Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin I
Leiter: Prof. Dr. Thomas Seufferlein

Identifikation differentiell exprimierter Gene im Kontext krankheitsassoziierter HLA-Haplotypen bei Typ 1 Diabetes

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Nadja Schäfer
geboren in Sindelfingen

2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Böhm

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Uwe Knippschild

Tag der Promotion: 04.07.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1

1.1 Zentrale und periphere Toleranz 1

1.2 Subpopulationen von T-Helferzellen und ihre Rolle bei Autoimmunerkrankugen 2

1.3 Das humane Leukozytenantigen 3

1.4 Diabetes mellitus Typ 1 12

1.5 MicroRNA 18

1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit 23

2 Material und Methoden 25

2.1 Material 25

2.2 Methoden 35

2.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes 35

2.2.2 Zellzahlbestimmung 35

2.2.3 HLA-Typisierung 37

2.2.4 Herstellung von EBV-Überständen 37

2.2.5 EBV-Transformation 38

2.2.6 Stimulation von B-LCLs mit PMA bzw. IFN-γ 38

2.2.7 Kurzzeitstimulation von B-LCLs mit PMA 40

2.2.8 Bestimmung der sekretierten Zytokinmenge mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* 40

2.2.9 Bestimmung der Zellproliferation mittels BrdU-ELISA 42

2.2.10 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen 43

2.2.11 Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid-Färbung 45

2.2.12 Gesamt-RNA und miRNA-Extraktion aus B-LCLs 47

2.2.13 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration 47

2.2.14 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren 47

2.2.15 Polymerasekettenreaktion 48

2.2.16 Ligation 49

2.2.17 Transformation 50

2.2.18 Kolonie-PCR und Inokulation 50

2.2.19 Extraktion von Plasmid-DNA (Mini-Präparation) 51

2.2.20 Kontrollverdau 51
2.2.21 Sequenzierung 52
2.2.22 Reverse Transkription von Gesamt-RNA 52
2.2.23 Reverse Transkription von miRNA 53
2.2.24 *Real-time*-quantitative PCR 54
2.2.25 Expressionsanalyse von miRNA 62
2.2.26 Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung 65
2.2.27 Statistische Auswertung 69

3 Ergebnisse 70

3.1 Analysen zur Generierung vergleichbarer Kulturbedingungen für B-LCLs 70
3.2 Untersuchung des Effekts von PMA auf B-LCLs 76
3.3 Untersuchungen zu Genexpressions- und Sekretionsunterschieden von TNF-α und IL-10 im Kontext verschiedener HLA-Konstellationen und des Stimulus 81
3.4 Untersuchungen zu Expressionsunterschieden am HLA-Locus im Kontext verschiedener HLA-Konstellationen und des Stimulus 88
3.5 Untersuchungen zu miRNA-Expressionsunterschieden im Kontext verschiedener HLA-Konstellationen und des Stimulus 113

4 Diskussion 126

4.1 TNF-α- und IL-10-Produktion in Abhängigkeit von der HLA-Konstellation und des Stimulus 128
4.2 Untersuchungen zu Expressionsunterschieden am HLA-Locus in Abhängigkeit von der HLA-Konstellation und des Stimulus 131
4.3 MiRNA-Expressionsunterschiede in Abhängigkeit von der HLA-Konstellation und des Stimulus 139
4.4 Ausblick 143

5 Zusammenfassung 146

6 Literaturverzeichnis 148

7 Anhang 166

8 Danksagung 184

9 Lebenslauf 186

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
A	Adenin
Ago	Argonaut
ARF	Adenosyl-Ribosylierungsfaktor
ATP	Adenosintriphosphat
BFA	Brefeldin A
B-LCLs	lymphoblastoide B-Zelllinien
BLS	*Bare Lymphocyte Syndrome*
bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C2	*complement component 2*
C4A	*complement component 4A (Rodgers blood group)*
C4B	*complement component 4B (Chido blood group)*
C. elegans	*Caenorhabditis elegans*
ca.	circa
CD	*Cluster of Differentiation*
cDNA	komplementäre DNA
CIITA	*Major histocompatibility complex class II transactivator*
CSA	Cyclosporin A
Ct-Wert	*cycle threshold*-Wert
CV	*coefficient of variation*; Variationskoeffizient
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
dbMHC	*Major Histocompatibility Complex database*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
dT	Desoxythymidin
E	PCR-Effizienz
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
et al.	und andere
FACS	*Fluorescence-activated Cell Sorting;* Durchflusszytometer

FCS	*fetal calf serum;* fetales Kälberserum
FES	*Feature Extraction Software*
FOXP3	*forkead box P3*
G	Guanin
G0/G1-Phase	Ruhephase/Gap1-Phase
G2/M-Phase	Gap2-Phase/Mitosephase
GAD65	Isoform 65 der Glutamat-Decarboxylase
gDNA	genomische DNA
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H-2	Histokompatibilitätsantigen-2
HGNC	*HUGO Gene Nomenclature Committee*
HLA	humanes Leukozytenantigen
HRP	*horseradish peroxidase*; Meerrettichperoxidase
hsa	*Homo sapiens*
Hsp	Hitzeschockprotein
HUGO	*the Human Genome Organisation*
HVR	hypervariable Region
IDDM	*Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*
IFN-γ	Interferon-gamma
IFN-γ-S	mit Interferon-gamma stimuliert
IL	Interleukin
IMGT	*the international immunogenetics information system*
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB-Medium	*lysogeny broth*-Medium
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
LD	*linkage disequilibrium*; Kopplungsungleichgewicht
LPS	Lipopolysaccharide
LU	*light unit*
Max	Maximum
Mb	Megabasenpaare
MCS	*Multiple Cloning Site*
m-DCs	myeloische dendritische Zellen
MHC	*Major Histocompatibility Complex;* Haupthistokompatibilitätskomplex
Min	Minimum
min	Minute
miRNA	microRNA
mir-X	Vorläufer-microRNA-X (X steht für die jeweilige Identifikationsnummer)
miR-X	reife microRNA-X (X steht für die jeweilige Identifikationsnummer)
ml	Milliliter
M-MuLV	*Moloney Murine Leukemia Virus*
mo-DCs	aus Monozyten abgeleitete dendritische Zellen
MODY	*Maturity Onset Diabetes of the Young*

M-Phase	Mitosephase
mRNA	*messenger RNA*
MS	Multiple Sklerose
mTEC	medulläre Thymus-Epithelzellen
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Probanden
n.a.	*not available*
n.s.	nicht signifikant
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
ng	Nannogramm
nm	Nannometer
NOD-Maus	*Non-Obese Diabetic Mouse*
OD	optische Dichte
ORF	*open reading frame*
P	Probanden-ID
p	Fehlerwahrscheinlichkeit
PBLs	periphere Blutlymphozyten
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Pikogramm
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H+-Konzentration
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMA-S	mit Phorbol-12-myristat-13-acetat stimuliert
POD	Peroxidase
pre-miRNA	Vorläufer-microRNA
pri-miRNA	primäre microRNA
Probanden-ID	Probandenidentität
qRT-PCR	*real-time*-quantitative-PCR
RA	Rheumatoide Arthritis
Ran-GTP	*Ras-related nuclear protein-GTP*
RefSeq	Referenzsequenz aus NCBI
RFX	*regulatory factor X*
RFXANK	*RFX ankyrin repeats*
RFXAP	*RFX-associated protein*
RISC	*RNA-induced silencing complex*
Rn	normalisierte Fluoreszenzwerte
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNA-Pol II	RNA-Polymerase II
RNA-Seq	Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung
rpm	*rounds per minute*
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR

s.o.	siehe oben
sog.	so genannt(e, er, es)
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SEM	Standardfehler
SI	Stimulationsindex
SNP	*single nucleotide polymorphism*; Einzelnukleodid-Polymorphismus
S-Phase	Synthesephase
SSO	*Sequenz Specific Oligonucleotides*
Std	Standard
T	Thymin
T1D	Typ 1 Diabetes
T2D	Typ 2 Diabetes
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-Polymerase	*Thermus aquaticus*-Polymerase
TCR	T-Zellrezeptor
TGF-β	*Transforming Growth Faktor-beta*
Th1-Zellen	Typ1-T-Helferzellen
Th2-Zellen	Typ2-T-Helferzellen
HUGO	*the Human Genome Organisation*
TM	Transmembran-Domäne
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRBP	*transactivation-responsive RNA-binding protein*
Treg-Zellen	regulatorische T-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/µl	Units pro Mikroliter
U	Uracil
u.a.	unter anderem
UCSC	*University of California, Santa Cruz*
US	unstimuliert
usw.	und so weiter
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
VNTR	*variable number of tandem repeats*
vs.	*versus*
z.B.	zum Beispiel
Zp	Zeitpunkt

Die in dieser Arbeit verwendeten offiziellen Gensymbole und Gennamen nach "*the Human Genome Organisation (HUGO) Gene Nomenclature Consortium*" sind im Anhang auf Seite 166 aufgeführt.

1 Einleitung

Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, den Organismus vor Pathogenen wie Bakterien, Pilzen, Parasiten und Viren zu schützen. Als zentrales Element gilt dabei die Fähigkeit, körpereigene von körperfremden Antigenen unterscheiden zu können. Erstere müssen, nachdem sie als körpereigen vom Organismus erkannt wurden, vom Immunsystem toleriert werden. Daher existieren mehrere Toleranzmechanismen, um die Bildung autoreaktiver Immunzellen zu kontrollieren.

1.1 Zentrale und periphere Toleranz

Sowohl B- als auch T-Zellen werden durch zentrale und periphere Toleranzmechanismen kontrolliert. Bei der zentralen Toleranz der T-Zellen im Thymus werden die aus dem Knochenmark stammenden, doppelt positiven Vorläuferzellen (Thymozyten), die sowohl CD4- als auch CD8-Rezeptoren tragen (CD4+/CD8+), nach bestimmten Kriterien ausselektiert. Bei der im Thymus-Cortex stattfindenden positiven Selektion werden diejenigen T-Zellen selektiert, deren T-Zellrezeptoren körpereigene MHC/Peptid-Komplexe (Haupthistokompatibilitätskomplex mit gebundenem Peptid) mit mittlerer Affinität binden können. Diese durchwandern anschließend die Medulla und verlassen den Thymus entweder als reife CD4+ oder CD8+ T-Zellen und gelangen in die Peripherie (Simmonds und Gough, 2005). Thymozyten, welche körpereigene MHC/Peptid-Komplexe nicht erkennen, sterben. Binden die T-Zellrezeptoren der Thymozyten körpereigene MHC/Peptid-Komplexe dagegen mit sehr hoher Affinität, gehen diese in Apoptose (negative Selektion) und werden somit ebenfalls ausselektiert (Alberola-Ila *et al.*, 1996).
Die Expression von gewebespezifischen Antigenen, wie beispielsweise Insulin, durch medulläre Thymus-Epithelzellen (mTEC), spielt eine entscheidende Rolle bei der negativen Selektion autoreaktiver T-Zellen in der Medulla. Sie wird über den Transkriptionsfaktor *autoimmune regulator* (AIRE) reguliert (Simmonds und Gough, 2005). Durch Mutationen im *AIRE*-Gen werden keine gewebespezifischen Antigene an der Oberfläche von mTECs mehr präsentiert, wodurch die Deletion von autoreaktiven T-Zellen ausbleibt und Autoimmunerkrankungen ausgelöst werden können (Liston *et al.*, 2003).

Gelangen autoreaktive T-Zellen in die Peripherie, werden sie dort durch weitere Toleranzmechanismen, die unter anderem durch regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) vermittelt werden, kontrolliert. Treg-Zellen sind für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz des Immunsystems durch die Suppression autoreaktiver T-Zellen essentiell (Beissert *et al.*, 2006).

1.2 Subpopulationen von T-Helferzellen und ihre Rolle bei Autoimmunerkrankungen

Verschiedene Subpopulationen von T-Helferzellen (Typ 1 und Typ 2) sezernieren unterschiedliche Zytokine und beeinflussen dadurch die Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Die charakteristischen Zytokine dieser Subpopulationen sind in Abbildung 1.1 dargestellt. Die von Typ 1 T-Helferzellen (Th1-Zellen) gesteuerte Immunantwort wird über Zytokine vermittelt, welche die zelluläre Immunantwort unterstützen. Dagegen begünstigt die von Typ 2 T-Helferzellen (Th2-Zellen) gesteuerte Immunantwort die humorale Immunabwehr (Tisch und McDevitt, 1996). Somit erfolgt die Differenzierung der T-Helferzellen nach Antigenkontakt in verschiedene CD4+ Subpopulationen durch eine differentielle Zytokinproduktion, welche unterschiedliche Immunreaktionen auslöst. Ein Ungleichgewicht in der Quantität und im zeitlichen Verlauf dieser Zytokinproduktion ist häufig an der Ausbildung verschiedener Autoimmunerkrankungen wie Myokarditis (Rose, 2011), Lupus erythematodes (Apostolidis *et al.*, 2011) und Typ 1 Diabetes (T1D) beteiligt (Singh *et al.*, 2011).

Bei T1D sind die von Th1-Zellen produzierten Zytokine Interleukin (IL)-2, der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α) und Interferon-gamma (IFN-γ) mit der Ausbildung der Erkrankung assoziiert. Dagegen haben von Th2-Zellen und Treg-Zellen sezernierte Zytokine, wie IL-4, IL-10 und der *Transforming Growth Faktor-beta* (TGF-β), bei T1D einen eher protektiven Effekt (Rabinovitch und Suarez-Pinzon, 2007).

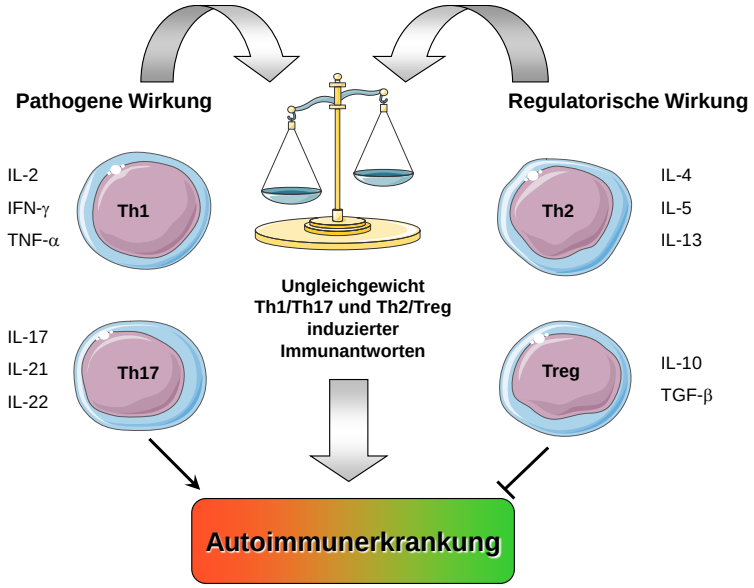


Abbildung 1.1: Charakteristische Zytokine mit pathogener oder regulatorischer Wirkung im Kontext mit Autoimmunerkrankungen. Charakteristische Zytokine der Th1-Zellen sind IL-2, IFN-γ und TNF-α, wohingegen die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 von Th2-Zellen produziert werden (Coffman, 2006). Weitere CD4+ Subpopulationen sind Th17-Zellen, welche IL-17, IL-21 und IL-22 produzieren und generell einen pathogenen Effekt haben, sowie Treg-Zellen, welche IL-10 und TGF-β produzieren und regulatorisch wirken. Um schwerwiegende pathologische Folgen für den Organismus zu vermeiden, muss ein Gleichgewicht zwischen von Th1-Zellen und Th2-Zellen induzierter Immunantwort aufrechterhalten werden (Moudgil und Choubey, 2011). Verwendete Abkürzungen: IFN-γ: Interferon-gamma; IL: Interleukin; Th: T-Helferzellen; Treg-Zellen: regulatorische T-Zellen; TGF-β: *Transforming Growth Factor-beta*; TNF-α: Tumornekrosefaktor-alpha.

1.3 Das humane Leukozytenantigen

Bereits in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts beschrieben Peter Gorer und George Snell als erste den murinen Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) (Vandiedonck und Knight, 2009). Anstelle der Bezeichnung MHC wird bei der Maus auch die Bezeichnung Histokompatibilitätsantigen-2 (H-2) und beim Menschen die Bezeichnung humanes Leukozytenantigen (HLA) verwendet. Die Hauptaufgabe des HLA-Komplexes ist das Erkennen körperfremder Antigene und die Präsentation derer prozessierten Peptide an spezialisierte Immunzellen, die wiederum den HLA/Peptid-Komplex erkennen und spezifische Immunreaktionen auslösen (Glynn, 1988). Um möglichst viele verschiedene Peptide erkennen zu können, hat sich im Laufe der Evolution eine sehr hohe Diversität im HLA-Locus entwickelt. Der humane HLA-Locus ist somit die Genregion mit dem höchsten Grad an Polymorphismus und kodiert für

eine Vielzahl strukturell verschiedener HLA-Moleküle (Janeway *et al.*, 2001; Piertney und Oliver, 2006; Ujvari und Belov, 2011).

Der HLA-Komplex beim Menschen erstreckt sich genomisch über einen 3600 kb großen Bereich (entspricht etwa 0,12% des humanen Genoms), der auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (6p21.31) lokalisiert ist und mehr als 200 Genloci mit überwiegend immunologischen Funktionen umfasst (The MHC sequencing consortium, 1999; Vandiedonck und Knight, 2009). Abhängig von deren Struktur und Funktion lassen sich die Gene in drei verschiedene Klassen unterteilen. Die Klasse-I-Region umfasst ca. 1900 kb und beinhaltet unter anderem die klassischen Gene *HLA-A*, *HLA-B* und *HLA-C*, welche von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert werden. HLA-Klasse-I-Moleküle präsentieren vom Proteasom prozessierte endogene Peptide an CD8+ T-Zellen (Neefjes *et al.*, 2011). Die Klasse-II-Region umfasst dagegen nur etwa 900 kb und beherbergt unter anderem die HLA-Loci HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ, deren Gene vorwiegend von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden (Vandiedonck und Knight, 2009). Die HLA-Klasse-II-Moleküle präsentieren exogene Antigene, welche zuvor im Endosom durch Proteasen prozessiert wurden, an CD4+ T-Zellen (Neefjes *et al.*, 2011). Die HLA-Klasse-III-Gene kodieren für verschiedene Moleküle mit meist immunologischen Funktionen, wie Komplementfaktoren (C2 und C4) und Tumornekrosefaktoren (TNF-α und TNF-β) (Abbildung 1.2) (Janeway *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 2003).

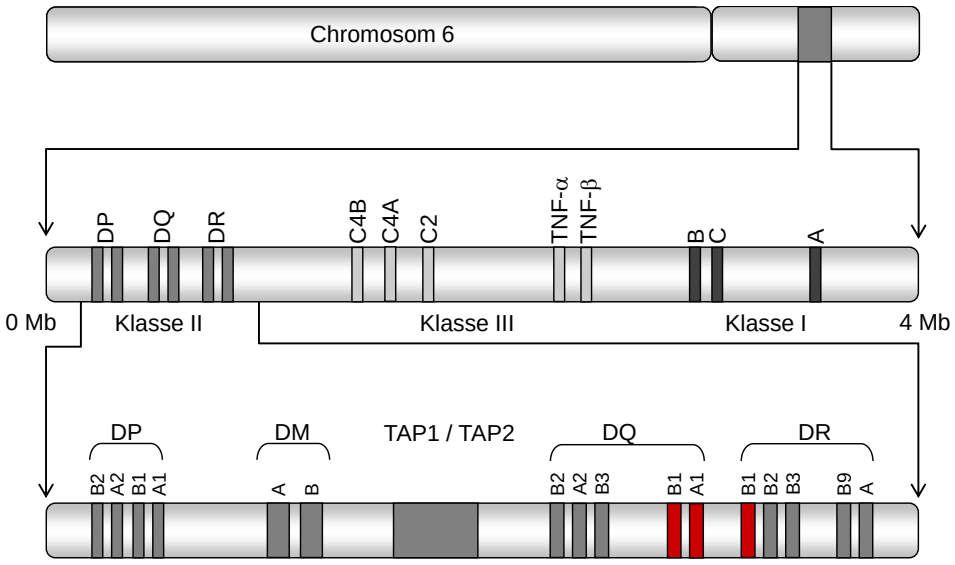


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der HLA-Genregion. Die HLA-Gene befinden sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 und werden in drei Klassen eingeteilt. Klassische Gene der Klasse-I-Region sind die Gene *HLA-A*, *HLA-B* und *HLA-C*. Zu den Klasse-III-Genen gehören die Gene die für Proteine des Komplementsystems (C4A, C4B, C2) und für die Zytokine TNF-α und TNF-β kodieren. Zur HLA-Klasse-II gehören die *TAP1*- und *TAP2*-Gene, deren Produkte an der Prozessierung von HLA-Klasse-I-Genen beteiligt sind, sowie die HLA-DR-, HLA-DQ-, HLA-DP- und HLA-DM-Regionen. HLA-DM ist an der Präsentation von Peptiden durch HLA-Klasse-II-Moleküle involviert. Die Gene *HLA-DQB1*, *HLA-DQA1* und *HLA-DRB1* (rote Banden) spielen bei der Entstehung diverser Autoimmunerkrankungen eine entscheidende Rolle. Verwendete Abkürzungen: HLA: humanes Leukozytenantigen; Mb: Megabasen; TNF-α: Tumornekrosefaktor-alpha; TNF-β: Tumornekrosefaktor-beta. Die verwendeten offiziellen Gensymbole und Gennamen nach „*the Human Genom Organisation*“ sind im Anhang auf Seite 166 aufgeführt. Abbildung modifiziert nach Simmonds und Gough (Simmonds und Gough, 2005).

Die Gene der HLA-DQ- und HLA-DP-Regionen kodieren jeweils für eine α- und eine β-Kette, welche beide hoch-polymorph sind. Gegenwärtig sind für *HLA-DQA1* (α-Kette) 51 Allele, für *HLA-DQB1* (β-Kette) 509 Allele, für *HLA-DPA1* (α-Kette) 37 Allele und für *HLA-DPB1* (β-Kette) 248 Allele bekannt (Quelle: http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html; Stand: 31. Januar 2014; Robinson *et al.,* 2011). Im Gegensatz dazu findet man in der HLA-DR-Region ein weniger polymorphes α-Kettengen mit nur 7 Allelen, sowie die vier teils hoch-polymorphe β-Kettengene *DRB1* (1.411 Allele), *DRB3* (58 Allele), *DRB4* (15 Allele) und *DRB5* (20 Allele) und fünf Pseudogene (*DRB2*, *DRB6*, *DRB7*, *DRB8* und *DRB9*) (Quelle: http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html; Stand: 31. Januar 2014; Robinson *et al.,* 2011).

Zwischen den verschiedenen HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 besteht ein starkes Kopplungsungleichgewicht. Das bedeutet, dass die Allele dieser HLA-Loci in einem Individuum auf Chromosom 6 gekoppelt vorliegen, was als HLA-Haplotyp bezeichnet wird (Vandiedonck und Knight, 2009). Jedes Individuum erbt somit einen HLA-Haplotypen von der Mutter und einen HLA-Haplotypen vom Vater. Die Kombination beider HLA-Haplotypen wird in der vorliegenden Arbeit als die „HLA-Konstellation“ der betreffenden Person bezeichnet.

Des Weiteren besteht ein Kopplungsungleichgewicht zwischen Polymorphismen im Promotorbereich von *TNF* (veraltet auch als *TNFA* bezeichnet) und HLA-Haplotypen (Shaw *et al.*, 2004; Furst *et al.*, 2012).

1.3.1 HLA-Klasse-II-Moleküle

1.3.1.1 Nomenklatur von HLA-Klasse-II-Genen

Aufgrund der sehr hohen Polymorphie der HLA-Gene erfolgt die Unterscheidung verschiedener Genvarianten anhand einer speziellen Nomenklatur. Sie gibt Auskunft über die spezifische HLA-Genregion, die Antigenvariante, ein spezifisches Allel und deren weitere Untergliederung in Suballele. Da die Anzahl an bekannten HLA-Allelen stetig steigt, wurden zur besseren Übersicht im April 2010 Doppelpunkte als Separatoren in die Allelnamen eingefügt. In Veröffentlichungen, die nach April 2010 erschienen sind, findet man gegenwärtig sowohl die neue als auch die alte Nomenklatur (Eerligh *et al.*, 2011; van Lummel *et al.*, 2012). In Tabelle 1.1 ist die Nomenklatur der HLA-Klasse-II-Gene vor und nach April 2010 anhand eines Beispiels dargestellt (Marsh *et al.*, 2010).

Tabelle 1.1: Nomenklatur von HLA-Klasse-II-Genen.
Quellen: (http://hla.alleles.org/nomenclature/naming_prev.html; Stand 31. Januar 2014; http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html; Stand: 31. Januar 2014; Marsh *et al.*, 2010). Verwendete Abkürzungen: HLA: humanes Leukozytenantigen.

Nomenklatur vor April 2010[a]	**Nomenklatur nach April 2010**	**Bedeutung**
HLA	HLA	Die HLA-Region und Prefix für HLA-Gene
HLA-DRB1	*HLA-DRB1*	Ein spezieller HLA-Locus hier: DRB1
*HLA-DRB1*13*	*HLA-DRB1*13*	Eine Gruppe von Allelen, welche für die Antigenvariante DR13 kodiert
*HLA-DRB1*1301*	*HLA-DRB1*13:01*	Ein spezifisches HLA-Allel
*HLA-DRB1*130102*	*HLA-DRB1*13:01:02*	Ein Allel, das sich durch eine stille Mutation von *DRB1*030101* bzw. *DRB1*03:01:01* unterscheidet
*HLA-DRB1*13010102*	*HLA-DRB1*13:01:01:02*	Ein Allel, das eine Mutation im nichtkodierenden Bereich von *DRB1*13010101* bzw. *DRB1*13:01:01:01* enthält

[a]: in der vorliegenden Arbeit wurde die alte Nomenklatur verwendet.

1.3.1.2 Aufbau und Struktur von HLA-Klasse-II-Molekülen

HLA-Klasse-II-Moleküle sind Glykoproteine, die sich aus einer 33 – 35 kDa schweren α-Kette und einer 25 – 30 kDa schweren β-Kette zu einem Heterodimer zusammensetzen. Die membrandistalen α1- und β1-Domänen bilden die peptid-

bindende Grube, deren Boden aus einem β-Faltblatt und deren Wände aus α-Helices bestehen (Jones *et al.*, 2006). Sie können exogene Antigene mit einer Länge von 12 – 25 Aminosäuren binden (Kelly *et al.*, 2003). Die peptidbindenden α1- und β1-Domänen der HLA-Klasse-II-Moleküle sind, mit Ausnahme der α-Kette der HLA-DR-Moleküle, hoch polymorph. Diese hypervariablen Regionen (HVR) befinden sich oft an den Wänden der peptidbindenden Grube und sorgen für eine hohe Variabilität in deren dreidimensionaler Struktur (Abbildung 1.3). Durch diese Vielgestaltigkeit der HLA-Klasse-II-Moleküle wird die Diversität der Antigene, die dort gebunden werden können, erhöht (Schueler-Furman *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 2003).

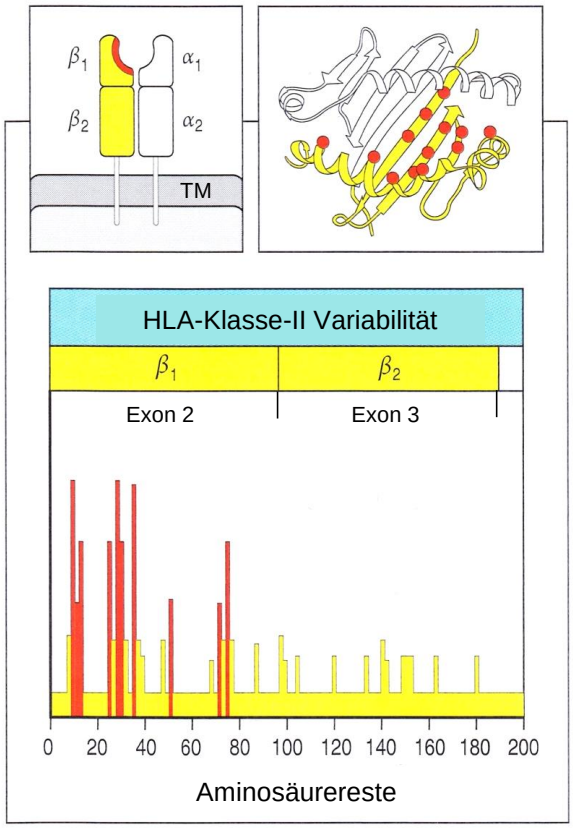


Abbildung 1.3: Struktur und Variabilität von HLA-Klasse-II-Molekülen. In dieser Abbildung sind die Struktur und die Variabilität der HLA-DR-Moleküle dargestellt. Die beiden oberen Abbildungen zeigen ein HLA-Klasse-II-Dimer, das von einer invarianten α-Kette, bestehend aus den Domänen α1 und α2 (weiß) und einer stets polymorphen β-Kette, bestehend aus den Domänen β1 und β2 (gelb) gebildet wird. Die peptidbindende Grube wird von der α1- und β1-Kette geformt und bildet deren seitliche Begrenzung. Der höchste Grad an Polymorphismus befindet sich in der β1-Domäne (rot hervorgehoben). Die untere Abbildung stellt die Variabilität von HLA-Klasse-II-Molekülen dar. Die hypervariablen Regionen (rote Balken) sind für die Diversität der peptidbindenden Grube verantwortlich (Abbildung modifiziert nach der Abbildung im Buch „Janeway Immunologie“ 7. Auflage, S. 254 (Murphy *et al.*, 2009)). Im Gegensatz zu HLA-DR-Molekülen ist bei HLA-DQ und HLA-DP-Molekülen die α-Kette ebenfalls polymorph (nicht dargestellt). Verwendete Abkürzungen: HLA: humanes Leukozytenantigen; TM: Transmembran-Domäne.

Die peptidbindende Grube von HLA-DR- und HLA-DQ-Molekülen (Orthologe bei Mäusen: I-E- und I-A-Moleküle) ist sehr ähnlich. Peptide, die mit ihren konservierten Aminosäureresten an Position 1 – 9 (P 1 – 9) der Bindungstaschen der peptidbindenden Gruben binden, bilden mit den Amino- und Carboxygruppen des konservierten Peptidrückrads Wasserstoffbrückenbindungen aus (Brown *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 2006). Bei den verschiedenen Bindungstaschen handelt es sich um sterisch unterschiedliche Vertiefungen in der Bindungsgrube (Abbildung 1.4). Je nach Phänotyp des HLA-Klasse-II-Moleküls variieren diese Bindungstaschen in Form und Größe, wodurch die Interaktion mit spezifischen Antigenen beeinflusst wird (Ettinger und Kwok, 1998; Cucca *et al.*, 2001). Durch die Diversität der peptidbindenden Grube existieren mit bestimmten Autoimmunerkrankungen positiv bzw. negativ assoziierte HLA-Klasse-II-Moleküle (Jones *et al.*, 2006). Der Zusammenhang zwischen T1D und der dreidimensionalen Struktur von HLA-Klasse-II-Molekülen ist in Abschnitt 1.4.2 beschrieben.

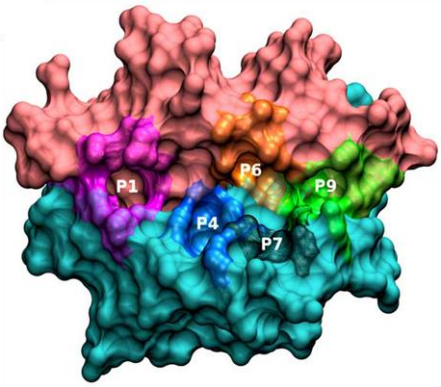


Abbildung 1.4: Bindungsgrube von HLA-Klasse-II-Molekülen. Die Bindungsgrube wird von der α1-Kette (rosa) und β1-Kette (türkis) gebildet. Die Bindungstaschen P1, P4, P6, P7 und P9 sind als verschieden farbige Vertiefungen dargestellt. Sie sind für die Spezifität der Bindung zwischen dem HLA-Klasse-II-Molekül und einem bestimmten Peptidfragment verantwortlich. Verwendete Abkürzungen: HLA: humanes Leukozytenantigen. Quelle: (Agudelo und Patarroyo, 2010).

1.3.1.3 Differentielle Expression von HLA-Klasse-II-Genen

Neben der Vielfalt in der Proteinstruktur der peptidbindenden Grube der HLA-Klasse-II-Moleküle und den damit verbundenen Assoziationen zu verschiedenen Autoimmunerkrankungen, können auch Unterschiede im Expressionsmuster von HLA-Klasse-II-Genen bei der Krankheitsausprägung von Bedeutung sein. Eine differentielle Expression protektiver bzw. prädisponierender Allele von antigen-

präsentierenden Zellen ist daher, neben den strukturellen Unterschieden, eine weitere Möglichkeit deren negative bzw. positive Assoziation zu spezifischen Erkrankungen zu erklären (Andersen *et al.*, 1991; Baumgart *et al.*, 1998). Die unterschiedliche Expression von prädisponierenden HLA-Klasse-II-Molekülen an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen kann zu unterschiedlichen Interaktionen der HLA/Peptid-Komplexe mit T-Zellen führen. Dadurch wiederum kann das Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zellen und somit die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen verschoben werden (Baumgart *et al.*, 1998). Eine unterschiedliche Expression von HLA-Klasse-II-Genen wurde von Heldt und Kollegen im Zusammenhang mit Rheumatoider Arthritis (RA) beschrieben. Sie untersuchten dafür Polymorphismen der Promotorsequenzen von *HLA-DRB*-Genen und die daraus resultierenden quantitativen Unterschiede verschiedener mit RA assoziierter HLA-Haplotypen (Heldt *et al.*, 2003). Einen Einfluss von Polymorphismen im Promotorbereich von HLA-Klasse-II-Genen auf deren Expression wurde ebenfalls von Morzycka-Wroblewska *et al*. beobachtet. Sie konnten zeigen, dass die differentielle Expression von *HLA-DQA1*-Allelen mit Polymorphismen in den Promotorsequenzen assoziiert ist (Morzycka-Wroblewska *et al.*, 1997). Des Weiteren wurden allelspezifische Unterschiede in Promotorbereichen von *HLA-DQB1*-Genen von Andersen *et al*. beschrieben (Andersen *et al.*, 1991). Die Arbeitsgruppe um Britten *et al*. fand zudem, dass allelspezifische *messenger RNA* (mRNA)-Level von *HLA-DQB1*-Genen mit deren relativer Promotoraktivität korrelieren (Britten *et al.*, 2009).

Die Regulation der Immunantwort ist somit zum einen abhängig von Polymorphismen in proteinkodierenden Bereichen, welche sterische Auswirkungen auf die peptidbindende Grube haben und dadurch die Interaktion zwischen Antigenen und HLA-Klasse-II-Molekülen beeinflussen. Zum anderen spielen Polymorphismen in den regulatorischen Regionen, welche die Transkriptionsaktivität der Promotoren und die damit verbundene differentielle Expression verschiedener Allele verursachen, ebenfalls eine wichtige Rolle (Louis *et al.*, 1994).

1.3.1.4 Rolle des Transkriptionsfaktors RFX bei der Expression von HLA-Klasse-II-Genen

Für die Regulation der Expression von HLA-Klasse-II-Genen ist der Transkriptionsfaktor RFX (*regulatory factor X*) essentiell. RFX ist ein trimerer Komplex bestehend aus den Proteinen RFXANK (*RFX ankyrin repeats*), RFX5 (*regulatory factor X, 5*) und RFXAP (*RFX-associated protein*), welcher an die X-Box des Promotors der HLA-Klasse-II-Gene bindet. Polymorphismen im Promotorbereich können die Bindungsaffinität von RFX modifizieren und haben daher einen maßgeblichen Einfluss auf die HLA-Klasse-II-Expression (Reith *et al.*, 1990; Andersen *et al.*, 1991; Reith und Mach, 2001). Die Relevanz des RFX-Komplexes für die Expression von HLA-Klasse-II-Genen wird anhand des *Bare Lymphocyte Syndroms* (BLS), besonders deutlich. Dieser schwere Immundefekt ist durch inadäquate Expression der HLA-Klasse-II-Gene charakterisiert. Dies resultiert aus Mutationen in den Genen des RFX-Komplexes und CIITA (*Major histocompatibility complex class II transactivators*), einem transkriptionellen Coaktivator, wodurch die Bindung an die X-Box des Promotors gestört ist (Reith und Mach, 2001).

1.3.1.5 HLA-Klasse-II-Gene und Autoimmunerkrankungen

Verschiedene HLA-Allele spielen bei der Ausbildung von Autoimmunerkrankungen eine bedeutende Rolle. Dabei gibt es mit einer bestimmten Krankheit positiv assoziierte und negativ assoziierte Allele. Wie stark die jeweiligen Allele an der Entwicklung der Erkrankung beteiligt sind, wird als relatives Risiko angegeben. Es beschreibt das Erkrankungsrisiko einer Person, die ein bestimmtes mit einer Krankheit assoziiertes Allel trägt, im Vergleich zu einer Kontrollperson, welche dieses Allel nicht trägt. Es sind mehrere mit dem HLA-System assoziierte Autoimmunerkrankungen bekannt.

Ein Beispiel ist die neurodegenerative Erkrankung Multiple Sklerose (MS). Sie ist mit den HLA-Allelen *DRB5*0101*, *DRB1*1501* und *DQB1*0602* positiv assoziiert (Jones *et al.*, 2006). Eine weitere Erkrankung, die mit *DQB1*0602* positiv assoziiert ist, ist die Narkolepsie, bei der es sich um eine chronische neurologische Erkrankung handelt (Mignot, 1998; Longstreth *et al.*, 2007). Individuen,

die dieses Allel homozygot tragen, haben das höchste Erkrankungsrisiko, was auf einen gendosisabhängigen Effekt hinweist (Mignot *et al.*, 2001).
Die RA, bei der es sich um eine chronische inflammatorische Erkrankung der Gelenke handelt, ist dagegen mit den Allelen *DRB1*0401*, *DRB1*0404* und *DRB1*0101* positiv assoziiert (Hammer *et al.*, 1995).
Zoliakie, eine chronische Erkrankung der Dünndarmschleimhaut, die durch eine Glutenunverträglichkeit verursacht wird, ist positiv mit HLA-DQA1*0501-DQB1*0201 (DQ.2) (kommt bei 90% der Betroffenen vor) und HLA-DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ8) (kommt bei 5% der Betroffenen vor) assoziiert (Sollid, 2002; Jones *et al.*, 2006). Beide Moleküle haben eine erhöhte Affinität für verschiedene Glutenepitope, welche über die T-Zellrezeptoren (TCR) an glutenreaktiven T-Zellen präsentiert werden und somit einen trimolekularen Komplex (MHC-Peptid-TCR) ausbilden (Sollid, 2002; Jones *et al.*, 2006). Die Gendosis von *HLA-DQ2* hat einen starken Effekt auf das Ausmaß der glutenspezifischen T-Zellantwort, welche mit der Menge an DQ2-Molekülen korreliert (Vader *et al.*, 2003).
Auch T1D gehört zu den chronischen Autoimmunerkrankungen, die mit dem HLA-System assoziiert sind. Dieser Zusammenhang wird ab Kapitel 1.4 genauer beschrieben.

1.3.1.6 Das „*MHC Haplotype Consortium*“

Der hohe Grad an Polymorphismus der HLA-Klasse-II-Gene spielt bei der Anfälligkeit für verschiedene Erkrankungen, wie T1D, MS und RA eine entscheidende Rolle. Daher ist die Identifikation bestimmter Genvarianten von großer Bedeutung. Zu diesem Zweck wurde im Jahr 2000 das „*MHC Haplotype Consortium*“ gegründet, mit dem Ziel, möglichst viele Informationen über die allelische Diversität im HLA-Locus zu erhalten. Dafür wurden acht Zelllinien mit homozygoten HLA-Haplotypen verwendet, die entweder einen protektiven oder prädisponierenden Effekt für T1D oder MS aufweisen und in der europäischen Bevölkerung verbreitet sind. Der HLA-Haplotyp *A3-B7-DR15* der Zelllinie PGF ist in das humane Referenzgenom (GRCh37/hg19; seit Februar 2009) des *Genome Reference Consortiums* inkorporiert. Die anderen sieben HLA-Haplotypen werden als „alternative Loci“ bezeichnet (Horton *et al.*, 2008; http://www.ucl.ac.uk/cancer/medical-genomics/mhc; Stand: 31. Januar 2014).

1.4 Diabetes mellitus Typ 1

Diabetes mellitus ist eine chronische Erkrankung, welche durch relativen oder absoluten Insulinmangel und der daraus resultierenden Hyperglykämie charakterisiert ist. Bleibt der Diabetes unbehandelt, können beträchtliche Folgeerkrankungen wie Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie, sowie kardiovaskuläre Erkrankungen auftreten (Mehers und Gillespie, 2008).

Diabetes mellitus lässt sich in zwei Hauptgruppen einteilen: Typ 1 Diabetes (T1D) und Typ 2 Diabetes (T2D).
T2D ist durch eine inadäquate Insulinproduktion bei progressiver Insulinresistenz charakterisiert (McCarthy, 2010). Beim T1D handelt es sich dagegen um eine organspezifische, multifaktorielle Autoimmunerkrankung, die aus der irreversiblen Zerstörung der insulinproduzierenden β-Zellen des Pankreas resultiert (Concannon *et al.*, 2005). Die Manifestation des T1D erfolgt über einen Zeitraum von mehreren Jahren. Schon vor Auftreten der diabetischen Symptome können immunologische Marker nachgewiesen werden, die auf den Prozess der fortschreitenden Zerstörung der β-Zellen hinweisen. Erst wenn 60 – 90% der β-Zellen zerstört sind, kommt es zum Auftreten der diabetischen Symptome (van Belle *et al.*, 2011). Als Charakteristikum dieser Erkrankung gilt die Erstdiagnose im Kindes- und Jugendalter sowie das Vorhandensein organspezifischer Autoantikörper gegen beispielsweise die Isoform 65 der Glutamat-Decarboxylase (GAD65) (Schott *et al.*, 1994), Insulin und seiner Prohormone Proinsulin und Präproinsulin (Congia *et al.*, 1998), sowie gegen die Tyrosinphosphatase IA-2 (Lan *et al.*, 1996).
Eine entscheidende Rolle bei der Manifestation der Erkrankung spielen die T-Lymphozyten. Die CD8+ zytotoxischen T-Zellen sind bei der Initiation der Pathogenese des T1D von großer Bedeutung (Tisch und McDevitt, 1996; Groen *et al.*, 2003). Sie erkennen MHC-Klasse-I-Antigenkomplexe, die sich an der Oberfläche der insulinproduzierenden β-Zellen befinden und leiten deren Zerstörung ein (Tisch und McDevitt, 1996). Zudem sezernieren sowohl CD8+ zytotoxische T-Zellen, als auch CD4+ T-Helferzellen verschiedene Zytokine wie IFN-γ und TNF-α, welche einen toxischen Effekt auf die β-Zellen ausüben (Tisch und McDevitt, 1996; von Herrath und Oldstone, 1997; Rabinovitch, 1998; Lehuen *et al.*, 2010). Neben CD4+ und CD8+ T-Zellen sind auch andere Zellen, wie Treg-

Zellen, Makrophagen, B-Zellen und natürliche Killerzellen an der Pathogenese des T1D beteiligt (Willcox *et al.*, 2009).

1.4.1 Genetische Prädisposition für T1D

Es sind 18 verschiedene Loci im humanen Genom bekannt, die mit T1D assoziiert sind (Concannon *et al.*, 2005). Ein Suszeptibilitätslocus für T1D ist das Gen, welches für Insulin kodiert (IDDM2). Es ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11p15.5) lokalisiert und macht etwa 10% des genetischen Risikos an T1D zu erkranken aus (Bell *et al.*, 1984; Davies *et al.*, 1994). Die variable Menge an *tandem repeats* (*variable number of tandem repeats*, VNTR) in der Promotorregion des Insulingens ist an der Regulation der produzierten Insulinmenge beteiligt (Bennett *et al.*, 1995; Mehers und Gillespie, 2008). Eine geringe Anzahl an *tandem repeats* (26 – 63) ist mit einer hohen T1D-Prädisposition assoziiert, wohingegen eine hohe Anzahl an *tandem repeats* (140 – 200) einen protektiven Effekt hat (Bennett *et al.*, 1995; Mehers und Gillespie, 2008; Raha *et al.*, 2009).

Der am stärksten mit T1D assoziierte Suszeptibilitätslocus ist jedoch das HLA-System (IDDM1), das als solches bereits in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts entdeckt wurde (Nerup *et al.*, 1974).

Der HLA-Haplotyp mit der höchsten T1D-Suszeptibilität ist *HLA-DRB1*0405*, **0401* oder **0402* gekoppelt mit *DQA1*0301-DQB1*0302* (*DR4-DQ8*) (Thomson *et al.*, 2007; Noble und Erlich, 2012). Ein weiterer HLA-Haplotyp mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko ist *HLA-DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201* (*DR3-DQ2*) (Noble und Erlich, 2012). Etwa 90% der Kaukasier, die an T1D erkranken, tragen mindestens einen dieser HLA-Haplotypen. In der kaukasischen Gesamtbevölkerung sind es hingegen nur etwa 20% (Redondo *et al.*, 2001). Das höchste Erkrankungsrisiko besteht, wenn *HLA-DR4-DQ8* zusammen mit *HLA-DR3-DQ2* vererbt wird (Rotter *et al.*, 1983; Sheehy *et al.*, 1989; Noble und Erlich, 2012). Dies tritt bei Individuen mit T1D zu 35% auf, im Gegensatz zu 2,4% in der kaukasischen Gesamtbevölkerung (Redondo *et al.*, 2001).

Aus den beiden prädisponierenden HLA-Haplotypen *HLA-DQA1*0501-DQB1*0201* und *HLA-DQA1*0301-DQB1*0302* können vier verschiedene HLA-DQ-Moleküle gebildet werden. Zwei in *cis*-Konfiguration (DQA1*0501-DQB1*0201

und DQA1*0301-DQB1*0302) und zwei in *trans*-Konfiguration (DQA1*0501-DQB1*0302 und DQA1*0301-DQB1*0201) (She, 1996; Eerligh *et al.*, 2011). Die Möglichkeit zur Bildung von *trans*-Dimeren spielt für das Erkrankungsrisiko eine entscheidende Rolle, da die potentielle Bindung von spezifischen Peptiden an *trans*- bzw. *cis*-Dimere unterschiedlich sein kann (Koeleman *et al.*, 2004).

Liegen die Hochrisikoallele *DRB1*0401* oder *DRB1*0405* mit *DQB1*0301* (anstelle *DQB1*0302*) gekoppelt vor, sinkt das relative Risiko einen T1D zu entwickeln auf ein mittleres Risiko (Cucca *et al.*, 2001; Koeleman *et al.*, 2004). Wird das Hochrisikoallel *DQB1*0302* gekoppelt mit *DRB1*0404* vererbt, nimmt das Risiko an T1D zu erkranken ebenfalls leicht ab. Darüber hinaus hat *DQB1*0302* in Kombination mit *DRB1*0403* bzw. *DRB1*0406* einen protektiven Effekt (Park *et al.*, 1998; Redondo *et al.*, 2001; Koeleman *et al.*, 2004).

Neben HLA-Haplotypen mit einer hohen Suszeptibilität für T1D existieren auch HLA-Haplotypen mit einem stark protektiven Effekt, wie *DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602* (*DR2-DQ6.2*) (Noble und Erlich, 2012). Etwa 20% der kaukasischen Bevölkerung tragen diesen HLA-Haplotypen, wohingegen er bei Individuen mit T1D äußerst selten vorkommt (< 1%) (Baisch *et al.*, 1990; Pugliese *et al.*, 1995; Ettinger und Kwok, 1998). Bei heterozygoten Individuen, die einen Hochrisikohaplotypen (entweder *DR4-DQ8* oder *DR3-DQ2*) und den protektiven HLA-Haplotypen *DR2-DQ6.2* besitzen, kommt T1D ebenfalls sehr selten vor, was für einen dominanten Effekt des protektiven HLA-Haplotypen gegenüber den Hochrisikohaplotypen spricht (Baisch *et al.*, 1990). Die Bildung von DQ6/8 *trans*-Dimeren ist nicht möglich, so dass heterozygote Individuen nur die entsprechenden *cis*-Dimere exprimieren (Eerligh *et al.*, 2011). Weitere protektive Haplotypen sind *DR5* gekoppelt mit *DQA1*0501-DQB1*0301* und *DR7* gekoppelt mit *DQA1*0201-DQB1*0303* (Cucca *et al.*, 2001).

Die unterschiedlichen mit T1D assoziierten Haplotypen bestimmen nicht nur das relative Erkrankungsrisiko, sondern stehen auch im Zusammenhang mit dem Alter der Patienten bei der Erstdiagnose. Die heterozygote Hochrisiko-HLA-Konstellation (*DR4-DQ8/DR3-DQ2*) ist häufiger bei Personen zu finden, die bei der Erstdiagnose jünger als 20 Jahre sind. Dagegen manifestiert sich der T1D bei Individuen, welche den protektiven Haplotypen (*DR2-DQ6.2*) tragen bzw. keinen der beiden Risikohaplotypen besitzen, erst später (Sabbah *et al.*, 2000; Amador-Patarroyo *et al.*, 2012).

Tabelle 1.2: Liste der wichtigsten mit T1D assoziierten HLA-Haplotypen und deren unterschiedliche Erkrankungsrisiken. Die HLA-Haplotypen setzen sich dabei aus den Allelen der Gene *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* zusammen. Verwendete Quellen: 1: (Redondo *et al.*, 2001); 2: (Cucca *et al.*, 2001); 3: (Kelly *et al.*, 2003); 4: (Steck und Rewers, 2011).Verwendete Abkürzungen: HLA: humanes Leukozytenantigen; T1D: Typ 1 Diabetes.

HLA-DRB1	***HLA-DQA1***	***HLA-DQB1***	**Quelle**
	höchstes Risiko[a]		
0401 + *0301*	*0301* + *0501*	*0302* + *0201*	1,2,3,4
	hohes Risiko		
0401	*0301*	*0302*	1,2,3,4
0402	*0301*	*0302*	1,2,3
0405	*0301*	*0302*	1,2,3
0301	*0501*	*0201*	1,2,3,4
	moderates Risiko		
0801	*0401*	*0402*	1,3
0101	*0101*	*0501*	1,3
0901	*0301*	*0303*	1,3
	geringes Risiko		
0403	*0301*	*0302*	1,2,3
0701	*0201*	*0201*	1
1101	*0501*	*0301*	1
0401	*0301*	*0301*	2
0405	*0501*	*0301*	2
	sehr geringes Risiko		
1501	*0102*	*0602*	1,2,3,4
1401	*0101*	*0503*	1,2
0701	*0201*	*0303*	1,2

[a]: das höchste Risiko an T1D zu erkranken besteht für heterozygote Individuen, die diese beiden HLA-Haplotypen tragen.

1.4.2 Zusammenhang zwischen der Struktur von HLA-Klasse-II-Molekülen und T1D

Bei der Manifestation des T1D spielt die dreidimensionale Struktur der peptidbindenden Grube der HLA-Klasse-II-Moleküle eine entscheidende Rolle. Sie beeinflusst die Wechselwirkung von HLA-Klasse-II-Molekülen mit spezifischen Antigenen, welche ihrerseits wiederum mit den T-Zellrezeptoren entsprechender T-Zellen interagieren. Kristallstrukturanalysen haben gezeigt, dass HLA-Klasse-II-Moleküle, die durch ein hohes relatives Erkrankungsrisiko charakterisiert sind (DQ8, DQ2 beim Menschen und I-A(g7) bei NOD-Mäusen (*Non-Obese Diabetic Mouse*, NOD), ähnliche dreidimensionale Strukturen in der peptidbindenden Grube aufweisen (Lee *et al.*, 2001). Diese sterischen Eigenschaften unterscheiden sich wesentlich von den peptidbindenden Gruben protektiver HLA-Klasse-II-Moleküle, welche ihrerseits untereinander wieder sehr ähnlich sind (Cucca *et al.*, 2001). Diese strukturellen Unterschiede in der peptidbindenden Grube von

prädisponierenden und protektiven HLA-Klasse-II-Molekülen spiegeln sich in funktionellen Unterschieden wider. Sie nehmen Einfluss auf die Bindungsaffinität diabetogener Peptidfragmente, auf die Interaktion mit T-Zellrezeptoren und auf die molekulare Stabilität an der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (Geluk *et al.*, 1998; Kelly *et al.*, 2003; Eerligh *et al.*, 2011). Eerligh *et al.* zeigten, dass von verschiedenen HLA-Klasse-II-Molekülen unterschiedliche diabetogene Epitope an der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen präsentiert werden, wodurch verschiedene Repertoires an CD4+ T-Zellen aktiviert werden (Eerligh *et al.*, 2011). Den größten Einfluss auf das Risiko an T1D zu erkranken hat die Aminosäure an Position 57 der β-Kette von HLA-DQ-Molekülen, welche in der Peptidbindungstasche P9 lokalisiert ist. Die protektiven Moleküle HLA-DQ6.2 (Mensch) bzw. H2-I-A(b) (Maus) tragen an dieser Position einen Asparaginsäurerest, der für die Stabilität des HLA-Klasse-II-Moleküls von entscheidender Bedeutung ist. Zwischen der negativen Ladung des Asparaginsäurerests und der positiven Ladung von Argininresten an Position 79 der α-Kette, bildet sich eine Salzbrücke aus (Abbildung 1.5). Diese verändert die Form der Bindungstasche P9 entscheidend im Vergleich zu Molekülen, die nicht Asparaginsäure an dieser Stelle tragen (Todd *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 2003). Wird die Asparaginsäure durch Alanin ersetzt, was für die meisten Hochrisikomoleküle wie HLA-DQ2 und HLA-DQ8 zutrifft, hat dies strukturelle Konsequenzen, welche im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für die Manifestation eines T1D stehen (Nepom und Kwok, 1998; Jones *et al.*, 2006).

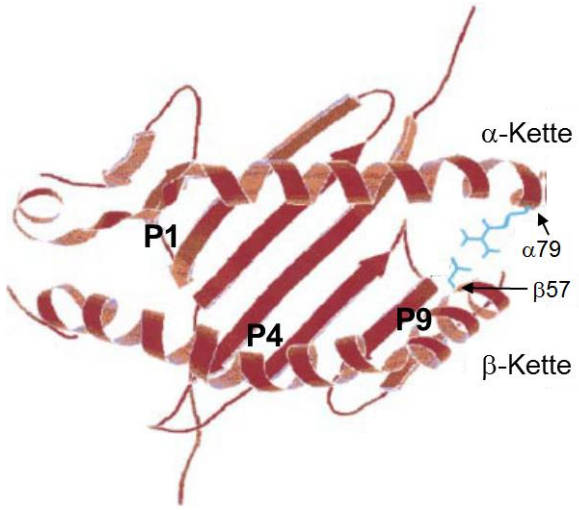


Abbildung 1.5: Detailansicht der peptidbindenden Grube eines HLA-DQ-Moleküls. Die in der Bindungstasche P9 lokalisierte Aminosäure an Position β57 hat den größten Einfluss auf die Manifestation von T1D. Je nach Aminosäurerest an dieser Position bildet sich zwischen β57 und α79 eine Salzbrücke aus, die die Konformation der Bindungstasche P9 verändert. Dies beeinflusst die Affinität der HLA-Klasse-II-Moleküle zu bestimmten Antigenen. Verwendete Abkürzungen: HLA: humanes Leukozytenantigen; T1D: Typ 1 Diabetes. Abbildung modifiziert nach Kelly *et al.* (Kelly *et al.*, 2003).

Eine weitere Möglichkeit für die unterschiedliche Assoziation von spezifischen HLA-Klasse-II-Molekülen mit T1D ist in der Selektion autoreaktiver T-Zellen im Thymus begründet. Das gebundene Peptid ist ein integraler Bestandteil des HLA-Klasse-II-Moleküls, ohne welches dieses nicht stabil ist. Ein mit hoher Affinität an ein protektives HLA-Klasse-II-Molekül gebundenes diabetogenes Peptidfragment, könnte im Thymus zu einer Deletion autoreaktiver T-Zellen führen. Diese negative Selektion konnte in einem transgenen Mausmodell bereits gezeigt werden (Schmidt *et al.*, 1997). Bindet ein Autoantigen dagegen mit mittlerer Affinität an HLA-Klasse-II-Moleküle, entgehen diese der negativen Selektion im Thymus, wodurch autoreaktive T-Zellen über die Peripherie zu den Organen gelangen können (Nepom und Kwok, 1998).

Des Weiteren wurden bereits quantitative Unterschiede in der MHC-Klasse-II-Expression an der Oberfläche verschiedener Thymusepithelzellen gefunden. Dies kann einen Einfluss auf die positive bzw. negative Selektion autoreaktiver T-Zellen im Cortex bzw. in der Medulla haben (Yang *et al.*, 2006).

1.5 MicroRNA

MicroRNAs (miRNAs) sind an der Regulation des Immunsystems beteiligt und können die Entwicklung verschiedener Autoimmunerkrankungen beeinflussen (Lindsay, 2008; Sonkoly *et al.*, 2008; Pauley *et al.*, 2009). Etwa 30 – 80% aller proteinkodierenden Gene in höheren Eukaryoten werden von miRNAs reguliert (Zhang und Farwell, 2008; Lu und Clark, 2012). Viele miRNAs werden gewebespezifisch bzw. zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung vieler Organismen exprimiert, so dass sie eine wichtige Rolle bei der Regulation einer Vielzahl von Genen und biologischen Prozessen spielen können (Pandey *et al.*, 2009).

Bei miRNAs handelt es sich um kleine, hochkonservierte, nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von durchschnittlich 22 Nukleotiden. Sie regulieren die Genexpression posttranskriptional, indem sie ihre Ziel-mRNA entweder degradieren oder deren Translation hemmen (Bartel, 2004). Ihre Entdeckung geht in die frühen 1990er Jahre zurück, als Victor Ambros und seine Kollegen herausfanden, dass das *lin-4* Gen, welches in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) die larvale Entwicklung kontrolliert, für kein Protein kodiert, sondern für zwei kleine RNAs mit einer Länge von etwa 22 bzw. 61 Nukleotiden (Lee *et al.*, 1993). Mittlerweile sind über 1850 verschiedene miRNAs beim Menschen bekannt (http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa; Stand: 01. Februar 2014; Griffiths-Jones *et al.*, 2008), von denen jede Hunderte bis Tausende verschiedener mRNAs regulieren kann. Um fundierte Vorhersagen über existierende miRNAs und deren Ziel-mRNAs zu treffen, bedient man sich mittlerweile bioinformatischer Methoden, mit deren Hilfe sich miRNAs und deren potentielle Ziel-mRNAs ermitteln lassen (Alexiou *et al.*, 2009).

MiRNAs können im Genom auf ganz unterschiedliche Weise vorliegen. Sie können als eigenes Gen vorkommen und einen eigenen Promotor besitzen (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001). Etwa ein Drittel der miRNAs befindet sich in Intronsequenzen proteinkodierender Gene und wird mit diesen cotranskribiert und anschließend prozessiert (Rodriguez *et al.*, 2004; Mendell und Olson, 2012). Des Weiteren können die Gene der miRNAs in sogenannten Clustern mit einem gemeinsamen Promotor vorkommen (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001; Lagos-Quintana *et al.*, 2003).

1.5.1 Nomenklatur von miRNAs

Die Nomenklatur von miRNAs ist in Tabelle 1.3 dargestellt.

Tabelle 1.3: Nomenklatur von miRNAs.

Nomenklatur	Bedeutung
hsa	*homo sapiens*
hsa-mir	Vorläufer-microRNA (pre-miRNA)
hsa-miR	reife microRNA
hsa-miR-X[a]	microRNA X[a]
hsa-miR-X[a]c / -X[a]d	paraloge Sequenzen mit maximal zwei Basen Unterschied
hsa-miR-X[a]-3p (alternative Bezeichnung: miR-X[a])	zwei microRNAs stammen von derselben Vorläufer-microRNA ab. Einmal werden sie vom 3´Bereich (-3p) und einmal vom 5´Bereich (-5p) der Vorläufer-microRNA kodiert
hsa-miR-X[a]-5p (alternative Bezeichnung: miR-X*[a])	

[a]: X steht für die jeweilige Identifikationsnummer, welche für jede miRNA einzigartig ist (Bsp: miR-1; miR-2 usw.).

1.5.2 MiRNA-Synthese

Die Transkription von miRNAs erfolgt in der Regel über die RNA-Polymerase (RNA-Pol) II oder III, woraufhin eine primäre miRNA (pri-miRNA) entsteht (Cai *et al.*, 2004; Winter *et al.*, 2009). Noch im Nukleus wird die pri-miRNA von Drosha, einer Ribonuklease (RNase) III, geschnitten, wodurch eine etwa 70 Nukleotide lange Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) mit charakteristischer Haarnadelstruktur entsteht (Lee *et al.*, 2003). Die pre-miRNA wird anschließend von Exportin-5 und dessen Cofaktor Ran-GTP (*Ras-related nuclear protein*, Ran; Guanosin-triphosphat, GTP) gebunden und ins Zytoplasma transportiert (Lund *et al.*, 2004). Die weitere Prozessierung der pre-miRNA erfolgt durch Dicer, ebenfalls eine RNase III und dessen Cofactor TRBP (*transactivation-responsive RNA-binding protein*), so dass ein doppelsträngiges etwa 22 Nukleotide langes RNA-Molekül entsteht (Bernstein *et al.*, 2001; Chendrimada *et al.*, 2005). Dieser miRNA-Duplex wird entwunden und einer der beiden Stränge in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) inkorporiert. Bei dem inkorporierten Strang handelt es sich zumeist um denjenigen, dessen 5´-Terminus weniger stabil gebunden ist, während der andere Strang degradiert und abgebaut wird (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz

et al., 2003). Es können jedoch auch beide Stränge als reife miRNAs fungieren (Schwarz *et al.*, 2003; Maniataki und Mourelatos, 2005).

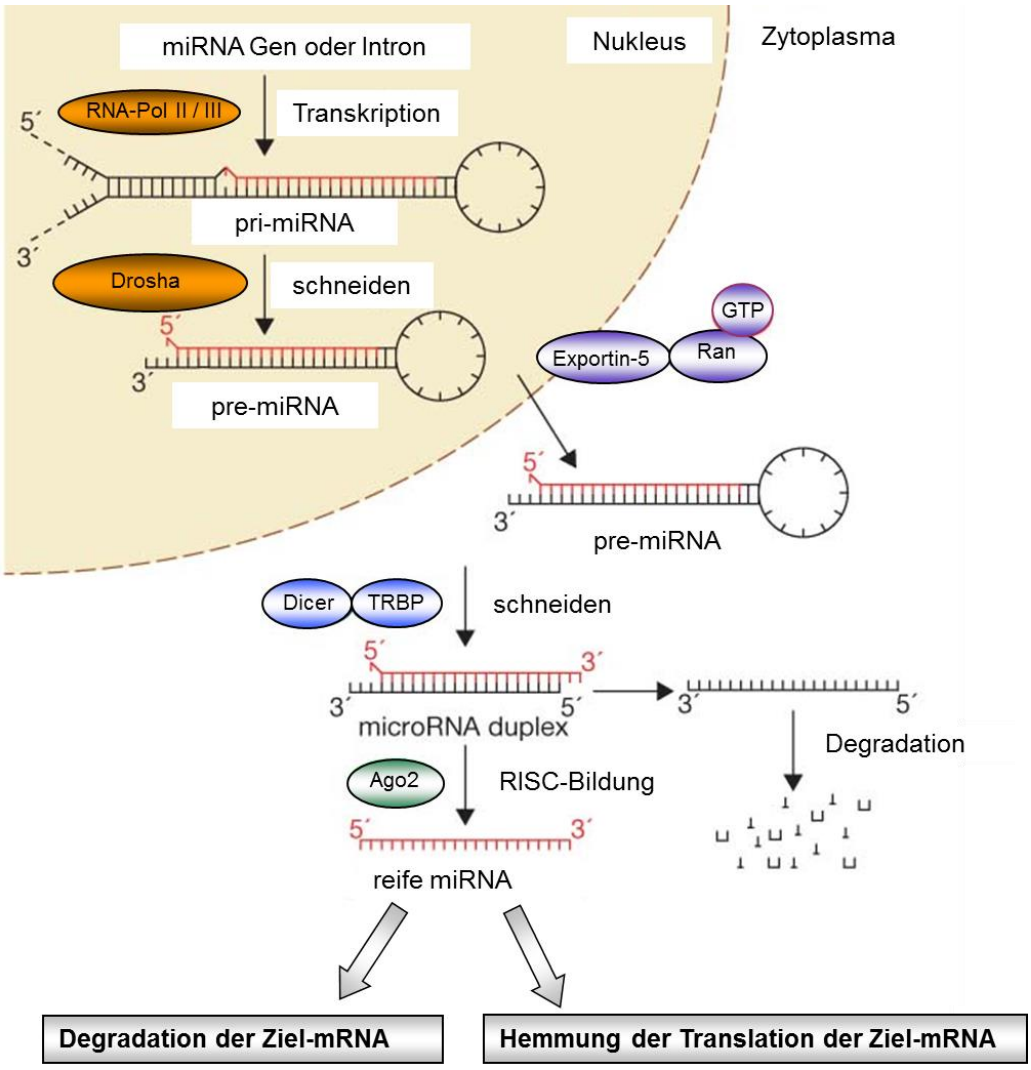


Abbildung 1.6: MiRNA-Synthese. Die Transkription der miRNA findet durch die RNA-Pol II oder III statt, so dass eine pri-miRNA entsteht. Anschließend wird die pri-miRNA von Drosha geschnitten, was zu einer 70 Nukleotide langen pre-miRNA führt. Diese wird im Anschluss über Exportin-5 und dessen Cofaktor Ran-GTP aus dem Nukleus ins Zytoplasma transportiert. Dort wird sie von Dicer, einer RNAse III Endonuklease, und dessen Cofaktor TRBP zu einem ca. 22 Nukleotide langen miRNA-Duplex geschnitten. Der Strang, dessen 5´-Ende weniger stabil gebunden ist, wird in den Argonaut enthaltenden RISC-Komplex inkorporiert, während der andere Strang abgebaut wird. Die reife miRNA kann nun spezifische Ziel-mRNAs degradieren oder deren Translation hemmen. Verwendete Abkürzungen: Ago: Argonaut; GTP: Guanosintriphosphat; mRNA: *messenger RNA*; miRNA: microRNA; pre-miRNA: Vorläufer-microRNA; pri-miRNA: primäre microRNA; Ran: *Ras-related nuclear protein*; RISC: *RNA-induced silencing complex*; RNA: Ribonukleinsäure; RNA-Pol II / III: RNA-Polymerase II / III; TRBP: *transactivation-responsive RNA-binding protein*. Abbildung modifiziert nach Winter *et al.* (Winter *et al.*, 2009).

1.5.3 Interaktion zwischen miRNA und mRNA

Die Regulation der mRNA durch miRNA erfolgt über die Watson-Crick Basenpaarung. Bei Pflanzen erfolgt diese Paarung mit perfekter oder nahezu perfekter Komplementarität, was zur Degradation der gebunden mRNA führt (Bartel und Bartel, 2003). Bei Metazoen hingegen sind zwei verschiedene posttranskriptionale Mechanismen bekannt. Bei ausreichender Komplementarität der miRNA zur Ziel-mRNA wird die Ziel-mRNA ebenfalls degradiert. Ist die Komplementarität hingegen vorhanden, jedoch nicht ausreichend um die mRNA zu degradieren, wird lediglich deren Translation gehemmt (Bartel, 2004). Die Zielsequenzen befinden sich fast immer in der 3´untranslatierten Region (3´UTR) von mRNAs und sind, wie auch die miRNAs selbst, hochkonserviert (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001; Bartel, 2009; Friedman *et al.*, 2009). Damit eine miRNA ihre Ziel-mRNA erkennt, ist eine perfekte Komplementarität der sogenannten *seed*-Region der miRNA zur Ziel-mRNA Voraussetzung. Diese befindet sich am 5´-Terminus der miRNA und besteht in der Regel aus 6 Nukleotiden an Position 2 – 7 (O'Driscoll, 2006). Diese Form der Komplementarität wird auch als „6mer“ bezeichnet (Lewis *et al.*, 2005). Gibt es zusätzlich zum 6mer noch eine komplementäre Bindung an Position 8, so spricht man von einem „7mer-m8“ (Brennecke *et al.*, 2005; Grimson *et al.*, 2007). Bei einer anderen Form befindet sich neben dem 6mer zusätzlich ein Adenin an Position 1 der Ziel-mRNA, wobei keine Komplementarität des Adenins zur miRNA Sequenz vorliegen muss. Diese Form wird als „7mer-A1“ bezeichnet. Ein „8mer“ vereint alle drei Formen. Es besteht aus einem perfekten *seed match*, welcher von einer komplementären Bindung an Position 8 und von einem Adenin an Position 1 in der Ziel-mRNA flankiert wird (Abbildung 1.7) (Lewis *et al.*, 2005).

Des Weiteren ist die Stabilität der miRNA-mRNA-Interaktion von Faktoren positiv beeinflusst, wie einer durch Fehlpaarungen verursachten Aufwölbung von 1 – 5 Nukleotiden in der Mitte des miRNA-mRNA-Duplex, sowie einer Komplementarität am 3´-Terminus der miRNA an Position 13 – 16. Zudem scheinen Sequenzen als Zielsequenzen umso geeigneter zu sein, je näher sie sich am Stop-Codon bzw. am Poly-(A)-Schwanz befinden (Abbildung 1.8) (Grimson *et al.*, 2007).

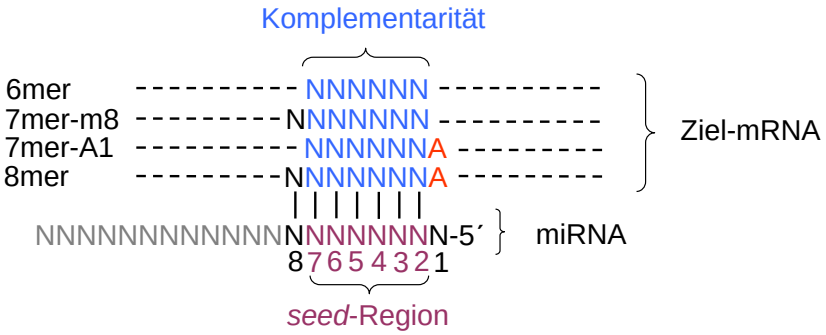


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung verschiedener Ziel-mRNA Komplementaritäten zur *seed*-Region der miRNA. Damit die miRNA die Ziel-mRNA erkennt, muss mindestens eine Komplementarität der *seed*-Region (Nukleotide 2 – 7 der miRNA) vorhanden sein (6mer). Weitere Faktoren erhöhen die Affinität der miRNA zur Ziel-mRNA. Verwendete Abkürzungen: A: Adenin; mRNA: *messenger RNA*; miRNA: microRNA; N: Nukleotid. Abbildung modifiziert nach Friedmann *et al.* (Friedman *et al.*, 2009).

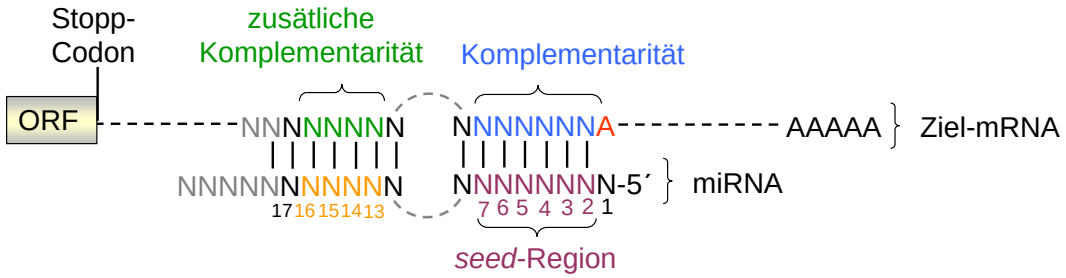


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der miRNA-Bindung an die Ziel-mRNA. Neben der Komplementarität der *seed*-Region sollte zur weiteren Stabilisierung des miRNA-mRNA-Komplexes eine 1 – 5 bp große Aufwölbung durch Fehlbasenpaarung, sowie eine weitere Komplementarität am 3´-Ende der miRNA (Nukleotide 13 – 16) vorhanden sein. Des Weiteren beeinflussen die Nähe der Zielsequenz zum Stopp-Codon bzw. Poly-A-Schwanz die Stabilität der miRNA-mRNA-Interaktion positiv. Verwendete Abkürzungen: A: Adenin; mRNA:*messenger RNA*; miRNA: microRNA; N: Nukleotid; ORF: *open reading frame*. Abbildung modifiziert nach Grimson *et al.* (Grimson *et al.*, 2007).

1.5.4 MiRNA und Erkrankungen

MiRNAs stehen im Zusammenhang mit diversen Erkrankungen wie Asthma (Tan *et al.*, 2007), kardiovaskulären Erkrankungen (Sayed *et al.*, 2007), Morbus Basedow (Liu *et al.*, 2012) und Diabetes (Tang *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2009; Guay *et al.*, 2011; Trajkovski *et al.*, 2011). MiR-375 gehört beispielsweise zu den am stärksten exprimierten miRNAs in den β-Zellen des Pankreas und spielt auch bei deren Entwicklung eine entscheidende Rolle (Kloosterman *et al.*, 2007). Eine Überexpression dieser miRNA führt zu einer Hemmung der Glukose-induzierten Insulinsekretion (Poy *et al.*, 2004). Auch miR-7 ist in den β-Zellen des Pankreas stark exprimiert und spielt bei deren Entwicklung eine Rolle (Bravo-Egana *et al.*,

2008; Correa-Medina *et al.*, 2009; Kredo-Russo *et al.*, 2012). MiR-9 reguliert die Exozytose von Insulin aus den β-Zellen des Pankreas. Eine Überexpression von miR-9 in insulinsekretierenden Zellen führt zu einer Reduktion der Exozytose von Insulin (Plaisance *et al.*, 2006).

Da die perfekte Komplementarität zwischen miRNA und Ziel-mRNA in der *seed*-Region essentiell ist, beeinflussen Polymorphismen in der *seed*-Region die miRNA-mRNA-Interaktion entweder negativ oder positiv, was zu einer Verminderung oder Erhöhung der mRNA-Translation führen kann (Chen *et al.*, 2008). Polymorphismen in den Zielsequenzen spielen unter anderem bei Asthma und kardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle (Martin *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2007). Im Zusammenhang mit Asthma konnten Tan *et al*. zeigen, dass ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP) in der 3´UTR-Region des mit Asthma assoziierten nicht-klassischen HLA-Klasse-I-Transkripts *HLA-G*, die miRNA-mRNA-Interaktion von drei verschiedenen miRNAs zu der mRNA von *HLA-G* modifiziert. Dieses Ergebnis spricht für eine allelspezifische Regulation der miRNA-mRNA-Interaktion, wodurch das relative Risiko an Asthma zu erkranken beeinflusst wird (Tan *et al.*, 2007).

1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

Hauptziel der in dieser Arbeit vorliegenden Untersuchungen war die Analyse und Identifikation differentiell exprimierter Gene des HLA-Locus bzw. von miRNAs im Kontext prädisponierender und protektiver HLA-Konstellationen für T1D. Des Weiteren sollte der Einfluss verschiedener, mit T1D assoziierter HLA-Konstellationen auf die Zytokinproduktion untersucht werden. Zur Bearbeitung dieser Ziele wurden aus Blut von Probanden, welche passende HLA-Konstellationen besaßen, lymphoblastoide B-Zelllinien (B-LCLs) generiert. In Vorversuchen sollten zunächst optimale Kulturbedingungen für B-LCLs geschaffen und das Mitogen Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) als geeigneter Immunstimulus verifiziert werden. Im Folgenden sind die einzelnen Zielsetzungen im Detail aufgeführt.

1. Vergleichbare Ausgangs- und Kulturbedingungen sind für verlässliche Genexpressionsdaten unerlässlich. Um stets gleiche Voraussetzungen bezüglich einge-

setzter Zellzahl und Zellmetabolismus zu gewährleisten, sollten zunächst verschiedene Zellzählmethoden verglichen und Zellzyklusanalysen durchgeführt werden.

2. Im Anschluss sollte ein inflammatorisches Milieu geschaffen werden. Dabei sollte getestet werden, ob sich PMA als Stimulus für B-LCLs eignet.

3. Es ist bereits bekannt, dass Individuen mit und ohne T1D differentielle Zytokinmuster aufweisen. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass HLA-Haplotypen die Zytokinsekretion beeinflussen können. Daher sollte die Sekretion und Genexpression des proinflammatorischen Zytokins TNF-α und des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 mit und ohne PMA-Stimulation im Zusammenhang mit unterschiedlichen, mit T1D assoziierten HLA-Konstellationen untersucht werden.

4. Der hohe Grad an Polymorphismus der HLA-Klasse-II-Gene und die damit verbundene molekulare Diversität spielen eine erhebliche Rolle bei der Erkennung diabetogener Peptidfragmente und deren Präsentation an autoreaktive T-Zellen. Neben strukturellen Unterschieden zwischen den HLA-Klasse-II-Molekülen könnten auch Unterschiede in der Expression prädisponierender und protektiver Allele der HLA-Klasse-II-Gene von funktioneller Bedeutung sein. Daher sollten zum einen das Expressionsmuster regulatorischer Faktoren der HLA-Klasse-II-Gene (*RFX1* und *RFX5*) zwischen Individuen mit prädisponierenden und protektiven HLA-Konstellationen untersucht werden. Des Weiteren sollte das Expressionsmuster der HLA-Klasse-II-Gene *HLA-DRA*, *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* zwischen Individuen mit prädisponierenden und protektiven HLA-Konstellationen analysiert werden. Zusätzlich sollte das Expressionsmuster prädisponierender und protektiver Allele von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* bei heterozygoten Individuen untersucht werden.

5. Da miRNAs einen bedeutenden Anteil an der Genregulation haben, ist eine Beteiligung von miRNAs an der Regulation von HLA-Klasse-II-Genen denkbar. Aus diesem Grund war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit miRNAs zu identifizieren, welche zwischen den verschiedenen mit T1D assoziierten HLA-Konstellationen unterschiedlich exprimiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Probandenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurden aus einem Probandenkollektiv von insgesamt 57 HLA-typisierten Individuen die zuvor generierten B-LCLs untersucht. Die Auswahl erfolgte nach den in Tabelle 2.1 dargestellten HLA-Haplotypen. Anhand der beobachteten HLA-Konstellationen wurde das Probandenkollektiv in sechs Gruppen eingeteilt. Anschließend wurde den Gruppen eine bestimmte Risikokategorie zugewiesen, welche auf bekannten, durch HLA-Haplotypen vermittelten Erkrankungsrisiken beruhen (Tabelle 1.2). Gruppe 1 steht demnach für das höchste Erkrankungsrisiko, Gruppe 2 für ein hohes, Gruppe 3 für ein mittleres und die Gruppen 4 – 6 für ein geringes Erkrankungsrisiko. Die Gruppenzugehörigkeit lässt somit auf das Risiko einer Person an T1D zu erkranken schließen (Abbildung 2.1).

Bei der Mehrzahl der Probanden handelte es sich um Diabetes-Patienten, die an der Klinik für Innere Medizin I, Sektion Endokrinologie am Universitätsklinikum Ulm in Behandlung waren. Zusätzlich wurden B-LCLs von gesunden Probanden verwendet, deren Blut ebenfalls am Universitätsklinikum Ulm gesammelt wurde. Einschlusskriterien der Probanden waren HLA-Haplotypen, welche mit dem autoimmunen Typ 1 Diabetes assoziiert sind. Die Verwendung der Proben für Forschungszwecke wurde von der Ethikkommission der Universität Ulm genehmigt (Nummer des Ethikvotums: 42/2004). In Tabelle 2.2 ist das gesamte Probandenkollektiv, das in dieser Arbeit verwendet wurde, aufgeführt.

Tabelle 2.1: Risikoeinteilung anhand der individuellen HLA-Haplotypen. Anhand der bekannten unterschiedlichen Erkrankungsrisiken, die durch die jeweiligen HLA-Haplotypen vermittelt werden (Tabelle 1.2), wurden die Probanden in sechs verschiedene Risikogruppen eingeteilt. Verwendete Bezeichnungen und Abkürzungen: HLA-Haplotyp 1: *DRB1*0301-DQA1*05XX-DQB1*02XX*; HLA-Haplotyp 2: *DRB1*0401-DQA1*03XX-DQB1*0301* oder **0302*; HLA-Haplotyp 3: *DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602*. HLA: humanes Leukozytenantigen; XX: Bei einigen Probanden lagen keine weiteren Informationen über die spezifischen Allele vor. Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 (Vandiedonck und Knight, 2009) und der Tatsache, dass das verwendete Probandenkollektiv ausschließlich kaukasischen Ursprungs ist, konnte davon ausgegangen werden, dass sich spezifische Allele und Suballele innerhalb einer Risikogruppe mit gleichem HLA-Haplotyp nicht unterscheiden (*HLA-DQA1*03XX* entspricht *HLA-DQA1*0301*; *HLA-DQA1*05XX* entspricht *HLA-DQA1*0501*; *HLA-DQB1*02XX* entspricht *HLA-DQB1*0201*).

Risiko-gruppe	Bezeichnung	HLA-Haplotyp	*HLA-DRB1*	*HLA-DQA1*	*HLA-DQB1*	Anmerkung
1	höchstes Risiko	1	*0301*	*05XX*	*02XX*	
		2	*0401*	*03XX*	*0302*	
2	hohes Risiko	2	*0401*	*03XX*	*03YY*	YY = 01 oder 02
		2	*0401*	*03XX*	*03YY*	YY = 01 oder 02
3	mittleres Risiko	1	*0301*	*05XX*	*02XX*	
		1	*0301*	*05XX*	*02XX*	
4	geringes Risiko 1	2	*0401*	*03XX*	*03YY*	YY = 01 oder 02
		3	*1501*	*0102*	*0602*	
5	geringes Risiko 2	1	*0301*	*05XX*	*02XX*	
		3	*1501*	*0102*	*0602*	
6	geringes Risiko 3	3	*1501*	*0102*	*0602*	
		3	*1501*	*0102*	*0602*	

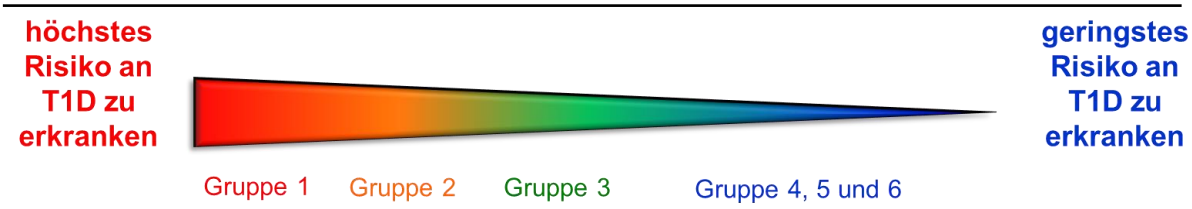


Abbildung 2.1: Risikoverteilung für verschieden HLA-Konstellationen. Die verschiedenen HLA-Konstellationen, die im Probandenkollektiv vorkommen, wurden in unterschiedliche Risikogruppen (Gruppe 1 – 6) eingeteilt. Je nach Gruppenzugehörigkeit ändert sich das Risiko der betreffenden Personen an T1D zu erkranken. Verwendete Abkürzungen: HLA: humanes Leukozytenantigen; T1D: Typ 1 Diabetes.

Tabelle 2.2: Einteilung des in dieser Arbeit verwendeten Probandenkollektivs in die verschiedenen Risikogruppen. Angegeben sind die verschiedenen Risikogruppen, die Probanden-ID (Labor)[a], die Probanden-ID, das Geschlecht, die Diagnose, sowie die vorliegenden Allele der Gene *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1*. Verwendete Bezeichnungen und Abkürzungen: f: weiblich; HLA: humanes Leukozytenantigen; m: männlich; MODY: *Maturity Onset Diabetes of the Young*; T1D: Typ 1 Diabetes; T2D: Typ 2 Diabetes; XX: Bei einigen Probanden lagen keine weiteren Informationen über die spezifischen Allele vor. Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 (Vandiedonck und Knight, 2009) und der Tatsache, dass das verwendete Probandenkollektiv ausschließlich kaukasischen Ursprungs ist, konnte davon ausgegangen werden, dass sich spezifische Allele und Suballele innerhalb einer Risikogruppe mit gleichem HLA-Haplotyp nicht unterscheiden (*HLA-DQA1*03XX* entspricht *HLA-DQA1*0301*; *HLA-DQA1*05XX* entspricht *HLA-DQA1*0501*; *HLA-DQB1*02XX* entspricht *HLA-DQB1*0201*); *-: Proband ist mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit für das entsprechende Gen homozygot.

Risiko-gruppe	Probanden-ID (Labor)[a]	Probanden ID	Ge-schlecht	Diagnose	*HLA-DRB1*		*HLA-DQA1*		*HLA-DQB1*	
					Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2
höchstes Risiko										
1	BOB-0096	P 1	m	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	BOB-0098	P 2	m	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	BOB-0112	P 3	m	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*02XX*	*0302*
1	BOB-0113	P 4	f	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	BOB-0118	P 5	m	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	BOB-0119	P 6[b]	m	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	BOB-0135	P 7	m	T1D, Asthma bronchiale	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	BOB-0143	P 8	m	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	BOB-0217	P 9	f	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	BOB-0273	P 10	f	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	BOB-0298	P 11	m	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	BOB-0299	P 12	f	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	BOB-0404	P 13	f	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	BOB-0432	P 14	f	Hashimoto thyreoiditis, Morbus Addison	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	BOB-0437	P 15	f	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	BOB-0608	P 16[b]	f	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	BOB-0521	P 17	m	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	BOB-0708	P 18	f	T2D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	BOB-5013	P 19	f	gesund	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	BOB-5015	P 20	f	gesund	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
1	IK-0404	P 21	f	TD Unbekannt	*0301*	*0401*	*0501*	*0301*	*02XX*	*0302*
hohes Risiko										
2	BOB-0129	P 22	m	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*-*	*0301*	*0302*
2	BOB-0132	P 23	f	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*-*	*0302*	*-*
2	BOB-0155	P 24	m	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*03XX*	*0302*	*0302*
2	BOB-5010	P 25	m	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*03XX*	*0302*	*0302*
2	BOB-5014	P 26	f	T1D	*0401*	*0401*	*0301*	*0301*	*0302*	*0302*
2	BOB-5019	P 27	f	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*03XX*	*0302*	*0302*
2	BOB-5024	P 28	m	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*03XX*	*0301*	*0302*
2	BOB-5027	P 29	f	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*03XX*	*0302*	*0302*
2	BOB-5028	P 30	m	T1D	*0401*	*-*	*03XX*	*-*	*0302*	*-*
2	BOB-5029	P 31	m	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*03XX*	*0302*	*0302*
2	BOB-5030	P 32	f	TD Unbekannt	*0401*	*0401*	*03XX*	*03XX*	*0301*	*0302*
2	BOB-5031	P 33	m	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*03XX*	*0302*	*0301*
2	IK-0504	P 34	m	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*03XX*	*0301*	*0301*
mittleres Risiko										
3	BOB-0269	P 35	m	T1D	*0301*	*0301*	*05XX*	*05XX*	*0201*	*0201*
3	BOB-5021	P 36[c]	f	T1D	*0301*	*0301*	*0501*	*0501*	*02XX*	*02XX*
3	BOB-5022	P 37	f	T1D	*0301*	*0301*	*0501*	*0501*	*02XX*	*02XX*
3	BOB-5023	P 38	f	T1D	*0301*	*0301*	*0501*	*0501*	*02XX*	*02XX*

geringes Risiko 1											
4	BOB-0577	P 39	m	T2D	*0401*	*1501*	*03XX*	*0102*	*0302*	*0602*
4	BOB-0648	P 40	f	T2D	*0401*	*1501*	*03XX*	*0102*	*0302*	*0602*
4	BOB-0693	P 41	f	T2D	*0401*	*1501*	*03XX*	*0102*	*0302*	*0602*
4	BOB-0730	P 42	f	T2D	*0401*	*1501*	*03XX*	*0102*	*0301*	*0602*
4	BOB-0731	P 43	m	T2D	*0401*	*1501*	*03XX*	*0102*	*0302*	*0602*
4	BOB-5016	P 44	f	T1D	*0401*	*1501*	*03XX*	*0102*	*0302*	*0602*
4	BOB-5017	P 45	m	T1D	*0401*	*1501*	*03XX*	*0102*	*0301*	*0602*
4	BOB-5018	P 46	f	gesund	*0401*	*1501*	*03XX*	*0102*	*0302*	*0602*
geringes Risiko 2											
5	BOB-0201	P 47	m	T1D	*0301*	*1501*	*05XX*	*0102*	*0201*	*0602*
5	BOB-0243	P 48	m	T2D	*0301*	*1501*	*05XX*	*0102*	*0201*	*0602*
5	BOB-0454	P 49	f	gesund	*0301*	*1501*	*05XX*	*0102*	*0201*	*0602*
5	BOB-0460	P 50	f	Morbus Addison, gestörte Glukosetoleranz	*0301*	*1501*	*05XX*	*0102*	*0201*	*0602*
5	BOB-0689	P 51	f	T2D	*0301*	*1501*	*05XX*	*0102*	*0201*	*0602*
5	BOB-0743	P 52	m	T2D	*0301*	*1501*	*05XX*	*0102*	*0201*	*0602*
5	BOB-0820	P 53	f	T2D	*0301*	*1501*	*05XX*	*0102*	*0201*	*0501*
geringes Risiko 3											
6	BOB-5025	P 54	m	T2D	*1501*	*1501*	*0102*	*0102*	*0602*	*0602*
6	IK-0436	P 55	f	MODY	*1501*	*1501*	*0102*	*0102*	*0602*	*0602*
6	IK-0533	P 56	m	TD Unbekannt	*1501*	*1501*	*0102*	*0102*	*0602*	*0602*
6	BOB-0815	P 57	f	T2D	*1501*	***	*0102*	***	*0602*	***

[a]: In dieser Arbeit wurde stets die Probanden-ID und nicht die Probanden-ID (Labor) verwendet.

[b]: Proben wurden ausschließlich zur RNA-Seq-Analyse verwendet.

[c]: Probe wurde ausschließlich zur Microarray-Analyse verwendet.

2.1.2 Primer

2.1.2.1 Kommerzielle Primer

Tabelle 2.3: Kommerziell erworbene Primer (RT^2 qRT-PCR Primer-Assays, Qiagen). Verwendete Abkürzungen: bp: Basenpaare; HLA: humanes Leukozytenantigen; qRT-PCR: *real-time*-quantitative-PCR; RefSeq: Referenzsequenz.

Primer-Assay	Cat #	RefSeq #	Produktlänge (bp)
HLA-DRA	PPH00857	NM_019111	119
HLA-DQA1	PPH18845	NM_002122	106
HLA-DRB1	PPH65871	NM_002124	142
HLA-DQB1	PPH05538	NM_002123	125
RPL13A	PPH01020	NM_012423	90
RFX1	PPH00040	NM_002918	141
RFX5	PPH06087	NM_000449	175
TNF	PPH00341	NM_000594	54
IL10	PPH00572	NM_000572	99

Tabelle 2.4: miRNA-Primer (miScript Primer-Assays, Qiagen). Verwendete Abkürzungen: hsa: *homo sapiens*; miR-X: microRNA-X (X steht für die jeweilige Identifikationsnummer); RefSeq: Referenzsequenz.

Primer-Assay	Cat. #	Sanger Accession #	Sequenz der miRNA nach miRBase
hsa-miR-9	MS00010752	MIMAT0000441	5´-UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA-3´
hsa-miR-9*	MS00006510	MIMAT0000442	5´-AUAAAGCUAGAUAACCGAAAGU-3´
hsa-miR-363	MS00009576	MIMAT0000707	5´-AAUUGCACGGUAUCCAUCUGUA-3´
hsa-miR-181c	MS00008841	MIMAT0000258	5´-AACAUUCAACCUGUCGGUGAGU-3´
hsa-miR-181d	MS00031500	MIMAT0002821	5´-AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGGU-3´
hsa-miR-424	MS00004186	MIMAT0001341	5´-CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAA-3´
hsa-miR-7	MS00032116	MIMAT0000252	5´-ACAACAAAATCACTAGTCTTCCA-3´
hsa-miR-345	MS00031766	MIMAT0000772	5´-GAGCCCTGGACTAGGAGTCAGC-3´
		Gen RefSeq #	
SNORD72	MS00033719	NR_002583.1	

2.1.2.2 Selbst erstellte Primer

Tabelle 2.5: Selbst erstellte Primer zur qRT-PCR- bzw. Sequenzanalyse. Verwendete Abkürzungen: bp: Basenpaare; qRT-PCR: *real-time*-quantitative-PCR.

Primer	Sequenz	Produktlänge (bp)	Annealingtemperatur (°C)	Verwendungszweck
DRB S DRB A	5´-AGAGAGGGCTTTCTCAGGAC-3´ 5´-CATTTAATAATGTAATGTGTTTG-3´	216	44	Sequenzanalyse
DQB S DQB A	5´-TGTCACGCAGCCACCAGGTC-3´ 5´-ACAGATAACTCAGGATCATG-3´	233	53	Sequenzanalyse
DQB1 _forward_2 DQB1 _reverse_2	5´-ATCTCCTTTCATCCCCAC-3´ 5´-ATAGAAACAGAAACCCCTTG-3´	123	60	qRT-PCR

2.1.2.3 Sequenzierprimer

SP6 5´-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3´

2.1.3 Chemikalien/Reagenzien

100% Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
1X TMB Substrate Solution	eBiosciences, San Diego, CA, USA
95-98% H_2SO_4	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe
Ampicillin (50 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Bacto™ Agar	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BSA (Albumin bovine Fraktion V)	SERVA, Heidelberg
Clean (CASY® clean Kapillar- und Systemreiniger)	Innovatis, Reutlingen
Cytofix/Cytoperm™	BD Biosciences, San Diego, CA, USA
D (+)-Glukose	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
dNTP Set, 100mM Lösung	GE Healthcare, Freiburg
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Essigsäure (100%)	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
FCS	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare, Life Sciences, NJ, USA
Heparin-Natrium Braun „Multi“ 10 000 I.E./ml Injektionslösung	Braun, Melsungen
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
IFN-γ	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
LB-Medium	MP Biomedicals, LLC, Solon, OH, USA
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NaCl 0,9%	Braun, Melsungen
Normocin™	amaxa biosystems, Köln
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Perm/Wash™	BD Biosciences, San Diego, CA, USA
Phosphatpuffer (PBS) 10X, pH:7,2	Invitrogen Carlsbad, CA, USA
Phosphatpuffer (PBS) 1X, pH:7,4	Invitrogen Carlsbad, CA, USA
PMA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RNAse A 17,500 units	Qiagen, Hilden
RPMI 1640 + GlutaMAX™-I	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
RT^2 qPCR SYBR Green/ROX Master Mix	Qiagen, Hilden
Sandimmune® Injection (Cyclosporin A)	Novartis Pharma, Basel, Schweiz
TE-Puffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Türks Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween® 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Xylen cyanol FF (C.I 43535)	United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH, USA

2.1.4 Reagenziensysteme

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche, Mannheim
Custom RT² Profiler PCR Arrays	Qiagen, Hilden
DuoSet ELISA Kits IL-10; TNF-α	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
MiRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
miScript® SYBR® Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
miScript II RT Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RNAase-Free DNAse Set	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
RT² First Strand Kit	Qiagen, Hilden
RT² SYBR® Green ROX qPCR Mastermix	Qiagen, Hilden

2.1.5 Lösungen, Puffer und Medien

50X TAE Puffer	24,2% Tris base 5,71% Essigsäure 0,05 M EDTA pH 8 in Aqua bidest
CSA-Medium	2% Cyclosporin A in RPMI 1640 + GlutaMAX™-I
Einfriermedium	90% FCS 10% DMSO
FACS-Puffer, Blockierungspuffer	1% BSA in 1X PBS
Ladepuffer für Nukleinsäuren	75% Glycerol 0,5% Xylen cyanol FF in Aqua bidest
LB-Medium +20% Glukose	20% Glukose in LB-Medium
LB-Medium + Agar	2% Bacto™ Agar in LB-Medium
Medium für die Zellkultur	10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 0,2% Normocin™ in RPMI 1640 + GlutaMAX™-I
Perm/Wash-Puffer	1X Perm/Wash™ in Aqua bidest

Stopp-Lösung	2 N H_2SO_4 in Aqua bidest
Waschpuffer (PBS-T)	0,05% Tween® 20 1X PBS in Aqua bidest

2.1.6 Bakterienstämme

Coli® XL10-Gold® - Ultracompetent Cells	Stratagene, La Jolla, CA, USA

2.1.7 Vektoren

pGEM®-T Vector System I	Promega, Madison WI, USA

2.1.8 Enzyme und Enzympuffer

Nco I (10 U/µl)	MBI Fermentas, Amherst, NY, USA
Pst I (10 U/µl)	Boehringer, Mannheim
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NEB 3-Puffer	New England Biolabs, Schwalbach

2.1.9 Längenstandards

1 kb Leiter	Fermentas, Vilnius, Litauen
100 bp Leiter	GE Healthcare, Freiburg

2.1.10 FACS-Antikörper

CD 19 Alexa 700	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
CD 19 Qdot 655	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
TNF-α Alexa 700	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

2.1.11 Geräte

7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Autoklav	Webeco, Stuttgart
Blockthermostat Techne DB2A	Techne, Staffordshire, UK
Eisbereiter AF 200, Scotsman®	Scotsman®, Mailand, Italien
Elektrophoresenetzgerät (Pharmacia LKB-EPS 500/400)	Pharmacia, Uppsala, Schweden

ELISA Microplate Reader (EL 808)	BioTek®, Winooski, Vermont, USA
Feinwaage (Analytic)	Sartorius, Göttingen
Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Geldokumentationssystem (VWR Genosmart)	VWR Leuven, Belgien
Heizblock (Techne® Dri-Block® heater Model DB-2A, input 240 V)	Techne, Cambridge, U.K.
Heizblock (Thermostat 5320)	Eppendorf, Hamburg
Inkubator (BBD 6220)	Heraeus, Hanau
Inkubatorhaube, CERTOMAT® H	Sartorius, Göttingen
Kreisschüttler, CERTOMAT® R	Sartorius, Göttingen
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Lichtmikroskop (Olympus IMT-2)	Olympus, Tokyo, Japan
LSRII Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Magnetrührer IKA Combimag RCT	Jahnke&Kunkel, Staufen
Mikrowellenofen	Bosch, Gerlingen
Perkin Elmer GeneAmp PCR-System 2400	Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA
Perkin Elmer GeneAmp PCR-System 9600	Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA
Photometer (BioPhotometer)	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank (Lamin Air HA 2448)	Heraeus, Hanau
Stickstofftank (Chronos 400)	Messer, Sulzbach
UV Lichtbox (VWR Genoview)	VWR Leuven, Belgien
Vortex Schüttler (REAX 2000)	Heidolph, Schwabach
Waage Precisa (40SM-200A)	Häberle Labortechnik, Lonsee-Ettlenschieß
Wärmeschrank	Heraeus, Fellbach
Wasserbad Pharmacia LKB MultiTemp II	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Zellzähler CASY® 1TT	Schärfe-System, Reutlingen
Zentrifuge (Minispin)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Multifuge 3S-R)	Heraeus, Hanau

2.1.12 Software

BD FACSDiva™ Software (v6.1.2)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Chromas LITE Version 2.01	Technelysium, Brisbane, Australia
Gen5™, Microplate Data Collection & Analysis Software	BioTek®, Winooski, VT, USA
GraphPad PRISM® Version 5.04	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Microsoft® Office 2010	Microsoft Corp., Washington, USA
Sequence Detection Software Version 1.4	Applied Biosystems, Darmstadt

2.1.13 Internetquellen

dbMHC database	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/mhc/main.fcgi?cmd=init
DIANA-microT v3.o	http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/
HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)	http://www.genenames.org/
IPD-IMGT HLA database	http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/
miRBase	http://www.mirbase.org/
miRDB	http://mirdb.org/miRDB/

National Center for Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
TargetScanHuman Release 6.2	http://www.targetscan.org/
The MHC Haplotype project	http://www.ucl.ac.uk/cancer/medical-genomics/mhc
UCSC Genome Bioinformatics	http://genome.ucsc.edu/

2.1.14 Sonstiges

6 well-Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-well ELISA-Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-well Zellkulturplatten	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
BRANDplates® pureGadeTM 96-well standard microplates	Brand, Wertheim
CASY® cups	Roche, Mannheim
EDTA-Röhrchen (2,7 ml)	SARSTEDT, Nümbrecht
Einmalspritze Injekt Solo Luer-Ansatz (20ml)	Braun, Melsungen
Elektrophoresekammer, DNA SUB CELLTM	BIO-RAD, München
Elektrophoresenetzgerät (Macrodrive 1)	LKB, Bromma, Schweden
Eppendorf Reference® Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Folie für PCR-Platten	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Kryoröhrchen, 1,8 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Millipore Sterilfilter (0,22 µm Filter)	Millipore, Billerica, MA USA
Millipore Sterilfilter (0,45 µm Filter)	Millipore, Billerica, MA USA
Neubauer Zählkammer	Labor Optik GmbH, Bad Homburg
Parafilm "M"	Pechney, Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
PCR-Platten, MicroAmp® Fast optical 96-well mit Barcode (0,1 ml)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
PCR-Röhrchen, ultradünn (0,2 ml)	Biozym, Oldendorf
Petrischalen mit Nocken 100X 15 mm	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10 µl)	SARSTEDT, Nümbrecht
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym, Oldendorf
Pipettierhelfer	INTEGRA Biosciences, Fernwald
Polypropylen Rundboden-Röhrchen (14 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Polypropylen Spitzboden-Röhrchen (50 ml, 15 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Polystyren Rundboden-Röhrchen (5 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Racks für PCR-Platten (schwarz)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Reaktionsgefäße mit Safe-Lock (0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Schraubgefäße (0,5 ml, 2,0 ml)	STARLAB, Ahrensburg
serologische Pipetten aus Polystyren (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Spitzbodenplatten, 96-wells	Greiner bio-one, Frickenhausen
UV_Küvette, mikro	Brand, Wertheim
Zellkulturflaschen (12,5 cm2, 25 cm2)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) erfolgte aus in Heparin aufgenommenen Blutproben mittels Dichtegradientenzentrifugation. Zunächst wurden 15 ml des heparinisierten Blutes in 50 ml Falcons überführt und mit 1X phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) im Verhältnis 1:2 verdünnt. Das verdünnte Blut wurde dann über 15 ml einer Ficoll-Trennlösung geschichtet und anschließend bei 2000 rpm für 30 min bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert. Die Zellen der Interphase wurden vorsichtig abgeerntet und zur Entfernung verbliebener Thrombozyten und Ficoll-Reste mit 1X PBS 3x gewaschen. Anschließend wurde ein kleines Aliquot der erhaltenen PBMCs mit Türks Lösung angefärbt und die Zellzahl mit Hilfe eines Hämozytometers bestimmt (Abschnitt 2.2.2). Daraufhin wurden die Zellen entweder sofort verwendet oder eingefroren. Dafür wurden jeweils 1 x 10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (90% fetales Kälber-serum (*fetal calf serum*, FCS) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2 Zellzahlbestimmung

Hämozytometer

Um die Vitalität einer Zellpopulation zu bestimmen, wurde der Farbstoff Trypanblau verwendet. Hierbei werden nur die toten Zellen blau angefärbt, was durch deren veränderte Membrandurchlässigkeit ermöglicht wird. Vitale Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf und erscheinen dadurch hell. Trypanblau wurde sowohl bei Zelllinien als auch bei aufgetautem Zellmaterial verwendet. Für frisch isolierte Lymphozyten wurde hingegen Türks Lösung eingesetzt. Durch die hohe Konzentration an Essigsäure (3%) in der Türks Lösung werden noch in der Suspension vorhandene Erythrozyten durch Hämolyse zerstört. Der Farbstoff färbt schließlich die Leukozyten an, so dass diese ausgezählt werden können.

Das zur Selektion toter Zellen verwendete Trypanblau wurde zunächst im Verhältnis 1:6 mit 1X PBS verdünnt. Die Türks Lösung wurde unverdünnt eingesetzt. Anschließend wurden 10 µl Zellsuspension mit dem jeweiligen Farbstoff im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die angefärbte Suspension wurde auf die vorbereitete Neubauer Zählkammer pipettiert und die Zellen ausgezählt. Dazu wurden die Zellen aller vier großen Eckquadrate gezählt und der Mittelwert der erhaltenen Zellzahlen gebildet. Die Anzahl an Zellen je ml wurde anschließend anhand folgender Formel ermittelt:

Mio. Zellen/ml = Zellzahl (Mittelwert der vier Quadrate) x Verdünnung (10) x Volumen (ml) x Kammerfaktor (0,01)

Impedanzmessung

Die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des Zellzählers *CASY® 1TT* (Schärfe-System) beruht auf der Messung des Widerstands der Zellsuspension mittels elektronischer Pulsflächenanalyse. Durch die Messkapillare fließt ein konstanter Stromkreis, in dem eine NaCl-Lösung einen konstanten Widerstand aufweist. Während der Messung stellt jeder Impuls eine Zelle bzw. einen Partikel dar. Der gemessene Widerstand an der Kapillare verändert sich proportional zur Größe und zum Volumen der durchströmenden Zellen bzw. Partikel. Da tote Zellen und Partikel einen anderen physiologischen Zustand als lebende Zellen aufweisen und somit auch einen anderen Widerstand erzeugen, können diese durch die Wahl des geeigneten Messbereichs differenziert werden (Abbildung 2.2).

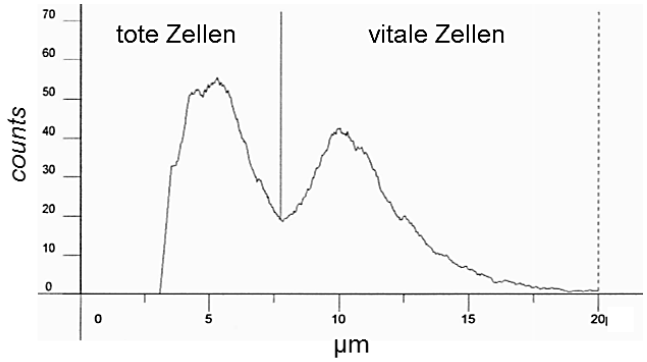


Abbildung 2.2: Zellzahlbestimmung von B-LCLs mittels Impedanzmessung. Mit diesem elektronischen Messverfahren wurden Zellen und Partikel gezählt und gleichzeitig deren Größe bestimmt. Da tote Zellen bzw. Partikel einen anderen Widerstand aufweisen als vitale Zellen, konnten diese voneinander unterschieden werden. Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien.

Die zur Zellzahlbestimmung verwendeten Verdünnungen (1:100 – 1:1000 auf insgesamt 10 ml) wurden mit 0.9% NaCl hergestellt. Der Messbereich reichte bis zu einem Durchmesser der Zellen von 20 µm, wobei die Zellen zwischen 7,7 und 20 µm als vital gezählt wurden. Die Zellzahlen wurden jeweils als Mittelwert aus Dreifachbestimmungen ermittelt.

2.2.3 HLA-Typisierung

Um gezielt Probanden, die mit T1D assoziierte HLA-Haplotypen tragen, für die Untersuchungen heranziehen zu können, mussten diese durch vorrangegangene HLA-Typisierung identifiziert werden. Dazu wurden 2 ml Probandenblut in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Röhrchen aufgenommen. Die HLA-Bestimmung wurde am Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Zur Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Isolierung aus EDTA-Blut wurde der *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen) verwendet. Für die Typisierung von *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* wurde zunächst Exon 2 mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die nachfolgende Sequenzbestimmung erfolgte durch Hybridisierung im revers *Sequenz Specific Oligonucleotides* (SSO) Dot Blot Verfahren.

2.2.4 Herstellung von EBV-Überständen

Die zur Epstein-Barr-Virus (EBV)-Transformation verwendeten EBV-Überstände wurden aus der lymphoblastoiden Marmosettenzelllinie B 95-8 gewonnen. Hierzu wurden die Zellen bei einer Konzentration von 1 x 10^6 Zellen pro ml Medium für eine Woche im Brutschrank (37°C, 5% CO_2) inkubiert. Nach vorsichtiger Entnahme und Zentrifugation des Überstandes bei 1200 rpm für 10 min bei RT, wurde dieser sterilfiltriert (0,45 µm), aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.2.5 EBV-Transformation

Durch die Transformation mit EBV können humane B-Zellen immortalisiert werden, wodurch unbegrenzt proliferierende B-LCLs entstehen. Es handelt sich dabei um eine oligoklonale Population.
Zunächst wurden bis zu 4 x 10^6 PBMC bei 1200 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1,25 ml Medium (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,2% Normocin™ in RPMI 1640 + GlutaMAX™-I) resuspendiert. Anschließend wurden 1,25 ml EBV-Überstand hinzugegeben. Nach mindestens 2-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurde der EBV-Ansatz in Zellkulturflaschen überführt und 2,5 ml Cyclosporin A (CSA)-Medium hinzugegeben. Nach dreiwöchiger Kultivierung bei 37°C und 5% CO_2 waren Blasten in Form von aggregatbildenden großen klaren Zellen zu erkennen. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von zwei bis vier Wochen unter mehrmaligem Mediumwechsel kultiviert, bis eine Zellzahl von ca. 5 Mio. erreicht war. Anschließend wurden die Zellen bis zum Gebrauch in 1 ml Einfriermedium in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.6 Stimulation von B-LCLs mit PMA bzw. IFN-γ

Für Stimulationsversuche mit B-LCLs wurde das Mitogen PMA oder das inflammatorische Zytokin IFN-γ verwendet. PMA und IFN-γ wurden in dieser Arbeit zur Simulation eines inflammatorischen Milieus eingesetzt. Die Stimulationszeiten betrugen für PMA 6 h oder 24 h und für IFN-γ stets 24 h.
Am Vortag der Versuche wurden die B-LCLs in einer Zelldichte von 0,8 x 10^6/ml in jeweils 6 ml Medium auf drei Zellkulturflaschen (Flasche 1 – 3) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Danach wurden die Zellen aus zwei Kulturflaschen (Flasche 2 und 3) mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) stimuliert und für den jeweiligen Zeitraum (Flasche 2: 6 h; Flasche 3: 24 h mit Waschschritt nach 6 h) bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Zellen aus Flasche 1 blieben unstimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden nach der jeweiligen Inkubationszeit, bei unbehandelten Zellen sofort, geerntet. Dafür wurden die Zellen bei 1200 rpm für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand bis zur Untersuchung der Zytokinsekretion bei -20°C gelagert. Das Zellpellet wurde daraufhin einmal mit 4°C

kaltem 1X PBS gewaschen, bei 1200 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand komplett entfernt und das Zellpellet zur RNA-Isolation sofort auf Eis gestellt. Für die 24-stündige Stimulation mit PMA wurde nach 6 h das Medium durch frisches Medium ohne PMA ersetzt und die Zellen für weitere 18 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Dadurch sollte der toxische Effekt von PMA auf die Zellen verringert werden. Sind die Zellen einmal durch PMA aktiviert, bleibt dieser Zustand auch in Abwesenheit von PMA erhalten. Nach insgesamt 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen wie oben beschrieben weiter behandelt. IFN-γ wurde über den gesamten Zeitraum im Medium belassen. Der gesamte Ablauf der B-LCL-Stimulation ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

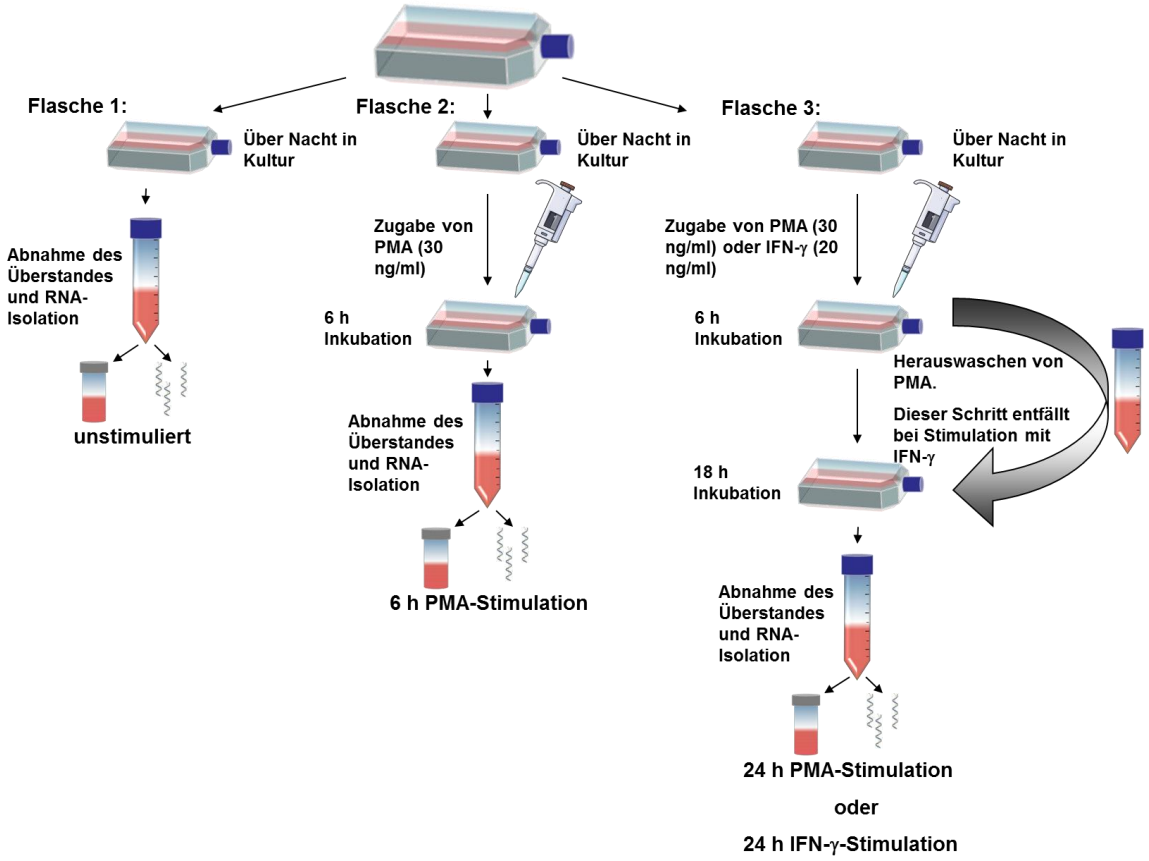


Abbildung 2.3: Workflow der B-LCL-Stimulation mit PMA bzw. IFN-γ. Die B-LCLs (0,8 x 10^6/ml) wurden auf drei Zellkulturflaschen (Flasche 1 – 3) verteilt und bei 37°C und 5% CO_2 über Nacht kultiviert. Anschließend wurden die B-LCLs aus Flasche 1 zur RNA-Isolation pelletiert und der Überstand bei -20°C tief gefroren. In Flasche 2 wurde stets PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) gegeben, wohingegen in Flasche 3 entweder PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) oder IFN-γ (Endkonzentration: 20 ng/ml) hinzugefügt wurde. Nach 6-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Zellen aus Flasche 2 zur RNA-Isolation ebenfalls pelletiert und der Überstand bei -20°C tief gefroren. Bei den Zellen aus Flasche 3 wurde nach PMA-Stimulation das PMA nach 6 h herausgewaschen und die Zellen in frischem Medium ohne PMA für weitere 18 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach IFN-γ-Stimulation verblieb dieses die ganzen 24 h im Medium. Anschließend wurden die Zellen aus Flasche 3 ebenfalls zur RNA-Isolation pelletiert und der Überstand bei -20°C

tief gefroren. Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; IFN-γ: Interferon-gamma; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; RNA: Ribonukleinsäure.

2.2.7 Kurzzeitstimulation von B-LCLs mit PMA

Die Zeiträume für die Kurzzeitstimulation betrugen 0 h, 2 h, 4 h und 6 h. Die Zeitpunkte für die einzelnen PMA-Zugaben (Endkonzentration: 30 ng/ml) wurden so gewählt, dass die Zellen aller Stimulationszeiten gleichzeitig pelletiert werden konnten. Dadurch, dass alle Zellen gleich lange kultiviert wurden, konnte ein kumulativer Effekt der sekretierten Zytokine im Medium ausgeschlossen werden. Nach Zentrifugation der Zellen bei 1200 rpm für 10 min bei 4°C wurden die Überstände abgenommen und bei -20°C bis zur Untersuchung der Zytokinsekretion gelagert.

2.2.8 Bestimmung der sekretierten Zytokinmenge mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Mit Hilfe des *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* (ELISA) wurde aus B-LCL-Überständen die Menge der ins Medium sekretierten Zytokine nach Stimulation mit PMA bestimmt. Dieser ELISA beruht auf der Verwendung zweier spezifischer Antikörper, die an unterschiedliche Stellen des nachzuweisenden Analyts binden, so dass ein Antikörper-Analyt-Antikörper-Komplex entsteht. An den zweiten biotinylierten Antikörper wird der Komplex Streptavidin-Meerrettichperoxidase (*horseradish-peroxidase*, HRP) gebunden, der durch die Umsetzung des passenden Substrats die Farbreaktion katalysiert.

Für die Bestimmung der Sekretion der Zytokine IL-10 und TNF-α wurden die entsprechenden *DuoSet ELISA Kits* von R&D Systems verwendet. Zunächst wurde der erste Antikörper (*capture antibody*) in 1X PBS gelöst (Endkonzentration: 4 µg/ml) und 100 µl davon in jede Vertiefung einer ELISA-Platte pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei RT. Während dieser Zeit wurde der Antikörper an die Kunststoffoberfläche der Vertiefungen gebunden. Anschließend wurde die Platte 3x mit 250 µl PBS-T (0,5% Tween® 20 in 1X PBS) gewaschen (in diesem Abschnitt als „Waschschritt“ bezeichnet), um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Dann wurde 200 µl Blockierungspuffer (1% bovines Serumalbumin

(BSA) in 1X PBS) in jede Vertiefung gegeben und die Platten für 1 h bei RT inkubiert. Dadurch wurden die unspezifischen Proteinbindungsstellen blockiert. Nach einem weiteren „Waschschritt“ wurden jeweils 100 µl der entsprechenden Standardreihe (Tabelle 2.6), der B-LCL-Überständen (Verdünnungen: von 1:1 bis 1:25 in Blockierungspuffer) und einer sogenannten Interassay-Kontrolle jeweils in Doppelwerten auf die Platten aufgetragen und diese für 2 h bei RT inkubiert. Bei einer Interassay-Kontrolle handelt es sich um eine Probe, die auf alle Platten eines Versuchs aufgetragen wird. Der Variationskoeffizient (*coefficient of variability*, CV), bei dem es sich um die relative Standardabweichung handelt (Standardabweichung dividiert durch das arithmetische Mittel), sollte für die Interassay-Kontrolle nicht größer als 15% sein. Nach dem darauffolgenden „Waschschritt“ wurde der mit Biotin konjugierte zweite Antikörper (*detection antibody*) aufgetragen und die Platten für weitere 2 h bei RT inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden anschließend durch einen „Waschschritt“ entfernt. Daraufhin wurden 100 µl Streptavidin-HRP (Verdünnung 1:200 in Blockierungspuffer) hinzupipettiert und 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach einem letzten „Waschschritt“ wurden 100 µl des Substrats 3, 3’, 5, 5’-Tetramethylbenzidin (TMB) unverdünnt hinzugefügt und die Platten für exakt 20 min im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion nahm in dieser Zeit proportional zum vorhandenen Zytokin zu. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit 50 µl einer 2 N H_2SO_4-Lösung, wurde die optische Dichte (OD) jeder Vertiefung bei 450 nm im ELISA-*Reader* gemessen. Nach Subtraktion der Leerwerte wurde die sekretierte Zytokinmenge anhand der mitgeführten Standardkurve ermittelt.

Tabelle 2.6: Standardkonzentrationen zur Bestimmung der sekretierten Zytokinmengen von IL-10 und TNF-α mittels ELISA. Verwendete Abkürzungen: ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; Std: Standard; IL-10: Interleukin-10; TNF-α: Tumornekrosefaktor-alpha.

Zytokin	**Standardkonzentrationen (pg/ml)**							
	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Std 7	Std 8
IL-10	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	0
TNF-α	1000	500	250	125	62,5	31,35	15,625	0

2.2.9 Bestimmung der Zellproliferation mittels BrdU-ELISA

Mit Hilfe eines BrdU-ELISAs (*Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric*), Roche) wurde die Zellproliferation von B-LCLs nach Stimulation mit PMA, TNF-α oder verschiedenen Überständen bestimmt. Diese Methode beruht auf dem Einbau von 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU), bei dem es sich um ein Basenanalogon von Thymidin handelt, während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA.

Zunächst wurden, abhängig von den jeweiligen Versuchen, 20.000 – 30.000 Zellen in einer 96-well-Platte in 100 µl purem Medium oder in mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) bzw. TNF-α (Endkonzentrationen: 0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml oder 2 ng/ml) enthaltenem Medium oder in verschiedenen Überständen für etwa 6 h bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Anschließend wurden 10 µl BrdU hinzugegeben (Endkonzentration: 10 µM) und die Platte für weitere 17 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Während dieser Zeit wurde das BrdU in die neu synthetisierte DNA proliferierender Zellen eingebaut. Anschließend wurde die Platte bei 1500 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Platte im Wärmeschrank bei 50°C für 70 min getrocknet. Zur Fixierung und DNA-Denaturierung wurden 200 µl der im Kit enthaltenen FixDenat-Lösung hinzupipettiert und die Platte für 30 min bei RT inkubiert. Nach Entfernen der FixDenat-Lösung wurden jeweils 100 µl des anti-BrdU-Peroxidase (POD)-Antikörpers hinzugefügt und die Platte für weitere 90 min bei RT inkubiert. Zum Entfernen ungebundener Antikörper wurde die Platte 3x mit 200 µl 1X PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 µl des Substrats 1X TMB in jede Vertiefung gegeben und die Platte für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Farbreaktion nahm in dieser Zeit proportional zur vorhandenen neu synthetisierten DNA zu. Zum Schluss wurde die Reaktion mit 25 µl 2 N H_2SO_4 abgestoppt. Nach einer weiteren Minute erfolgte die Messung der OD jeder Vertiefung bei 450 nm im ELISA-*Reader*.

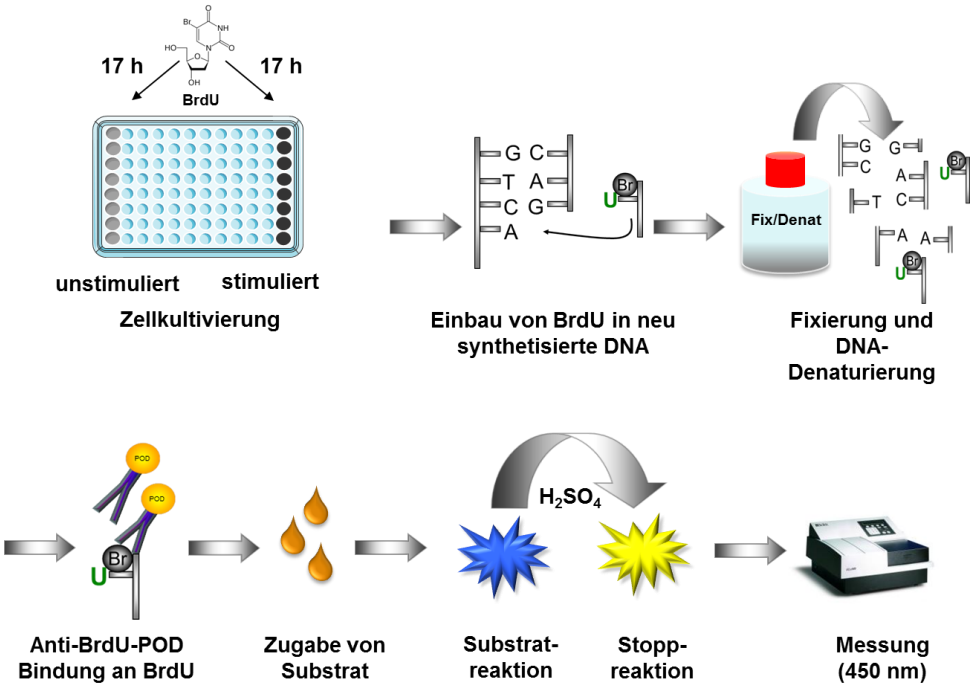


Abbildung 2.4: Workflow des BrdU-ELISAs. Es wurden zwischen 20.000 und 30.000 Zellen entweder unstimuliert oder stimuliert in Medium inklusive BrdU (Endkonzentration: 10 µM) kultiviert. In dieser Zeit wurde das BrdU in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Anschließend folgte die Fixierung und DNA-Denaturierung. Nach Bindung des anti-BrdU-POD-Antikörpers fand nach Zugabe von 1X TMB die Substratreaktion statt. Nach Abstoppen der Reaktion durch H_2SO_4 erfolgte die Messung der OD bei 450 nm im ELISA-*Reader*. Verwendete Abkürzungen: BrdU: 5-Brom-2-desoxyuridin; DNA: Desoxyribonukleinsäure; ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; OD: optische Dichte; POD: Peroxidase.

2.2.10 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen

Durch die intrazelluläre Färbung von Zytokinen sollte die TNF-α-Produktion von B-LCLs mit und ohne PMA-Stimulation mit Hilfe eines Durchflusszytometers (*Fluorescence-activated Cell Sorting*, FACS) untersucht werden. Um die Sekretion der Zytokine ins Medium zu verhindern, wurden die Zellen mit Brefeldin A (BFA) behandelt. Dieses Zellgift inhibiert den vesikulären Proteintransport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat, so dass gebildete Zytokine in der Zelle akkumulieren.

Zunächst wurden 1,6 x 10^6 Zellen in 2 ml Medium auf 6-well-Platten ausgesät und bei 37°C und 5% CO_2 über Nacht kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen entweder für 6 h mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) inkubiert oder unbehandelt belassen. Fünf Stunden bevor die Zellen geerntet wurden, wurde BFA (Endkonzentration: 10 µg/ml) dazugegeben. Anschließend wurden die Zellen

pelletiert, das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer (1% BSA in 1X PBS) gelöst, auf Spitzbodenplatten überführt und bei 1500 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Daraufhin wurde das für B-Lymphozyten charakteristische Oberflächenantigen CD19 angefärbt. Dazu wurden die Zellen mit jeweils 100 µl des Mastermixes für die Färbung von CD19-Oberflächenmoleküle für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert und anschließend 2x mit jeweils 150 µl Perm/Wash-Lösung gewaschen. Zur Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen in 100 µl Cytofix/Cytoperm -Lösung resuspendiert, für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert und nochmals 2x mit jeweils 150 µl Perm/Wash-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl des Mastermixes für die intrazelluläre Färbung von TNF-α für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit jeweils 150 µl Perm/Wash-Lösung wurden die Zellen zur Messung am LSR II Durchfluss-zytometer in FACS-Röhrchen überführt.

Mastermix für die Färbung von CD19-Oberflächenmolekülen:

CD19 Qdot 655	1 µl
FACS-Puffer	99 µl
Gesamt	100 µl

Mastermix für die intrazelluläre Färbung von TNF-α:

TNF-α Alexa 700	5 µl
FACS-Puffer	95 µl
Gesamt	100 µl

2.2.11 Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid-Färbung

Die Zellzyklusanalyse diente dazu, mögliche Unterschiede in den Zellzyklusphasen von B-LCLs zu identifizieren. Die Untersuchung wurde mit Hilfe von Propidiumiodid (PI) durchgeführt, das in Nukleinsäuren interkaliert. Vor dem Anfärben der Zellen wurden diese mit RNAse A behandelt, da PI nicht nur in DNA, sondern auch in RNA interkaliert, was zur Bildung von Artefakten und somit zu einem falschen Ergebnis führen würde. Das am Durchflusszytometer gemessene Fluoreszenzsignal korreliert mit der Farbstoffmenge, die in die DNA interkalierte. Da der Chromosomensatz einer Zelle in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus variiert (Ruhephase/Gap1-Phase (G0/G1-Phase): einfacher diploider Chromosomansatz (2n); Synthesephase (S-Phase): Chromosomensatz variiert zwischen 2n und 4n; Gap2-Phase/Mitosephase (G2/M-Phase): doppelter diploider Chromosomensatz (4n)), lässt sich anhand des Fluoreszenzsignals die prozentuale Verteilung der Zellen auf die jeweiligen Phasen ermitteln.
Nach einem Zentrifugationsschritt (1200 rpm, 10 min, RT) wurden 1 x 10^6 B-LCLs in kaltem 1X PBS aufgenommen, in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellpellets in 300 µl kaltem 1X PBS resuspendiert. Zur Permeabilisierung und Fixierung der Zellen wurden 700 µl 100% Ethanol dazugegeben (Endkonzentration: 70% Ethanol in 1X PBS) und die Suspension für mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 250 µl 1X PBS inklusive RNAse A (Endkonzentration: 0,4 mg/ml) aufgenommen und für 1 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in FACS-Röhrchen mit 250 µl 1X PBS überführt. Etwa eine Minute vor der Messung wurde PI (Endkonzentration: 50 µg/ml) zu den Zellen gegeben und gut gemischt. Die Zellen konnten nun im LSR II Durchflusszytometer analysiert werden.

Datenauswertung

Bei der Auswertung wurde darauf geachtet, Dubletten (Zellaggregate bestehend aus zwei aneinander haftenden Zellen), die sich bei einer Fixierung mit Ethanol häufig bilden, auszuschließen. Da zwei aneinander haftende Zellen, die sich jeweils in der G0/G1-Phase befinden, die gleiche Menge an DNA besitzen und somit das gleiche Fluoreszenzsignal erzeugen wie eine Einzelzelle, die sich in der

G2/M-Phase befindet, könnte dies zu falsch positiven Ergebnissen führen. Dieser Fehler kann über eine Selektion anhand der unterschiedlichen Größen von Einzelzellen und Zellaggregaten verhindert werden. Da Dubletten für gewöhnlich größer sind als Einzelzellen, benötigen sie mehr Zeit um den Laserfokus zu passieren, was zu einem breiteren Peak und somit zu einer größeren Signal-Weite führt. Die Auswertung der prozentualen Verteilung der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen (G0/G1-Phase, S-Phase und G2/M-Phase) beschränkte sich daher auf die in Abbildung 2.5a markierte Population (roten Kasten), wodurch Dubletten von der Analyse ausgeschlossen wurden.

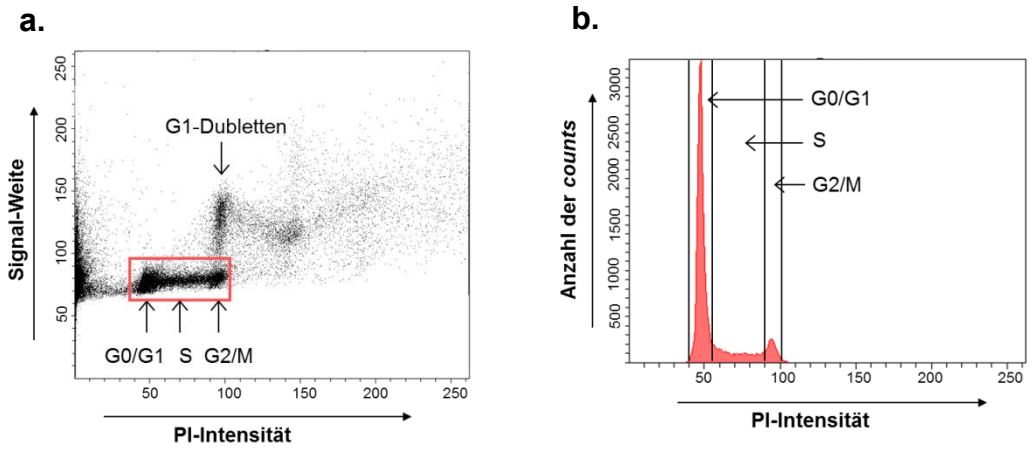


Abbildung 2.5: Dotplot und Histogramm zur Datenanalyse.
a: Dotplot zur Dubletten-Diskriminierung: Der Dotplot diente zur Diskriminierung von Dubletten, die sich durch die Fixierung mit Ethanol bilden können. Durch die unterschiedlichen Signal-Weiten von Einzelzellen und Dubletten war es möglich diese voneinander zu unterscheiden. Für die Datenanalyse wurde ausschließlich der Teil der Population innerhalb des roten Kastens verwendet. **b: Histogramm zur Datenanalyse:** Das Histogramm wurde zur eigentlichen Datenanalyse verwendet. Angezeigt und ausgewertet wurde nur die im Dotplot rot eingerahmte Population (Abbildung 2.5a). Verwendete Abkürzungen: G0/G1: Ruhephase/Gap1-Phase; S: Synthesephase; G2/M: Gap2-Phase/Mitosephase PI: Propidiumiodid.

2.2.12 Gesamt-RNA und miRNA-Extraktion aus B-LCLs

Zur Extraktion der Gesamt-RNA inklusive miRNA aus unstimulierten und mit PMA bzw. IFN-γ stimulierten B-LCLs (5 x 10^6) wurde der *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Der DNAse-Verdau wurde mit Hilfe des *RNAase-Free DNAse Sets* (Qiagen) ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt. Die extrahierte RNA jeder Probe wurde zum Schluss mit 30 – 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Proben wurden bis zum Gebrauch bei -80°C eingefroren.

2.2.13 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Ermittlung der Nukleinsäure-Konzentration erfolgte spektralphotometrisch. Die Nukleinsäuren wurden mit ddH_2O auf ein Gesamtvolumen von 80 µl verdünnt (zwischen 1:20 und 1:100, je nach zu erwartender Konzentration). Als Leerwert diente ddH_2O. Die Nukleinsäure-Konzentration errechnet sich nach folgender Formel:

Nukleinsäure-Konzentration (µg/ml) = Multiplikationsfaktor x Verdünnungsfaktor x OD_{260}

Für einzelsträngige RNA beträgt der Multiplikationsfaktor 40, da eine OD-Einheit einer Konzentration von 40 µg/ml entspricht. Dementsprechend beträgt der Multiplikationsfaktor für doppelsträngige DNA 50. Der Verdünnungsfaktor variierte je nach Verdünnungsgrad.

2.2.14 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäurefragmente entsprechend ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dies wird durch die Phosphorsäurereste ermöglicht, die der Nukleinsäure bei neutralem pH-Wert eine negative Ladung verleihen. Dem entsprechend wandert die Nukleinsäure nach Anlegen einer Spannung zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit

der Fragmente ist dabei abhängig von der Länge der Moleküle und der Porenweite der Trägermatrix. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente nimmt dabei mit abnehmender Porenweite (höherprozentiges Gel) und zunehmender Länge der Nukleinsäuren ab.

Die Agarose wurde in 1X Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)-Puffer angesetzt, der auch als Laufpuffer diente. Nach Aufkochen der Agarose wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,34 µg/ml) dazugegeben, das zwischen die Basen der Nukleinsäuren interkalierte und diese somit unter ultraviolettem (UV)-Licht sichtbar wurden. Nachdem die Nukleinsäureproben in die Geltaschen geladen waren, wurde eine Spannung von 120 Volt (V) für etwa 30 min angelegt. In dieser Zeit wurden die Nukleinsäurefragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren diente das Geldokumentationssystem Genosmart von VWR.

2.2.15 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diente in dieser Arbeit zur Amplifikation von bestimmten HLA-Klasse-II-Gen-Sequenzen. Das Prinzip der PCR beruht auf der exponentiellen Amplifikation definierter Genomabschnitte. Hierfür wurden zum einen Primer der Firma Qiagen und zum anderen selbst erstellte Primer verwendet, die den zu amplifizierenden Bereich flankierten. Um eine optimale Ausbeute an PCR-Produkten zu erhalten, mussten für jedes Primerpaar die PCR-Bedingungen angepasst werden. Hierfür wurden verschiedene *annealing*-Temperaturen und -Zeiten getestet. Auch die eingesetzten Mengen an Primern, Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), *Taq*-Polymerase (*Thermus aquaticus*, *Taq*) und *template*-DNA wurden zu diesem Zweck variiert. Im Regelfall wurde nachfolgender Standard-PCR-Ansatz und das in Tabelle 2.7 angegebene Standard-PCR-Programm verwendet.

Standard-PCR-Ansatz:

ddH_2O	variabel
10X Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix (8 mM)	2,5 µl
Vorwärtsprimer (10 µM)	0,5 µl
Rückwärtsprimer (10 µM)	0,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
template-DNA	variabel
Gesamt je Reaktion	25 µl

Tabelle 2.7: Standard-PCR-Programm. Verwendete Abkürzungen: PCR: Polymerasekettenreaktion; *Taq: Thermus aquaticus.*

Anzahl der Zyklen	Dauer	Temperatur (°C)	was
1x	3 min	95	Aktivierung der *Taq*-Polymerase
38x	30 sek 30 sek 30 sek	95 53 – 60 72	Denaturierung *annealing* Elongation
1x	5 min	72	Elongation

2.2.16 Ligation

Die Klonierung der PCR-Produkte verschiedener HLA-Klasse-II-Gene in einen Plasmid-Vektor erfolgte mit Hilfe des *pGEM®-T Vector Systems* (Promega). Voraussetzung für die erfolgreiche Ligation war der Einsatz einer *Taq*-Polymerase, die unabhängig vom Matrizenstrang bei der vorangegangenen PCR am 3´-Ende des PCR-Produkts einen einzelnen Adenin (A)-Überhang synthetisiert. Nach der Verknüpfung des PCR-Produkts mit dem Vektor durch das Enzym T4 DNA-Ligase und des Cofaktors Adenosintriphosphat (ATP), wurde das Ligationsprodukt in superkompetente Bakterien transformiert.

Ligationsansatz:

2X Ligationspuffer	5 µl
pGEM®-T-Vektor (50 ng/µl)	1 µl
PCR-Produkt (30 – 50 ng)	3 µl
T4 DNA-Ligase (3 U/µl)	1 µl
Gesamt je Reaktion	10 µl

Für die Ligation wurde pro Ansatz zwischen 30 und 50 ng des PCR-Produkts verwendet. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und konnte im Anschluss direkt für die Transformation verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

2.2.17 Transformation

Für die Transformation, die der Vervielfältigung von Plasmid-DNA diente, wurden die superkompetenten Bakterien *Epicurian Coli® XL10-Gold®* (Stratagene) verwendet. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 50 µl der Zellsuspension in vorgekühlte 15 ml Falcons überführt. Zur Steigerung der Kompetenz wurden die Zellen mit 2 µl des im Kit mitgelieferten β-Mercaptoethanols versetzt und unter gelegentlichem leichten Schwenken für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 3 µl der Ligationsreaktion mit der Bakteriensuspension vermengt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Hitzeschockreaktion bei genau 42°C für exakt 30 Sekunden. Durch die dabei entstandenen Poren in der Zellmembran gelangte die DNA in die Zellen. Sofort nach der Hitzeschockreaktion wurden die Zellen für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 200 µl eines mit 20%iger Glukose versetzten *lysogeny broth* (LB)-Mediums wurden die Zellen für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert und im Anschluss auf LB-Agarplatten inklusive Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

2.2.18 Kolonie-PCR und Inokulation

Nach erfolgreicher Transformation waren am folgenden Tag Bakterienkolonien auf den LB-Agarplatten vorhanden. Um Insert-tragende Kolonien als solche zu identifizieren, wurde zunächst eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurde mit einer sterilen Pipettenspitze etwa die Hälfte einer Bakterienkolonie „gepickt“ und in ein Reaktionsgefäß mit entsprechendem PCR-Reaktionsansatz getaucht. Die andere Hälfte derselben Kolonie wurde ebenfalls „gepickt“ und in 5 ml LB-Medium inklusive Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) inokuliert. Die Amplifikations-bedingungen für die Kolonie-PCR entsprachen den in Abschnitt 2.2.15 genannten

Bedingungen. Nach erfolgter Amplifikation und Gelelektrophorese wurden zwei Inokulate, die als Insert-tragende Klone identifiziert wurden, ausgewählt und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

2.2.19 Extraktion von Plasmid-DNA (Mini-Präparation)

Die Mini-Präparation diente der Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien. Nachdem am Vortag 5 ml LB-Medium inklusive Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) mit den entsprechenden Bakterienklonen inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert wurde, wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des *QIAprep® Spin Miniprep Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Abschließend wurde die isolierte Plasmid-DNA in 50 µl EB-Puffer eluiert und konnte sofort weiter verwendet oder bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert werden.

2.2.20 Kontrollverdau

Um sicherzustellen, dass die Plasmide ein Insert richtiger Größe trugen, wurde ein Kontrollverdau durchgeführt. Dazu wurden zwei Endonukleasen (Nco I und Pst I) verwendet, deren spezifische Schnittstellen im Vektor lagen und das Insert flankierten. Die Inkubation des Verdauansatzes fand für 2 – 3 h bei 37°C im Heizblock statt.

Ansatz für den Kontrollverdau:

ddH_2O	3 µl
10X NEB 3-Puffer	1 µl
Plasmid-DNA	4 µl
Nco I (10 U/µl)	1 µl
Pst I (10 U/µl)	1 µl
Gesamt je Reaktion	10 µl

2.2.21 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde von der Firma GATC Biotech, Konstanz nach der Sanger-Methode mit Hilfe des Geräts ABI 3730 xl durchgeführt. Die Plasmid-DNA (Endkonzentration: 30 – 100 ng/µl) wurde zu je 20 µl an GATC Biotech geschickt. Als Sequenzierprimer diente der Primer SP6. Dieser wurde von der Firma GATC angeboten und lag 72 bp in 3´-Richtung der *Multiple Cloning Site* (MCS) der Plasmide. Die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung waren über die Homepage der Firma zugänglich und konnten von dort zur Auswertung heruntergeladen werden.

2.2.22 Reverse Transkription von Gesamt-RNA

Die reverse Transkription wurde mit dem *RT^2 First Strand Kit* (Qiagen) durchgeführt. Vor Beginn der reversen Transkription wurde noch vorhandene genomische DNA (gDNA) mit Hilfe eines Eliminationsmixes entfernt. Die reverse Transkription beruht auf der Verwendung von Random-Hexanukleotid-Primern und Oligo-Desoxythymidin (dT)-Primern. Als RNA-abhängige DNA-Polymerase wurde die *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MuLV) reverse Transkriptase verwendet. Zudem wurde eine externe RNA-Kontrolle mitgeführt, die durch Kontrollelemente, die auf den *RT² Profiler™ PCR Arrays* (Qiagen) vorhanden waren, detektiert werden konnte (Abschnitt 2.2.24.2). Dadurch konnte später auf die Effizienz der reversen Transkription geschlossen werden. Nach erfolgter reverser Transkription wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Zunächst wurden 2 µl des im Kit enthaltenen Puffers zur Eliminierung von gDNA in 0,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert, 2 µg Gesamt-RNA hinzugefügt und die Reaktion mit RNase-freiem Wasser auf insgesamt 10 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 42°C für 5 min im Heizblock. Während dieser Zeit wurde noch vorhandene gDNA eliminiert. Anschließend wurde der Ansatz für mindestens 1 min auf Eis gekühlt. Danach wurden 10 µl des Mastermixes für die reverse Transkription hinzugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei 42°C im Heizblock wurde der Ansatz bei 95°C für 5 min abgestoppt anschließend für mindestens 1 min auf Eis gekühlt. Anschließend konnte der Ansatz bei -20°C gelagert oder direkt für die *real-time*-quantitative-PCR verwendet werden.

Eliminationsmix zur Entfernung von gDNA:

RNAse freies H_2O	variabel
GE (*5X gDNA Elimination Buffer*)	2 µl
Gesamt-RNA (2 µg)	variabel
Gesamt je Reaktion	10 µl

Mastermix für die reverse Transkription:

RNAse freies H_2O	3 µl
BC3 (*5X ReverseTranscription Buffer 3*)	4 µl
P2 (*Primer and External Control Mix*)	1 µl
RE3 (*ReverseTranscription Enzyme Mix 3*)	2 µl
Gesamt je Reaktion	10 µl

2.2.23 Reverse Transkription von miRNA

Für die reverse Transkription von miRNA mit Hilfe des *miScipt II RT Kits* (Qiagen) wurde in dieser Arbeit stets der im Kit enthaltene HiSpec-Puffer verwendet. Es wurden stets 1,5 µg RNA (Gesamt-RNA inklusive miRNA) eingesetzt. Je nach RNA-Konzentration wurde die entsprechende Menge an RNase freiem Wasser in 0,5 ml Eppendorfgefäße vorgelegt und 8 µl des Mastermixes für die reverse Transkription von reifer miRNA dazugegeben. Anschließend wurden 1,5 µg RNA hinzugefügt, der Reaktionsansatz im Heizblock bei 37°C für 60 min inkubiert und anschließend bei 95°C für 5 min inaktiviert. Der Ansatz wurde für mindestens 2 min auf Eis gekühlt und konnte anschließend bei -20°C gelagert oderdirekt für die *real-time*-quantitative-PCR verwendet werden.

Reaktionsansatz für die reverse Transkription von reifer miRNA:

RNAse freies H_2O	variabel	
5X miScript HiSpec Puffer	4 µl	Mastermix
10X miScript Nucleus Mix	2 µl	
miScipt reverser Transkriptase Mix	2 µl	
RNA (1,5 µg)	variabel	
Gesamt je Reaktion	20 µl	

2.2.24 *Real-time*-quantitative-PCR

Die *real-time*-quantitative-PCR (qRT-PCR) ist eine hoch sensitive Methode zur Durchführung von Genexpressionsanalysen. Bei einer herkömmlichen PCR nach dem Prinzip der sogenannten Endpunktanalyse wird das amplifizierte Produkt erst am Ende der PCR-Reaktion in der Plateauphase gelelektrophoretisch ausgewertet, wodurch ausschließlich ein qualitativer Nachweis möglich ist. Im Gegensatz dazu wird bei der qRT-PCR nach jedem Zyklus die Menge des entstandenen Amplikons durch Fluoreszenzmessung erfasst, was eine quantitative Analyse ermöglicht (Abbildung 2.6). Als Fluoreszenzfarbstoff wird SYBR Green verwendet, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert. Das Fluoreszenzsignal steigt dabei proportional zur Menge der entstandenen Amplifikate an. Die Datenerfassung findet in der exponentiellen Phase statt. In dieser Phase herrschen optimale Reaktionsbedingungen, so dass es bei optimaler PCR-Effizienz pro Zyklus zu einer Verdopplung der Amplifikate kommt.

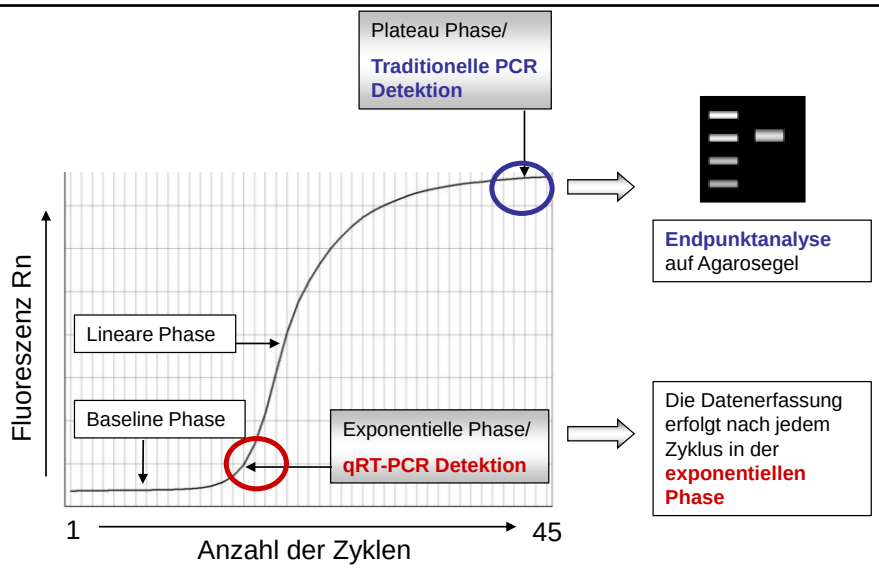


Abbildung 2.6: Darstellung der verschiedenen qRT-PCR-Phasen. Auf der Ordinatenachse sind die normalisierten Fluoreszenzwerte (Rn) (= Fluoreszenz von SYBR Green dividiert durch die Fluoreszenz eines Referenzfarbstoffes (in der vorliegenden Arbeit: ROX)) aufgetragen und auf der Abszissenachse die Anzahl der Zyklen. Im sigmoidalen Kurvenverlauf sind die verschiedenen Phasen einer qRT-PCR dargestellt. Die Baseline Phase spiegelt die Hintergrundfluoreszenz der PCR-Reaktion wider. Die Exponentielle Phase ist durch einen steilen Anstieg der Kurve durch die exponentielle Vervielfältigung des PCR-Produkts charakterisiert. Hier findet die Datenerfassung bei der qRT-PCR statt. Während der linearen Phase nimmt die Steigung der Amplifikationskurve ab. Dies kommt durch verbrauchtes Substrat und verminderte Enzymaktivität während der PCR-Reaktion zustande. In der Plateau Phase kommt die PCR-Reaktion zum Erliegen. Zu diesem Zeitpunkt findet bei einer traditionellen PCR die Detektion statt. Verwendete Abkürzungen: PCR: Polymerasekettenreaktion; qRT-PCR: *real-time*-quantitative-PCR; Rn: normalisierte Fluoreszenzwerte.

Da SYBR Green in jede doppelsträngige DNA interkaliert, können neben der zu untersuchenden Sequenz auch unerwünschte Sequenzen detektiert werden, was zu falschen Signalintensitäten führen kann. Daher wurde im Anschluss an die PCR zusätzlich eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Schmelztemperatur ist dabei abhängig von der Länge und dem GC-Gehalt eines Amplikons und sollte für ein bestimmtes Primerpaar identisch sein. Die Funktionsweise der Schmelzkurvenanalyse basiert auf einer langsamen Erhöhung der Temperatur. Ist die Schmelztemperatur des jeweiligen Amplikons erreicht, denaturiert die DNA-Doppelhelix und SYBR Green wird schlagartig freigesetzt, was zu einer sofortigen Abnahme des Fluoreszenzsignals führt. Da Artefakte eine andere Schmelztemperatur als das gewünschte PCR-Produkt besitzen, können diese so voneinander unterschieden werden.

2.2.24.1 Primerdesign der *HLA-DQB1*-Primer für die qRT-PCR

Die Primersequenzen für *HLA-DQB1* wurden manuell definiert, da im Primerbindungsbereich der Primer von Qiagen allelspezifische Sequenzunterschiede vorhanden waren (Abschnitt 3.4.1.3.2), welche einen Einfluss auf das Amplifikationsverhalten hatten (Abschnitt 3.4.1.4). Beim Erstellen der Primersequenzen für *HLA-DQB1* wurde darauf geachtet, dass bei den Bindungsstellen für den Vorwärts- und Rückwärtsprimer keine verschiedenen Sequenzen zwischen den zu untersuchenden Allelen vorkamen. Die verwendete komplementäre DNA (cDNA) wurde bereits zuvor mit Hilfe der *Customized Array Plates* (Qiagen) auf gDNA überprüft (Abschnitt 2.2.24.2). Da in keinem Ansatz gDNA gefunden wurde, mussten beim Erstellen der *HLA-DQB1*-Primer intronübergreifende Bereiche nicht mehr berücksichtigt werden. Mit Hilfe der im Anschluss an jedes qRT-PCR-Programm durchgeführten Schmelzkurvenanalyse wurde überprüft, ob nur ein spezifisches Produkt amplifiziert wurde. Dies ist der Fall, wenn sich bei der Analyse nur ein Fluoreszenz-Peak ergibt. Alle manuell definierten Primer für die qRT-PCR sowie für die Sequenzanalyse sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

2.2.24.2 qRT-PCR mit Hilfe von *Customized Array Plates*

Bei den *Customized Array Plates* von Qiagen handelt es sich um vorgefertigte Platten, auf denen sich bereits die einzelnen Primer-Paare befinden. Vorteile solcher Arrays sind eine hohe Reproduzierbarkeit und Konsistenz in der Durchführung, sowie eine einfache Handhabung. Des Weiteren sind viele Kontrollen, wie die gDNA-Kontrolle, die positive PCR-Kontrolle, sowie die reverse Transkriptionskontrolle, bereits integriert. Die genauen Definitionen dieser Kontrollen sind im Handbuch *RT^2 Profiler^{TM} PCR Array System* Version 5.01 auf den Seiten 32 – 33 detailliert beschrieben. In dieser Arbeit wurde das Plattenlayout für 8 verschiedene Gene und 12 verschiedene Probanden verwendet. Die für den qRT-PCR-Ansatz pipettierten Volumina entsprechen den Angaben aus dem oben genannten Handbuch auf Seite 21.
Zu Beginn wurden die nach der reversen Transkription erhaltenen 20 µl cDNA entsprechend der Herstellerangaben mit 91 µl ddH_2O verdünnt. Von dem Mastermix, welcher aus SYBR Green und ddH_2O bestand, wurden jeweils 216,5 µl auf zwölf 0,5 ml Eppendorfgefäße verteilt und 8,5 µl der jeweiligen cDNA hinzugefügt. Anschließend wurden je 25 µl in die Vertiefungen der Platten pipettiert.

qRT-PCR-Ansatz für eine *Customized Array Plate*:

ddH_2O	1248 µl	} Mastermix
2X RT^2 SYBR Green ROX qPCR-Mastermix	1350 µl	
verdünnte cDNA	102 µl	
Gesamt je Platte	2700 µl	

2.2.24.3 qRT-PCR mit Hilfe von Primer-Assays

Bei der Verwendung von Primer-Assays oder selbst erstellten Primern mussten diese zum Mastermix hinzugefügt werden. Je Vertiefung wurden 23 µl des Mastermixes bestehend aus SYBR Green, ddH_2O und dem jeweiligen Primer-Assay (10 µM je Primer) auf eine 96-well-Platte verteilt. Anschließend wurden je Ansatz 2 µl der verdünnten cDNA hinzugefügt.

qRT-PCR-Ansatz für RT^2 qPCR Primer-Assays:

ddH_2O	9,5 µl	⎫
2X RT^2 SYBR Green ROX qPCR-Mastermix	12,5 µl	⎬ Mastermix
Primer-Assay (10µM je Primer)	1 µl	⎭
verdünnte cDNA	2 µl	
Gesamt je Reaktion	25 µl	

2.2.24.4 qRT-PCR mit Plasmid-DNA

Für diese qRT-PCR wurden zunächst allelspezifische PCR-Produkte für die Gene *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* homozygoter Probanden in den pGEM-T Vektor ligiert (Abschnitt 2.2.16) und anschließend in superkompetente Zellen transformiert (Abschnitt 2.2.17). Nach erfolgreicher Inokulation (Abschnitt 2.2.18) und Mini-Präparation (Abschnitt 2.2.19) konnte die Plasmid-DNA für die qRT-PCR-Analyse verwendet werden.

Zunächst wurde die Plasmid-DNA auf eine Konzentration von 0,0015 ng/µl verdünnt. Daraufhin wurden je Vertiefung einer 96-well-Platte 22 µl des Mastermixes bestehend aus SYBR Green, ddH_2O und Primer-Assay (10 µM je Primer) verteilt. Anschließend wurden 3 µl Plasmid-DNA hinzugefügt.

qRT-PCR-Ansatz für Plasmid-DNA:

ddH_2O	8,5 µl	⎫
2 X RT^2 SYBR Green ROX qPCR-Mastermix	12,5 µl	⎬ Mastermix
Primer-Assay (10 µM je Primer)	1 µl	⎭
Plasmid-DNA (0,0015 ng/µl)	3 µl	
Gesamt je Reaktion	25 µl	

Für alle bisher beschriebenen qRT-PCR-Ansätze, wurde das Standard qRT-PCR-Programm aus Tabelle 2.8 verwendet.

Tabelle 2.8: PCR-Programm für eine Standard qRT-PCR. Verwendete Abkürzungen: DNA: Desoxyribonukleinsäure; *Taq: thermus aquaticus*; qRT-PCR: *real-time*-quantitative-PCR.

Anzahl der Zyklen	Dauer	Temperatur (°C)	was
1x	10 min	95	Aktivierung der HotStart DNA *Taq*-Polymerase
45x	15 sek	95	Denaturierung
	60 sek	60 **Fluoreszenzmessung**	*annealing* und Elongation
1x	15 sek	95	Schmelzkurvenanalyse
	60 sek	60	
	15 sek	95	
	15 sek	60	

2.2.24.5 qRT-PCR mit miRNA

Mit Hilfe dieser qRT-PCR wurde die Expression bestimmter miRNAs untersucht. Zunächst wurde die zuvor hergestellte cDNA (Abschnitt 2.2.23) verdünnt. Dazu wurden 123 µl ddH_2O vorgelegt und anschließend 2 µl der cDNA hinzugegeben. Anschließend wurde ein Mastermix bestehend aus SYBR Green, ddH_2O, Primer-Assay und einem Universal Primer angefertigt und davon jeweils 22,5 µl pro Vertiefung der 96-well-Platte verteilt. Anschließend wurden 2,5 µl der entsprechenden cDNA hinzugefügt.

PCR-Ansatz für die qRT-PCR mit miRNA:

ddH_2O	5 µl	Mastermix
2X miScipt SYBR Green PCR-Mastermix	12,5 µl	
10X Universal Primer	2,5 µl	
10X Primer-Assay	2,5 µl	
verdünnte cDNA	2,5 µl	
Gesamt	25 µl	

Für die qRT-PCR zur miRNA-Validierung wurde das qRT-PCR-Programm aus Tabelle 2.9 verwendet.

Tabelle 2.9: PCR-Programm für die qRT-PCR mit miRNA. Verwendete Abkürzungen: DNA: Desoxyribonukleinsäure; miRNA: microRNA; *Taq: thermus aquaticus*; qRT-PCR: *real-time*-quantitative-PCR.

Anzahl der Zyklen	Dauer	Temperatur (°C)	was
1x	15 min	95	Aktivierung der HotStart DNA *Taq*-Polymerase
45x	15 sek	94	Denaturierung
	30 sek	55	*annealing*
	34 sek	70 **Fluoreszenzmessung**	Elongation
1x	15 sek	95	Schmelzkurvenanalyse
	60 sek	60	
	15 sek	95	
	15 sek	60	

2.2.24.6 Bestimmung der PCR-Effizienz selbst erstellter Primer mit Hilfe einer Standardkurve

Herstellung einer Verdünnungsreihe

Zur Generierung einer Standardkurve wurden zunächst 3 µg RNA aus einer B-LCL revers transkribiert und eine 10-fache Verdünnungsreihe hergestellt. Die Konzentration der unverdünnten cDNA betrug 150 ng/µl. Als Ausgangsprodukt für die nächst höhere Verdünnung wurde stets die zuvor hergestellte Verdünnung verwendet.

Tabelle 2.10: Herstellung einer Verdünnungsreihe. Verwendete Abkürzungen: cDNA: komplementäre DNA; ddH_2O: doppelt destilliertes Wasser.

cDNA (µl)	ddH_2O (µl)	Konzentration (ng/µl)	Verdünnungsstufe
11.5	0	150	1
10	90	15	1:10
10	90	1,5	1:100
10	90	0,15	1:1.000
10	90	0,015	1:10.000
10	90	0,0015	1:100.000

Durchführung der qRT-PCR

Für die qRT-PCR wurden pro Vertiefung einer 96-well-Platte 12,5 µl SYBR Green und 1 µl des entsprechenden Primerpaares (10 µM je Primer) vorgelegt und anschließend 11,5 µl der cDNA-Verdünnungen hinzugefügt. Die unverdünnte cDNA konnte nicht verwendet werden, da die Reagenzien, die für die reverse Transkription verwendet wurden, die qRT-PCR-Reaktion störten. Für jede Verdünnungsstufe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Es wurde das PCR-Programm für eine Standard qRT-PCR verwendet (Tabelle 2.8).

Bestimmung der PCR-Effizienz

Zur Bestimmung der PCR-Effizienz wurden die ermittelten *cycle threshold* (Ct)-Werte der einzelnen Verdünnungsstufen gegen den dekadischen Logarithmus der eingesetzten cDNA-Mengen aufgetragen und eine Gerade erstellt. Mit Hilfe der Steigung dieser Geraden konnte die Effizienz der PCR berechnet werden.

$$PCR\text{-}Effizienz = 10^{(-1/Steigung)}$$

Bei einer optimalen PCR-Reaktion beträgt der Wert der Effizienz 2, was bedeutet, dass sich bei jedem Zyklus die Menge des PCR-Produkts verdoppelt.

2.2.24.7 Analyse der qRT-PCR-Daten

Ermittlung der Ct-Werte

Zur Auswertung der Fluoreszenzsignale, die während der qRT-PCR ermittelt wurden, wurde für jedes Gen in der exponentiellen Phase der PCR-Kurve ein individueller Schwellenwert (*threshold*) gesetzt. Die Stelle der Abszissenachse, an der die Kurve den Schwellenwert kreuzte, entspricht dem *cycle threshold* (Ct)-Wert. Je mehr cDNA in der Ausgangsprobe vorhanden war, desto mehr doppelsträngige DNA lag im Ansatz vor und umso mehr SYBR Green konnte pro Zyklus in die neu synthetisierte DNA interkalieren. Der Schwellenwert wurde daher umso schneller überschritten, d.h. der Ct-Wert war umso kleiner, je mehr cDNA in der Ausgangsprobe vorhanden war. Die Ct-Werte wurden in das Programm Microsoft Excel exportiert und damit ausgewertet.

Normalisierung der Ct-Werte, Bildung der ΔCt-Werte und Ermittlung der relativen Expression in Relation zu einer endogenen Kontrolle

Die reinen Ct-Werte sagen zunächst nur etwas über die vorhandene Menge an cDNA in der Ausgangsprobe aus, jedoch nicht über die relative Expression spezifischer Gene. Unterschiedliche Ct-Werte können auch bei Proben mit gleich starker Genexpression gemessen werden. Die Ursache hierfür kann beispielsweise an unterschiedlichen RNA-Mengen zur reversen Transkription liegen oder an Faktoren im Reaktionsansatz, welche die reverse Transkription unterschiedlich stark hemmen. Um diese Ungenauigkeiten auszugleichen, wurden die Ct-Werte zunächst normalisiert. Als endogene Kontrolle wurde hierfür ein sogenanntes Haushaltsgen verwendet. Hierbei handelt es sich um ein konstitutiv exprimiertes Gen, das unabhängig von äußeren Einflüssen in Zellen annähernd gleich stark exprimiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde das Haushaltsgen *60S ribosomal protein L13a* (*RPL13A*), das für ein ribosomales Protein kodiert, als endogene Kontrolle verwendet. Für die Normalisierung wurde der Ct-Wert von *RPL13A* von dem Ct-Wert des Zielgens subtrahiert:

$$Ct_{Zielgen} - Ct_{RPL13A} = \Delta Ct$$

Zur Ermittlung der relativen Expression der untersuchten Gene in Relation zur Expression von *RPL13A* wurden die ΔCt-Werte in folgende Formel eingesetzt:

$$2^{-(\Delta Ct)}$$

Bildung der ΔΔCt-Werte und Ermittlung der relativen Expression in Relation zu einer Referenzprobe

Möchte man verschiedene Proben in Relation zu einer Referenzprobe setzen, wird zunächst der ΔΔCt-Wert ermittelt. Dafür wurde der ΔCt-Wert der Referenzprobe von dem ΔCt-Wert der Probe subtrahiert:

$$\Delta Ct_{Probe} - \Delta Ct_{Referenzprobe} = \Delta\Delta Ct$$

Anschließend wurden die ΔΔCt-Werte in die folgende Formel eingesetzt:

$$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

2.2.25 Expressionsanalyse von miRNA

Die Expression vieler proteinkodierender Gene wird von miRNAs kontrolliert. Eine Beteiligung dieser miRNAs an der differentiellen Expression verschiedener HLA-Gene gilt daher als möglich. Um solche miRNAs zu identifizieren, wurden mit Hilfe des *Agilent Human Microarray Systems (one color)* (Agilent Technologies) die miRNA-Expressionsprofile von Probanden analysiert, die verschiedene mit T1D assoziierte HLA-Konstellationen besitzen.

Probenvorbereitung

Zunächst wurden aus mit PMA- oder IFN-γ-stimulierten und unstimulierten B-LCLs (5×10^6) von Probanden mit unterschiedlichen mit T1D assoziierten HLA-Konstellationen mit Hilfe des *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen) die Gesamt-RNA inklusive miRNA isoliert. Für jede Probe wurde RNA auf Trockeneis zur Analyse an die Firma Miltenyi gesendet (Miltenyi Biotec GmbH, Friedrich-Ebert-Straße 68, 51429 Bergisch Gladbach).

Herstellung von Probenpools

Es wurden 16 verschiedene Probenpools hergestellt. Dafür wurden die B-LCLs entweder nicht stimuliert, für 6 h mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) stimuliert oder für 24 h mit IFN-γ (Endkonzentration: 20 ng/ml) stimuliert. Die Durchführung der B-LCL-Stimulation ist in Abschnitt 2.2.6 detailliert beschrieben. Es wurde die RNA von drei verschiedenen Probanden mit identischen HLA-Konstellationen und Stimulationen gepoolt (Abbildung 2.7). Bei Verwendung der sechs in dieser Arbeit verwendeten HLA-Konstellation (Tabelle 2.1) entspricht dies 18 verschiedenen Pools. Da sich auf einem Objektträger acht Kammern für jeweils einen Microarray befinden, wurde aus Platzgründen die Microarray-Analyse stimulierter Proben der HLA-Konstellation für ein mittleres Risiko nicht durchgeführt. Die RNA-Konzentration pro Pool betrug 100 ng/µl.

Markierung und Hybridisierung der miRNA

Die Markierung und Hybridisierung der miRNA wurde mit dem *Complete Labeling and Hyb Kit* (Agilent Technologies) durchgeführt. Dabei wird ein mit Cyanin 3

marktiertes Cytosin (Cyanin 3pCp) an das 3´-Ende der miRNA ligiert. Die markierten miRNAs wurden anschließend auf *Agilent Human microRNA Microarrays* 8x60K v16 Kammern hybridisiert.

Datenanalyse

Die Emissionssignale der Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit dem *Microarray Scanner System* (Agilent Technologies) detektiert. Dabei korreliert die Stärke der Emissionssignale mit der miRNA-Expression. Die Datenbearbeitung erfolgte mit der Agilent *Feature Extraction Software* (FES), mit Hilfe derer Hintergrundrauschen von tatsächlichen Signalen subtrahiert, sowie Ausreißer von der Analyse ausgeschlossen wurden. Die prozessierten Daten wurden daraufhin mit Hilfe der *GeneSpringGX Software* (Agilent Technologies) weiter analysiert. Im Zuge dieser Analyse wurde das Verhältnis der Fluoreszenzsignale zweier Probenpools zueinander gebildet, um unterschiedliche Expressionsstärken zwischen den einzelnen Probenpools zu identifizieren.

Validierung der Microarray-Daten mittels qRT-PCR

Wurden anhand der Microarray-Daten Unterschiede in den Expressionsprofilen zwischen den untersuchten HLA-Konstellationen bzw. zwischen den Proben vor und nach PMA- oder IFN-γ-Stimulation gefunden, wurden die entsprechenden Ergebnisse anschließend mit Hilfe der qRT-PCR validiert (Abschnitt 2.2.24.5). Die Auswahl der miRNAs erfolgte danach, ob eine signifikant unterschiedliche Expression zwischen der HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko (Referenzpool) und den anderen HLA-Konstellationen (Probenpools) oder signifikante Expressionsunterschiede zwischen unstimulierten Proben (Referenzpools) und mit PMA- oder IFN-γ-stimulierten Proben (Probenpools) vorhanden waren. Dabei wurde als signifikant gewertet, wenn die miRNA-Expression zwischen Referenzpool und dem Probenpool entweder um Faktor ≥ 2 oder ≤ 0,5 verändert war. Die Analyse der qRT-PCR-Daten zur Untersuchung der relativen Expression von miRNAs erfolgte analog zur Analyse der relativen Expression von mRNAs (Abschnitt 2.2.24.7). Als endogene Kontrolle wurde für die miRNA-Analysen *small nucleolar RNA, C/D box 72* (*SNORD72*), eine kleine nukleoläre Ribonukleinsäure, verwendet.

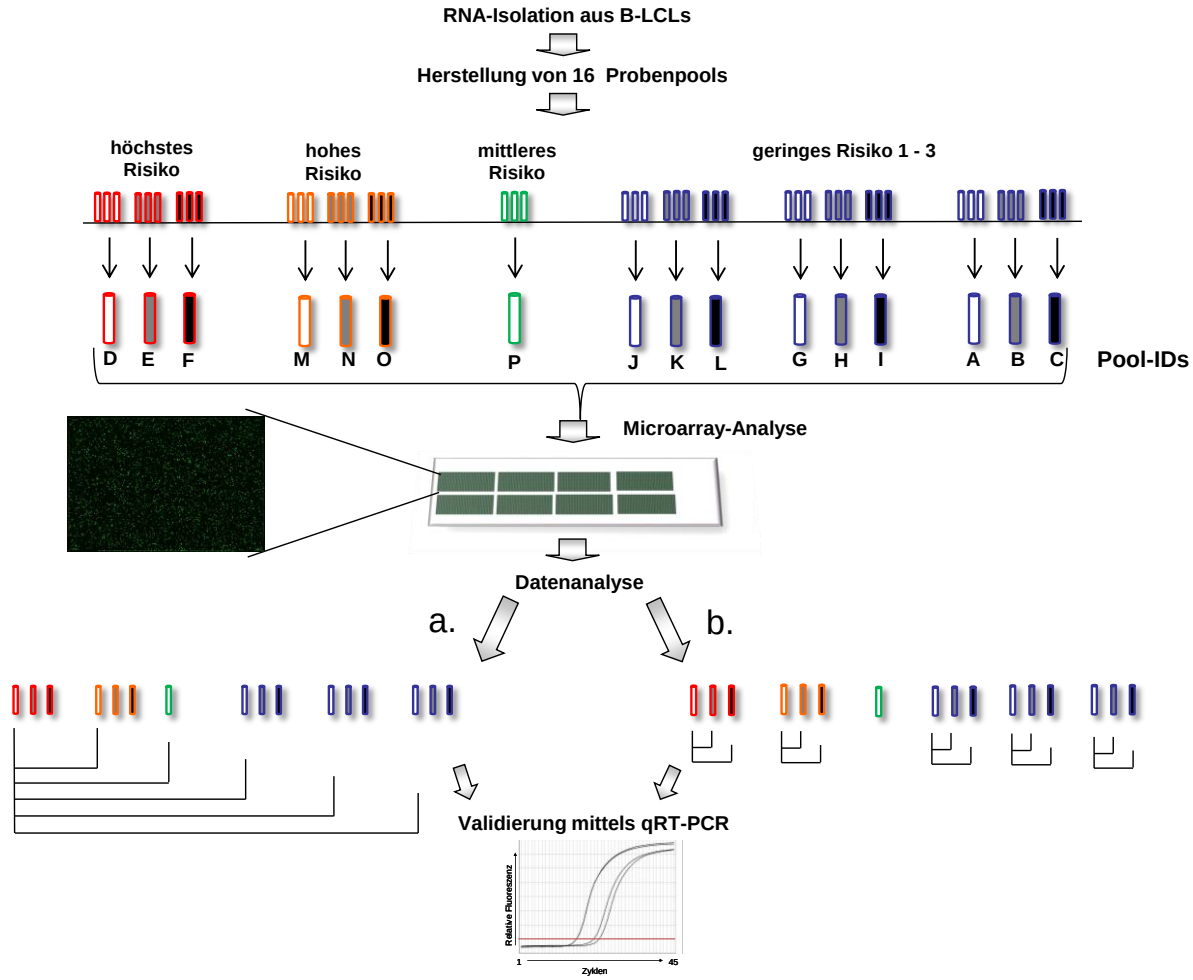


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Microarray-Analyse. Nach der RNA-Isolation aus B-LCLs wurden 16 Probenpools hergestellt. Die B-LCLs der einzelnen Proben wurden dafür zum einen nicht stimuliert (weiße Füllung), für 6 h mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) stimuliert (graue Füllung) oder für 24 h mit IFN-γ (Endkonzentration: 20 ng/ml) stimuliert (schwarze Füllung). Pro HLA-Konstellation wurde die RNA von drei verschiedenen Probanden mit identischen HLA-Konstellationen und Stimulationen gepoolt: höchstes Risiko (rot), hohes Risiko (orange), mittleres Risiko (grün) und drei HLA-Konstellationen mit geringem Risiko (1 – 3) (blau). Anschließend folgte die Microarray-Analyse, der sich die Datenanalyse anschloss. Dabei wurden zum einen differentielle Expressionsprofile zwischen dem unstimulierten Referenzpool mit dem höchsten Risiko (rot, weiße Füllung) und den übrigen unstimulierten Pools mit geringerem Erkrankungsrisiko (orange, grün, blau, weiße Füllungen) analysiert (a). Zum anderen wurden Expressionsunterschiede zwischen unstimulierten Proben (weiße Füllung) und mit PMA bzw. IFN-γ stimulierten Proben (graue bzw. schwarze Füllung) innerhalb der verschiedenen HLA-Konstellationen ermittelt (b). Wurden Expressionsunterschiede gefunden, wurden diese anschließend mittels qRT-PCR validiert. Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; HLA: humanes Leukozytenantigen; IFN-γ: Interferon-gamma; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; qRT-PCR: *real-time*-quantitative-PCR; RNA: Ribonukleinsäure.

2.2.26 Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung

Die Technologie der Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung (RNA-Seq) basiert auf Hochdurchsatzmethoden (*Next Generation Sequencing*) und bietet eine hochauflösende Erfassung von Genexpressionsprodukten. Im vorliegenden Fall diente diese Technologie zur Bestimmung unterschiedlicher Expressionen bestimmter Allele von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* bei heterozygoten Individuen.
Es ist bekannt, dass der HLA-Haplotyp *HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602* einen dominant protektiven Effekt bei der Manifestation des T1D hat (Noble und Erlich, 2012). Heterozygote Individuen mit einem Risikohaplotypen und diesem protektiven Haplotypen sind in der Regel vor der Erkrankung geschützt. Eine mögliche Ursache dafür könnten, neben Unterschieden in der molekularen Struktur, auch quantitative Unterschiede in der Expression protektiver und prädisponierender Allele sein. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde eine RNA-Seq von RNA aus B-LCLs von der Firma Otogenetics (Otogenetics corporation, 400 Pinnacle Way, Ste 435, Norcross, GA 30071, USA) mit Hilfe des *HiSeq™2000 Sequencing Systems* von Illumina durchgeführt.

Durchführung der RNA-Seq

Zunächst wurde aus unstimulierten B-LCLs (8×10^6) von 18 heterozygoten Probanden mit unterschiedlichen mit T1D assoziierten HLA-Konstellationen Gesamt-RNA mit Hilfe des *RNeasy® Mini Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert und diese auf Trockeneis zu der Firma Otogenetics geschickt (10 µg pro Probe). Die Durchführung der RNASeq wurde dort durchgeführt und ist in Abbildung 2.8 schematisch dargestellt. Mittels „*paired-end*“-Sequenzierung, bei der die Fragmente der cDNA-*library* von beiden Enden sequenziert werden, wurden 100 Nukleotide umfassende Fragmente (*reads*) generiert. Die „*coverage*“ (Anzahl an *reads*) für jede Probe lag bei mindestens 20 Millionen *reads*.

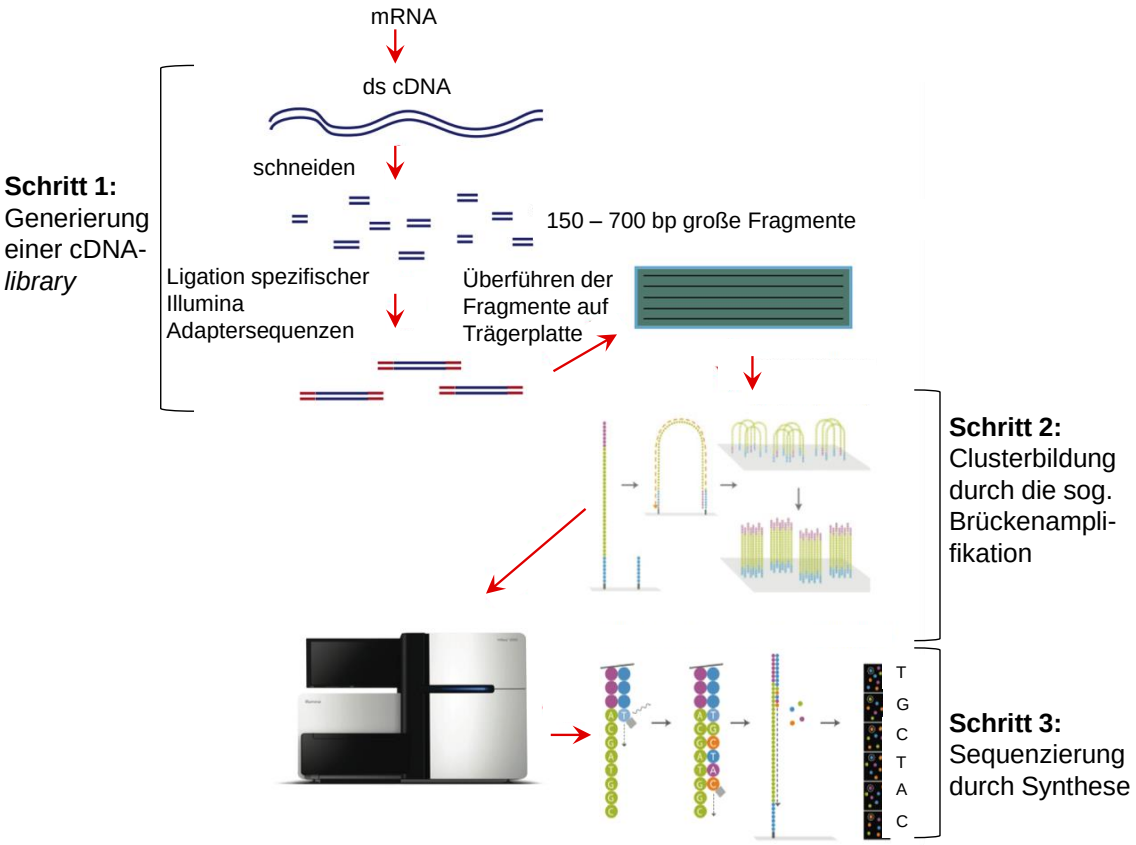


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der RNA-Seq-Durchführung. Im **ersten Schritt** wurde mit Hilfe des *SMART™ cDNA Library Construction Kits* (Clontech) eine cDNA-*library* mit spezifischen Adaptern für Illumina generiert. Die RNA-Seq erfolgte mit Hilfe des *HiSeq™2000 Sequencing Systems* von Illumina. Hierfür wurden im **zweiten Schritt** die Einzelmoleküle über ihre Adaptersequenzen an die feste Oberfläche einer Trägerplatte gebunden und über die sogenannte Brückenamplifikation, bei der die DNA brückenartige Strukturen bildet, vervielfältigt. Es entstanden ca. eine Million Kopien von jedem *template*, welche sich in engen Clustern befanden. Im **dritten Schritt** erfolgte die Sequenzierung durch Synthese. Hierbei wurden fluoreszenzmarkierte Nukleotide eingesetzt, welche nach Einbau von einem Laser angeregt wurden. Da jedes Nukleotid einen spezifischen Farbstoff trug, konnte über die Detektion der Farbstoffe die Sequenz des synthetisierten Stranges erhalten werden. Verwendete Abkürzungen: A: Adenin; C: Cytosin; ds cDNA: doppelsträngige komplementäre DNA; DNA: Desoxyribonukleinsäure; G: Guanin; RNA-Seq: Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung; T: Thymin. Abbildung modifiziert nach Brown (Brown, 2012).

Auswertung der RNA-Seq-Daten

Je mehr cDNA eines HLA-Allels in einer Ausgangsprobe vorhanden war, umso mehr RNA-Seq-*reads*, welche Sequenzabschnitte dieses Allels enthielten, lagen nach Durchführung der PCR vor. Die erhaltenen *reads* der RNA-Seq wurden mit jeweils zwei kurzen Sequenzabschnitten der Gene *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* abgeglichen und die übereinstimmenden *reads* (= *counts*) gezählt. Diese 22 – 25 Nukleotide langen Sequenzabschnitte wurden mit Hilfe der Datenbanken von NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

und UCSC (*University of California, Santa Cruz*; http://genome.ucsc.edu/) aus dem Referenzgenom GRC37/hg19 (Version 19 des Referenzgenoms, seit Februar 2009) des *Genome Reference Consortiums* sowie aus den Referenzsequenzen der sieben alternativen Haplotypen des *MHC Haplotype Projects*, welche in die Datenbanken von NCBI und UCSC integriert sind (Horton *et al.*, 2008), ausgewählt. Dabei wurden zum einen jeweils Sequenzen aus der konstanten Region ausgewählt, die für alle untersuchten Allele von *HLA-DQA1* bzw. *HLA-DQB1* identisch waren, sowie Sequenzen aus der variablen Region, die für die betreffenden Allele spezifisch waren. Da die Unterschiede der spezifischen Sequenzen zwischen den einzelnen Allelen von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* oft nur durch ein paar wenige Basenaustausche charakterisiert sind, wurden die Sequenzen so ausgewählt, dass ausschließlich das gewünschte Allel detektiert wurde. Mit Hilfe der UCSC Blat-Funktion wurde verifiziert, dass die Sequenzen einmalig im Referenzgenom GRCh37/hg19 bzw. in den Referenzsequenzen der sieben alternativen Haplotypen des *MHC Haplotype Projects*, welche in die Datenbanken von NCBI und UCSC integriert sind, vorlagen (Horton *et al.*, 2008). Die Positionen der verwendeten konstanten und allelspezifischen DNA-Sequenzen sind in Abbildung 2.9 dargestellt. Die dazugehörenden Sequenzinformationen sind in Tabelle 2.11 aufgeführt.

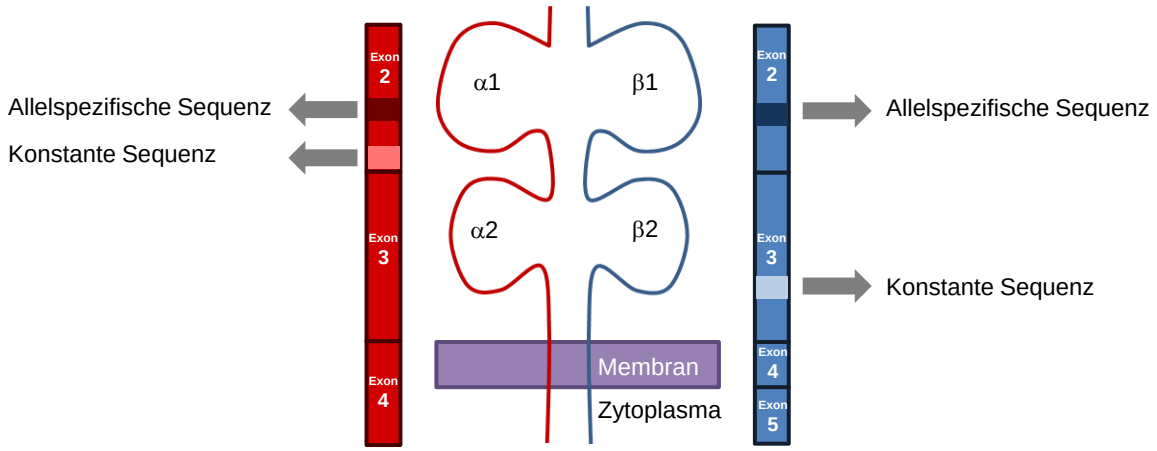


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der Lage der allelspezifischen und konstanten Sequenzen in den Genen *HLA-DQA1* (rot) und *HLA-DQB1* (blau), die für die RNA-Seq-Analyse verwendet wurden. Dargestellt ist ein HLA-DQ-Heterodimer bestehend aus α-Kette (rot) und β-Kette (blau). Exon 1 kodiert für die 5´UTR und das Signalpeptid (nicht dargestellt). Exon 2 kodiert für die α1 bzw. β1 Domäne und Exon 3 für die α2 bzw. β2 Domäne. Exon 4 kodiert bei *HLA-DQA1* für die transmembrane und die zytoplasmatische Domäne. Bei *HLA-DQB1* kodiert Exon 4 für die transmembrane und Exon 5 für die zytoplasmatische Domäne. Der allelspezifische Sequenzabschnitt befindet sich für *HLA-DQA1* (dunkelrote Bande) und *HLA-DQB1* (dunkelblaue Bande) in Exon 2. Der konstante Sequenzabschnitt befindet sich für *HLA-DQA1* (hellrote Bande) in

Exon 2 und für *HLA-DQB1* (hellblaue Bande) in Exon 3. Die für die Erstellung dieser Abbildung verwendeten Informationen stammten von Noble und Erlich (Noble und Erlich, 2012) und aus der Datenbank von NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3119; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3117; Stand: 31. Januar 2014; Maglott *et al.,* 2011). Verwendete Abkürzungen: HLA: humanes Leukozytenantigen.

Tabelle 2.11: Darstellung allelspezifischer und konstanter Sequenzabschnitte von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* zur RNA-Seq-Analyse, die mit Hilfe der Datenbanken von NCBI und UCSC ausgewählt wurden. Um allelspezifische Sequenzunterschiede hervorzuheben, wurden unterschiedliche Basen im Vergleich zu den Allelen *DQA1*0102* bzw. *DQB1*0602* rot gekennzeichnet. Verwendete Abkürzungen: A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; HLA: humanes Leukozytenantigen; RefSeq: Referenzsequenz aus NCBI; RNA: Ribonukleinsäure; RNA-Seq: Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung; T: Thymin; XX: Bei einigen Probanden lagen keine weiteren Informationen über die spezifischen Allele vor. Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 (Vandiedonck und Knight, 2009) und der Tatsache, dass das verwendete Probandenkollektiv ausschließlich kaukasischen Ursprungs ist, konnte davon ausgegangen werden, dass sich spezifische Allele und Suballele innerhalb einer Risikogruppe mit gleichem HLA-Haplotyp nicht unterscheiden (*HLA-DQA1*03XX* entspricht *HLA-DQA1*0301*; *HLA-DQA1*05XX* entspricht *HLA-DQA1*0501*; *HLA-DQB1*02XX* entspricht *HLA-DQB1*0201*).

Gen	Allel	allelspezifische Sequenzen (5´ – 3´)	konstante Sequenzen (5´ – 3´)	Exon	Gen RefSeq Position	Gen Ref Seq Accession #
HLA-DQA1	*0102 05XX 03XX*		CAACTCTACCGCTGCTACCAAT	2	362 – 383	NM_002122
	0102	TGCCTGGCGGTGGCCTGAGTTCAGC		2	254 – 278	
	05XX	TGTCTGGTGTTTGCCTGTTCTCAGA				
	03XX	TGTCTGGCAGTTGCCTCTGTTCCGC				
HLA-DQB1	*0602 02XX 0301 0302*		TCCTGGTGATGCTGGAAATGACTCC	3	648 – 672	NM_002123
	0602	GGGTGTACCGCGCGGTGACGCCGCA		2	312 – 336	
	02XX	GGGAGTTCCGGGCGGTGACGCTGCT				
	0301	AGGTGTACCGGGCGGTGACGCCGCT				
	0302	GGGTGTATCGGGCGGTGACGCCGCT				

Die Datenanalyse wurde am Institut für Neuroinformatik der Universität Ulm durchgeführt. Da der HLA-Bereich hoch-polymorph ist, können sich das Referenzgenom GRCh37/hg19 sowie die sieben alternativen Haplotypen des *MHC Haplotype Projects* an dieser Stelle wesentlich von dem Genom der hier verwendeten Individuen unterscheiden. Daher wurde keine Zuordnung der *reads* zu den Referenzen (*read-mapping*) vorgenommen. Zudem wären beim *read-mapping* gegen diese Referenzen Fehlpaarungen (*mismatches*) erlaubt, was im vorliegenden Fall ausgeschlossen werden musste, da die allelspezifischen Sequenzen teilweise nur durch wenige Basenaustausche charakterisiert sind. Eine Unterscheidung spezifischer Allele bei heterozygoten Individuen wäre dadurch

nicht möglich. Daher wurde für die Datenauswertung ein „*perfect match*"-Alignment der ausgewählten allelspezifischen und konstanten Sequenzen aus den Datenbanken von NCBI und UCSC mit den RNA-Seq-*reads* durchgeführt (*exact string matching*) und die Anzahl an *counts* bestimmt. Dabei wurden nur 100%ige Übereinstimmungen gewertet und keine *mismatches* zugelassen. Dadurch wurden jedoch RNA-Seq-*reads*, welche an dieser Stelle mögliche Mutationen enthielten nicht erfasst. Ebenso wurden unvollständige Alignments zwischen den ausgewählten Sequenzen und den RNA-Seq-*reads* nicht gezählt. Diese potentiellen Einschränkungen waren jedoch für alle Proben identisch. Es wurde das Verhältnis der erhaltenen *counts* aus der konstanten Region zu den erhaltenen *counts* aus der allelspezifischen Region ermittelt (*counts* der allelspezifischen Region dividiert durch die *counts* der konstanten Region). Für die beiden HLA-Klasse-II-Gene *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* wurde die Expression der allelspezifischen Sequenzen somit ins Verhältnis zur Expression der konstanten Region gesetzt, wobei diese den Wert „1" erhielt.

2.2.27 Statistische Auswertung

In der vorliegenden Arbeit wurde die statistische Auswertung mit dem Programm GraphPad Prism Version 5.04 durchgeführt. Angegeben wurden die Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). Für den Vergleich gepaarter Stichproben wurde der nicht-parametische Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Für die Analyse ungepaarter Stichproben wurde der nicht-parametrische Kruskall-Wallis Test und als Nachfolgetest der Dunn´s Test verwendet. War die Anzahl an Stichproben zu gering, um mit nicht-parametrischen Tests auf signifikante Unterschiede zu testen, wurden die Ergebnisse deskriptiv ausgewertet. Als Signifikanzgrenze wurde eine Fehlerwahrscheinlichkeit (p) unter 5% ($p \leq 0{,}05$) verwendet. Korrelationsanalysen wurden mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Analysen zur Generierung vergleichbarer Kulturbedingungen für B-LCLs

Für *in vitro* Stimulationsversuche sowie für Genexpressionsanalysen, für die B-LCLs verschiedener Probanden eingesetzt werden, sind vergleichbare Ausgangs- und Kulturbedingungen für jede Zelllinie von entscheidender Bedeutung um valide Ergebnisse zu erzielen. Bisher nicht ausreichend berücksichtigte Fehlerquellen können unterschiedliche Zelldichten und Änderungen im Zellmetabolismus während unterschiedlicher Zellzyklusphasen sein. Um diese möglichen Fehlerquellen zu minimieren, wurden in der vorliegenden Arbeit homogene Kulturbedingungen für B-LCLs etabliert.

Um für alle Versuche konstante Zellzahlen einzusetzen, sollte eine zuverlässige Zellzählmethode gefunden werden. Dazu wurden zunächst zwei unterschiedliche Zählverfahren auf ihre Reproduzierbarkeit getestet. Zur Bestimmung der Zellzahl wird vorwiegend die Färbung von Zellen mit Trypanblau und der anschließenden manuellen Zellzählung mit einem Hämozytometer angewendet. Da das optische Erscheinungsbild von B-LCLs im Hämozytometer nicht einheitlich ist und die Zellen sich trotz Trypanblaufärbung nicht eindeutig als lebend oder tot identifizieren lassen, wurde für die Bestimmung der Zellzahl zusätzlich eine automatisierte Methode getestet. Bei dieser Methode wurden die Zellzahlen von einem Zellzähler (CASY® 1TT, Schärfe-System) mittels Impedanzmessung automatisch erfasst.

Außerdem wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt. Diese dienten dazu, mögliche Unterschiede in den Zellzyklusphasen von B-LCLs verschiedener Probanden zu identifizieren, um gegebenenfalls eine Synchronisation der Zellzyklusphasen durchzuführen.

3.1.1 Vergleich der ermittelten Zellzahlen mittels Hämozytometer und Zellzähler

Bei der Zellzählung mittels Hämozytometer und Trypanblaufärbung wurde zunächst die Zellzahl aller ungefärbten Zellen jeglicher Form und Größe ermittelt. Anschließend wurden nur ungefärbte, runde Zellen gezählt. Bei der Zählung mit dem Zellzähler wurden alle Zellen und Zellbruchstücke durch Impedanzmessung detektiert. Da vitale Zellen durch ihre intakte Membran einen anderen Impuls auslösen als tote Zellen bzw. Zellbruchstücke, konnten diese voneinander unterschieden werden.

In Abbildung 3.1 sind die Zellzahlen aller ungefärbten Zellen (Hämozytometer) bzw. aller Zellen (Zellzähler) dargestellt. Die ermittelten Zellzahlen variierten nach Zählung mit dem Hämozytometer deutlich (Minimum (Min): 20,75 Mio.; Maximum (Max): 31,5 Mio.; CV: 13,4). Im Vergleich dazu waren die mit Hilfe des Zellzählers erhaltenen Zellzahlen viel konstanter (Min: 27,96 Mio.; Max: 29,26 Mio.; CV: 1,4). Die Reproduzierbarkeit der Zellzahlen war daher bei Verwendung des Zellzählers deutlich besser als bei Verwendung des Hämozytometers.

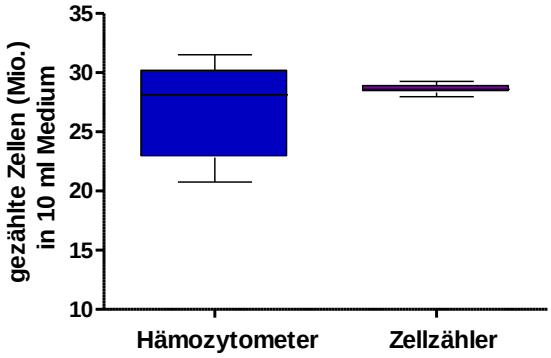


Abbildung 3.1: Erhaltene Zellzahlen nach Zählung aller ungefärbten Zellen mit dem Hämozytometer bzw. aller Zellen mit dem Zellzähler. Beide Zählmethoden wurden unter identischen Bedingungen in Sechsfach-Bestimmung durchgeführt. Dafür wurden jeweils 300 µl Zellsuspension auf sechs Reaktionsgefäße verteilt. Für die eigentliche Zählung wurden die Zellen für beide Zählmethoden stets aus dem gleichen Reaktionsgefäß entnommen. Dargestellt sind Box-Whisker-Plots (Whisker: Min/Max) der erfassten Zellzahlen in 10 ml Medium. Die Zellzahlen ließen sich mit Hilfe des Zellzählers besser reproduzieren.

Auch nach Zählung der runden, ungefärbten Zellen mit dem Hämozytometer waren deutliche Unterschiede in den erhaltenen Zellzahlen vorhanden (Min: 12,25 Mio.; Max: 16,5 Mio.; CV: 11,1). Dagegen waren die erhaltenen Zellzahlen vitaler Zellen mit Hilfe des Zellzählers konstanter (Min: 13,83 Mio.; Max: 15,52 Mio.; CV:

4,2). Eine bessere Reproduzierbarkeit der Zellzahlen wurde demnach ebenfalls mit dem Zellzähler erreicht (Abbildung 3.2).

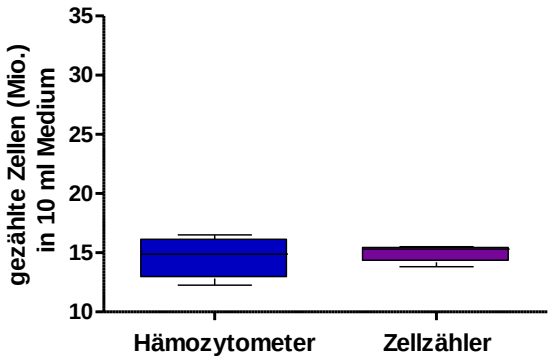


Abbildung 3.2: Erhaltene Zellzahlen nach Zählung nur runder, ungefärbter Zellen mit dem Hämozytometer bzw. nur vitaler Zellen mit dem Zellzähler. Die Ermittlung der Zellzahlen wurde wie in Abbildung 3.1 beschrieben durchgeführt. Dargestellt sind Box-Whisker-Plots (Whisker: Min/Max) der erfassten Zellzahlen in 10 ml Medium nach Zählung nur runder, ungefärbter Zellen mittels Hämozytometer bzw. vitaler Zellen mittels Zellzähler. Die Zellzahlen ließen sich mit Hilfe des Zellzählers besser reproduzieren.

3.1.2 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse wurde mit Hilfe von PI im Durchflusszytometer LSRII (Becton Dickinson) durchgeführt. Alle für die Versuche verwendeten B-LCLs (n = 8) wurden unter identischen Bedingungen kultiviert.

Bei allen Versuchen wurde stets der prozentuale Anteil an Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen (G0/G1-, S- und G2/M-Phase) bestimmt. Es wurden drei verschiedene Untersuchungen durchgeführt:

- Vergleich des durchschnittlichen prozentualen Anteils an Zellen in den Zellzyklusphasen bei verschiedenen Probanden.
- Vergleich des prozentualen Anteils an Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen innerhalb einer einzelnen B-Zelllinie über einen Zeitraum von mehreren Tagen (im Folgenden als „Untersuchungszeitpunkte“ bezeichnet).
- Vergleich des prozentualen Anteils an Zellen in den Zellzyklusphasen ohne Mediumwechsel (Wachstumsbedingung 1) und mit Mediumwechsel am Vortag (Wachstumsbedingung 2).

3.1.2.1 Zellzyklusphasen verschiedener B-LCLs

Der durchschnittliche Anteil an Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen war zwischen den B-LCLs verschiedener Probanden vergleichbar (Abbildung 3.3). Es wurden bei allen drei Zellzyklusphasen (G0/G1-, S- und G2M-Phase) keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten B-LCLs gefunden (Kruskall-Wallis Test, Nachfolgetest: Dunn´s Test: n.s.: nicht signifikant).

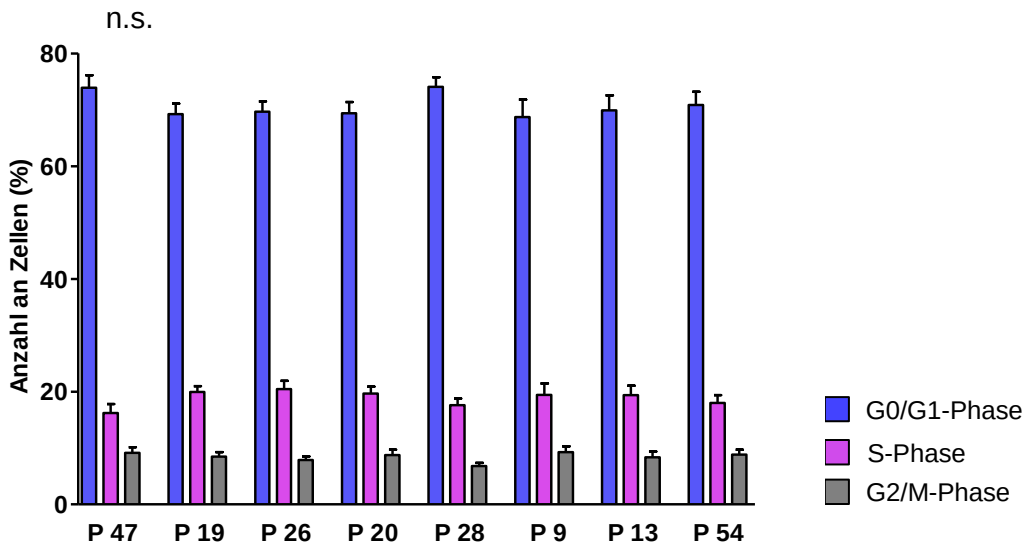


Abbildung 3.3: Zellzyklusphasen verschiedener B-LCLs. Es wurden acht verschiedene B-LCLs untersucht. Für die Analyse mittels PI im Durchflusszytometer LSRII wurden stets 1 x 10^6 Zellen eingesetzt. Es wurde für jede B-Zelllinie der Mittelwert des prozentualen Anteils an Zellen in den jeweiligen Phasen der verschiedenen Untersuchungszeitpunkte bestimmt. Für alle drei Zellzyklusphasen waren die prozentualen Anteile an Zellen zwischen den verschiedenen Probanden nicht signifikant verschieden. (Kruskall-Wallis Test, Nachfolgetest: Dunn´s Test: n.s.: nicht signifikant). Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; G0/G1: Ruhephase/Gap1-Phase; S: Synthesephase; G2/M: Gap2-Phase/Mitosephase; P: Probanden-ID; PI: Propidiumiodid.

3.1.2.2 Änderungen der Zellzyklusphasen innerhalb einer B-Zelllinie zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Die prozentuale Verteilung der Zellen auf die drei Zellzyklusphasen war zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten unterschiedlich. Der prozentuale Anteil an Zellen, die sich in der G0/G1-Phase befanden, variierte zwischen den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten im Mittel um etwa 20%, der Anteil an Zellen in der S-Phase um etwa 13% und der Anteil in der G2/M-Phase um etwa 8%. Der sich über die sieben Untersuchungszeitpunkte ergebende Verlauf der

Zellzyklusphasen war für die untersuchten B-LCLs vergleichbar. Die rote Linie stellt den Verlauf der G0/G1-Phase dar (Abbildung 3.4).

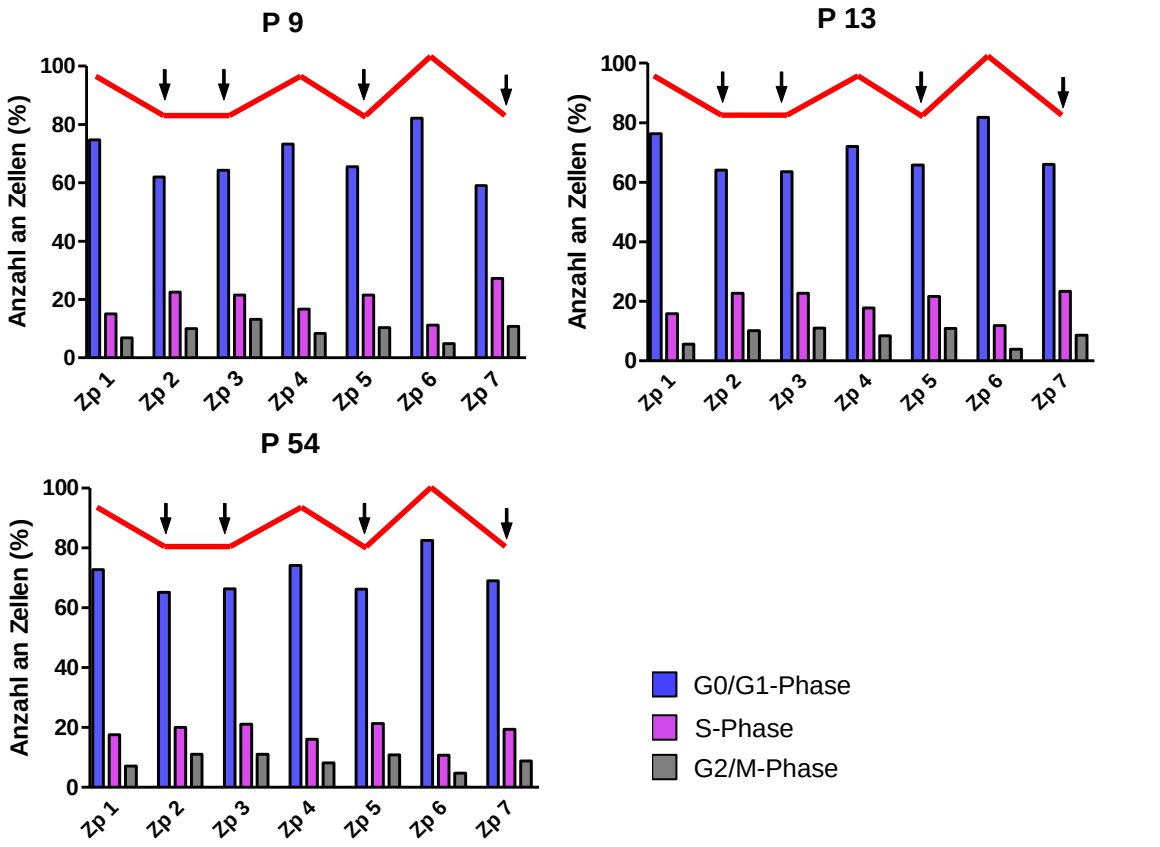


Abbildung 3.4: Prozentuale Verteilung der Zellen auf die drei Zellzyklusphasen an sieben verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. Exemplarisch wurde die prozentuale Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen von drei verschiedenen Probanden dargestellt. Für die Analyse mittels PI im Durchflusszytometer LSRII wurden stets 1 x 10^6 Zellen eingesetzt. Die rote Linie zeigt, dass der Verlauf der Verteilung der Zellen in der G0/G1-Phase an den sieben Untersuchungszeitpunkten für die drei Probanden vergleichbar war. Die schwarzen Pfeile weisen auf die Verteilung der Zellen, wenn das Medium vor weniger als 24 h gewechselt wurde, hin. Verwendete Abkürzungen: G0/G1: Ruhephase/Gap1-Phase; S: Synthesephase; G2/M: Gap2-Phase/Mitosephase; P: Probanden-ID; Zp: Untersuchungszeitpunkt.

3.1.2.3 Untersuchung der Zellzyklusphasen in Abhängigkeit vom Mediumwechsel

Der prozentuale Anteil an Zellen in den drei Zellzyklusphasen, bei denen mindestens 48 h lang kein Mediumwechsel stattgefunden hat (Wachstumsbedingung 1), wurde mit dem prozentualen Anteil an Zellen, bei denen maximal 24 h zuvor ein Mediumwechsel vorgenommen wurde (Wachstumsbedingung 2), verglichen. Für die G0/G1-Phase und S-Phase wurden signifikante Unterschiede zwischen den beiden Wachstumsbedingungen gefunden, wohingegen für die

G2/M-Phase keine signifikanten Unterschiede beobachtet wurden (Abbildung 3.5) (Wilcoxon Test: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; n.s.: nicht signifikant). Demnach befanden sich nach Mediumwechsel signifikant weniger Zellen in der G0/G1-Phase und signifikant mehr Zellen in der S-Phase. Auch wenn das Ergebnis nicht signifikant war ($p = 0,07$), waren nach Mediumwechsel tendenziell mehr Zellen in der G2/M-Phase vorhanden (11% nach Mediumwechsel vs. 7% vor Mediumwechsel).

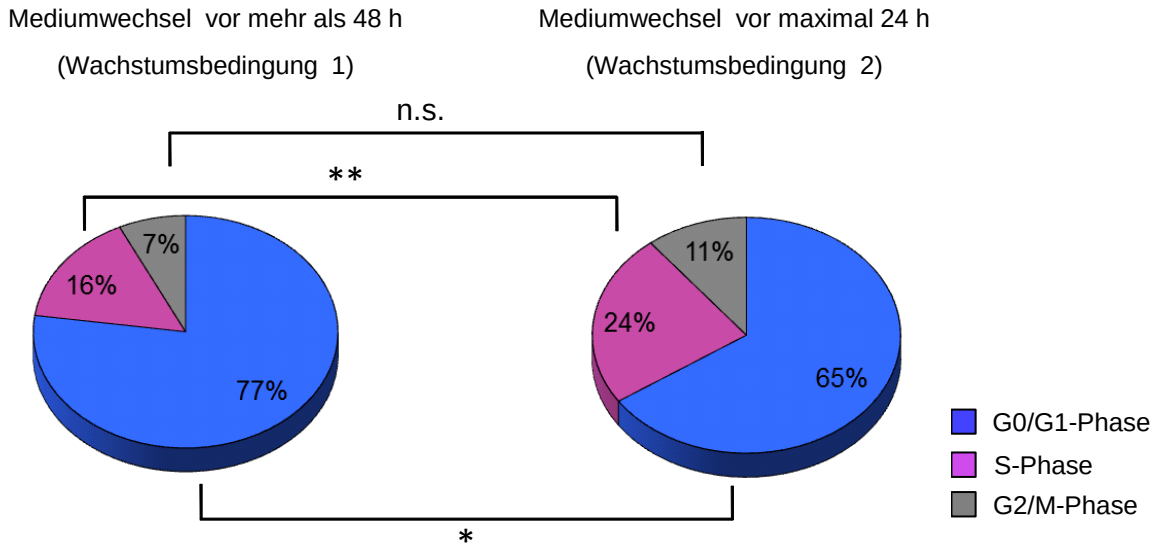


Abbildung 3.5: Prozentualer Anteil an Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen mit und ohne Mediumwechsel. Für die Analyse mittels PI im Durchflusszytometer LSRII wurden stets 1 x 10^6 Zellen eingesetzt. Für drei B-LCLs wurden die Mittelwerte für jede Phase jeweils für Wachstumsbedingung 1 und 2 gebildet und diese miteinander verglichen. Dabei wurden bei der G0/G1-Phase und S-Phase signifikante Unterschiede in den Zellzyklusphasen zwischen den beiden Wachstumsbedingungen gefunden (Wilcoxon Test: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; n.s.: nicht signifikant). Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; G0/G1: Ruhephase/Gap1-Phase; S: Synthesephase; G2/M: Gap2-Phase/Mitosephase.

Auf Grund der geringen Unterschiede in den Zellzyklusphasen zwischen den B-LCLs einzelner Probanden konnten die Versuche auch ohne vorheriges Synchronisieren der Zellzyklen durchgeführt werden. Da alle B-LCLs am Tag vor den Versuchen mit frischem Medium versehen und mit identischer Zellzahl in neue Zellkulturflaschen überführt wurden, konnte von identischen Ausgangsbedingungen für alle B-LCLs ausgegangen werden. Die Stimulation mit PMA bzw. IFN-γ fand stets am folgenden Tag nach Mediumwechsel statt. Die Voraussetzungen zu Beginn der Versuche waren demnach für alle B-LCLs identisch.

3.2 Untersuchung des Effekts von PMA auf B-LCLs

Die physiologischen Effekte des in dieser Arbeit als Stimulus verwendeten Mitogens PMA beruhen auf der Aktivierung der Proteinkinase C, die an der Aktivierung spezifischer Zellfunktionen und der Zellproliferation von Bedeutung ist (Castagna *et al.*, 1982). In diesem Teil der Arbeit sollte überprüft werden, ob PMA ein inflammatorisches Milieu bei B-LCLs generiert und demnach für *in vitro* Stimulationsversuche geeignet ist. Dafür wurde der Effekt von PMA zum einen durch die Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF-α bei B-LCLs bestimmt. Da bekannt ist, dass die mitogene Wirkung von PMA die Zell-proliferation bei Lymphozyten induziert (Touraine *et al.*, 1977), sollte zum anderen der Effekt von PMA auf die Proliferation von B-LCLs mit Hilfe eines BrdU-ELISAs untersucht werden.

3.2.1 Effekt von PMA auf die Sekretion von TNF-α

Für die Untersuchung des immunologischen Effekts von PMA auf die Sekretion von TNF-α wurden zehn verschiedene B-LCLs verwendet. Die TNF-α-Sekretion war nach 6-stündiger PMA-Stimulation im Vergleich zum nicht stimulierten Zustand signifikant erhöht (Abbildung 3.6) (Wilcoxon Test: ** p ≤ 0,01).

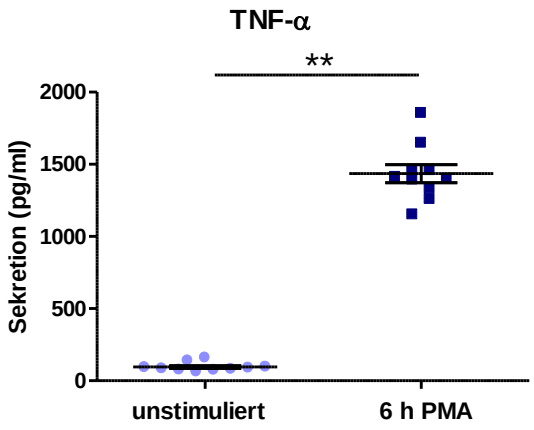


Abbildung 3.6: Effekt von PMA auf die TNF-α-Sekretion. Es wurden zehn verschiedene B-LCLs untersucht. Diese wurden zum einen unstimuliert belassen und zum anderen für 6 h mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) stimuliert. Nach Abnahme der Überstände wurde die ins Medium sekretierte Zytokinmenge (pg/ml) mittels ELISA bestimmt. Die TNF-α-Sekretion nahm nach Stimulation mit PMA signifikant zu (Wilcoxon Test: ** p ≤ 0,01). Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; TNF-α: Tumornekrosefaktor-alpha.

3.2.2 Effekt von PMA auf die Produktion von TNF-α

Neben der TNF-α-Sekretion wurde der Effekt von PMA auf die TNF-α-Produktion von B-LCLs mittels intrazellulärer FACS-Färbung analysiert. Dabei wurde der prozentuale Anteil an TNF-α-produzierenden B-LCLs bestimmt. Um die Sekretion von TNF-α ins Medium zu verhindern, wurde Brefeldin A (BFA) verwendet. Durch die Blockierung des anterograden Proteintransports über Vesikel vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat, akkumulieren die Zytokine in den Zellen und werden nicht sekretiert. BFA verhindert dabei die Aktivierung von Adenosyl-Ribosylierungsfaktor (ARF) GTPasen am Golgi-Apparat, die die Verpackung von Proteinen in Transportvesikel sowie deren Formation am trans-Golgi-Netzwerk regulieren. Auf diese Weise kann TNF-α direkt in der Zelle detektiert werden (Ivessa *et al.*, 1995; Sciaky *et al.*, 1997; Vigil *et al.*, 2010).

Es wurden sechs verschiedene B-LCLs untersucht. Der prozentuale Anteil an TNF-α-produzierenden Zellen war nach 6-stündiger PMA-Stimulation im Vergleich zum nicht stimulierten Zustand signifikant erhöht. (Wilcoxon Test: * $p \leq 0{,}05$) (Abbildung 3.7 und Abbildung 7.1; Anhang). Er lag im unstimulierten Zustand im Mittel bei 3,8% und nach 6-stündiger PMA-Stimulation bei 12,6%.

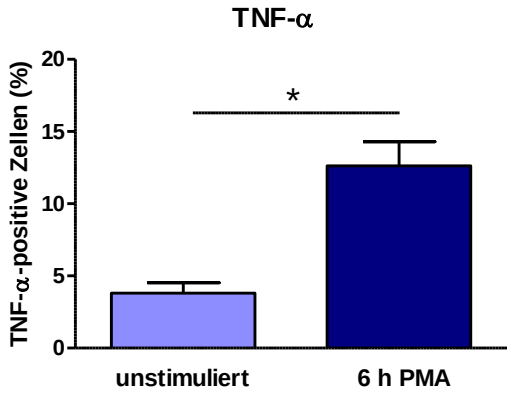


Abbildung 3.7: Prozentualer Anteil TNF-α-produzierender Zellen mit und ohne PMA-Stimulation. Es wurden sechs verschiedene B-LCLs untersucht. Jede B-LCL wurde zum einen unstimuliert belassen und zum anderen für 6 h mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) stimuliert. Die Datenerhebung fand mit Hilfe des Durchflusszytometers LSRII statt. Der prozentuale Anteil TNF-α-produzierender Zellen nahm nach PMA-Stimulation signifikant zu (Wilcoxon Test: * $p \leq 0{,}05$). Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; TNF-α: Tumornekrosefaktor-alpha.

3.2.3 Veränderung der Proliferation nach PMA-Stimulation

Der Einfluss von PMA auf B-LCLs sollte weiterhin anhand von Proliferationsversuchen verifiziert werden. Die Proliferation wurde durch den Einbau von BrdU in neu synthetisierte DNA gemessen.
Die Proliferation nahm nach PMA-Stimulation bei allen drei B-LCLs ab (Abbildung 3.8).

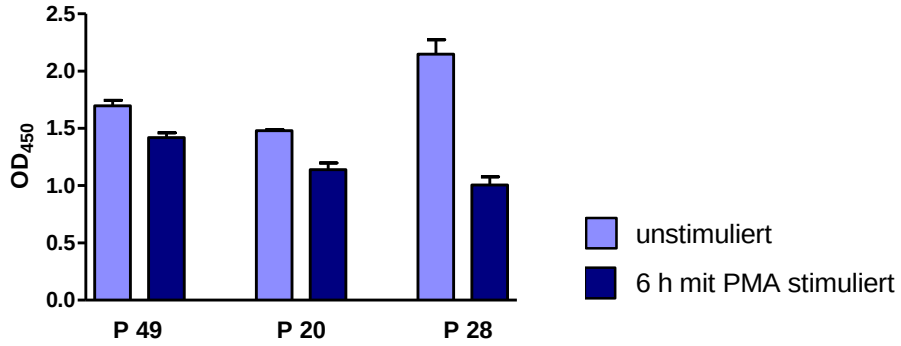


Abbildung 3.8: Verminderte Zellproliferation nach PMA-Stimulation. Es wurden drei verschiedene B-LCLs in Doppelbestimmung untersucht. Dafür wurden jeweils 20.000 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden zum einen unstimuliert belassen und zum anderen mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) stimuliert. Nach 6-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurde zu allen Zellen BrdU (Endkonzentration: 10 µM) hinzugefügt und diese für weitere 17 h inkubiert. Die Proliferation nahm nach PMA-Stimulation bei allen B-LCLs ab. Verwendete Abkürzungen:
B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; BrdU: 5-Brom-2-desoxyuridin; OD: optische Dichte; P: Probanden-ID; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat.

Dieses Ergebnis war zunächst überraschend, da PMA gemäß bekannter Literatur die Zellproliferation steigert (Bertoglio, 1983; Sauerwein *et al.*, 1987). Für die in dieser Arbeit beobachtete Inhibition der Proliferation wurde zum einen ein Effekt der ins Medium sekretierten Zytokine vermutet. Zum anderen wurde ein Einfluss der Toxizität des PMA als Ursache der Inhibition in Betracht gezogen. Diese beiden Hypothesen sollten anhand weiterer Proliferationsversuche überprüft werden.

3.2.4 Effekt unterschiedlicher TNF-α-Konzentrationen auf die Proliferation

Um den Einfluss von TNF-α auf die Proliferation von B-LCLs zu untersuchen, wurden die Zellen mit unterschiedlichen TNF-α-Konzentrationen kultiviert.
Mit steigender TNF-α-Konzentration wurde eine Abnahme der Proliferation beobachtet (Abbildung 3.9).

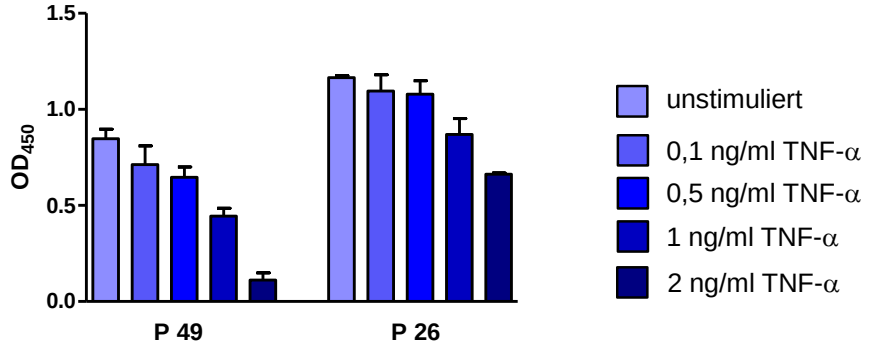


Abbildung 3.9: B-LCL-Proliferation nach Kultivierung der Zellen mit unterschiedlichen TNF-α-Konzentrationen. Es wurden zwei verschiedene B-LCLs in Doppelbestimmung untersucht. Dazu wurden jeweils 20.000 Zellen ausgesät und diese mit verschiedenen TNF-α-Konzentrationen (Endkonzentration: 0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml und 2 ng/ml) für 6 h bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Anschließend wurde zu allen Zellen BrdU (Endkonzentration: 10 µM) gegeben und diese für weitere 17 h inkubiert. Für beide B-LCLs nahm die Proliferation mit steigender TNF-α-Konzentration ab. Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; OD: optische Dichte; Probanden-ID; TNF-α: Tumornekrosefaktor-alpha.

Da PMA die TNF-α-Produktion steigert (Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7), könnte die erhöhte Menge an TNF-α für die in Abbildung 3.8 beobachtete Abnahme der B-LCL-Proliferation nach PMA-Stimulation verantwortlich sein. Mit dem nachfolgenden Versuch sollte nun überprüft werden, ob die Toxizität von PMA bei der verminderten B-LCL-Proliferation ebenfalls eine Rolle spielt, oder ob ausschließlich die erhöhte Zytokin-Sekretion nach PMA-Stimulation für die reduzierte B-LCL-Proliferation verantwortlich war.

3.2.5 Effekt des im Überstand verbliebenen PMA auf die Proliferation

Es wurden drei verschiedene B-LCLs in frischem Medium und in verschiedenen Überständen PMA-stimulierter B-LCLs kultiviert. In den Überständen PMA-stimulierter B-LCLs war PMA zum einen noch enthalten und zum anderen wurde

es nach 6-stündiger Stimulation herausgewaschen und die durch PMA aktivierten Zellen in frischem Medium für weitere 18 h kultiviert.

Bei allen drei B-LCLs wurde eine Abnahme der Proliferation zwischen denjenigen Zellen, die in frischem Medium kultiviert wurden und denjenigen Zellen, welche in den Überständen PMA-stimulierter B-LCLs kultiviert wurden, beobachtet. Es wurde jedoch kein Unterschied in der Proliferation der B-LCLs nach Kultivierung der Zellen in dem Überstand, der PMA noch enthielt und dem Überstand, welcher kein PMA mehr enthielt, gefunden (Abbildung 3.10). Die Toxizität des PMA hatte somit keinen Einfluss auf die Zellproliferation.

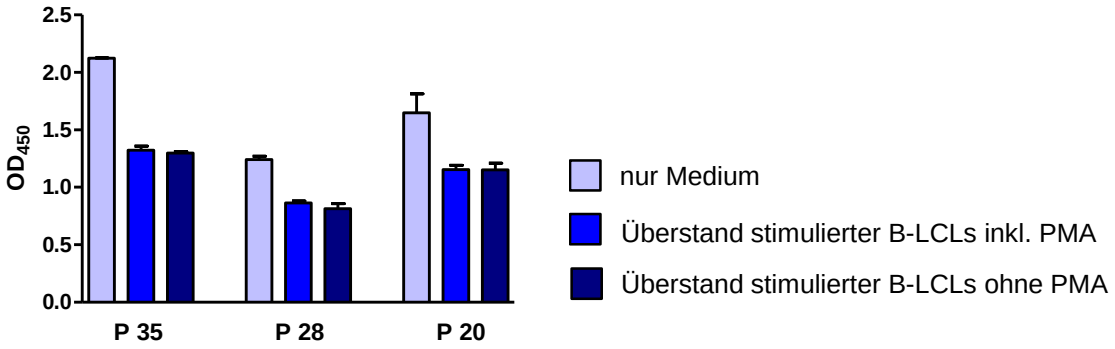


Abbildung 3.10: B-LCL-Proliferation nach Kultivierung mit Medium und verschiedenen Überständen. Es wurden drei verschiedene B-LCLs und zwei verschiedene Überstände von B-LCLs verwendet. Die B-LCLs wurden dazu zum einen für 6 h und zum anderen für 24 h mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) stimuliert. Im Überstand der für 6 h stimulierten Zellen war PMA noch enthalten, wohingegen sich bei den für 24 h mit PMA stimulierten Zellen kein PMA mehr im Überstand befand, da dieses nach 6-stündiger Stimulation herausgewaschen wurde. Es wurden jeweils 30.000 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden entweder in 100 µl Medium oder in 100 µl der entsprechenden Überstände bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Proliferation nahm nach Kultivierung in beiden Überständen im Vergleich zur Kultivierung in frischem Medium ab. Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; OD: optische Dichte; P: Probanden-ID; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat.

Dass die Abnahme der Proliferation nach Kultivierung der B-LCLs in stimulierten Überständen im Vergleich zu einer Kultivierung in frischem Medium abnahm, war auch nicht auf einen Nährstoffmangel durch schon gebrauchtes Medium zurückzuführen. Dies wurde anhand eines weiteren Versuchs gezeigt, bei dem kein Unterschied in der Proliferation von B-LCLs, welche in frischem Medium kultiviert wurden und B-LCLs, welche in unstimulierten Überständen kultiviert wurden, vorhanden war (Abbildung 7.2; Anhang).

In diesem Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass die Toxizität von PMA keinen Einfluss auf die Proliferation hat. Da die Proliferation mit steigender TNF-α-

Konzentration abnahm, war die reduzierte Proliferation ein Effekt des ins Medium sezernierten TNF-α. Ob noch andere Zytokine einen Einfluss auf die Zellproliferation haben, muss in weiteren Versuchen untersucht werden. Diese Versuche zeigten weiterhin anhand der gesteigerten TNF-α-Sekretion und -Produktion von mit PMA stimulierten B-LCLs, dass PMA ein inflammatorisches Milieu generiert und somit für die nachfolgenden *in vitro* Stimulationsversuche geeignet war.

3.3 Untersuchungen zu Genexpressions- und Sekretionsunterschieden von TNF-α und IL-10 im Kontext verschiedener HLA-Konstellationen und des Stimulus

Es gibt Hinweise darauf, dass bestimmte MHC-Klasse-II-Moleküle einen Einfluss auf das Zytokinmuster haben (Zipp *et al.*, 1995; Hanson *et al.*, 1996; Matthews und Price, 2000). Des Weiteren besteht ein Kopplungsungleichgewicht zwischen verschiedenen Allelen von *TNF* und HLA-Genen (Shaw *et al.*, 2004). Daher sollte überprüft werden, ob eine differentielle Zytokinproduktion zwischen B-LCLs mit HLA-Konstellationen, die unterschiedlich stark mit T1D assoziiert sind, vorhanden ist und ob die Simulation eines inflammatorischen Milieus eine Polarisierung in der Zytokinproduktion zwischen diesen HLA-Konstellationen hervorruft.

Als Vertreter proinflammatorischer Zytokine wurde TNF-α, dessen Gen in der HLA-Klasse-III-Region lokalisiert ist, verwendet. Als Vertreter antiinflammatorischer Zytokine wurde IL-10, ein Negativregulator von TNF-α, eingesetzt (Gowans *et al.*, 2002; Iyer und Cheng, 2012). Die Genexpression wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Die Auswertung erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$-Methode. Dabei wurde zunächst die relative Expression in Bezug zur Expression der endogenen Kontrolle *RPL13A* ermittelt. Anschließend wurde die Expression der stimulierten Proben in Relation zur Expression der unstimulierten Proben bestimmt. Die Zytokinsekretion wurde mittels ELISA ermittelt. Es wurden insgesamt 23 B-LCLs untersucht. Die B-LCLs stammten von Probanden, die verschiedene mit T1D assoziierte HLA-Konstellationen besitzen, welche zuvor in Risikogruppen eingeteilt wurden (Tabelle 3.1). Die B-LCLs wurden zum einen unbehandelt belassen und zum anderen für 6 h

bzw. 24 h mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) stimuliert. Da das PMA für die 24-stündige Stimulation nach 6-stündiger Inkubation herausgewaschen wurde, wurde *de facto* nur eine 18-stündige Zytokinsekretion gemessen. Daher wurden für die Darstellung der 24-stündigen PMA-Stimulation die erhaltenen Werte nach 6-stündiger Stimulation zu den erhaltenen Werten nach 18-stündiger Sekretion addiert. Die Bezeichnung „18 h PMA (6 – 24)“ kennzeichnet die 18-stündige Sekretion der Zytokine in dem Zeitraum zwischen dem Herauswaschen des PMAs nach 6 h und der Entnahme des Überstandes nach 24 h.

Tabelle 3.1: Darstellung der mit T1D assoziierten HLA-Konstellationen, die zur Untersuchung differentieller Zytokinmuster verwendet wurden. Angegeben sind verschiedene mit T1D assoziierte HLA-Konstellationen und die für diese in der vorliegenden Arbeit verwendete Bezeichnung. Verwendete Bezeichnungen und Abkürzungen: HLA-Haplotyp 1: *DRB1*0301-DQA1*05XX-DQB1*02XX*; HLA-Haplotyp 2: *DRB1*0401-DQA1*03XX-DQB1*0301* oder **0302*; HLA-Haplotyp 3: *DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602*. HLA: humanes Leukozytenantigen; T1D: Typ 1 Diabetes; XX: Bei einigen Probanden lagen keine weiteren Informationen über die spezifischen Allele vor. Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 (Vandiedonck und Knight, 2009) und der Tatsache, dass das verwendete Probandenkollektiv ausschließlich kaukasischen Ursprungs ist, konnte davon ausgegangen werden, dass sich spezifische Allele und Suballele innerhalb einer Risikogruppe mit gleichem HLA-Haplotyp nicht unterscheiden (*HLA-DQA1*03XX* entspricht *HLA-DQA1*0301*; *HLA-DQA1*05XX* entspricht *HLA-DQA1*0501*; *HLA-DQB1*02XX* entspricht *HLA-DQB1*0201*).

Risiko-gruppe	Bezeichnung	Proben (n)	HLA-Haplotyp	*HLA-DRB1*	*HLA-DQA1*	*HLA-DQB1*	Anmerkung
1	höchstes Risiko	8	1	*0301*	*05XX*	*02XX*	
			2	*0401*	*03XX*	*0302*	
2	hohes Risiko	10	2	*0401*	*03XX*	*03YY*	YY = 01 oder 02
			2	*0401*	*03XX*	*03YY*	YY = 01 oder 02
4	geringes Risiko 1	3	2	*0401*	*03XX*	*03YY*	YY = 01 oder 02
			3	*1501*	*0102*	*0602*	
5	geringes Risiko 2	2	1	*0301*	*05XX*	*02XX*	
			3	*1501*	*0102*	*0602*	

3.3.1 IL-10

3.3.1.1 *IL10*-Expression

Weder vor noch nach PMA-Stimulation waren signifikante Unterschiede in der *IL10*-Expression zwischen den einzelnen HLA-Konstellationen vorhanden (Kruskall-Wallis Test, Nachfolgetest: Dunn´s Test: n.s.: nicht signifikant). Nach 6-stündiger PMA-Stimulation war die *IL10*-Expression bei allen HLA-Konstellationen

4 – 5-fach erhöht und nahm nach 24-stündiger PMA-Stimulation wieder geringfügig ab (Abbildung 3.11).

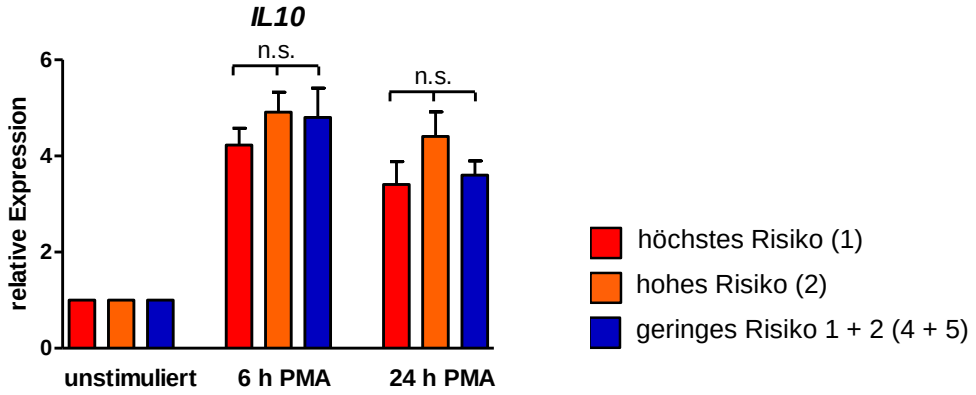


Abbildung 3.11: Expression von *IL10* bei nicht stimulierten und für 6 h bzw. 24 h mit PMA stimulierten B-LCLs. Es wurden 23 B-LCLs mit verschiedenen mit T1D assoziierten HLA-Konstellationen untersucht. Die Zahlen in den Klammern weisen auf die Gruppenzugehörigkeit der HLA-Konstellationen hin (Tabelle 3.1). Die B-LCLs wurden entweder unstimuliert belassen oder für 6 h bzw. 24 h mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) stimuliert. Die Expression der stimulierten Proben wurde in Relation zur Expression der unstimulierten Proben bestimmt. Die Expression der unstimulierten Proben wurde „1“ gesetzt. Zwischen den untersuchten HLA-Konstellationen wurde kein signifikanter Unterschied in der *IL10*-Expression gefunden (Kruskall-Wallis Test, Nachfolgetest: Dunn´s Test: n.s.: nicht signifikant). Nach PMA-Zugabe war ein Anstieg der *IL10*-Expression zu beobachten. Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; HLA: humanes Leukozytenantigen; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; T1D: Typ 1 Diabetes.

3.3.1.2 IL-10-Sekretion

Weder vor noch nach PMA-Stimulation waren signifikante Unterschiede in der IL-10-Sekretion zwischen den einzelnen HLA-Konstellationen vorhanden (Kruskall-Wallis Test, Nachfolgetest: Dunn´s Test: n.s.: nicht signifikant). Die IL-10-Sekretion stieg nach PMA-Zugabe für alle HLA-Konstellationen signifikant an (Wilcoxon Test: ** $p \leq 0{,}01$). In den ersten 6 h nach PMA-Zugabe war, im Vergleich zu TNF-α (Abbildung 3.14), der Anstieg in der IL-10-Sekretion geringer, was auf einen verzögerten Effekt des PMA auf die IL-10-Sekretion hindeutet (Abbildung 3.12a). Beim Vergleich der IL-10-Sekretion nach 6-stündiger PMA-Stimulation mit der IL-10-Sekretion zwischen 6 h und 24 h nach PMA-Zugabe („18 h PMA (6 – 24)“), wurde ein signifikanter Unterschied beobachtet (Wilcoxon Test: ** $p \leq 0{,}01$). (Abbildung 3.12b).

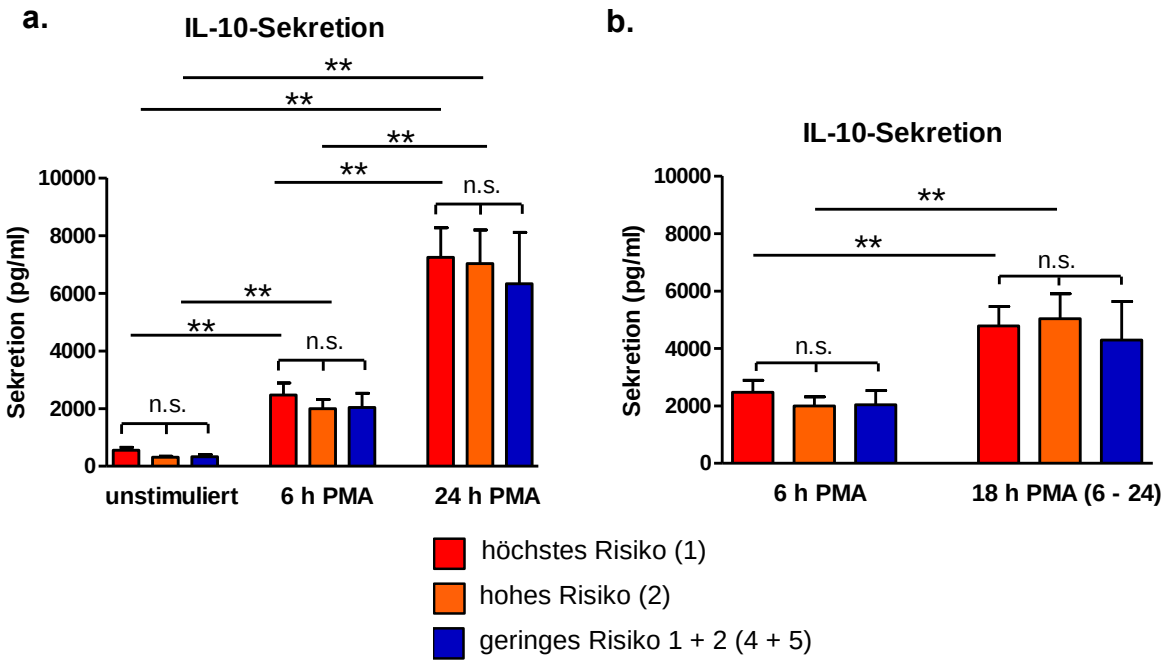


Abbildung 3.12: Sekretion von IL-10 bei nicht stimulierten und für 6 h bzw. 24 h mit PMA stimulierten B-LCLs. Es wurden 23 B-LCLs mit verschiedenen mit T1D assoziierten HLA-Konstellationen untersucht. Die Zahlen in den Klammern weisen auf die Gruppenzugehörigkeit der HLA-Konstellationen hin (Tabelle 3.1). Die B-LCLs wurden entweder unstimuliert belassen oder für 6 h bzw. 24 h mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) stimuliert. **a:** Zwischen den untersuchten HLA-Konstellationen wurde kein signifikanter Unterschied in der IL-10-Sekretion gefunden (Kruskall-Wallis Test, Nachfolgetest: Dunn´s Test: n.s.: nicht signifikant). Die Sekretion nahm für alle HLA-Konstellationen signifikant zu (Wilcoxon Test: ** $p \leq 0{,}01$). **b:** Nach 18-stündiger Sekretion (18 h PMA (6 – 24)) wurde signifikant mehr IL-10 sekretiert, als nach 6-stündiger PMA-Stimulation (Wilcoxon Test: ** $p \leq 0{,}01$). Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; HLA: humanes Leukozytenantigen; IL-10: Interleukin-10; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; T1D: Typ 1 Diabetes.

3.3.2 TNF-α

3.3.2.1 *TNF*-Expression

Weder vor noch nach PMA-Stimulation waren signifikante Unterschiede in der *TNF*-Expression zwischen den einzelnen HLA-Konstellationen vorhanden (Kruskall-Wallis Test, Nachfolgetest: Dunn´s Test: n.s.: nicht signifikant). Nach 6-stündiger PMA-Stimulation stieg die *TNF*-Expression für alle HLA-Konstellationen auf das etwa 4-fache an und nahm nach 24-stündiger PMA-Stimulation wieder deutlich ab (Abbildung 3.13).

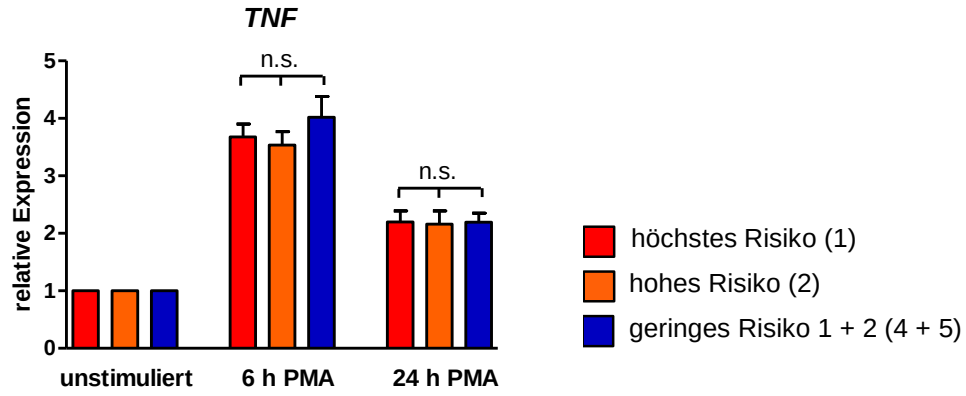


Abbildung 3.13: Expression von *TNF* bei nicht stimulierten und für 6 h bzw. 24 h mit PMA stimulierten B-LCLs. Es wurden 23 B-LCLs mit verschiedenen mit T1D assoziierten HLA-Konstellationen untersucht. Die Zahlen in den Klammern weisen auf die Gruppenzugehörigkeit der HLA-Konstellationen hin (Tabelle 3.1). Die B-LCLs wurden entweder unstimuliert belassen oder für 6 h bzw. 24 h mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) stimuliert. Die Expression der stimulierten Proben wurde in Relation zur Expression der unstimulierten Proben bestimmt. Die Expression der unstimulierten Proben wurde „1“ gesetzt. Zwischen den untersuchten HLA-Konstellationen wurde kein signifikanter Unterschied in der *TNF*-Expression gefunden (Kruskall-Wallis Test, Nachfolgetest: Dunn´s Test: n.s.: nicht signifikant). Nach PMA-Zugabe war ein Anstieg der *TNF*-Expression zu beobachten. Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; HLA: humanes Leukozytenantigen; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; T1D: Typ 1 Diabetes.

3.3.2.2 TNF-α-Sekretion

Weder vor noch nach PMA-Stimulation waren signifikante Unterschiede in der TNF-α-Sekretion zwischen den einzelnen HLA-Konstellationen vorhanden (Kruskall-Wallis Test, Nachfolgetest: Dunn´s Test: n.s.: nicht signifikant). Nach PMA-Zugabe war ein signifikanter Anstieg der TNF-α-Sekretion für alle HLA-Konstellationen zu beobachten (Wilcoxon Test: ** $p \leq 0{,}01$). Dabei war der Effekt von PMA in den ersten 6 h am stärksten, was auf eine schnelle Wirkung von PMA auf die TNF-α-Sekretion hindeutet (Abbildung 3.14a). Beim Vergleich der TNF-α-Sekretion nach 6-stündiger PMA-Stimulation mit der TNF-α-Sekretion zwischen 6 h und 24 h nach PMA-Zugabe („18 h PMA (6 – 24)“), wurde kein signifikanter Unterschied gefunden, obwohl die Zellen dem Stimulus 3x länger ausgesetzt waren (Wilcoxon Test: n.s.: nicht signifikant) (Abbildung 3.14b). Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der größte Effekt von PMA auf die TNF-α-Sekretion in den ersten 6 h nach PMA-Zugabe erreicht wurde.

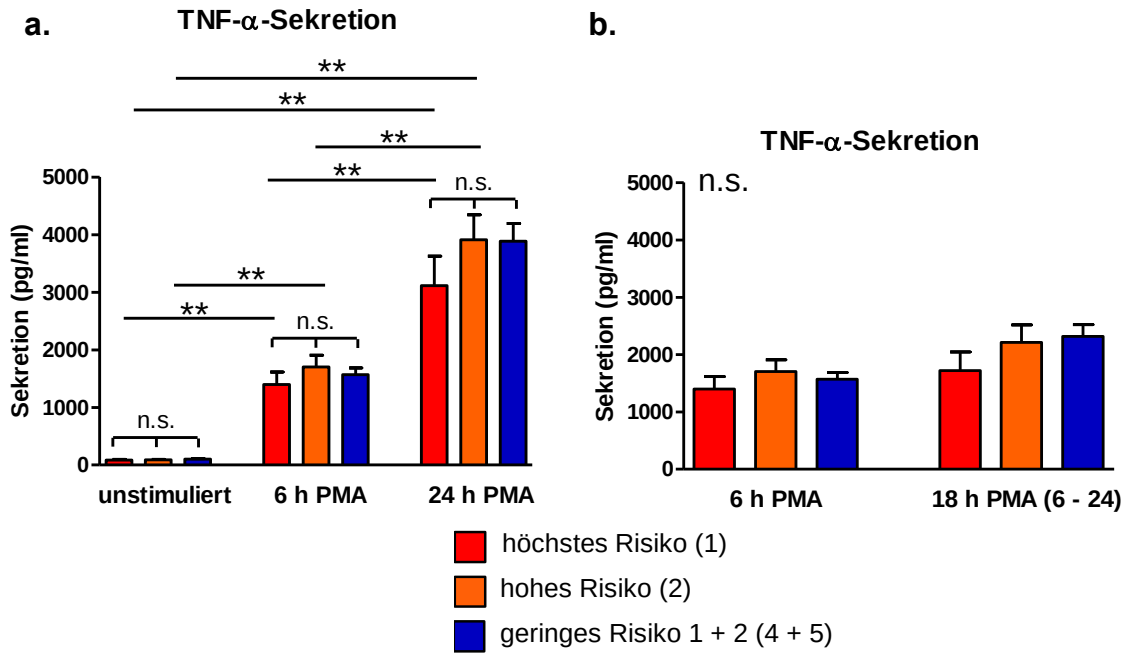


Abbildung 3.14: Sekretion von TNF-α bei nicht stimulierten und für 6 h bzw. 24 h mit PMA stimulierten B-LCLs. Es wurden 23 B-LCLs mit verschiedenen mit T1D assoziierten HLA-Konstellationen untersucht. Die Zahlen in den Klammern weisen auf die Gruppenzugehörigkeit der HLA-Konstellationen hin (Tabelle 3.1). Die B-LCLs wurden entweder unstimuliert belassen oder für 6 h bzw. 24 h mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) stimuliert. **a:** Zwischen den untersuchten HLA-Konstellationen wurde kein signifikanter Unterschied in der TNF-α-Sekretion gefunden (Kruskall-Wallis Test, Nachfolgetest: Dunn´s Test: n.s.: nicht signifikant) Die Sekretion nahm für alle HLA-Konstellationen signifikant zu (Wilcoxon Test: ** $p \leq 0{,}01$). **b:** Es war kein signifikanter Unterschied in der TNF-α-Sekretion zwischen 18-stündiger Sekretion „18 h PMA (6 – 24)“ und 6-stündiger PMA-Stimulation vorhanden (Wilcoxon Test: n.s.: nicht signifikant). Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; HLA: humanes Leukozytenantigen; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; TNF-α: Tumornekrosefaktor-alpha; T1D: Typ 1 Diabetes.

3.3.2.3 TNF-α-Sekretion nach Kurzzeitstimulation mit PMA

Da innerhalb der ersten 6 h der größte Effekt von PMA auf die TNF-α-Sekretion zu beobachten war, wurden die Zellen nun kürzeren Stimulationszeiten ausgesetzt (2 h, 4 h und 6 h). Hierfür wurden aus dem in Tabelle 3.1 aufgeführten Probanden-kollektiv zwölf B-LCLs verschiedener HLA-Konstellationen untersucht. Höchstes Risiko (1): n = 4; hohes Risiko (2): n = 4; geringes Risiko 1 + 2 (4 + 5): n = 4. Da die Anzahl an Probanden bei dem vorliegenden Versuch für die in dieser Arbeit verwendeten nicht-parametrischen Testverfahren zu gering war, um auf signifikante Unterschiede zu testen, wurde der Versuch deskriptiv ausgewertet.

Für alle HLA-Konstellationen stieg die TNF-α-Sekretion in den ersten 2 h nach PMA-Zugabe am deutlichsten an. Die Sekretion nahm weiterhin bei längeren

Stimulationszeiten langsamer zu (Abbildung 3.15a und Abbildung 7.3; Anhang). Für die HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko stieg die TNF-α-Sekretion nach Stimulation am langsamsten an. Der Stimulationsindex (SI), welcher das Verhältnis der TNF-α-Sekretion vor und nach PMA-Stimulation beschreibt, lag nach 6-stündiger Stimulation bei der HLA-Konstellation mit dem höchsten Risiko im Mittel bei 15,3, wohingegen er bei der HLA-Konstellation mit einem hohen bzw. einem geringen Erkrankungsrisiko im Mittel bei 24,3 bzw. 24,8 lag (Abbildung 3.15b).

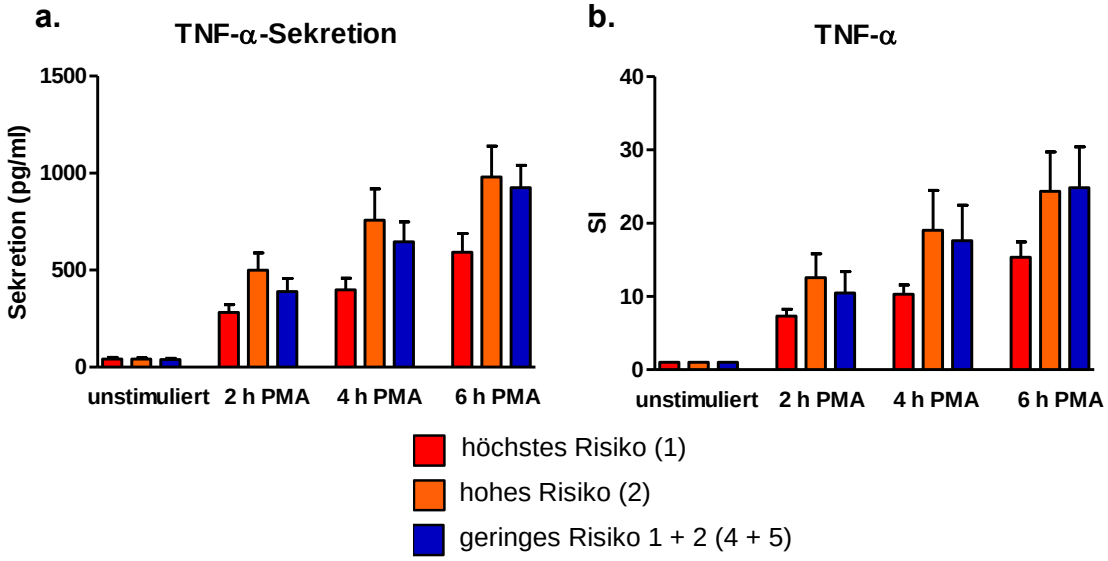


Abbildung 3.15: Sekretion von TNF-α nach Kurzzeitstimulation mit PMA. Es wurden zwölf B-LCLs mit verschiedenen mit T1D assoziierten HLA-Konstellationen untersucht. Die B-LCLs wurden entweder unstimuliert belassen oder für 2 h, 4 h oder 6 h mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) stimuliert. Höchstes Risiko (1): n = 4; hohes Risiko (2): n = 4; geringes Risiko (4 + 5): n = 4. Die Zahlen in Klammern weisen auf die jeweilige Gruppenzugehörigkeit hin (Tabelle 3.1). **a:** Nach PMA-Zugabe stieg die TNF-α-Sekretion für alle HLA-Konstellationen an. **b:** Der SI lag nach 6-stündiger PMA-Stimulation bei der HLA-Konstellation mit dem höchsten Risiko im Mittel bei 15,3 wohingegen er bei den HLA-Konstellationen mit einem hohen bzw. geringen Risiko im Mittel bei 24,3 bzw. 24,8 lag. Ein SI ≥ 3 wurde als signifikant gewertet. Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; HLA: humanes Leukozytenantigen; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; SI: Stimulationsindex; TNF-α: Tumornekrosefaktor-alpha; T1D: Typ 1 Diabetes.

Zusammenfassend wurde in diesem Teil der Arbeit ein Anstieg in der Genexpression und Sekretion von IL-10 und TNF-α nach PMA-Stimulation beobachtet. Zwischen den einzelnen HLA-Konstellationen waren hingegen weder vor noch nach PMA-Stimulation Unterschiede vorhanden. Die B-LCLs der Probanden der Risikogruppe 1 (höchstes Risiko) sekretierten nach Kurzzeitstimulation tendenziell jedoch weniger TNF-α als die der Probanden der Risikogruppe 2 (hohes Risiko) und der Risikogruppen 4 + 5 (geringes Risiko 1 + 2).

3.4 Untersuchungen zu Expressionsunterschieden am HLA-Locus im Kontext verschiedener HLA-Konstellationen und des Stimulus

Der hohe Grad an Polymorphismus der HLA-Klasse-II-Gene und die damit verbundene molekulare Diversität ist für das relative Risiko an T1D zu erkranken von großer Bedeutung. Dabei spielt die dreidimensionale Struktur der peptidbindenden Grube der HLA-Klasse-II-Moleküle und die daraus resultierende differentielle Bindungsaffinität zu diabetogenen Peptiden eine bedeutende Rolle bei der Manifestation der Erkrankung. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass auch Unterschiede in der Expression der HLA-Klasse-II-Gene an der Pathogenese des T1D beteiligt sein könnten (Donner *et al.*, 2002; Britten *et al.*, 2009). Daher sollte die Expression bestimmter HLA-Klasse-II-Gene bei HLA-Konstellationen analysiert werden, die positiv oder negativ mit T1D assoziiert sind. Hierfür wurde zum einen die Expression von *HLA-DRA*, das nicht mit T1D assoziiert ist, bei verschiedenen HLA-Konstellationen untersucht. Zum anderen wurde die Expression der Gene *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1*, die stark mit T1D assoziiert sind, bei verschiedenen HLA-Konstellationen analysiert. Zusätzlich wurde die Expression von Faktoren untersucht, welche die HLA-Klasse-II-Expression regulieren. Die quantitativen Expressionsanalysen wurden mit Hilfe der qRT-PCR durchgeführt. Dafür sollten kommerzielle Primer der Firma Qiagen verwendet werden.

3.4.1 Überprüfung der Eignung kommerzieller Primer zur quantitativen Expressionsanalyse am HLA-Locus

Um sicher zu stellen, dass potentielle Expressionsunterschiede der hochpolymorphen HLA-Klasse-II-Gene zwischen den einzelnen HLA-Konstellationen nicht durch unterschiedliche Spezifitäten der kommerziellen Primer für die verschiedenen Allele verursacht wurden, wurde die Bindung dieser Primer an die in dieser Arbeit zu analysierenden Allele überprüft. Hierfür wurden die Primerbindungsbereiche dieser Primer lokalisiert und auf Basenaustausche hin untersucht. Dazu wurden Sequenzvergleiche mit Hilfe der Datenbanken dbMHC (*Major Histocompatibility Complex database*;

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/main.fcgi?cmd=init; Helmberg *et al.* 2004) von NCBI und IMGT/HLA (http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/; Robinson *et al.,* 2011) von IMGT® (*the international immunogenetics information system*®) durchgeführt. Des Weiteren wurde die Spezifität der kommerziellen Primer für die HLA-Allele mit qRT-PCR-Experimenten analysiert (Abschnitt 3.4.1.4).
Die Herstellung der kommerziellen Primer von Qiagen basiert auf den Sequenzen des Referenzgenoms des *Genome reference consortiums*, unter Berücksichtigung von SNPs, welche von Qiagen über eine dbSNP-Datenbank überprüft wurden (Quelle: http://www.sabiosciences.com/custompcrplate.php; Stand: Juli 2011). Da der HLA-Bereich hoch-polymorph ist, kann die Sequenz des Referenzgenoms zu den Sequenzen der hier untersuchten Allele jedoch stark abweichen. Dies kann zu Problemen bei der Primerbindung in diesem Bereich führen, weshalb die Primerbindungsbereiche der hier untersuchten Gene für die im Probandenkollektiv vorkommenden Allele untersucht werden sollten.

3.4.1.1 Vorhandene Informationen über die Primerlokalisation

Für die kommerziellen Primer waren keine Sequenzinformationen vorhanden. Die Firma Qiagen gibt jedoch für jedes käuflich zu erwerbende Primerpaar eine Referenzsequenz aus NCBI (RefSeq) unter der entsprechenden RefSeq Accession Nummer an. Über die RefSeq Accession Nummer gelangt man zur mRNA-Sequenz des jeweiligen Gens aus der Datenbank von NCBI. Zusätzlich wird für jedes Gen eine Referenzposition angegeben. Die Referenzposition beschreibt eine Position in der RefSeq, die innerhalb des Amplikons liegt und demnach von den kommerziellen Primern flankiert wird. Des Weiteren sind die Längen der Amplikons bekannt. Auf Grund der bekannten Referenzpositionen und Amplikonlängen sind die Bereiche, innerhalb derer die kommerziellen Primer binden, bereits vor der Sequenzanalyse bekannt. Primername, RefSeq Accession Nummern, Amplikonlängen, Referenzposition und die Lage im Gen sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

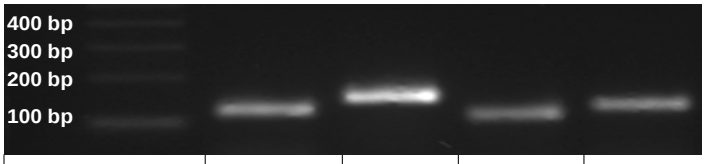
Tabelle 3.2: Angaben zu den verwendeten Primern von Qiagen. Angegeben sind Primername, Gen RefSeq #, Amplikonlänge, Referenzposition und die Lage der Primer im Gen, wie sie zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung vorlagen (Stand: Juli 2011[a]). Verwendete Abkürzungen: bp: Basenpaare; Gen RefSeq #: Accession Nummern der Referenzsequenzen; HLA: humanes Leukozytenantigen; UTR: untranslatierte Region.

Primer	Gen RefSeq #	Amplikonlänge (bp)	Referenzposition	Lage im Gen
HLA-DRA	NM_019111	119	984	3´UTR
HLA-DRB1	NM_002124	142	976	3´UTR
HLA-DQA1	NM_002122	106	426	Exon 3
HLA-DQB1	NM_002123	125	1145	3´UTR

[a]: Die Informationen der Primer für die hier aufgeführten Gene, können von der Firma Qiagen bis dato geändert worden sein.

3.4.1.2 Bestimmung der genauen Primerlokalisation

Um Informationen über die Sequenzen der kommerziellen Primer und deren exakte Lokalisation im jeweiligen Gen zu erhalten, wurden die mit den kommerziellen Primern generierten PCR-Produkte der zu untersuchenden Gene *HLA-DRA*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* in das pGEM-Vektor System kloniert. Anschließend wurden sie mit Hilfe von vektorspezifischen Primern sequenziert. Es wurde jeweils eine homozygote Probe verwendet (Haplotyp: *DRB1*0301/0301-DQA1*0501/0501-DQB1*02XX/02XX*). Die Sequenzierung wurde von der Firma GATC Biotech mit Hilfe der Sanger-Methode durchgeführt.



Gelspur	1	2	3	4	5
Name	100 bp Leiter	*HLA-DRA*	*HLA-DRB1*	*HLA-DQA1*	*HLA-DQB1*
Amplikonlänge (bp)		119	142	106	125

Abbildung 3.16: PCR-Produkte von *HLA-DRA*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1*. Für die Generierung der PCR-Produkte wurden Primer der Firma Qiagen verwendet. Als Template diente die cDNA einer homozygoten Probe (*DRB1*0301/0301-DQA1*0501/0501-DQB1*02XX/02XX*). Die PCR-Produkte wurden in das pGEM-Vektor System kloniert und von der Firma GATC Biotech im ABI 3730xl nach der Sanger-Methode sequenziert. Verwendete Abkürzungen: bp: Basenpaare; cDNA: komplementäre DNA; HLA: humanes Leukozytenantigen; PCR: Polymerasekettenreaktion. XX: Bei einigen Probanden lagen keine weiteren Informationen über die spezifischen Allele vor. Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 (Vandiedonck und Knight, 2009) und der Tatsache, dass das verwendete Probandenkollektiv ausschließlich kaukasischen Ursprungs ist, konnte davon ausgegangen werden, dass sich spezifische Allele und Suballele innerhalb einer Risikogruppe mit gleichem HLA-Haplotyp nicht unterscheiden. *HLA-DQB1*02XX* entspricht *HLA-DQB1*0201*).

Die von der Firma GATC Biotech erhaltenen Sequenzen wurden für jedes der vier Gene mit dem jeweiligen Sequenzabschnitt der RefSeq aus der Datenbank von NCBI verglichen. Der Vorwärtsprimer begann für *HLA-DRA*, *HLA-DQA1* und *HLA-DRB1* immer 20 ± 1 bp in 5´-Richtung (= stromaufwärts) der von Qiagen angegebenen Referenzposition. Der Rückwärtsprimer befand sich entsprechend der Länge des Amplikons weiter in 3´-Richtung (= stromabwärts). Für *HLA-DQB1* hingegen begann der Rückwärtsprimer 20 bp stromabwärts der Referenzposition und der Vorwärtsprimer lag entsprechend der Länge des Amplikons weiter stromaufwärts (Abbildung 7.4; Anhang). Da nur die ungefähren Längen der Primer bekannt waren, konnten diese zwischen 19 und 23 Nukleotiden (Nt) lang sein (Quelle: http://www.sabiosciences.com/custompcrplate.php; Stand:Juli 2011).

3.4.1.3 Untersuchung der Primerbindungsbereiche von *HLA-DRA*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* und *HLA-DRB1*

Für das nicht-polymorphe Gen *HLA-DRA*, existieren sieben verschiedene Varianten (Quelle: http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html; Stand: 31. Januar 2014; Robinson *et al.,* 2011). Für sechs Varianten waren in den dbMHC- und IMGT/HLA-Datenbanken Informationen über den Primerbindungsbereich in der 3´UTR vorhanden. In diesen Varianten wurden keine Polymorphismen im Primerbindungsbereich gefunden. Es wurde daher angenommen, dass auch für die siebte Variante keine Polymorphismen im Primerbindungsbereich vorkommen.
Da es sich bei *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* und *HLA-DRB1* um hoch-polymorphe Gene handelt, wurde überprüft, ob die Primerbindungsstellen bei allen im Probandenkollektiv vorkommenden Allele identisch sind (Tabelle 3.3). Als Kontrollsequenzen diente die RefSeq aus NCBI. Die Positionen der Basenaustausche im Primerbindungsbereich, wurden stets ausgehend vom 5´-Ende des Primers angegeben.

Tabelle 3.3: Im Probandenkollektiv vorkommende Allele. XX: Bei einigen Probanden lagen keine weiteren Informationen über die spezifischen Allele vor. Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 (Vandiedonck und Knight, 2009) und der Tatsache, dass das verwendete Probandenkollektiv ausschließlich kaukasischen Ursprungs ist, konnte davon ausgegangen werden, dass sich spezifische Allele und Suballele innerhalb einer Risikogruppe mit gleichem HLA-Haplotyp nicht unterscheiden (HLA-*DQA1*03XX* entspricht *HLA-DQA1*0301*; *HLA-DQA1*05XX* entspricht *HLA-DQA1*0501*; *HLA-DQB1*02XX* entspricht *HLA-DQB1*0201*).

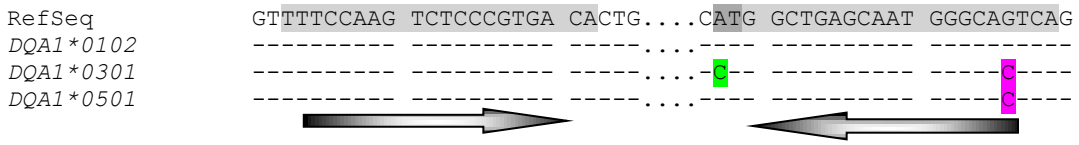
HLA-DRB1	***HLA-DQA1***	***HLA-DQB1***
0301	*05XX*	*02XX*
1501	*0102*	*0602*
0401	*03XX*	*0301 oder 0302*

3.4.1.3.1 Basenaustausche im Primerbindungsbereich von *HLA-DQA1*

Für *HLA-DQA1* sind gegenwärtig 51 verschiedene HLA-Allele bekannt (Quelle: http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html; Stand: 31. Januar 2014; Robinson *et al.,* 2011). In dieser Arbeit wurde überprüft, ob die Sequenzen in den Primerbindungsbereichen bei allen untersuchten Allelen (*DQA1*0102*, *DQA1*03XX* und *DQA1*05XX*) identisch sind.

Die Bindungsstellen des Vorwärts- und Rückwärtsprimers von *HLA-DQA1* sind in Exon 3 lokalisiert. Im Bereich des kommerziellen Vorwärtsprimers war kein Basenaustausch zu finden, so dass von einer gleichwertigen Bindung an alle untersuchten Allele ausgegangen werden kann. Im Bindungsbereich des kommerziellen Rückwärtsprimers konnte ein Basenaustausch von G nach C an Position 4 für die Allele *DQA1*0301* und *DQA1*0501* festgestellt werden (Abbildung 3.17).

Basenaustausche im Primerbindungsbereich von *HLA-DQA1*



ACTG = Vorwärtsprimer von Qiagen. Hier immer mit 20 Nt angegeben (mögliche Länge: 19 – 23 Nt). Die Pfeilspitze stellt das 3´-Ende dar.

ACTG = Rückwärtsprimer von Qiagen. Hier mit 20 Nt angegeben (mögliche Länge: 19 – 23 Nt). Die Pfeilspitze stellt das 3´-Ende dar.

AT = Base 21 und 22 gehören möglicherweise zum Primer.

C = Basenaustausch im Primerbindungsbereich.

C = Basenaustausch, welcher möglicherweise im Primerbindungsbereich liegt.

---- = Basen sind identisch zur RefSeq.

.... = Platzhalter für die Sequenz zwischen den Primern.

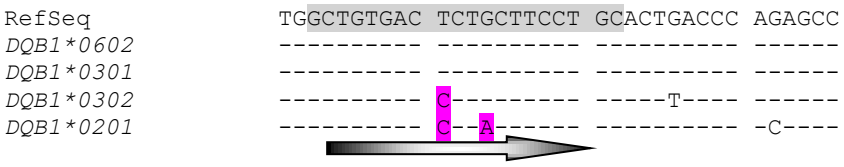
Abbildung 3.17: Basenaustausche im Primerbindungsbereich von *HLA-DQA1* für alle untersuchten Allele. Es wurde ein Sequenzalignment der unterschiedlichen Allele der dbMHC-Datenbank durchgeführt und mit der RefSeq aus NCBI (RefSeq #: NM_002122) verglichen. Der Austausch von G nach C an Position 4 für die Allele *DQA1*0301* und *DQA1*0501* gehört zum Primerbindungsbereich. Nach Herstellung eines homozygoten Klons für *DQA1*0301* konnte gezeigt werden, dass das C an Position 22 (ausgehend vom 5´-Ende des Primers; grün unterlegt) nicht mehr zum Primerbindungsbereich gehört (Ergebnis nicht gezeigt). Der Primer ist daher maximal 21 Nt lang. Verwendete Abkürzungen: A: Adenin; C: Cystein; G: Guanin; HLA: humanes Leukozytenantigen; Nt: Nukleotide; RefSeq: Referenzsequenz aus NCBI; T: Thymin.

3.4.1.3.2 Basenaustausche im Primerbindungsbereich von *HLA-DQB1*

Für *HLA-DQB1* sind momentan 509 verschiedene HLA-Allele bekannt (Quelle: http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html; Stand: 31. Januar 2014; Robinson *et al.,* 2011). Wie schon für *HLA-DQA1* wurde auch für *HLA-DQB1* überprüft, ob die Sequenzen der Primerbindungsstellen bei allen hier untersuchten Allelen (*DQB1*0602*, *DQB1*0302*, *DQB1*0301* und *DQB1*02XX*) identisch sind.

Für den Vorwärtsprimer war für die Allele *DQB1*0602* und *DQB1*0301* kein Basenaustausch vorhanden. Für Allel *DQB1*0302* befand sich ein Basenaustausch von T nach C an Position 9. Das Allel *DQB1*0201* wies zwei Basenaustausche im Primerbindungsbereich für den Vorwärtsprimer auf, die sich an Position 9 (T nach C) und 12 (G nach A) befanden (Abbildung 3.18).

Basenaustausche im Primerbindungsbereich des Vorwärtsprimers von *HLA-DQB1*



ACTG = Vorwärtsprimer von Qiagen. Hier immer mit 20 Nt angegeben (mögliche Länge: 19 – 23 Nt). Die Pfeilspitze stellt das 3´-Ende dar.

C = Basenaustausch im Primerbindungsbereich.

---- = Basen sind identisch zur RefSeq.

Abbildung 3.18: Basenaustausche von *HLA-DQB1* im Bereich des Vorwärtsprimers. Es wurde ein Sequenzalignment der unterschiedlichen Allele der dbMHC-Datenbank durchgeführt und mit der RefSeq aus NCBI (RefSeq #: NM_002123) verglichen. Für die Allele *DQB1*0602* und *DQB1*0301* waren keine Basenaustausche im Primerbindungsbereich vorhanden. Für Allel *DQB1*0302* war ein Austausch und für Allel *DQB1*0201* waren zwei Austausche vorhanden (pink unterlegt). Verwendete Abkürzungen: A: Adenin; C: Cystein; G: Guanin; HLA: humanes Leukozytenantigen; Nt: Nukleotide; RefSeq: Referenzsequenz aus NCBI; T: Thymin.

In den dbMHC- und IMGT/HLA-Datenbanken sind nur begrenzt Sequenzinformationen über die 3´UTR, in der die *HLA-DQB1*-Primerbindungsstellen der kommerziellen Primer liegen, vorhanden. Somit waren für keine der untersuchten Allele Sequenzinformationen über den Primerbindungsbereich des Rückwärtsprimers enthalten. Um dennoch eine Aussage über den Primerbindungsbereich des Rückwärtsprimers machen zu können, wurde mit Hilfe der RefSeq von *HLA-DQB1* aus der Datenbank von NCBI (RefSeq: NM_002123) ein Primer erstellt, der stromabwärts des kommerziellen Rückwärtsprimers gelegt wurde. Die generierten PCR-Produkte homozygoter Proben für die Allele *DQB1*0602*, *DQB1*0301*, *DQB1*0302* und *DQB1*02XX* wurden kloniert und sequenziert.

Nach der Sequenzierung waren für drei der vier untersuchten Allele keine Basenaustausche im Primerbindungsbereich des kommerziellen Rückwärtsprimers vorhanden. Eine Ausnahme stellte das Allel *DQB1*0302* dar, bei welchem an Position 19 ein Austausch von C nach T gefunden wurde (Abbildung 7.5; Anhang). Da die kommerziellen Primer von Qiagen zwischen 19 und 23 Nt lang sind, liegt dieser Austausch im Primerbindungsbereich.

3.4.1.3.3 Basenaustausche im Primerbindungsbereich von *HLA-DRB1*

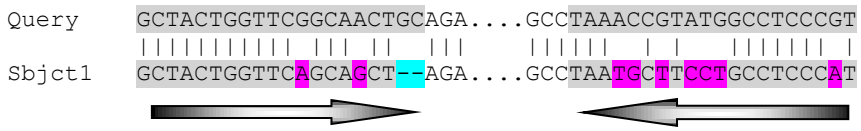
Für *HLA-DRB1* sind momentan 1.411 verschiedene HLA-Allele bekannt (Quelle: http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html; Stand: 31. Januar 2014; Robinson *et al.,* 2011).

Für Allel *DRB1*1501* waren im Primerbindungsbereich keine Basenaustausche vorhanden. Für Allel *DRB1*0301* lag im Primerbindungsbereich des Vorwärtsprimers an Position 12 ein Basenaustausch von G nach A vor. Für den Primerbindungsbereich des Rückwärtsprimers konnten zwei Basenaustausche gefunden werden. Ein Austausch von T nach C an Position 3 und ein Austausch von G nach C an Position 14 (Abbildung 7.6; Anhang).

Für das Allel *DRB1*0401* konnten zunächst keine Aussagen über mögliche Basenaustausche gemacht werden, da in den IMGT/HLA- und dbMHC-Datenbanken keine Sequenzinformationen über die 3´UTR dieses Allels vorlagen. Um die Primerbindungsbereiche für das Allel *DRB1*0401* untersuchen zu können, wurden zunächst mit Hilfe der RefSeq aus der Datenbank von NCBI Primer erstellt, welche die kommerziellen Primer von Qiagen flankierten. Das generierte PCR-Produkt einer homozygoten Probe für Allel *DRB1*0401* wurde ebenfalls kloniert und sequenziert.

Es waren für den Bindungsbereich des Vorwärtsprimers zwei Basenaustausche und zwei Deletionen und für den Bindungsbereich des Rückwärtsprimers sieben Basenaustausche vorhanden (Abbildung 3.19).

Basenaustausche im Primerbindungsbereich von *DRB1*0401*



Query: *HLA-DRB1*-Sequenz der Primerbindungsbereiche aus der Datenbank von NCBI (RefSeq: NM_002124).

Sbjct1: *HLA-DRB1*-Sequenz der Primerbindungsbereiche für einen homozygoten Klon für Allel *DRB1*0401.*

ACTG = Vorwärtsprimer von Qiagen. Hier immer mit 20 Nt angegeben (mögliche Länge: 19 – 23 Nt). Die Pfeilspitze stellt das 3´-Ende dar.

ACTG = Rückwärtsprimer von Qiagen. Hier mit 20 Nt angegeben (mögliche Länge: 19 – 23 Nt). Die Pfeilspitze stellt das 3´-Ende dar.

. . . . = Platzhalter für die Sequenz zwischen den Primern.

ACTG = Basenaustausche

-- = Deletionen

| = Basen sind identisch zur Query-Sequenz.

Abbildung 3.19: Basenaustausche im Primerbindungsbereich von Allel *DRB1*0401*. Die von der Firma GATC Biotech erhaltenen Sequenzen eines für das Allel *DRB1*0401* homozygoten Klons wurden im Primerbindungsbereich mit der RefSeq aus NCBI (RefSeq #: NM_002124) verglichen. Innerhalb der Sequenz des Vorwärtsprimers waren zwei Basenaustausche (pink unterlegt) und zwei Deletionen (türkis unterlegt) vorhanden. Im Rückwärtsprimer befanden sich sieben Basenaustausche (pink unterlegt). Verwendete Abkürzungen: A: Adenin; C: Cystein; G: Guanin; HLA: humanes Leukozytenantigen; Nt: Nukleotide; RefSeq: Referenzsequenz aus NCBI; T: Thymin.

3.4.1.4 Analyse der Spezifität kommerzieller Primer für bestimmte *DQA1*- und *DQB1*-Allele mittels qRT-PCR

Neben der datenbankgestützten Analyse sollte die Spezifität der Primer für die im Probandenkollektiv vorkommenden Allele auch experimentell überprüft werden. Dafür wurden allelspezifische PCR-Produkte der Gene *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* homozygoter Probanden in das pGEM-Vektor System kloniert. Die allelspezifischen PCR-Produkte wurden zuvor mit selbst erstellten Primern generiert, welche die Primerbindungsstellen der kommerziellen Primer flankierten. Für *HLA-DQA1* waren im Probandenkollektiv drei (*DQA1*05XX*, *DQA1*03XX* und *DQA1*0102*) und für *HLA-DQB1* vier (*DQB1*02XX*, *DQB1*0301*, *DQB1*0302* und *DQB1*0602*) verschiedene Allele vorhanden, so dass insgesamt sieben verschiedene Plasmide, die für die jeweiligen Allele homozygot waren, hergestellt wurden.

Anschließend wurde das Amplifikationsverhalten der allelspezifischen Plasmide mittels qRT-PCR analysiert.

Bei Verwendung allelspezifischer Plasmide von *HLA-DQA1* als *template* für die qRT-PCR und den kommerziellen *HLA-DQA1*-Primern, ergaben sich identische Ct-Werte (Abbildung 3.20a). Daraus lässt sich schließen, dass die kommerziellen Primer an alle hier untersuchten Allele gleich gut binden. Der Basenaustausch von G nach C in den Allelen *DQA1*03XX* und *DQA1*05XX* an Position 4 im Primerbindungsbereich des Rückwärtsprimers (Abbildung 3.17) hatte demnach, bei Verwendung der kommerziellen Primer, keinen Einfluss auf das Amplifikationsverhalten.

Bei der Verwendung allelspezifischer Plasmide von *HLA-DQB1* als *template* für die qRT-PCR und den kommerziellen *HLA-DQB1*-Primern, waren deutliche Unterschiede in den Ct-Werten vorhanden (Abbildung 3.20b). Für die Allele *DQB1*0602* und *DQB1*0301* existierten keine Basenaustausche im Bereich der Primerbindungsstellen, wodurch die Primer die besten Bindungseigenschaften zu ihrer Bindungsstelle aufwiesen. Dies spiegelt sich in den beobachteten niedrigen Ct-Werten wider. Dennoch war der Ct-Wert für Allel *DQB1*0301* etwas höher als für Allel *DQB1*0602*. Für Allel *DQB1*0302* war ein Basenaustausch an Position 9 von T nach C und an Position 19 von C nach T vorhanden. Dennoch waren die Ct-Werte für *DQB1*0302* gegenüber den Ct-Werten für Allel *DQB1*0301* nur leicht erhöht. Der Ct-Wert für Allel *DQB1*02XX* war deutlich am höchsten. Im Bereich des Vorwärtsprimers wurden für dieses Allel zwei Basenaustausche gefunden, einmal an Position 9 von T nach C und einmal an Position 12 von G nach A. Der Einfluss auf das Amplifikationsverhalten war in diesem Fall am deutlichsten.

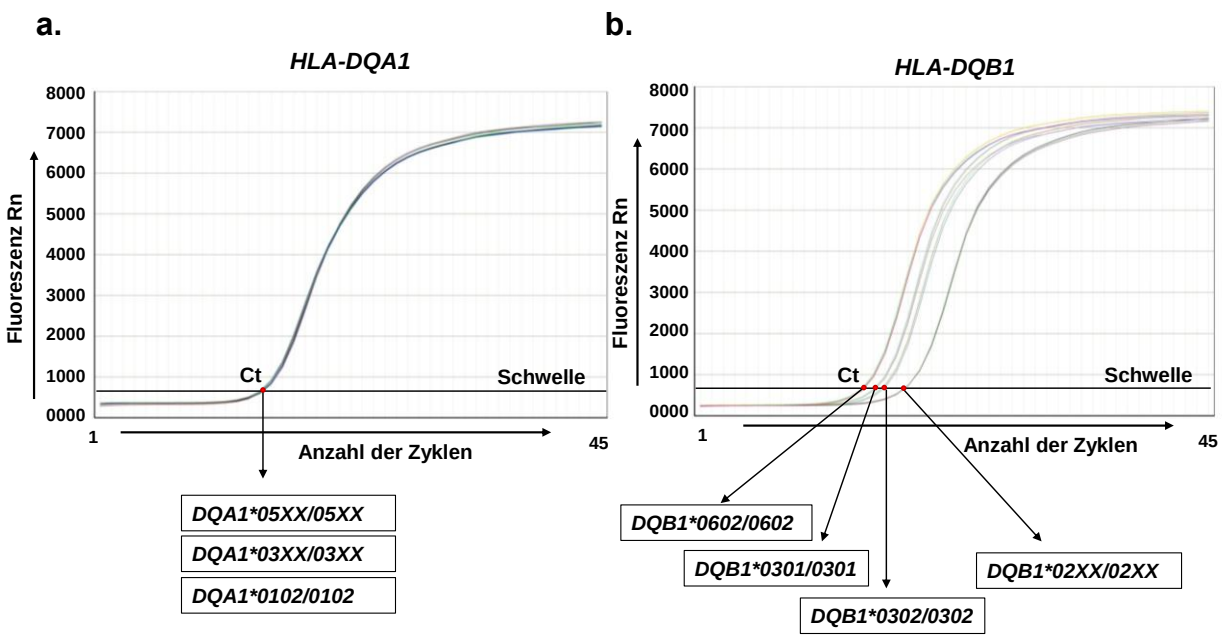


Abbildung 3.20: Darstellung der Kurvenverläufe bei Verwendung allelspezifischer Plasmide von *HLA-DQB1* und *HLA-DQA1* als *template* für die qRT-PCR. Auf der Ordinatenachse ist die Fluoreszenz aufgetragen, auf der Abszissenachse die Anzahl der Zyklen. **a:** Bei Verwendung allelspezifischer Plasmide von *HLA-DQA1* als *template* und kommerziellen HLA-*DQA1*-Primern, wurden identischen Ct-Werte gefunden. **b:** Die Ct-Werte waren bei Verwendung allelspezifischer Plasmide von *HLA-DQB1* als *template* und kommerziellen *HLA-DQB1*-Primern verschieden. Verwendete Abkürzungen: Ct: *cycle threshold*; HLA: humanes Leukozytenantigen; qRT-PCR *real-time*-quantitative-PCR; Rn: normalisierte Fluoreszenzwerte; XX: Bei einigen Probanden lagen keine weiteren Informationen über die spezifischen Allele vor. Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 (Vandiedonck und Knight, 2009) und der Tatsache, dass das verwendete Probandenkollektiv ausschließlich kaukasischen Ursprungs ist, konnte davon ausgegangen werden, dass sich spezifische Allele und Suballele innerhalb einer Risikogruppe mit gleichem HLA-Haplotyp nicht unterscheiden (*HLA-DQA1*03XX* entspricht *HLA-DQA1*0301*; *HLA-DQA1*05XX* entspricht *HLA-DQA1*0501*; *HLA-DQB1*02XX* entspricht *HLA-DQB1*0201*).

Aufgrund der hier erhaltenen Ergebnisse zur Spezifität kommerziell erworbener Primer für die Allele von *HLA-DQA1*, wurden die Primer von Qiagen für Expressionsanalysen am HLA-DQA1-Locus verwendet. Für Expressionsanalysen am HLA-DQB1-Locus wurden dagegen Primer erstellt, welche für die hier untersuchten Allele in nicht-polymorphen Bereichen lagen.

Für *HLA-DRB1* war es aufgrund dessen Polygenie nicht möglich, Primer in nicht-polymorphen Bereichen für die im Probandenkollektiv vorkommenden Allele zu generieren, welche ausschließlich *HLA-DRB1* und nicht auch dessen paraloge Gene *HLA-DRB3*, *HLA-DRB4* und *HLA-DRB5*, sowie dessen Pseudogene detektierten. Daher wurden in dieser Arbeit keine Untersuchungen zur Expression am HLA-DRB1-Locus durchgeführt.

3.4.2 Expressionsanalyse bestimmter HLA-Klasse-II-Gene und HLA-Klasse-II regulierender Faktoren bei verschiedenen HLA-Konstellationen und Stimuli

Auf Grundlage der Analysen zur Spezifität von Primern für die im Probandenkollektiv vorkommenden Allele von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1*, konnten für die Expressionsanalysen mittels qRT-PCR von *HLA-DQA1* die kommerziellen Primer der Firma Qiagen verwendet werden, wohingegen für *HLA-DQB1* selbst erstellte Primer eingesetzt wurden. Für die nicht-polymorphen Gene *HLA-DRA*, *RFX1* und *RFX5* wurden ebenfalls kommerzielle Primer der Firma Qiagen verwendet. Die Auswertung erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$-Methode. Dabei wurde zum einen die relative Expression der zu untersuchenden Gene in Bezug zur Expression der endogenen Kontrolle *RPL13A* bei unstimulierten Proben ermittelt. Des Weiteren wurde die Expression der stimulierten Proben in Relation zur Expression der unstimulierten Proben bestimmt.

Für den Vergleich der Expression von HLA-Klasse-II-Genen bzw. HLA-Klasse-II-regulierender Faktoren bei verschiedenen HLA-Konstellationen wurden, falls nicht anders erwähnt, 54 unstimulierte B-LCLs von Probanden verwendet, die verschiedene mit T1D assoziierte HLA-Konstellationen besitzen, welche zuvor in Risikogruppen eingeteilt wurden (Tabelle 3.4). Zusätzlich wurde die Expression nach Simulation eines inflammatorischen Milieus, verursacht durch PMA-Stimulation (Endkonzentration: 30 ng/ml für 6 h, bei allen 54 Proben) bzw. IFN-γ-Stimulation (Endkonzentration: 20 ng/ml für 24 h, bei 30 Proben), untersucht. Die geringere Anzahl an mit IFN-γ-stimulierten Proben resultiert daraus, dass bei der Auswertung der Expression der ersten 24 Proben zwischen den für 6 h und den für 24 h mit PMA-stimulierten Proben nur unwesentliche Unterschiede vorhanden waren (Ergebnisse nicht gezeigt). Daher wurde die 24-stündige PMA-Stimulation durch eine 24-stündige IFN-γ-Stimulation ersetzt. IFN-γ hat, laut bekannter Literatur, einen Einfluss auf die Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (Loh *et al.*, 1992; Giroux *et al.*, 2003).

Tabelle 3.4: Mit T1D assoziierte HLA-Konstellationen, welche zur Untersuchung differentieller Expressionsmuster verwendet wurden. Angegeben sind verschiedene mit T1D assoziierte HLA-Konstellationen und die für diese in der vorliegenden Arbeit verwendete Bezeichnung. Es wurden alle 54 Proben unbehandelt belassen und für 6 h mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) stimuliert. Die entsprechende Anzahl an Proben, die für 24 h mit IFN-γ (Endkonzentration: 20 ng/ml) stimuliert wurden, ist für jede HLA-Konstellation in der vierten Spalte von links angegeben. Verwendete Bezeichnungen und Abkürzungen: HLA-Haplotyp 1: *DRB1*0301-DQA1*05XX-DQB1*02XX*; HLA-Haplotyp 2: *DRB1*0401-DQA1*03XX-DQB1*0301* oder **0302*; HLA-Haplotyp 3: *DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602*. HLA: humanes Leukozytenantigen; IFN-γ: Interferon-gamma; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; T1D: Typ 1 Diabetes; XX: Bei einigen Probanden lagen keine weiteren Informationen über die spezifischen Allele vor. Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 (Vandiedonck und Knight, 2009) und der Tatsache, dass das verwendete Probandenkollektiv ausschließlich kaukasischen Ursprungs ist, konnte davon ausgegangen werden, dass sich spezifische Allele und Suballele innerhalb einer Risikogruppe mit gleichem HLA-Haplotyp nicht unterscheiden (*HLA-DQA1*03XX* entspricht *HLA-DQA1*0301*; *HLA-DQA1*05XX* entspricht *HLA-DQA1*0501*; *HLA-DQB1*02XX* entspricht *HLA-DQB1*0201*).

Risikogruppe	Bezeichnung	Proben (n)	IFN-γ-stimulierte Proben (n)	HLA-Haplotyp	*HLA-DRB1*	*HLA-DQA1*	*HLA-DQB1*	Anmerkung
1	höchstes Risiko	19	11	1	*0301*	*05XX*	*02XX*	
				2	*0401*	*03XX*	*0302*	
2	hohes Risiko	13	3	2	*0401*	*03XX*	*03YY*	YY = 01 oder 02
				2	*0401*	*03XX*	*03YY*	YY = 01 oder 02
3	mittleres Risiko	3	2	1	*0301*	*05XX*	*02XX*	
				1	*0301*	*05XX*	*02XX*	
4	geringes Risiko 1	8	5	2	*0401*	*03XX*	*03YY*	YY = 01 oder 02
				3	*1501*	*0102*	*0602*	
5	geringes Risiko 2	7	5	1	*0301*	*05XX*	*02XX*	
				3	*1501*	*0102*	*0602*	
6	geringes Risiko 3	4	4	3	*1501*	*0102*	*0602*	
				3	*1501*	*0102*	*0602*	

3.4.2.1 Untersuchung der Expression HLA-Klasse-II regulierender Faktoren bei verschiedenen HLA-Konstellationen

RFX1 und RFX5 sind Transkriptionsfaktoren, welche im Promotorbereich von HLA-Klasse-II-Genen binden und dadurch deren Transkription beeinflussen (Reith *et al.*, 1990). Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine differenzielle Expression von *RFX1* und *RFX5* bei verschiedenen HLA-Konstellationen vorhanden ist. Außerdem sollte der Einfluss eines inflammatorischen Milieus, induziert durch PMA bzw. IFN-γ, auf die Expression von *RFX1* und *RFX5* untersucht werden.

Die Expression von *RFX1* und *RFX5* war zwischen den einzelnen HLA-Konstellationen nicht signifikant verschieden (Kruskall-Wallis Test, Nachfolge Test: Dunn´s Test: n.s.: nicht signifikant).

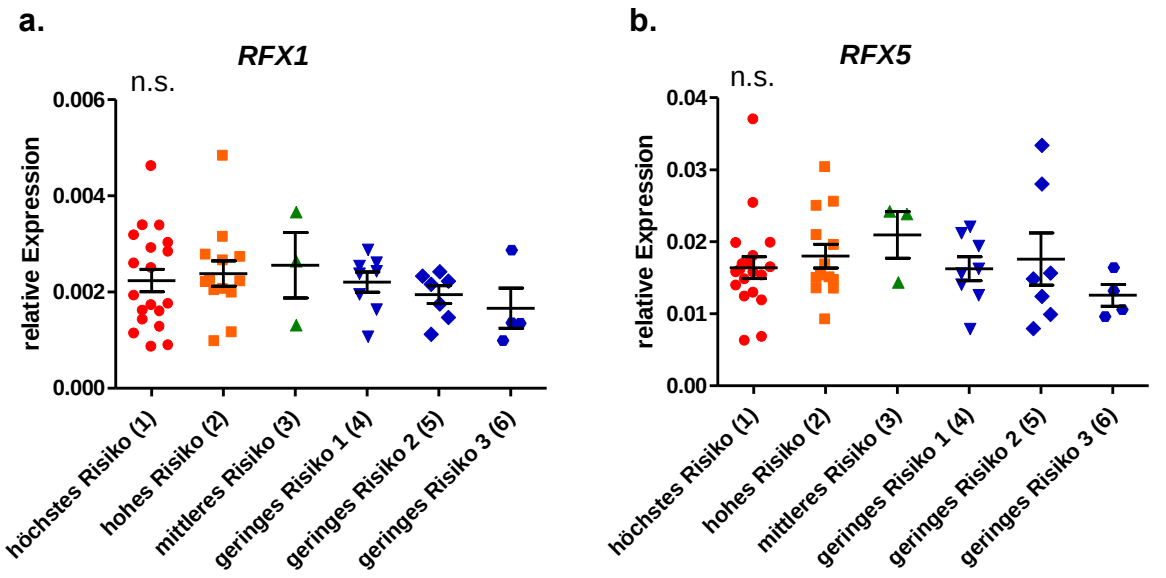


Abbildung 3.21: Expression von *RFX1* und *RFX5* bei verschiedenen HLA-Konstellationen (Risikogruppe 1 – 6). Es wurden 54 B-LCLs mit verschiedenen mit T1D assoziierten HLA-Konstellationen untersucht. Die Zahlen in den Klammern weisen auf die Gruppenzugehörigkeit der HLA-Konstellationen hin (Tabelle 3.4). Die relative Expression wurde in Bezug zur Expression von *RPL13A* ermittelt. **a + b:** Weder für *RFX1* noch für *RFX5* wurden signifikante Unterschiede in der Expression zwischen verschiedenen HLA-Konstellationen gefunden (Kruskall-Wallis Test, Nachfolge Test: Dunn´s Test; n.s.: nicht signifikant). Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; HLA: humanes Leukozytenantigen; T1D: Typ 1 Diabetes.

Für *RFX1* war nach PMA- bzw. IFN-γ-Stimulation für die meisten HLA-Konstellationen eine leichte Steigerung in der Expression vorhanden. Nach IFN-γ-Stimulation wurde für die HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko eine leichte Reduktion in der Expression beobachtet (Abbildung 3.22a). Für *RFX5* wurde, mit Ausnahme der HLA-Konstellation mit einem hohen Erkrankungsrisiko, sowohl nach PMA- als auch nach IFN-γ-Stimulation eine leichte Reduktion in der Expression gefunden (Abbildung 3.22b).

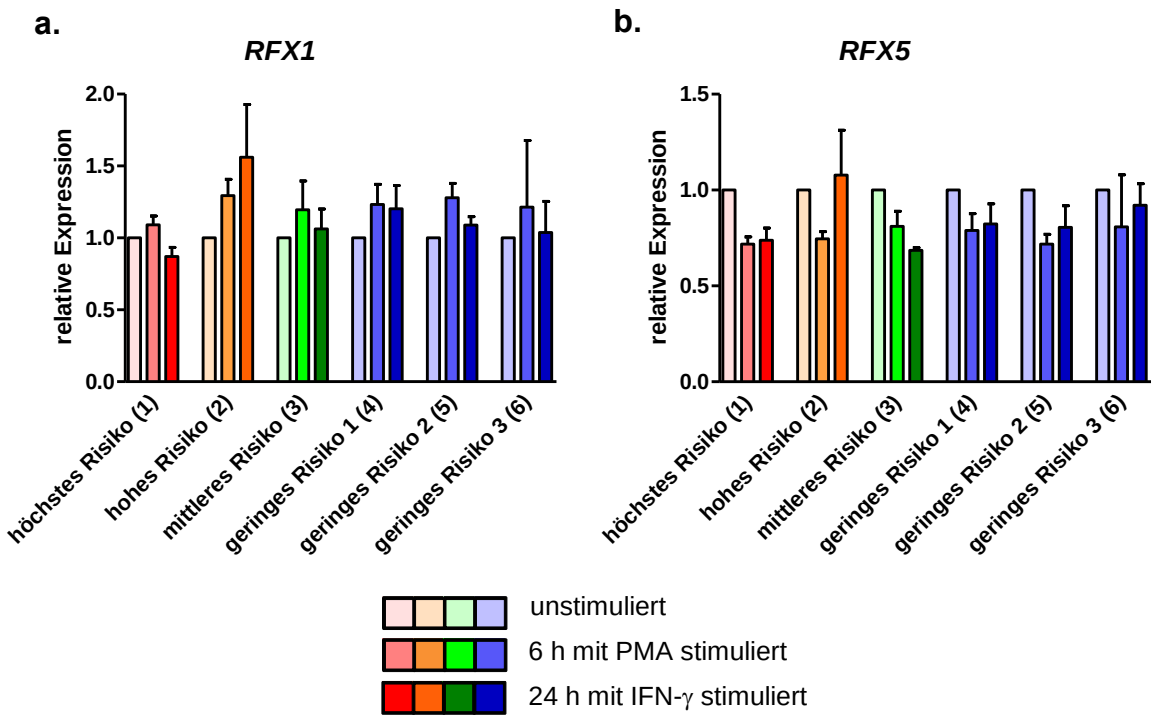


Abbildung 3.22: Expression von *RFX1* und *RFX5* nach 6-stündiger Stimulation mit PMA bzw. 24-stündiger Stimulation mit IFN-γ. Es wurden 54 B-LCLs mit verschiedenen mit T1D assoziierten HLA-Konstellationen untersucht. Die Zahlen in den Klammern weisen auf die Gruppenzugehörigkeit der HLA-Konstellationen hin (Tabelle 3.4). Die B-LCLs wurden entweder unstimuliert belassen oder für 6 h mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) oder für 24 h mit IFN-γ (Endkonzentration: 20 ng/ml) stimuliert. Die Expression der stimulierten Proben wurde in Relation zur Expression der unstimulierten Proben bestimmt. Die Expression der unstimulierten Proben wurde „1“ gesetzt. **a:** Für *RFX1* wurde für die meisten HLA-Konstellationen eine leichte Steigerung der Expression nach PMA- und IFN-γ-Stimulation gefunden. **b:** Die Expression von *RFX5* war für die meisten HLA-Konstellationen nach Stimulation mit PMA oder IFN-γ etwas geringer als bei unbehandelten Proben. Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; HLA: humanes Leukozytenantigen; IFN-γ: Interferon-gamma; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; T1D: Typ 1 Diabetes.

3.4.2.2 Untersuchung der Expression bestimmter HLA-Klasse-II-Gene

3.4.2.2.1 Expression von *HLA-DRA* bei verschiedenen HLA-Konstellationen

Die Expressionsanalyse des nicht-polymorphen Gens *HLA-DRA* sollte als Negativkontrolle dienen, da es nicht mit Autoimmunerkrankungen assoziiert ist und daher keine Expressionsunterschiede zwischen den Risiko-HLA-Konstellationen zu erwarten waren.

Die Expression von *HLA-DRA* war zwischen den einzelnen HLA-Konstellationen nicht signifikant verschieden, was den Erwartungen entsprach (Kruskall-Wallis Test, Nachfolge Test: Dunn´s Test: n.s.: nicht signifikant) (Abbildung 3.23a). Nach Stimulation mit PMA bzw. IFN-γ war die Expression von *HLA-DRA* für alle HLA-Konstellationen nur unwesentlich verändert. (Abbildung 3.23b).

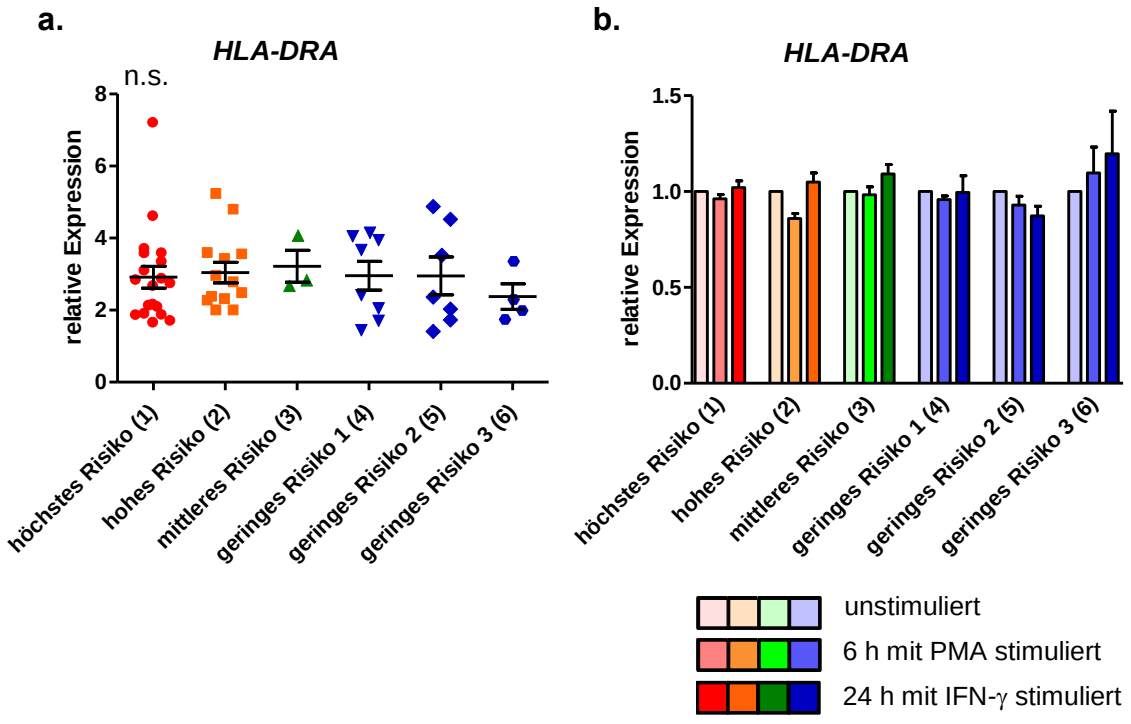


Abbildung 3.23: Expression von *HLA-DRA* bei verschiedenen HLA-Konstellationen (Risikogruppe 1 – 6) und nach Stimulation mit PMA bzw. IFN-γ. Es wurden 54 B-LCLs mit verschiedenen mit T1D assoziierten HLA-Konstellationen untersucht. Die Zahlen in den Klammern weisen auf die Gruppenzugehörigkeit der HLA-Konstellationen hin (Tabelle 3.4). **a:** Die relative Expression wurde in Bezug zur Expression von *RPL13A* ermittelt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Expression von *HLA-DRA* zwischen den einzelnen HLA-Konstellationen beobachtet (Kruskall-Wallis Test, Nachfolgetest: Dunn´s Test; n.s.: nicht signifikant). **b:** Die Expression der stimulierten Proben wurde in Relation zur Expression der unstimulierten Proben bestimmt. Die Expression der unstimulierten Proben wurde „1“ gesetzt. Nach 6-stündiger Stimulation mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) bzw. 24-stündiger Stimulation mit IFN-γ (Endkonzentration: 20 ng/ml)

waren keine Unterschiede in der Expression von *HLA-DRA* vorhanden. Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; HLA: humanes Leukozytenantigen; IFN-γ: Interferon-gamma; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; T1D: Typ 1 Diabetes.

3.4.2.2.2 Expression von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* bei verschiedenen HLA-Konstellationen

Wegen der starken Assoziation bestimmter HLA-Klasse-II-Gene mit T1D, wurde die Expression von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* bei unterschiedlichen HLA-Konstellationen untersucht.

Die Expression von *HLA-DQA1* war bei den HLA-Konstellationen mit dem höchsten, hohen und mittleren Erkrankungsrisiko (Gruppe 1, 2 und 3) höher als bei den HLA-Konstellationen mit einem geringen Erkrankungsrisiko (Gruppe 4 – 6). Bei der homozygoten, protektiven HLA-Konstellation (geringes Risiko 3 (Gruppe 6)), war die Expression von *HLA-DQA1* signifikant geringer als bei den drei HLA-Konstellationen höchstes Risiko (Gruppe 1), hohes Risiko (Gruppe 2) und mittleres Risiko (Gruppe 3). (Kruskall-Wallis Test, Nachfolgetest: Dunn´s Test; ** $p \leq 0{,}01$) (Abbildung 3.24a).

Für *HLA-DQB1* wurde bei der HLA-Konstellation mit einem geringen Risiko 2 (Gruppe 5) eine Probe (P 53) nicht dargestellt. Der Grund dafür ist, dass *HLA-DRB1*1501-DQA1*0102* nicht wie vorwiegend mit *DQB1*0602*, sondern mit *DQB1*0501* gekoppelt vorliegt (Tabelle 2.2). Für dieses Allel wurde der Primerbindungsbereich jedoch nicht untersucht. Da Polymorphismen in diesem Bereich vorkommen können, wurde diese Probe für die Untersuchung der Expression von *HLA-DQB1* nicht einbezogen.

Bei den Risiko-HLA-Konstellationen höchstes Risiko (Gruppe 1) und hohes Risiko (Gruppe 2), der HLA-Konstellation mit einem mittleren Erkrankungsrisiko (Gruppe 3) und der HLA-Konstellation mit einem geringen Risiko 2 (Gruppe 5) wurde *HLA-DQB1* weniger stark exprimiert, als bei den beiden protektiven HLA-Konstellationen geringes Risiko 1 (Gruppe 4) und geringes Risiko 3 (Gruppe 6) (Kruskall-Wallis Test, Nachfolgetest: Dunn´s Test; * $p \leq 0{,}05$; ** $p \leq 0{,}01$) (Abbildung 3.24b).

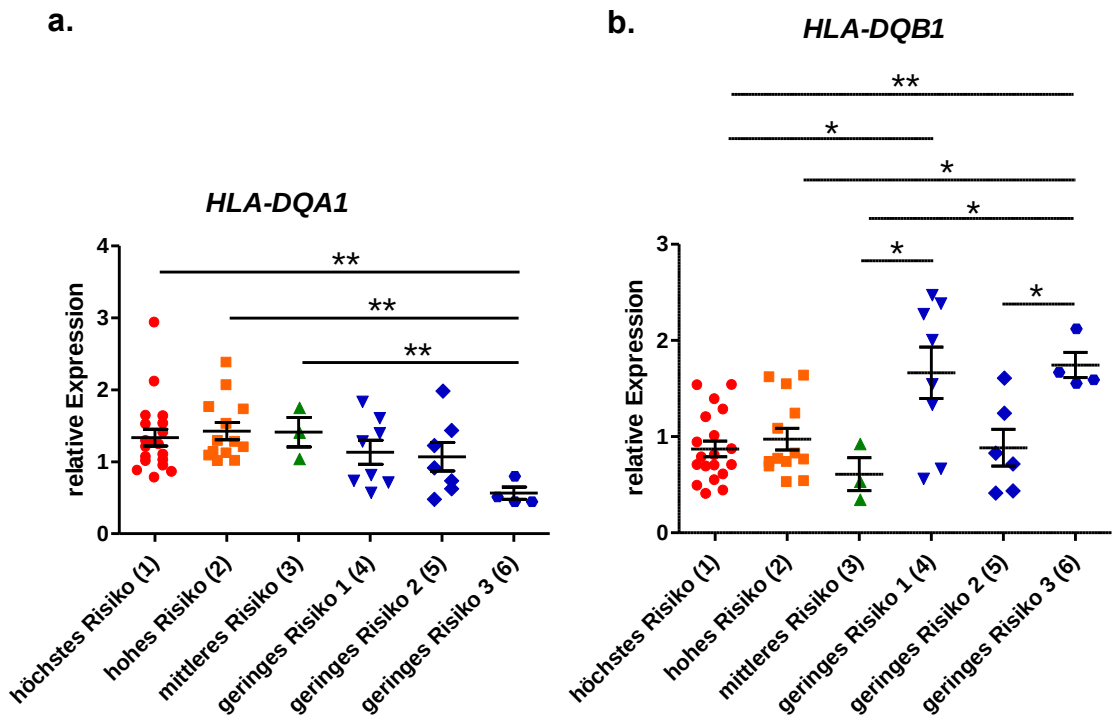


Abbildung 3.24: Expression von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* bei verschiedenen HLA-Konstellationen (Risikogruppe 1 – 6). Es wurden für *HLA-DQA1* 54 und für *HLA-DQB1* 53 B-LCLs mit verschiedenen mit T1D assoziierten HLA-Konstellationen untersucht. Die Zahlen in den Klammern weisen auf die Gruppenzugehörigkeit der HLA-Konstellationen hin (Tabelle 3.4). Die relative Expression wurde in Bezug zur Expression von *RPL13A* ermittelt. **a:** Für *HLA-DQA1* war die Expression zwischen drei HLA-Konstellationen (Gruppe 1, 2 und 3) und der HLA-Konstellation geringes Risiko 3 (Gruppe 6) signifikant reduziert (Kruskall-Wallis Test; Nachfolgetest: Dunn´s Test: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$). **b:** *HLA-DQB1* wurde bei zwei protektive HLA-Konstellationen (Gruppe 4 und 6) im Vergleich zu den übrigen HLA-Konstellationen signifikant höher exprimiert (Kruskall-Wallis Test, Nachfolgetest: Dunn´s Test: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$). Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; HLA: humanes Leukozytenantigen; T1D: Typ 1 Diabetes.

Diese differentielle Expression von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* bei verschiedenen HLA-Konstellationen sollte im Folgenden näher untersucht werden. Dabei wurde der Fokus auf die differentielle Expression bestimmter Allele innerhalb heterozygoter Individuen gelegt (Abschnitt 3.4.3).

Mit Ausnahme der HLA-Konstellation mit einem hohen Erkrankungsrisiko (Gruppe 2) war nach PMA-Stimulation eine geringe Steigerung in der Expression von *HLA-DQA1* zu erkennen. Nach IFN-γ-Stimulation nahm die Expression, mit Ausnahme der HLA-Konstellation für geringes Risiko 2 (Gruppe 5), ebenfalls geringfügig zu (Abbildung 3.25a).

Die Expression von *HLA-DQB1* war für alle HLA-Konstellationen nach PMA-Stimulation leicht erhöht, wohingegen sie nach IFN-γ-Stimulation deutlich reduziert war. Eine Ausnahme stellt hier die HLA-Konstellation mit einem hohen Erkrankungsrisiko (Gruppe 2) dar (Abbildung 3.25b).

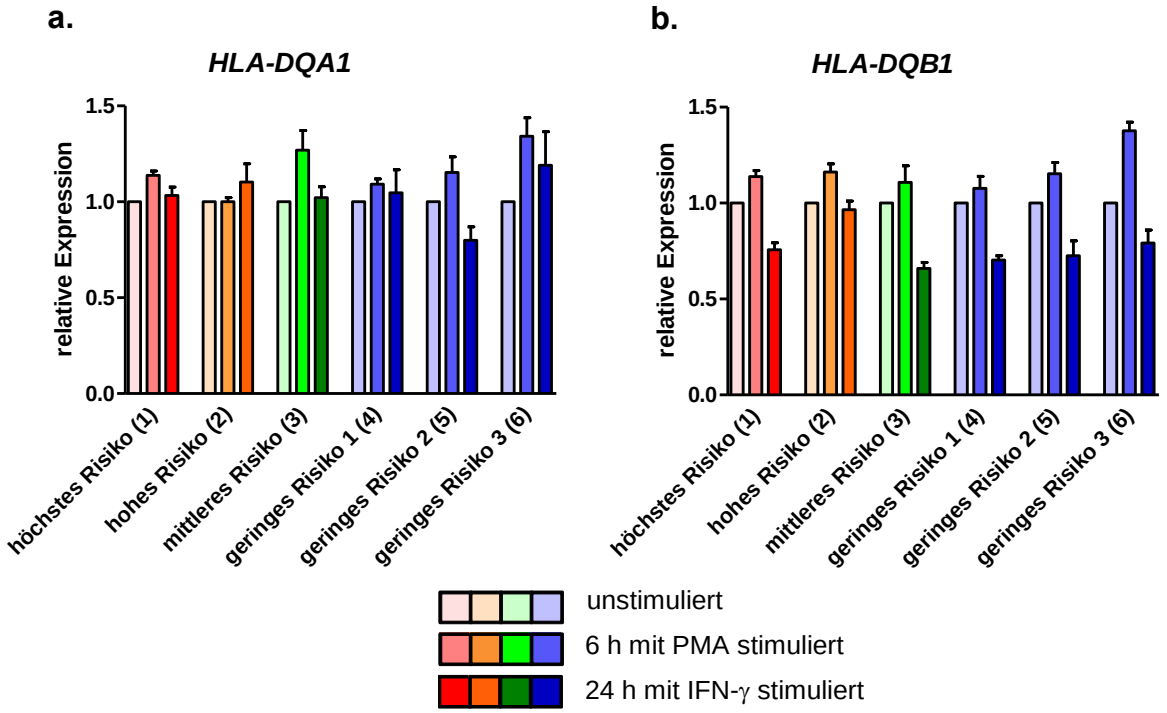


Abbildung 3.25: Expression von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* nach 6-stündiger Stimulation mit PMA bzw. 24-stündiger Stimulation mit IFN-γ. Es wurden für *HLA-DQA1* 54 und für *HLA-DQB1* 53 B-LCLs mit verschiedenen mit T1D assoziierten HLA-Konstellationen untersucht. Die Zahlen in den Klammern weisen auf die Gruppenzugehörigkeit der HLA-Konstellationen hin (Tabelle 3.4). Die B-LCLs wurden entweder unstimuliert belassen oder für 6 h mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) oder für 24 h mit IFN-γ (Endkonzentration: 20 ng/ml) stimuliert. Die Expression der stimulierten Proben wurde in Relation zur Expression der unstimulierten Proben bestimmt. Die Expression der unstimulierten Proben wurde „1“ gesetzt. **a:** Für *HLA-DQA1* wurde eine leichte Steigerung der Expression nach PMA-Stimulation gefunden. **b:** Im Vergleich zu unbehandelten Proben war die Expression von *HLA-DQB1* bei PMA stimulierten Proben leicht erhöht und nach IFN-γ-Stimulation deutlich reduziert. Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; HLA: humanes Leukozytenantigen; IFN-γ: Interferon-gamma; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; T1D: Typ 1 Diabetes.

3.4.2.3 Korrelation der Expression von *RFX1* und *RFX5* mit der Expression bestimmter HLA-Klasse-II-Gene

Die Expression von *RFX1* korrelierte leicht mit der Expression von *HLA-DQA1* (Spearman r = 0,3510, p = 0,0093), wohingegen zwischen der Expression von *RFX1* und *HLA-DRA* keine signifikante Korrelation gefunden wurde (Spearman r = 0,1743, p = 0,2074) (Abbildung 3.26a und b). Ebenso wurde für die Expression von *RFX1* bzw. *RFX5* und *HLA-DQB1* keine Korrelation beobachtet (Abbildung 7.9; Anhang). Dagegen konnte eine stark positive Korrelation zwischen der Expression von *RFX5* und *HLA-DQA1* bzw. *HLA-DRA* gefunden werden (Spearman r = 0,6308, p ≤ 0,0001 bzw. 0,5161, p ≤ 0,0001) (Abbildung 3.26c und d).

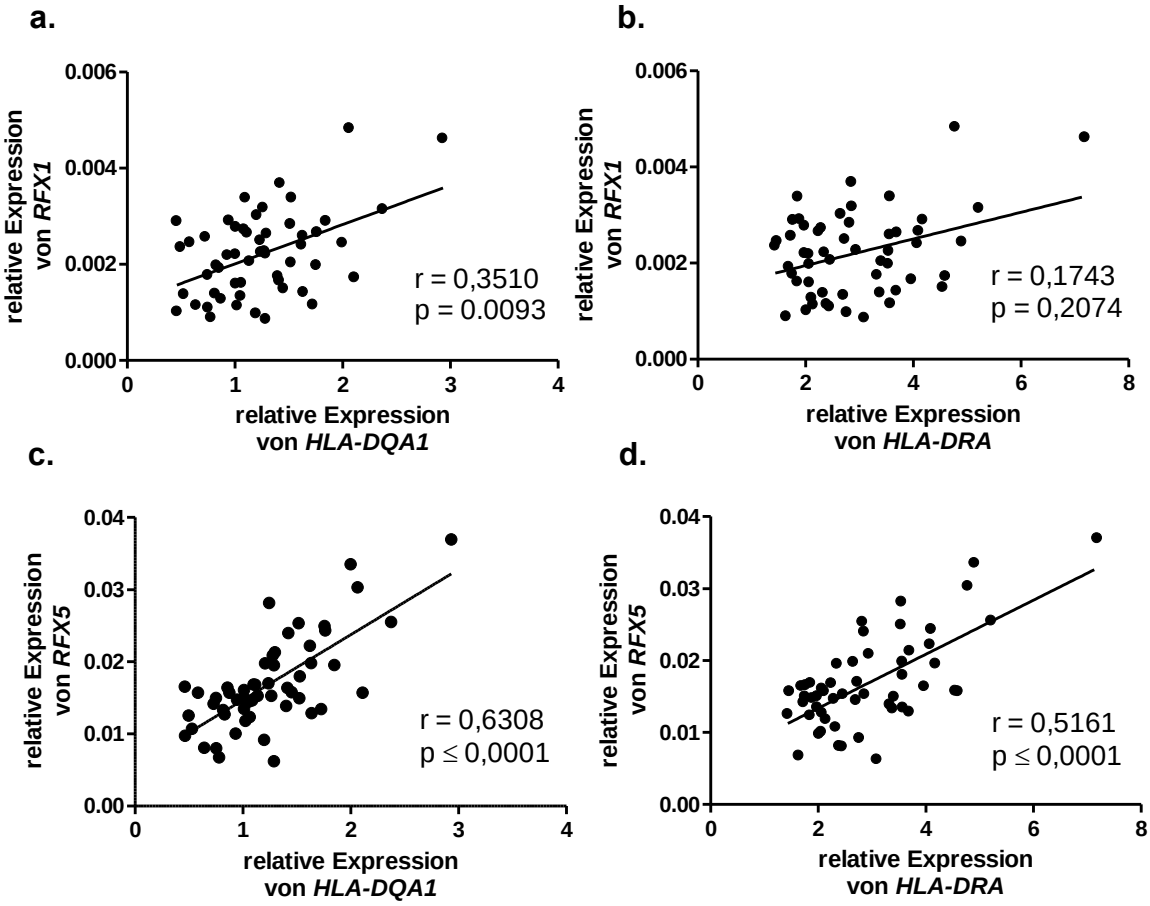


Abbildung 3.26: Korrelation zwischen der Expression von *RFX1* bzw. *RFX5* und der Expression von *HLA-DRA* bzw. *HLA-DQA1*. a + b: Zwischen *RFX1* und *HLA-DQA1* bzw. *HLA-DRA* war eine geringe bzw. keine Korrelation zu beobachten (Spearman r = 0,3510, p = 0,0093 bzw. r = 0,1743, p = 0,2074). **c + d:** Dagegen war zwischen *RFX5* und *HLA-DQA1* bzw. *HLA-DRA* eine starke Korrelation vorhanden (Spearman r = 0,6308, p ≤ 0,0001 bzw. r = 0,5161, p ≤ 0,0001). Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; HLA: humanes Leukozytenantigen.

3.4.3 Expression protektiver und prädisponierender Allele von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* bei heterozygoten Individuen

Aufgrund der differentiellen Expressionsmuster von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* bei verschiedenen HLA-Konstellationen (Abbildung 3.24a und b) wurde die Expression bestimmter Allele von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* mit Hilfe der RNA-Seq analysiert. Diese Technik basiert auf einer Hochdurchsatzmethode des *Next Generation Sequencing*. Für die Durchführung der Sequenzierung wurde der RNA-Seq-Service von Otogenetics in Anspruch genommen. Die Sequenzierung wurde mit dem Genome Analyzer von Illumina durchgeführt.

Wie schon für die Expressionsanalyse mittels qRT-PCR wurden auch mittels RNA-Seq keine Untersuchungen am DRB1-Locus durchgeführt, da es aufgrund dessen Polygenie nicht möglich war, Sequenzabschnitte zu identifizieren, welche ausschließlich *HLA-DRB1* und nicht auch dessen paraloge Gene *HLA-DRB3*, *HLA-DRB4* und *HLA-DRB5*, sowie dessen Pseudogene detektierten.

Für die Gene *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* wurden zunächst unter Verwendung des Referenzgenoms GRCh37/hg19 der Datenbanken von NCBI und UCSC, in welche die Sequenzen der sieben alternativen Haplotypen des *MHC Haplotype Projects* integriert sind (Horton *et al.*, 2008), aus den konstanten Regionen dieser beiden Gene kurze Sequenzen ausgewählt, welche keine Polymorphismen zwischen den untersuchten Allelen aufwiesen. Des Weiteren wurden Sequenzen aus den variablen Regionen gewählt, die zwischen den untersuchten Allelen unterschiedlich waren (Tabelle 2.11). Bei der Auswahl der Sequenzen wurde darauf geachtet, dass diese einmalig im Genom vorkommen. Zur Analyse der RNA-Seq-Daten wurde ein „*perfect match*“-Alignment der konstanten und allelspezifischen Sequenzen zu den RNA-Seq-*reads* durchgeführt. Dabei wurden *mismatches* ausgeschlossen. Für die Auswertung wurde die Anzahl an Übereinstimmungen (*counts*) zwischen RNA-Seq-*reads* und ausgewählten Sequenzen bestimmt (Tabelle 7.5). Für jedes Allel wurde die Expression der allelspezifischen Region relativ zur Expression der konstanten Region ermittelt. Dafür wurde jeweils die Anzahl an *counts* der allelspezifischen Region durch die Anzahl an *counts* der konstanten Region dividiert. Die Expression der konstanten Region wurde dabei „1“ gesetzt. Es wurden die generierten B-LCLs von 18 heterozygoten Individuen mit insgesamt fünf unterschiedlichen HLA-Konstellationen untersucht. Da für die

Risikogruppe „geringes Risiko 1“ für *HLA-DQB1* zwei HLA-Konstellationen vorlagen (*DQB1*0302/*0602* und *DQB1*0301/*0602*), wurden diese mit „geringes Risiko 1a“ und „geringes Risiko 1b“ bezeichnet (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: HLA-Konstellationen von Probanden, die für die RNA-Seq-Analyse verwendet wurden. Zur allelspezifischen Expressionsanalyse wurde für die Gruppe mit dem höchsten Erkrankungsrisiko für das Gen *HLA-DQA1* die Expression von Allel 1 (*DQA1*05XX*) mit der Expression von Allel 2 (*DQA1*03XX*) verglichen. Für das Gen *HLA-DQB1* wurde dem entsprechend die Expression von Allel 1 (*DQB1*02XX*) mit der Expression von Allel 2 (*DQB1*0302*) verglichen. Analog erfolgte die allelspezifische Expressionsanalyse für die anderen HLA-Konstellationen. Verwendete Abkürzungen: HLA: humanes Leukozytenantigen; RNA-Seq: Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung; XX: Bei einigen Probanden lagen keine weiteren Informationen über die spezifischen Allele vor. Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 (Vandiedonck und Knight, 2009) und der Tatsache, dass das verwendete Probandenkollektiv ausschließlich kaukasischen Ursprungs ist, konnte davon ausgegangen werden, dass sich spezifische Allele und Suballele innerhalb einer Risikogruppe mit gleichem HLA-Haplotyp nicht unterscheiden (*HLA-DQA1*03XX* entspricht *HLA-DQA1*0301*; *HLA-DQA1*05XX* entspricht *HLA-DQA1*0501*; *HLA-DQB1*02XX* entspricht *HLA-DQB1*0201*).

HLA-DQA1		***HLA-DQB1***		**Bezeichnung**	**Probanden (n)**
Allel 1	**Allel 2**	**Allel 1**	**Allel 2**		
05XX	*03XX*	*02XX*	*0302*	höchstes Risiko	10
03XX	*03XX*	*0301*	*0302*	hohes Risiko	3
03XX	*0102*	*0302 / 0301*	*0602*	geringes Risiko 1a / b	2 / 1
05XX	*0102*	*02XX*	*0602*	geringes Risiko 2	2

3.4.3.1 Allelspezifische Expressionsunterschiede am HLA-DQA1-Locus

Für die Allele von *HLA-DQA1* waren bei allen untersuchten HLA-Konstellationen leichte Expressionsunterschiede vorhanden. Bei der HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko war bei acht von zehn Probanden das Allel *DQA1*03XX* stärker exprimiert als das Allel *DQA1*05XX* (0,41-fach ± 0,055 vs. 0,305-fach ± 0,05) (Abbildung 3.27a und Tabelle 7.3; Anhang). Bei den beiden HLA-Konstellationen mit einem geringen Erkrankungsrisiko (geringes Risiko 1 und 2) war das protektive Allel *DQA1*0102* stets etwas schwächer exprimiert, als die prädisponierenden Allele *DQA1*03XX* und *DQA1*05XX*. (0,35-fach ± 0,007 vs. 0,42-fach ± 0,03 bzw. 0,3-fach ± 0,05 vs. 0,39-fach ± 0,007) (Abbildung 3.27b und c und Tabelle 7.3; Anhang). Da für die HLA-Konstellation mit einem hohen Risiko die Allele homozygot vorliegen (*DQA1*03XX/DQA1*03XX*), war eine Untersuchung allelspezifischer Expressionsunterschiede nicht möglich.

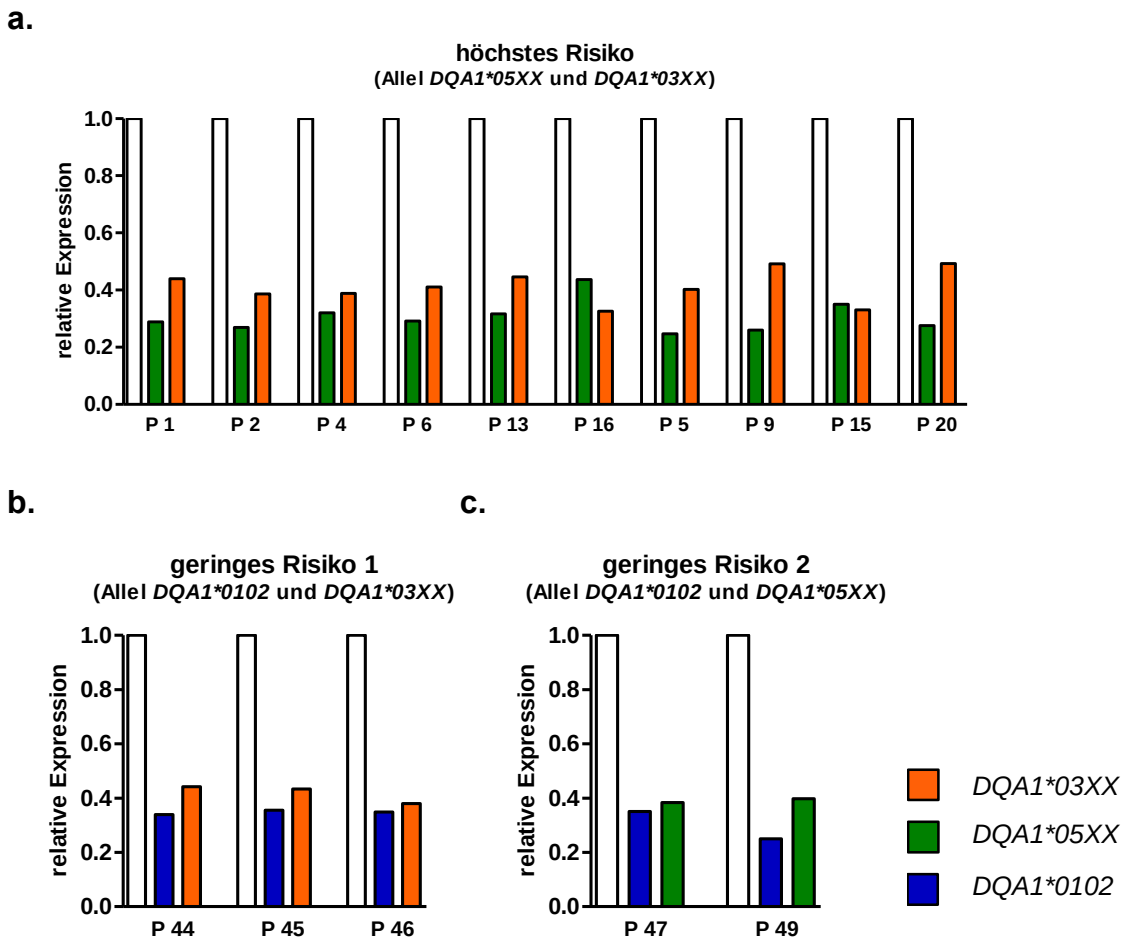


Abbildung 3.27: Relative Expression bestimmter Allele von *HLA-DQA1* bei heterozygoten Individuen mit verschiedenen HLA-Konstellationen. Es wurde die allelspezifische Expression von B-LCLs heterozygoter Individuen mittels RNA-Seq untersucht. Dargestellt ist die relative Expression unterschiedlicher Allele, welche zum einen mit T1D assoziiert (*DQA1*03XX* und *DQA1*05XX*) und zum anderen protektiv (*DQA1*0102*) sind. Die relative Expression der Allele wurde in Bezug zur Expression der konstanten Region ermittelt. Die Expression der konstanten Region wurde „1“ gesetzt (weiße Balken). **a:** Bei acht von zehn Probanden war Allel *DQA1*03XX* stärker exprimiert als Allel *DQA1*05XX*. **b + c:** Das protektive Allel *DQA1*0102* war sowohl in Kombination mit Allel *DQA1*03XX* als auch in Kombination mit Allel *DQA1*05XX* leicht reduziert exprimiert. Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; HLA: humanes Leukozytenantigen; P: Probanden-ID; RNA-Seq: Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung; T1D: Typ 1 Diabetes; XX: Bei einigen Probanden lagen keine weiteren Informationen über die spezifischen Allele vor. Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 (Vandiedonck und Knight, 2009) und der Tatsache, dass das verwendete Probandenkollektiv ausschließlich kaukasischen Ursprungs ist, konnte davon ausgegangen werden, dass sich spezifische Allele und Suballele innerhalb einer Risikogruppe mit gleichem HLA-Haplotyp nicht unterscheiden (*HLA-DQA1*03XX* entspricht *HLA-DQA1*0301*; *HLA-DQA1*05XX* entspricht *HLA-DQA1*0501*).

3.4.3.2 Allelspezifische Expressionsunterschiede am HLA-DQB1-Locus

Beim Vergleich der Expression der beiden prädisponierenden Allele der HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko wurde bei drei Probanden (P 2, P 4, P 13) keine differentielle Allelexpression gefunden. Bei vier Probanden (P 5, P 9, P 15, P16) war Allel *DQB1*02XX* etwas stärker exprimiert als Allel *DQB1*0302*, wohingegen bei drei Probanden (P 1, P 6, P 20) Allel *DQB1*0302* etwas stärker exprimiert war als Allel *DQB1*02XX* (Abbildung 3.28a).

Für die HLA-Konstellation mit einem hohen Risiko existieren homozygote (*DQB1*0302/DQB1*0302* oder *DQB1*0301/DQB1*0301*) und heterozygote (*DQB1*0301/DQB1*0302*) Formen. Da für die homozygoten Formen keine Untersuchung allelspezifischer Expressionsunterschiede möglich war, wurden nur die heterozygoten Probanden analysiert. Beim Vergleich der Allele *DQB1*0301* und *DQB1*0302* wurde das als protektiv geltende Allel *DQB1*0301* fast zweifach stärker exprimiert als das mit T1D stark positiv assoziierte Allel *DQB1*0302* (0,43-fach ± 0,05 vs. 0,22-fach ± 0,03) (Abbildung 3.28b und Tabelle 7.4; Anhang).

Beim Vergleich der Expression protektiver und prädisponierender Allele bei Individuen mit einem geringen Erkrankungsrisiko wurde eine deutlich differentielle Expression beobachtet. Überraschenderweise war das protektive Allel *DQB1*0602* in Kombination mit den Allelen *DQB1*0302* (geringes Risiko 1a) und *DQB1*02XX* (geringes Risiko 2) nur etwa halb so stark exprimiert wie diese (0,3-fach ± 0,05 vs. 0,56-fach ± 0,004 bzw. 0,33-fach ± 0,02 vs. 0,55-fach ± 0,06) (Abbildung 3.28c und e und Tabelle 7.4; Anhang). In Kombination mit dem Allel *DQB1*0301* (geringes Risiko 1b) war die Expression von *DQB1*0602* am deutlichsten reduziert (0,76-fach vs. 0,21-fach). (Abbildung 3.28d und Tabelle 7.4; Anhang).

Je nach HLA-Konstellation war die relative Expression des Allels *DQB1*0302* im Verhältnis zur konstanten Region unterschiedlich. In Kombination mit Allel *DQB1*0301* lag die relative Expression von *DQB1*0302* bei nur etwa 0,2, wohingegen sie in Kombination mit dem Allel *DQB1*0602* bei fast 0,6 lag (Abbildung 3.28b und c). In Kombination mit Allel *DQB1*02XX* wurde eine relative Expression des Allels *DQB1*0302* von etwa 0,4 beobachtet (Abbildung 3.28a).

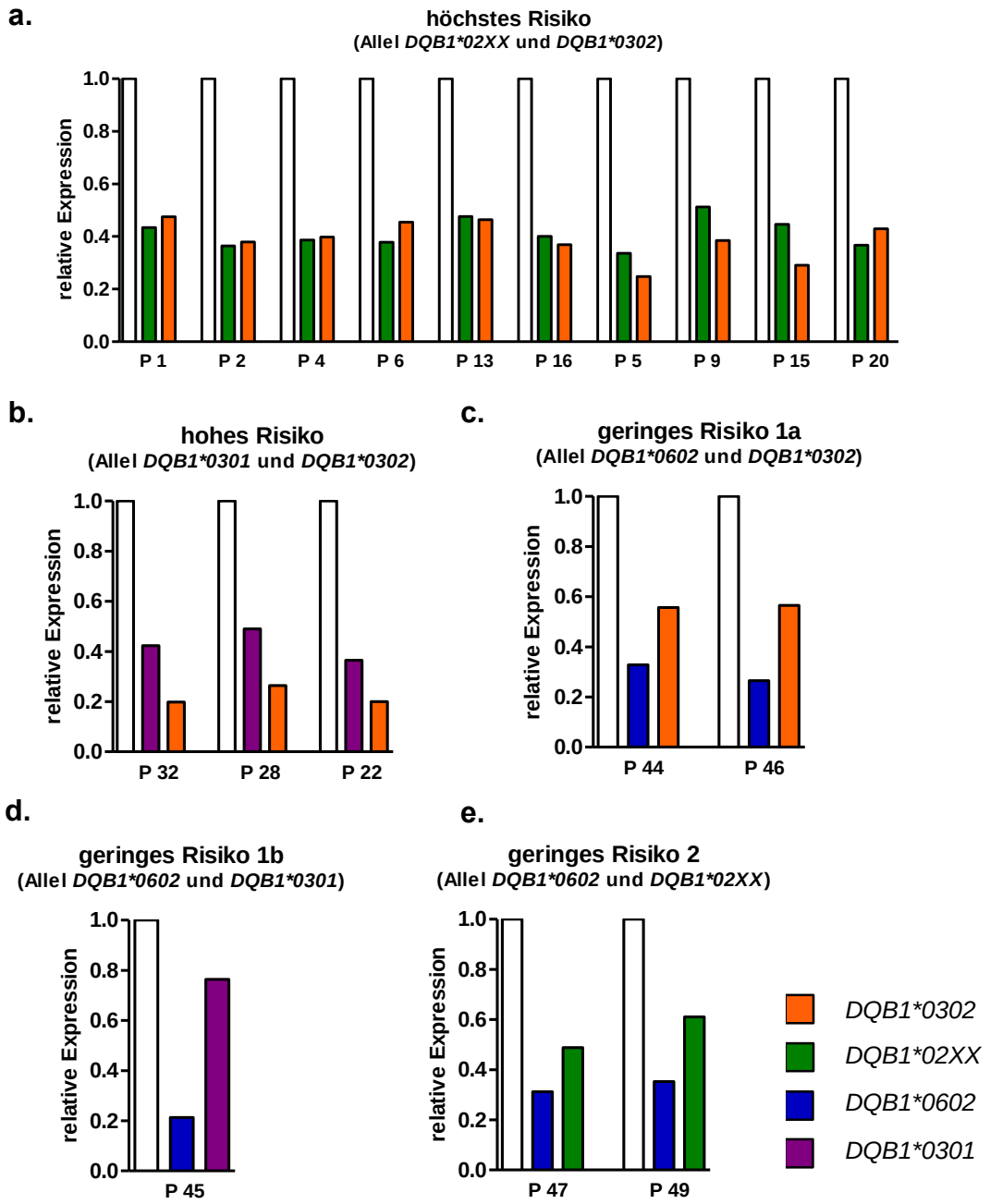


Abbildung 3.28: Relative Expression bestimmter Allele von *HLA-DQB1* bei heterozygoten Individuen mit verschiedenen HLA-Konstellationen. Es wurde die allelspezifische Expression von B-LCLs heterozygoter Individuen mittels RNA-Seq untersucht. Dargestellt ist die relative Expression unterschiedlicher Allele, welche zum einen mit T1D assoziiert (*DQB1*0302* und **02XX*) und zum anderen protektiv (*DQB1*0602* und *DQB1*0301*) sind. Die relative Expression der Allele wurde in Bezug zur Expression der konstanten Region ermittelt. Die Expression der konstanten Region wurde „1“ gesetzt (weiße Balken). **a:** Bei drei Probanden war Allel *DQB1*03XX* stärker exprimiert als Allel *DQB1*02XX*, wohingegen bei vier Probanden das Allel *DQB1*02XX* stärker exprimiert war. Bei drei weiteren Probanden wurde keine differentielle Allelexpression beobachtet. **b:** Das als protektiv geltende Allel *DQB1*0301* war etwa doppelt so stark exprimiert wie das prädisponierende Allel *DQB1*0302*. **c** – **e:** Das protektive Allel *DQB1*0602* war in Kombination mit den Allelen *DQB1*0302*, *DQB1*0301* und *DQB1*02XX* deutlich reduziert exprimiert. Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; HLA: humanes Leukozytenantigen; P: Probanden-ID; RNA-Seq: Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung; T1D: Typ 1 Diabetes; XX: Bei einigen Probanden lagen keine weiteren Informationen über die spezifischen Allele vor.

Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 (Vandiedonck und Knight, 2009) und der Tatsache, dass das verwendete Probandenkollektiv ausschließlich kaukasischen Ursprungs ist, konnte davon ausgegangen werden, dass sich spezifische Allele und Suballele innerhalb einer Risikogruppe mit gleichem HLA-Haplotyp nicht (*HLA-DQB1*02XX* entspricht *HLA-DQB1*0201*).

3.5 Untersuchungen zu miRNA-Expressionsunterschieden im Kontext verschiedener HLA-Konstellationen und des Stimulus

Etwa 30 – 80% aller proteinkodierenden Gene in höheren Eukaryoten werden von miRNAs reguliert (Zhang und Farwell, 2008; Lu und Clark, 2012). Auch eine Beteiligung dieser regulatorischen RNAs an der differentiellen Expression von HLA-Klasse-II-Genen bei verschiedenen HLA-Konstellationen bzw. prädisponierender und protektiver Allele von HLA-Klasse-II-Genen, wie sie in Abschnitt 3.4.2.2.2 und 3.4.3 gefunden wurden, ist denkbar. Daher wurden in diesem Teil der Arbeit die miRNA-Expressionsprofile von verschiedenen mit T1D assoziierten HLA-Konstellationen mittels Microarrays analysiert. Die Gruppe mit dem höchsten Risiko an T1D zu erkranken diente dabei als Referenz. Zusätzlich wurde nach miRNAs geschaut, die zwischen unstimulierten und mit PMA bzw. IFN-γ-stimulierten Proben unterschiedlich exprimiert waren. Hierbei dienten jeweils die unstimulierten Proben als Referenz.

Für die Microarray-Analyse wurde Gesamt-RNA inklusive miRNA, die zuvor mit dem *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen) isoliert wurde, von 48 Einzelproben verwendet. Zunächst wurden die Proben, nach HLA-Konstellation und Stimulus sortiert, in 16 Pools (Pool A – Pool P) eingeteilt (Tabelle 7.10; Anhang). Jeder Pool bestand aus der RNA dreier Proben mit identischen HLA-Konstellationen und identischen Stimulationen (unstimuliert, 6 h mit PMA stimuliert oder 24 h mit IFN-γ stimuliert) (Abbildung 2.7). Anschließend wurde für jeden Pool die Expression von 1347 reifen miRNAs, darunter 1205 humanen miRNAs untersucht. Im Microarray differentiell exprimierte humane miRNAs wurden im Anschluss mittels qRT-PCR validiert. Die Auswertung der Expressionsdaten erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$-Methode. Als endogene Kontrolle wurde *SNORD72*, eine kleine nukleoläre Ribonukleinsäure, verwendet.

Interpretation der Microarray-Daten

Um die differentielle Expression zwischen den jeweiligen Referenzpools und den Probenpools im Microarray richtig einschätzen zu können, war die Berücksichtigung der sogenannten *light unit* (LU) essentiell. Zur Analyse der Expressionssignale teilt ein Laser die Intensitäten der Fluoreszenzsignale in LUs ein. Eine LU zwischen 1 und 10 deutet auf ein schwaches Signal und somit auf eine schwach exprimierte miRNA hin. Je größer die LU ist, umso stärker wird die entsprechende miRNA exprimiert. Ist keine Expression nachweisbar, wird die LU mit 0,1 angegeben. Wird die Ratio (= Verhältnis der Expressionen) zwischen einem Pool, welcher die betreffende miRNA exprimiert (LU ≥ 1) und einem Pool, bei dem dieselbe miRNA nicht detektiert werden konnte (LU = 0,1) gebildet, ergibt sich entweder ein sehr großer Ratio-Wert (wenn Referenzpool = 0,1 und Probenpool ≥ 1) oder ein sehr kleiner Ratio-Wert (wenn Referenzpool ≥ 1 und Probenpool = 0,1). Dies suggeriert zunächst eine hoch differentielle miRNA-Expression zwischen Referenzpool und Probenpool, die jedoch lediglich aus dem Fehlen des Fluoreszenzsignals durch eine nicht detektierbare miRNA in einem der beiden Pools resultiert. Bei der Interpretation der Ergebnisse musste die Signalintensität daher stets berücksichtigt werden. Daher wurden in dieser Arbeit für die Validierung der durch die Microarray-Analyse erhaltenen Ergebnisse lediglich miRNAs herangezogen, deren LUs bei allen zu untersuchenden Pools ≥ 1 war.

3.5.1 Differentiell exprimierte miRNAs in Abhängigkeit von der HLA-Konstellation

Es sollten zunächst miRNAs gefunden werden, welche anhand der Microarray-Analyse zwischen Referenzpool (HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko) und den Probenpools (HLA-Konstellationen mit geringerem Erkrankungsrisiko) unterschiedlich exprimiert waren. Dabei wurde als signifikant gewertet, wenn die miRNA-Expression zwischen Referenzpool und den anderen Probenpools entweder um Faktor ≥ 2 oder ≤ 0,5 verändert war. Diese unterschiedliche Expression sollte anschließend mittels qRT-PCR verifiziert werden. Es wurden diejenigen miRNAs ausgewählt, die einen signifikanten Unterschied in der Expression zwischen Referenzpool (Pool D) und mindestens einem protektiven

Pool (Pool J, G oder A) zeigten. Mittels dieser Analysemethode wurden sechs differentiell exprimierte miRNAs gefunden (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Darstellung von miRNAs, die differentielle Expressionsprofile zwischen dem Referenzpool und den Probenpools aufwiesen. Dargestellt sind die miRNA-Ratios zwischen dem Referenzpool (HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko; Pool D) und den Probenpools (HLA-Konstellationen mit geringerem Erkrankungsrisiko; Pool M, P, J, G und A) von sechs miRNAs. Die Buchstaben in den Klammern repräsentieren die Pool-IDs (Tabelle 7.10; Anhang). **Grün unterlegt**: Die relative miRNA-Expression des Probenpools im Vergleich zum Referenzpool ist ≤ 0,5. ➔ Der Referenzpool weist eine höhere Expression auf. **Rot unterlegt**: Die relative miRNA-Expression des Probenpools im Vergleich zum Referenzpool ist ≥ 2. ➔ Der Referenzpool weist eine niedrigere Expression auf. Verwendete Abkürzungen: n.a.: *not available* (Für miR-181d wurde im Probenpool G keine Expression gemessen). miR-X: reife microRNA-X (X steht für die jeweilige Identifikationsnummer); miRNA: microRNA.

miRNA	höchstes Risiko (D) vs. hohes Risiko (M)	höchstes Risiko (D) vs. mittleres Risiko (P)	höchstes Risiko (D) vs. geringes Risiko 1 (J)	höchstes Risiko (D) vs. geringes Risiko 2 (G)	höchstes Risiko (D) vs. geringes Risiko 3 (A)
miR-9	0,65	0,33	0,29	0,31	0,40
miR-9*	0,90	0,41	0,32	0,60	0,64
miR-363	1,60	2,58	2,16	2,62	1,92
miR-181c	0,46	0,27	0,47	0,36	0,35
miR-181d	0,64	0,36	0,49	n.a.	0,44
miR-424	0,50	0,52	0,44	0,45	0,31

3.5.1.1 Validierung der differentiellen miRNA-Expression in Abhängigkeit von der HLA-Konstellation mittels qRT-PCR

Sowohl für die Microarray- als auch für die qRT-PCR-Analyse diente die HLA-Konstellation mit dem höchsten Risiko an T1D zu erkranken als Referenzpool (Pool D). Die miRNA-Expression der Probenpools (HLA-Konstellationen mit geringerem Erkrankungsrisiko) im Vergleich zum Referenzpool ist sowohl für die Microarray-Daten als auch für die qRT-PCR-Daten in Abbildung 3.29 dargestellt.

Auch wenn die Expressionsunterschiede zwischen dem Referenzpool und den Probenpools zwischen den Microarray-Daten und den qRT-PCR-Daten keine einheitlichen Expressionsstärken aufwiesen, zeigte die miRNA-Expression nach der qRT-PCR-Analyse stets den gleichen Trend wie nach der Microarray-Analyse. Die Expression der miRNAs miR-9, miR-9*, miR-424, miR-181c und miR-181d war bei allen Probenpools im Vergleich zum Referenzpool stets geringer, wohingegen die Expression von miR-363 bei allen Probenpools im Vergleich zum Referenzpool stets erhöht war. Somit ließ sich das durch die Microarray-Analyse erhaltene Expressionsprofil mit Hilfe der qRT-PCR validieren.

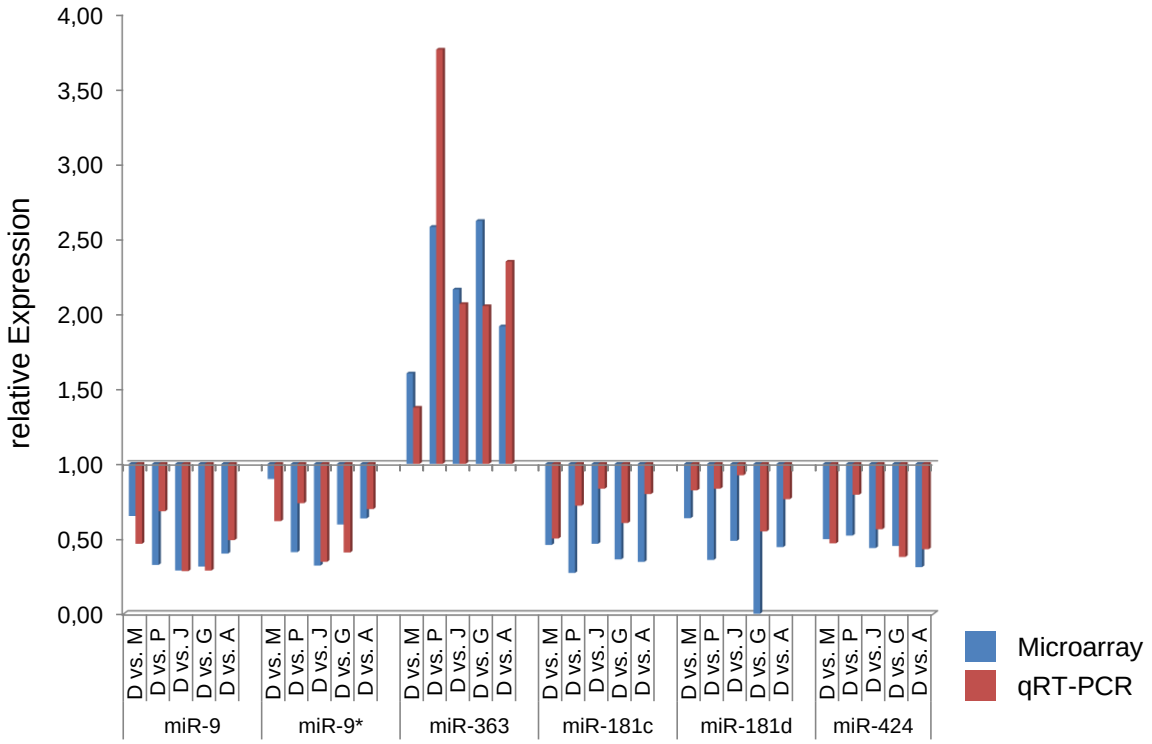


Abbildung 3.29: Validierung der Microarray-Daten mittels qRT-PCR. Dargestellt ist die relative Expression verschiedener miRNAs von Probenpools (HLA-Konstellationen mit geringerem Erkrankungsrisiko; Pool M, P, J, G, A), im Verhältnis zum Referenzpool (HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko; Pool D). Die Expression des Referenzpools wurde „1“ gesetzt. Die Probenpools waren dazu entweder höher oder niedriger exprimiert. Die Tendenzen der miRNA-Expressionen waren für beide Analysemethoden analog. Die Daten der Microarray-Analyse konnten somit mittels qRT-PCR bestätigt werden. Pool D (höchstes Risiko; unstimuliert; Referenzpool), Pool M (hohes Risiko; unstimuliert), Pools P (mittleres Risiko; unstimuliert), Pool J (geringes Risiko 1; unstimuliert), Pool G (geringes Risiko 2; unstimuliert), Pool A (geringes Risiko 3, unstimuliert). Verwendete Abkürzungen: miR-X: reife microRNA-X (X steht für die jeweilige Identifikationsnummer); miRNA: microRNA; PCR: Polymerasekettenreaktion; qRT-PCR: *real-time*-quantitative-PCR.

3.5.1.2 Validierung der miRNA-Expression der in den Pools enthaltenen Einzelproben

Um zu verifizieren, dass alle in den Pools enthaltenen Einzelproben die beobachtete Expression der Pools widerspiegeln, wurde die Expression der Einzelproben mittels qRT-PCR analysiert (Abbildung 3.30).

MiR-363 war bei den Einzelproben der Probenpools tendenziell höher exprimiert als bei den Einzelproben des Referenzpools, was das Ergebnis der Microarray-Analyse bestätigte. Die miRNAs miR-9, miR-9*, miR-181c, miR-181d und miR-424 waren dagegen bei einer Einzelprobe (P 7) des Referenzpools (Pool D) sehr hoch exprimiert. (Abbildung 3.30 schwarze Pfeile). Dadurch lässt sich die niedrigere

Expression der Probenpools im Vergleich zum Referenzpool erklären. Bei diesem Probanden war, neben T1D auch Asthma bronchiale vorhanden. Die zur Behandlung verwendeten Medikamente, wie Betamimetika und Kortison, könnten für die deutlich differentielle Expression dieser miRNAs von Bedeutung sein. Da in dieser Arbeit modifizierte B-Zelllinien und keine primären B-Zellen verwendet wurden, ist der Einfluss von Medikamenten jedoch eher unwahrscheinlich. Da die Gründe für die extrem hohen miRNA-Expressionen für diese Probe unbekannt sind, wurde sie für die nachfolgenden Analysen nicht mehr dargestellt. Bei Betrachtung der beiden anderen im Referenzpool enthaltenen Proben zeigte sich, dass die miRNAs miR-181c, miR-181d und miR-424 tendenziell eher gering exprimiert waren. (Abbildung 3.30d, e, f). Um diesen Trend zu überprüfen, wurde das Probandenkollektiv erweitert.

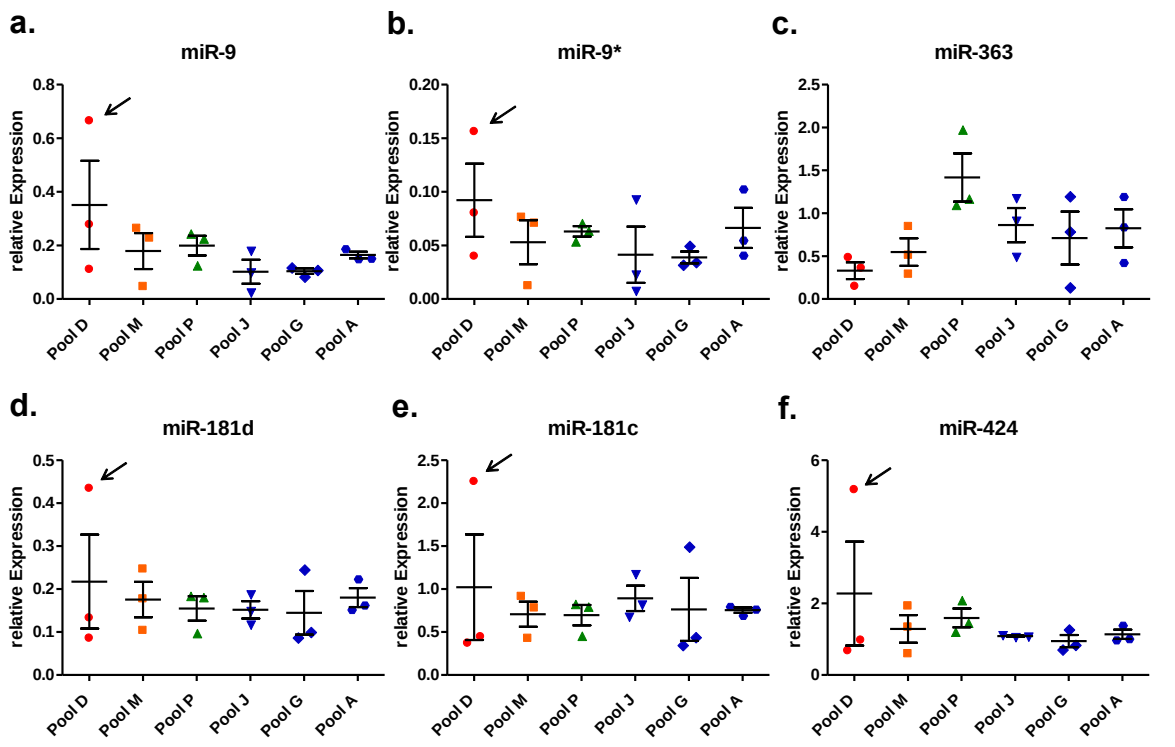


Abbildung 3.30: MiRNA-Expression der in den Pools enthaltenen Einzelproben. Die Analyse wurde mittels qRT-PCR durchgeführt. Dargestellt ist die relative Expression verschiedener miRNAs der Pool-Einzelproben zu *SNORD72*. Für die Probe P7 des Referenzpools (Pool D) waren die miRNAs miR-9, miR-9*, miR-181c, miR-181d und miR-424 sehr hoch exprimiert (schwarze Pfeile), wodurch sich die niedrigere Expression der Probenpools im Vergleich zum Referenzpool (Abbildung 3.29) erklären lässt. Pool D (höchstes Risiko; unstimuliert; Referenzpool), Pool M (hohes Risiko; unstimuliert), Pools P (mittleres Risiko; unstimuliert), Pool J (geringes Risiko 1; unstimuliert), Pool G (geringes Risiko 2; unstimuliert), Pool A (geringes Risiko 3, unstimuliert). Verwendete Abkürzungen: miR-X: reife microRNA-X (X steht für die jeweilige Identifikations-nummer); miRNA: microRNA; qRT-PCR: *real-time*-quantitative-PCR.

3.5.1.3 Reduzierte Expression bestimmter miRNAs bei der HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko

Im Folgenden sollte der im qRT-PCR-Experiment beobachtete Trend, wonach die Expression bestimmter miRNAs für die HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko reduziert war (Abbildung 3.30), genauer untersucht werden. Dazu wurde das Probandenkollektiv je nach Verfügbarkeit pro HLA-Konstellation um bis zu vier Proben erweitert. Die Probe P 7 wurde nicht mehr dargestellt. Die Gruppeneinteilung der einzelnen Risiko-HLA-Konstellationen erfolgte analog zu der Einteilung aus Tabelle 3.4.

Die Expression der miRNAs miR-363, miR-181c, miR-181d und miR-424 war auch nach Erweiterung des Probandenkollektivs bei der Gruppe 1 (höchstes Erkrankungsrisiko) tendenziell reduziert, was den in Abbildung 3.30 beobachteten Trend bestätigte. Die Expression von miR-363 war bei Gruppe 1 im Vergleich zu Gruppe 3 (mittleres Risiko) signifikant geringer (Kruskall-Wallis Test, Nachfolgetest: Dunn´s Test: * $p \leq 0{,}05$). Für miR-181c und miR-181d wurde eine signifikant reduzierte Expression bei Gruppe 1 im Vergleich zu Gruppe 2 (hohes Erkrankungsrisiko) und 6 (geringes Erkrankungsrisiko 3) gefunden (Kruskall-Wallis Test, Nachfolgetest: Dunn´s Test: * $p \leq 0{,}05$). Die Expression von miR-424 bei Gruppe 1 war im Vergleich zu Gruppe 2 tendenziell geringer, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Kruskall-Wallis Test, Nachfolgetest: Dunn´s Test: n.s.: nicht signifikant) (Abbildung 3.31).

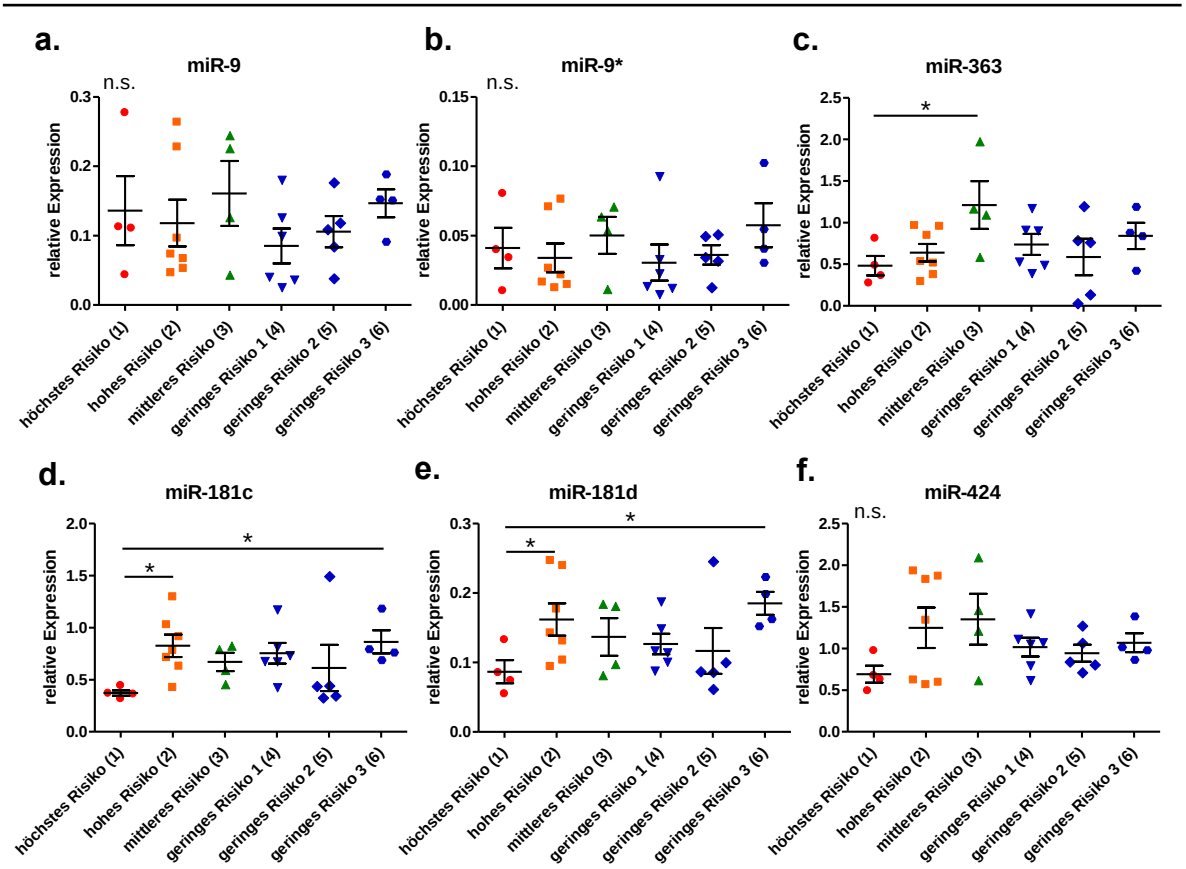


Abbildung 3.31: Reduzierte Expression bestimmter miRNAs bei der HLA-Konstellation für das höchste Risiko an T1D zu erkranken. Es wurden 30 B-LCLs mit verschiedenen mit T1D assoziierten HLA-Konstellationen untersucht. Die Zahlen in den Klammern weisen auf die Gruppenzugehörigkeit der HLA-Konstellationen hin (Tabelle 3.4). Die Analyse wurde mittels qRT-PCR durchgeführt. Dargestellt ist die relative Expression verschiedener miRNAs zu *SNORD72* bei verschiedenen HLA-Konstellationen. Für miR-363, miR-181c und miR181d wurde eine signifikant reduzierte Expression bei der HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko gefunden (Kruskall-Wallis Test, Nachfolgetest: Dunn´s Test: * $p \leq 0{,}05$). Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; miR-X: reife microRNA-X (X steht für die jeweilige Identifikationsnummer); miRNA: microRNA; qRT-PCR: *real-time*-quantitative-PCR; T1D: Typ 1 Diabetes.

3.5.2 Differentiell exprimierte miRNAs in Abhängigkeit vom Stimulus

Des Weiteren sollten miRNAs gefunden werden, die zwischen unstimulierten Pools und stimulierten Pools unterschiedlich exprimiert waren. Dafür wurden die B-LCLs der Probanden für jede HLA-Konstellation entweder für 6 h mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) oder für 24 h mit IFN-γ (Endkonzentration: 20 ng/ml) stimuliert. Aus Platzgründen wurde die HLA-Konstellation für ein mittleres Risiko mittels Microarray nicht auf Expressionsunterschiede vor und nach Stimulation getestet (Abbildung 2.7). Als Referenzpool dienten jeweils die unbehandelten Pools. Für die Validierung der Microarraydaten mittels qRT-PCR wurden

diejenigen miRNAs ausgewählt, deren relative miRNA-Expression für mindestens vier der fünf untersuchten HLA-Konstellationen nach Stimulation signifikant verschieden war. Dabei wurde als signifikant gewertet, wenn die miRNA-Expression zwischen Referenzpools und den stimulierten Probenpools entweder um Faktor ≥ 2 oder ≤ 0,5 verändert war. Mittels dieser Analysemethode wurden zwei unterschiedlich exprimierte miRNAs nach IFN-γ-Stimulation gefunden, wohingegen nach PMA-Stimulation keine unterschiedlich exprimierten miRNAs beobachtet wurden (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: Darstellung von miRNAs, die differentielle Expressionsprofile nach IFN-γ-Stimulation aufwiesen. Dargestellt sind die miRNA-Ratios zwischen den Referenzpools (unstimulierte Pools; Pool D, M, J, G und A) und den mit PMA (Pool E, N, K, H und B) oder IFN-γ (Pool F, O, L, I und C) stimulierten Probenpools von zwei miRNAs. Die Buchstaben in den Klammern repräsentieren die Pool-IDs (Tabelle 7.10; Anhang). **Grün unterlegt**: Die relative miRNA-Expression des Probenpools im Vergleich zum Referenzpool ist ≤ 0,5. ➔ Der Referenzpool weist eine höhere Expression auf. **Rot unterlegt**: Die relative miRNA-Expression des Probenpools im Vergleich zum Referenzpool ist ≥ 2. ➔ Der Referenzpool weist eine niedrigere Expression auf. Verwendete Abkürzungen: IFN-γ-S: mit IFN-γ stimuliert; miR-X: reife microRNA-X (X steht für die jeweilige Identifikationsnummer); miRNA: microRNA; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; PMA-S: mit Phorbol-12-myristat-13-acetat stimuliert; US: unstimuliert.

	höchstes Risiko		**hohes Risiko**		**geringes Risiko 1**		**geringes Risiko 2**		**geringes Risiko 3**	
miRNA	**US (D) vs. 6 h PMA-S (E)**	**US (D) vs. 24 h IFN-γ-S (F)**	**US (M) vs. 6 h PMA-S (N)**	**US (M) vs. 24 h IFN-γ-S (O)**	**US (J) vs. 6 h PMA-S (K)**	**US (J) vs. 24 h IFN-γ-S (L)**	**US (G) vs. 6 h PMA-S (H)**	**US (G) vs. 24 h IFN-γ-S (I)**	**US (A) vs. 6 h PMA-S (B)**	**US (A) vs. 24 h IFN-γ-S (C)**
miR-345	0,97	0,40	1,23	0,50	1,10	0,37	0,87	0,45	0,95	0,74
miR-7	1,34	2,55	1,10	2,01	1,23	2,83	1,04	2,23	1,09	2,18

3.5.2.1 Validierung der differentiellen miRNA-Expression in Abhängigkeit vom Stimulus mittels qRT-PCR

Sowohl für die Microarray- als auch für die qRT-PCR-Analyse diente für jede HLA-Konstellation der jeweils unstimulierte Pool als Referenz. Die relative miRNA-Expression zwischen unstimulierten Probenpools und mit IFN-γ stimulierten Probenpools, ist für die Microarray- und qRT-PCR-Daten, in Abbildung 3.32 dargestellt.

Die Microarray- und qRT-PCR-Daten wiesen stets die gleichen Tendenzen auf. Die Expression für miR-345 war für alle HLA-Konstellationen nach Stimulation sowohl anhand der Microarray-Daten als auch anhand der qRT-PCR-Daten stets geringer, wohingegen sie für miR-7 nach Stimulation stets erhöht war. Somit

konnte das Ergebnis der Microarray-Daten mittels qRT-PCR erfolgreich validiert werden.

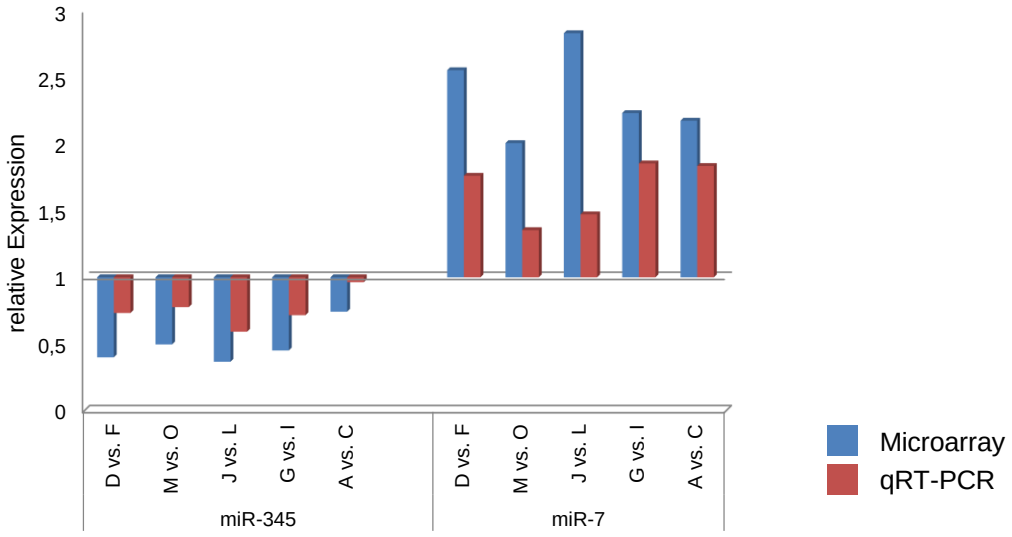


Abbildung 3.32: Validierung der Microarray-Daten mittels qRT-PCR (unstimulierte vs. mit IFN-γ stimulierte Probenpools). Dargestellt ist die relative Expression von miRNA-345 und miR-7 nach 24-stündiger IFN-γ-Stimulation (Endkonzentration: 20 ng/ml; Pool F, O, L, I, C) im Vergleich zu unstimulierten Pools (Pool D, M, J, G, A). Die Expression der unstimulierten Pools wurde „1“ gesetzt. Die stimulierten Pools waren dazu entweder niedriger (für miR-345) oder höher (für miR-7) exprimiert. Die Tendenzen der miRNA-Expressionen waren für beide Analysemethoden analog. Die Daten der Microarray-Analyse konnten somit mittels qRT-PCR bestätigt werden. Pool D (höchstes Risiko; unstimuliert), Pool F (höchstes Risiko; 24 h mit IFN-γ stimuliert), Pool M (hohes Risiko; unstimuliert), Pool O (hohes Risiko; 24 h mit IFN-γ stimuliert), Pool J (geringes Risiko 1; unstimuliert), Pool L (geringes Risiko 1; 24 h mit IFN-γ stimuliert), Pool G (geringes Risiko 2; unstimuliert), Pool I (geringes Risiko 2; 24 h mit IFN-γ stimuliert), Pool A (geringes Risiko 3; unstimuliert), Pool C (geringes Risiko 3; 24 h mit IFN-γ stimuliert). Verwendete Abkürzungen: IFN-γ: Interferon-gamma; miR-X: reife microRNA-X (X steht für die jeweilige Identifikationsnummer); miRNA: microRNA; qRT-PCR: *real-time*-quantitative-PCR.

3.5.2.2 Validierung der Expression von miR-7 und miR-345 der Pool-Einzelproben in Abhängigkeit vom Stimulus

Die Herunterregulierung der Expression bei miR-345 nach IFN-γ-Stimulation, welche bei der Microarray-Analyse beobachtet wurde, konnte nach Analyse der Pool-Einzelproben mittels qRT-PCR nicht bestätigt werden. (Abbildung 3.33a).

Dagegen konnte das Ergebnis der Microarray-Analyse für miR-7 durch die Untersuchung der Einzelproben der Pools verifiziert werden. Die Expression der

mit IFN-γ stimulierten Proben war für alle HLA-Konstellationen im Vergleich zu den unstimulierten Proben hochreguliert (Abbildung 3.33b).

Beide miRNAs waren bei der Probe P 7 nach IFN-γ-Stimulation sehr hoch exprimiert (schwarze Pfeile). Eine stark erhöhte Expression bei dieser Probe wurde schon für die miRNAs miR-9, miR-9*, miR-424, miR-181c und miR-181d im unstimulierten Zustand beobachtet (Abbildung 3.30).

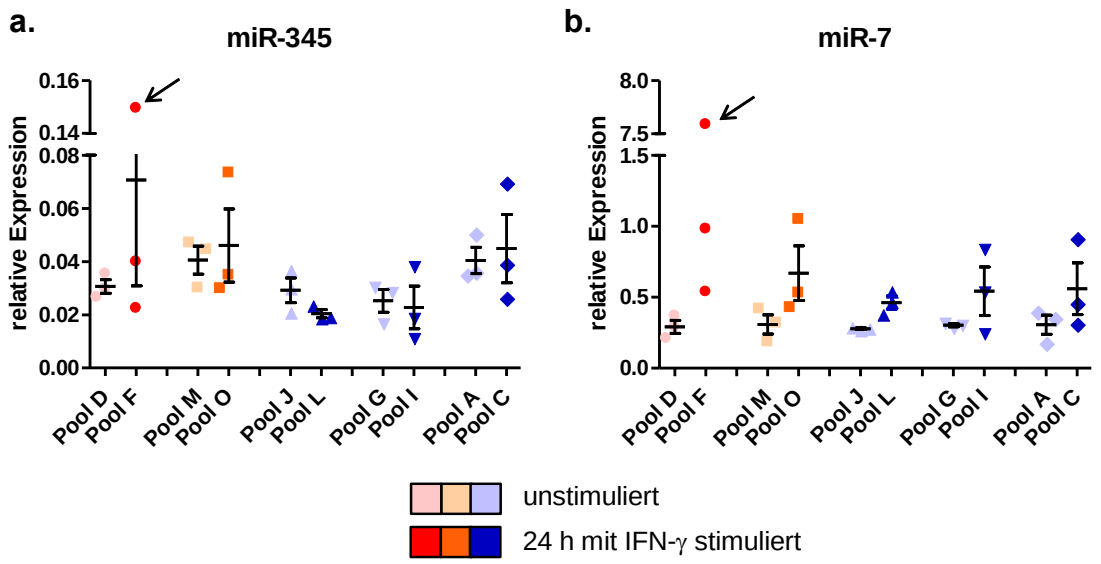


Abbildung 3.33: MiRNA-Expression der unstimulierten und mit IFN-γ stimulierten Pool-Einzelproben. Die miRNA-Expression der Pool-Einzelproben wurde mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt ist die relative Expression von miR-345 und miR-7 zu *SNORD72* bei verschiedenen HLA-Konstellationen vor und nach Stimulation mit IFN-γ (Endkonzentration: 20 ng/ml). Beide miRNAs waren bei der Probe P 7 nach IFN-γ-Stimulation sehr hoch exprimiert (schwarze Pfeile). **a:** Für miR-345 war kein Expressionsunterschied zwischen unstimulierten und für 24 h mit IFN-γ stimulierten Proben vorhanden. **b:** Bei den für 24 h mit IFN-γ stimulierten Proben war miR-7 stärker exprimiert. Pool D (höchstes Risiko; unstimuliert), Pool F (höchstes Risiko; 24 h mit IFN-γ stimuliert), Pool M (hohes Risiko; unstimuliert), Pool O (hohes Risiko; 24 h mit IFN-γ stimuliert), Pool J (geringes Risiko 1; unstimuliert), Pool L (geringes Risiko 1; 24 h mit IFN-γ stimuliert), Pool G (geringes Risiko 2; unstimuliert), Pool I (geringes Risiko 2; 24 h mit IFN-γ stimuliert), Pool A (geringes Risiko 3; unstimuliert), Pool C (geringes Risiko 3; 24 h mit IFN-γ stimuliert). Verwendete Abkürzungen: IFN-γ: Interferon-gamma; miR-X: reife microRNA-X (X steht für die jeweilige Identifikationsnummer); miRNA: microRNA; qRT-PCR: *real-time*-quantitative-PCR.

3.5.2.3 Einfluss von IFN-γ auf die Expression von miR-345 und miR-7

Um die Ergebnisse aus Abbildung 3.33 zu verifizieren, wurde das Probandenkollektiv je nach Verfügbarkeit pro HLA-Konstellation um bis zu drei Proben erweitert. Die HLA-Konstellation für ein mittleres Risiko, welche für die Microarray-

Analyse nicht verwendet wurde, wurde nun ebenfalls untersucht. Die sehr hoch exprimierte Probe P 7 wurde im Folgenden nicht mehr dargestellt.

Für miR-345 waren auch nach Erweiterung des Probandenkollektivs keine Expressionsunterschiede zwischen unstimulierten und mit IFN-γ stimulierten Proben vorhanden (Abbildung 3.34a). Für miR-7 konnte dagegen die erhöhte Expression nach Stimulation mit IFN-γ für alle HLA-Konstellationen bestätigt werden (Abbildung 3.34b).

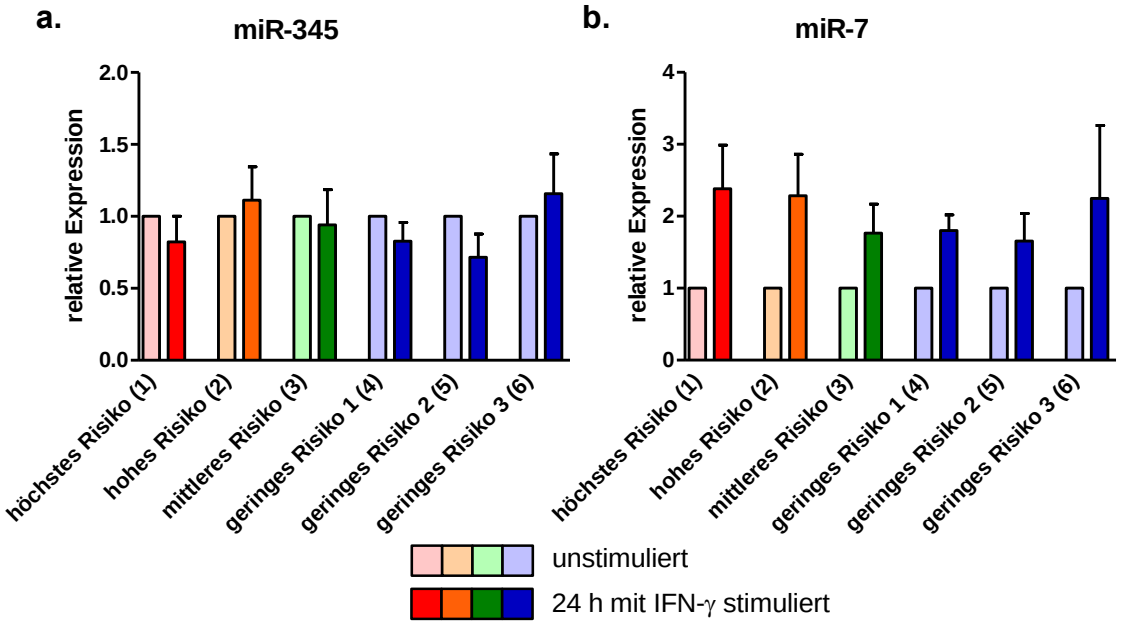


Abbildung 3.34: MiRNA-Expression der unstimulierten und stimulierten Proben nach Erweiterung des Probandenkollektivs. Die Analyse wurde mittels qRT-PCR durchgeführt. Die Expression der mit IFN-γ (Endkonzentration: 20 ng/ml) stimulierten Proben wurde in Relation zur Expression der unstimulierten Proben bestimmt. Die Expression der unstimulierten Proben wurde „1“ gesetzt. Höchstens Risiko (1): n = 5; hohes Risiko (2): n = 3; mittleres Risiko (3): n = 3; geringes Risiko 1 (4): n = 5; geringes Risiko 2 (5): n = 5; geringes Risiko 3 (6): n = 4. Die Zahlen in den Klammern weisen auf die Gruppenzugehörigkeit der HLA-Konstellationen hin (Tabelle 3.4). **a:** Für miR-345 war nach 24-stündiger IFN-γ-Stimulation kein Unterschied in der Expression vorhanden. **b:** Die miR-7-Expression stieg nach 24-stündiger IFN-γ-Stimulation an. Verwendete Abkürzungen: IFN-γ: Interferon-gamma; miR-X: reife microRNA-X (X steht für die jeweilige Identifikationsnummer); miRNA: microRNA; qRT-PCR: *real-time*-quantitative-PCR.

3.5.3 Korrelation der Expression von miR-9 und miR-9* mit der Expression von *RFX1* und *RFX5*

Beim Vergleich der Expression der in dieser Arbeit in die Validierungsanalyse einbezogenen miRNAs mit der Expression von *HLA-DRA*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, sowie der Expression der Transkriptionsfaktoren *RFX1* und *RFX5*, wurde

eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von miR-9 und miR-9* und der Expression der beiden Transkriptionsfaktoren gefunden, wonach die Expression dieser mit abnehmender miRNA-Expression zunahm (Abbildung 3.35a – d). Es war keine Korrelation zwischen den übrigen miRNAs und den Transkriptionsfaktoren bzw. HLA-Klasse-II-Genen vorhanden (Ergebnisse nicht gezeigt).

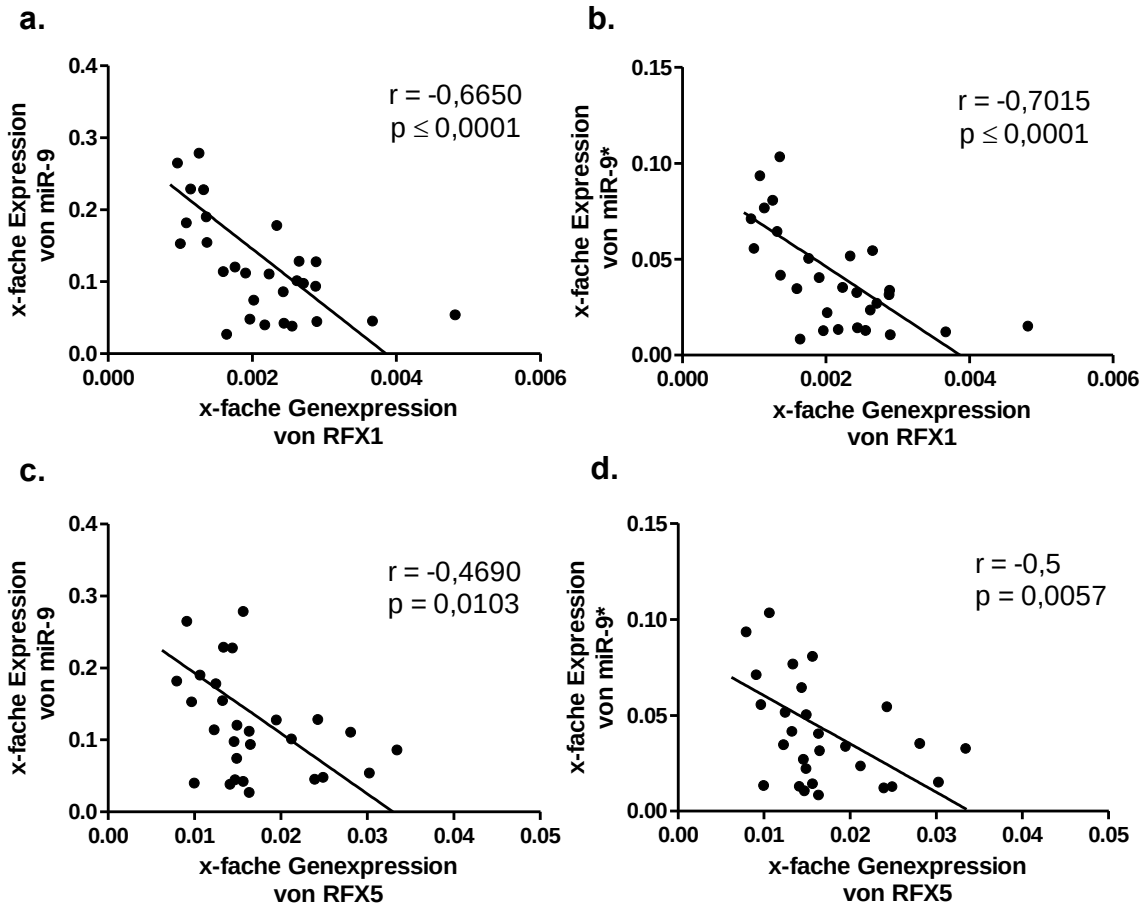


Abbildung 3.35: Korrelation zwischen der Expression von miR-9 und miR-9* und der Expression von *RFX1* und *RFX5*. a + b: Zwischen miR-9 bzw. miR-9* und *RFX1* war eine starke Korrelation vorhanden (Spearman r = -0,6650, p ≤ 0,0001 bzw. r = -0,7015, p ≤ 0,0001). **c + d:** Ebenso wurde zwischen miR-9 bzw. miR-9* und *RFX5* eine Korrelation beobachtet (Spearman r = -0,4690, p = 0,0103 bzw. r = -0,5, p = 0,0057). Verwendete Abkürzungen: MiR-X: reife microRNA-X (X steht für die jeweilige Identifikationsnummer).

3.5.4 Vorhersage potentieller Ziel-mRNAs für die untersuchten miRNAs

In den bisherigen Versuchen wurden diejenigen miRNAs mittels qRT-PCR validiert, welche hinsichtlich der Microarray-Daten differentielle miRNA-Expressionen zwischen den Referenzenpools (HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko bzw. unstimulierte Proben) und den Probenpools (HLA-

Konstellationen mit geringerem Erkrankungsrisiko bzw. mit IFN-γ stimulierte Proben) aufwiesen. Mit Hilfe der im Internet frei verfügbaren Algorithmen von miRDB (http://mirdb.org/miRDB/; Wang *et al.,* 2008), TargetScan (http://www.targetscan.org/; Lewis *et al.*, 2005) und DIANA-microT (http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/; Maragkakis *et al.*, 2009) sollten für diese miRNAs mögliche Ziel-mRNAs *in silico* identifiziert werden.

Im Folgenden wurde für die miRNAs miR-9, miR-9*, miR-363, miR-181c, miR-181d, miR-424, miR-7 und miR-345 nach potentiellen Ziel-mRNAs gesucht, die möglicherweise im Zusammenhang mit einer differentiellen Expression der hier betrachteten HLA-Konstellationen stehen. Es konnten für die meisten hier analysierten miRNAs potentielle Ziel-mRNAs identifiziert werden, die im Zusammenhang mit differentiell exprimierten HLA-Genen stehen könnten (Tabelle 3.8). Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass für diese miRNAs oft hunderte möglicher Interaktionspartner angegeben wurden.

Tabelle 3.8: Darstellung der acht in dieser Arbeit näher untersuchten miRNAs und deren potentieller Ziel-mRNAs, die in Zusammenhang mit differentiell exprimierten HLA-Genen stehen könnten. Die Identifikation der hier aufgeführten potentiellen Ziel-mRNAs erfolgte mit Hilfe der Datenbanken miRDB, TargetScan und DIANA-microT. Angegeben sind die Namen der miRNAs, deren pre-miRNAs und die Lokalisation der pre-miRNAs im Genom (Nummer des Chromosoms und Lage auf dem kurzen (q) oder langen Arm (p) des Chromosoms, sowie die Chromosomenbanden nach Giemsa-Färbung), sowie die potentiellen Ziel-mRNAs, welche in Zusammenhang mit differentiell exprimierten HLA-Genen stehen könnten. Verwendete Abkürzungen: HLA: humanes Leukozytenantigen; IL: Interleukin; mir-X: Vorläufer-microRNA-X (X steht für die jeweilige Identifikationsnummer); miR-X: reife microRNA-X (X steht für die jeweilige Identifikationsnummer); miRNA: microRNA; mRNA: *messenger RNA*; pre-miRNA: Vorläufer-microRNA; RNA: Ribonukleinsäure.

miRNA	**pre-miRNA**	**Lokalisation der pre-miRNA im Genom**	**potentielle Ziel-mRNAs (Auswahl)**
miR-9	*mir-9-1* *mir-9-2* *mir-9-3*	1q22 5q14.3 15q26.1	*RFX1*, *HLA-F*, *IL6R*
miR-9*	*mir-9-1* *mir-9-2* *mir-9-3*	1q22 5q14.3 15q26.1	-
miR-363	*mir-363*	Xq26.2	*RFX1*
miR-424	*mir-424*	Xq26.2	*HLA-DPB1*, *IL15*
miR-181c	*mir-181c*	19p13.13	*TNF*, *RFX2*, *IL2*
miR-181d	*mir-181d*	19p13.13	*TNF*, *RFX2*, *IL2*
miR-7	*mir-7-1* *mir-7-2* *mir-7-3*	9q21.32 15q26.1 19p13.3	*HLA-DRB1*, *HLA-DOB*, *HLA-DPB1*, *HLA-DRB4*, *HLA-DRB5*, *HLA-DRB3*
miR-345	*mir-345*	14q32.2	-

4 Diskussion

Bestimmte HLA-Klasse-II-Moleküle präsentieren im Falle des T1D prozessierte Peptidfragmente diabetogener Antigene an der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen und aktivieren im Zuge einer Autoimmunreaktion CD4+ T-Zellen. Diese interagieren mit zytotoxischen CD8+ T-Zellen und tragen somit zur Zerstörung der insulinproduzierenden β-Zellen des Pankreas bei (Mehers und Gillespie, 2008). Ein Zusammenhang zwischen strukturellen Eigenschaften der HLA-Klasse-II-Moleküle durch Polymorphismen in der peptidbindenden Grube und dem Risiko an T1D zu erkranken konnte bereits von einigen Arbeitsgruppen gezeigt werden (Kwok *et al.*, 1996; Vartdal *et al.*, 1996; Ettinger *et al.*, 1998). Neben biochemischen Faktoren wie Peptidbindungseigenschaften könnte auch der Expressionsgrad protektiver und prädisponierender HLA-Klasse-II-Moleküle an der Pathogenese des T1D beteiligt sein. Da spezifische HLA-Allele der Gene *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* mit T1D assoziiert sind, war es ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit, Expressionsunterschiede dieser Gene bei protektiven und prädisponierenden HLA-Konstellationen zu finden. Des Weiteren sollten Unterschiede in der Expression protektiver und prädisponierender Allele von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* in heterozygoten Individuen identifizieren werden.

Als Surrogat-Modell wurden für alle in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen B-LCLs verwendet. Diese immortalisierten B-Zellen sind als Modell für Genexpressionsanalysen gut etabliert und werden von vielen Arbeitsgruppen als solches verwendet (Cheung *et al.*, 2003; Dixon *et al.*, 2007; Duan *et al.*, 2008). Primäre Zellen sind im Gegensatz zu B-LCLs nicht experimentell modifiziert worden. Faktoren wie Lebensgewohnheiten und die Medikation der Probanden können jedoch signifikante Auswirkungen auf die Expression spezifischer Gene haben (Whitney *et al.*, 2003). Allerdings kann bei B-LCLs das zur Transformation benötigte EBV die Genexpression beeinflussen (Choy *et al.*, 2008). Beim Vergleich der Genexpression von lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) und primären B-Zellen wurden in der Literatur zwar Unterschiede gefunden, jedoch waren diese gering, sodass LCLs die natürlich vorkommende Genexpression in primären Zellen in hohem Maße widerspiegeln (Goring *et al.*, 2007; Caliskan *et al.*, 2011). Des Weiteren sind Zelllinien gegenüber primären Zellen in hoher Anzahl verfügbar

und einfacher in der Handhabung. Dadurch können leicht uniforme Bedingungen generiert werden, was den Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf die Genexpression minimiert (Cheung und Spielman, 2009).

Um zuverlässige und vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, müssen die Kulturbedingungen für alle in einem Versuch verwendeten B-LCLs so ähnlich wie möglich sein. Die Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität dient dabei als etablierte Methode zur Sicherung vergleichbarer Ausgangsbedingungen. Dadurch wird es möglich für alle Versuche konstante Zahlen vitaler Zellen einzusetzen.
Die automatisierte Methode mittels Zellzähler war in dieser Arbeit der manuellen Methode mittels Hämozytometer und Trypanblau bezüglich Reproduzierbarkeit eindeutig zu bevorzugen. Es wurden sowohl nach Zählung aller Zellen als auch nach Zählung der vitalen Zellen mit dem Zellzähler konstantere Ergebnisse erzielt (Abbildung 3.1 und 3.2). Die Vor- und Nachteile beider Zählmethoden zur Zellzahlbestimmung sind in Abbildung 7.10 im Anhang dargestellt.

Um möglichst identische Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurden neben der Ermittlung konstanter Zellzahlen zusätzlich die Zellzyklusphasen der B-LCLs untersucht. Da sich die einzelnen Zellen einer Kultur während der exponentiellen Wachstumsphase in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befinden, kann die Genexpression stark variieren, wodurch Genexpressionsanalysen beeinflusst werden können (Cho *et al.*, 2001; Whitfield *et al.*, 2002; de Lichtenberg *et al.*, 2005). Daher sollte experimentell sichergestellt werden, dass alle verwendeten B-LCLs in ähnlichen Zellzyklusphasen waren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass keine signifikanten Unterschiede in den Zellzyklusphasen der B-LCLs der einzelnen Probanden vorhanden waren (Abbildung 3.3). Bei Betrachtung der Zellzyklusphasen innerhalb der B-LCL eines Probanden zu verschiedenen Zeitpunkten, konnten zeitpunktabhängige Unterschiede festgestellt werden. Diese Unterschiede waren jedoch zwischen verschiedenen B-LCLs für die untersuchten Zeitpunkte und Versuchsbedingungen (Mediumwechsel am Vortag) identisch (Abbildung 3.4 und 3.5). Damit konnte der Einfluss von Unterschieden in der Genexpression während verschiedener Zellzyklusphasen auf die vorliegenden Ergebnisse minimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte PMA zur Simulation eines inflammatorischen Milieus eingesetzt werden. Daher wurde zunächst der Effekt von PMA auf B-LCLs anhand der TNF-α-Produktion und Zellproliferation untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl die TNF-α-Sekretion als auch die Anzahl TNF-α-produzierender Zellen nach PMA-Stimulation erhöht war (Abbildung 3.6 und 3.7). Der gleiche Effekt von PMA auf die TNF-α-Sekretion wurde auch von Sullivan *et al*. in PBMCs und von Celada und Maki in murinen Makrophagen gezeigt (Celada und Maki, 1991; Sullivan *et al.*, 2000). Die Proliferation der B-LCLs nahm dagegen nach PMA-Stimulation ab, was aufgrund des mitogenen Charakters von PMA zunächst widersprüchlich erschien (Abbildung 3.8). Es zeigte sich jedoch, dass die Inhibition der Proliferation kein PMA-bedingter Effekt, sondern ein Effekt des in den Überstand sekretierten TNF-α war (Abbildung 3.9 und 3.10). Aufgrund der immunologischen Reaktion von B-LCLs auf PMA, welche durch die gesteigerte TNF-α-Produktion gezeigt werden konnte, wurde PMA als geeigneter Stimulus zur Generierung eines inflammatorischen Milieus angesehen und für die folgenden Versuche neben IFN-γ als Stimulus verwendet.

4.1 TNF-α- und IL-10-Produktion in Abhängigkeit von der HLA-Konstellation und des Stimulus

Es gibt in der Literatur Hinweise darauf, dass MHC-Klasse-II-Moleküle einen Einfluss auf die Zytokinsekretion haben (Caruso *et al.*, 1996). Matthews und Price zeigten im Mausmodell, dass die Zytokinproduktion nach Stimulation mit bestimmten Mitogenen in Abhängigkeit vom H-2-Haplotyp variieren kann (Matthews und Price, 2000). Außerdem zeigten Hanson *et al*. in transgenen NOD-Mäusen, welche die für T1D protektiven H-2-I-E-Moleküle (Orthologe beim Menschen: HLA-DR-Moleküle) in großer Menge an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen exprimieren, nach Stimulation mit dem diabetogenen Antigen GAD65, eine Polarisierung von Th1-vermittelter Sekretion nach Th2-vermittelter Sekretion. Eine erhöhte Expression protektiver MHC-Moleküle könnte somit durch die Veränderung des Zytokingleichgewichts vor T1D schützen (Hanson *et al.*, 1996). Des Weiteren ist das Gen, welches für TNF-α kodiert, in der HLA-Region lokalisiert (Simmonds und Gough, 2005), wodurch möglicherweise ein Zusammen-

hang zwischen der Assoziation von T1D mit den Genen des HLA-Komplexes und der TNF-α-Produktion besteht (Pociot *et al.*, 1993; Zipp *et al.*, 1995; Furst *et al.*, 2012). In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die Sekretion von TNF-α (proinflammatorisches Zytokin) und IL-10 (antiinflammatorisches Zytokin) von der HLA-Konstellation abhängig ist. Dazu wurde die Genexpression und die Sekretion von IL-10 und TNF-α von B-LCLs verschiedener, mit T1D assoziierter HLA-Konstellationen vor und nach PMA-Stimulation untersucht.

Die Expression von *IL10* und *TNF* war unabhängig von der HLA-Konstellation nach 6-stündiger PMA-Stimulation erhöht und nahm nach 24-stündiger Stimulation wieder ab (Abbildung 3.11 und 3.13) Ein ähnliches Ergebnis für die Expression von *TNF* wurde von Boehringer *et al*. in PMA-stimulierten Alveolarmakrophagen gezeigt (Boehringer *et al.*, 1999).

Die Sekretion der Zytokine TNF-α und IL-10 nahm nach PMA-Stimulation bei allen HLA-Konstellationen zu. Für TNF-α wurde für alle HLA-Konstellationen schon in den ersten 6 Stunden nach PMA-Stimulation ein sehr schneller Anstieg in der Sekretion beobachtet (Abbildung 3.14a). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass PMA ein inflammatorisches Milieu induziert, worauf die Zellen mit der Produktion verschiedener Zytokine reagieren. TNF-α wird neben weiteren Zytokinen wie IFN-γ und IL-1 in der akuten Phase der Inflammation und somit sehr früh gebildet und steigert die Synthese verschiedener Akut-Phase-Proteine, sowie die Aktivierung inflammatorischer Zellen (Gruys *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu TNF-α stieg die IL-10-Sekretion in den ersten 6 Stunden nach PMA-Stimulation langsamer an (Abbildung 3.12a). Bei IL-10 handelt es sich um ein regulatorisches Zytokin, dessen Synthese unter anderem durch TNF-α hochreguliert wird (Wanidworanun und Strober, 1993; Platzer *et al.*, 1995). Daher könnte die IL-10-Sekretion durch die TNF-α-Sekretion, welche schon kurz nach der PMA-Stimulation deutlich hochreguliert war, vermittelt worden sein. Im Hinblick auf die TNF-α- und IL-10-Sekretion fanden Boehringer *et al*. in Alveolarmakrophagen, die mit Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert worden waren, ähnliche Effekte wie sie in dieser Arbeit nach PMA-Stimulation gefunden wurden. Sie konnten zeigen, dass die TNF-α-Sekretion in den ersten 2 h nach LPS-Stimulation deutlich anstieg, wohingegen die IL-10-Sekretion erst nach 4 h – 7 h messbar wurde. Jedoch konnte nach Stimulation mit PMA eine Steigerung der Sekretion lediglich für TNF-

α nachgewiesen werden (Boehringer *et al.*, 1999). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass in der vorliegenden Arbeit die B-LCLs mit 30 ng/ml PMA stimuliert wurden, wohingegen die Arbeitsgruppe um Boehringer *et al.* mit nur 10 ng/ml PMA stimulierte (Boehringer *et al.*, 1999). Des Weiteren könnten Unterschiede zwischen dem hier verwendeten Zellsystem (B-LCLs) und dem bei Boehringer *et al.* verwendeten Zellsystem (Alveolarmakrophagen) für die Differenz der Ergebnisse bei der IL-10-Sekretion eine Rolle spielen.

Die TNF-α-Sekretion nahm nach Kurzzeitstimulation mit PMA bei der HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko (*HLA*DRB1*0301/0401-DQA1*05XX/03XX-DQB1*02XX/03XX*) am langsamsten zu (Abbildung 3.15). Auch war die absolute Menge an sekretiertem TNF-α nach 6-stündiger PMA-Stimulation für diese HLA-Konstellation im Gegensatz zu den protektiven HLA-Konstellationen (tragen den Haplotypen *DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602*) und der HLA-Konstellation für ein hohes Erkrankungsrisiko (homozygot für den Haplotypen *DRB1*0401-DQA1*03XX-DQB1*03XX*) reduziert. Dies war aufgrund des proinflammatorischen Charakters von TNF-α und dessen positiver Assoziation zu T1D unerwartet.

TNF-α, welches überwiegend inflammatorische Immunantworten induziert (Keffer *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1994; Moudgil und Choubey, 2011), kann jedoch auch antiinflammatorische und immunregulatorische Effekte haben (Christen *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2008). So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass die immunregulatorischen Effekte durch die Fähigkeit von TNF-α zustande kommen, die Aktivität von Treg-Zellen zu steigern (Bilate und Lafaille, 2010; Grinberg-Bleyer *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu zeigten andere Arbeitsgruppen bei RA am Menschen allerdings, dass TNF-α in Treg-Zellen die Expression der Protein-phosphatase PP1 steigert, was die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors *forkhead box P3* (FOXP3) an der DNA-Bindungsdomäne induziert. Dies hat wiederum zur Folge, dass die Aktivität der Treg-Zellen supprimiert wird (Bromberg, 2013; Nie *et al.*, 2013). Der Effekt von TNF-α auf Treg-Zellen ist demnach sehr vielschichtig, so dass sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen vorhanden sind.

Durch den proinflammatorischen Charakter von TNF-α und dessen positiver Assoziation zu T1D, war die hohe TNF-α-Sekretion der protektiven HLA-Kon-

stellationen überraschend. Es muss jedoch berücksichtig werden, dass eine spezifische HLA-Konstellation mit einer bestimmten Erkrankung positiv assoziiert sein und für eine andere Erkrankung einen protektiven Effekt haben kann. Die für T1D protektive HLA-Konstellation (Individuen tragen den HLA-Haplotypen *HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602* und einen beliebigen anderen HLA-Haplotypen*)* ist sehr stark mit der neuroimmunologischen Erkrankung MS assoziiert. Das an der Entstehung von T1D beteiligte Zytokin TNF-α spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der MS (Sharief und Hentges, 1991; Zipp *et al.*, 1995). So zeigten Zipp *et al*., dass nach antigeninduzierter Stimulation antigenspezifischer CD4+ T-Zelllinien von *HLA-DR2* (= *HLA-DRB1*1501*)-tragenden Individuen mehr TNF-α sekretiert wurde, als von *HLA-DR2*-negativen Individuen (Zipp *et al.*, 1995). Um zu überprüfen, ob die TNF-α-Produktion auch im Falle des T1D auf ähnliche Weise vom HLA-Haplotyp abhängig ist, wäre es sinnvoll, in weiterführenden Studien ebenfalls antigenspezifische T-Zelllinien für T1D zu generieren und die Zytokinsekretion nach Stimulation mit Peptidfragmenten diabetogener Antigene zu überprüfen.

Die beobachtete differentielle TNF-α-Produktion könnte auch auf das starke Kopplungsungleichgewicht zwischen *TNF* und den HLA-Genen zurückzuführen sein (Shaw *et al.*, 2004). Daher müssen zudem in weiterführenden Studien die B-LCLs der hier verwendeten Probanden bezüglich deren *TNF*-Allele genotypisiert werden. Anschließend kann die Expressionsstärke bestimmter *TNF*-Allele ausgewertet und ein Zusammenhang zwischen bestimmten HLA-Haplotypen und der TNF-α-Produktion untersucht werden.

4.2 Untersuchungen zu Expressionsunterschieden am HLA-Locus in Abhängigkeit von der HLA-Konstellation und des Stimulus

Aus der Literatur ist bekannt, dass der HLA-Haplotyp *HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602* dominant protektive Eigenschaften bei der Manifestation des T1D besitzt (Baisch *et al.*, 1990; Pugliese *et al.*, 1995; Ettinger und Kwok, 1998). Heterozygote Individuen, welche diesen protektiven Haplotypen in Kombination mit einem Risikohaplotypen tragen, sind in der Regel vor der Erkran-

kung geschützt. Ursächlich dafür könnten, neben molekularen Unterschieden der peptidbindenden Grube der HLA-Klasse-II-Moleküle, quantitative Differenzen in der Expression protektiver und prädisponierender Allele sein, wofür es schon erste Hinweise aus der Literatur gibt (Donner *et al.*, 2002; Britten *et al.*, 2009). Um dieser Hypothese weiter nachzugehen, wurde die Expression der HLA-Klasse-II-Gene *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* bei verschiedenen HLA-Konstellationen untersucht. Anschließend wurde die Expression bestimmter Allele dieser beiden Gene bei heterozygoten Individuen mit Hilfe der RNA-Seq analysiert. Des Weiteren wurde die Expression der Gene *RFX1* und *RFX5*, bei denen es sich um Transkriptionsfaktoren von HLA-Klasse-II-Genen handelt, untersucht.

4.2.1 Expressionsanalyse von *RFX1* und *RFX5*

Der RFX-Komplex besteht aus den Proteinen RFX5, RFXANK und RFXAP und bindet an die X-Box, die sich im Promotorbereich von HLA-Klassen-II-Genen befindet, wodurch die Transkription der HLA-Klasse-II-Gene beeinflusst wird (Reith *et al.*, 1990; Garvie *et al.*, 2007). Neben der Bindungsaffinität des RFX-Komplexes an die X-Box könnte auch das Expressionslevel bestimmter Faktoren dieses Komplexes eine Rolle bei der Regulation der Expression der HLA-Klasse-II-Gene spielen. In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression von *RFX5* und *RFX1* und der Expression von *HLA-DRA*, *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* besteht. *RFX1* gehört wie *RFX5* zur RFX-Familie und ist ebenfalls an der Regulation der Expression von HLA-Klasse-II-Genen beteiligt (Reith und Mach, 2001). Des Weiteren sollte die Expression von *RFX1* und *RFX5* in Abhängigkeit von der HLA-Konstellation und des Stimulus untersucht werden.

Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von *RFX5* und der Expression von *HLA-DQA1* und *HLA-DRA* gefunden (Abbildung 3.26c und d). Dieser Effekt wurde für *HLA-DQB1* jedoch nicht beobachtet (Abbildung 7.9b; Anhang). Es besteht demnach scheinbar ein Zusammenhang zwischen der Expression von *RFX5* und der Expression von *HLA-DRA* und *HLA-DQA1*, wohingegen die Expression von *RFX5* bei der Expression von *HLA-DQB1* keine Rolle spielt. Die Expression von *RFX1* korrelierte dagegen nur gering oder gar nicht mit der Expression von *HLA-DQA1*, *HLA-DRA* und *HLA-DQB1* (Abbildung

3.26a und b und Abbildung 7.9a; Anhang), wonach das Expressionslevel von *RFX1* keinen Einfluss auf die Expression von HLA-Klasse-II-Genen hat.
Zwischen verschiedenen HLA-Konstellationen wurde keine differentielle Expression von *RFX1* und *RFX5* gefunden (Abbildung 3.21a und b). Dies deutet darauf hin, dass der Expressionsgrad von *RFX1* und *RFX5* keinen Einfluss auf die allelspezifische Expression von HLA-Klasse-II-Genen hat. Die beobachteten Unterschiede in der Expression von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* bei verschiedenen HLA-Konstellationen sind daher vermutlich auf allelspezifische Polymorphismen im Promotorbereich und den daraus resultierenden unterschiedlichen Bindungsaffinitäten von regulatorischen Faktoren wie des RFX-Komplexes zurückzuführen. (Reith *et al.*, 1990; Andersen *et al.*, 1991; Beaty *et al.*, 1995; Morzycka-Wroblewska *et al.*, 1997).
Nach Stimulation der B-LCLs mit PMA oder IFN-γ war *RFX1* bei den meisten HLA-Konstellationen gegenüber unstimulierten Zellen leicht höher exprimiert (Abbildung 3.22a). *RFX5* war sowohl nach PMA- als auch nach IFN-γ-Stimulation dagegen geringer exprimiert (Abbildung 3.22b). Jedoch fanden Xu *et al*. in Lungenfibroblasten eine erhöhte Expression von *RFX5* nach IFN-γ-Stimulation (Xu *et al.*, 2003). Eine Reduktion von RFX5 nach PMA-Stimulation konnte auch auf Proteinebene nicht beobachtet werden. Nach Kwon *et al*. blieb die RFX5-Expression nach PMA-Stimulation in der B-Zelllinie Raji unverändert (Kwon *et al.*, 2006). Die in dieser Arbeit gefundenen Unterschiede sind sehr gering und konnten durch Angaben aus der Literatur nicht bestätigt werden. Daher muss das in dieser Arbeit gefundene Ergebnis durch weitere Versuche verifiziert werden.

4.2.2 Expressionsanalyse von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1*

Bei der Untersuchung der Expression der hoch-polymorphen HLA-Klasse-II-Gene bei verschiedenen HLA-Konstellationen mittels qRT-PCR musste darauf geachtet werden, dass die Spezifität der verwendeten Primer an die verschiedenen HLA-Allele identisch war. Eine nicht perfekte Primerbindung kann die qRT-PCR-Effizienz und dadurch die errechneten Expressionswerte wesentlich beeinflussen. Effekte von Polymorphismen im Primerbindungsbereich auf die Effizienz der qRT-PCR konnten durch die Untersuchung der Spezifität der verwendeten Primer für

die in dieser Arbeit vorkommenden Allele ausgeschlossen werden (Abschnitt 3.4.1).

Bei Betrachtung der Expression der HLA-Klasse-II-Gene *HLA-DRA*, *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* zwischen den verschiedenen HLA-Konstellationen, die unterschiedlich mit T1D assoziiert sind, waren für *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* Unterschiede vorhanden.
Die Expression von *HLA-DQA1* war bei Individuen, welche homozygot für das protektive Allel *DQA1*0102* waren, signifikant geringer als bei Individuen, die für die prädisponierenden Allele *DQA1*03XX* und *DQA1*05XX* entweder homozygot oder heterozygot waren (Abbildung 3.24a). Auch heterozygote Individuen, welche das Allel *DQA1*0102* und ein weiteres Allel trugen (*DQA1*03XX* oder *DQA1*05XX*), zeigten tendenziell eine geringere Expression als Individuen, die das Allel *DQA1*0102* nicht trugen. Diese Beobachtung konnte durch die Ergebnisse von Britten *et al*. gestützt werden, wonach das Allel *DQA1*0102* in PBMCs ebenfalls geringer exprimiert war, als das Allel *DQA1*0301* (Britten *et al.*, 2009).
Die Expression von *HLA-DQB1* war bei zwei von drei protektiven HLA-Konstellationen, die alle das protektive Allel *DQB1*0602* enthielten, höher (Abbildung 3.24b). Eine erhöhte Expression des Allels *DQB1*0602* wurde auch schon von Britten *et al*. beschrieben. Diese könnte auf die erhöhte Promotoraktivität des Allels *DQB1*0602* zurückzuführen sein (Britten *et al.*, 2009). Die HLA-Konstellation, bei der *HLA-DQB1* trotz des Allels *DQB1*0602* nicht erhöht exprimiert war, enthielt zusätzlich das Allel *DQB1*02XX*. Auch war die Expression *von HLA-DQB1* bei Individuen, die für *DQB1*02XX* homozygot waren, am geringsten. Dieses Ergebnis konnte durch Angaben aus der Literatur bestätigt werden. Demnach fanden Britten *et al*., dass das Allel *DQB1*0201* in heterozygoten Individuen sowohl in Kombination mit *DQB1*0602* als auch mit *DQB1*0302* weniger stark exprimiert war (Britten *et al.*, 2009).

Um genauere Aussagen über Expressionsunterschiede bestimmter Allele von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* treffen zu können, wurde im Folgenden eine allelspezifische Expressionsanalyse mittels RNA-Seq durchgeführt.

Sowohl die qRT-PCR Ergebnisse, als auch die RNA-Seq Ergebnisse dieser Arbeit, sowie Angaben aus der Literatur, weisen auf eine erhöhte Expression des Allels *DQA1*03XX* hin. Mittels RNA-Seq wurde beim Vergleich der Allele *DQA1*03XX* und *DQA1*05XX* in acht von zehn heterozygoten Individuen eine erhöhte Expression von Allel *DQA1*03XX* gefunden (Abbildung 3.27a). Eine mögliche Erklärung liefern die Arbeitsgruppen um Morzycka-Wroblewska *et al*. und Britten *et al*. Sie beobachteten eine erhöhte Promotoraktivität von *DQA1*0301* im Vergleich zu *DQA1*0501* (Morzycka-Wroblewska *et al.*, 1997; Britten *et al.*, 2009).

Beim Vergleich von heterozygoten Individuen, welche die Allele *DQA1*03XX* und *DQA1*0102* trugen, war ebenfalls Allel *DQA1*03XX* schwach hochreguliert (Abbildung 3.27b). Diese Ergebnisse konnten durch verschiedene Literaturquellen bestärkt werden, die ebenfalls eine höhere Expression von *DQA1*03* (Donner *et al.*, 2002) bzw. *DQA1*0301* (Britten *et al.*, 2009) im Vergleich zu anderen Allelen beschrieben. Außerdem fanden Maffei *et al*. in peripheren Blutlymphozyten (PBLs) bei heterozygoten Proben für *DQA1*01* und *DQA1*03* ebenfalls eine erhöhte Expression von *DQA1*03* (Maffei *et al.*, 1997).

Die in dieser Arbeit gefundenen allelspezifischen Expressionsunterschiede bei heterozygoten Individuen für *DQA1*05XX* und *DQA1*0102*, wonach Allel *DQA1*05XX* stärker exprimiert war (Abbildung 3.27c), wurden durch Angaben aus der Literatur ebenfalls unterstützt (Maffei *et al.*, 1997). Die Arbeitsgruppe um Donner *et al*. fand jedoch eine höhere Expression von *DQA1*01* im Vergleich zu *DQA1*05* (Donner *et al.*, 2002). Britten und Kollegen fanden dagegen keine Unterschiede in der Expression dieser beiden Allele, sie konnten jedoch eine erhöhte Promotoraktivität von *DQA1*0501* im Gegensatz zu *DQA1*0102* beobachten, was die Ergebnisse dieser Arbeit stützt (Britten *et al.*, 2009). Die Ergebnisse der Expression bestimmter Allele von *HLA-DQA1* aus dieser Arbeit sind den Ergebnissen aus der Literatur in Tabelle 7.8 im Anhang gegenübergestellt.

Bei der Betrachtung der Expression bestimmter Allele von *HLA-DQB1* fallen zunächst die deutlichen Expressionsunterschiede zwischen prädisponierenden und protektiven Allelen auf. Das protektive Allel *DQB1*0602* war in Kombination mit den Allelen *DQB1*0302* und *DQB1*02XX* stets geringer exprimiert (Abbildung 3.28c und e). Dem entgegen stehen die Ergebnisse der qRT-PCR aus dieser

Arbeit, wonach die Expression von *HLA-DQB1* bei Individuen, die für das protektive Allel *DQB1*0602* homozygot waren, höher war (Abbildung 3.24b), sowie die Ergebnisse von Britten *et al*., die ebenfalls eine erhöhte Expression für Allel *DQB1*0602* im Vergleich zu *DQB1*02XX* und *DQB1*0302* fanden (Britten *et al.*, 2009).

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene reduzierte Expression des Allels *DQB1*0602* im Vergleich zu Allel *DQB1*0301*, welches ebenfalls protektive Eigenschaften hat, konnte durch die Arbeit von Ferstl *et al*. unterstützt werden (Abbildung 3.28d). Diese zeigte, dass während der TNF-α-induzierten Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten bei heterozygoten Probanden für die Allele *DQB1*0602* und *DQB1*0301* das Allel *DQB1*0602* ebenfalls deutlich geringer exprimiert wurde (Ferstl *et al.*, 2004). Eine mögliche Erklärung dafür könnten die unterschiedlichen Sequenzen dieser beiden Allele in der Region um die X-Box im Promotorbereich sein. *DQB1*0602* enthält zwischen der W-Box und X1-Box zusätzlich das Dinukleotid TG an Position –180 und –179 (Tabelle 7.6; Anhang). Dies führt zu einem größeren Abstand zwischen der W-Box und der X1-Box, der mit einer verminderten Expression von *HLA-DQB1* assoziiert ist (Beaty *et al.*, 1995; Ferstl *et al.*, 2004). Dem entgegen steht jedoch die oben beschriebene erhöhte Promotoraktivität von *DQB1*0602*, die von Britten *et al*. gefunden wurde (Britten *et al.*, 2009).

In dieser Arbeit wurde mittels RNA-Seq jedoch nicht nur eine reduzierte Expression des protektiven Allels *DQB1*0602*, sondern auch des protektiven Allels *DQA1*0102* gefunden (Abbildungen 3.28c, d, e und 3.27b, c). Dies bedeutet, dass die beiden protektiven Allele der Gene *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1*, welche im HLA-Klasse-II-Locus gekoppelt vorliegen, im Vergleich zu anderen Allelen stets eine verminderte Expression aufwiesen. Diese reduzierte Expression erscheint in Bezug auf den dominant protektiven Effekt des Haplotypen *HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602* bei T1D zunächst kontrovers.

Jedoch kann, unabhängig vom Expressionsgrad, die Affinität diabetogener Antigene an die peptidbindende Grube protektiver HLA-Klasse-II-Moleküle gegenüber prädisponierenden HLA-Klasse-II-Molekülen unterschiedlich sein. Somit konnte *in vitro* eine erhöhte Bindungsaffinität von (Pro)insulinpeptiden an protektive HLA-Klasse-II-Moleküle gegenüber neutralen oder prädisponierenden HLA-Klasse-II-Molekülen gezeigt werden (Geluk *et al.*, 1998). Diese erhöhte

Bindungsaffinität könnte *in vivo* zu einer besseren Peptidpräsentation und einer effizienteren negativen Selektion von gegen das entsprechende Antigen potentiell autoreaktiven T-Zellen im Thymus führen (Geluk *et al.*, 1998; Jiang und Chess, 2004).

Eine weitere Erklärung für den protektiven Effekt der schwächer exprimierten Allele *DQA1*0102* und *DQB1*0602* liefern Ettinger und Kollegen. Sie zeigten in *in vitro* Untersuchungen von B-LCLs und PBLs, dass das protektive α/β-Dimer HLA-DQA1*0102-DQB1*0602 nach einer Behandlung mit Natriumdodecylsulfat (SDS), einem Denaturierungsmittel für Proteine, die größte Stabilität aufwies, wohingegen die prädisponierenden Moleküle HLA-DQA1*0301-DQB1*0302 und HLA-DQA1*0501-DQB1*0201 am instabilsten waren (Tabelle 7.7; Anhang) (Ettinger *et al.*, 1998; Nepom und Kwok, 1998). Daher könnte das reduzierte Expressionslevel auf mRNA-Ebene durch die hohe Stabilität auf Proteinebene kompensiert werden.

Einen Hinweis auf Expressionsunterschiede verschiedener HLA-Klasse-II-Proteinkomplexe liefert die Arbeit von Fernandes und Kollegen. Sie untersuchten quantitative Unterschiede von unterschiedlichen HLA-DQ-Heterodimeren an der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen. Sie konnten zeigen, dass die Expression von HLA-DQ-Heterodimeren bei Patienten mit T1D, die das Allel *DQB1*0201* besaßen, im Vergleich zu Patienten mit T1D, die dieses Allel nicht trugen, herunterreguliert war (Fernandes *et al.*, 2004). Als mögliche Ursache sahen die Autoren die verringerte Stabilität dieser Moleküle basierend auf den Ergebnissen von Ettinger *et al.* (Ettinger *et al.*, 1998).

Beim Vergleich der Expression zweier prädisponierender Allele von *HLA-DQB1* (*DQB1*02XX* und *DQB1*0302*) wurde in dieser Arbeit bei drei Probanden kein Unterschied in der Expression dieser Allele gefunden, wohingegen vier Individuen eine leicht erhöhte Expression des Allels *DQB1*02XX* aufwiesen und bei weiteren drei Individuen die Expression des Allels *DQB1*0302* leicht erhöht war (Abbildung 3.28a). Dagegen fanden Britten *et al*. stets eine verringerte Expression des Allels *DQB1*0201* (Britten *et al.*, 2009). Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Abweichungen in der Expression der Allele von *HLA-DQB1* bei heterozygoten Individuen mit identischen HLA-Konstellationen sind möglicherweise ein Hinweis dafür, dass neben Sequenzunterschieden im regulatorischen Bereich von HLA-Klasse-II-Genen, weitere Faktoren, wie beispielsweise epigenetische Modifikationen, an der Regulation der Expression von HLA-Klasse-II-Genen beteiligt sind.

Des Weiteren war in dieser Arbeit bei heterozygoten Individuen für die Allele *DQB1*0301* und *DQB1*0302* das als protektiv geltende Allel *DQB1*0301* stets stärker exprimiert als das prädisponierende Allel *DQB1*0302*. Diese beiden Allele weisen unterschiedliche Sequenzen in der Region um die X-Box des Promotorbereichs auf. *DQB1*0302* enthält zwischen der W-Box und X1-Box zusätzlich das Dinukleotid TG an Position –180 und –179 (Tabelle 7.6; Anhang). Wie oben schon für Allel *DQB1*0602* beschrieben, führt dies zu einem größeren Abstand zwischen der W-Box und der X1-Box, der mit einer verminderten Expression von *HLA-DQB1* assoziiert ist (Beaty *et al.*, 1995). Die Ergebnisse der Expression bestimmter Allele von *HLA-DQB1* aus dieser Arbeit sind den Ergebnissen aus der Literatur in Tabelle 7.9 im Anhang gegenübergestellt.

Sowohl zwischen einzelnen Angaben aus der Literatur, als auch zwischen Literaturquellen und den Analysen aus dieser Arbeit, wurden hinsichtlich der Expression verschiedener Allele bei *HLA-DQA1* sowie bei *HLA-DQB1* zum Teil unterschiedliche Ergebnisse gefunden. Diese Unterschiede können durch Faktoren verursacht wurden sein, wie beispielsweise die von Labor zu Labor unterschiedlichen Ausgangs- und Kulturbedingungen. Zudem muss stets das verwendete Zellsystem (PBMCs, PBLs, B-LCLs) berücksichtigt werden, da verschiedene Zellsysteme unterschiedliche Transkriptionsintensitäten aufweisen können (Maffei *et al.*, 1997; Fernandez *et al.*, 2003; Britten *et al.*, 2009). Daneben spielen auch methodische Faktoren, wie RNA-Isolation und die Quantifizierung der Transkripte, eine Rolle (Britten *et al.*, 2009). So wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Methoden zur Untersuchung der allelspezifischen Expression verwendet (Tabelle 7.8 und 7.9; Anhang).

Ein anderer wesentlicher Aspekt bei der Bewertung der allelspezifischen Expression von HLA-Klasse-II-Genen ist, dass anhand der Genexpression nicht automatisch auf das Proteinlevel der einzelnen HLA-Klasse-II-Moleküle an der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen geschlossen werden kann. Die Menge spezifischer HLA-DQ-Heterodimere ist dabei von mehreren Faktoren abhängig. Dazu gehören die mRNA-Expressionslevel von *HLA-DQA1*- und *HLA-DQB1*, die beide allelspezifisch reguliert werden, alternatives Spleißen der mRNA, die relative Stabilität unterschiedlicher Transkripte, sowie die Effizienz der Translation und die Paarungsfähigkeit verschiedener α- und β-Peptidketten (Britten *et*

al., 2009). Des Weiteren war sowohl in dieser Arbeit als auch in der Literatur (Maffei *et al.*, 1997; Donner *et al.*, 2002; Britten *et al.*, 2009) die Anzahl an Probanden stark limitiert, so dass die Ergebnisse durch eine Erweiterung des Probandenkollektivs verifiziert werden müssen.

Nach PMA-Stimulation war die Expression von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* in der vorliegenden Arbeit leicht erhöht. In der Literatur wurden schon ähnliche Effekte der Proteinkinase C, welche von PMA aktiviert wird, auf die Regulation der MHC-Klasse-II-Expression bei Makrophagen gefunden (Smith *et al.*, 1992). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion der Expression von *HLA-DQB1* nach IFN-γ-Stimulation (Abbildung 3.25b) war überraschend, da IFN-γ die Expression von MHC-Klasse-II laut Literatur steigert (Rosa *et al.*, 1983; Collins *et al.*, 1984; Giroux *et al.*, 2003). Beim Vergleich der Daten aus dieser Arbeit mit den Daten aus der Literatur, muss jedoch stets das jeweils verwendete Zellsystem berücksichtigt werden. Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass nach IFN-γ- und PMA-Stimulation auch auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analysen keine Unterschiede in der Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen bei B-LCLs vorhanden waren (Ergebnisse nicht gezeigt). Auch nach IFN-γ-Stimulation von primären B-Zellen wurden keine Unterschiede beobachtet, wobei in myeloischen dendritischen Zellen (m-DCs) eine erhöhte HLA-Klasse-II-Expression gefunden wurde (Ergebnisse nicht gezeigt). Für die reduzierte Expression von *HLA-DQB1* nach IFN-γ-Stimulation in B-LCLs könnte demnach das verwendete Zellsystem verantwortlich sein.

4.3 MiRNA-Expressionsunterschiede in Abhängigkeit von der HLA-Konstellation und des Stimulus

Lange wurde angenommen, dass die Komplexität des Proteoms ausschließlich aus der Expression proteinkodierender Gene und deren anschließender Prozessierung resultiert. Weitere Untersuchungen deuteten jedoch darauf hin, dass das Proteom auch über andere Mechanismen, wie miRNAs reguliert wird (Lee *et al.*, 1993).

Im Kontext mit HLA-Klasse-II-Genen konnten Expressionsunterschiede, die durch allelspezifische Polymorphismen in deren Promotorbereichen verursacht wurden, schon mehrfach gezeigt werden (Reith *et al.*, 1990; Morzycka-Wroblewska *et al.*, 1997; Heldt *et al.*, 2003; Ferstl *et al.*, 2004). Eine weitere Ursache der allelspezifischen Expressionsunterschiede von HLA-Klasse-II-Genen könnte aus Polymorphismen in deren 3´UTR resultieren, wodurch die Interaktion zwischen mRNA und miRNA beeinflusst werden könnte (Tan *et al.*, 2007; Endale Ahanda *et al.*, 2012). Diese Polymorphismen könnten somit Auswirkungen auf die Affinität und Funktionalität von miRNAs als potentielle Interaktionspartner für die mRNA-Transkripte der HLA-Klasse-II-Gene haben, wodurch die Expression dieser HLA-Klasse-II-Gene moduliert werden könnte (Abbildung 7.11; Anhang). Des Weiteren wäre es möglich, dass miRNAs Immunmodulatoren wie pro-und antiinflammatorische Zytokine regulieren und durch die Polarisierung des Zytokinexpressionsmusters in Richtung zelluläre oder humorale Immunantwort die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beeinflussen können.

4.3.1 Bewertung der miRNA-Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen HLA-Konstellationen

In dieser Arbeit wurden für vier miRNAs (miR-363, miR-181c, miR-181d und miR-424) Expressionsunterschiede zwischen der HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko und den HLA-Konstellationen mit geringerem Risiko gefunden. Anhand der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Algorithmen von DIANA-microT (http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/; Maragkakis *et al.*, 2009), TargetScan (http://www.targetscan.org/; Lewis *et al.*, 2005) und miRDB (http://mirdb.org/miRDB/; Wang *et al.,* 2008) wurde für miR-424, welche bei der HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko tendenziell herunterreguliert war, die mRNA von *HLA-DPB1* als potentieller Interaktionspartner angegeben (Abbildung 3.31f und Tabelle 3.8). Es gibt Hinweise darauf, dass *HLA-DPB1* mit dem Erkrankungsrisiko für T1D assoziiert sein kann (Stuchlikova *et al.*, 2006; Varney *et al.*, 2010). Jedoch konnte keine potentielle Interaktion zwischen den miRNAs miR-363, miR-181c und miR-181d, welche bei der HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko im Vergleich zu mindestens einer anderen HLA-Konstellation signifikant herunterreguliert waren (Abbildung 3.31c, d und e),

und der mRNA von HLA-Klasse-II-Genen gefunden werden (Tabelle 3.8). Dagegen sind nach TargetScan für miR-137 die mRNA von *HLA-DQA1* und für die miRNAs miR-148a, miR-148b und miR-152 die mRNA von *HLA-DQB1* potentielle Ziele (Stand: 01. Februar 2014). Die Microarray-Daten wiesen für diese miRNAs jedoch keine Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen HLA-Konstellationen auf (Ergebnisse nicht gezeigt). Nach miRDB wurden für *HLA-DQA1* sogar 30 miRNAs und für *HLA-DQB1* zwölf miRNAs als potentielle Interaktionspartner angegeben (Stand: 01. Februar 2014). Bei der Bewertung von HLA-Klasse-II-Transkripten als potentielle Ziele für spezifische miRNAs muss berücksichtigt werden, dass die herangezogenen Algorithmen zur Vorhersage potentieller Ziel-mRNAs das Referenzgenom des *Genome reference consortiums* verwenden. Dieses kann sich in hoch-polymorphen Bereichen, wie der HLA-Region von anderen Individuen stark unterscheiden. Durch allelspezifische Polymorphismen in der 3´UTR der HLA-Klasse-II-Gene, kann daher die miRNA-mRNA-Interaktion bei verschiedenen Allelen unterschiedlich sein. Außerdem liegen für die meisten Allele der HLA-Klasse-II-Gene zurzeit keine oder nur unzureichende Sequenzinformationen über die 3'UTR vor, was das Auffinden von mRNAs spezifischer HLA-Klasse-II-Allele als potentielle Interaktionspartner für bestimmte miRNAs wesentlich erschwert. Da gegenwärtig keine bioinformatischen Vorhersagemodelle zur Verfügung stehen, mit denen sich die Eignung spezifscher miRNAs als Interaktionspartner von mRNA-Transkripten unterschiedlicher HLA-Allele bestimmen lässt, ist eine diesbezügliche Beurteilung der Ergebnisse *in silico* momentan noch nicht möglich.

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass für eine Erkrankung protektive bzw. prädisponierende MHC-Klasse-II-Moleküle einen Einfluss auf das Zytokin-expressionsmuster haben können (Zipp *et al.*, 1995; Hanson *et al.*, 1996). Da die mRNA von Zytokinen auch potentielle Ziele für miRNAs darstellen, wurde die miRNA-Expression von verschiedenen HLA-Konstellationen im Zusammenhang mit verschiedenen Zytokinen beurteilt. Dazu wurden abermals die im Internet frei verfügbaren Vorhersagemodelle von DIANA-microT, TargetScan und miRBase verwendet. Danach handelt es sich bei *TNF* und *IL2*, welche beide für proinflammatorische Th1-Zytokine kodieren (Singh *et al.*, 2011), um potentielle Ziele der miRNAs miR-181c und miR-181d. Für miR-424 stellt die mRNA des Zytokins IL-15, das zur Familie der IL-2 Zytokine gehört und an der Pathogenese des T1D

beteiligt ist (Fehniger und Caligiuri, 2001; Moudgil und Choubey, 2011; Bobbala *et al.*, 2012), einen potentiellen Interaktionspartner dar (Tabelle 3.8). In der vorliegenden Arbeit wurde bei der HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko im Vergleich zu den HLA-Konstellationen mit geringerem Erkrankungsrisiko eine reduzierte Expression der miRNAs miR-181c, miR-181d und miR-424 gefunden (Abbildung 3.31d, e und f). Dies könnte zu einer gesteigerten Sekretion der inflammatorischen Zytokine (TNF-α, IL-2 und IL-15) führen. In Folge dessen könnte sich das Zytokinexpressionsmuster in Richtung Th1-Zellen verschieben, was die Ausbildung von T1D begünstigt. Daher ist ein Zusammenhang zwischen der differentiellen miRNA-Expression bei verschiedenen HLA-Konstellationen und einem Effekt auf die Modulation des Zytokinexpressionsmusters denkbar, wodurch wiederum die Pathogenese immunologischer Erkrankungen beeinflusst werden könnte.

4.3.2 MiR-9 und miR-9* könnten an der Regulation der HLA-Klasse-II-Expression beteiligt sein

Anhand der für diese Arbeit verwendeten Vorhersagemodelle war für miR-9 eine potentielle Interaktion mit der mRNA von *RFX1* vorhanden (Tabelle 3.8). Auch wurde in dieser Arbeit eine Korrelation zwischen der Expression von miR-9 bzw. miR-9* und der Expression von *RFX1* und *RFX5* beobachtet (Abbildung 3.35a – d). Die Expression von *RFX1* und *RFX5* nahm mit steigender Expression von miR-9 und miR-9* ab. Dies deutet darauf hin, dass miR-9 und miR-9* einen Einfluss auf die Expression von *RFX1* und *RFX5* haben könnten. Durch verschiedene Literaturangaben ist bekannt, dass RFX1 und RFX5 an der Regulation von HLA-Klasse-II-Genen beteiligt sind (Reith *et al.*, 1990; Garvie *et al.*, 2007). Eine Steuerung der HLA-Klasse-II-Expression über die Regulation der Expression von *RFX1* und *RFX5* durch miR-9 und miR-9* ist somit denkbar und muss in weiterführenden Studien genauer untersucht werden.

4.3.3 MiR-7 könnte an der Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen beteiligt sein

MiR-7 wird in den Inselzellen des Pankreas exprimiert und ist an dessen Entwicklung beteiligt (Bravo-Egana *et al.*, 2008; Kredo-Russo *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte in Folge eines durch IFN-γ induzierten inflammatorischen Reizes eine erhöhte Expression von miR-7 für alle untersuchten HLA-Konstellationen nachgewiesen werden (Abbildung 3.34b). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass miR-7 an der Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen beteiligt ist. Darauf deuteten auch Ergebnisse von Bravo-Egana *et al*. hin. Sie konnten in den Inselzellen des Pankreas nach Stimulation mit einem Mix der Zytokine IL-1β, IFN-γ und TNF-α bei diversen miRNAs, unter anderem auch bei miR-7, eine Steigerung in der Expression nachweisen (Bravo-Egana *et al.*, 2012). Detaillierte Untersuchungen des Effekts einer IFN-γ-Stimulation auf die Expression von miR-7 wurden bis jetzt in der Literatur noch nicht beschrieben. Die funktionelle Bedeutung des Ergebnisses der vorliegenden Arbeit für inflammatorische Prozesse muss daher durch weitere Analysen im Detail untersucht werden.

4.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf Unterschiede in der Expression von für T1D protektiven und prädisponierenden Allelen von HLA-Klasse-II-Genen in B-LCLs hin. Interessanterweise wurde mittels RNA-Seq eine reduzierte Expression der dominant protektiven Allele sowohl für *HLA-DQA1*, als auch für *HLA-DQB1* gefunden. Es ist jedoch bekannt, dass die protektiven HLA-Klasse-II-Moleküle gegenüber den prädisponierenden HLA-Klasse-II-Molekülen stabiler sind (Ettinger *et al.*, 1998), so dass eine reduzierte Expression auf mRNA-Ebene nicht automatisch auf eine verringerte Proteinmenge schließen lässt. Da die Menge prädisponierender und protektiver HLA-Klasse-II-Moleküle an der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen einen Einfluss auf die Entstehung von Autoimmunerkrankungen haben könnte, ist es sinnvoll in weiterführenden Studien zu untersuchen, ob die Expression protektiver HLA-Klasse-II-Moleküle an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen sich von der Expression prädisponierender

HLA-Klasse-II-Moleküle unterscheidet. Eine unterschiedliche Expression prädisponierender und protektiver HLA-Klasse-II-Moleküle an der Zelloberfläche könnte die Anzahl an Interaktionen zwischen T-Helferzellen und antigenpräsentierenden Zellen entsprechend verändern. Dadurch wäre eine Verschiebung des Gleichgewichts von Th1- und Th2-Zellen möglich, wodurch die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigt oder verhindert werden könnte (Baumgart *et al.*, 1998; Heldt *et al.*, 2003).

Außerdem wurde schon gezeigt, dass protektive HLA-Klasse-II-Moleküle mit den prädisponierenden HLA-Klasse-II-Molekülen um die Präsentation prozessierter diabetogener Antigene konkurrieren können. Dadurch wird die Menge an gebundenen Autoantigenen an prädisponierenden HLA-Klasse-II-Molekülen, die für das Auslösen einer T-Zellvermittelten Autoimmunreaktion benötigt wird, nicht mehr erreicht (Nepom und Kwok, 1998; Kelly *et al.*, 2003). Weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Expression protektiver und prädisponierender HLA-Klasse-II-Moleküle an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen würden daher einen besseren Einblick in die Rolle allelspezifischer Expressionsunterschiede von HLA-Klasse-II-Genen bei der Pathogenese des T1D ermöglichen. Des Weiteren ist es denkbar, dass ein besseres Verständnis darüber, wie die protektiven bzw. prädisponierenden HLA-Klasse-II-Gene in bestimmten Zelltypen exprimiert werden, die Entwicklung einer Therapie ermöglicht, welche auf der Beeinflussung der Expression spezifischer mit T1D assoziierter Gene basiert.

In dieser Arbeit konnten miRNAs gefunden werden, die bei verschiedenen HLA-Konstellationen differentiell exprimiert waren. Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen der Expression bestimmter miRNAs und der Expression der Transkriptionsfaktoren *RFX1* und *RFX5*, die an der Regulation der HLA-Klasse-II-Expression beteiligt sind, beobachtet werden. Dabei nahm die Expression von *RFX1* und *RFX5* mit steigender Expression von miR-9 bzw. miR-9* ab. Um den Einfluss dieser miRNAs auf die Expression von HLA-Klasse-II-Genen genauer zu untersuchen, wäre es möglich die Expression dieser miRNAs mit Hilfe synthetischer miRNAs (*miRNA mimics*) zu steigern oder die Interaktion der miRNAs mit der 3´UTR der Ziel-mRNAs mit Hilfe von antisense Sequenzen (*miRNA antagomirs*) zu inhibieren (Lindsay, 2008).

Da allelspezifische Polymorphismen in der 3´UTR von HLA-Klasse-II-Transkripten die Regulation der Expression durch miRNAs durch unterschiedliche Komplementaritäten zwischen miRNA und mRNA beeinflussen könnten, müssten des Weiteren die entsprechenden Sequenzen der 3´UTRs ermittelt werden. Anschließend wäre es möglich die mRNAs protektiver und prädisponierender HLA-Klasse-II-Allele als potentielle Ziele für bestimmte miRNAs mittels bioinformatischer Vorhersagemodelle *in silico* zu identifizieren. Darauf aufbauend könnten miRNAs, die als potentielle Regulatoren bestimmter HLA-Klasse-II-Allele in Frage kommen, mittels molekularbiologischer Assays *in vitro* validiert werden.

Da miRNAs auch an der Entwicklung eines Autoimmundiabetes beteiligt sind (Pandey *et al.*, 2009; Fernandez-Valverde *et al.*, 2011) und schon gezeigt wurde, dass miRNAs im Serum und Plasma sehr stabil vorliegen (Cortez *et al.*, 2011), wäre es zudem interessant, miRNAs im Serum bzw. Plasma zu identifizieren, welche als Biomarker für T1D dienen könnten.

5 Zusammenfassung

Typ 1 Diabetes (T1D) ist eine multifaktorielle Autoimmunerkrankung, bei der die insulinproduzierenden β-Zellen des Pankreas zerstört werden. Der am stärksten mit der Erkrankung assoziierte Genlocus ist der des humanen Leukozytenantigen (HLA)-Systems, der neben den HLA-Klasse-III-Genen die hoch-polymorphen HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Gene umfasst. Bestimmte HLA-Konstellationen (Kombinationen von HLA-Haplotypen) der HLA-Klasse-II-Gene *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* und *HLA-DRB1* sind mit einer erhöhten Suszeptibilität für T1D assoziiert. In diesem Kontext sollte in dieser Arbeit zum einen der Einfluss verschiedener HLA-Konstellationen auf die Produktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine untersucht werden. Des Weiteren sollten Expressionsunterschiede prädisponierender und protektiver Allele der Gene *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* identifiziert werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob microRNAs (miRNAs) in Abhängigkeit von der HLA-Konstellation unterschiedlich exprimiert werden.

Für alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden lymphoblastoide B-Zelllinien (B-LCLs) verwendet. Um zuverlässige und vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurden zunächst identische Ausgangsbedingungen zur Kultivierung von B-LCLs generiert und die Funktionalität von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) als inflammatorischer Reiz auf B-LCLs verifiziert.

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass bestimmte HLA-Haplotypen einen direkten Einfluss auf das Zytokinmuster haben können. Daher wurde die Zytokinproduktion des Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α) als Vertreter proinflammatorischer Zytokine, dessen Gen in der HLA-Region lokalisiert ist, und von Interleukin-10 (IL-10) als Vertreter antiinflammatorischer Zytokine, im Kontext verschiedener mit T1D assoziierter HLA-Konstellationen mittels *real-time*-quantitativer-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) und *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) untersucht. Es zeigte sich ein von der HLA-Konstellation abhängiger Trend, wonach die TNF-α-Sekretion nach Kurzzeitstimulation mit PMA für die HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko reduziert war.

Um mittels qRT-PCR valide Expressionsdaten bestimmter HLA-Klasse-II-Gene bei verschiedenen HLA-Konstellationen zu erhalten, wurde zunächst die Spezifität der verwendeten Primer für die in dieser Arbeit untersuchten Allele überprüft. In der anschließenden Expressionsanalyse zeigten sich zwischen verschiedenen HLA-Kon-

stellationen für die Gene *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* leichte Unterschiede. Auch wurden anhand der Expressionsanalysen heterozygoter Individuen mittels Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung (RNA-Seq), die auf der Hochdurchsatzmethode *Next-Generation Sequencing* basiert, allelspezifische Differenzen für *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* identifiziert, wobei diese Unterschiede bei *HLA-DQB1* stärker waren. Das als hoch-protektiv geltende Allel *DQB1*0602* war dabei geringer exprimiert, als die übrigen Allele. Die allelspezifischen Expressionsunterschiede liefern einen Hinweis darauf, dass neben strukturellen Unterschieden in der peptidbindenden Grube von HLA-Klasse-II-Molekülen auch Unterschiede in der Expression zwischen prädisponierenden und protektiven Allelen bestimmter HLA-Klasse-II-Gene die Pathogenese des T1D und anderer Autoimmunerkrankungen beeinflussen könnten.

Mit Hilfe von Microarray- und qRT-PCR-Analysen konnten vier miRNAs identifiziert werden (miR-363, miR-181c, miR-181d und miR-424), die bei der HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko tendenziell geringer exprimiert waren, als bei HLA-Konstellationen, mit einem geringeren Erkrankungsrisiko. Da für die Mehrzahl der Allele von *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* keine ausreichenden Sequenzinformationen über die 3´UTR, an welche miRNAs binden, vorlagen, war ein Nachweis potentieller allelspezifischer miRNA-mRNA-Interaktionen nicht möglich. Für miR-181c, miR-181d und miR-424 wurden jedoch immunregulatorische Faktoren als potentielle Ziele gefunden. Die verringerte miRNA-Expression bei der HLA-Konstellation mit dem höchsten Erkrankungsrisiko resultiert möglicherweise in einer Steigerung dieser immunregulatorischen Faktoren. Des Weiteren wurde eine negative Korrelation zwischen der Expression von miR-9 und miR-9* und der Expression der HLA-Klasse-II-regulierenden Faktoren *RFX1* und *RFX5* gefunden, was auf eine Beteiligung dieser miRNAs an der Regulation der HLA-Klasse-II-Expression hindeutet. Weiterhin war in Folge eines durch IFN-γ induzierten inflammatorischen Milieus die miR-7 hochreguliert, was ein Hinweis darauf ist, dass miR-7 an der Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen beteiligt sein könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Indizien dafür, dass neben strukturellen Unterschieden zwischen den HLA-Klasse-II-Molekülen auch eine differentielle Expression der Allele bestimmter HLA-Klasse-II-Gene an der Pathogenese des T1D beteiligt sein könnte. Durch die Charakterisierung von dosisabhängigen Effekten der mit T1D assoziierten HLA-Klasse-II-Moleküle an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen, könnten diese Erkenntnisse erweitert und für mögliche Therapieansätze verwendet werden.

6 Literaturverzeichnis

1. **Agudelo W. A. und Patarroyo M. E.** (2010). Quantum chemical analysis of MHC-peptide interactions for vaccine design. *Mini Rev Med Chem* **10**: 746-758.

2. **Alberola-Ila J., Hogquist K. A., Swan K. A., Bevan M. J. und Perlmutter R. M.** (1996). Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J Exp Med* **184**: 9-18.

3. **Alexiou P., Maragkakis M., Papadopoulos G. L., Reczko M. und Hatzigeorgiou A. G.** (2009). Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification. *Bioinformatics* **25**: 3049-3055.

4. **Altman S. A., Randers L. und Rao G.** (1993). Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog* **9**: 671-674.

5. **Amador-Patarroyo M. J., Rodriguez-Rodriguez A. und Montoya-Ortiz G.** (2012). How does age at onset influence the outcome of autoimmune diseases? *Autoimmune Dis* **2012**: 251730.

6. **Andersen L. C., Beaty J. S., Nettles J. W., Seyfried C. E., Nepom G. T. und Nepoom B. S.** (1991). Allelic polymorphism in transcriptional regulatory regions of HLA-DQB genes. *J Exp Med* **173**: 181-192.

7. **Apostolidis S. A., Lieberman L. A., Kis-Toth K., Crispin J. C. und Tsokos G. C.** (2011). The dysregulation of cytokine networks in systemic lupus erythematosus. *J Interferon Cytokine Res* **31**: 769-779.

8. **Baisch J. M., Weeks T., Giles R., Hoover M., Stastny P. und Capra J. D.** (1990). Analysis of HLA-DQ genotypes and susceptibility in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* **322**: 1836-1841.

9. **Bartel B. und Bartel D. P.** (2003). MicroRNAs: at the root of plant development? *Plant Physiol* **132**: 709-717.

10. **Bartel D. P.** (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281-297.

11. **Bartel D. P.** (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**: 215-233.

12. **Baumgart M., Moos V., Schuhbauer D. und Müller B.** (1998). Differential expression of major histocompatibility complex class II genes on murine macrophages associated with T cell cytokine profile and protective/suppressive effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 6936-6940.

13. **Beaty J. S., West K. A. und Nepom G. T.** (1995). Functional effects of a natural polymorphism in the transcriptional regulatory sequence of HLA-DQB1. *Mol Cell Biol* **15**: 4771-4782.

14. **Beissert S., Schwarz A. und Schwarz T.** (2006). Regulatory T cells. *J Invest Dermatol* **126**: 15-24.

15. **Bell G. I., Horita S. und Karam J. H.** (1984). A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* **33**: 176-183.

16. **Bennett S. T., Lucassen A. M., Gough S. C., Powell E. E., Undlien D. E., Pritchard L. E., Merriman M. E., Kawaguchi Y., Dronsfield M. J., Pociot F. und et al.** (1995). Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet* **9**: 284-292.

17. **Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M. und Hannon G. J.** (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363-366.

18. **Bertoglio J. H.** (1983). Monocyte-independent stimulation of human B lymphocytes by phorbol myristate. *J Immunol* **131**: 2279-2281.

19. **Bilate A. M. und Lafaille J. J.** (2010). Can TNF-alpha boost regulatory T cells? *J Clin Invest* **120**: 4190-4192.

20. **Bobbala D., Chen X. L., Leblanc C., Mayhue M., Stankova J., Tanaka T., Chen Y. G., Ilangumaran S. und Ramanathan S.** (2012). Interleukin-15 plays an essential role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Diabetologia* **55**: 3010-3020.

21. **Boehringer N., Hagens G., Songeon F., Isler P. und Nicod L. P.** (1999). Differential regulation of tumor necrosing factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-10 (IL-10) secretion by protein kinase and phosphatase inhibitors in human alveolar macrophages. *Eur Cytokine Netw* **10**: 211-218.

22. **Bravo-Egana V., Rosero S., Klein D., Jiang Z., Vargas N., Tsinoremas N., Doni M., Podetta M., Ricordi C., Molano R. D., Pileggi A. und Pastori R. L.** (2012). Inflammation-Mediated Regulation of MicroRNA Expression in Transplanted Pancreatic Islets. *J Transplant* **2012**: 723614.

23. **Bravo-Egana V., Rosero S., Molano R. D., Pileggi A., Ricordi C., Dominguez-Bendala J. und Pastori R. L.** (2008). Quantitative differential expression analysis reveals miR-7 as major islet microRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **366**: 922-926.

24. **Brennecke J., Stark A., Russell R. B. und Cohen S. M.** (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* **3**: e85.

25. **Britten A. C., Mijovic C. H., Barnett A. H. und Kelly M. A.** (2009). Differential expression of HLA-DQ alleles in peripheral blood mononuclear cells: alleles associated with susceptibility to and protection from autoimmune type 1 diabetes. *Int J Immunogenet* **36**: 47-57.

26. **Bromberg J.** (2013). TNF-alpha trips up Treg cells in rheumatoid arthritis. *Nat Med* **19**: 269-270.

27. **Brown J. H., Jardetzky T., Saper M. A., Samraoui B., Bjorkman P. J. und Wiley D. C.** (1988). A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* **332**: 845-850.

28. **Brown S. M.** (2012). Sequencing-by-Synthesis: Explaining the Illumina Sequencing Technology. von http://bitesizebio.com/13546/sequencing-by-synthesis-explaining-the-illumina-sequencing-technology/. (31. Januar 2014).

29. **Cai X., Hagedorn C. H. und Cullen B. R.** (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* **10**: 1957-1966.

30. **Caliskan M., Cusanovich D. A., Ober C. und Gilad Y.** (2011). The effects of EBV transformation on gene expression levels and methylation profiles. *Hum Mol Genet* **20**: 1643-1652.

31. **Caruso C., Candore G., Modica M. A., Bonanno C. T., Sireci G., Dieli F. und Salerno A.** (1996). Major histocompatibility complex regulation of cytokine production. *J Interferon Cytokine Res* **16**: 983-988.

32. **Castagna M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Kikkawa U. und Nishizuka Y.** (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* **257**: 7847-7851.

33. **Celada A. und Maki R. A.** (1991). IFN-gamma induces the expression of the genes for MHC class II I-A beta and tumor necrosis factor through a protein kinase C-independent pathway. *J Immunol* **146**: 114-120.

34. **Chen K., Song F., Calin G. A., Wei Q., Hao X. und Zhang W.** (2008). Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology. *Carcinogenesis* **29**: 1306-1311.

35. **Chendrimada T. P., Gregory R. I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K. und Shiekhattar R.** (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**: 740-744.

36. **Cheung V. G., Conlin L. K., Weber T. M., Arcaro M., Jen K. Y., Morley M. und Spielman R. S.** (2003). Natural variation in human gene expression assessed in lymphoblastoid cells. *Nat Genet* **33**: 422-425.

37. **Cheung V. G. und Spielman R. S.** (2009). Genetics of human gene expression: mapping DNA variants that influence gene expression. *Nat Rev Genet* **10**: 595-604.

38. **Cho R. J., Huang M., Campbell M. J., Dong H., Steinmetz L., Sapinoso L., Hampton G., Elledge S. J., Davis R. W. und Lockhart D. J.** (2001). Transcriptional regulation and function during the human cell cycle. *Nat Genet* **27**: 48-54.

39. **Choy E., Yelensky R., Bonakdar S., Plenge R. M., Saxena R., De Jager P. L., Shaw S. Y., Wolfish C. S., Slavik J. M., Cotsapas C., Rivas M., Dermitzakis E. T., Cahir-McFarland E., Kieff E., Hafler D., Daly M. J. und Altshuler D.** (2008). Genetic analysis of human traits in vitro: drug response and gene expression in lymphoblastoid cell lines. *PLoS Genet* **4**: e1000287.

40. **Christen U., Wolfe T., Mohrle U., Hughes A. C., Rodrigo E., Green E. A., Flavell R. A. und von Herrath M. G.** (2001). A dual role for TNF-alpha in type 1 diabetes: islet-specific expression abrogates the ongoing autoimmune process when induced late but not early during pathogenesis. *J Immunol* **166**: 7023-7032.

41. **Coffman R. L.** (2006). Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. *Nat Immunol* **7**: 539-541.

42. **Collins T., Korman A. J., Wake C. T., Boss J. M., Kappes D. J., Fiers W., Ault K. A., Gimbrone M. A., Jr., Strominger J. L. und Pober J. S.** (1984). Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 4917-4921.

43. **Concannon P., Erlich H. A., Julier C., Morahan G., Nerup J., Pociot F., Todd J. A. und Rich S. S.** (2005). Type 1 diabetes: evidence for susceptibility loci from four genome-wide linkage scans in 1,435 multiplex families. *Diabetes* **54**: 2995-3001.

44. **Congia M., Patel S., Cope A. P., De Virgiliis S. und Sonderstrup G.** (1998). T cell epitopes of insulin defined in HLA-DR4 transgenic mice are derived from preproinsulin and proinsulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3833-3838.

45. **Correa-Medina M., Bravo-Egana V., Rosero S., Ricordi C., Edlund H., Diez J. und Pastori R. L.** (2009). MicroRNA miR-7 is preferentially expressed in endocrine cells of the developing and adult human pancreas. *Gene Expr Patterns* **9**: 193-199.

46. **Cortez M. A., Bueso-Ramos C., Ferdin J., Lopez-Berestein G., Sood A. K. und Calin G. A.** (2011). MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* **8**: 467-477.

47. **Cucca F., Lampis R., Congia M., Angius E., Nutland S., Bain S. C., Barnett A. H. und Todd J. A.** (2001). A correlation between the relative predisposition of MHC class II alleles to type 1 diabetes and the structure of their proteins. *Hum Mol Genet* **10**: 2025-2037.

48. **Davies J. L., Kawaguchi Y., Bennett S. T., Copeman J. B., Cordell H. J., Pritchard L. E., Reed P. W., Gough S. C., Jenkins S. C., Palmer S. M. und et al.** (1994). A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* **371**: 130-136.

49. **de Lichtenberg U., Jensen L. J., Fausboll A., Jensen T. S., Bork P. und Brunak S.** (2005). Comparison of computational methods for the identification of cell cycle-regulated genes. *Bioinformatics* **21**: 1164-1171.

50. **Dixon A. L., Liang L., Moffatt M. F., Chen W., Heath S., Wong K. C., Taylor J., Burnett E., Gut I., Farrall M., Lathrop G. M., Abecasis G. R. und Cookson W. O.** (2007). A genome-wide association study of global gene expression. *Nat Genet* **39**: 1202-1207.

51. **Donner H., Seidl C., Rau H., Herwig J., Seifried E., Usadel K. H. und Badenhoop K.** (2002). Unbalanced amounts of HLA-DQA1 allele mRNA: DQA1*03 shows high and DQA1*0501 low amounts of mRNA in heterozygous individuals. *Eur J Immunogenet* **29**: 321-330.

52. **Duan S., Huang R. S., Zhang W., Bleibel W. K., Roe C. A., Clark T. A., Chen T. X., Schweitzer A. C., Blume J. E., Cox N. J. und Dolan M. E.** (2008). Genetic architecture of transcript-level variation in humans. *Am J Hum Genet* **82**: 1101-1113.

53. **Eerligh P., van Lummel M., Zaldumbide A., Moustakas A. K., Duinkerken G., Bondinas G., Koeleman B. P., Papadopoulos G. K. und Roep B. O.** (2011). Functional consequences of HLA-DQ8 homozygosity versus heterozygosity for islet. *Genes Immun* **12**: 415-427.

54. **Endale Ahanda M. L., Fritz E. R., Estelle J., Hu Z. L., Madsen O., Groenen M. A., Beraldi D., Kapetanovic R., Hume D. A., Rowland R. R., Lunney J. K., Rogel-Gaillard C., Reecy J. M. und Giuffra E.** (2012). Prediction of altered 3'-UTR miRNA-binding sites from RNA-Seq data: the swine leukocyte antigen complex (SLA) as a model region. *PLoS One* **7**: e48607.

55. **Ettinger R. A. und Kwok W. W.** (1998). A peptide binding motif for HLA-DQA1*0102/DQB1*0602, the class II MHC molecule associated with dominant protection in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol* **160**: 2365-2373.

56. **Ettinger R. A., Liu A. W., Nepom G. T. und Kwok W. W.** (1998). Exceptional stability of the HLA-DQA1*0102/DQB1*0602 alpha beta protein dimer, the class II MHC molecule associated with protection from insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol* **161**: 6439-6445.

57. **Ettinger R. A., Liu A. W., Nepom G. T. und Kwok W. W.** (2000). Beta 57-Asp plays an essential role in the unique SDS stability of HLA-DQA1*0102/DQB1*0602 alpha beta protein dimer, the class II MHC allele associated with protection from insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol* **165**: 3232-3238.

58. **Fehniger T. A. und Caligiuri M. A.** (2001). Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* **97**: 14-32.

59. **Fernandes A. P., Foss M. C. und Donadi E. A.** (2004). HLA-DQB1 alleles may influence the surface expression of DQ molecules in lymphomononuclear cells of type 1 diabetes mellitus patients. *Scand J Immunol* **59**: 305-309.

60. **Fernandez-Valverde S. L., Taft R. J. und Mattick J. S.** (2011). MicroRNAs in beta-cell biology, insulin resistance, diabetes and its complications. *Diabetes* **60**: 1825-1831.

61. **Fernandez S., Wassmuth R., Knerr I., Frank C. und Haas J. P.** (2003). Relative quantification of HLA-DRA1 and -DQA1 expression by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Eur J Immunogenet* **30**: 141-148.

62. **Ferstl B., Zacher T., Lauer B., Blagitko-Dorfs N., Carl A. und Wassmuth R.** (2004). Allele-specific quantification of HLA-DQB1 gene expression by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Genes Immun* **5**: 405-416.

63. **Friedman R. C., Farh K. K., Burge C. B. und Bartel D. P.** (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* **19**: 92-105.

64. **Furst D., Zollikofer Ch, Schrezenmeier H. und Mytilineos J.** (2012). TNFA promoter alleles--frequencies and linkage with classical HLA genes in a South German Caucasian population. *Tissue Antigens* **80**: 502-508.

65. **Garvie C. W., Stagno J. R., Reid S., Singh A., Harrington E. und Boss J. M.** (2007). Characterization of the RFX complex and the RFX5(L66A) mutant: implications for the regulation of MHC class II gene expression. *Biochemistry* **46**: 1597-1611.

66. **Geluk A., van Meijgaarden K. E., Schloot N. C., Drijfhout J. W., Ottenhoff T. H. und Roep B. O.** (1998). HLA-DR binding analysis of peptides from islet antigens in IDDM. *Diabetes* **47**: 1594-1601.

67. **Giroux M., Schmidt M. und Descoteaux A.** (2003). IFN-gamma-induced MHC class II expression: transactivation of class II transactivator promoter IV by IFN regulatory factor-1 is regulated by protein kinase C-alpha. *J Immunol* **171**: 4187-4194.

68. **Glynn L. E.** (1988). Natural history of the major histocompatibility complex. Jan Klein, John Wiley and Sons: New York. 775 pages, £90.75 (1986). *Cell Biochemistry and Function* **6**: 222-222.

69. **Goring H. H., Curran J. E., Johnson M. P., Dyer T. D., Charlesworth J., Cole S. A., Jowett J. B., Abraham L. J., Rainwater D. L., Comuzzie A. G., Mahaney M. C., Almasy L., MacCluer J. W., Kissebah A. H., Collier G. R., Moses E. K. und Blangero J.** (2007). Discovery of expression QTLs using large-scale transcriptional profiling in human lymphocytes. *Nat Genet* **39**: 1208-1216.

70. **Gowans D., O'Sullivan A., Rollinson S., Roddam P., Groves M., Fegan C., Morgan G. und Bowen D.** (2002). Allele and haplotype frequency at human leucocyte antigen class I/II and immunomodulatory cytokine loci in patients with myelodysplasia and acute myeloid leukaemia: in search of an autoimmune aetiology. *Br J Haematol* **117**: 541-545.

71. **Griffiths-Jones S., Saini H. K., van Dongen S. und Enright A. J.** (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* **36**: D154-158.

72. **Grimson A., Farh K. K., Johnston W. K., Garrett-Engele P., Lim L. P. und Bartel D. P.** (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* **27**: 91-105.

73. **Grinberg-Bleyer Y., Saadoun D., Baeyens A., Billiard F., Goldstein J. D., Gregoire S., Martin G. H., Elhage R., Derian N., Carpentier W., Marodon G., Klatzmann D., Piaggio E. und Salomon B. L.** (2010). Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *J Clin Invest* **120**: 4558-4568.

74. **Groen H., Klatter F., Pater J., Nieuwenhuis P. und Rozing J.** (2003). Temporary, but essential requirement of CD8+ T cells early in the pathogenesis of diabetes in BB rats as revealed by thymectomy and CD8 depletion. *Clin Dev Immunol* **10**: 141-151.

75. **Gruys E., Toussaint M. J., Niewold T. A. und Koopmans S. J.** (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* **6**: 1045-1056.

76. **Guay C., Roggli E., Nesca V., Jacovetti C. und Regazzi R.** (2011). Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Transl Res* **157**: 253-264.

77. **Hammer J., Gallazzi F., Bono E., Karr R. W., Guenot J., Valsasnini P., Nagy Z. A. und Sinigaglia F.** (1995). Peptide binding specificity of HLA-DR4

molecules: correlation with rheumatoid arthritis association. *J Exp Med* **181**: 1847-1855.

78. **Hanson M. S., Cetkovic-Cvrlje M., Ramiya V. K., Atkinson M. A., Maclaren N. K., Singh B., Elliott J. F., Serreze D. V. und Leiter E. H.** (1996). Quantitative thresholds of MHC class II I-E expressed on hemopoietically derived antigen-presenting cells in transgenic NOD/Lt mice determine level of diabetes resistance and indicate mechanism of protection. *J Immunol* **157**: 1279-1287.

79. **Heldt C., Listing J., Sozeri O., Blasing F., Frischbutter S. und Muller B.** (2003). Differential expression of HLA class II genes associated with disease susceptibility and progression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **48**: 2779-2787.

80. **Helmberg W., Dunivin R., und Feolo M.** (2004). The sequencing-based typing tool of dbMHC: typing highly polymorphic gene sequences. *Nucleic Acids Res* **32**: W173-175.

81. **Horton R., Gibson R., Coggill P., Miretti M., Allcock R. J., Almeida J., Forbes S., Gilbert J. G., Halls K., Harrow J. L., Hart E., Howe K., Jackson D. K., Palmer S., Roberts A. N., Sims S., Stewart C. A., Traherne J. A., Trevanion S., Wilming L., Rogers J., de Jong P. J., Elliott J. F., Sawcer S., Todd J. A., Trowsdale J. und Beck S.** (2008). Variation analysis and gene annotation of eight MHC haplotypes: the MHC Haplotype Project. *Immunogenetics* **60**: 1-18.

82. **Ivessa N. E., De Lemos-Chiarandini C., Gravotta D., Sabatini D. D. und Kreibich G.** (1995). The Brefeldin A-induced retrograde transport from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum depends on calcium sequestered to intracellular stores. *J Biol Chem* **270**: 25960-25967.

83. **Iyer S. S. und Cheng G.** (2012). Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* **32**: 23-63.

84. **Janeway C. A., Jr., Travers P. und Walport M.** (2001). The major histocompatibility complex and its functions. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease,* Garland Science. **5th edition**, von http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27156/. (31. August 2013).

85. **Jiang H. und Chess L.** (2004). An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* **114**: 1198-1208.

86. **Jones E. Y., Fugger L., Strominger J. L. und Siebold C.** (2006). MHC class II proteins and disease: a structural perspective. *Nat Rev Immunol* **6**: 271-282.

87. **Keffer J., Probert L., Cazlaris H., Georgopoulos S., Kaslaris E., Kioussis D. und Kollias G.** (1991). Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo J* **10**: 4025-4031.

88. **Kelly M. A., Rayner M. L., Mijovic C. H. und Barnett A. H.** (2003). Molecular aspects of type 1 diabetes. *Mol Pathol* **56**: 1-10.

89. **Khvorova A., Reynolds A. und Jayasena S. D.** (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**: 209-216.

90. **Killemann U. und Schneider E.** (2004). Vergleich verschiedenster Methoden zur Bestimmung von Zellzahlen und Zellvitalitäten bei der Optimierung der Formulierung von Kulturmedien mit Hybridoma-Zellen. *BIOspektrum*.

91. **Kim E. Y., Chi H. H., Rajaiah R. und Moudgil K. D.** (2008). Exogenous tumour necrosis factor alpha induces suppression of autoimmune arthritis. *Arthritis Res Ther* **10**: R38.

92. **Kloosterman W. P., Lagendijk A. K., Ketting R. F., Moulton J. D. und Plasterk R. H.** (2007). Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol* **5**: e203.

93. **Koeleman B. P., Lie B. A., Undlien D. E., Dudbridge F., Thorsby E., de Vries R. R., Cucca F., Roep B. O., Giphart M. J. und Todd J. A.** (2004). Genotype effects and epistasis in type 1 diabetes and HLA-DQ trans dimer associations with disease. *Genes Immun* **5**: 381-388.

94. **Kredo-Russo S., Ness A., Mandelbaum A. D., Walker M. D. und Hornstein E.** (2012). Regulation of pancreatic microRNA-7 expression. *Exp Diabetes Res* **2012**: 695214.

95. **Kwok W. W., Domeier M. L., Raymond F. C., Byers P. und Nepom G. T.** (1996). Allele-specific motifs characterize HLA-DQ interactions with a diabetes-associated peptide derived from glutamic acid decarboxylase. *J Immunol* **156**: 2171-2177.

96. **Kwon M. J., Soh J. W. und Chang C. H.** (2006). Protein kinase C delta is essential to maintain CIITA gene expression in B cells. *J Immunol* **177**: 950-956.

97. **Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W. und Tuschl T.** (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**: 853-858.

98. **Lagos-Quintana M., Rauhut R., Meyer J., Borkhardt A. und Tuschl T.** (2003). New microRNAs from mouse and human. *Rna* **9**: 175-179.

99. **Lan M. S., Wasserfall C., Maclaren N. K. und Notkins A. L.** (1996). IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6367-6370.

100. **Lau N. C., Lim L. P., Weinstein E. G. und Bartel D. P.** (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. *Science* **294**: 858-862.

101. **Lee K. H., Wucherpfennig K. W. und Wiley D. C.** (2001). Structure of a human insulin peptide-HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes. *Nat Immunol* **2**: 501-507.

102. **Lee R. C., Feinbaum R. L. und Ambros V.** (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75**: 843-854.

103. **Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S. und Kim V. N.** (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**: 415-419.

104. **Lehuen A., Diana J., Zaccone P. und Cooke A.** (2010). Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol* **10**: 501-513.

105. **Lewis B. P., Burge C. B. und Bartel D. P.** (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**: 15-20.

106. **Lindsay M. A.** (2008). microRNAs and the immune response. *Trends Immunol* **29**: 343-351.

107. **Liston A., Lesage S., Wilson J., Peltonen L. und Goodnow C. C.** (2003). Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* **4**: 350-354.

108. **Liu R., Ma X., Xu L., Wang D., Jiang X., Zhu W., Cui B., Ning G., Lin D. und Wang S.** (2012). Differential microRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from Graves' disease patients. *J Clin Endocrinol Metab* **97**: E968-972.

109. **Loh J. E., Chang C. H., Fodor W. L. und Flavell R. A.** (1992). Dissection of the interferon gamma-MHC class II signal transduction pathway reveals that type I and type II interferon systems share common signalling component(s). *Embo J* **11**: 1351-1363.

110. **Longstreth W. T., Jr., Koepsell T. D., Ton T. G., Hendrickson A. F. und van Belle G.** (2007). The epidemiology of narcolepsy. *Sleep* **30**: 13-26.

111. **Louis P., Vincent R., Cavadore P., Clot J. und Eliaou J. F.** (1994). Differential transcriptional activities of HLA-DR genes in the various haplotypes. *J Immunol* **153**: 5059-5067.

112. **Lu J. und Clark A. G.** (2012). Impact of microRNA regulation on variation in human gene expression. *Genome Res* **22**: 1243-1254.

113. **Lund E., Guttinger S., Calado A., Dahlberg J. E. und Kutay U.** (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**: 95-98.

114. **Maffei A., Harris P. E., Reed E. F., Del Pozzo G., Ciullo M., Suciu-Foca N. und Guardiola J.** (1997). Differential expression of insulin-dependent diabetes mellitus-associated HLA-DQA1 alleles in vivo. *Eur J Immunol* **27**: 1549-1556.

115. **Maglott D., Ostell J., Pruitt K. D. und Tatusova T.** (2011). Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res* **39**: D52-57.

116. **Maniataki E. und Mourelatos Z.** (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* **19**: 2979-2990.

117. **Maragkakis M., Reczko M., Simossis V. A., Alexiou P., Papadopoulos G. L., Dalamagas T., Giannopoulos G., Goumas G., Koukis E., Kourtis K., Vergoulis T., Koziris N., Sellis T., Tsanakas P. und Hatzigeorgiou A. G.** (2009). DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res* **37**: W273-276.

118. **Marsh S. G., Albert E. D., Bodmer W. F., Bontrop R. E., Dupont B., Erlich H. A., Fernandez-Vina M., Geraghty D. E., Holdsworth R., Hurley C. K., Lau M., Lee K. W., Mach B., Maiers M., Mayr W. R., Muller C. R., Parham P., Petersdorf E. W., Sasazuki T., Strominger J. L., Svejgaard A., Terasaki P. I., Tiercy J. M. und Trowsdale J.** (2010). Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* **75**: 291-455.

119. **Martin M. M., Buckenberger J. A., Jiang J., Malana G. E., Nuovo G. J., Chotani M., Feldman D. S., Schmittgen T. D. und Elton T. S.** (2007). The human angiotensin II type 1 receptor +1166 A/C polymorphism attenuates microrna-155 binding. *J Biol Chem* **282**: 24262-24269.

120. **Matthews V. B. und Price P.** (2000). The H2(b) haplotype modifies the production of pro-inflammatory cytokines: implications for immunopathology. *Eur Cytokine Netw* **11**: 640-646.

121. **McCarthy M. I.** (2010). Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *N Engl J Med* **363**: 2339-2350.

122. **Mehers K. L. und Gillespie K. M.** (2008). The genetic basis for type 1 diabetes. *Br Med Bull* **88**: 115-129.

123. **Mendell J. T. und Olson E. N.** (2012). MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell* **148**: 1172-1187.

124. **Mignot E.** (1998). Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology* **50**: S16-22.

125. **Mignot E., Lin L., Rogers W., Honda Y., Qiu X., Lin X., Okun M., Hohjoh H., Miki T., Hsu S., Leffell M., Grumet F., Fernandez-Vina M., Honda M. und Risch N.** (2001). Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. *Am J Hum Genet* **68**: 686-699.

126. **Mishra P. J., Humeniuk R., Longo-Sorbello G. S., Banerjee D. und Bertino J. R.** (2007). A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13513-13518.

127. **Morzycka-Wroblewska E., Munshi A., Ostermayer M., Harwood J. I. und Kagnoff M. F.** (1997). Differential expression of HLA-DQA1 alleles associated with promoter polymorphism. *Immunogenetics* **45**: 163-170.

128. **Moudgil K. D. und Choubey D.** (2011). Cytokines in autoimmunity: role in induction, regulation, and treatment. *J Interferon Cytokine Res* **31**: 695-703.

129. **Murphy K., Travers P. und Walport M.** (2009). *Janeway Immunologie*, Springer Spektrum. **7th edition:** S. 254.

130. **Neefjes J., Jongsma M. L., Paul P. und Bakke O.** (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* **11**: 823-836.

131. **Nepom G. T. und Kwok W. W.** (1998). Molecular basis for HLA-DQ associations with IDDM. *Diabetes* **47**: 1177-1184.

132. **Nerup J., Platz P., Andersen O. O., Christy M., Lyngsoe J., Poulsen J. E., Ryder L. P., Nielsen L. S., Thomsen M. und Svejgaard A.** (1974). HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet* **2**: 864-866.

133. **Nie H., Zheng Y., Li R., Guo T. B., He D., Fang L., Liu X., Xiao L., Chen X., Wan B., Chin Y. E. und Zhang J. Z.** (2013). Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis. *Nat Med* **19**: 322-328.

134. **Noble J. A. und Erlich H. A.** (2012). Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: a007732.

135. **O'Driscoll L.** (2006). The emerging world of microRNAs. *Anticancer Res* **26**: 4271-4278.

136. **Pandey A. K., Agarwal P., Kaur K. und Datta M.** (2009). MicroRNAs in diabetes: tiny players in big disease. *Cell Physiol Biochem* **23**: 221-232.

137. **Park Y. S., Wang C. Y., Ko K. W., Yang S. W., Park M., Yang M. C. und She J. X.** (1998). Combinations of HLA DR and DQ molecules determine the susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus in Koreans. *Hum Immunol* **59**: 794-801.

138. **Pauley K. M., Cha S. und Chan E. K.** (2009). MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun* **32**: 189-194.

139. **Piertney S. B. und Oliver M. K.** (2006). The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity (Edinb)* **96**: 7-21.

140. **Plaisance V., Abderrahmani A., Perret-Menoud V., Jacquemin P., Lemaigre F. und Regazzi R.** (2006). MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. *J Biol Chem* **281**: 26932-26942.

141. **Platzer C., Meisel C., Vogt K., Platzer M. und Volk H. D.** (1995). Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs. *Int Immunol* **7**: 517-523.

142. **Pociot F., Briant L., Jongeneel C. V., Molvig J., Worsaae H., Abbal M., Thomsen M., Nerup J. und Cambon-Thomsen A.** (1993). Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* **23**: 224-231.

143. **Poy M. N., Eliasson L., Krutzfeldt J., Kuwajima S., Ma X., Macdonald P. E., Pfeffer S., Tuschl T., Rajewsky N., Rorsman P. und Stoffel M.** (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* **432**: 226-230.

144. **Pugliese A., Gianani R., Moromisato R., Awdeh Z. L., Alper C. A., Erlich H. A., Jackson R. A. und Eisenbarth G. S.** (1995). HLA-DQB1*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetes* **44**: 608-613.

145. **Rabinovitch A.** (1998). An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* **14**: 129-151.

146. **Rabinovitch A. und Suarez-Pinzon W. L.** (2007). Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes. *Cell Biochem Biophys* **48**: 159-163.

147. **Raha O., Chowdhury S., Dasgupta S., Raychaudhuri P., Sarkar B. N., Raju P. V. und Rao V. R.** (2009). Approaches in type 1 diabetes research: A status report. *Int J Diabetes Dev Ctries* **29**: 85-101.

148. **Redondo M. J., Fain P. R. und Eisenbarth G. S.** (2001). Genetics of type 1A diabetes. *Recent Prog Horm Res* **56**: 69-89.

149. **Reith W., Herrero-Sanchez C., Kobr M., Silacci P., Berte C., Barras E., Fey S. und Mach B.** (1990). MHC class II regulatory factor RFX has a novel DNA-binding domain and a functionally independent dimerization domain. *Genes Dev* **4**: 1528-1540.

150. **Reith W. und Mach B.** (2001). The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression. *Annu Rev Immunol* **19**: 331-373.

151. **Robinson J., Mistry K., McWilliam H., Lopez R., Parham P. und Marsh S. G.** (2011). The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res* **39**:D1171-1176.

152. **Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J. L. und Bradley A.** (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* **14**: 1902-1910.

153. **Rosa F., Hatat D., Abadie A., Wallach D., Revel M. und Fellous M.** (1983). Differential regulation of HLA-DR mRNAs and cell surface antigens by interferon. *Embo J* **2**: 1585-1589.

154. **Rose N. R.** (2011). Critical cytokine pathways to cardiac inflammation. *J Interferon Cytokine Res* **31**: 705-710.

155. **Rotter J. I., Anderson C. E., Rubin R., Congleton J. E., Terasaki P. I. und Rimoin D. L.** (1983). HLA genotypic study of insulin-dependent diabetes the excess of DR3/DR4 heterozygotes allows rejection of the recessive hypothesis. *Diabetes* **32**: 169-174.

156. **Sabbah E., Savola K., Ebeling T., Kulmala P., Vahasalo P., Ilonen J., Salmela P. I. und Knip M.** (2000). Genetic, autoimmune, and clinical characteristics of childhood- and adult-onset type 1 diabetes. *Diabetes Care* **23**: 1326-1332.

157. **Sauerwein R. W., van der Meer W. G. und Aarden L. A.** (1987). Induction of proliferation of B prolymphocytic leukemia cells by phorbol ester. *Blood* **70**: 670-675.

158. **Sayed D., Hong C., Chen I. Y., Lypowy J. und Abdellatif M.** (2007). MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res* **100**: 416-424.

159. **Schärfe J.** (2004). Elektronische Zellvitalitätsbestimmung, ein Vergleich mit dem klassischen Trypanblau Assay. *BIOspektrum*.

160. **Schmidt D., Verdaguer J., Averill N. und Santamaria P.** (1997). A mechanism for the major histocompatibility complex-linked resistance to autoimmunity. *J Exp Med* **186**: 1059-1075.

161. **Schott M., Schatz D., Atkinson M., Krischer J., Mehta H., Vold B. und Maclaren N.** (1994). GAD65 autoantibodies increase the predictability but not the sensitivity of islet cell and insulin autoantibodies for developing insulin dependent diabetes mellitus. *J Autoimmun* **7**: 865-872.

162. **Schueler-Furman O., Altuvia Y., Sette A. und Margalit H.** (2000). Structure-based prediction of binding peptides to MHC class I molecules: application to a broad range of MHC alleles. *Protein Sci* **9**: 1838-1846.

163. **Schwarz D. S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N. und Zamore P. D.** (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**: 199-208.

164. **Sciaky N., Presley J., Smith C., Zaal K. J., Cole N., Moreira J. E., Terasaki M., Siggia E. und Lippincott-Schwartz J.** (1997). Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J Cell Biol* **139**: 1137-1155.

165. **Sharief M. K. und Hentges R.** (1991). Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* **325**: 467-472.

166. **Shaw B. E., Maldonado H., Madrigal J. A., Smith C., Petronzelli F., Mayor N. P., Potter M. N., Bodmer J. G. und Marsh S. G.** (2004). Polymorphisms in the TNFA gene promoter region show evidence of strong linkage disequilibrium with HLA and are associated with delayed neutrophil engraftment in unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Tissue Antigens* **63**: 401-411.

167. **She J. X.** (1996). Susceptibility to type I diabetes: HLA-DQ and DR revisited. *Immunol Today* **17**: 323-329.

168. **Sheehy M. J., Scharf S. J., Rowe J. R., Neme de Gimenez M. H., Meske L. M., Erlich H. A. und Nepom B. S.** (1989). A diabetes-susceptible HLA haplotype is best defined by a combination of HLA-DR and -DQ alleles. *J Clin Invest* **83**: 830-835.

169. **Simmonds M. J. und Gough S. C.** (2005). Genetic insights into disease mechanisms of autoimmunity. *Br Med Bull* **71**: 93-113.

170. **Singh B., Nikoopour E., Huszarik K., Elliott J. F. und Jevnikar A. M.** (2011). Immunomodulation and regeneration of islet Beta cells by cytokines in autoimmune type 1 diabetes. *J Interferon Cytokine Res* **31**: 711-719.

171. **Smith M. R., Ramsburg E. A., Kung H. F. und Durum S. K.** (1992). Components of the protein kinase C pathway induce Ia expression after injection into macrophages. *J Immunol* **149**: 1304-1310.

172. **Sollid L. M.** (2002). Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* **2**: 647-655.

173. **Sonkoly E., Stahle M. und Pivarcsi A.** (2008). MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol* **18**: 131-140.

174. **Steck A. K. und Rewers M. J.** (2011). Genetics of type 1 diabetes. *Clin Chem* **57**: 176-185.

175. **Stuchlikova M., Kantarova D., Michalkova D., Barak L. und Buc M.** (2006). Association of HLA-DPB1 alleles with type I diabetes mellitus in Slovak population. *Bratisl Lek Listy* **107**: 73-75.

176. **Sullivan K. E., Cutilli J., Piliero L. M., Ghavimi-Alagha D., Starr S. E., Campbell D. E. und Douglas S. D.** (2000). Measurement of cytokine secretion, intracellular protein expression, and mRNA in resting and stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol* **7**: 920-924.

177. **Tan Z., Randall G., Fan J., Camoretti-Mercado B., Brockman-Schneider R., Pan L., Solway J., Gern J. E., Lemanske R. F., Nicolae D. und Ober C.** (2007). Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet* **81**: 829-834.

178. **Tang X., Tang G. und Ozcan S.** (2008). Role of microRNAs in diabetes. *Biochim Biophys Acta* **1779**: 697-701.

179. **The MHC sequencing consortium** (1999). Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. . *Nature* **401**: 921-923.

180. **Thomson G., Valdes A. M., Noble J. A., Kockum I., Grote M. N., Najman J., Erlich H. A., Cucca F., Pugliese A., Steenkiste A., Dorman J. S., Caillat-Zucman S., Hermann R., Ilonen J., Lambert A. P., Bingley P. J., Gillespie K. M., Lernmark A., Sanjeevi C. B., Ronningen K. S., Undlien D. E., Thorsby E., Petrone A., Buzzetti R., Koeleman B. P., Roep B. O., Saruhan-Direskeneli G., Uyar F. A., Gunoz H., Gorodezky C., Alaez C., Boehm B. O., Mlynarski W., Ikegami H., Berrino M., Fasano M. E., Dametto E., Israel S., Brautbar C., Santiago-Cortes A., Frazer de Llado T., She J. X., Bugawan T. L., Rotter J. I., Raffel L., Zeidler A., Leyva-Cobian F., Hawkins B. R., Chan S. H., Castano L., Pociot F. und Nerup J.** (2007). Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: a meta-analysis. *Tissue Antigens* **70**: 110-127.

181. **Tisch R. und McDevitt H.** (1996). Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Cell* **85**.

182. **Todd J. A., Fukui Y., Kitagawa T. und Sasazuki T.** (1990). The A3 allele of the HLA-DQA1 locus is associated with susceptibility to type 1 diabetes in Japanese. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 1094-1098.

183. **Touraine J. L., Hadden J. W., Touraine F., Hadden E. M., Estensen R. und Good R. A.** (1977). Phorbol myristate acetate: a mitogen selective for a T-lymphocyte subpopulation. *J Exp Med* **145**: 460-465.

184. **Trajkovski M., Hausser J., Soutschek J., Bhat B., Akin A., Zavolan M., Heim M. H. und Stoffel M.** (2011). MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature* **474**: 649-653.

185. **Ujvari B. und Belov K.** (2011). Major histocompatibility complex (MHC) markers in conservation biology. *Int J Mol Sci* **12**: 5168-5186.

186. **Vader W., Stepniak D., Kooy Y., Mearin L., Thompson A., van Rood J. J., Spaenij L. und Koning F.** (2003). The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12390-12395.

187. **van Belle T. L., Coppieters K. T. und von Herrath M. G.** (2011). Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* **91**: 79-118.

188. **van Lummel M., van Veelen P. A., Zaldumbide A., de Ru A., Janssen G. M., Moustakas A. K., Papadopoulos G. K., Drijfhout J. W., Roep B. O. und Koning F.** (2012). Type 1 diabetes-associated HLA-DQ8 transdimer accommodates a unique peptide repertoire. *J Biol Chem* **287**: 9514-9524.

189. **Vandiedonck C. und Knight J. C.** (2009). The human Major Histocompatibility Complex as a paradigm in genomics research. *Brief Funct Genomic Proteomic* **8**: 379-394.

190. **Varney M. D., Valdes A. M., Carlson J. A., Noble J. A., Tait B. D., Bonella P., Lavant E., Fear A. L., Louey A., Moonsamy P., Mychaleckyj J. C. und Erlich H.** (2010). HLA DPA1, DPB1 alleles and haplotypes contribute to the risk associated with type 1 diabetes: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes* **59**: 2055-2062.

191. **Vartdal F., Johansen B. H., Friede T., Thorpe C. J., Stevanovic S., Eriksen J. E., Sletten K., Thorsby E., Rammensee H. G. und Sollid L. M.** (1996). The peptide binding motif of the disease associated HLA-DQ (alpha 1* 0501, beta 1* 0201) molecule. *Eur J Immunol* **26**: 2764-2772.

192. **Vigil D., Cherfils J., Rossman K. L. und Der C. J.** (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* **10**: 842-857.

193. **von Herrath M. G. und Oldstone M. B.** (1997). Interferon-gamma is essential for destruction of beta cells and development of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* **185**: 531-539.

194. **Wang X.** (2008). miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA* **14**:1012-1017.

195. **Wanidworanun C. und Strober W.** (1993). Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *J Immunol* **151**: 6853-6861.

196. **Whitfield M. L., Sherlock G., Saldanha A. J., Murray J. I., Ball C. A., Alexander K. E., Matese J. C., Perou C. M., Hurt M. M., Brown P. O. und Botstein D.** (2002). Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Mol Biol Cell* **13**: 1977-2000.

197. **Whitney A. R., Diehn M., Popper S. J., Alizadeh A. A., Boldrick J. C., Relman D. A. und Brown P. O.** (2003). Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1896-1901.

198. **Willcox A., Richardson S. J., Bone A. J., Foulis A. K. und Morgan N. G.** (2009). Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* **155**: 173-181.

199. **Winter J., Jung S., Keller S., Gregory R. I. und Diederichs S.** (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* **11**: 228-234.

200. **Xu Y., Wang L., Buttice G., Sengupta P. K. und Smith B. D.** (2003). Interferon gamma repression of collagen (COL1A2) transcription is mediated by the RFX5 complex. *J Biol Chem* **278**: 49134-49144.

201. **Yang S. J., Ahn S., Park C. S., Holmes K. L., Westrup J., Chang C. H. und Kim M. G.** (2006). The quantitative assessment of MHC II on thymic epithelium: implications in cortical thymocyte development. *Int Immunol* **18**: 729-739.

202. **Yang X. D., Tisch R., Singer S. M., Cao Z. A., Liblau R. S., Schreiber R. D. und McDevitt H. O.** (1994). Effect of tumor necrosis factor alpha on insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. I. The early development of autoimmunity and the diabetogenic process. *J Exp Med* **180**: 995-1004.

203. **Zhang B. und Farwell M. A.** (2008). microRNAs: a new emerging class of players for disease diagnostics and gene therapy. *J Cell Mol Med* **12**: 3-21.

204. **Zipp F., Weber F., Huber S., Sotgiu S., Czlonkowska A., Holler E., Albert E., Weiss E. H., Wekerle H. und Hohlfeld R.** (1995). Genetic control of multiple sclerosis: increased production of lymphotoxin and tumor necrosis factor-alpha by HLA-DR2+ T cells. *Ann Neurol* **38**: 723-730.

7 Anhang

Offizielle Gensymbole und Gennamen nach "*the Human Genome Organisation (HUGO) Gene Nomenclature Consortium*"

AIRE	*autoimmune regulator*
HLA-A	*major histocompatibility complex, class I, A*
HLA-B	*major histocompatibility complex, class I, B*
HLA-C	*major histocompatibility complex, class I, C*
HLA-F	*major histocompatibility complex, class I, F*
HLA-DMA	*major histocompatibility complex, class II, DM alpha*
HLA-DMB	*major histocompatibility complex, class II, DM beta*
HLA-DOB	*major histocompatibility complex, class II, DO beta*
HLA-DPA1	*major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1*
HLA-DPB1	*major histocompatibility complex, class II, DP beta 1*
HLA-DQA1	*major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1*
HLA-DQB1	*major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1*
HLA-DRA	*major histocompatibility complex, class II, DR alpha*
HLA-DRB1	*major histocompatibility complex, class II, DR beta 1*
HLA-DRB3	*major histocompatibility complex, class II, DR beta 3*
HLA-DRB4	*major histocompatibility complex, class II, DR beta 4*
HLA-DRB5	*major histocompatibility complex, class II, DR beta 5*
IL2	*interleukin 2*
IL6R	*interleukin 6 receptor*
IL10	*interleukin 10*
IL15	*interleukin 15*
INS	*insulin*
RFX1	*regulatory factor X, 1 (influences HLA class II expression)*
RFX2	*regulatory factor X, 2 (influences HLA class II expression)*
RFX5	*regulatory factor X, 1 (influences HLA class II expression)*
RPL13A	*ribosomal protein L13a*
SNORD72	*small nucleolar RNA, C/D box 72*
TAP1	*transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)*
TAP2	*transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)*
TNF	*tumor necrosis factor*

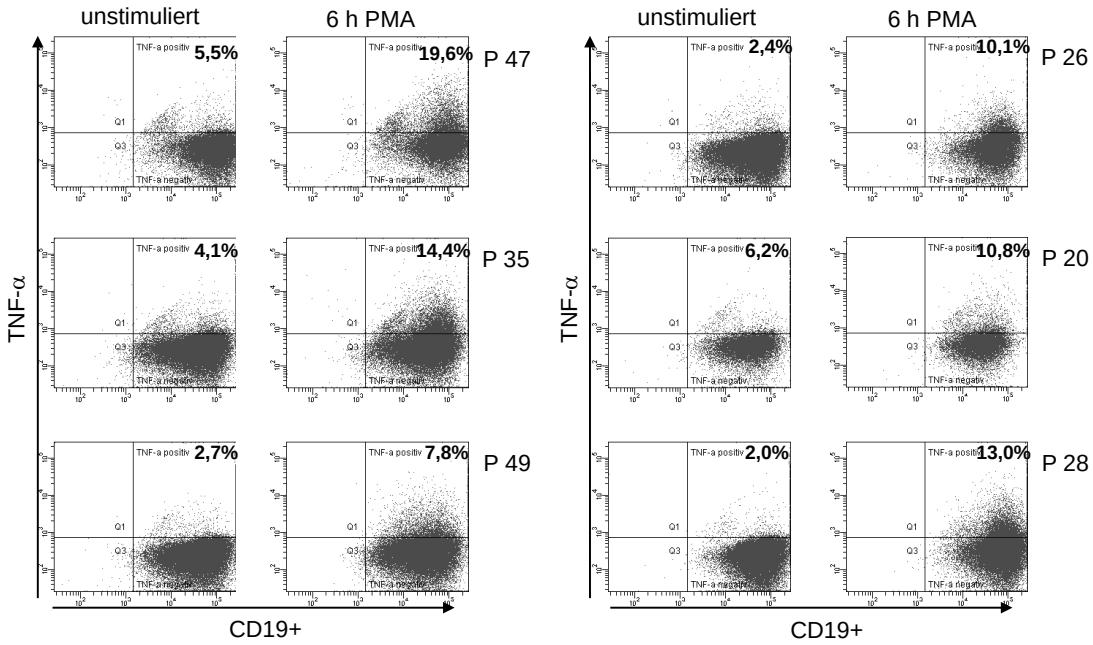


Abbildung 7.1: Prozentualer Anteil TNF-α-produzierender Zellen mit und ohne PMA-Stimulation. Es wurden sechs verschiedene B-LCLs untersucht. Jede B-LCL wurde zum einen unstimuliert belassen und zum anderen für 6 h mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/ml) stimuliert. Die Datenerhebung fand mit Hilfe des Durchflusszytometers LSRII statt. Nach Stimulation mit PMA war für alle B-LCLs der prozentuale Anteil TNF-α-produzierender Zellen erhöht. Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; CD19: *Cluster of Differentiation* 19; P: Probanden-ID; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; TNF-α: Tumornekrosefaktor-alpha.

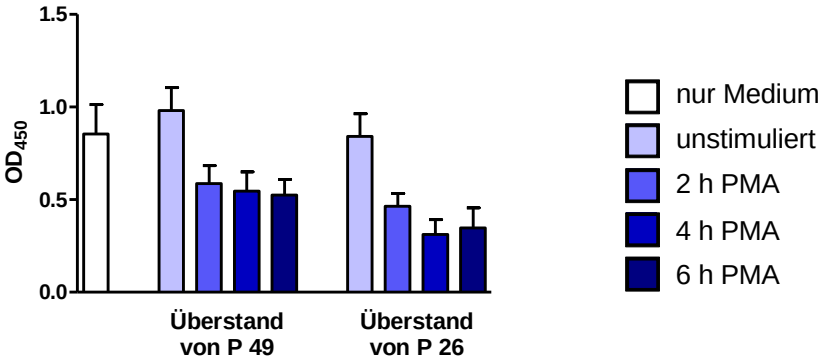


Abbildung 7.2: B-LCL-Proliferation nach Kultivierung in frischem Medium und in B-LCL-Überständen, nachdem diese unterschiedlich lange mit PMA stimuliert wurden. Untersucht wurde die Proliferation von drei verschiedenen B-LCLs, welche in Überständen von mit PMA-stimulierten (Endkonzentration: 30 ng/ml) B-LCLs kultiviert wurden. Die Stimulationszeiten betrugen 0 h, 2h, 4h und 6 h. Es wurden jeweils 30.000 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden entweder in 100 µl Medium oder in 100 µl der entsprechenden Überstände aufgenommen und auf die 96-Well Platten überführt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Es war kein Unterschied in der Proliferation nach Kultivierung der Zellen in frischem Medium oder in nicht stimulierten Überständen vorhanden. Nach Kultivierung in Überständen von mit PMA stimulierten Zellen, nahm die Proliferation ab. Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; OD: optische Dichte; P: Probanden-ID; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat.

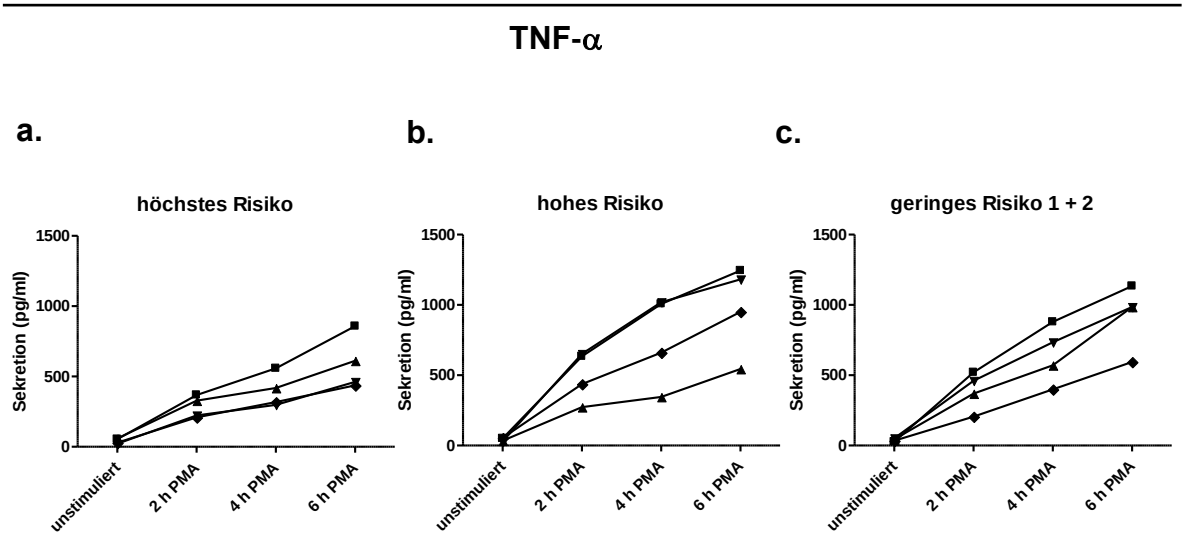
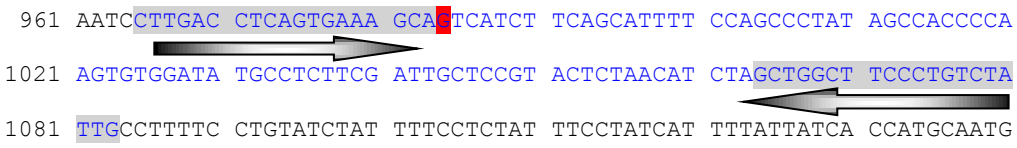
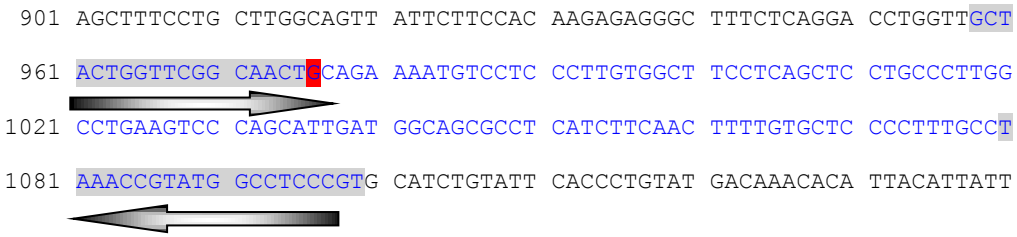


Abbildung 7.3: TNF-α-Sekretion von B-LCLs verschiedener HLA-Konstellationen nach unterschiedlichen Stimulationszeiten mit PMA (unstimuliert, 2 h, 4 h, 6 h). Für jede HLA-Konstellation wurden die B-LCLs von vier Probanden untersucht. Dargestellt ist die TNF-α-Sekretion für jede verwendete B-LCL nach verschiedenen Stimulationszeiten mit PMA (Endkonzentration: 30 ng/µl). **a – c:** Die TNF-α-Sekretion war bei der HLA-Konstellation mit dem höchsten Risiko tendenziell geringer exprimiert (a.) als bei den HLA-Konstellationen mit einem geringeren Erkrankungsrisiko (b + c). Verwendete Abkürzungen: BLCLs: lymphoblasotide B-Zelllinien; HLA: humanes Leukozytenantigen; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; TNF-α: Tumornekrosefaktor-alpha.

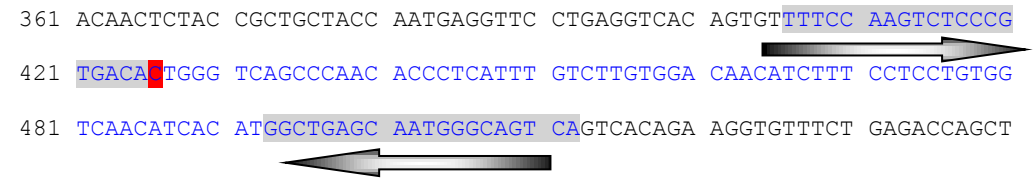
a. ***HLA-DRA***



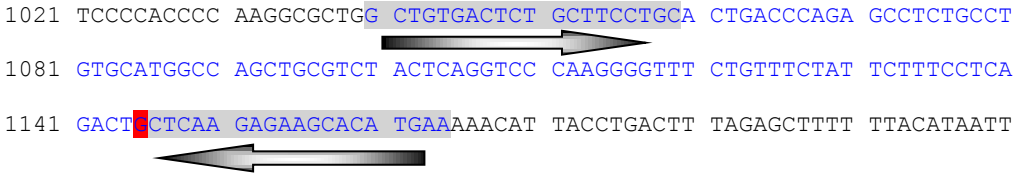
b. ***HLA-DRB1***



c. ***HLA-DQA1***



d. ***HLA-DQB1***



Rote Base = Referenzposition, die von Qiagen angegeben wird.

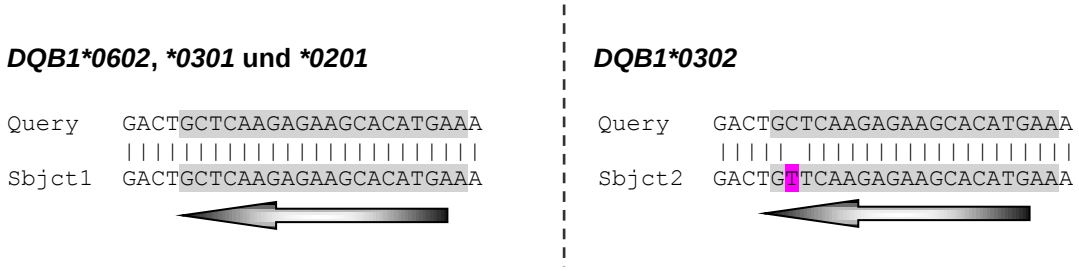
ACTG = Vorwärtsprimer von Qiagen. Hier immer mit 20 Nt angegeben (mögliche Länge: 19 – 23 Nt). Die Pfeilspitze stellt dabei immer das 3´-Ende dar.

ACTG = Rückwärtsprimer von Qiagen. Hier mit 20 Nt angegeben (mögliche Länge: 19 – 23 Nt). Die Pfeilspitze stellt dabei immer das 3´-Ende dar.

ACTG = Insertsequenz

Abbildung 7.4: Lage der Qiagenprimer bestimmter HLA-Klasse-II-Gene innerhalb der RefSeq. **a:** *HLA-DRA* (RefSeq #: NM_019111), **b:** *HLA-DRB1* (RefSeq #: NM_002124), **c:** *HLA-DQA1* (RefSeq #: NM_002122) **d:** *HLA-DQB1* (RefSeq #: NM_002123). Zunächst wurden die mittels Qiagen-Primern amplifizierten PCR-Produkte der zu untersuchenden Gene in das pGEM-Vektor System kloniert und anschließend im ABI 3730xl von der Firma GATC nach der Sanger-Methode sequenziert. Die Sequenzen wurden daraufhin mit den RefSeq aus NCBI abgeglichen, wodurch die Primerbindungsstellen identifiziert werden konnten. Verwendete Abkürzungen: A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; HLA: humanes Leukozytenantigen; Nt: Nukleotide; PCR: Polymeraseketten-reaktion; RefSeq: Referenzsequenz aus NCBI; T: Thymin.

Basenaustausche im Primerbindungsbereich des Rückwärtsprimers von *HLA-DQB1*



Query: Primerbindungsbereich von *HLA-DQB1* aus der Datenbank von NCBI (RefSeq #: NM_002124.2).

Sbjct1: Primerbindungsbereich von *HLA-DQB1* (homozygote Klone für die Allele *DQB1*0602*, *DQB1*0301* und *DQB1*0201*).

Sbjct2: Primerbindungsbereich von *HLA-DQB1* (homozygoter Klon für das Allel *DQB1*0302*)

ACTG = Rückwärtsprimer von Qiagen. Hier mit 20 Nt angegeben (mögliche Länge: 19 – 23 Nt). Die Pfeilspitze stellt dabei immer das 3´-Ende dar.

T = Basenaustausch im Primberbindungsbereich.

| = Basen sind identisch zur Query-Sequenz.

Abbildung 7.5: Basenaustausche von *HLA-DQB1* im Bindungsbereich des Rückwärtsprimers. Es wurden die Primerbindungsbereiche der sequenzierten, allelspezifischen Sequenzen mit der RefSeq aus NCBI (RefSeq #: NM_002123) verglichen. Für die Allele *DQB1*0602*, *DQB1*0301* und *DQB1*0201* waren keine Basenaustausche vorhanden, wohingegen für Allel *DQB1*0302* ein Basenaustausch von C nach T an Position 19 (ausgehend vom 5´-Ende des Primers) vorlag. Verwendete Abkürzungen: A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; HLA: humanes Leukozytenantigen; Nt: Nukleotide; RefSeq: Referenzsequenz aus NCBI; T: Thymin.

Basenaustausche von *HLA-DRB1* für die Allele *DRB1*1501* und *DRB1*0301*

DRB1*1501

```
Query    GCTACTGGTTCGGCAACTGCAGA....GCCTAAACCGTATGGCCTCCCGT
         ||||||||||||||||||||||    ||||||||||||||||||||||
Sbjct1   GCTACTGGTTCGGCAACTGCAGA....GCCTAAACCGTATGGCCTCCCGT
```



DRB1*0301

```
Query    GCTACTGGTTCGGCAACTGCAGA....GCCTAAACCGTATGGCCTCCCGT
         ||||||||||| ||||||||||    |||||||| |||||||||| ||
Sbjct2   GCTACTGGTTCAGCAACTGCAGA....GCCTAAACCCTATGGCCTCCTGT
```



Query: *HLA-DRB1* Primerbindungsbereich aus der NCBI Datenbank (RefSeq: NM_002124).

Sbjct1:Primerbindungsbereich von *DRB1*1501* aus der IMGT/HLA Datenbank.

Sbjct2: Primerbindungsbereich von *DRB1*0301* aus der IMGT/HLA Datenbank.

ACTG  = Vorwärtsprimer von Qiagen. Hier immer mit 20 Nt angegeben (mögliche Länge: 19 – 23 Nt). Die Pfeilspitze stellt dabei immer das 3´-Ende dar.

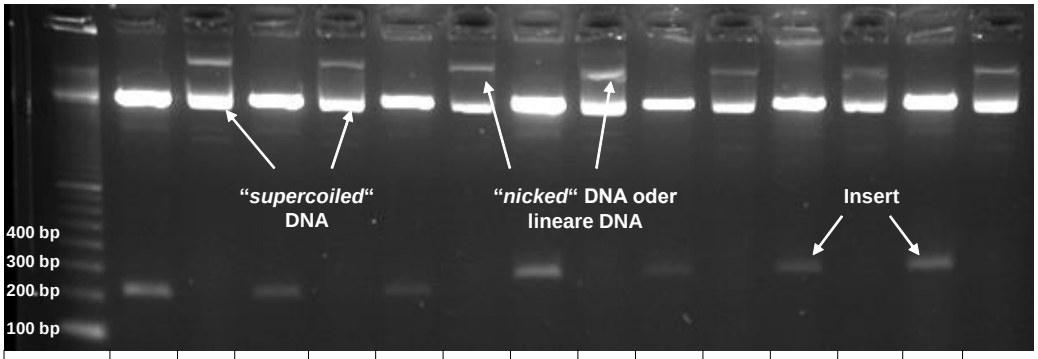
ACTG  = Rückwärtsprimer von Qiagen. Hier mit 20 Nt angegeben (mögliche Länge: 19 – 23 Nt). Die Pfeilspitze stellt dabei immer das 3´-Ende dar.

ACTG = Basenaustausche

. . . . = Platzhalter für die Sequenz zwischen den Primern.

| = Basen sind identisch zur Query-Sequenz.

Abbildung 7.6: Basenaustausche im Primerbindungsbereich von *DRB1*1501* und *DRB1*0301*. Es wurden die Primerbindingsbereiche in der 3´UTR für die Allele *DRB1*1501* und *DRB1*0301* mit Hilfe der allelspezifischen Sequenz aus der IMGT/HLA Datenbank und der Referenzsequenz aus NCBI (RefSeq: NM_002124) untersucht. Für Allel *DRB1*1501* waren keine Austausche vorhanden. Für Allel *DRB1*0301* war ein Basenaustausch im Vorwärtsprimer und zwei im Rückwärtsprimer vorhanden. Verwendete Abkürzungen: A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; HLA: humanes Leukozytenantigen; HLA: humanes Leukozytenantigen; Nt: Nukleotide; RefSeq: Referenzsequenz; aus NCBI T: Thymin.



Gelspur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Name	100 bp Leiter	*HLA-DQA1*						*HLA-DQB1*							
Genotyp		*05XX/05XX*		*03XX/03XX*		*0102/0102*		*0302/0302*		*02XX/02XX*		*0301/0301*		*0602/0602*	
Nco I und Pst I Verdau		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

Abbildung 7.7: Qualitätskontrolle der Plasmid-DNA. Die Plasmid-DNA wurde als template zur Analyse der Spezifität kommerzieller Primer für bestimmte *DQA1*- und *DQB1*-Allele mittels qRT-PCR eingesetzt. Das Agarosebild zeigt die allelspezifischen Plasmide der Gene *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1*. Es wurden jeweils 3 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Gelspuren 2 – 7 zeigen die Plasmide von *HLA-DQA1* (**05XX/05XX, *03XX/03XX* und **0102/0102*) und die Gelspuren 8 – 15 die Plasmide von *HLA-DQB1* (**0302/0302, *02XX/02XX*, **0301/0301* und **0602/0602*). Die geradzahligen Gelspuren zeigen die mit Nco I und Pst I verdauten Plasmide, wohingegen die ungeradzahligen Gelspuren die unverdauten Plasmide darstellen. Bei den geradzahligen Gelspuren (Nco I und Pst I verdaut) ist zu sehen, dass alle Plasmide das Insert richtiger Größe trugen (*HLA-DQA1*: 175 bp; *HLA-DQB1*: 233 bp). Die Banden weißen im Vergleich zum Insert eine um 37 bp größere Länge auf, da die Schnittstellen der Endonukleasen NcoI und PstI 15 bp und 22 bp vom Insert entfernt liegen. Die Bandenstärke war bei allen unverdauten Plasmiden (ungeradzahlige Gelspuren) vergleichbar, so dass von einer vergleichbaren Qualität aller Plasmide ausgegangen werden kann. Auf der ersten Spur des Gelbildes ist die verwendete 100 bp DNA-Leiter zu sehen, welche zur Bestimmung der einzelnen Bandengrößen diente. Verwendete Abkürzungen: bp: Basenpaare; DNA: Desoxyribonukleinsäure; HLA: humanes Leukozytenantigen; qRT-PCR: *real-time*-quantitative-PCR; XX: Bei einigen Probanden lagen keine weiteren Informationen über die spezifischen Allele vor. Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 (Vandiedonck und Knight, 2009) und der Tatsache, dass das verwendete Probandenkollektiv ausschließlich kaukasischen Ursprungs ist, konnte davon ausgegangen werden, dass sich spezifische Allele und Suballele innerhalb einer Risikogruppe mit gleichem HLA-Haplotyp nicht unterscheiden (*HLA-DQA1*03XX* entspricht *HLA-DQA1*0301*; *HLA-DQA1*05XX* entspricht *HLA-DQA1*0501*; HLA-DQB1*02XX entspricht *HLA-DQB1*0201*).

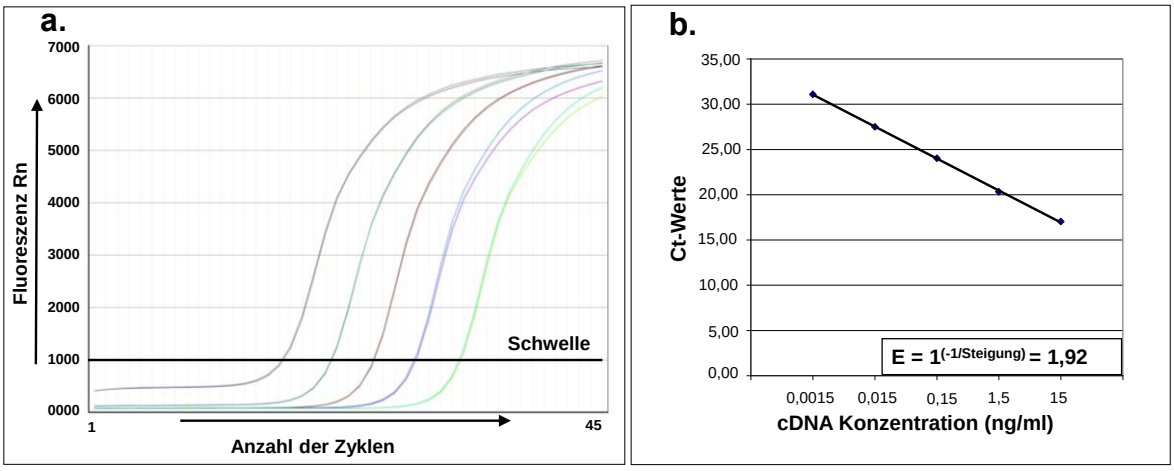


Abbildung 7.8: Ermittlung der PCR-Effizienz des für die qRT-PCR selbst erstellten Primerpaares von *HLA-DQB1*. a: qRT-PCR-Kurven der 10-fachen Verdünnungsreihe. Die erste Kurve von links entspricht der geringsten Verdünnungsstufe (15 ng/ml) und kreuzt die Schwelle als erstes. Nach rechts nimmt die Verdünnung stetig zu, wobei die Fluoreszenzsignale die Schwelle immer später kreuzen. Auf der Ordinatenachse sind die Fluoreszenzwerte aufgetragen, auf der Abszissenachse die Anzahl der Zyklen. **b:** Ermittlung der PCR-Effizient von *HLA-DQB1*-Primern. Es ist die lineare Abhängigkeit zwischen cDNA Konzentration und den Ct-Werten dargestellt. Dafür wurde die eingesetzte cDNA-Konzentration (Abszissenachse) gegen den Ct-Wert (Ordinatenachse) aufgetragen. Die Gerade verläuft mit abnehmender cDNA-Konzentration antiproportional zu den Ct-Werten, welche zunehmen. Verwendete Abkürzungen: cDNA: komplementäre DNA; Ct: *cycle threshold*; E: PCR-Effizienz; HLA: humanes Leukozytenantigen; qRT-PCR: *real-time*-quantitative-PCR; Rn: normalisierte Fluoreszenzwerte.

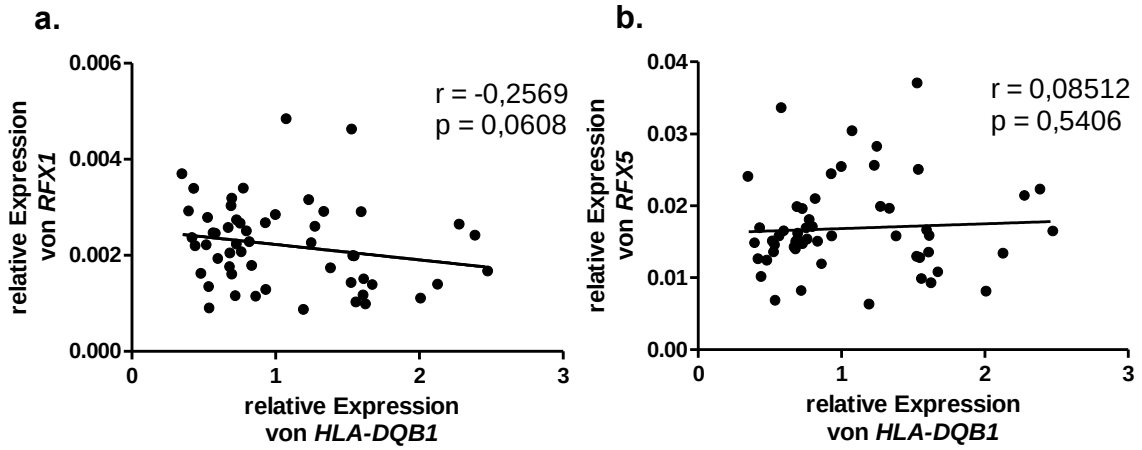


Abbildung 7.9: Korrelation zwischen der Expression von *RFX1* bzw. *RFX5* und der Expression von *HLA-DQB1*. a + b: Zwischen der Expression *RFX1* und *RFX5* und der Expression von *HLA-DQB1* wurde keine signifikante Korrelation gefunden (Spearman r = -0,2569, p = 0,0608 bzw. r = 0,08512, p = 0,5406). Verwendete Abkürzungen: HLA: humanes Leukozytenantigen.

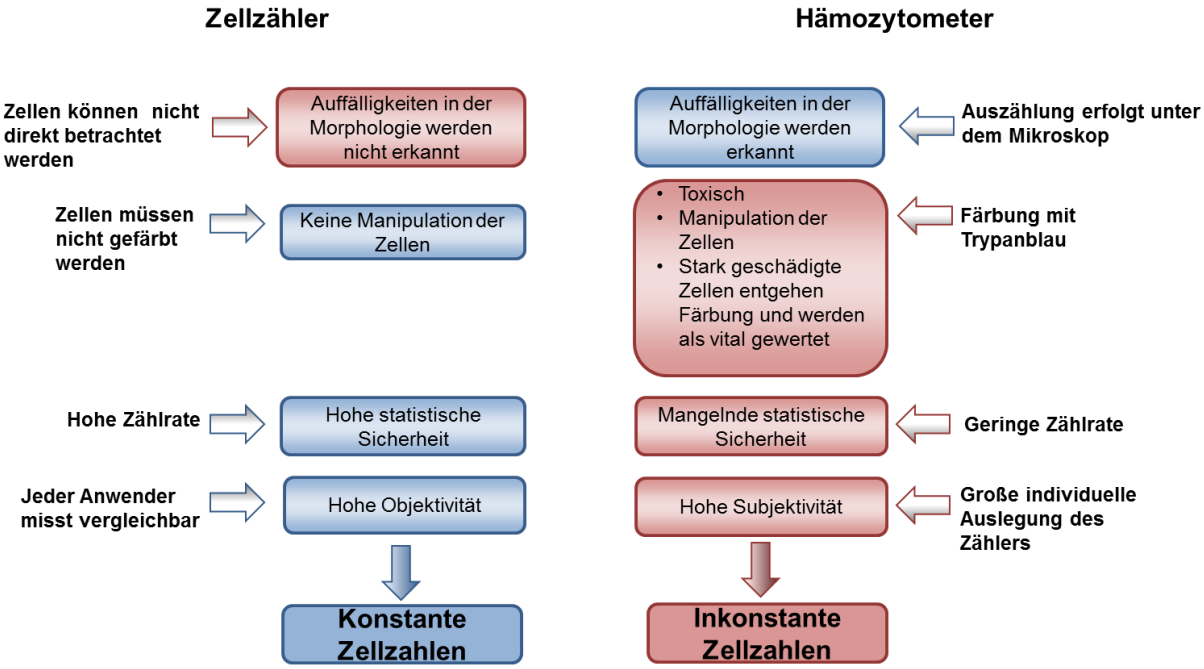


Abbildung 7.10: Vor- und Nachteile automatisierter und manueller Zellzählungsmethoden. Die Vorteile sind blau dargestellt, wohingegen die Nachteile dunkelrot dargestellt sind. Zur Erstellung der Abbildung wurden, neben den eigenen Ergebnissen, folgende Quellen verwendet: (Altman *et al.*, 1993; Killemann und Schneider, 2004; Schärfe, 2004).

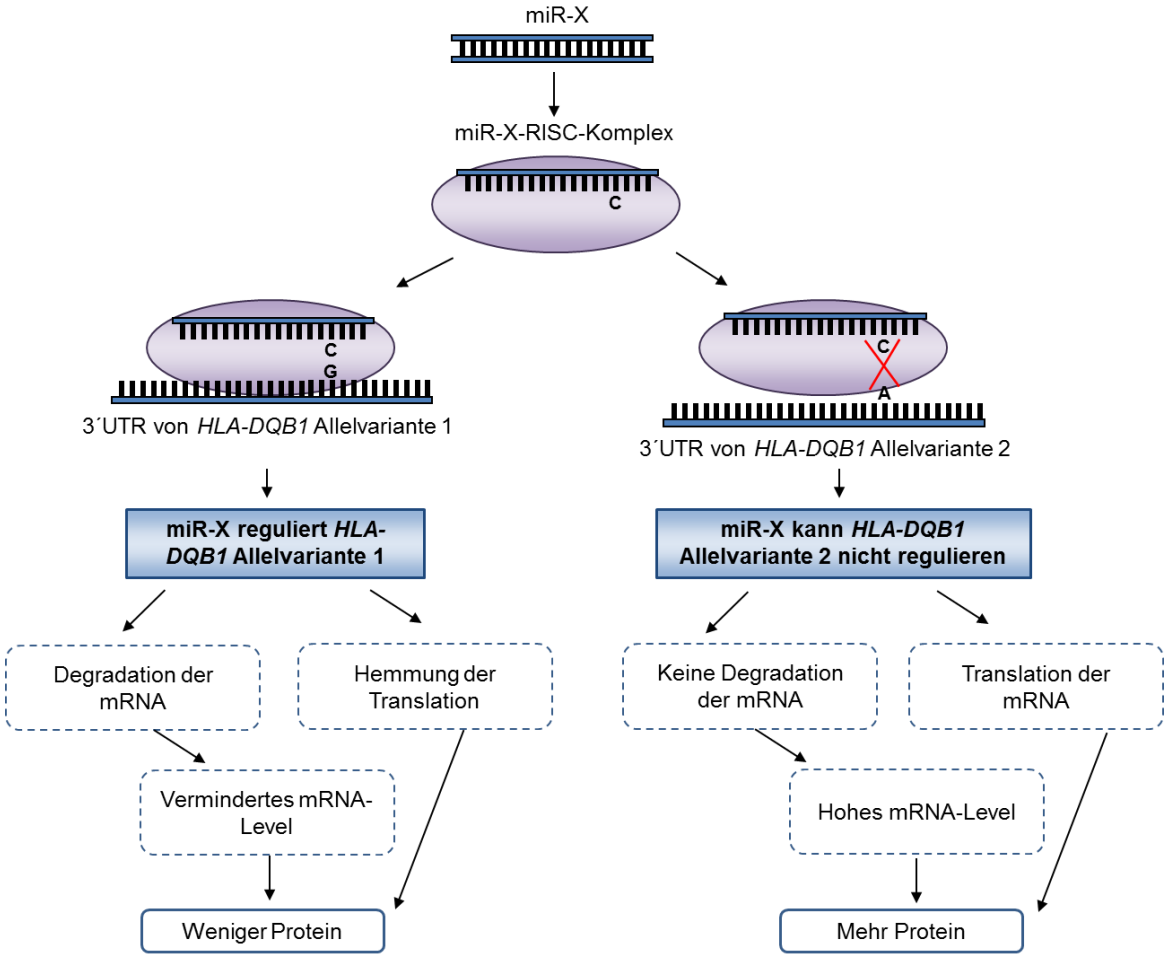


Abbildung 7.11: Möglicher Wirkungsmechanismus von miRNAs bei der allelspezifischen Regulation der Expression von HLA-Klasse-II-Genen. Hier am Beispiel von *HLA-DQB1* dargestellt. Verwendete Abkürzungen: miR-X: microRNA-X (X steht für eine noch nicht näher definierte microRNA); mRNA: *messenger RNA*; UTR: untranslatierte Region. Abbildung modifiziert nach (Mishra *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008).

Tabelle 7.1: Zusammenfassung der allelspezifischen Basenaustausche der Gene *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* und *HLA-DRB1* in den jeweiligen Primerbindungsbereichen. Die Tabelle beinhaltet die Gennamen und die entsprechenden untersuchten Allele, sowie die Accession # der dazugehörenden RefSeq aus NCBI (Stand: September 2012). Des Weiteren sind die Position des Basenaustauschs in der RefSeq, sowie die Base, welche sich an dieser Position befindet und die Base, welche sich in der allelspezifischen Sequenz an dieser Position befindet, aufgeführt. Die letzten zwei Spalten zeigen zum einen welcher Primer an diesen Bereich bindet und zum anderen an welcher Position vom 5´-Ende des Primers aus gesehen der Basenaustausch vorliegt. Verwendete Abkürzungen: A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; HLA: humanes Leukozytenantigen; RefSeq: Referenzsequenz aus NCBI; T: Thymin.

Gen	Allel	Gen RefSeq			allel-spezifische Base an dieser Position	betroffener Primer	Position im Primerbindungs-bereich (vom 5´-Ende des Primers aus gesehen)
		Accession #	Position des Basenaus-tauschs	Base an dieser Position			
HLA-DQA1	*0301*	NM_002122	509	G	C	rückwärts	4
	0501		509	G	C	rückwärts	4
	0102						
HLA-DQB1	*0301*	NM_002123					
	0302		1048	T	C	vorwärts	9
			1147	C	T	rückwärts	19
	0201		1048	T	C	vorwärts	9
			1051	G	A	vorwärts	12
	0602						
HLA-DRB1	*0401*	NM_002124	969	G	A	vorwärts	12
			973	A	G	vorwärts	16
			976	G	Deletion	vorwärts	19
			977	C	Deletion	vorwärts	20
			1098	G	A	rückwärts	2
			1090	G	T	rückwärts	10
			1089	T	C	rückwärts	11
			1088	A	C	rückwärts	12
			1086	G	T	rückwärts	14
			1084	C	G	rückwärts	16
			1083	A	T	rückwärts	17
	0301		969	G	A	vorwärts	12
			1097	C	T	rückwärts	3
			1086	G	C	rückwärts	14
	1501						

Tabelle 7.2: PCR-Effizienz des für die qRT-PCR selbst erstellten Primerpaares von *HLA-DQB1*. Die PCR-Effizienz lag bei 92%. Gemäß den Angaben von Qiagen ist eine Effizienz zwischen 90% und 110% akzeptabel (http://www.sabiosciences.com/custompcrplate.php; Stand: 01. Februar 2014). Siehe auch Abbildung 7.8. Verwendete Abkürzungen: qRT-PCR: *real-time*-quantitative-PCR.

Gen	R^2	Steigung	-1/Steigung	Effizienz: $10^{(-1/Steigung)}$	% Effizienz: (E-1) x 100
HLA-DQB1	0,9997	-3,5302	0,28327	1,91986	92

Tabelle 7.3: Relative Expression bestimmter Allele von *HLA-DQA1*. Relative Expression verschiedener Allele von *HLA-DQA1* im Vergleich zur konstant exprimierten Region in heterozygoten Individuen bei verschiedenen HLA-Konstellationen (höchstes Risiko, geringes Risiko 1, geringes Risiko 2), welche mittels RNA-Seq ermittelt wurde. Die Expression der konstanten Region wurde „1“ gesetzt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aller Individuen einer HLA-Konstellation und die jeweiligen Standardabweichungen. Verwendete Abkürzungen: HLA: humanes Leukozytenantigen; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; RNA-Seq: Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung; XX: Bei einigen Probanden lagen keine weiteren Informationen über die spezifischen Allele vor. Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 (Vandiedonck und Knight, 2009) und der Tatsache, dass das verwendete Probandenkollektiv ausschließlich kaukasischen Ursprungs ist, konnte davon ausgegangen werden, dass sich spezifische Allele und Suballele innerhalb einer Risikogruppe mit gleichem HLA-Haplotyp nicht unterscheiden (*HLA-DQA1*03XX* entspricht *HLA-DQA1*0301*; *HLA-DQA1*05XX* entspricht *HLA-DQA1*0501*).

	relative Expression		
HLA-DQA1	**höchstes Risiko (n = 10) MW ± SD**	**geringes Risiko 1 (n = 3) MW ± SD**	**geringes Risiko 2 (n = 2) MW ± SD**
konstante Sequenz	1	1	1
Allel: **0102*		0,35 ± 0,007	0,3 ± 0,05
Allel: **05XX*	0,305 ± 0,05		0,39 ± 0,007
Allel: **03XX*	0,41 ± 0,055	0,42 ± 0,03	

Tabelle 7.4: Relative Expression bestimmter Allele von *HLA-DQB1*. Relative Expression verschiedener Allele von *HLA-DQB1* im Vergleich zur konstant exprimierten Region in heterozygoten Individuen bei verschiedenen HLA-Konstellationen (höchstes Risiko, hohes Risiko, geringes Risiko 1a, geringes Risiko 1b, geringes Risiko 2), welche mittels RNA-Seq ermittelt wurde. Die Expression der konstanten Region wurde „1“ gesetzt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aller Individuen einer HLA-Konstellation und die jeweiligen Standardabweichungen. Verwendete Abkürzungen: HLA: humanes Leukozytenantigen; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; RNA-Seq: Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung; XX: Bei einigen Probanden lagen keine weiteren Informationen über die spezifischen Allele vor. Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 (Vandiedonck und Knight, 2009) und der Tatsache, dass das verwendete Probandenkollektiv ausschließlich kaukasischen Ursprungs ist, konnte davon ausgegangen werden, dass sich spezifische Allele und Suballele innerhalb einer Risikogruppe mit gleichem HLA-Haplotyp nicht unterscheiden (*HLA-DQB1*02XX* entspricht *HLA-DQB1*0201*).

	relative Expression				
HLA-DQB1	**höchstes Risiko (n =10) MW ± SD**	**hohes Risiko (n = 3) MW ± SD**	**geringes Risiko 1a (n = 2) MW ± SD**	**geringes Risiko 1b (n = 1) MW ± SD**	**geringes Risiko 2 (n = 2) MW ± SD**
konstante Sequenz	1	1	1	1	1
Allel: *0602*			0,3 ± 0,05	0,21	0,33 ± 0,02
Allel: *02XX*	0,41 ± 0,05				0,55 ± 0,06
Allel: *0301*		0,43 ± 0,05		0,76	
Allel: *0302*	0,39 ± 0,07	0,22 ± 0,03	0,56 ± 0,004		

Tabelle 7.5: Anzahl der erhaltenen *counts* nach „*perfect match*“-Alignment kurzer Sequenzen konstanter und allelspezifischer Regionen der Gene *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1* mit den RNA-Seq-*reads*. Die konstanten und allelspezifischen Sequenzen wurden mit Hilfe der Datenbanken von NCBI und UCSC aus dem Referenzgenom GRC37/hg19 ausgewählt und anschließend ein „*perfect match*“-Alignment mit den RNA-Seq-*reads* durchgeführt. Um allelspezifische Sequenzunterschiede hervorzuheben, wurden unterschiedliche Basen im Vergleich zu den Allelen *DQA1*0102* bzw. *DQB1*0602* rot gekennzeichnet. In blau sind die *counts* derjenigen Sequenzen dargestellt, die für alle Allele des betreffenden Gens identisch waren. In schwarz sind die *counts* der allelspezifischen Sequenzen dargestellt. Verwendete Abkürzungen: A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin HLA: humanes Leukozytenantigen; P: Probanden-ID; T: Thymin; RNA-Seq: Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung; XX: Bei einigen Probanden lagen keine weiteren Informationen über die spezifischen Allele vor. Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 (Vandiedonck *et. al.,* 2009) und der Tatsache, dass das verwendete Probandenkollektiv ausschließlich kaukasischen Ursprungs ist, konnte davon ausgegangen werden, dass sich spezifische Allele und Suballele innerhalb einer Risikogruppe mit gleichem HLA-Haplotyp nicht unterscheiden (*HLA-DQA1*03XX* entspricht HLA-DQA1*0301; *HLA-DQA1*05XX* entspricht *HLA-DQA1*0501; HLA-DQB1*02XX* entspricht *HLA-DQB1*0201*).

Gen	Allel	Sequenz (5´ – 3´)	*counts*																	
			höchstes Risiko										hohes Risiko			geringes Risiko 1			geringes Risiko 2	
			P 1	P 2	P 4	P 6	P 13	P 16	P 5	P 9	P 15	P 20	P 32	P 28	P 22	P 44	P 45	P 46	P 47	P 49
HLA-DQA1	*0102, 05XX, 03XX*	CAACTCTACCGCTGCTACCAAT	1098	647	2156	1595	980	1246	600	185	911	755				575	540	1486	1890	2320
	0102	TGCCTGGCGGTGGCCTGAGTTCAGC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				195	192	518	663	581
	05XX	TGTCTGGTGTTTGCCTGTTCTCAGA	317	174	690	465	311	545	148	48	319	208				0	2	6	725	922
	03XX	TGTCTGGCAGTTGCCTCTGTTCCGC	483	250	839	654	437	406	241	91	301	372				254	234	564	0	0
HLA-DQB1	*0602, 02XX, 0301, 0302*	TCCTGGTGATGCTGGAAATGACTCC	267	137	654	449	271	430	101	39	186	207	293	257	551	210	653	1583	573	460
	0602	GGGTGTACCGCGCGGTGACGCCGCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	69	139	420	179	162
	02XX	GGGAGTTCCGGGCGGTGACGCTGCT	116	50	253	170	129	172	34	20	83	76	1	1	2	0	1	3	280	281
	0301	AGGTGTACCGGGCGGTGACGCCGCT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	124	126	201	0	499	0	0	0
	0302	GGGTGTATCGGGCGGTGACGCCGCT	127	52	260	204	126	159	25	15	54	89	58	68	110	117	1	895	1	0

Tabelle 7.6: Sequenzunterschiede in der X-Box-Region (Position –188 bis –154) des Promotors von *HLA-DQB1* bei unterschiedlichen Allelen. Identische Basen sind mit einem Querstrich dargestellt. Die X1-Box-Region ist unterstrichen und die X2-Box-Region ist kursiv dargestellt. Die W-Box reicht von Position –204 bis –189 und ist nicht mehr dargestellt. Verwendete Abkürzungen: A: Adenin; C: Cystein; G: Guanin; HLA: humanes Leukozytenantigen; T: Thymin. Quellen: (Beaty *et al.*, 1995; Ferstl *et al.*, 2004).

Sequenz (5´ – 3´)	***DQB1*-Allele**
AAAAAAAA//TCTGCCCAGAGACAGAT*GAGGTCCA*	**02, *0301*
--------TG------T----------*T*-------	**0302*
--------TG----------	**0602*

Tabelle 7.7: Korrelation zwischen T1D-Empfänglichkeit und der Stabilität verschiedener α/β-Dimere von HLA-DQ unter SDS Einwirkung. Verwendete Abkürzungen: HLA: humanes Leukozytenantigen; T1D: Typ 1 Diabetes, SDS: Natriumdodecylsulfat. Quelle: (Ettinger *et al.*, 2000).

HLA-DQ-Dimer	**T1D-Empfänglichkeit**	**SDS-Stabilität**
A1*0102-B1*0602	dominant protektiv	+++
A1*0301-B1*0301	schwach protektiv/neutral	+
A1*0501-B1*0201	krankheitsfördernd	0
A1*0301-B1*0302	krankheitsfördernd	0/+

Tabelle 7.8: Vergleich der Expression bestimmter Allele von *HLA-DQA1* aus dieser Arbeit mit verschiedenen Quellen aus der Literatur. –: Allel ist schwächer exprimiert; **+**: Allel ist stärker exprimiert; **=**: kein Expressionsunterschied zwischen den Allelen; **Grün**: Ergebnisse aus der Literatur und dieser Arbeit stimmen überein. **Rot**: Ergebnisse aus der Literatur und dieser Arbeit stimmen nicht überein. Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; HLA: humanes Leukozytenantigen; PBLs: periphere Blutlymphozyten; PBMCs: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes; qRT-PCR: *real-time*-quantitative-PCR; RNA-Seq: Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung; RT-PCR: Reverse Transkriptase-PCR; XX: Bei einigen Probanden lagen keine weiteren Informationen über die spezifischen Allele vor. Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 (Vandiedonck und Knight, 2009) und der Tatsache, dass das verwendete Probandenkollektiv ausschließlich kaukasischen Ursprungs ist, konnte davon ausgegangen werden, dass sich spezifische Allele und Suballele innerhalb einer Risikogruppe mit gleichem HLA-Haplotyp nicht unterscheiden (*HLA-DQA1*03XX* entspricht *HLA-DQA1*0301*; *HLA-DQA1*05XX* entspricht *HLA-DQA1*0501*).

HLA-DQA1								
höchstes Risiko		**geringes Risiko 1**		**geringes Risiko 2**		**Zellsystem**	**Methode**	**Quelle**
Allel 1	**Allel 2**	**Allel 1**	**Allel 2**	**Allel 1**	**Allel 2**			
05XX	***03XX***	***0102***	***03XX***	***0102***	***05XX***			
–	**+**	**–**	**+**	**–**	**+**	B-LCLs	RNA-Seq	vorliegende Arbeit
–	**+**	**–**	**+**	**=**	**=**	PBMCs	RT-PCR und allelspezifischer Restriktionsverdau	Britten *et al*., 2009
–/=[b]	**+/=**[b]	**–/–**	**+/+**	**–/–**	**+/+**	PBLs/ B-LCLs	*RNAse protection Assay*	Maffei *et al*., 1997[a]
–	**+**	**–**	**+**	**+**	**–**	PBLs	semiquantitative, sequenzspezifische qRT-PCR	Donner *et al*., 2002[a]

[a]: In diesen beiden Veröffentlichungen konnte nicht zwischen den spezifischen HLA-Allelen unterschieden werden (*DQA1*05XX* entsricht *DQA1*05*; *DQA1*03XX* entspricht *DQA1*03*; *DQA1*0102* entspricht *DQA1*01*).

[b]: Das Verhältnis der Expressionen der Allele *DQA1*05XX* und *DQA1*03XX* bei heterozygoten Individuen war zwischen verschiedenen Zellsystemen (PBLs oder B-LCLs) unterschiedlich.

Tabelle 7.9: Vergleich der Expression bestimmter Allele von *HLA-DQB1* aus dieser Arbeit mit verschiedenen Quellen aus der Literatur. –: Allel ist schwächer exprimiert; **+**: Allel ist stärker exprimiert; **=**: kein Expressionsunterschied zwischen den Allelen; **Grün**: Ergebnisse aus der Literatur und dieser Arbeit stimmen überein. **Rot**: Ergebnisse aus der Literatur und dieser Arbeit stimmen nicht überein. Verwendete Abkürzungen: B-LCLs: lymphoblastoide B-Zelllinien; mo-DCs: aus Monozyten abgeleitete dendritische Zellen; HLA: humanes Leukozytenantigen; PBMCs: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes; qRT-PCR: *real-time*-quantitative-PCR; RNA-Seq: Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung; RT-PCR: Reverse Transkriptase-PCR; XX: Bei einigen Probanden lagen keine weiteren Informationen über die spezifischen Allele vor. Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 (Vandiedonck und Knight, 2009) und der Tatsache, dass das verwendete Probandenkollektiv ausschließlich kaukasischen Ursprungs ist, konnte davon ausgegangen werden, dass sich spezifische Allele und Suballele innerhalb einer Risikogruppe mit gleichem HLA-Haplotyp nicht unterscheiden (*HLA-DQB1*02XX* entspricht *HLA-DQB1*0201*).

HLA-DQB1												
höchstes Risiko		**hohes Risiko**		**geringes Risiko 1a**		**geringes Risiko 1b**		**geringes Risiko 2**		**Zell-system**	**Methode**	**Quelle**
Allel 1	**Allel 2**	**Allel 1**	**Allel 2**	**Allel 1**	**Allel 2**	**Allel 1**	**Allel 2**	**Allel 1**	**Allel 2**			
02XX	***0302***	***0301***	***0302***	***0602***	***0301***	***0602***	***0302***	***0602***	***02XX***			
=	**=**	**+**	**–**	**–**	**+**	**–**	**+**	**–**	**+**	B-LCLs	RNA-Seq	vorliegende Arbeit
–	**+**	**=**	**=**	**+**	**–**	**+**	**–**	**+**	**–**	PBMCs	RT-PCR und allelspezifischer Restriktionsverdau	Britten *et al.*, 2009
				–	**+**					mo-DCs	qRT-PCR mit Taqman Sonden	Ferstl *et al.*, 2004

Tabelle 7.10: Probanden, die für die Microarray-Analyse von miRNA verwendet wurden. Die Proben wurden nach HLA-Konstellation und Stimulus sortiert, gepoolt. In der Tabelle angegeben sind die Pool-ID, der verwendete Stimulus (PMA; Endkonzentration: 30 ng/ml) oder IFN-γ; Endkonzentration: 20 ng/ml), die Probanden-ID, das Geschlecht, die Diagnose, sowie die vorliegenden Allele der Gene *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1*. Verwendete Abkürzungen: f: weiblich; HLA: humanes Leukozytenantigen; IFN-γ: Interferon-gamma; m: männlich; MODY: *Maturity Onset Diabetes of the Young*; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; T1D: Typ 1 Diabetes; T2D: Typ 2 Diabetes; XX: Bei einigen Probanden lagen keine weiteren Informationen über die spezifischen Allele vor. Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den HLA-Loci DRB1, DQA1 und DQB1 (Vandiedonck und Knight, 2009) und der Tatsache, dass das verwendete Probandenkollektiv ausschließlich kaukasischen Ursprungs ist, konnte davon ausgegangen werden, dass sich spezifische Allele und Suballele innerhalb einer Risikogruppe mit gleichem HLA-Haplotyp nicht unterscheiden (*HLA-DQA1*03XX* entspricht *HLA-DQA1*0301*; *HLA-DQA1*05XX* entspricht *HLA-DQA1*0501*; *HLA-DQB1*02XX* entspricht *HLA-DQB1*0201*); *-: Proband ist mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit für das entsprechende Gen homozygot.

Pool-ID	Stimulus	Proban-den-ID	Geschlecht	Diagnose	*HLA-DRB1*		*HLA-DQA1*		*HLA-DQB1*	
					Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2
höchstes Risiko										
D	unstimuliert	P 2	m	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
		P 3	m	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*02XX*	*0302*
		P 7	m	T1D, Asthma bronchiale	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
E	6 h PMA	P 2	m	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
		P 3	m	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*02XX*	*0302*
		P 7	m	T1D, Asthma bronchiale	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
F	24 h IFN-γ	P 2	m	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
		P 3	m	T1D	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*02XX*	*0302*
		P 7	m	T1D, Asthma bronchiale	*0301*	*0401*	*05XX*	*03XX*	*0201*	*0302*
hohes Risiko										
M	unstimuliert	P 23	f	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*-*	*0302*	*-*
		P 29	f	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*03XX*	*0302*	*0302*
		P 34	m	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*03XX*	*0301*	*0301*
N	6 h PMA	P 23	f	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*-*	*0302*	*-*
		P 29	f	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*03XX*	*0302*	*0302*
		P 34	m	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*03XX*	*0301*	*0301*
O	24 h IFN-γ	P 23	f	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*-*	*0302*	*-*
		P 29	f	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*03XX*	*0302*	*0302*
		P 34	m	T1D	*0401*	*0401*	*03XX*	*03XX*	*0301*	*0301*
mittleres Risiko										
P	unstimuliert	P 36	f	T1D	*0301*	*0301*	*0501*	*0501*	*02XX*	*02XX*
		P 37	f	T1D	*0301*	*0301*	*0501*	*0501*	*02XX*	*02XX*
		P 38	f	T1D	*0301*	*0301*	*0501*	*0501*	*02XX*	*02XX*
geringes Risiko 1										
J	unstimuliert	P 39	m	T2D	*0401*	*1501*	*03XX*	*0102*	*0302*	*0602*
		P 40	f	T2D	*0401*	*1501*	*03XX*	*0102*	*0302*	*0602*
		P 43	m	T2D	*0401*	*1501*	*03XX*	*0102*	*0302*	*0602*
K	6 h PMA	P 39	m	T2D	*0401*	*1501*	*03XX*	*0102*	*0302*	*0602*
		P 40	f	T2D	*0401*	*1501*	*03XX*	*0102*	*0302*	*0602*
		P 43	m	T2D	*0401*	*1501*	*03XX*	*0102*	*0302*	*0602*
L	24 h IFN-γ	P 39	m	T2D	*0401*	*1501*	*03XX*	*0102*	*0302*	*0602*
		P 40	f	T2D	*0401*	*1501*	*03XX*	*0102*	*0302*	*0602*
		P 43	m	T2D	*0401*	*1501*	*03XX*	*0102*	*0302*	*0602*
geringes Risiko 2										
G	unstimuliert	P 48	m	T2D	*0301*	*1501*	*05XX*	*0102*	*0201*	*0602*
		P 52	m	T2D	*0301*	*1501*	*05XX*	*0102*	*0201*	*0602*
		P 53	f	T2D	*0301*	*1501*	*05XX*	*0102*	*0201*	*0501*
H	6 h PMA	P 48	m	T2D	*0301*	*1501*	*05XX*	*0102*	*0201*	*0602*
		P 52	m	T2D	*0301*	*1501*	*05XX*	*0102*	*0201*	*0602*
		P 53	f	T2D	*0301*	*1501*	*05XX*	*0102*	*0201*	*0501*
I	24 h IFN-γ	P 48	m	T2D	*0301*	*1501*	*05XX*	*0102*	*0201*	*0602*
		P 52	m	T2D	*0301*	*1501*	*05XX*	*0102*	*0201*	*0602*
		P 53	f	T2D	*0301*	*1501*	*05XX*	*0102*	*0201*	*0501*

				geringes Risiko 3						
A	unstimuliert	P 54	m	T2D	*1501*	*1501*	*0102*	*0102*	*0602*	*0602*
		P 55	f	MODY	*1501*	*1501*	*0102*	*0102*	*0602*	*0602*
		P 56	m	TD Unbekannt	*1501*	*1501*	*0102*	*0102*	*0602*	*0602*
B	6 h PMA	P 54	m	T2D	*1501*	*1501*	*0102*	*0102*	*0602*	*0602*
		P 55	f	MODY	*1501*	*1501*	*0102*	*0102*	*0602*	*0602*
		P 56	m	TD Unbekannt	*1501*	*1501*	*0102*	*0102*	*0602*	*0602*
C	24 h IFN-γ	P 54	m	T2D	*1501*	*1501*	*0102*	*0102*	*0602*	*0602*
		P 55	f	MODY	*1501*	*1501*	*0102*	*0102*	*0602*	*0602*
		P 56	m	TD Unbekannt	*1501*	*1501*	*0102*	*0102*	*0602*	*0602*

8 Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.