

Aus der Klinik für Rheumatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Distler

**Validierung der High-Resolution-Melting-Analyse zur Detektion
epigenetischer Modifikationen bei systemischem Lupus erythematodes**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors in der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anna Veronica Rosenbaum

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Stefan Vordenbäumen

Zweitgutachter: PD Dr. med. Hans Martin Bosse

“Science and everyday life cannot and should not be separated.”

— Rosalind Franklin

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

1. Rosenbaum, A., Bleck, E., Schneider, M., Pongratz, G., & Vordenbäumen, S. (2016). Assessment of direct versus indirect magnetic bead-based T-cell isolation procedures followed by magnetic bead-based DNA isolation. *Lupus Science & Medicine*, 3(1), e000167.
2. Vordenbäumen, S., Rosenbaum, A., Gebhard, C., Raithel, J., Sokolowski, A., Düsing, C., Chehab, G., Richter, J. G., Brinks, R., Rehli, M., & Schneider, M. (2021). Associations of site-specific CD4⁺-T-cell hypomethylation within CD40-ligand promotor and enhancer regions with disease activity of women with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 30(1), 45–51.
3. Vordenbäumen, S., Sokolowski, A., Rosenbaum, A., Gebhard, C., Raithel, J., Düsing, C., Chehab, G., Richter, J. G., Brinks, R., Rehli, M., & Schneider, M. (2021). Methyl donor micronutrients, CD40-ligand methylation and disease activity in systemic lupus erythematosus: A cross-sectional association study. *Lupus*, 30(11), 1773–1780.

Zusammenfassung

Epigenetische Modifikationen gelten als wichtige Einflussfaktoren in der komplexen Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses (SLE). Zu einer dieser epigenetischen Modifikationen zählt die Methylierung von Cytosin. Eine globale Hypomethylierung von DNA in CD4⁺-T-Zellen von Patientinnen und Patienten mit SLE wurde bereits nachgewiesen. Auch der CD40-Ligand (CD40L) als co-stimulierender Faktor in der Aktivierung von B-Zellen spielt eine pathogenetische Rolle beim SLE. T-Zellen von weiblichen SLE-Erkrankten zeigten eine erhöhte Expression von CD40L.

Die vorliegende Studie konzentrierte sich in einem ersten Schritt auf die Validierung der *High-Resolution-Melting*(HRM)-Analyse als eine anwenderfreundliche Methode zum Nachweis von Methylierungen im CD40L-Promotor. Im Vergleich zur Massenspektrometrie-basierten Referenzmethode (EpiTYPER) erwies sich die HRM-Analyse jedoch als unzureichend.

In einem zweiten Schritt wurden die Ergebnisse der Methylierungsanalyse des EpiTYPERs von CD40L-Promotor- und CD40L-Enhancer-Bereichen ausgewertet. Es galt zu überprüfen, ob das Methylierungsmuster als Biomarker für die Beurteilung der Krankheitsaktivität dienen kann.

Hierfür wurde DNA aus CD4⁺-T-Zellen von 60 an SLE erkrankten Frauen untersucht. Die Ergebnisse wurden unter anderem mit der Krankheitsaktivität, gemessen am *Systemic Lupus Disease Activity Index* (SLEDAI), und serologischen Markern wie dem C-reaktiven Protein (CRP) oder SLE-spezifischen Autoantikörpern korreliert.

In der Auswertung der Methylierung einzelner Cytosin-Guanin-Dinukleotid(CpG)-Bereiche des CD40L-Promotors bei Frauen mit SLE zeigte sich eine Assoziation zwischen Hypomethylierung an Position CpG22 und SLEDAI ($\beta = - 40,1$, $p = 0,001$, p (adj.) = 0,027) sowie Hypomethylierung an Position CpG17 und erhöhten CRP-Werten ($\beta = - 5,6$, $p = 0,001$, p (adj.) = 0,029).

Die vorliegende Studie konnte somit einen Zusammenhang zwischen Krankheitsaktivität und Hypomethylierung an vereinzelt CpG-Loci des CD40L-Promotors bei Frauen mit SLE nachweisen.

Abstract

Epigenetic modifications are considered to be important influencing factors in the complex pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). One of these epigenetic modifications is the methylation of cytosine. Global hypomethylation of DNA in CD4⁺ T cells of patients with SLE has already been demonstrated. The CD40 ligand (CD40L) as a co-stimulating factor in the activation of B cells plays a role in the pathogenesis of SLE as well. T cells from female patients with SLE showed an increased expression of CD40L.

In a first step, the study presented here focussed on validating high-resolution melting (HRM) analysis as a user-friendly method to detect methylation in the CD40L promoter. Compared to the reference method based on mass spectrometry (EpiTYPER), the HRM analysis proved to be insufficient.

In a second step, the results of the EpiTYPER methylation analysis of CD40L promoter and CD40L enhancer regions were analysed. The aim was to verify whether the methylation pattern can serve as a biomarker for the assessment of disease activity.

For this purpose, DNA from CD4⁺ T cells of 60 women diagnosed with SLE was analysed using the reference method (EpiTYPER). Results were then correlated with disease activity, measured by the Systemic Lupus Disease Activity Index (SLEDAI), and serological markers such as c reactive protein (CRP) or SLE-specific autoantibodies.

Results of individually assessed specific cytosine guanine dinucleotides (CpG) in the CD40L promoter in women with SLE showed an association between hypomethylation at position CpG22 and SLEDAI ($\beta = -40.1$, $p = 0.001$, $p \text{ (adj.)} = 0.027$) as well as hypomethylation at position CpG17 and increased CRP values ($\beta = -5.6$, $p = 0.001$, $p \text{ (adj.)} = 0.029$).

In conclusion, it was possible to demonstrate an association between disease activity and hypomethylation in specific CpG loci of the CD40L promoter in women with SLE.

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|----------------------|---|----------------------|---|
| µM | Mikromolar | MALDI-TOF . | <i>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight</i> |
| °C..... | Grad Celsius | mg | Milligramm |
| 5hmC | 5-Hydroxymethylcytosin | MHC | <i>Major Histocompatibility Complex</i> |
| 5mC | 5-Methylcytosin | min | Minute |
| ACR..... | <i>American College of Rheumatology</i> | ml | Milliliter |
| Anti-Sm-Ak | Anti-Smith-Antikörper | mTOR | <i>mammalian target of Rapamycin</i> |
| BMI | <i>Body-Mass-Index</i> | MW | Mittelwert |
| BSG | Blutkörperniedrigungsgeschwindigkeit | n | Anzahl |
| C1q | Komplementfaktor 1 q | NF-κB | <i>nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B-cells</i> |
| C3 | Komplementfaktor 3 | p | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| C4 | Komplementfaktor 4 | p (adj.)..... | adjustierte Irrtumswahrscheinlichkeit |
| C5 | C5-Kohlenstoff | PBMC | <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> | PCR..... | Polymerasekettenreaktion |
| CD40 | <i>Cluster of differentiation 40</i> | PI3K..... | Phosphoinositid-3-Kinase |
| CD40L..... | <i>Cluster of differentiation 40 Ligand</i> | PKC-δ | Protein Kinase C delta |
| CpG | Cytosin-Guanin Dinukleotid | RNA | Ribonukleinsäure |
| CRP | C-reaktives Protein | rpm..... | <i>rounds per minute</i> |
| C _T | <i>Cycle Threshold</i> | s..... | Sekunde |
| dl..... | Deziliter | SAH | S-Adenosylhomocystein |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure | SAM..... | S-Adosylmethionin |
| DNMT | DNA-Methyltransferase | SD | Standardabweichung |
| E..... | Regressionskoeffizient (β) | SLE | Systemischer Lupus erythematoses |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat | SLEDAI | <i>Systemic Lupus Erythematoses Disease Activity Index</i> |
| ERK..... | extrazelluläre Rezeptorkinase | SLICC ... | <i>Systemic Lupus Collaborating Clinics</i> |
| g..... | Gramm | T _M | Schmelztemperatur |
| h..... | Stunde | TNF..... | Tumornekrosefaktor |
| HRM..... | <i>High-resolution melting</i> | U | <i>Unit</i> |
| Ig..... | Immunglobulin | UV..... | Ultraviolett |
| kDa | Kilodalton | x g | x Erdbeschleunigung |
| kg..... | Kilogramm | β | Regressionskoeffizient |
| KI..... | Konfidenzintervall | µl..... | Mikroliter |
| l..... | Liter | | |
| m..... | Meter | | |
| MACS..... | <i>Magnetic cell separation</i> | | |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Immunologische Grundlagen zu CD40 und CD40-Ligand..... | 1 |
| 1.2 | Systemischer Lupus erythematoses | 3 |
| 1.2.1 | Pathogenese und Ätiologie | 5 |
| 1.2.2 | Genetische Faktoren | 6 |
| 1.2.3 | Umweltfaktoren | 6 |
| 1.2.4 | Geschlecht und hormonelle Faktoren | 8 |
| 1.3 | Epigenetik..... | 9 |
| 1.3.1 | DNA-Methylierung..... | 9 |
| 1.3.2 | Einfluss auf Methylierung | 13 |
| 1.4 | Methoden zur Analyse von DNA-Methylierungen | 14 |
| 1.4.1 | Bisulfit-Sequenzierung | 15 |
| 1.4.2 | Pyrosequenzierung..... | 16 |
| 1.4.3 | Methylierungssensitive <i>High-Resolution-Melting</i> -Analyse | 16 |
| 1.4.4 | MassARRAY-EpiTYPER-Technik..... | 16 |
| 1.5 | Zielsetzung der Arbeit | 17 |
| 2 | Material und Methoden | 18 |
| 2.1 | Untersuchungsmaterial | 18 |
| 2.2 | Material für die Laborarbeit | 20 |
| 2.2.1 | Geräte..... | 20 |
| 2.2.2 | Verbrauchsmaterial..... | 21 |
| 2.2.3 | Reagenzien..... | 21 |
| 2.2.4 | Kits..... | 21 |
| 2.2.5 | <i>Primer</i> für die HRM-Analyse..... | 22 |
| 2.2.6 | <i>Primer</i> für den MassARRAY | 22 |
| 2.2.7 | Software und Datenbanken..... | 22 |
| 2.2.8 | Kontrollen | 23 |
| 2.3 | Methoden zur Erhebung der klinischen Daten | 23 |
| 2.3.1 | <i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i> - SLEDAI | 23 |
| 2.3.2 | <i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics</i> - SLICC..... | 23 |
| 2.3.3 | Blutentnahme..... | 24 |
| 2.4 | Labormethoden..... | 24 |
| 2.4.1 | Isolierung der CD4 ⁺ -T-Lymphozyten..... | 24 |
| 2.4.2 | Zellzählung am Durchflusszytometer..... | 25 |
| 2.4.3 | Manuelle magnetische Zellseparation von CD4 ⁺ -Zellen..... | 25 |
| 2.4.4 | DNA-Isolierung am MagCore [®] HF16 | 26 |
| 2.4.5 | Bisulfit-Konversion | 26 |
| 2.4.6 | <i>Primer</i> -Design für die HRM-Analyse | 30 |
| 2.4.7 | Sequenzierung..... | 31 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.4.8 | High-Resolution-Melting-Analyse | 31 |
| 2.4.9 | MassARRAY-EpiTYPER-Technik | 33 |
| 2.5 | Statistische Auswertung | 34 |
| 3 | Ergebnisse | 35 |
| 3.1 | Etablierung der HRM-Methode..... | 35 |
| 3.1.1 | MACS [®] -Isolierungskit und DNA-Isolierung am MagCore [®] | 35 |
| 3.1.2 | Bisulfit-Konversionskit..... | 37 |
| 3.1.3 | <i>Primer</i> -Testung..... | 38 |
| 3.1.4 | Messung der Proben mittels HRM-Analyse | 39 |
| 3.1.5 | Messung der Proben mittels EpiTYPER | 39 |
| 3.2 | Analyse der EpiTYPER-Daten..... | 40 |
| 3.2.1 | Beschreibung der untersuchten CpG-Bereiche..... | 40 |
| 3.2.2 | Assoziation von Geschlecht, Alter, CpG-Methylierung und SLEDAI..... | 41 |
| 3.2.3 | Beschreibung der Kohorte | 44 |
| 3.2.4 | Assoziation von CpG-Methylierung bei Frauen und SLEDAI..... | 46 |
| 3.2.5 | Assoziation von CpG-Methylierung bei Frauen und SLICC | 48 |
| 3.2.6 | Assoziation von CpG-Methylierung bei Frauen und Anti-dsDNA-Ak..... | 49 |
| 3.2.7 | Assoziation von CpG-Methylierung bei Frauen und C3 bzw. C4..... | 50 |
| 3.2.8 | Assoziation von CpG-Methylierung bei Frauen und CRP | 52 |
| 3.3 | Zusammenfassung..... | 54 |
| 4 | Diskussion | 55 |
| 4.1 | Diskussion der angewandten Methoden..... | 55 |
| 4.1.1 | MACS [®] und MagCore [®] DNA Isolierung..... | 55 |
| 4.1.2 | Bisulfit-Konversion | 56 |
| 4.1.3 | <i>Primer</i> -Design und Testung mittels HRM-Analyse | 57 |
| 4.1.4 | EpiTYPER..... | 58 |
| 4.2 | Diskussion der erhobenen Daten..... | 59 |
| 4.3 | Limitationen | 60 |
| 4.4 | Ausblick..... | 61 |
| 5 | Literaturverzeichnis..... | 62 |
| 6 | Anhang | 72 |

1 Einleitung

1.1 Immunologische Grundlagen zu CD40 und CD40-Ligand

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine systemische Autoimmunerkrankung. Pathogenetisch sind sowohl adaptive als auch angeborene Immunmechanismen gestört [1]. Das adaptive Immunsystem besteht aus B- und T-Lymphozyten. Für ihre Differenzierung ist ein komplexes System verantwortlich, das auf der Interaktion von B-Zellen und T-Zellen, Interleukinen (IL) und verschiedenen co-stimulatorischen Signalen beruht.

Erkennt eine B-Zelle über die variable Region ihres B-Zell-Rezeptors ihr spezifisches Antigen, benötigt sie zur Aktivierung eine CD4⁺-T-Helferzelle. Diese bindet über den ebenfalls antigenspezifischen T-Zellrezeptor an eine Domäne des *Major Histocompatibility complex*(MHC)-II-Peptid-Komplexes der B-Zelle, mit dem der CD4⁺-T-Helferzelle das spezifische Antigen präsentiert wird. Zur vollständigen Aktivierung dienen verschiedene zelluläre co-stimulatorische Signale sowie Zytokine. Eine wichtige Zell-Zell-Co-Stimulation ist die Interaktion am CD40-Rezeptor der B-Zelle und dem CD40-Ligand (CD40L) der T-Zelle [2]. Sie dient der B-Zell- und T-Zell-Proliferation und des B-Zell-Überlebens [3], [4].

Weitere co-stimulatorische Signale in der T-Zell/B-Zell-Interaktion werden über den *inducible co-stimulator* (ICOS) mit dazugehörigem ICOS-Liganden vermittelt. Das *programmed cell death protein 1* (PD-1) und der PD-1-Ligand wirken in der T-Zell/B-Zell-Interaktion als co-inhibitorische Signalgeber, bei der Differenzierung von T-Zellen [5]. An der zellulären Kommunikation beteiligte Interleukine sind unter anderem IL-21 und IL-4, die die B-Zell-Differenzierung und -Proliferation unterstützen [6].

CD40 ist ein 48 Kilodalton (kDa) großes Transmembranprotein in der Zelloberfläche von B-Zellen und anderen antigenpräsentierenden Zellen [7]. Das *CD40*-Gen liegt auf Chromosom 20 (20q12–q13.2). Bestehend aus neun Exons enthält das Endprodukt 277 Aminosäuren [8], [9]. Es stammt aus der Familie der Tumornekrosefaktor(TNF)-Rezeptoren. Nach Stimulation des Rezeptors werden sowohl der NF- κ B(*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*)-Weg aktiviert, der das Überleben der Zelle stärkt, als auch der Phosphoinositid-3-Kinase(PI3K)-Weg, der das Überleben der Zelle, das Fortschreiten des Zellzyklus, den Metabolismus von Glucose

sowie die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) induziert. Durch Re-Expression der Telomerase-Aktivität trägt CD40 zu einer Verlängerung der Überlebenszeit der Zelle bei [2]. Neben der B-Zell-Aktivierung ist CD40 von Bedeutung in der Gedächtniszellgenerierung, dem Antikörper-Isotypen-Wechsel und der Produktion von zahlreichen Zytokinen wie IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) sowie Chemokinen [10], [8]. CD40 lässt sich auch auf der Zelloberfläche von epithelialen, endothelialen und einigen mesenchymalen Zellen nachweisen [4].

Der CD40-Ligand (in der Literatur auch CD154) ist ein 34-39 kDa großes, trimeres Membranprotein aus 261 Aminosäuren, kodiert auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xq26.3–q27.1). Das *CD40L*-Gen besteht aus fünf Exons und vier Introns. Das erste Exon kodiert für die intrazelluläre, transmembranöse und einen kleinen Teil der extrazellulären Domäne. Die restlichen Exons kodieren für die übrige extrazelluläre Region des Proteins. Die Promotorsequenz enthält circa 2.000 Basenpaare [9]. Überwiegend von CD4⁺-T-Zellen exprimiert, kann CD40L unter anderem auch auf Makrophagen, Thrombozyten, Endothelzellen sowie glatten Muskelzellen exprimiert werden und wird auch in löslicher Form mit vergleichbarer Funktion nachgewiesen [11], [8], [12]. Neben CD40 binden auch andere Rezeptoren CD40L. Als ein Beispiel gilt der Glykoprotein-Ib/IIIa-Rezeptor, der eine wichtige Rolle in der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten einnimmt und somit auch an der Thrombusbildung beteiligt ist [8]. Erste Erkenntnis zur Funktion von CD40L erhielt man im Zusammenhang mit dem X-gekoppelten Hyper-Immunglobulin-M(IgM)-Syndrom. Die Erkrankung, verursacht durch Mutationen im *CD40L*-Gen, führt zu der Unfähigkeit zum Antikörperklassenwechsel und ist durch eine hohe Konzentration an IgM-Antikörpern und ein Fehlen von IgG, IgA oder IgE charakterisiert [11]. Das autosomal-rezessiv vererbte Hyper-IgM-Syndrom tritt bei Mutationen im *CD40*-Gen auf und ist klinisch nicht zu unterscheiden vom X-gekoppelten Hyper-IgM-Syndrom.

Aufgrund vielfältiger biologischer Effekte ist es lange nicht gelungen, die CD40-Rezeptor/Ligand-Schnittstelle als Ansatz für eine erfolgreich Immuntherapie zu nutzen [13]. In Mausmodellen zu SLE zeigte sich vorerst ein gutes Outcome. Die Blockierung des CD40-CD40L-Signalwegs mittels monoklonaler Antikörper konnte eine Reduktion der Autoantikörperproduktion, insbesondere der Anti-Doppelstrang-DNA-Antikörper(Anti-dsDNA-Ak)-Level, bewirken sowie den Antikörper-Isotypwechsel, als auch eine renale

Beteiligung durch u. a. B-Zell-Infiltration in Zielorgane verhindern [14], [13], [12]. Klinische Studien zu CD40L-blockierenden Antikörpern wurden aber zum Teil aufgrund von thromboembolischen Zwischenfällen eingestellt [8], [15]. Durch Studien zu Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen konnten weitere Erkenntnisse gewonnen werden zu den Auswirkungen der Blockierung des CD40-CD40L-Signalwegs durch Antikörper. Aktuell zeigen Studien zu verschiedenen Erkrankungen vielversprechende Ergebnisse in Hinblick auf eine Therapie, die die CD40-CD40L-Interaktion beeinflusst. Der anti-CD40L-Antikörper Frexalimab zeigte bei Multiple-Sklerose-Erkrankten eine Verringerung in der Anzahl der Läsionen in der Magnetresonanztomographie im Vergleich zur Placebo-Gruppe [16]. Bei der Behandlung des Sjögren-Syndroms mit Dazodalibep, einem CD40L-Antagonisten, wurden Besserungen der Symptome und der Krankheitsaktivität beobachtet [17]. Für die Therapie bei systemischem Lupus erythematoses laufen aktuell Phase-3-Studien mit Dapirolizumab pegol, einem CD40L-Inhibitor, der zumindest nach Auswertung der Phase 2 gut verträglich ist, und sich klinisch und immunologisch Verbesserungen zeigen [18].

1.2 Systemischer Lupus erythematoses

Der systemische Lupus erythematoses ist eine chronische, entzündliche Autoimmunerkrankung, die ein weites Spektrum an klinischer Manifestation in multiplen Organen und Geweben zeigt. 2019 überarbeitete Aringer *et al.* die bestehenden *American College of Rheumatology*(ACR)-Klassifikationskriterien des SLE. Sie helfen die Erkrankung besser zu erkennen, von anderen Autoimmunerkrankungen abzugrenzen und dienen vor allem als Grundlage für klinische Studien [19], [20]. Tabelle 1 zeigt Einschlusskriterien und Zusatzkriterien mit den jeweiligen Punkten, die ihnen zugeteilt werden. Ein Bestandteil, neben dem klinischen Erscheinungsbild, sind verschiedene serologische Marker. Obligates Einstiegs Kriterium ist der Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA), aktuell oder jemals, mit einem Titer von $\geq 1:80$. Für die Klassifikation müssen, neben dem genannten ANA-Titer, mindestens zehn Punkte erreicht und ein klinisches Kriterium erfüllt sein.

Tabelle 1: Klassifikationskriterien für den SLE nach Aringer et al., 2019 [19]

Einstiegskriterium: ANA \geq 1:80

- Wenn nicht vorhanden, nicht als SLE klassifizieren
- **Wenn vorhanden, Zusatzkriterien anwenden**

Zusatzkriterien:

| Klinische Kriterien | | Punkte |
|--------------------------------|--|---------------|
| Konstitution | Fieber (nicht infektiös) | 2 |
| Hämatologie | Leukopenie | 3 |
| | Thrombopenie | 4 |
| | Autoimmunhämolyse | 4 |
| Neuropsychiatrie | Delirium | 2 |
| | Psychose | 3 |
| | Krampfanfälle | 5 |
| Haut/Schleimhaut | Nicht vernarbende Alopezie | 2 |
| | Orale Ulzera | 2 |
| | Subakut kutaner oder diskoider Lupus | 4 |
| | Akuter kutaner Lupus | 6 |
| Serös | Pleura- oder Perikarderguss | 5 |
| | Akute Perikarditis | 6 |
| Bewegungsapparat | Gelenkbeteiligung (Synovitis bzw. Druckschmerz und Morgensteifigkeit \geq 2 Gelenke) | 6 |
| Niere | Proteinurie $>$ 0,5 g / 24 h | 4 |
| | Lupusnephritis (histologisch) Typ II oder V | 8 |
| | Lupusnephritis (histologisch) Typ III oder IV | 10 |
| Serologische Marker | | |
| Antiphospholipid-Antikörper | Anticardiolipin-Antikörper | 2 |
| | Beta-2-Glykoprotein | 2 |
| | Lupus-Antikoagulanz | 2 |
| Komplementsystem | C3 oder C4 vermindert | 3 |
| | C3 und C4 vermindert | 4 |
| SLE-spezifische Autoantikörper | Anti-dsDNA-Ak | 6 |
| | Anti-Sm-Ak | 6 |

→ **Klassifizierung als SLE: Mindestens ein klinisches Kriterium und \geq 10 Punkte**

ANA = Antinukleäre Antikörper, SLE = systemischer Lupus erythematoses, g/24h = Gramm/24 Stunden, C3 = Komplementfaktor 3, C4 = Komplementfaktor 4, Anti-dsDNA-Ak = Anti-Doppelstrang-DNA-Antikörper, Anti-Sm-Ak = Anti-Smith-Antikörper

Ein Charakteristikum des SLE ist das erhöhte Vorkommen von Autoantikörpern. Sie sind, direkt oder über die Bildung von Immunkomplexen, beteiligt an der klinischen Symptomatik. Nach Bestimmung von ANA aus dem Blut der Erkrankten, können der Nachweis von Anti-dsDNA-Ak und Anti-Smith-Antikörpern (Anti-sm-Ak), die sich auch gegen nukleäre Strukturen richten, richtungsweisend sein. Insgesamt können eine Vielzahl unterschiedlicher Autoantikörper beim SLE nachgewiesen werden, bei denen nicht nur nukleäre Antigene als Zielstrukturen dienen. Auch Antikörper gegen z. B. Komplementfaktoren oder Phospholipide sind verantwortlich für das heterogene Krankheitsbild und das systemische Krankheitsgeschehen [21]. Zum Teil werden Antikörper als Marker für die Krankheitsaktivität bestimmt [14], [22]. Neben der Untersuchung der erwähnten Antikörper und der Erhebung der klinischen Symptomatik werden weitere Biomarker zur Diagnostik und Verlaufskontrolle hinzugezogen. Hierzu zählen Standardlaboruntersuchungen inklusive Entzündungsparameter wie Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und C-reaktives-Protein (CRP), Blutbild und Urindiagnostik sowie Komplementfaktor 3 (C3) und Komplementfaktor 4 (C4) [23], [20]. Neue Biomarker, die im Verlauf der Erkrankung eine Überwachung der Therapie erlauben oder Auskunft über individuelle Therapiemöglichkeiten liefern, sind Inhalt aktueller Forschung [24]. Ziel ist es, die wachsende Kenntnis über die Pathogenese und Ätiologie des SLE für möglichst individualisierte Entscheidungen im Sinne der Patientinnen und Patienten zu nutzen [25].

1.2.1 Pathogenese und Ätiologie

Der systemische Lupus erythematodes ist eine Autoimmunerkrankung mit noch nicht vollständig verstandener Pathogenese und unklarer Ätiologie [26], [27]. Dennoch wurden in den vergangenen Jahrzehnten große Fortschritte im Verständnis dieser komplexen Erkrankung erzielt [28]. Besonders der Zusammenhang von zellulären und molekularen Mechanismen stand im Mittelpunkt der Forschung autoimmunbedingter Erkrankungen [29]. In der Literatur werden eine Vielzahl an Ursachen für Lupus-Erkrankungen und die Entstehung von Erkrankungsschüben diskutiert. Ein multifaktorielles Geschehen bildet die Grundlage für alle Theorien. Im Folgenden wird auf eine Auswahl an Faktoren eingegangen, die für die Entstehung von Lupus ursächlich sein und den Verlauf beeinflussen können. Auf viele weitere mögliche Ursachen, wie die Rolle von Teilen des angeborenen Immunsystems (z. B. neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen oder

Clearance-Defekte durch gestörte Apoptose), sowie Umweltfaktoren wie Chemikalien oder Infektionen wird nicht weiter eingegangen.

1.2.2 Genetische Faktoren

Genetische Anlagen führen häufig zu einer Prädisposition für die Entstehung des Lupus. Solche Annahmen können gemacht werden auf der Grundlage von einem nachgewiesenen erhöhten familiären Risiko von circa 10 bis 30 Prozent und einer 20-prozentigen Konkordanz unter monozygoten Zwillingen, gegenüber zwei bis fünf Prozent bei dizygoten Zwillingen und Geschwistern [30], [31]. Seltene Formen der Lupus-Erkrankung, die sich bereits im Kindesalter manifestieren, sind häufig assoziiert mit einer monogenen Ursache. Der C1q-Komplementdefekt ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die mit einem bis zu 93-prozentigen Risiko einhergeht, Lupus zu entwickeln [32]. Die Einteilung von Erkrankten in Gruppen auf Grundlage von genetischen Veranlagungen könnte in Zukunft die personalisierte Therapie vereinfachen [33]. Es ist allerdings meistens nur die Gesamtheit einer Vielzahl an genetischen Varianten, die zu einem erhöhten Risiko für eine SLE-Erkrankung führen [34], [31]. Studien zu Autoimmunerkrankungen bei monozygoten Zwillingen deuten durch häufige Konkordanz auf eine genetische Veranlagung hin. Die häufigen Unterschiede im Erkrankungsstatus bei monozygoten Zwillingen weisen jedoch ebenso darauf hin, dass die Krankheit nicht alleinig durch den Genotyp bedingt ist [35]. Nicht-genetische Ursachen wie z. B. Umweltfaktoren könnten die Expression von bestimmten Genen beeinflussen und Lupus dadurch triggern [36]. Genomweite Studien haben in den vergangenen Jahren eine Vielzahl an Einzelnukleotid-Polymorphismen aufgedeckt, die in ihrer Gesamtheit das Risiko einer Erkrankung erhöhen können [21], [31], [34].

1.2.3 Umweltfaktoren

Der Verlust von Selbsttoleranz ist ein entscheidender Schritt in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass verschiedene Umweltfaktoren diese Toleranz beeinflussen können. Ultraviolettes(UV)-Licht (UV-A2 und UV-B) ist einer der bekanntesten Trigger für Erkrankungsschübe. Bis zu 73 Prozent der Erkrankten entwickeln Symptome unter UV-Licht-Exposition [37]. Diese induziert die Apoptose in Keratinozyten. Werden die apoptotischen Zellen durch gestörte Makrophagenaktivität nicht schnell genug abgebaut, kann es durch Zerfall zu einer

vermehrten Präsentation von Zellkernbestandteilen kommen [38], [39], [40], [41]. Die Reaktionen von Autoantikörpern gegen nukleäre Strukturen werden unter anderem als ein klinisches Merkmal des Lupus in der Haut sichtbar. Zum anderen wurde nachgewiesen, dass Erkrankte mit aktivem SLE besonders stark auf UV-B-Licht reagieren, gemessen an der Verringerung ihres DNA-Methylierungslevels [37]. UV-Licht verursacht oxidativen Stress in Zellen, der gestörte T-Zellfunktion verursachen kann [40]. SLE-Erkrankte werden deshalb aufgefordert, sich konsequent vor UV-Licht zu schützen, da dies die Erkrankung im Verlauf beeinflusst. Das konsequente Vermeiden von UV-Licht führt jedoch meist zu einem ausgesprochenen Vitamin-D-Mangel [42].

Ein inverser Zusammenhang zwischen Krankheitsaktivität und Vitamin-D-Spiegel konnte in einer Studie über einen Zeitraum von 32,5 (\pm 5,5) Monaten nachgewiesen werden [43]. Vitamin D ist ein fettlösliches Vitamin, das in zwei Formen existiert: Vitamin D₂ und Vitamin D₃. Vitamin D₃ wird durch UV-Licht in der Haut synthetisiert. Durch weiteren Metabolismus in Leber, Niere und Immunsystem entsteht die aktive Form 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. Diese aktive Form hat neben der Funktion des Calcium- und Phosphat-Metabolismus auch immunmodulatorische Funktionen, die nun unter anderem zur Abschwächung der B-Zell-Proliferation und somit eine Verminderung der Antikörperproduktion oder zu einer Verminderung der proinflammatorischen Zytokin-Produktion führen. Auch zeigte sich durch Vitamin D eine Steigerung des CD40L-Methylierungslevels und daraus resultierend eine Verminderung von Proteinkinase C Delta (PKC- δ), extrazellulärer Rezeptor kinase (ERK) und CD40L-Expression in CD4⁺-T-Zellen von Lupus-Erkrankten. [43]. Die aktuellen Ergebnisse von zahlreichen Studien zu Vitamin D und SLE-Krankheitsaktivität sind jedoch nicht eindeutig und bedürfen weiterer Untersuchungen zur Klärung von Ursache und Wirkung [42], [43], [44]. Auf eine ausreichende Vitamin-D-Substitution kann im Rahmen von regelmäßigen Kontrolluntersuchungen geachtet werden.

Arzneimittelinduzierter Lupus ist ein bekanntes Phänomen. Dass Medikamente wie Hydralazin und Procainamid eine Lupus-ähnliche Erkrankung durch die Bildung von antinukleären Antikörpern auslösen können, ist lange bekannt [45]. Hydralazin, ursprünglich eingesetzt als blutdrucksenkendes Medikament, hat heute aufgrund seines breiten Nebenwirkungsspektrums keine große therapeutische Bedeutung mehr [46]. Ebenso stellt Procainamid heutzutage lediglich ein Reserve-Antiarrhythmikum dar. Die Wirkung beider Medikamente trug schon früh zum Verständnis epigenetischer

Mechanismen bei der Beeinflussung von Autoimmunerkrankungen bei, insbesondere im Zusammenhang mit SLE. Gesteigerte T-Zell-Autoreaktivität wird hierbei in vitro durch die Hemmung von Enzymen und Signalwegen, nötig für DNA-Methylierung in T-Zellen, hervorgerufen [45]. Moderne Medikamente wie Typ-I-Interferon und TNF- α -Blocker aus der Gruppe der Biologika sind heute eher für Lupus-ähnliche Nebenwirkungen bekannt [47], [48].

Ein weiterer wichtiger Umweltfaktor ist die Ernährung. Sie wirkt sich auf die Entstehung und den Verlauf vieler Krankheiten aus, so zum Beispiel durch ihren Einfluss auf epigenetische Mechanismen. DNA-Methylierungen werden durch Enzyme wie die DNA-Methyltransferasen (DNMT) hinzugefügt. Für die Funktion dieser Enzyme sind u. a. Nährstoffe wie Folsäure, Methionin, Vitamin B2, B6 und B12 sowie Homocystein essenziell. So ist die Aufnahme von Methionin, Cholin und Cystein bei Frauen mit SLE assoziiert mit einer höheren Methylierungsrate des CD40L-Promotors in T-Zellen [49].

Auch oxidativer Stress hat eine negative Auswirkung auf die Funktion der DNMT. Das Zusammenspiel von Nährstoffmangel und zusätzlichem oxidativen Stress durch z. B. UV-Licht, kann daraufhin zu einem Anstieg der Krankheitsaktivität führen [40].

1.2.4 Geschlecht und hormonelle Faktoren

Tatsächlich fällt in den epidemiologischen Daten zum SLE auf, dass das weibliche Geschlecht im Verhältnis 9:1 (4:1 in Deutschland) deutlich häufiger betroffen ist als das männliche [50]. Eine der ersten naheliegenden Annahmen war, dass der Östrogenspiegel einen Einfluss auf die Entstehung der Krankheit und ihr gehäuftes Auftreten bei Frauen hat [51]. Die Tatsache, dass es bei Kindern (6:1) und postmenopausalen Frauen (4:1) jedoch auch ein deutliches Geschlechterungleichgewicht zu erkennen ist, lässt Östrogen eher als Faktor für die Schwere des Verlaufs vermuten [52]. Eine weitere mögliche Erklärung für das häufigere Auftreten bei Frauen ist eine gesteigerte Aktivierung bzw. geringere Inaktivierung von X-chromosomalen Genen. So nähert sich die Inzidenz von Lupus bei Männern mit Klinefelter-Syndrom (47,XXY) jener der Frauen an [53]. Wird eines der X-Chromosomen bei Frauen nicht komplett inaktiviert, können die dort befindlichen Gene vermehrt exprimiert werden. Bei SLE-Patienten spielt hierbei offenbar das *CD40L*-Gen eine wichtige Rolle [54]: Eine erhöhte Expression des Gens, so die Annahme, führt zu einer gesteigerten Aktivierung von B-Zellen und zu einer erhöhten Immunreaktion durch Produktion von Autoantikörpern [55]. Dieses Gen ist auf T-Lymphozyten von Frauen mit

Lupus demethyliert und vermehrt exprimiert, jedoch nicht bei Männern [52], [55]. Bei gesunden Frauen konnte nachgewiesen werden, dass das *CD40L*-Gen auf dem einen X-Chromosom von CD4⁺-T-Zellen methyliert ist und auf dem anderen nicht methyliert vorliegt. Das *CD40L*-Gen bei Männern ist überwiegend nicht methyliert [55], [56].

1.3 Epigenetik

Der Begriff Epigenetik wurde 1942 von Conrad Waddington geprägt, noch zehn Jahre bevor die Struktur der DNA 1953 aufgeklärt wurde. Für ihn war die zentrale Aufgabe der Epigenetik die Verbindung von Genotyp und Phänotyp [57]. Epigenetik ist ein Mechanismus, der Einfluss nimmt auf die Genexpression [58]. Hierbei kommt es nicht zu einer Veränderung der DNA-Sequenz an sich, sondern zu einer Veränderung in der Funktion dieser Sequenz [59]. Diese Modifikationen werden stabil vererbt, sind aber reversibel. Zu den wichtigsten epigenetischen Modifikationen gehören die Methylierung und Acetylierung von Histonen [60], der Umbau von Chromatinstrukturen [59], mikro-RNAs sowie die Methylierung von DNA [61]. Eine, in der Bedeutung teilweise noch unklare epigenetische Modifikation, ist das 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC). Es kommt vor als Zwischenprodukt im Abbau von 5-Methylcytosin (5mC). 5hmC scheint ebenfalls eine eigenständige Funktion als epigenetischer Marker zu haben [62]. In CD4⁺-T-Zellen von SLE-Erkrankten wurden bereits erhöhte 5hmC-Werte nachgewiesen werden [63].

1.3.1 DNA-Methylierung

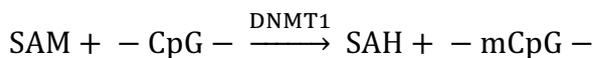
Methylierungen von DNA können auf unterschiedliche Weise die Genexpression regulieren. In der Promotorregion eines Gens führt die Methylierung von Cytosin zu einer Inaktivierung der Genexpression. Zum einen verhindert die Methylgruppe direkt die Bindung von Transkriptionsfaktoren. Zum anderen gibt es Proteine, wie Methyl-DNA-Bindeproteine, die durch Rekrutierung ihrerseits die Bindung von Transkriptionsfaktoren unterbinden und Acetylierungen von Histonen fördern [46], [64]. Studien konnten jedoch auch zeigen, dass Hypomethylierung eine Reaktion auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren sein kann. Dies macht das Zusammenspiel von Gentranskription und Methylierungsstatus nicht einfach vorherzusagen [65], [66].

Der menschliche DNA-Strang liegt kondensiert im Zellkern vor. Für diese Anordnung wird er zuerst als Nukleosom verpackt. Hierbei wird die DNA (147 Basenpaare) um einen

Histon-Oktamer gewickelt. Die negativ geladene DNA und die positiv geladenen Histonproteine bilden starke elektrostatische Bindungen aus [29]. Mehrere Nukleosome organisieren sich dann zu einer Chromatinfaser zusammen. Diese Struktur lässt sich während der Interphase des Zellzyklus beobachten. Durch weitere Verdrillung entsteht in der Metaphase das hoch kondensierte Chromatid. Während der restlichen Phasen des Zellzyklus weist ein Chromosom jeweils Abschnitte von locker verpacktem Euchromatin und kondensiertem Heterochromatin vor. Bei Euchromatin handelt es sich um eine transkriptionsaktive Form. Heterochromatin kann unterteilt werden in konstitutionelles Heterochromatin, das auf bestimmten Chromosomen durchgehend hochkondensiert vorliegt, und fakultatives Heterochromatin, das je nach Zelltyp variieren kann. Die posttranslationale Modifikation von Histonen dient zum einen der Verpackung von DNA und zur Aufrechterhaltung der chromosomalen Integrität [67], und zugleich reguliert es so bereits die Zugänglichkeit für die Transkription [29].

Das inaktivierte X-Chromosom eines weiblichen Individuums liegt in Form von fakultativem Heterochromatin vor und ist dem Transkriptionsapparat somit schwer zugänglich. Als kondensierte Form ist es im Lichtmikroskop als Barr-Körperchen sichtbar. In Oozyten kann es im Rahmen der Meiose zu Euchromatin gelöst werden [68]. Zusätzlich werden in dem inaktiven X-Chromosom ein hohes Level an DNA-Methylierungen und ein geringes Level an Histon-Acetylierungen nachgewiesen. Viele ergänzende Mechanismen, wie z. B. die lange nicht kodierende X-Inaktivierung-spezifische-Transkript-RNA (*Xist-RNA*) führen zur Inaktivierung des Chromosoms und seiner Gene [69]. In Zellen weiblicher Individuen ist also immer nur ein X-Chromosom aktiv. Diese Inaktivierung dient der Gendosiskompensation und ist zufallsabhängig [68], [70]. Dennoch können circa 15 Prozent der Gene der Inaktivierung entkommen und exprimiert werden. Auch hier zeigen sich Unterschiede in den Geweben und der Zellspezialisierung [71]. Die komplette Inaktivierung eines Gens ist eher untypisch, da man davon ausgeht, dass beide Kopien der Gene von Mutter und Vater ausgeglichen exprimiert werden. Es gibt aber weitere Ausnahmen dieses genomischen Imprintings in circa 100 bis 200 Genen. Hier bedarf es nur der Expression des mütterlichen oder des väterlichen Gens. Störungen in diesem System führen zu Entwicklungsdefekten (z. B. Prader-Willi-Syndrom oder Angelman-Syndrom). Häufigster Mechanismus des genomischen Imprintings ist die DNA-Methylierung [29], [58].

Methylierungen werden eingefügt durch verschiedene DNA-Methyltransferasen (DNMT). DNMT1 ist für den Erhalt von bestehenden Methylierungen im Rahmen des Zellzyklus von Bedeutung [58]. Jedes Mal, wenn sich eine Zelle teilt, wird DNA samt seiner epigenetischen Modifikationen repliziert [40]. DNMT1 wird unter anderem über einen Stoffwechselweg der mitogen-aktivierten extrazellulären Rezeptorkinase (ERK) reguliert [72], [73]. Diese kann wiederum reguliert werden durch die Proteinkinase C delta (PKC- δ) [74], [75]. Dieser Pfad dient häufig als transgener Kontrollpunkt und wird in Mausmodellen genutzt, um Lupus-ähnliche Erkrankungen hervorzurufen. CD4⁺-T-Zellen von Lupus-Erkrankten zeigen diverse Veränderungen in diesem Signalweg [76], [65]. Für die Neusynthese von Methylierungen sind DNMT3a und DNMT3b verantwortlich. Diese Neusynthese erfolgt in der frühen Embryogenese, nach genomweiter Demethylierung [58]. Bei dem Vorgang wird eine Methylgruppe zumeist an die C5-Position eines Cytosins übertragen, welches überwiegend als Cytosin-Guanin(CpG)-Dinukleotid vorliegt [77]. Diese Methylgruppe stammt von S-Adenosylmethionin (SAM). Es entsteht 5-Methylcytosin und S-Adosylhomocystein (SAH). Abb. 1 stellt die biochemische Reaktion schematisch dar.



Die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist proportional zur Konzentration an SAM und der Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms und umgekehrt proportional zur SAH-Konzentration [78], [79].

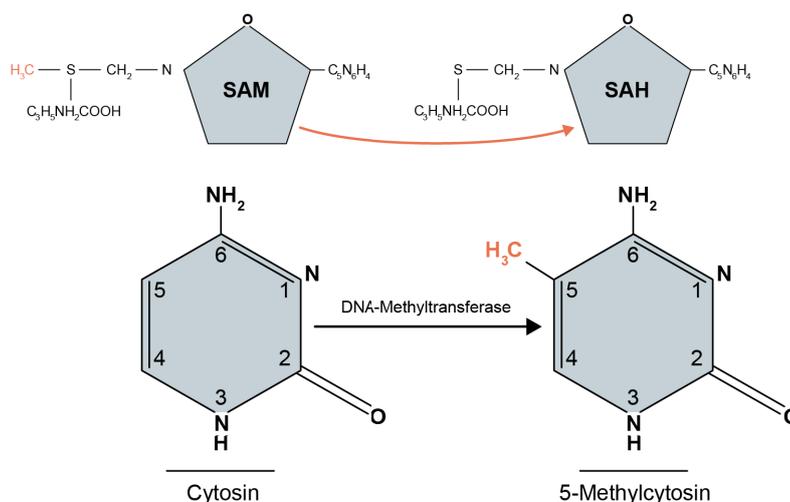


Abb. 1: Darstellung der biochemischen Reaktion der DNA-Methylierung. Die Methylgruppe wird mithilfe der DNA-Methyltransferase von S-Adenosylmethionin (SAM) auf das 5' Kohlenstoff von Cytosin übertragen. Modifiziert nach Attwood et al. [80]

5mC macht circa ein Prozent der gesamten DNA-Basen aus und betrifft circa 70 bis 80 Prozent aller CpG-Dinukleotide im Genom [81]. Die methylierten CpG-Dinukleotide sind im ganzen Genom verteilt, kommen gehäuft (zu circa 15 Prozent) als CpG-Inseln vor, wovon ungefähr die Hälfte in Transkriptionsstart- bzw. Promotorregionen liegen [59]. Man schätzt, dass es circa 27 Millionen CpGs im menschlichen Genom gibt. 1,2 Millionen davon befinden sich allein auf dem X-Chromosom [71]. Das Methylierungsmuster ist ein dynamischer Prozess, der sich im Laufe des Lebens ändern kann. So zeigen sich diverse Hypomethylierungen im gesamten Genom mit zunehmendem Alter. Methylierungsmuster sind vererbbar, monozygote Zwillinge zeigen jedoch auch Unterschiede [29]. Da vor allem im Laufe des Lebens immer mehr Unterschiede im Methylierungsmuster bei monozygoten Zwillingen nachweisbar sind, wird dies als Hinweis auf den Einfluss von Umweltfaktoren bewertet [65]. Ein wichtiger Umweltfaktor, der Auswirkungen auf das Methylierungsmuster hat, ist, wie bereits erwähnt, die Ernährung. Wie beschrieben ist die Reaktion der DNMT u. a. abhängig von der SAM-Konzentration. Für den Kreislauf zur Bildung von SAM werden unter anderem Folsäure, Methionin und Vitamin B12 benötigt [79], [65]. Ein Mangel an diesen Faktoren, besonders in Kombination, kann zur Demethylierung führen, ebenso wie eine erhöhte Konzentration an Homocystein im Blut [78], [36].

Die Diversität an Geweben und Zellen im menschlichen Körper, die alle die gleiche genetische Information tragen, ist zurückzuführen auf das epigenetische Phänomen [67]. Für T-Lymphozyten ist diese Form der Modifizierung von großer Bedeutung. Ihre Differenzierung in verschiedene Zelllinien bedarf einer ständigen Expressionsregulierung von wechselnden Transkriptionsfaktoren durch aberrante Methylierung [82]. *In vitro* konnte eine Überexpression von CD40L in CD4⁺-T-Zellen durch Hemmung von DNMT1 und zusätzlich durch spezielle Diäten in Mausmodellen nachgewiesen werden [40]. Die Hypomethylierung konnte autoreaktive CD4⁺-Zellen hervorrufen, die über CD40L-Überexpression und Zytokinproduktion B-Zellen zur Autoantikörpersezerneierung anregen [55], [83]. Mononukleäre Zellen des Blutes und auch spezifisch T-Zellen von Lupus-Erkrankten zeigten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine allgemeine Reduktion von Methylierungsmustern [37]. Dies kann Auswirkungen auf verschiedene Signaltransduktionswege haben [83], [33], [84], [12]. Die allgemeine Annahme, dass Methylierungen im Promotor-Bereich zum Stilllegen eines Gens (sog. *Gene silencing*) beitragen kann, ist anerkannt. Es wird jedoch auch immer deutlicher, dass eine spezifische

Lokalisation dieser Methylierung an bestimmten CpG-Positionen ausschlaggebend ist für diese Funktion [85]. Viele dieser Erkenntnisse kommen aus der Krebsforschung. Über solche spezifischen Regionen im *CD40L*-Gen bei Autoimmunerkrankungen wie SLE weiß man aktuell noch wenig. Es gibt verschiedene Gene, die durch Hypomethylierung in CD4⁺-T-Zellen zur Autoreaktivität und somit zur Pathogenese des Lupus beizutragen scheinen [86]: CD11a [87], CD70 [88] und Perforin [89] sind Beispiele hierfür.

1.3.2 Einfluss auf Methylierung

Ein bedeutender Zusammenhang zwischen Genetik und Umweltfaktor zeigt sich in epigenetischen Modifikationen. Bei der Entstehung von Methylierungen kommt dem Enzym DNMT1 eine zentrale Rolle zuteil. Es stellt die zentrale Schnittstelle für das Hinzufügen oder das Fernbleiben der Methylierungen dar. Die Beeinflussung dieses Mechanismus gerade in CD4⁺-T-Zellen im Zusammenhang mit der Entstehung von SLE und der Entstehung von Schüben im Rahmen der Erkrankung ist ein aktives Forschungsfeld. Auch hier sind eine Vielzahl an Einflussfaktoren bekannt. Dieser Abschnitt soll die bereits genannten umweltassoziierten Einflussfaktoren des SLE und ihre spezifische Auswirkung auf Methylierungen beschreiben.

Hydralazin und Procainamid lösen durch Verminderung der DNA Methylierung in CD4⁺-T-Zellen einen arzneimittelinduzierten Lupus aus [90]. Für experimentelle Studien wird in der Regel 5-Azacytidin verwendet, um einen demethylierenden Effekt bei Mäusen zu erzielen. Da viele vergleichbare Ergebnisse auch für Procainamid nachgewiesen wurden, nimmt man ähnliche Mechanismen an, die für die Auslösung von arzneimittelinduziertem Lupus verantwortlich sind. Procainamid ist ein bekannter kompetitiver Inhibitor der DNMT1 [91]. Hydralazin inhibiert die Signaltransduktion durch Störung des ERK-Signalwegs [74]. Schon früh verhalfen diese Chemikalien zu einem Verständnis von Epigenetik und Lupus. Die in assoziierten Studien gewonnenen Erkenntnisse setzen eine Grundlage für alle Studien zu epigenetischen Modifikationen.

In Mausmodellen konnte nachgewiesen werden, dass oxidativer Stress durch Sauerstoffradikale eine erhöhte Expression von CD40L in CD4⁺-T-Zellen verursachen kann und somit die B-Zell-Stimulation verstärkt vermittelt wird [90]. Die Sauerstoffradikale bewirken hier die Nitrierung von Proteinen, wie PKC- δ , die dann zu einer verminderten Expression von DNMT1 führen. Die Methylierungen, die während der

Zellteilung gemäß der Vorlage übertragen werden, erfolgen dann nicht mehr [76]. *In vitro* Versuche zeigten auch, dass die Auswirkungen von Demethylierung in CD4⁺-T-Zellen zu Autoreaktivität führt und die Apoptose in Makrophagen induziert. Hierdurch kommt es zu einer vermehrten Präsentation von nukleären Strukturen. In Zusammenhang mit der Aktivierung von B-Zellen durch co-stimulierende Signale der T-Zellen (wie z. B. CD40L) werden dann vermehrt Anti-dsDNA-Ak produziert [82].

1.4 Methoden zur Analyse von DNA-Methylierungen

Parallel zur wachsenden Kenntnis über epigenetische Mechanismen und ihren Einfluss auf Entwicklung und Pathogenese vieler Erkrankungen, etablierten sich auch laborchemische Methoden zum Nachweis der DNA-Methylierungen. Besonders für den Bereich der Forschung wurden zahlreiche Methoden für die unterschiedlichsten Fragestellungen entwickelt. So muss man unterscheiden, ob es sich um eine globale Analyse von einem Gesamtanteil an Methylierungen handelt, einem durchschnittlichen Methylierungslevel bestimmter Bereiche, einem Methylierungsprofil verschiedener CpGs oder einem Methylierungsmuster einzelner cis-ständiger CpG-Dinukleotide. Jede Methode zeigt Stärken und Schwächen [92]. Auch kann die Wahl der Methode abhängig sein von dem Material, das man untersuchen möchte [92]. Für einen Überblick zum genomweiten Methylierungsstatus lohnt sich z. B. die Anwendung von Sequenziermethoden [93]. Um den Methylierungsstatus bestimmter CpGs in spezifischen Genen inklusive eines einzelnen Locus (*single-locus*) nachzuweisen, können eher quantitative PCR-Methoden zur Anwendung kommen [94]. Die Forschung nutzt verschiedene Methoden, deren Ergebnisse nicht immer miteinander vergleichbar sind. Dies erschwert die Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Stand der Wissenschaft. So ist es möglich, dass aufgrund von verschiedenen Untersuchungstechniken diskordante Ergebnisse entstehen [95]. Zur Validierung neuer Methoden benötigte man eine etablierte Methode, die sich unter anderem sensitiv, schnell und kosteneffektiv zeigt [93]. Diese Verfahren sind zum großen Teil PCR-basiert [96]. Insgesamt kann man sagen, dass Methylierungsanalysen eine gewisse Erfahrung voraussetzen, um Ergebnisse entsprechend beurteilen sowie Fehler erkennen und beheben zu können [67].

Ein umfassender *Review* zu allen Methoden im Bereich der Methylierungsanalysen wurde 2012 von Olkhov-Mitsel und Bapat verfasst [96].

Eine grobe Sortierung der Methoden erlaubt die Aufteilung in vier Kategorien:

1. Enzymatische Methoden durch Restriktionsverdau mittels Endonukleasen wie z. B. *Methyl-Seq*, *Methylated CpG island amplification (MCA)*, *comprehensive high-throughput arrays for relative methylation (CHARM)*
2. Antikörper und proteinbasierte Anreicherungen mittels Immunpräzipitation oder Array-Methoden wie z. B. *Methylated DNA Immunoprecipitation (MeDIP)*, und *MeDIP PCR*, *Methyl binding domain proteins MBD column Chromatographie*
3. Chemische oder enzymatische Konversion durch Bisulfit-Modifikation wie z. B. Bisulfit-Sequenzierung, Pyrosequenzierung, Methylierungssensitive(MS)-HRM, MS-PCR, EpiTYPER
4. Direkte Bestimmung mittels Sequenzierung wie z. B. *Nanopore-* oder *Zeptowell-* Sequenzierung

Da die Information über Methylierungen durch die meisten molekularbiologischen Methoden verloren geht, benötigt eine Mehrheit der Anwendungen eine Vorbehandlung der DNA, um diese Informationen zu konservieren. Die Einführung der Natriumbisulfitbehandlung durch Frommer *et al.* [97] revolutionierte die Analyse der DNA-Methylierungen [98]. Bei dieser Methode werden Cytosinbasen zu Uracil deaminiert. Die Methylierung an einem Cytosin schützt vor dieser Konversion. In einer anschließenden Amplifizierung zeigen sich entsprechende Sequenzunterschiede. Techniken, die die Konversion mittels Bisulfit nutzen, gehören zu den am meisten akzeptierten und genutzten Methoden im Bereich der Methylierungsanalysen [96]. Eine genauere Beschreibung dieser Methode findet sich im 2. Kapitel *Material und Methoden* dieser Arbeit.

Im Folgenden eine kurze Zusammenfassung gängiger Methoden für Analysen genspezifischer Methylierung aus der Gruppe der chemischen Konversion mittels Bisulfit:

1.4.1 Bisulfit-Sequenzierung

Bisulfit-Sequenzierung gilt als der Goldstandard der Methylierungsstudien [65], [99]. Als genomweite Analysemethode mit der Fähigkeit einzelne CpG-Loci darzustellen, liefert die Methode die umfangreichsten Ergebnisse [100]. Jedoch ist die Sequenzierung des ganzen menschlichen Genoms zeitintensiv und sehr kostspielig [96], [77].

1.4.2 Pyrosequenzierung

Pyrosequenzierung ist eine Methode, die es erlaubt, schnell und akkurat quantitative Ergebnisse zu einzelnen CpG-Methylierungen zu erhalten [96]. Einfach in der Anwendung, benötigt sie jedoch spezielle Ausrüstungen, die nicht in jedem Routinelabor vorhanden sind [99], [101]. Zusammen mit der Methode der massiv-parallelen Sequenzierung ist es möglich Pyrosequenzierung auch für genomweite Analysen zu verwenden.

1.4.3 Methylierungssensitive *High-Resolution-Melting*-Analyse

Die *High-Resolution-Melting*(HRM)-Analyse beruht auf der Methode einer Polymerasekettenreaktion (PCR). Man macht sich zunutze, dass Unterschiede in der DNA-Sequenz durch verschiedene Schmelzeigenschaften detektiert werden können. So hat jedes DNA-Molekül eine charakteristische Schmelztemperatur, bei der sich der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge trennt. Längere DNA-Moleküle zeigen charakteristische Schmelz-Profile. Anhand von Standardreihen lässt sich das Schmelzprofil für die untersuchte Region semi-quantitativ beurteilen. Die Methode ist in ihrer Anwendung sehr sensitiv, schnell und kostengünstig [94], [102] [101]. Sie bietet die Möglichkeit, Reaktionsprodukte im Anschluss durch weitere Methoden zu analysieren, was einen Vorteil für Forschung und Diagnostik bedeutet [103]. Die meisten PCR-Geräte bieten auch die Möglichkeit zur Schmelzkurvenanalyse. In der Routine wurde die HRM-Analyse unter anderem als Nachweismethode von Imprinting-Erkrankungen etabliert [103].

1.4.4 MassARRAY-EpiTYPER-Technik

Als MassARRAY ist die Verbindung von Bisulfit-modifizierter DNA-Amplifizierung mittels spezieller PCR, anschließender basenspezifischer Spaltung und Massenspektrometrie bekannt [104]. *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF-Massenspektrometrie) analysiert quantitativ Unterschiede vieler einzelner CpG-Dinukleotide mit einer großen Kapazität für eine große Anzahl an Proben [105]. Die Analysen gelten als schnell, akkurat und reproduzierbar. Eine kurze Beschreibung der Methode findet sich im Methodenteil dieser Arbeit. Die Methode wird im Folgenden als EpiTYPER abgekürzt.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, mittels validierter *High-Resolution-Melting*-Analyse die Methylierung des CD40L-Promotors bei Erkrankten mit systemischem Lupus zu erfassen und somit eine kostengünstige, schnelle und anwenderfreundliche Methode zu entwickeln, die aufgrund ihrer technischen Voraussetzung in Routinelaboratorien zum Einsatz kommen kann. Dabei gilt es, die bereits entwickelte Methode der Schmelzkurvenanalyse zu adaptieren und für den Nachweis eines Methylierungsstatus im CD40L-Promotor bei Erkrankten mit systemischen Lupus erythematodes zu ermöglichen. Die erhobenen Ergebnisse sollen helfen, Zusammenhänge zur Krankheitsaktivität aufzuzeigen. Hierzu wurden vorab folgende Hypothesen aufgestellt:

1. Die HRM-Analyse eignet sich zur semiquantitativen Messung der Methylierung des CD40L-Promotors in aufgereinigter Test-DNA und im Blut von Erkrankten mit SLE.
2. Das Ausmaß der Methylierung des CD40L-Promotors korreliert invers zur Krankheitsaktivität gemessen am *Systemic Lupus Disease Activity Index* (SLEDAI).
3. Das Ausmaß der Methylierung des CD40L-Promotors korreliert invers zum kumulativen Schaden durch den SLE, gemessen am *Systemic Lupus Collaborating Clinics* (SLICC).

2 Material und Methoden

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine experimentelle Studie unter Verwendung humaner Lymphozyten. Die in der Arbeit verwendeten Daten stammen aus der Studie „Wechselseitige Einflüsse der Erbsubstanz, Ernährung und Krankheitsfaktoren“. Die Daten wurden im Zeitraum von September 2016 bis November 2017 in der rheumatologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Düsseldorf erhoben. Die gesammelten Daten wurden gemeinsam mit dem Hiller Forschungszentrum verarbeitet und ausgewertet. Darüber hinaus wurden Proben zur Bestimmung des Methylierungsstatus der CD40L-Promotor- und -Enhancer-Region an die Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Rehli der Inneren Medizin III des Universitätsklinikums Regensburg versandt.

Da im Rahmen dieser Studie Blut und Daten von Patientinnen und Patienten verwendet wurden, erfolgte eine Prüfung durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Das Ethikvotum läuft unter der Studiennummer 5211 vom 07.09.2015. Eine Erlaubnis zur Modifikation der Patienten- und Einwilligungserklärung sowie eine zusätzliche Isolation von B-Lymphozyten wurde am 27.07.2016 erteilt. Ein zweites Votum mit dem Titel „Prospektive epidemiologische Studie zur Fatigue bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes“ wurde unter der internen Studiennummer 5466R am 20.04.2016 genehmigt.

2.1 Untersuchungsmaterial

Untersucht wurde Blut von 68 Patientinnen und Patienten der rheumatologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Düsseldorf. Einschlusskriterien für die Studie waren ein gesicherter systemischer Lupus erythematodes (ICD10: M32) und Volljährigkeit. Im Rahmen ihres Ambulanzbesuchs wurden die Patientinnen und Patienten über Ablauf und Zielsetzung der Studie informiert. Nach erfolgter Aufklärung über pseudonyme Verwendung von Daten und Material sowie geleisteter Zustimmung zur Studienteilnahme, erfolgte die Probenentnahme.

Aus dem gesammelten Probenmaterial (EDTA-Blut, Serum, Lithium-Heparin-Plasma und Urin) hat das Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf zusätzlich definierte laborchemische und hämatologische Werte bestimmt. Hierzu zählen unter anderem Anti-dsDNA-Ak, C3, C4, CRP, Homocystein, Vitamin B6, Cholesterol und Vitamin D.

Neben den Laborparametern wurden weitere Daten im Rahmen des Ambulanzbesuches für die Studie erhoben:

- Alter
- Geschlecht
- *Body-Mass-Index* (BMI)
- SLEDAI
- Aktuelle Medikation

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die gesamte Kohorte, bestehend aus 68 Patientinnen und Patienten inklusive der Angaben zur Medikamenteneinnahme.

Tabelle 2: Überblick zur gesamten Kohorte inklusive aktueller Medikamenteneinnahme

| Parameter | n | MW | SD |
|--------------------------|------------------|-------------|-----------|
| Weiblich | 60 | - | - |
| Männlich | 8 | - | - |
| Alter (Jahre) | 68 | 45,6 | 12,5 |
| BMI (kg/m ²) | 68 | 25,2 | 4,5 |
| SLEDAI | 68 | 2,49 | 4,64 |
| C3 (mg/dl) | 62 | 90,9 | 16,5 |
| C4 (mg/dl) | 62 | 16,3 | 8,3 |
| Anti-dsDNA-Ak (U/l) | 66 | 201,8 | 333,6 |
| CRP (mg/dl) | 68 | 0,35 | 0,66 |
| Medikament | Anzahl ja | % ja | |
| Antimalariamittel | 46 | 67,6 % | - |
| Glukokortikoide | 44 | 64,7 % | - |
| Azathioprin | 10 | 14,7 % | - |
| Mycophenolat | 6 | 8,8 % | - |
| Rituximab | 6 | 8,8 % | - |
| Belimumab | 4 | 5,9 % | - |
| Methotrexat | 2 | 2,9 % | - |
| Ciclosporin | 1 | 1,5 % | - |

n = Anzahl, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, BMI = *Body-Mass-Index*, kg = Kilogramm, m = Meter, SLEDAI = *Systemic Lupus Erythematoses Disease Activity Index*, C3 = Komplementfaktor 3, C4 = Komplementfaktor 4, mg = Milligramm, dl = Deziliter, Anti-dsDNA-Ak = Anti-Doppelstrang-DNA-Antikörper, CRP = C-reaktives Protein, U/l=Units/Liter

Von den ersten Proben (n = 25) wurde eine HRM-Analyse durchgeführt. Sie galt der Validierung der Technik. Aufgrund der fehlenden Übereinstimmung der Daten mit den Ergebnissen des EpiTYPERs wurde diese Methode nicht weiter angewandt.

2.2 Material für die Laborarbeit

2.2.1 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte für die Laborarbeit

| Produktname | Hersteller/Bezugsquelle |
|--------------------------|---|
| Eppendorf Reference® | Eppendorf AG, Hamburg |
| Vortexer VF2 | IKA® Werke GmbH & Co KG., Staufen |
| PocketBlock Thermomixer | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf |
| Centrifuge 5415C | Eppendorf AG, Hamburg |
| Centrifuge 5417R | Eppendorf AG, Hamburg |
| Megafuge 1.0R | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| StepOne Plus™ | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| PEQStar 96X Thermocycler | VWR International GmbH, Erlangen |
| Wasserbad 1092 | GFL GmbH, Burgwedel |
| MS1 Minishaker | IKA® Werke GmbH & Co KG., Staufen |
| MagCore® HF16 | RBCBioscience Corp., New Taipei City, Taiwan |
| Nanophotometer P300 | Implen GmbH, München |
| Eisbad 1-6031 | neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg |
| MACSQuant® Analyzer | Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach |
| OctoMACS® | Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach |
| Pipetus | Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt |
| PEQStar 96X Thermocycler | VWR International GmbH, Erlangen |

2.2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 4: Verwendetes Verbrauchsmaterial für die Laborarbeit

| Produktname | Hersteller/Bezugsquelle |
|----------------------------------|--|
| Safe Seal-Tips professional | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf |
| Tip One® | STARLAB GmbH, Hamburg |
| PCR Soft Tubes, 0,2ml | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf |
| Safe Lock Tubes, 0,5ml | Eppendorf AG, Hamburg |
| Safe Lock Tubes, 1,5ml | Eppendorf AG, Hamburg |
| Safe Lock Tubes, 2,0ml | Eppendorf AG, Hamburg |
| MicroAmp™ Reaction Plate | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| MicroAmp™ Optical Adhesive Films | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Costar® Stripette | Corning, Corning USA |
| Pipettes | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Vacutainer® | Becton Dickinson GmbH, |
| MACS® Tubes | Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach |

2.2.3 Reagenzien

Tabelle 5: Verwendete Reagenzien für die Laborarbeit

| Produktname | Hersteller/Bezugsquelle |
|---|--|
| Methylated and unmethylated gDNA Controls | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Master Mix Melt Doctor™ | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| RNase-freies Wasser | Qiagen GmbH, Hilden |
| Nuclease-freies Wasser | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Primer-Paare | TIB Molbiol, Berlin |
| Leucosep® | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |

2.2.4 Kits

Tabelle 6: Verwendete Kits für die Laborarbeit

| Produktname | Hersteller/Bezugsquelle |
|---|--|
| innuCONVERT Bisulfite Basic Kit | Analytik Jena AG, Jena |
| Cell to CpG™ Bisulfite Conversion Kit | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Bisulfite Conversion and Quantification Control Kit | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |

| Produktname | Hersteller/Bezugsquelle |
|---|--|
| MagCore® Genomic DNA Whole Blood Kit 102 | RADIM Deutschland GmbH, Freiburg |
| MACS® Kit CD4 MicroBeads, human | Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach |
| MACS® Kit Whole Blood CD4 T Cell Isolation Kit, human | Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach |
| MACS® Kit CD4+T Cell Isolation Kit, human | Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach |

2.2.5 Primer für die HRM-Analyse

Tabelle 7: Verwendete Primer, die für HRM-Analysen getestet wurden

| Name | Sequenz 5'- 3' | Hersteller |
|-----------------|---------------------------|---------------------|
| CD40L_M_V1_fw | AACGTTTTTGTGGGAGAGAAGAT | TIB Molbiol, Berlin |
| CD40L_M_V1_rv | CTATCAAATAACCACCTTACTCAA | |
| CD40L_methyl_fw | TGCTGGGAGAGAAGACTACG | TIB Molbiol, Berlin |
| CD40L_methyl_rv | TCGGGGGAGAAGTTTGGTTGT | |
| CD40Lb_fw | AGTTTGGAAAGTGAATGATATGGGT | TIB Molbiol, Berlin |
| CD40Lb_rv | ACTATCAAATAACCACCTTACTCA | |
| CD40Lc_fw | ATTTTTTAGGAAGTGTGGGTTGTAA | TIB Molbiol, Berlin |
| CD40Lc_rv | TCATACTAATAACAATCCAATAACC | |

fw = forward Primer, rv = reverse Primer

2.2.6 Primer für den MassARRAY

Die *Primer* für den MassARRAY können dem Anhang (Tabelle 30, Seite 72) entnommen werden.

2.2.7 Software und Datenbanken

Tabelle 8: Software und Datenbanken

| Software (Version) | Hersteller/Bezugsquelle |
|---|---|
| High Resolution Melt (HRM) Software (3.0.1) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| StepOnePlus™ (2.0) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| R-Software (3.5.2.) | R Development Core Team |
| Affinity Photo | Serif Europe Ltd., 2021 |
| Primer3 (4.1.0) | www.primer3.ut.ee |
| MACSQuantify™ Software (2.1) | Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach |
| PubMed | https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov |

2.2.8 Kontrollen

Für PCR-Reaktionen diente Nuklease-freies Wasser als Kontaminationskontrolle in jedem Lauf. Das verwendete Kontroll-Kit der Bisulfit-Konversion *Cells-to-CpG Bisulfite Conversion and Quantitation Control Kit* beinhaltet weitere Kontrollproben zur Überprüfung der Konversion und der HRM-Ergebnisse. Hier liefen jeweils drei weitere Kontrollen in jedem Lauf: *Control sample 1 (unconverted human male gDNA)*, *Control Sample 2 (converted human male gDNA)* und eigens konvertierte *Control sample 1*.

2.3 Methoden zur Erhebung der klinischen Daten

Daten von Patientinnen und Patienten wurden bei der Aufnahme in der rheumatologischen Ambulanz erfasst. Vor Untersuchungen und Blutentnahme erfolgte eine umfassende Aufklärung durch einen Doktoranden, eine Doktorandin und behandelnde Ärztinnen und Ärzte. Die Unterschrift zum Einverständnis erfolgte dreimal (eine Version für den Patienten oder die Patientin, eine Version für die Akte und eine Version für die Studienzentrale). Im weiteren Verlauf der Datenverarbeitung erhielten Proben und Fragebögen eine Pseudonymisierungsnummer. Die Zuordnung zu einer Identität war nur möglich durch einen biowissenschaftlichen Dokumentar der rheumatologischen Ambulanz. Laborparameter, klinische Angaben und die durch das ärztliche Personal ermittelten Scores zur Krankheitsaktivität wurden als einheitlicher pseudonymisierter Datensatz exportiert und bewertet.

2.3.1 Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index - SLEDAI

Die Bestimmung des SLEDAI-Scores gilt in der Klinik als etabliertes Maß zur Erfassung der aktuellen Krankheitsaktivität. 1985 erstmals vorgestellt, wurden seitdem verschiedene Modifizierungen des Originals entwickelt [106]. Die originale Version des SLEDAI wurde verwandt.

2.3.2 Systemic Lupus International Collaborating Clinics - SLICC

Der *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ American College of Rheumatology Damage Index* (SLICC/ACR DI) ist ein weiteres Maß zur Erfassung von Krankheitsschäden und Schäden durch deren medikamentöse Langzeitbehandlung.

Zusätzlich dient der Index auch zur Abschätzung einer Prognose [107]. Die Erfassung erfolgte durch den behandelnden Arzt oder die behandelnde Ärztin.

2.3.3 Blutentnahme

Den Teilnehmenden der Studie wurde jeweils acht Milliliter (ml) peripher venöses Blut in einem mit EDTA beschichteten Vacutainer[®] entnommen. Das gewonnene Blut wurde kurzzeitig bei Raumtemperatur gelagert und nach Transport ins Labor direkt weiterverarbeitet. Für die weiteren laborchemischen Parameter wurden weitere Proben gewonnen und durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf bestimmt.

Das Material für diese Arbeit wurde im Labor des Hiller-Forschungszentrums weiterverarbeitet. Alle Schritte folgten der Gebrauchsanweisungen der Hersteller. In der Regel wurde nicht unter einem Abzug gearbeitet. Zur Verwendung kamen sterile Verbrauchsmaterialien.

2.4 Labormethoden

2.4.1 Isolierung der CD4⁺-T-Lymphozyten

Zur Isolierung von Lymphozyten und mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurde mit raumtemperierten Reagenzien gearbeitet. Ebenso wurde die Zentrifuge bei Raumtemperatur belassen.

Mittels Dichtegradientenzentrifugation konnte eine PBMC-reiche Interphase gewonnen werden. Hierfür wurde Lymphoprep-Lösung vorsichtig vor Gebrauch geschwenkt, 15 ml wurden mit einer Glaspipette in ein Leucosep-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Röhrchen bei 1000-facher Erdbeschleunigung ($x g$) für ca. 30 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das EDTA-Blut wurde im Verhältnis 1:2 mit MACS[®]-Puffer verdünnt und auf den Filter des Leucosep-Röhrchens gegeben. Zur optimalen Separation wurde im Anschluss 15 Minuten mit 1.000 $x g$ ohne zugeschaltete Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Plasmafraktion wurde bis kurz über der Interphase abgenommen und verworfen. Die angereicherte Zellfraktion wurde nun in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt und mit 10 ml MACS[®]-Puffer angereichert. Als Reinigungsschritt wurde erneut 10 Minuten bei 300 $x g$ und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand mit der Pipette abgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen gefüllt.

Das Zellpellet wurde in 10 ml MACS[®]-Puffer resuspendiert und zusammen mit dem gewonnenen Überstand für 10 Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Zum Schluss wurde der Überstand abgesaugt und die Zellpellets wurden in 4 ml MACS[®]-Puffer in einem 5 ml-Röhrchen zusammengeführt. Die Zellzählung erfolgte mittels Durchflusszytometrie am MACSQuant[®].

2.4.2 Zellzählung am Durchflusszytometer

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen anhand von Größe, Struktur und Oberflächenbeschaffenheiten charakterisiert werden. Die Zählung der isolierten Lymphozyten geschah im Zuge der Charakterisierung der Zellen anhand von Größe und Kernstruktur über die Erfassung eines Lasersignals. Die ermittelte Zellzahl diente der Berechnung von Mengenangaben für die folgende Zellseparation.

2.4.3 Manuelle magnetische Zellseparation von CD4⁺-Zellen

Magnetic cell separation (MACS) ist eine Methode, die von Milteny Biotec Mitte der 1990er Jahre entwickelt wurde. Beim Prinzip der magnetischen Zellseparation werden Antikörper mit magnetischen Partikeln gekoppelt. Diese Antikörper können an passende Oberflächenproteine der Zelle binden. Beim Durchwandern einer Säule in einem magnetischen Feld werden die Komplexe zurückgehalten und somit von nicht markierten Zellen getrennt werden.

Die Isolierung von CD4⁺-Zellen erfolgt mit auf Eis gekühlten Reagenzien. Die Zentrifuge wurde auf zwei bis acht Grad Celsius (°C) temperiert. Die 4 ml Zellsuspension wurde bei 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und verworfen. Das Zellpellet wurde in 80 Mikroliter (µl) / 10⁷ Zellen MACS[®]-Puffer resuspendiert und die entsprechenden Zellen mit 20 µl / 10⁷ Zellen CD4⁺ *MicroBeads* markiert. Nach dem Vortexen erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 4 °C. Anschließend wurden 2 ml MACS[®]-Puffer zugegeben und bei 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde abpipettiert und das Zellpallet in 500 µl/10⁸ Zellen MACS[®]-Puffer resuspendiert. Für den Schritt der Separation wurden die MS-Säulen in den entsprechenden Adapter des Octo-MACS[®] eingesetzt und mit *Pre-Separation*-Filtern ergänzt. Säule und Filter wurden mit 500 µl MACS[®]-Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde auf die Säule aufgetragen. Im Anschluss wurde dreimal in Folge mit 500 µl MACS[®]-Puffer gespült, um alle nicht markierten Zellen zu entfernen. Schließlich wurde die Säule aus dem Adapter

entfernt und auf ein 5 ml-Röhrchen gesetzt. Mit 1 ml MACS[®]-Puffer und dazugehörigem Stempel wurden die CD4⁺-markierten Zellen aus der Säule eluiert. Als letzten Schritt wurde die Zellzahl am Durchflusszytometer bestimmt. *CD4 MicroBeads human Kit* wurde für die direkte Markierung der Zellen genutzt. *CD4+T Cell Isolation Kit human* wurde verwendet, um indirekt CD4⁺-T-Zellen zu gewinnen, indem alle anderen Zellen markiert und aussortiert wurden und nur die gewünschten Zellen ohne Markierung zurückblieben. Nach der Auftrennung wurden die gewonnenen Zellen am MACSQuant[®] mittels CD3-Markierung auf Reinheit überprüft. Die Datenanalyse erfolgte über die MACSQuantify[®] Software. Besonders wichtig war hierbei zu überprüfen, ob direkte oder indirekte Zellmarkierung zu einer höheren Ausbeute führen würde, und ob es im Anschluss zu einer Interaktion mit der maschinellen magnetischen DNA-Extraktion kommen könnte.

2.4.4 DNA-Isolierung am MagCore[®] HF16

Das Prinzip des MagCore[®] HF16 beruht auf magnetischen Zellulosepartikeln, die selektiv DNA binden. Durch automatisierte Waschschrte erhält man am Ende die extrahierte, gereinigte DNA. Die Vorbereitung erfolgte gemäß Handbuch und mit den dazugehörigen Kits. Das Gerät wurde entsprechend bestückt und die Funktion überprüft. Lyophilisierte Proteinase K wurde mit 1.100 µl *Proteinkinase K Storage Buffer* angesetzt, jeweils 80 µl wurden in jedes *Sample Tube* vorgelegt. Die isolierten CD4⁺-Zellen wurden bei 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1.200 µl phosphatgepufferter Salzlösung resuspendiert, in das *Sample Tube* überführt und das Programm gestartet. Reinheit und Konzentration wurden am *Nanodrop* Photometer durch Messung der Absorption bei 260 und 280 Nanometer bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.4.5 Bisulfit-Konversion

Unmethylierte Cytosinbasen reagieren durch Behandlung mit Bisulfit zu Uracil. Die Methylierung an einer Cytosinbase schützt vor dieser Reaktion und die Base bleibt bestehen. Somit wird die epigenetische Information in eine Basensequenz übersetzt. Die einzelnen Schritte dieser Reaktion werden in Abb. 2 und Abb. 3 veranschaulicht.

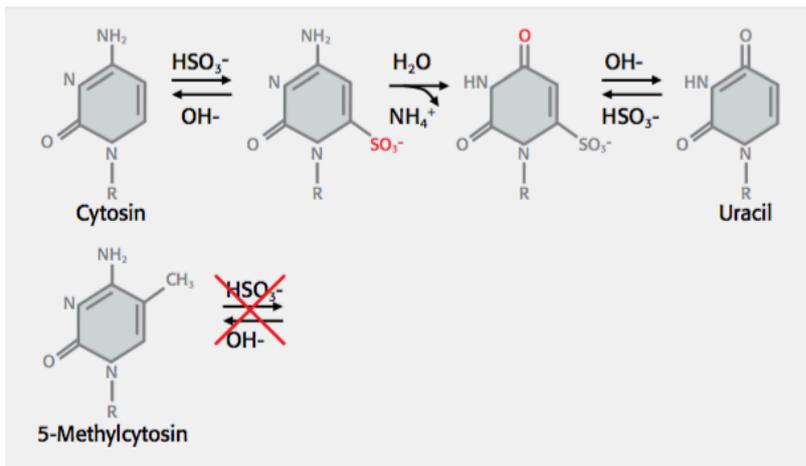


Abb. 2: Schematische Darstellung der Bisulfit-Konversion aus der Anleitung zum All-in-One Konversionskit (Version 6/2016) mit freundlicher Genehmigung von Analytik Jena



Abb. 3: Schematische Darstellung der Konversion aus der Anleitung zum All-in-One Konversionskit (Version 6/2016) mit freundlicher Genehmigung von Analytik Jena

Als Vorbereitung auf die Studie wurden zwei Konversionskits in Handhabung und Effizienz miteinander verglichen. Das *innuConvert Bisulfite Basic Kit* von Analytik Jena schnitt hier gegenüber des *Cells-to-CpG Bisulfite Conversion Kit* von Applied Biosystems besser ab und wurde deshalb für die weiteren Versuche verwendet. Es wurde stets nach offizieller Arbeitsanleitung gearbeitet. *Binding Solution*, *Washing Solution* und *Desulfonation Buffer* wurden mit 99,8 % Ethanol angesetzt. Hierfür wurde unter der Abzugshaube gearbeitet. Alle Reagenzien wurden vor Gebrauch gut durchmischt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und auf dem Vortexrüttler gut durchmischt. Zur semiquantitativen Bestimmung der Methylierungsrate wurde eine Standardreihe aus 100 %- und 0 %-methylierter DNA wie in Tabelle 9 beschrieben, angesetzt. Neben Proben und Standardreihe wurde eine Kontrollprobe (*Control Sample 1*) mitkonvertiert.

Tabelle 9: Ansatzschema für die Standardreihe

| Methylierungsgrad | Ansatz |
|--------------------------|--|
| 100 % meth. DNA | 10 µl 100 % meth. DNA |
| 75 % meth. DNA | 7,5µl 100 % meth. DNA + 2,5 µl 0 % meth. DNA |
| 50 % meth. DNA | 7,5 µl 100 % meth. DNA + 7,5 µl 0 % meth. DNA |
| 25 % meth. DNA | 5 µl 100 % meth. DNA + 5 µl 0 % meth. DNA |
| 10 % meth. DNA | 1,5 µl 100 % meth. DNA + 13,5 µl 0 % meth. DNA |
| 1 % meth. DNA | 1,5 % 10 % meth. DNA + 13,5 µl 0 % meth. DNA |
| 0,1 % meth. DNA | 1 µl 1 % meth. DNA + 9 µl 0 % meth. DNA |
| 0 % meth. DNA | 10 µl 0 % meth. DNA |

µl = Mikroliter, meth. = methyliert

In einem 2,0 ml *Safe-Lock Tube* wurden 1000 ng DNA mit Nuclease-freiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Zum Starten der Konversionsreaktion wurden 70 µl *Conversion Reagent* und 30 µl *Conversion Buffer* hinzu pipettiert. Für 10 Sekunden wurden die Proben auf dem Vortexrüttler durchmischt und kurz anzentrifugiert, um kein Material im Deckel zu belassen. Im Anschluss wurden die Proben im Thermomixer für 45 Minuten bei 85 °C und 800 rpm (*rounds per minute*) im Anschluss inkubiert. Nach Zugabe von 700 µl *Binding Solution* wurde am Vortexrüttler gemischt und kurz zentrifugiert. Ein *Spin Filter* wurde auf ein *Receiver Tube* gestellt und die Probe auf den Filter pipettiert. Für drei Minuten wurde bei 14.000 x g zentrifugiert. In diesem Schritt kommt es zur Bindung der DNA an den Filter, sodass das Filtrat verworfen werden konnte. Der Filter wurde auf ein neues *Receiver Tube* übertragen. Als Waschschrift wurde 200 µl *Washing Solution* ergänzt und für eine Minute bei 14.000 x g zentrifugiert. Das Filtrat wurde erneut verworfen und der Filter auf ein neues *Receiver Tube* gestellt. Nach Zugabe des *Desulfonation Buffer* wurde für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend eine Minute bei 14.000 x g zentrifugiert. Das Filtrat wurde erneut verworfen und der Filter auf ein neues *Receiver Tube* gestellt. Der folgende Waschschrift mit 400 µl *Washing Solution*, einer Minute Zentrifugation bei 14.000 x g wurde einmal wiederholt, die Filtrate wurden jeweils verworfen und der Filter auf ein neues *Receiver Tube* gestellt. Um keine *Washing Solution* in den nächsten Schritt zu übertragen, wurde erneut für drei Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert. Bei geöffnetem Deckel wurde der Filter für zehn Minuten bei 60 °C getrocknet. Um die DNA aus dem Filter zu lösen, wurde 50 µl *Elution Buffer* aufgetragen

und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde eine Minute bei 8.000 x g zentrifugiert. Der Filter konnte jetzt entsorgt werden. Die konvertierte DNA befand sich im Filtrat. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Die erfolgte Konversion wurde mittels quantitativer PCR und mithilfe des *Cells-t-CpG Bisulfite Conversion and Quantitation Control Kit* überprüft. Bei dieser Methode wird DNA mithilfe von *Primern* und Polymerase amplifiziert. Lagert sich der Farbstoff SYTO™ 9 in doppelsträngige DNA ein, wird ein Fluoreszenzsignal gesendet. Mit steigender Konzentration nimmt die Signalintensität zu. Über softwareunterstützte Berechnungen lassen sich die Veränderungen vom Grundwert ermitteln. Wird in einem Zyklus ein bestimmter Schwellenwert erreicht, spricht man vom *Cycle Threshold (C_T)*. Anhand einer Schmelzkurve lässt sich auch die Qualität der PCR kontrollieren. So können z. B. *Primer-Dimere* erkannt werden.

Die Ansätze erfolgten in 96-Well-Platten mit *Melt Doctor™ HRM Master Mix* und der im Kit enthaltenen *Primer*. *Primer* und Proben wurden auf Eis aufgetaut, gut gemischt und kurz anzentrifugiert. *Melt Doctor™ HRM Master Mix* wurde lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufgetaut. Als zusätzliche Kontrolle lief die konvertierte *Control Sample 1* mit.

Wie in Tabelle 10 ersichtlich wurde zu 1 µl DNA von Proben bzw. Kontrollen 0,5 µl *Control Primer Mix a* oder *b*, 5 µl *Melt Doctor™ HRM Master Mix* und 3,5 µl Nuklease-freies Wasser pipettiert. In Tabelle 11 ist Temperaturprofil für die Schmelzkurvenanalyse dargestellt. Der Ansatz erfolgte doppelt. Versiegelt wurde mit *Optical Adhesive Film*, zentrifugiert für eine Minute bei 1.000 rpm Raumtemperatur.

Tabelle 10: Reaktionsansatz für PCR

| Komponente | Volumen / Einzelbestimmung |
|--|-----------------------------------|
| Melt Doctor™ HRM Master Mix | 5,0 µl |
| 20x Non-Conversion Control Primer Mix oder 20x Conversion Control Primer Mix | 0,5 µl |
| Nuklease-freies Wasser | 3,5 µl |
| DNA | 1,0 µl |

µl = Mikroliter

Tabelle 11: Temperaturprofil für PCR mit Schmelzkurve

| Schritt | | Temperatur | Zeit |
|------------------|------------------|------------|--------|
| <i> Holding </i> | Enzymaktivierung | 95 °C | 10 min |
| <i> Cycling </i> | Denaturierung | 95 °C | 15 s |
| (45 Zyklen) | Anlagerung | 60 °C | 1 min |
| Schmelzkurve | Denaturierung | 95 °C | 15 s |
| | Anlagerung | 60 °C | 15 s |
| | Schmelzen | 95 °C | 15 s |

min = Minute, s = Sekunde, °C = Grad Celsius

Anhand von zwei Ansätzen mit verschiedenen *Primern* (*Conversion* oder *Non-Conversion Primer*) konnte die Effizienz der Konversion rechnerisch ermittelt werden:

$$Effizienz = \left(\frac{2^{(-\Delta C_T + 1)}}{2^{(-\Delta C_T + 1)} + 1} \right) \times 100$$

$$\Delta C_T = C_T(\text{converted}) - C_T(\text{unconverted})$$

Zusätzlich wurden die Ergebnisse anhand der *Cycle Threshold*(C_T)- und Schmelztemperatur(T_M)-Werte qualitativ überprüft. Niedrigere C_T - und T_M -Werte wurden bei dem Lauf mit *Conversion Control Primer Mix* erwartet, höhere C_T - und T_M -Werte bei der Verwendung von *Non-Conversion Control Primer Mix*.

2.4.6 Primer-Design für die HRM-Analyse

Im Zuge der Arbeit wurden verschiedene *Primer* getestet. Die Promotorsequenz des *CD40L*-Gens wurde anhand der DNA-Sequenzdatenbank des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* ermittelt. Als Programm für das Design wurde *Primer3* verwendet. Da die *Primer* wesentlich zum Gelingen der PCR beitragen, wurden Länge, Genproduktlänge, Basensequenz, *Annealing*-Temperatur und Schmelztemperatur beim Design berücksichtigt.

Die Oligonukleotide wurden durch die Firma *TIB MOLBIOL* synthetisiert, als Lyophilisat geliefert und in 50 µl Nuclease-freiem Wasser gelöst, um eine Konzentration von

100 Mikromolar zu erreichen. Die Lagerung erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. In Tabelle 12 sind die *Primer*-Namen und -Sequenzen zu sehen, die verwendet wurden. Nach Austestungen der unterschiedlichen *Primer* wurde mit dem *Primer*-Paar „CD40Lb“ gearbeitet.

Tabelle 12: Primer-Sequenzen für alle getesteten Primer

| Name | 5'- 3' Basensequenz |
|-----------------|---------------------------|
| CD40L_M_V1_fw | AACGTTTTTGGTGGGAGAGAAGAT |
| CD40L_M_V1_rv | CTATCAAATAACCACCTTACTCAA |
| CD40L_methyl_fw | TGCTGGGAGAGAAGACTACG |
| CD40L_methyl_rv | TCGGGGGAGAAGTTTGGTTGT |
| CD40Lb_fw | AGTTTGGAAGTGAATGATATGGGT |
| CD40Lb_rv | ACTATCAAATAACCACCTTACTCA |
| CD40Lc_fw | ATTTTTTAGGAAGTGTGGGTTGTAA |
| CD40Lc_rv | TCATACTAATAACAATCCAATAACC |

fw = *forward Primer*, rv = *reverse Primer*

2.4.7 Sequenzierung

Um die Spezifität der ausgetesteten *Primer* zu überprüfen, wurden PCR-Produkte durch das Biologisch-medizinische Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf exemplarisch sequenziert. Hierfür wurden Proben mit dem *Rapid PCR Clean Up Set* nach Herstellerangaben aufgereinigt und im Anschluss versandt.

2.4.8 High-Resolution-Melting-Analyse

Die HRM-Analyse macht sich Schmelzeigenschaften der DNA zunutze, um Sequenzunterschiede zu detektieren. Informationen über die Methylierungen einzelner Cytosinbasen können nicht gewonnen werden. Hierzu müssten Sequenzierungen erfolgen. Bei einem Schmelzvorgang werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen aufgespaltet. Die Schmelztemperatur (T_M) ist die Temperatur, bei der 50 Prozent der DNA-Stränge in zwei Einzelstränge gespalten sind. Die benötigte Energie ist abhängig von der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren. Zwischen Adenin und Thymin gibt es zwei Bindungen. Zwischen Cytosin und Guanin binden drei Wasserstoffbrücken. Es wird also mehr Energie (höhere

Temperaturen) benötigt, um diese zu spalten. In einer mit Bisulfit behandelten DNA werden Cytosinbasen zu Uracil konvertiert. Methylierte Cytosinbasen bleiben jedoch unverändert. Die Modifikation führt also zu einer methylierungsabhängigen Basenzusammensetzung. Uracil wird im Verlauf der Amplifikation durch Thymin ersetzt. Während eines Schmelzvorgangs wird die Temperatur kontinuierlich erhöht. Der fluoreszierende Farbstoff ist zu Beginn in der amplifizierten DNA eingelagert und sendet ein Signal. Ab einer spezifischen Temperatur beginnt das Amplikon zu schmelzen. Der Farbstoff löst sich von der DNA und das Signal verändert sich. Aufgrund unterschiedlicher Basenzusammensetzung entstehen unterschiedliche Schmelzprofile. Vor allem die Schmelztemperatur unterscheidet sich hier. Die Ergebnisse der Schmelzprofile lassen sich auf verschiedene Weise darstellen. Anhand der Standardreihe können die Ergebnisse der Proben ausgewertet werden. Hier ergibt es Sinn, die Ergebnisse in Gruppen einzuteilen.

Alle Schritte folgten den Anweisungen des Herstellers. Soweit möglich wurde in den einzelnen Schritten jeweils mit einem Aliquot gearbeitet.

Die Proben und *Primer* wurden auf Eis aufgetaut. Der *Melt Doctor™ Master Mix* wurde lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufgetaut. Der Reaktions-Mix wurde nach Berechnung vor jeder Doppelbestimmung der Standardreihe sowie der Proben angesetzt (siehe Tabelle 13). *Primer* wurden im Verhältnis 1:20 mit Nuklease-freiem Wasser in *PCR Strip Tubes* vorverdünnt.

Tabelle 13: Herstellung des Master Mix für die HRM-Analyse

| Komponente | Volumen / Einzelbestimmung |
|--|-----------------------------------|
| Melt Doctor™ HRM Master Mix | 10 µl |
| Forward Primer (5 µM) 1:20 vorverdünnt | 1,2 µl |
| Reverse Primer (5 µM) 1:20 vorverdünnt | 1,2 µl |
| Nuklease-freies Wasser | 6,6 µl |

µl = Mikroliter, µM = Mikromolar

Jeweils 19 µl Reaktionsmix wurde in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert. 1 µl DNA wurde anschließend hinzu pipettiert.

Die HRM wurde im *Real-Time-PCR*-Gerät *StepOnePlus* durchgeführt. In Tabelle 14 sind die einzelnen Schritte der Analyse beschrieben. In Vorversuchen wurde ein optimales Temperaturprofil von 60 °C für die *Annealing*-Temperatur ermittelt.

Tabelle 14: HRM-Analyse mit einzelnen Schritten

| Schritt | | Temperatur | Zeit |
|------------------|------------------|------------|--------|
| <i> Holding </i> | Enzymaktivierung | 95 °C | 10 min |
| <i> Cycling </i> | Denaturierung | 95 °C | 15 s |
| (40 Zyklen) | Anlagerung | 60 °C | 1 min |
| Schmelzkurve | Denaturierung | 95 °C | 15 s |
| | Anlagerung | 60 °C | 15 s |
| | Schmelzen | 95 °C | 15 s |

min = Minute, sek = Sekunde, °C = Grad Celsius

2.4.9 MassARRAY-EpiTYPER-Technik

Die Verifizierung der HRM-Ergebnisse und die quantitative Bestimmung der CpG-Methylierungen erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Rehli der Inneren Medizin III des Universitätsklinikums Regensburg. Eine detaillierte Beschreibung der Methode findet sich in Ehrich *et al.* (2005) [104]. DNA-Sequenzen wurden mittels *UCSC Genom Browser* (www.genome.ucsc.edu) bestimmt. *Primer*-Design erfolgte mittels *Methprimer* (www.urogene.org/methprimer). Das Prinzip des EpiTYPERs gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Schritt wird Bisulfit-konvertierte DNA (Zymo Research, Orange, USA) amplifiziert und mit einem T7-Promotor verknüpft, der die anschließende Umschreibung in RNA ermöglicht. Hierbei repräsentiert ein Guanin ein methyliertes Cytosin, ein unmethyliertes Cytosin wird durch ein Adenin repräsentiert. Die transkribierte RNA enthält also weiterhin alle Informationen zu den ursprünglichen Methylierungen. Eine Behandlung mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* dephosphoryliert freie Nukleotid-Enden, um ein Selbstligieren oder unerwünschte Reaktionen in weiteren Schritten zu verhindern. Durch Uracil-spezifische Spaltung (*MassCLEAVE™*, Agena, San Diego, USA) wird die RNA in kleine Einheiten geschnitten. Jedes Fragment enthält Information zu einer CpG-Einheit. Im Anschluss werden die Produkte auf Silikon Chips (spectroCHIP, Agena, San Diego, USA) geladen und im MALDI-TOF-Massenspektrometer (MassARRAY Compact MALDI-TOF, Agena,

San Diego, USA) untersucht. Methylierte und unmethylierte CpGs (Guanin und Adenin in der RNA) lassen sich anhand der Massendifferenz von 16 Dalton (Da) zwischen Guanin (methyliertes Cytosin in der DNA) und Adenin (unmethyliertes Cytosin in der DNA) unterscheiden.

Methylierungen der einzelnen CpGs wurden mittels EpiTYPER Analyzer Software v1.0 (Agena, San Diego, USA) ausgewertet. Der Prozentsatz der Methylierung einer CpG-Position wird durch die Ergebnisse des Massenspektrometers berechnet. Die Oberfläche des Peaks, der das methylierte Fragment darstellt, wird durch die Gesamtoberfläche der Peaks sowohl des methylierten als auch des unmethylierten Fragments dividiert.

2.5 Statistische Auswertung

Die Rohdaten wurden in Microsoft Excel 2011 erfasst und vorab ausgewertet. Aufgrund vieler *Missings* wurden die Ergebnisse für CpG20 gelöscht. Ebenso enthielten zwei Patienten sechs fehlende Messwerte, sodass diese von der Auswertung ausgeschlossen wurden. Einzelne fehlenden Messwerte wurden mittels Medians imputiert. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Statistikprogramms R-Software-Version 3.5.2. Die Visualisierung erfolgte mittels Affinity Photo.

Mittels multivariablen linearen Modells wurde die Effektstärke (initial adjustiert für Alter und Geschlecht) berechnet. Als unabhängige Variable wurden die CpG-Methylierungen der einzelnen Loci im Enhancer- und im Promotor-Bereich des *CD40L*-Gens einbezogen. Als abhängige Variable wurden SLEDAI, SLICC, Anti-dsDNA-Ak, C3, C4 und CRP getrennt voneinander untersucht.

Zur Ermittlung von Zusammenhängen mehrerer CpG-Methylierungsstellen wurden Cluster-Analysen mittels *supervised Random Forest* erstellt.

Werte von $p \leq 0,05$ wurden bei allen Untersuchungen als statistisch signifikant betrachtet. Um die Irrtumswahrscheinlichkeit (Alpha-Fehler) bei multiplen Testen zu kontrollieren, wurden p-Werte nach Bonferroni-Holm adjustiert.

Epidemiologische Daten und Daten zur Krankheitsverlauf wurden absolut und in Prozent berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der HRM-Methode

3.1.1 MACS[®]-Isolierungskit und DNA-Isolierung am MagCore[®]

Um möglichst effektiv CD4⁺-T-Zellen aus EDTA-Blut zu isolieren, verglichen wir im Vorfeld verschiedene MACS[®]-Isolierungskits an zehn gesunden Probandinnen und Probanden (fünf männlich, fünf weiblich, 28.5 ± 4.1 Jahre). Die bereits veröffentlichten Ergebnisse [108] zeigten, dass die Proben, die über direkte Zellmarkierung gewonnen wurden, gemessen am A260/A280 Quotienten eine höhere Reinheit hatten, und dass die DNA-Konzentration tendenziell etwas höher war (siehe Tabelle 15). Wir sahen insgesamt keine störenden Einflüsse der Isolierungskits beim Gewinnen der DNA mittels MagCore[®].

Tabelle 15: Quantitativer und qualitativer Vergleich der verwendeten CD4⁺-T-Zell Isolierungskits

| Parameter | CD4 MicroBeads Kit (direkt) | CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit (indirekt) | p | Hedge's g (95% KI) |
|-----------------------------|--------------------------------|---|---------------|-----------------------|
| A260/A280 | 1.82±0.05 | 1.78±0.03 | 0.0488 | 0.88 (-0.03-1.80) |
| c(DNA) [µg/ml] | 59.55±27.42 | 53.00±19.95 | 0.0924 | 0.26 (-0.62-1.14) |
| c(DNA) [ng/(ml x cell)] | 50.97±14.15 | 49.53±13.62 | 0.4922 | 0.10 (-0,78-0,98) |
| Purity CD3 ⁺ [%] | 93.11±1.47 | 94.99±1.54 | 0.1250 | -1.1 (-2,46-0,21) |

p = Irrtumswahrscheinlichkeit, KI = Konfidenzintervall, µg = Mikrogramm, ml = Milliliter,

Die Ergebnisse der Zell- und der DNA-Isolierung für die ersten 25 HRM-Proben sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Ergebnisse der Zell- und DNA-Isolierung

| Probe | PBMC-Zellzahl gesamt | CD4⁺- Zellzahl gesamt | CD4⁺-Zellzahl/ PBMC-Zellzahl | eingesetzte Zellmenge für DNA- Extraktion | DNA- Konzentration (ng/μl) in 60μl | DNA-Menge (ng) in 20μl |
|--------------|---------------------------------|---|--|--|---|-----------------------------------|
| 1 | 1,22E+07 | 1,19E+06 | 9,79% | 1,19E+06 | 51 | 1020 |
| 2 | 2,03E+07 | 2,76E+06 | 13,60% | 1,10E+06 | 315 | 6300 |
| 3 | 3,85E+07 | 3,28E+06 | 8,52% | 1,31E+06 | 448 | 8960 |
| 4 | 1,40E+07 | 3,75E+06 | 26,79% | 1,50E+06 | 390 | 7800 |
| 5 | 6,27E+06 | 1,54E+06 | 24,56% | 1,54E+06 | 425 | 8500 |
| 6 | 9,96E+06 | 2,80E+06 | 28,11% | 1,12E+06 | 272 | 5440 |
| 7 | 9,44E+06 | 1,31E+06 | 13,88% | 1,31E+06 | 323 | 6460 |
| 8 | 1,64E+07 | 4,80E+06 | 29,27% | 2,80E+06 | 605 | 12100 |
| 9 | 6,40E+06 | 5,25E+05 | 8,20% | 5,25E+05 | 140 | 2800 |
| 10 | 3,18E+07 | 9,55E+06 | 30,03% | 7,55E+06 | 1645 | 32900 |
| 11 | 1,76E+07 | 1,54E+06 | 8,75% | 1,54E+06 | 97,5 | 1950 |
| 12 | 1,64E+07 | 3,70E+06 | 22,56% | 1,70E+06 | 98,5 | 1970 |
| 13 | 1,82E+07 | 1,18E+06 | 6,48% | 1,18E+06 | 60,5 | 1210 |
| 14 | 1,63E+07 | 1,39E+06 | 8,53% | 1,39E+06 | 87,5 | 1750 |
| 15 | 1,77E+07 | 4,40E+06 | 24,86% | 2,70E+06 | 194 | 3880 |
| 16 | 3,02E+07 | 7,50E+06 | 24,83% | 5,50E+06 | 338 | 6760 |
| 17 | 1,90E+07 | 1,90E+06 | 10,00% | 1,90E+06 | 138 | 2760 |
| 18 | 2,80E+07 | 5,40E+06 | 19,29% | 3,40E+106 | 189 | 3780 |
| 19 | 3,15E+07 | 8,20E+06 | 26,03% | 6,20E+06 | 383 | 7660 |
| 20 | 1,20E+07 | 5,30E+05 | 4,42% | 5,30E+05 | 21,5 | 430 |
| 21 | 3,12E+07 | 5,80E+06 | 18,59% | 3,80E+06 | 214 | 4280 |
| 22 | 1,55E+07 | 2,30E+06 | 14,84% | 1,30E+06 | 71 | 1420 |
| 23 | 2,08E+07 | 3,76E+06 | 18,08% | 1,70E+06 | 102 | 2040 |
| 24 | 8,60E+07 | 3,04E+06 | 3,53% | 1,04E+06 | 57 | 1140 |
| 25 | 2,81E+07 | 2,64E+06 | 9,40% | 1,64E+06 | 80,5 | 1610 |

μl = Mikroliter, ng = Nanogramm, PBMC = periphere mononukleäre Blutzellen

3.1.2 Bisulfit-Konversionskit

Die Bisulfit-Konversion wurde durch die Austestung von zwei Konversionskits optimiert. Hierbei wurde das Kit von *Applied Biosystems Cells-to-CpG Bisulfite Conversion Kit* mit dem Kit von *Analytik Jena innuCONVERT Bisulfite Basic Kit* verglichen. Anhand einer Konversionseffizienz konnten die Ergebnisse ausgewertet und verglichen werden. Hierbei zeigten sich bessere Ergebnisse für die Konversion mit dem Kit von Analytik Jena. Sowohl im *Amplification Plot* als bei der Effizienz waren jene Probenergebnisse überlegen, die mit Analytik Jena konvertiert wurden. Ein weiteres wichtiges Merkmal war die Handhabung der einzelnen Konversionsschritte im Labor. Hierbei zeigte sich subjektiv eine anwenderfreundlichere Verarbeitung bei Analytik Jena. In Tabelle 17 werden die Ergebnisse der Effizienz der Konversion mit Applied Biosystems aufgeführt, in Tabelle 18 die Effizienz der Ergebnisse der Konversion mit Analytik Jena.

Tabelle 17: Ergebnisse der Bisulfit-Konversion mit Applied Biosystems

| Probe | C _T | C _T | ΔC_T | Effizienz |
|--------------------------------|-----------------------|-------------------|--------------|-----------|
| | <i>Non-Conversion</i> | <i>Conversion</i> | | |
| ABI 0% methyl gDNA | 23,16 | 30,90 | 7,74 | 0,93 |
| ABI 100% methyl gDNA | 40,48 | 32,38 | -8,10 | 99,82 |
| ABI unconverted converted gDNA | 22,13 | 32,99 | 10,85 | 0,11 |
| unconverted gDNA | 25,52 | 37,08 | 11,56 | 0,07 |
| converted gDNA | 36,97 | 29,04 | -7,93 | 99,80 |

C_T= Cycle Threshold, ΔC_T = Differenz der C_T-Werte, ABI = Applied Biosystems

Tabelle 18: Ergebnisse der Bisulfit-Konversion mit Analytik Jena

| Probe | C _T | C _T | ΔC_T | Effizienz |
|-------------------------------|-----------------------|-------------------|--------------|-----------|
| | <i>Non-Conversion</i> | <i>Conversion</i> | | |
| AJ 0% methyl gDNA | 45 | 28,09 | -16,91 | 99,99 |
| AJ 100% methyl gDNA | 36,34 | 32,30 | -4,04 | 97,05 |
| AJ unconverted converted gDNA | 45 | 32,10 | -12,90 | 99,99 |
| unconverted gDNA | 25,52 | 37,08 | 11,56 | 0,07 |
| converted gDNA | 36,97 | 29,04 | -7,93 | 99,80 |

C_T = Cycle Threshold, ΔC_T = Differenz der C_T-Werte, AJ = Analytik Jena

3.1.3 Primer-Testung

Im Voraus wurden verschiedene *Primer* designiert und getestet. Parallel wurden unterschiedliche Amplifikationstemperaturen und DNA-Konzentrationen getestet. Ziel der Untersuchung war es, einen *Primer* zu finden, der es ermöglichte, die Standardreihe bestmöglich aufzulösen. Ergebnisse wurden jeweils mittel Sequenzierung bestätigt. *Primer* CD40L_b konnte die Verdünnungsreihe bis 10 % Methylierung auflösen (bei 60 °C *Annealing*-Temperatur).

In Abb. 4 sieht man die Schmelzkurven der Verdünnungsreihe bis 10 %, auf 100 % normalisiert.

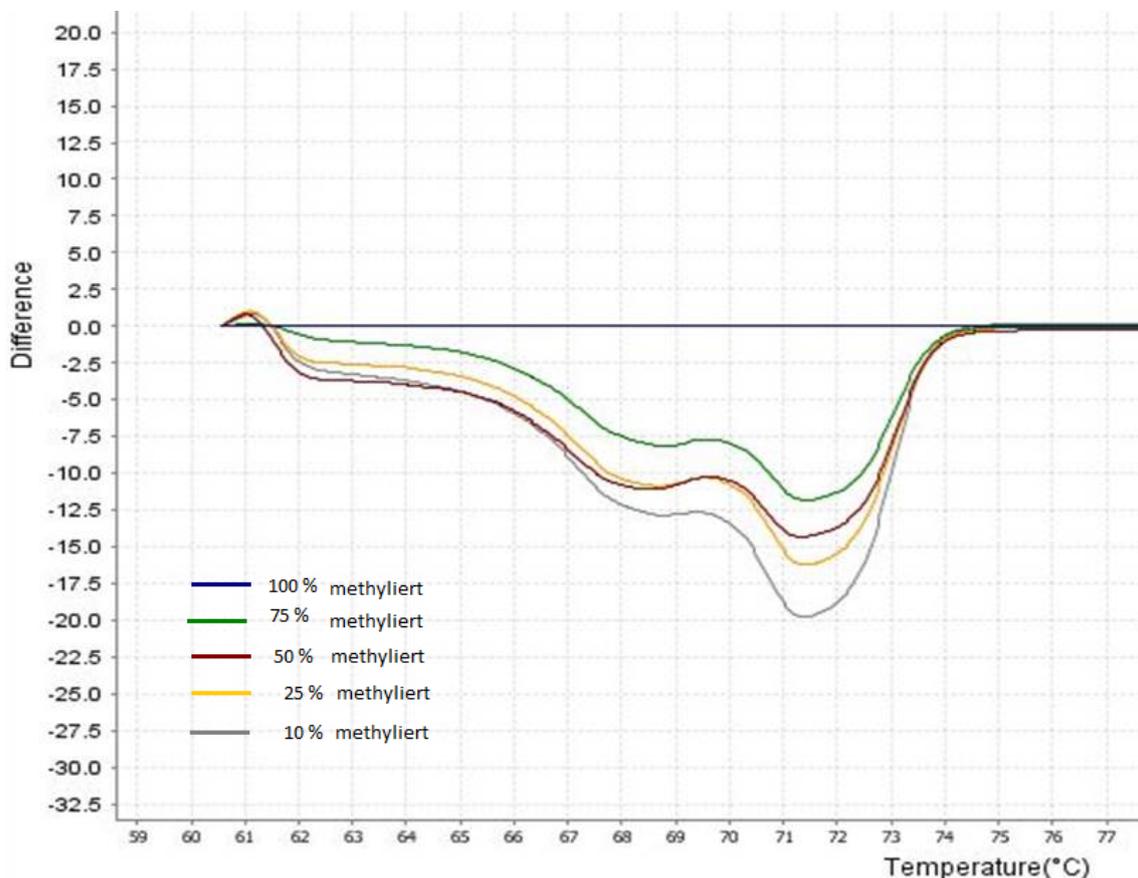


Abb. 4: Schmelzkurven der Verdünnungsreihe mit Auflösung bis 10 %. Es wird die relative Signaldifferenz (Y-Achse) bei kontinuierlichem Temperaturanstieg in °C (X-Achse) aufgezeichnet. Es zeigen sich die fünf Kurven der Standardreihe auf 100 % Methylierung normalisiert.

3.1.4 Messung der Proben mittels HRM-Analyse

Nach Etablierung einer Standardreihe wurden die ersten Proben von Patientinnen und Patienten gemessen. DNA von 24 Proben aus der rheumatologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Düsseldorf wurde mittels der etablierten HRM-Analyse untersucht. Es zeigte sich ein geringer Methylierungsgrad (< 10 %) in 21 Proben. Lediglich eine Probe zeigte Werte in einem Bereich zwischen 10 % und 25 %. Bei zwei Proben gab es Diskrepanzen in der Doppelbestimmung. Abb. 5 zeigt die Schmelzkurven der Standardreihe und drei exemplarischen Proben von Patientinnen und Patienten.

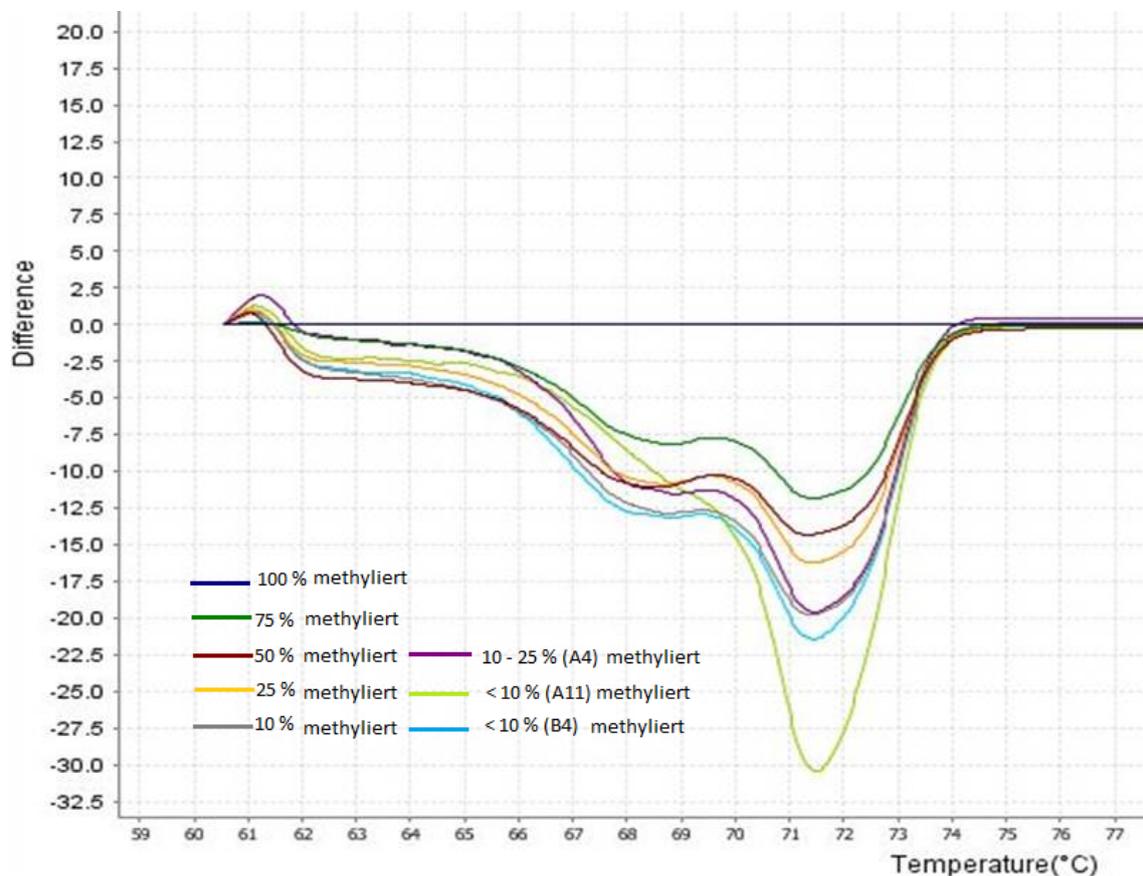


Abb. 5: Schmelzkurven dreier Patientenproben inkl. der Standardreihe. Es wird die relative Signaldifferenz (Y-Achse) bei kontinuierlichem Temperaturanstieg in °C (X-Achse) aufgezeichnet. Es zeigen sich die fünf Kurven der Standardreihe und drei Patientenproben. A4 zeigt einen Methylierungswert zwischen 10 % und 25 % Methylierung. A11 und B4 zeigen Werte < 10 % Methylierung. Alle Kurven sind auf 100 % Methylierung Standardprobe normalisiert.

3.1.5 Messung der Proben mittels EpiTYPER

Im Anschluss wurde die Auswertung der ersten Proben (n = 25) mittels Referenzmethode (EpiTYPER) vergleichend hinzugezogen. Die Bestimmung des Methylierungswertes

(Methylierungsratio) einzelner CpGs in Enhancer 1 und 2 sowie der Promotorregion des *CD40L*-Gens erfolgte durch die Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. M. Rehli des Universitätsklinikums Regensburg. Die Auswertung und Beurteilung der Ergebnisse in Hinblick auf unsere Fragestellungen erfolgten durch unsere Arbeitsgruppe in Düsseldorf. Die Rohdaten enthielten die Methylierungswerte von 22 CpG-Positionen. Die vier CpG-Positionen des Promotor-Bereiches CpG16, CpG17, CpG18 und CpG19 stimmten mit unserem untersuchten Bereich des *CD40L*-Promotors überein. Zwei Erkrankte zeigten einen durchschnittlichen Methylierungswert von $< 0,1$ (MW = 0,41; SD = 0,12). In Tabelle 31 im Anhang sind die Ergebnisse der Methylierungsanalyse des EpiTYPERs dargestellt. Zum Abgleich mit den Ergebnissen der HRM-Analyse wurde der Mittelwert der Methylierungswerte über die entsprechenden CpG-Regionen berechnet.

3.2 Analyse der EpiTYPER-Daten

Zu Beginn der statistischen Auswertung wurden die Daten auf Vollständigkeit überprüft. Aufgrund von fehlenden Messwerten wurden zwei Studienteilnehmende von der Auswertung ausgeschlossen. Einzelne fehlenden Messwerte wurden mittels Medians imputiert.

3.2.1 Beschreibung der untersuchten CpG-Bereiche

Im Rahmen der Auswertung der Proben mittels EpiTYPER wurden insgesamt 22 CpGs im *CD40L*-Gen untersucht. Ein CpG-Bereich (CpG20) konnte bei elf Erkrankten nicht quantifiziert werden und wurde deshalb von der Auswertung ausgeschlossen. Insgesamt 15 CpG-Loci stammten aus den Enhancer-Regionen 1 und 2. Sechs Loci fanden sich im Bereich des *CD40L*-Promotors. Tabelle 19 zeigt die genauen Nukleotid-Positionen der untersuchten CpGs.

Tabelle 19: CpG-Locus im CD40L-Gen

| Locus | Region auf Chromosom X (GrCh37/hg19) | Art |
|-------|--------------------------------------|------------|
| CpG1 | 135726342 - 135726343 | Enhancer 1 |
| CpG2 | 135726386 - 135726387 | Enhancer 1 |
| CpG3 | 135726602 - 135726603 | Enhancer 1 |
| CpG4 | 135726606 - 135726607 | Enhancer 1 |

| Locus | Region auf Chromosom X (GrCh37/hg19) | Art |
|--------------|---|------------|
| CpG5 | 135726646 - 135726647 | Enhancer 1 |
| CpG6 | 135726707 - 135726708 | Enhancer 1 |
| CpG7 | 135726744 - 135726745 | Enhancer 1 |
| CpG8 | 135726746 - 135726747 | Enhancer 1 |
| CpG9 | 135726752 - 135726753 | Enhancer 1 |
| CpG10 | 135726862 - 135726863 | Enhancer 1 |
| CpG11 | 135728699 - 135728700 | Enhancer 2 |
| CpG12 | 135728914 - 135728915 | Enhancer 2 |
| CpG13 | 135728921 - 135728922 | Enhancer 2 |
| CpG14 | 135728989 - 135728990 | Enhancer 2 |
| CpG15. | 135729052 - 135729053 | Enhancer 2 |
| CpG16 | 135730241 - 135730242 | Promotor |
| CpG17 | 135730265 - 135730266 | Promotor |
| CpG18 | 135730298 - 135730299 | Promotor |
| CpG19 | 135730306 - 135730307 | Promotor |
| CpG21 | 135730438 - 135730439 | Promotor |
| CpG22 | 135730445 - 135730446 | Promotor |

3.2.2 Assoziation von Geschlecht, Alter, CpG-Methylierung und SLEDAI

Im ersten Schritt wurde mittels multivariablen linearen Modells, adjustiert für Alter und Geschlecht, die Assoziation des SLEDAI mit den einzelnen CpG-Methylierungen untersucht. In Tabelle 20 ist die Effektstärke und Signifikanz des CpG-Locus, in Tabelle 21 die Effektstärke und Signifikanz des Alters und in Tabelle 22 der Einfluss des Geschlechts in der Gesamtpopulation der untersuchten Patientinnen und Patienten angegeben. Das Alter hatte keinen Einfluss, so dass auf eine Adjustierung in den folgenden Analysen verzichtet wurde. Aufgrund des Einflusses des Geschlechts wurden nur weibliche Personen im Weiteren berücksichtigt. Die Gruppe der männlichen SLE-Erkrankten war für weitere Analysen zu klein.

Tabelle 20: Assoziation von Geschlecht, Alter und CpG-Locus

| Locus | E | 2.5% KI | 97.5% KI | p |
|--------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| CpG1 | -16,28 | -46,02 | 13,47 | 0,278 |
| CpG2 | 0,80 | -17,76 | 19,35 | 0,932 |
| CpG3 | 4,53 | -6,31 | 15,37 | 0,407 |
| CpG4 | 4,53 | -6,31 | 15,37 | 0,407 |
| CpG5 | 14,65 | -14,74 | 44,04 | 0,323 |
| CpG6 | 0,95 | -27,04 | 28,95 | 0,946 |
| CpG7 | 2,92 | -20,45 | 26,28 | 0,804 |
| CpG8 | 2,92 | -20,45 | 26,28 | 0,804 |
| CpG9 | 2,42 | -29,91 | 34,75 | 0,882 |
| CpG10 | -10,35 | -22,31 | 1,61 | 0,089 |
| CpG11 | 15,40 | 1,50 | 29,30 | 0,030 |
| CpG12 | -1,25 | -21,36 | 18,86 | 0,901 |
| CpG13 | 2,31 | -19,02 | 23,64 | 0,829 |
| CpG14 | -13,60 | -36,79 | 9,58 | 0,245 |
| CpG15 | -23,28 | -50,92 | 4,36 | 0,097 |
| CpG16 | 10,03 | -12,97 | 33,03 | 0,387 |
| CpG17 | -30,08 | -55,33 | -4,82 | 0,020 |
| CpG18 | -9,80 | -39,66 | 20,05 | 0,514 |
| CpG19 | -7,60 | -34,26 | 19,06 | 0,571 |
| CpG21 | -5,43 | -20,15 | 9,28 | 0,463 |
| CpG22 | -27,39 | -46,71 | -8,06 | 0,006 |

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit

Tabelle 21: Assoziation von Alter und CpG-Methylierung

| Locus/Alter | E | 2.5% KI | 97.5% KI | p |
|-------------|---------|---------|----------|------|
| CpG1 | -0,0310 | -0,13 | 0,07 | 0,54 |
| CpG2 | -0,0329 | -0,13 | 0,07 | 0,52 |
| CpG3 | -0,0351 | -0,14 | 0,07 | 0,49 |
| CpG4 | -0,0351 | -0,14 | 0,07 | 0,49 |
| CpG5 | -0,0250 | -0,13 | 0,08 | 0,63 |
| CpG6 | -0,0328 | -0,14 | 0,07 | 0,52 |

| Locus/Alter | E | 2.5% KI | 97.5% KI | p |
|--------------------|----------|----------------|-----------------|----------|
| CpG7 | -0,0339 | -0,14 | 0,07 | 0,51 |
| CpG8 | -0,0339 | -0,14 | 0,07 | 0,51 |
| CpG9 | -0,0332 | -0,13 | 0,07 | 0,52 |
| CpG10 | -0,0403 | -0,14 | 0,06 | 0,42 |
| CpG11 | -0,0379 | -0,14 | 0,06 | 0,44 |
| CpG12 | -0,0332 | -0,13 | 0,07 | 0,51 |
| CpG13 | -0,0336 | -0,13 | 0,07 | 0,51 |
| CpG14 | -0,0328 | -0,13 | 0,07 | 0,52 |
| CpG15 | -0,0316 | -0,13 | 0,07 | 0,53 |
| CpG16 | -0,0354 | -0,14 | 0,07 | 0,49 |
| CpG17 | -0,0433 | -0,14 | 0,05 | 0,38 |
| CpG18 | -0,0411 | -0,14 | 0,06 | 0,43 |
| CpG19 | -0,0274 | -0,13 | 0,08 | 0,60 |
| CpG21 | -0,0331 | -0,13 | 0,07 | 0,51 |
| CpG22 | -0,0357 | -0,13 | 0,06 | 0,46 |

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit

Tabelle 22: Assoziation von Geschlecht und CpG-Methylierung

| Locus/Geschlecht | E | 2.5% KI | 97.5% KI | p |
|-------------------------|----------|----------------|-----------------|----------|
| CpG1 | 0,51 | -3,58 | 4,60 | 0,805 |
| CpG2 | 0,60 | -3,54 | 4,74 | 0,773 |
| CpG3 | 0,83 | -3,32 | 4,98 | 0,690 |
| CpG4 | 0,83 | -3,32 | 4,98 | 0,690 |
| CpG5 | 0,69 | -3,41 | 4,79 | 0,739 |
| CpG6 | 0,59 | -3,54 | 4,72 | 0,777 |
| CpG7 | 0,59 | -3,54 | 4,72 | 0,776 |
| CpG8 | 0,59 | -3,54 | 4,72 | 0,776 |
| CpG9 | 0,57 | -3,57 | 4,71 | 0,784 |
| CpG10 | 0,03 | -4,05 | 4,12 | 0,987 |
| CpG11 | 1,12 | -2,88 | 5,12 | 0,579 |
| CpG12 | 0,77 | -4,25 | 5,78 | 0,761 |
| CpG13 | -0,20 | -8,57 | 8,17 | 0,962 |

| Locus/Geschlecht | E | 2.5% KI | 97.5% KI | p |
|------------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| CpG14 | 1,50 | -2,87 | 5,86 | 0,496 |
| CpG15 | 3,55 | -1,80 | 8,90 | 0,190 |
| CpG16 | -1,17 | -6,93 | 4,59 | 0,685 |
| CpG17 | 13,09 | 1,88 | 24,31 | 0,023 |
| CpG18 | 4,91 | -8,88 | 18,71 | 0,479 |
| CpG19 | 4,60 | -10,07 | 19,28 | 0,533 |
| CpG21 | 3,00 | -4,71 | 10,71 | 0,440 |
| CpG22 | 15,98 | 4,44 | 27,51 | 0,007 |

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit

In der Berechnung: 0 = weiblich, 1 = männlich

3.2.3 Beschreibung der Kohorte

Insgesamt wurden die Datensätze von 60 Studienteilnehmerinnen ausgewertet. Der Altersdurchschnitt zum Zeitpunkt der Erhebung lag bei 45,7 Jahren (SD = 12,08 Jahre). Die durchschnittliche Erkrankungsdauer betrug 17 Jahre (SD = 8,3 Jahre). Weitere deskriptive Analysen sind der Tabelle 23 zu entnehmen.

Tabelle 23: Beschreibung der analysierten Kohorte

| Parameter | n | MW | SD |
|--------------------------|----|--------|--------|
| Alter (Jahre) | 60 | 45,65 | 12,08 |
| Erkrankungsdauer (Jahre) | 60 | 17,0 | 8,3 |
| BMI (kg/m ²) | 60 | 25,16 | 4,39 |
| SLEDAI | 60 | 4,73 | 5,25 |
| SLICC | 60 | 1,62 | 2,28 |
| C3 (mg/dl) | 60 | 92,18 | 16,78 |
| C4 (mg/dl) | 60 | 17,16 | 8,57 |
| Anti-dsDNA-Ak (U/l) | 60 | 207,57 | 347,59 |
| CRP (mg/dl) | 60 | 0,35 | 0,68 |

| Medikamente | Anzahl ja | % ja | |
|--------------------|------------------|-------------|---|
| Antimalariamittel | 41 | 68,3 % | - |
| Glukokortikoide | 39 | 65 % | - |
| Azathioprin | 9 | 15 % | - |
| Mycophenolat | 5 | 8,3 % | - |
| Rituximab | 4 | 6,7 % | - |
| Belimumab | 3 | 5 % | - |
| Methotrexat | 2 | 3,3 % | - |
| Ciclosporin | 1 | 1,7 % | - |

n = Anzahl, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, BMI = *Body-Mass-Index*, kg = Kilogramm, m = Meter, SLEDAI = *Systemic Lupus Erythematoses Activity Index*, SLICC = *Systemic Lupus International Collaborating Centers*, C3 = Komplementfaktor 3, C4 = Komplementfaktor 4, Anti-dsDNA-Ak = Anti-Doppelstrang-DNA-Antikörper, U = Units, l = Liter, CRP = C-reaktives Protein, mg = Milligramm, dl = Deziliter

Im Rahmen des Ambulanzbesuches wurden neben der Erhebung unterschiedlicher Scores (SLEDAI und SLICC) verschiedene Laborparameter bestimmt. Ein durchschnittlicher SLEDAI-Score von 4,7 (SD = 5,3) zeigt, dass die Krankheitsaktivität zum Zeitpunkt der Erhebung im Allgemeinen eher niedrig war. In Abb. 6 sieht man die Darstellung des Methylierungsgrades jeder gemessenen CpG-Position in CD40L-Promotor- und Enhancer-Bereich gemessen am SLEDAI.

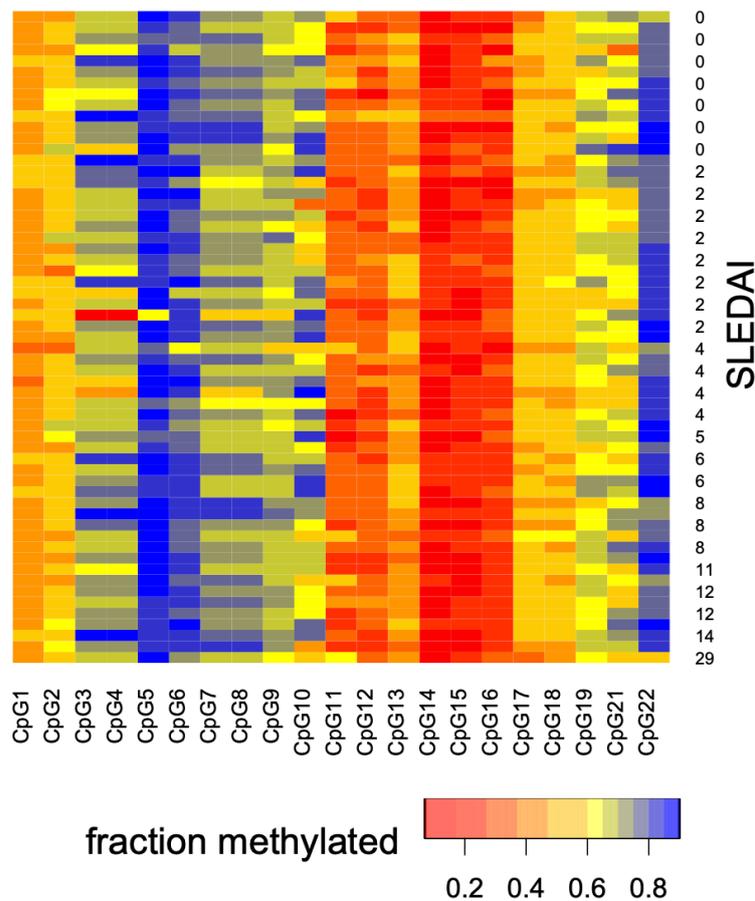


Abb. 6: Anteil der methylierten CpGs in den CD40L-Enhancer und Promotor-Regionen. Rot zeigt einen niedrigen Methylierungsgrad an, orange und gelb zeigen einen mittleren Methylierungsgrad an. Blau zeigt einen hohen Methylierungsgrad an. Die einzelnen Säulen auf der X-Achse repräsentieren die einzelnen CpG-Loci, gemessen am SLEDAI (Y-Achse) von 59 Studienteilnehmenden. Die Methylierungsanalysen mittels EpiTYPER wurden an DNA von CD4⁺-T-Zellen vorgenommen. Die gelben Bereiche im CpG22, d. h. eine verminderter Methylierungsgrad, ist mit einem höheren SLEDAI assoziiert.[109]

3.2.4 Assoziation von CpG-Methylierung bei Frauen und SLEDAI

Der Einfluss einer CpG-Methylierung auf SLE-Krankheitsaktivitätsparameter (SLEDAI) konnte nur für Frauen nachgewiesen werden. Jedoch enthielt die Stichprobe auch nur wenige Männer. Auch nach Bonferroni-Holm-Korrektur war für CpG22 im CD40L-Promotor eine Hypomethylierung signifikant mit einer höheren Krankheitsaktivität assoziiert (siehe Tabelle 25). Eine Abnahme der Methylierung von 10 % an CpG22 ist mit einer Zunahme des SLEDAI um vier Punkte assoziiert (siehe Abb. 7). Ein ähnlicher Trend zeigte sich für CpG17 im CD40L-Promotor. Nach Adjustierung konnte das Signifikanzniveau jedoch nicht erreicht werden. Wie in Tabelle 24 ersichtlich, zeigt sich im Bereich des CD40L-Enhancers 2 an Position des CpG11 ein umgekehrter Trend. Hier war eine Hypomethylierung mit einer geringeren Krankheitsaktivität assoziiert. Die Adjustierung konnte jedoch auch hier kein Signifikanzniveau erreichen.

Tabelle 24: Assoziation von CpG-Methylierung bei Frauen und SLEDAI

| Locus | E | 2.5 % KI | 97.5 % KI | p | p (adj.) |
|--------------|---------------|-----------------|------------------|---------------|-----------------|
| CpG1 | -18,99 | -51,62 | 13,64 | 0,2488 | 1,0 |
| CpG2 | 0,98 | -18,34 | 20,30 | 0,9197 | 1,0 |
| CpG3 | 4,40 | -7,23 | 16,03 | 0,4522 | 1,0 |
| CpG4 | 4,40 | -7,23 | 16,03 | 0,4522 | 1,0 |
| CpG5 | 11,23 | -20,53 | 42,99 | 0,4817 | 1,0 |
| CpG6 | 2,92 | -25,79 | 31,64 | 0,8392 | 1,0 |
| CpG7 | 4,64 | -20,41 | 29,70 | 0,7120 | 1,0 |
| CpG8 | 4,64 | -20,41 | 29,70 | 0,7120 | 1,0 |
| CpG9 | 3,64 | -30,12 | 37,40 | 0,8300 | 1,0 |
| CpG10 | -10,69 | -23,14 | 1,76 | 0,0909 | 1,0 |
| CpG11 | 14,99 | 0,28 | 29,70 | 0,0460 | 0,873 |
| CpG12 | -4,35 | -27,33 | 18,63 | 0,7060 | 1,0 |
| CpG13 | 1,15 | -21,72 | 24,02 | 0,9201 | 1,0 |
| CpG14 | -13,12 | -37,26 | 11,02 | 0,2809 | 1,0 |
| CpG15 | -27,64 | -57,28 | 1,99 | 0,0669 | 1,0 |
| CpG16 | 12,63 | -11,40 | 36,65 | 0,2970 | 1,0 |
| CpG17 | -30,46 | -58,13 | -2,79 | 0,0316 | 0,631 |
| CpG18 | -7,58 | -38,18 | 23,03 | 0,6220 | 1,0 |
| CpG19 | -8,50 | -38,68 | 21,68 | 0,5750 | 1,0 |
| CpG21 | -6,08 | -22,90 | 10,74 | 0,4719 | 1,0 |
| CpG22 | -40,05 | -63,76 | -16,34 | 0,0013 | 0,027 |

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit, p (adj.) = adjustierte Irrtumswahrscheinlichkeit

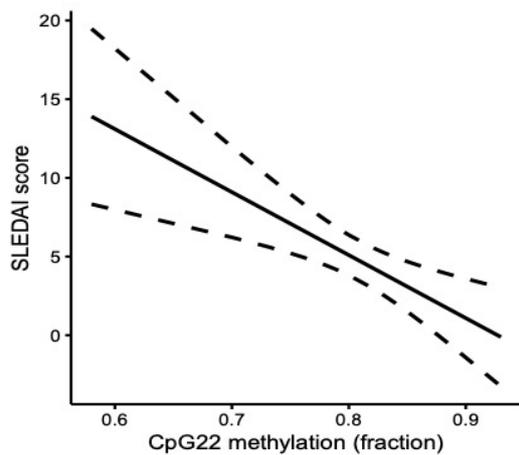


Abb. 7: Assoziation der Methylierung von CpG22 im CD40L-Promotors (X-Achse) und SLEDAI (Y-Achse). Die Abnahme der Methylierung an CpG22 im Promotor des CD40L-Gens um 10 % ist mit einer Zunahme des SLEDAIs um vier Punkte assoziiert [109].

3.2.5 Assoziation von CpG-Methylierung bei Frauen und SLICC

Für die Assoziation zwischen Methylierung und Krankheitsschäden konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25: Assoziation von CpG-Methylierung bei Frauen und SLICC

| Locus | E | 2.5 % KI | 97.5 % KI | p |
|-------|--------|----------|-----------|------|
| CpG1 | 3,788 | -10,142 | 17,718 | 0,59 |
| CpG2 | 5,091 | -3,162 | 13,345 | 0,22 |
| CpG3 | 1,737 | -3,273 | 6,747 | 0,49 |
| CpG4 | 1,737 | -3,273 | 6,747 | 0,49 |
| CpG5 | -3,025 | -16,678 | 10,627 | 0,66 |
| CpG6 | 2,937 | -9,435 | 15,310 | 0,64 |
| CpG7 | 8,094 | -2,558 | 18,745 | 0,13 |
| CpG8 | 8,094 | -2,558 | 18,745 | 0,13 |
| CpG9 | 10,023 | -4,366 | 24,411 | 0,17 |
| CpG10 | -2,967 | -8,403 | 2,470 | 0,28 |
| CpG11 | -1,037 | -7,634 | 5,560 | 0,75 |
| CpG12 | -2,167 | -12,046 | 7,712 | 0,66 |
| CpG13 | 0,630 | -9,276 | 10,537 | 0,90 |
| CpG14 | 3,107 | -7,426 | 13,641 | 0,56 |

| Locus | E | 2.5 % KI | 97.5 % KI | p |
|-------|--------|----------|-----------|------|
| CpG15 | -6,750 | -19,839 | 6,339 | 0,31 |
| CpG16 | 1,575 | -8,886 | 12,037 | 0,76 |
| CpG17 | -1,758 | -14,023 | 10,507 | 0,78 |
| CpG18 | -0,223 | -13,407 | 12,960 | 0,97 |
| CpG19 | 8,255 | -4,673 | 21,183 | 0,21 |
| CpG21 | 1,946 | -5,355 | 9,247 | 0,60 |
| CpG22 | 1,718 | -9,497 | 12,934 | 0,76 |

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit

3.2.6 Assoziation von CpG-Methylierung bei Frauen und Anti-dsDNA-Ak

Einen Bestandteil in der SLE-Diagnostik stellt der Nachweis von Anti-dsDNA-Ak dar. Eine Hypomethylierung von CpG15 im CD40L-Enhancer 2 konnte im Trend mit hoher Effektstärke assoziiert werden. Das Signifikanzniveau konnte nach Bonferroni-Holm-Korrektur nicht erreicht werden (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26: Assoziation von CpG-Methylierung bei Frauen und Anti-dsDNA-Ak

| Locus | E | 2.5% KI | 97.5% KI | p | p (adj.) |
|-------|----------|-----------|----------|-------|----------|
| CpG1 | -631,502 | -2755,891 | 1492,887 | 0,554 | 1,00 |
| CpG2 | -556,424 | -1823,815 | 710,966 | 0,383 | 1,00 |
| CpG3 | 140,869 | -625,821 | 907,559 | 0,714 | 1,00 |
| CpG4 | 140,869 | -625,821 | 907,559 | 0,714 | 1,00 |
| CpG5 | 1270,243 | -789,570 | 3330,056 | 0,222 | 1,00 |
| CpG6 | 450,907 | -1436,839 | 2338,652 | 0,634 | 1,00 |
| CpG7 | 365,512 | -1288,993 | 2020,017 | 0,660 | 1,00 |
| CpG8 | 365,512 | -1288,993 | 2020,017 | 0,660 | 1,00 |
| CpG9 | 848,268 | -1372,498 | 3069,033 | 0,448 | 1,00 |
| CpG10 | -24,448 | -862,456 | 813,559 | 0,954 | 1,00 |
| CpG11 | 53,028 | -954,314 | 1060,370 | 0,916 | 1,00 |
| CpG12 | -275,345 | -1783,488 | 1232,797 | 0,716 | 1,00 |
| CpG13 | 472,891 | -1033,830 | 1979,612 | 0,532 | 1,00 |
| CpG14 | 153,375 | -1458,193 | 1764,943 | 0,850 | 1,00 |

| Locus | E | 2.5% KI | 97.5% KI | p | p (adj.) |
|--------------|------------------|------------------|-----------------|--------------|-------------|
| CpG15 | -2309,293 | -4231,194 | -387,393 | 0,019 | 0,41 |
| CpG16 | -652,270 | -2240,591 | 936,051 | 0,414 | 1,00 |
| CpG17 | -1171,502 | -3018,745 | 675,741 | 0,209 | 1,00 |
| CpG18 | -651,263 | -2655,582 | 1353,055 | 0,518 | 1,00 |
| CpG19 | -1806,233 | -3749,218 | 136,751 | 0,068 | 1,00 |
| CpG21 | -183,479 | -1299,176 | 932,219 | 0,743 | 1,00 |
| CpG22 | -1220,854 | -2903,224 | 461,517 | 0,152 | 1,00 |

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit, p (adj.) = adjustierte Irrtumswahrscheinlichkeit

3.2.7 Assoziation von CpG-Methylierung bei Frauen und C3 bzw. C4

Für die Assoziation von CpG-Methylierungen im CD40L-Promotor- und Enhancer-Bereich und C3- (Tabelle 27) sowie C4-Werten (Tabelle 28) zeigte sich keine Signifikanz. P-Wert-Adjustierungen sind zudem getrennt für die einzelnen Loci und die Mittelwerte der Promotor- und Enhancer-Bereiche berechnet worden.

Tabelle 27: Assoziation von CpG-Methylierung und C3

| Locus | E | 2.5 % KI | 97.5 % KI | p | p (adj.) |
|-------|---------|----------|-----------|-------|----------|
| CpG1 | 102,865 | -0,658 | 206,388 | 0,051 | 1 |
| CpG2 | -14,042 | -81,061 | 52,977 | 0,676 | 1 |
| CpG3 | 36,871 | 0,180 | 73,561 | 0,049 | 1 |
| CpG4 | 36,871 | 0,180 | 73,561 | 0,049 | 1 |
| CpG5 | 57,375 | -45,301 | 160,050 | 0,267 | 1 |
| CpG6 | 52,693 | -42,791 | 148,177 | 0,273 | 1 |
| CpG7 | 67,060 | -11,944 | 146,064 | 0,095 | 1 |
| CpG8 | 67,060 | -11,944 | 146,064 | 0,095 | 1 |
| CpG9 | 98,821 | -7,518 | 205,161 | 0,068 | 1 |
| CpG10 | 9,674 | -32,064 | 51,412 | 0,644 | 1 |
| CpG11 | 18,106 | -34,652 | 70,863 | 0,494 | 1 |
| CpG12 | -19,921 | -99,723 | 59,881 | 0,619 | 1 |
| CpG13 | -22,941 | -98,752 | 52,870 | 0,546 | 1 |
| CpG14 | 15,222 | -71,329 | 101,774 | 0,726 | 1 |

| Locus | E | 2.5 % KI | 97.5 % KI | p | p (adj.) |
|---------------|----------|-----------------|------------------|----------|-----------------|
| CpG15 | 25,553 | -77,855 | 128,960 | 0,622 | 1 |
| CpG16 | -19,342 | -101,717 | 63,033 | 0,640 | 1 |
| CpG17 | -73,828 | -167,983 | 20,328 | 0,122 | 1 |
| CpG18 | -57,645 | -154,141 | 38,850 | 0,236 | 1 |
| CpG19 | 40,971 | -61,848 | 143,791 | 0,428 | 1 |
| CpG21 | -24,843 | -90,392 | 40,706 | 0,451 | 1 |
| CpG22 | -38,665 | -125,329 | 47,999 | 0,375 | 1 |
| MW Enhancer 1 | 115,463 | 13,805 | 217,121 | 0,027 | 0,11 |
| MW Enhancer 2 | 10,020 | -105,137 | 125,177 | 0,862 | 0,86 |
| MW Promotor | -75,599 | -212,118 | 60,920 | 0,272 | 0,54 |

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit, p (adj.) = Adjustierte Irrtumswahrscheinlichkeit, MW = Mittelwert

Tabelle 28: Assoziation von CpG-Methylierung und C4

| Locus | E | 2.5 % KI | 97.5 % KI | p | p (adj.) |
|--------------|----------|-----------------|------------------|----------|-----------------|
| CpG1 | 48,27 | -4,91 | 101,46 | 0,07 | 1 |
| CpG2 | -15,81 | -49,82 | 18,21 | 0,36 | 1 |
| CpG3 | 8,43 | -10,88 | 27,74 | 0,39 | 1 |
| CpG4 | 8,43 | -10,88 | 27,74 | 0,39 | 1 |
| CpG5 | -12,77 | -65,71 | 40,18 | 0,63 | 1 |
| CpG6 | -6,43 | -55,73 | 42,87 | 0,79 | 1 |
| CpG7 | -10,65 | -51,99 | 30,69 | 0,61 | 1 |
| CpG8 | -10,65 | -51,99 | 30,69 | 0,61 | 1 |
| CpG9 | -16,74 | -72,62 | 39,14 | 0,55 | 1 |
| CpG10 | -3,87 | -25,21 | 17,47 | 0,72 | 1 |
| CpG11 | -20,62 | -47,09 | 5,84 | 0,12 | 1 |
| CpG12 | -25,12 | -65,39 | 15,15 | 0,22 | 1 |
| CpG13 | -6,91 | -45,73 | 31,90 | 0,72 | 1 |
| CpG14 | -28,97 | -72,51 | 14,56 | 0,19 | 1 |
| CpG15 | -0,35 | -53,29 | 52,60 | 0,99 | 1 |
| CpG16 | -4,95 | -47,09 | 37,19 | 0,81 | 1 |

| Locus | E | 2.5 % KI | 97.5 % KI | p | p (adj.) |
|---------------|--------|----------|-----------|------|----------|
| CpG17 | 7,45 | -41,71 | 56,61 | 0,76 | 1 |
| CpG18 | 4,44 | -45,50 | 54,37 | 0,86 | 1 |
| CpG19 | -1,97 | -54,80 | 50,87 | 0,94 | 1 |
| CpG21 | -2,82 | -36,48 | 30,83 | 0,87 | 1 |
| CpG22 | 0,11 | -44,49 | 44,71 | 1,00 | 1 |
| MW Enhancer 1 | 4,09 | -50,31 | 58,49 | 0,88 | 1 |
| MW Enhancer 2 | -43,40 | -101,01 | 14,21 | 0,14 | 0,55 |
| MW Promotor | -0,89 | -71,43 | 69,66 | 0,98 | 1 |

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit, p (adj.) = Adjustierte Irrtumswahrscheinlichkeit, MW = Mittelwert

3.2.8 Assoziation von CpG-Methylierung bei Frauen und CRP

Hypomethylierungen im Promotor-Bereich bei CpG17 zeigen eine signifikante Assoziation zu höheren CRP-Werten, auch nach Bonferroni-Holm-Korrektur (siehe Tabelle 30). Im Bereich des Promotors ist eine jeweils 10 % Verringerung der Methylierung mit einem Anstieg des CRP-Wertes um 0,56 mg/dl assoziiert (siehe Abb. 8). Ein ähnlicher Trend zeigt sich für die Position CpG22 (siehe auch Tabelle 29). Hier wurde das Signifikanzniveau nach Bonferroni-Holm-Korrektur nicht erreicht.

Tabelle 29: Assoziation von CpG-Methylierung bei Frauen und CRP-Wert

| Locus | E | 2.5%CI | 97.5%CI | p | p. (adj) |
|-------|--------|--------|---------|--------|----------|
| CpG1 | -1,729 | -5,847 | 2,389 | 0,4042 | 1 |
| CpG2 | -1,209 | -3,669 | 1,251 | 0,3292 | 1 |
| CpG3 | 0,565 | -0,920 | 2,050 | 0,4496 | 1 |
| CpG4 | 0,565 | -0,920 | 2,050 | 0,4496 | 1 |
| CpG5 | 3,134 | -0,838 | 7,107 | 0,1197 | 1 |
| CpG6 | 1,802 | -1,846 | 5,449 | 0,3269 | 1 |
| CpG7 | 1,893 | -1,290 | 5,077 | 0,2387 | 1 |
| CpG8 | 1,893 | -1,290 | 5,077 | 0,2387 | 1 |
| CpG9 | 3,839 | -0,382 | 8,060 | 0,0738 | 1 |
| CpG10 | 0,118 | -1,512 | 1,747 | 0,8856 | 1 |

| Locus | E | 2.5%CI | 97.5%CI | p | p. (adj) |
|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| CpG11 | 0,885 | -1,060 | 2,830 | 0,3661 | 1 |
| CpG12 | -0,549 | -3,481 | 2,384 | 0,7094 | 1 |
| CpG13 | -1,167 | -4,091 | 1,756 | 0,4274 | 1 |
| CpG14 | -1,369 | -4,483 | 1,744 | 0,3823 | 1 |
| CpG15 | -2,969 | -6,810 | 0,871 | 0,1271 | 1 |
| CpG16 | -1,415 | -4,499 | 1,669 | 0,3622 | 1 |
| CpG17 | -5,594 | -8,925 | -2,263 | 0,0014 | 0,029 |
| CpG18 | -3,159 | -6,982 | 0,663 | 0,1034 | 1 |
| CpG19 | -1,929 | -5,785 | 1,926 | 0,3207 | 1 |
| CpG21 | 1,333 | -0,810 | 3,476 | 0,2180 | 1 |
| CpG22 | -4,184 | -7,328 | -1,041 | 0,0100 | 0,199 |

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit, p (adj.) = Adjustierte Irrtumswahrscheinlichkeit

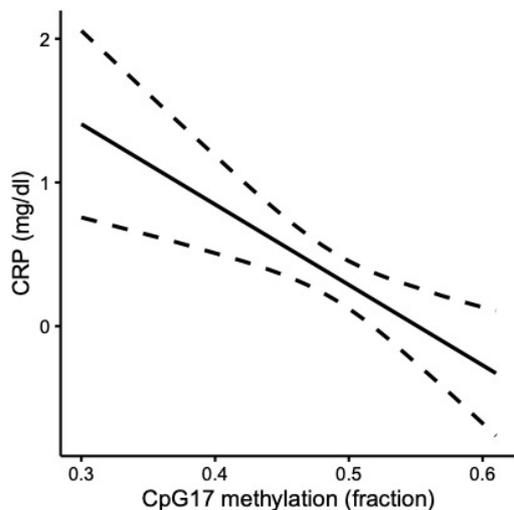


Abb. 8: Assoziation von Hypomethylierung und CRP-Werten. Jede Verminderung der Methylierung an CpG17 im Promotor des CD40L-Gens um 10 % ist mit einer Zunahme des CRP-Wertes um 0,56 mg/dl assoziiert [109].

3.3 Zusammenfassung

Die HRM-Analyse zum semiquantitativen Nachweis von Methylierungen des CD40L-Promotors erwies sich gegenüber der Referenzmethode als unzureichend.

Der Einfluss einzelner CpG-Methylierungen im CD40L-Promotor auf die Krankheitsaktivität beim SLE konnte nur für Frauen nachgewiesen werden.

Eine Hypomethylierung im CpG22 des CD40L-Promotors war auch nach Bonferroni-Holm-Korrektur signifikant mit einer erhöhten Krankheitsaktivität bei Frauen mit SLE assoziiert. Ein ähnlicher Trend zeigte sich für CpG17.

Für CpG11 im Enhancer-Bereich des CD40L-Gens war eine Hypomethylierung im Trend mit einer geringeren Krankheitsaktivität bei Frauen mit SLE assoziiert.

Eine Hypomethylierung im CpG15 des Enhancer-Bereichs des CD40L-Gens zeigte den Trend einer Assoziation zu höheren Anti-dsDNA-Ak-Spiegeln mit hoher Effektstärke.

Hypomethylierungen im Promotor-Bereich des CpG17 zeigen eine signifikante Assoziation zu höheren CRP-Werten, auch nach Bonferroni-Holm-Korrektur. Ein ähnlicher Trend zeigt sich für CpG22 im CD40L-Promotor.

4 Diskussion

Die Modifikation von DNA durch Methylierung gilt als stabil und vererbbar, jedoch nicht unveränderbar. Veränderungen im Methylierungsmuster wurden in Zusammenhang mit dem Auftreten von SLE und anderen Autoimmunerkrankungen bereits mehrfach beschrieben [59], [84].

Schwerpunkt dieser Arbeit war die Etablierung der HRM-Methode zur Untersuchung von Methylierungen des CD40L-Promotors bei Patienten mit systemischen Lupus erythematoses. Zusätzlich sollten die Ergebnisse dieser Untersuchung genutzt werden, um klinische und laborchemische Daten in Hinblick auf bestimmte Methylierungsmuster zu beurteilen.

Die vorbereitenden Untersuchungen stellten einen wichtigen Schritt für die Etablierung der HRM-Analyse dar. Im ersten Teil werden nun folgend die methodischen Aspekte diskutiert.

4.1 Diskussion der angewandten Methoden

4.1.1 MACS[®] und MagCore[®] DNA Isolierung

Als gut etablierte manuelle Methode zur Isolierung von speziellen Zellsubtypen gilt seit Langem die Markierung dieser Zellen mit magnetischen Mikropartikeln [110]. In dieser Arbeit erfolgte sowohl die Isolierung der CD4⁺-T-Zellen als auch die Gewinnung von DNA aus diesen Zellen mittels magnetischer Partikel. Wir konnten demonstrieren, dass sowohl Negativ- als auch Positivselektion der CD4⁺-T-Zellen mit anschließender automatischer DNA-Isolierung mittels magnetischer Markierung quantitativ und qualitativ gute Ergebnisse brachte [108]. Die Reinheit, gemessen am A260/A280 Quotienten, war für die direkte Markierung mit signifikanter Effektstärke höher. Ebenso zeigte sich ein positiver Trend für die DNA-Konzentration nach Positivselektion. Die Ergebnisse zeigen auf, dass eine gewisse Flexibilität in Hinblick auf die Verarbeitung des Materials für epigenetische Analysen gegeben ist. Sowohl manuelle als auch automatisierte Methoden können angewendet werden. Die Nutzung von automatisierten Verfahren ermöglicht zudem ein größeren Probendurchsatz, als gegebenenfalls eine manuelle Verarbeitung

erlaubt. Eine hohe DNA-Konzentration war in Hinblick auf die vergleichenden Untersuchungen mittels EpiTYPER für unsere Studien ein wichtige Kenngröße.

4.1.2 Bisulfit-Konversion

Die meisten Methoden der Methylierungsanalysen beruhen auf dem ersten Schritt der Natriumbisulfit-Behandlung. Erst diese chemische Konservierung der Methylierungsinformation ermöglicht eine Analyse für eine Vielzahl an Methoden. Hierbei werden Cytosinbasen zu Uracil konvertiert, nicht jedoch 5-methyl-Cytosinbasen. In der anschließenden PCR-Amplifikation werden die Uracilbasen dann durch Thymin ersetzt. Unterschiedliche Methoden nutzen diese Grundlage für die Auswertung der Methylierungsinformation. Es gibt zahlreiche Kits auf dem Markt, die eine Konversion in mehr oder weniger einfachen Schritten ermöglichen. Wir verglichen die Konversionskits von Analytik Jena und Applied Biosystems gemessen an Anwenderfreundlichkeit und Konversionseffizienz. Zum Einsatz kam dann das Kit von Analytik Jena, welches die besseren Ergebnisse zeigte. Für die Untersuchungen mittels EpiTYPER erfolgte der Versand von unbehandelter DNA. Die Bisulfit-Konversion erfolgte hier mit einem anderen Kit.

Die Konversion stellt einen ersten wichtigen Schritt in der Probenverarbeitung dar, da die weiteren Analysen von einem korrekten Ergebnis abhängen. Hier ist es wichtig, dass alle unmethylierten Cytosinbasen komplett zu Uracil umgewandelt werden, und, dass methylierte Cytosinbasen nicht fälschlicherweise zu Thymin umgewandelt werden [111]. Jedes Kit bringt Vor- und Nachteile mit sich und muss entsprechend ausgewählt werden. Die chemische Reaktion der Bisulfit-Konversion führt durch hohe Reaktionstemperaturen bis 90 °C und durch alkalische Lösungen zur Fragmentierung von DNA [111]. Das Problem der Fragmentierung stellt sich vor allem für Analysen langer Fragmente über 500 Nukleotide. In unsere Studie beinhaltete die Promotorsequenz insgesamt 171 Nukleotide. Es war also nicht mit einer übermäßigen Fragmentierung als Störgröße zu rechnen. Neben Fragmentierung spielen eine DNA-Degradation bzw. Strangbrüche durch die hohen Temperaturen sowie der niedrige pH-Wert der Lösungen eine Rolle. Temperaturen von 85 °C über 45 Minuten während der Konversionsreaktion (Analytik Jena) wurden in Kauf genommen, um ein ausreichend gutes Konversionsergebnis mit entsprechender Effizienz zu erreichen. Es gilt hier, die Balance zwischen gewünschter und ungewünschter Reaktion zu finden [112]. Eine Verkürzung der Inkubationszeit kann zur Reduktion der fehlerhaften

Konversion führen (d.h. Umwandlung von methyliertem Cytosin zu Thymin). Unsere Ergebnisse der HRM-Analyse zeigten zu niedrige Methylierungswerte im Vergleich zur EpiTYPER Methode. Eine mögliche Erklärung könnte eine fehlerhafte Konversion sein.

Eine Möglichkeit der Konversionskontrolle stellt die Berechnung der Effizienz dar. Bestimmte Techniken der DNA-Methylierungsanalyse beinhalten Konversionskontrollen (z. B. über bestimmte Sonden) zur Qualitätskontrolle. Die HRM-Methode bietet keine solche Kontrolle der Konversionsreaktionen. Unsere Vorversuche zur Auswahl der Konversions-Kits richteten sich ausschließlich nach Konversions-Effizienz und Anwenderfreundlichkeit. Weitere Kriterien wie Fragmentierung oder Spezifität der Konversion wurden nicht mitbeurteilt.

Als Kritikpunkt kann man in dieser Studie anbringen, dass es nicht auszuschließen ist, dass die Bisulfit-Konversion als erster Schritt schon ausschlaggebend ist für die abweichenden Ergebnisse in den Methoden. Es zeigt sich durchaus eine Heterogenität in Hinblick auf Durchführung unterschiedlicher Kits [113].

4.1.3 Primer-Design und Testung mittels HRM-Analyse

Eines der Hauptprobleme der PCR-basierten Methylierungsanalysen ist der PCR-Bias. Dieser entsteht durch die ungleichmäßige Amplifizierung von methylierter und unmethylierter DNA [114]. Verschiedene Studien zeigen eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten unmethylierter DNA [115]. Zum Teil konnte dieser Effekt mit Erhöhung der *Annealing*-Temperatur korrigiert werden [114]. Die Versuche erfolgten bei Variation der Temperatur zwischen 50 °C und 60 °C. In unserer Studie wurden die optimalen *Annealing*-Temperaturen anhand der Standardreihe in einem Bereich zwischen 58 °C und 62 °C getestet. Die optimale *Annealing*-Temperatur lag bei 60 °C. Hier zeigten sich Auflösung und Reproduzierbarkeit der abgestuften Methylierungsreihe am besten. Im Bereich der Probenanalyse kann es aufgrund einer Über-Amplifizierung der unmethylierten DNA zu falsch-niedrigen Ergebnissen gekommen sein. Eine Variierung der *Annealing*-Temperatur erfolgte mit den einzelnen Proben nicht.

Wojdacz et al. diskutierte 2009 bereits, dass nicht nur der CG-Gehalt einer Probe, sondern auch die Sequenz an sich PCR-Bias vermehrt auftreten lässt [116]. Aus verschiedenen Analysen ergab sich eine Guideline zum Design von *Primern* für HRM-Analysen. Hier stehen vor allem die *Annealing*-Temperatur sowie die Anzahl an CpGs im Mittelpunkt der

Optimierung in Hinblick auf den PCR-Bias [117]. Für das Design von *Primern* gibt es eine Vielzahl an unterstützenden Programmen. Auch für Methylierungsanalysen im Allgemeinen und HRM-Analysen gibt es entsprechende Produkte. Wir hielten uns vorerst an die allgemeinen Abläufe zum Design von *Primern*.

In diesem ersten Schritt der Probenauswertung schienen die Ergebnisse unserer Erwartung eines niedrigen Methylierungsgrades des CD40L-Promoto-Bereiches zu entsprechen.

4.1.4 EpiTYPER

In dieser Arbeit wurde die Massenspektrometrie-basierte EpiTYPER-Technik zur Verifizierung der HRM-Methode angewendet. Die Etablierung und Auswertung erfolgte durch die Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Rehli der Uniklinik Regensburg. Als massenspektrometrisches Verfahren erfolgt eine semi-quantitative DNA-Methylierungsanalyse mit hohem Durchsatz.

Die Möglichkeit mit einer anwenderfreundlichen, schnellen und kostengünstigen Methode genspezifische Methylierungsmuster und -veränderungen nachzuweisen, ist im Rahmen diagnostischer Anwendungen bei chronischen Erkrankungen von großem Interesse. Der EpiTYPER bietet die Möglichkeit, schnell und präzise Informationen zu spezifischen Methylierungsstellen zu liefern [96]. In der Anwendung und aufgrund ihrer eingeschränkten Verfügbarkeit ist die Methode jedoch nicht für den klinischen Alltag in der Breite nutzbar. Gerade aber diese Anwendung im klinischen Alltag sollte mit den Ergebnissen dieser Arbeit ermöglicht werden. Aktuell gibt es eine Vielzahl an Methoden, die zur Quantifizierung der DNA-Methylierung verwendet werden [99], [118]. Je nach Fragestellung kommt es zum Einsatz von aufwändigen oder einfacheren Methoden. Seit langem werden verschiedene serologische Marker zur Diagnosestellung und zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs beim SLE verwendet. Unter anderem CRP, BSG und Antikörperdiagnostik werden in Zusammenschau mit Bildgebung und klinischer Untersuchung zur Beurteilung des aktuellen Krankenstandes oder zur Einschätzung des Krankheitsverlaufs hinzugezogen. Vorteil dieser serologischen Marker und deshalb im klinischen Alltag anwendbar, ist die unkomplizierte Messung. Auf dem Weg zur personalisierten Medizin werden Methylierungsbiomarker eine wichtige Rolle einnehmen. Denkbar ist eine Anwendung in Bereichen zur Ermittlung eines persönlichen Risikos, zur Entscheidung für eine personalisierte Therapie bis hin zur Kontrolle einer Therapie oder der Ermittlung einer individuellen Prognose [119]. Aktuell kommen vor allem qualitative

Methylierungsuntersuchungen in der Diagnostik vor [120]. Bei der Therapie von Glioblastomen steht z. B. die Methylierung des O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase(MGMT)-Promotors für ein erfolgreiches Ansprechen auf Temozolomid, das selbst Modifikationen (Alkylierung) an der DNA vornimmt [121]. Zur Entwicklung von semiquantitativen und quantitativen Methoden zu Anwendung in der Klinik bedarf es somit weiterer Forschung. Eine möglichst einfache Bestimmung der Biomarker ist für den klinischen Alltag von großer Bedeutung.

4.2 Diskussion der erhobenen Daten

Beim SLE ist die verminderte Methylierung in Immunzellen als ein wichtiger Faktor für Krankheitsdisposition und -aktivität seit langem bekannt [84], [122]. Auch konnte ein erniedrigtes Methylierungslevel in CD4⁺-T-Zellen bei SLE-Erkrankten nachgewiesen werden [123] [124]. Lu *et al.* demonstrierten in ihrer Studie den Zusammenhang zwischen Demethylierung des CD40L-Promotors und Krankheitsaktivität bei SLE [55]. Diesen Effekt konnten unsere Untersuchungen nicht bestätigen. Die Betrachtung der Gesamtmethylierung im CD40L-Promotor- und Enhancer-Bereich ergab gemessen an der Krankheitsaktivität keinen Hinweis auf einen Zusammenhang [109].

Bei Auswertung einzelner CpG-Bereiche im CD40L-Promotor konnte an Position des CpG22 ein signifikanter Effekt zwischen Hypomethylierung und Krankheitsaktivität bei Frauen mit SLE aufgezeigt werden. Für CpG17 konnte ein ähnlicher Trend beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Beurteilung einzelner CpG-Bereiche im Vergleich zur Gesamtmethylierung eines Gens oder einer Zellpopulation zusätzlich Informationen liefern und gegebenenfalls auch Auswirkungen auf die Genexpression haben kann. Die Tatsache, dass Methylierungsveränderungen einzelner CpGs in Abhängigkeit von Ihrer Position zum Transkriptionsstartpunkt relevant sein können, wurde bereits von van Vlodrop *et al.* besprochen [85]. Eine Untersuchung zum Methylierungsstatus einzelner CpG-Bereiche wäre in Zukunft als Biomarker für die Einschätzung der Krankheitsaktivität denkbar. Voraussetzung hierfür sind die sorgfältige Wahl und Durchführung der Methode zur Methylierungsanalyse und eine entsprechend sorgfältige Datenanalyse. Wenn bestimmte „Kern-CpGs“ bekannt sind, sollte die Untersuchung um diese etabliert werden.

Die Menge an diagnostischen Indikatoren bei Autoimmunerkrankungen wie dem SLE illustriert die Komplexität der Erkrankung. Es ist erst die Gesamtheit an erhobenen Befunden, die eine Beurteilung ermöglichen. Das C-reaktive Protein ist als Laborwert ein unspezifischer Indikator – sowohl für die Krankheitsaktivität des SLE im Allgemeinen [125] als auch gemessen am SLEDAI [126]. Gerade in Zusammenhang mit Lupus stellt CRP einen nicht verlässlichen Biomarker für die Überwachung der Krankheitsaktivität dar [127]. Eine Verbindung zwischen CRP-Werten und SLE wird jedoch in Zusammenhang mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko schon seit langem diskutiert [128]. CRP ist zum einen beschrieben als ein Marker zur Bestimmung des kardiovaskulären Risikos bei Frauen [129]. Ebenso konnten CD40 und dem CD40-Liganden eine wichtige Rolle in der Entstehung der Arteriosklerose nachgewiesen werden [130]. In unserer Studie konnte nun ein signifikanter Zusammenhang zwischen Hypomethylierung an CpG17 des CD40L-Promotors und erhöhten CRP-Werten bei Frauen mit SLE nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse könnten einen Hinweis darauf geben, dass ein Zusammenhang zwischen Veränderungen des Methylierungsmusters am CD40L-Promotor (hier Hypomethylierung des CpG17) und der Krankheitsaktivität sowie der systemischen Entzündung in Zusammenhang mit SLE besteht, und dass es in einem weiteren Schritt zur Erklärung des erhöhten kardiovaskulären Risikos bei Patienten mit SLE beiträgt. Zusammen genommen könnten beide Biomarker eine genauere Beurteilung von Krankheitsaktivität und Prognose liefern.

4.3 Limitationen

Die Ergebnisse unserer Studie sind im Zusammenhang mit folgenden Limitationen zu interpretieren: Die Fallzahl unserer Studie ist mit $n = 60$ relativ klein, daher sind die Ergebnisse nur eingeschränkt auf eine Grundgesamtheit übertragbar.

Die Frage, warum SLE bei Frauen häufiger Auftritt als bei Männern, ist bisher nicht gelöst. Verminderte X-Inaktivierung und somit vermehrte Expression X-chromosomal gelegener Gene ist bereits mehrfach in Zusammenhang mit dem gehäuften Auftreten der Erkrankung bei Frauen beschrieben [50], [54], [55]. Unsere Studienkohorte umfasst nur Frauen, eine Beurteilung des Methylierungslevels des CD40L-Promotors bei männlichen Patienten kann demnach nicht erfolgen. Möglicherweise gibt es auch andere Genorte, die sowohl für Männer als auch Frauen mit SLE eine Korrelation von Hypomethylierung und

Krankheitsaktivität zeigen, und die als Biomarker unabhängig vom Geschlecht genutzt werden können. Hier bedarf es weiterer Forschung.

Ebenso umfasste unsere Studie Erkrankte mit eher längerem Krankheitsgeschehen. Neben Unterschieden im Phänotyp wurden die Patientinnen auch unterschiedlich therapiert. Es ist möglich, dass die bisherige Therapie bereits einen Einfluss auf den Methylierungsstatus der untersuchten Zielregion hatte. Unterschiede in der Therapie sind nicht berücksichtigt worden. Methotrexat z. B. ist ein Medikament, das in den Folsäuremetabolismus eingreift. Studien sind bisher nicht eindeutig, ob und wie dies Einfluss auf DNA-Methylierungen nimmt. Die Untersuchung der hier besprochenen CpG-Loci in Hinblick auf Veränderungen des Methylierungsmusters einzelner Methylierungsstellen oder des gesamten Methylierungslevels unter Methotrexat-Therapie wäre von Interesse.

In Hinblick auf die hier angewandten Methoden ist zu erwähnen, dass bei beiden Methoden, HRM-Analyse und EpiTYPER, die Vorbehandlung mittels Bisulfit erfolgt. Dies ist eine Methode, die es im Anschluss nicht ermöglicht, einen Unterschied zwischen methylierten Cytosin und hydroxymethyliertem Cytosin zu erfassen [92]. Da die Hydroxymethylierung des Cytosins im Vergleich zur Methylierung des Cytosins eine differenzierte Funktion in der Zelle übernimmt und ein erhöhtes Level an Hydroxymethylcytosin in CD4⁺-T-Zellen beim Lupus bereits beschrieben wurde [63], wäre es von Interesse, eine differenzierte Analyse der verschiedenen epigenetischen Variationen und ihren möglichen Einfluss beim SLE anzustreben und mögliche ggf. diskordante Ergebnisse in Hinblick auf Methylierungsanalyse aufzuklären [95].

4.4 Ausblick

SLE ist eine komplexe Erkrankung mit klinischer Heterogenität, vielen diagnostischen Ansätzen und anwendbaren Therapien. Voraussichtlich wird es nie möglich sein, anhand einer einzigen Untersuchungsmethode und anhand eines einzelnen Biomarkers umfassende Entscheidungen im Sinne der Erkrankten zu treffen. Mit Blick auf eine personalisierte Behandlung wird es zunehmend wichtiger sein, die persönliche Vorgeschichte, Familienanamnese, demographische Daten und eine spezifische Auswahl an Biomarkern hinzuzuziehen, um Erkrankte möglichst effektiv zu behandeln. Diese Entwicklung wird auch die Etablierung neuer Untersuchungsmethoden mit sich bringen.

5 Literaturverzeichnis

- [1] A. Rahman und D. A. Isenberg, „Systemic Lupus Erythematosus“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 358, Nr. 9, S. 929–939, Feb. 2008, doi: 10.1056/NEJMra071297.
- [2] K. M. Murphy, C. Weaver, und C. Janeway, *Janeway Immunologie*, 9. Auflage. in Springer Lehrbuch. Berlin: Springer Spektrum, 2018.
- [3] T. Tang, X. Cheng, B. Truong, L. Sun, X. Yang, und H. Wang, „Molecular basis and therapeutic implications of CD40/CD40L immune checkpoint“, *Pharmacol. Ther.*, Bd. 219, S. 107709, März 2021, doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107709.
- [4] T. Kawabe, M. Matsushima, N. Hashimoto, K. Imaizumi, und Y. Hasegama, „CD40/CD40 Ligand interactions in immune response and pulmonary immunity“, *Nagoya J. Med. Sci.*, Bd. 73, Nr. 3–4, S. 69–78, Aug. 2011.
- [5] S. G. Tangye, C. S. Ma, R. Brink, und E. K. Deenick, „The good, the bad and the ugly — TFH cells in human health and disease“, *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 13, Nr. 6, Art. Nr. 6, Juni 2013, doi: 10.1038/nri3447.
- [6] R. L. Reinhardt, H.-E. Liang, und R. M. Locksley, „Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire“, *Nat. Immunol.*, Bd. 10, Nr. 4, S. 385–393, Apr. 2009, doi: 10.1038/ni.1715.
- [7] S. A. Quezada, L. Z. Jarvinen, E. F. Lind, und R. J. Noelle, „CD40/CD154 Interactions at the Interface of Tolerance and Immunity“, *Annu. Rev. Immunol.*, Bd. 22, Nr. 1, S. 307–328, Apr. 2004, doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104533.
- [8] N. Alaaeddine, G. S. Hassan, D. Yacoub, und W. Mourad, „CD154: An Immunoinflammatory Mediator in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis“, *Clin. Dev. Immunol.*, Bd. 2012, S. 1–11, 2012, doi: 10.1155/2012/490148.
- [9] C. van Kooten und J. Banchereau, „CD40-CD40 ligand“, *J. Leukoc. Biol.*, Bd. 67, Nr. 1, S. 2–17, Jan. 2000, doi: 10.1002/jlb.67.1.2.
- [10] A. Cerutti, I. Puga, und M. Cols, „Innate control of B cell responses“, *Trends Immunol.*, Bd. 32, Nr. 5, S. 202–211, Mai 2011, doi: 10.1016/j.it.2011.02.004.
- [11] A. D. Kirk, P. J. Blair, D. K. Tadaki, H. Xu, und D. M. Harlan, „The role of CD154 in organ transplant rejection and acceptance“, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, Bd. 356, Nr. 1409, S. 691–702, Mai 2001, doi: 10.1098/rstb.2001.0855.
- [12] M. A. Jeffries und A. H. Sawalha, „Epigenetics in systemic lupus erythematosus: leading the way for specific therapeutic agents“, *Int. J. Clin. Rheumatol.*, Bd. 6, Nr. 4, S. 423–439, Aug. 2011, doi: 10.2217/ijr.11.32.
- [13] F. Martin und A. C. Chan, „B CELL IMMUNOBIOLOGY IN DISEASE: Evolving Concepts from the Clinic“, *Annu. Rev. Immunol.*, Bd. 24, Nr. 1, S. 467–496, Apr. 2006, doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090517.
- [14] H. Xu *u. a.*, „Increased frequency of circulating follicular helper T cells in lupus patients is associated with autoantibody production in a CD40L-dependent manner“, *Cell. Immunol.*, Bd. 295, Nr. 1, S. 46–51, Mai 2015, doi: 10.1016/j.cellimm.2015.01.014.
- [15] C.-L. Law und I. S. Grewal, „Therapeutic interventions targeting CD40L (CD154) and CD40: the opportunities and challenges“, *Adv. Exp. Med. Biol.*, Bd. 647, S. 8–36, 2009, doi: 10.1007/978-0-387-89520-8_2.

- [16] P. Vermersch *u. a.*, „Inhibition of CD40L with Frexalimab in Multiple Sclerosis“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 390, Nr. 7, S. 589–600, Feb. 2024, doi: 10.1056/NEJMoa2309439.
- [17] E. W. St *u. a.*, „Op0143 Efficacy and Safety of Dazodalibep (vib4920/Hzn4920) in Subjects with Sjögren’s Syndrome: A Phase 2, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Proof of Concept Study“, *Ann. Rheum. Dis.*, Bd. 82, Nr. Suppl 1, S. 95–95, Juni 2023, doi: 10.1136/annrheumdis-2023-eular.234.
- [18] A. Askanase, C. Stach, C. Brittain, G. Stojan, und R. Furie, „Pos0115 Dapirolizumab Pegol Efficacy by Subgroups in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Post Hoc Analysis of Phase 2 Clinical Trial Data“, *Ann. Rheum. Dis.*, Bd. 82, Nr. Suppl 1, S. 272–273, Juni 2023, doi: 10.1136/annrheumdis-2023-eular.1991.
- [19] M. Aringer *u. a.*, „2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus“, *Arthritis Rheumatol.*, Bd. 71, Nr. 9, S. 1400–1412, Sep. 2019, doi: 10.1002/art.40930.
- [20] M. Aringer und M. Schneider, „[Systemic lupus erythematosus]“, *Internist*, Bd. 62, Nr. 4, S. 385–396, Apr. 2021, doi: 10.1007/s00108-021-00948-8.
- [21] T. Alexander, A. Radbruch, und F. Hiepe, „Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses“, *Z. Für Rheumatol.*, Bd. 74, Nr. 3, S. 183–190, Apr. 2015, doi: 10.1007/s00393-014-1456-2.
- [22] A. Kuhn, G. Bonsmann, H.-J. Anders, P. Herzer, K. Tenbrock, und M. Schneider, „The Diagnosis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus“, *Dtsch. Aerzteblatt Online*, Juni 2015, doi: 10.3238/arztebl.2015.0423.
- [23] G. Bertsias *u. a.*, „EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics“, *Ann. Rheum. Dis.*, Bd. 67, Nr. 2, S. 195–205, Feb. 2008, doi: 10.1136/ard.2007.070367.
- [24] M. Shipa *u. a.*, „Identification of biomarkers to stratify response to B-cell-targeted therapies in systemic lupus erythematosus: an exploratory analysis of a randomised controlled trial“, *Lancet Rheumatol.*, Bd. 5, Nr. 1, S. e24–e35, Jan. 2023, doi: 10.1016/S2665-9913(22)00332-0.
- [25] null The Lancet Rheumatology, „Quest for the holy grail: biomarkers in SLE“, *Lancet Rheumatol.*, Bd. 5, Nr. 1, S. e1, Jan. 2023, doi: 10.1016/S2665-9913(22)00362-9.
- [26] R. Sabahi und J. H. Anolik, „B-cell-targeted therapy for systemic lupus erythematosus“, *Drugs*, Bd. 66, Nr. 15, S. 1933–1948, 2006.
- [27] B. Qu und N. Shen, „miRNAs in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus“, *Int. J. Mol. Sci.*, Bd. 16, Nr. 5, S. 9557–9572, Apr. 2015, doi: 10.3390/ijms16059557.
- [28] Y. Zhan, Y. Guo, und Q. Lu, „Aberrant Epigenetic Regulation in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus and Its Implication in Precision Medicine“, *Cytogenet. Genome Res.*, Bd. 149, Nr. 3, S. 141–155, 2016, doi: 10.1159/000448793.
- [29] A. G. Wilson, „Epigenetic Regulation of Gene Expression in the Inflammatory Response and Relevance to Common Diseases“, *J. Periodontol.*, Bd. 79, Nr. 8s, S. 1514–1519, Aug. 2008, doi: 10.1902/jop.2008.080172.
- [30] J. A. Kelly, K. L. Moser, und J. B. Harley, „The genetics of systemic lupus erythematosus: putting the pieces together“, *Genes Immun.*, Bd. 3, Nr. S1, S. S71–S85,

Okt. 2002, doi: 10.1038/sj.gene.6363885.

[31] A. M. Delgado-Vega *u. a.*, „Whole Exome Sequencing of Patients from Multicase Families with Systemic Lupus Erythematosus Identifies Multiple Rare Variants“, *Sci. Rep.*, Bd. 8, Juni 2018, doi: 10.1038/s41598-018-26274-y.

[32] A. Belot und R. Cimaz, „Monogenic forms of systemic lupus erythematosus: new insights into SLE pathogenesis“, *Pediatr. Rheumatol.*, Bd. 10, Nr. 1, S. 21, Dez. 2012, doi: 10.1186/1546-0096-10-21.

[33] M. E. Alarcón-Riquelme, „New Attempts to Define and Clarify Lupus“, *Curr. Rheumatol. Rep.*, Bd. 21, Nr. 4, 2019, doi: 10.1007/s11926-019-0810-4.

[34] G. C. Tsokos, „Systemic Lupus Erythematosus“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 365, Nr. 22, S. 2110–2121, Dez. 2011, doi: 10.1056/NEJMra1100359.

[35] B. M. Javierre *u. a.*, „Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus“, *Genome Res.*, Bd. 20, Nr. 2, S. 170–179, Feb. 2010, doi: 10.1101/gr.100289.109.

[36] F. M. Strickland *u. a.*, „Diet Influences Expression of Autoimmune-Associated Genes and Disease Severity by Epigenetic Mechanisms in a Transgenic Mouse Model of Lupus: Diet, DNA Methylation, and Lupus“, *Arthritis Rheum.*, Bd. 65, Nr. 7, S. 1872–1881, Juli 2013, doi: 10.1002/art.37967.

[37] G. Wang *u. a.*, „Ultraviolet B exposure of peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus inhibits DNA methylation“, *Lupus*, Bd. 18, Nr. 12, S. 1037–1044, Okt. 2009, doi: 10.1177/0961203309106181.

[38] S. Finzel, S. Schaffer, M. Rizzi, und R. E. Voll, „Pathogenese des systemischen Lupus erythematosus“, *Z. Für Rheumatol.*, Bd. 77, Nr. 9, S. 789–798, Nov. 2018, doi: 10.1007/s00393-018-0541-3.

[39] M. Gourley und F. W. Miller, „Mechanisms of Disease: environmental factors in the pathogenesis of rheumatic disease“, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, Bd. 3, Nr. 3, S. 172–180, März 2007, doi: 10.1038/ncprheum0435.

[40] E. Somers und B. Richardson, „Environmental exposures, epigenetic changes and the risk of lupus“, *Lupus*, Bd. 23, Nr. 6, S. 568–576, Mai 2014, doi: 10.1177/0961203313499419.

[41] B. L. Park, L. H. Kim, H. D. Shin, Y. W. Park, W. S. Uhm, und S.-C. Bae, „Association analyses of DNA methyltransferase-1 (DNMT1) polymorphisms with systemic lupus erythematosus“, *J. Hum. Genet.*, Bd. 49, Nr. 11, S. 642–646, Nov. 2004, doi: 10.1007/s10038-004-0192-x.

[42] X.-J. He, Y. Ding, W. Xiang, und X.-Q. Dang, „Roles of 1,25(OH)₂D₃ and Vitamin D Receptor in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus by Regulating the Activation of CD4⁺ T Cells and the PKCδ/ERK Signaling Pathway“, *Cell. Physiol. Biochem.*, Bd. 40, Nr. 3–4, S. 743–756, 2016, doi: 10.1159/000453135.

[43] C. C. Mok, E. T. Bro, L. Y. Ho, R. J. Singh, und P. J. Jannetto, „Serum 25-hydroxyvitamin D3 levels and flares of systemic lupus erythematosus: a longitudinal cohort analysis“, *Clin. Rheumatol.*, Bd. 37, Nr. 10, S. 2685–2692, Okt. 2018, doi: 10.1007/s10067-018-4204-1.

[44] A. Watad, S. G. Neumann, A. Soriano, H. Amital, und Y. Shoenfeld, „Vitamin D

and Systemic Lupus Erythematosus: Myth or Reality?“, *Isr. Med. Assoc. J. IMAJ*, Bd. 18, Nr. 3–4, S. 177–182, Apr. 2016.

[45] E. Cornacchia, J. Golbus, J. Maybaum, J. Strahler, S. Hanash, und B. Richardson, „Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity“, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, Bd. 140, Nr. 7, S. 2197–2200, Apr. 1988.

[46] Y. Pan und A. H. Sawalha, „Epigenetic regulation and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus“, *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.*, Bd. 153, Nr. 1, S. 4–10, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.trsl.2008.10.007.

[47] O. Shovman, S. Tamar, H. Amital, A. Watad, und Y. Shoenfeld, „Diverse patterns of anti-TNF- α -induced lupus: case series and review of the literature“, *Clin. Rheumatol.*, Bd. 37, Nr. 2, S. 563–568, Feb. 2018, doi: 10.1007/s10067-017-3884-2.

[48] L. E. Wilson, D. Widman, S. H. Dikman, und P. D. Gorevic, „Autoimmune disease complicating antiviral therapy for hepatitis C virus infection“, *Semin. Arthritis Rheum.*, Bd. 32, Nr. 3, S. 163–173, Dez. 2002, doi: 10.1053/sarh.2002.37277.

[49] S. Vordenbäumen *u. a.*, „Methyl donor micronutrients, CD40-ligand methylation and disease activity in systemic lupus erythematosus: A cross-sectional association study“, *Lupus*, Bd. 30, Nr. 11, S. 1773–1780, Okt. 2021, doi: 10.1177/09612033211034559.

[50] C. E. Weckerle und T. B. Niewold, „The unexplained female predominance of systemic lupus erythematosus: clues from genetic and cytokine studies“, *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, Bd. 40, Nr. 1, S. 42–49, Feb. 2011, doi: 10.1007/s12016-009-8192-4.

[51] R. Vidaver, „Molecular and clinical evidence of the role of estrogen in lupus“, *Trends Immunol.*, Bd. 23, Nr. 5, S. 229–230, Mai 2002.

[52] F. M. Strickland *u. a.*, „Environmental exposure, estrogen and two X chromosomes are required for disease development in an epigenetic model of lupus“, *J. Autoimmun.*, Bd. 38, Nr. 2–3, S. J135–J143, Mai 2012, doi: 10.1016/j.jaut.2011.11.001.

[53] R. H. Scofield *u. a.*, „Klinefelter’s syndrome (47,XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: Support for the notion of a gene-dose effect from the X chromosome“, *Arthritis Rheum.*, Bd. 58, Nr. 8, S. 2511–2517, Aug. 2008, doi: 10.1002/art.23701.

[54] A. Hewagama *u. a.*, „Overexpression of X-Linked genes in T cells from women with lupus“, *J. Autoimmun.*, Bd. 41, S. 60–71, März 2013, doi: 10.1016/j.jaut.2012.12.006.

[55] Q. Lu, A. Wu, L. Tesmer, D. Ray, N. Yousif, und B. Richardson, „Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus“, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, Bd. 179, Nr. 9, S. 6352–6358, Nov. 2007.

[56] X. Lian *u. a.*, „DNA demethylation of CD40L in CD4+ T cells from women with systemic sclerosis: A possible explanation for female susceptibility“, *Arthritis Rheum.*, Bd. 64, Nr. 7, S. 2338–2345, 2012, doi: 10.1002/art.34376.

[57] C. H. Waddington, „The Epigenotype“, *Int. J. Epidemiol.*, Bd. 41, Nr. 1, S. 10–13, Feb. 2012, doi: 10.1093/ije/dyr184.

[58] J. K. Kim, M. Samaranayake, und S. Pradhan, „Epigenetic mechanisms in mammals“, *Cell. Mol. Life Sci.*, Bd. 66, Nr. 4, S. 596–612, Feb. 2009, doi: 10.1007/s00018-008-8432-4.

[59] Y. Zhang, M. Zhao, A. H. Sawalha, B. Richardson, und Q. Lu, „Impaired DNA methylation and its mechanisms in CD4+T cells of systemic lupus erythematosus“, *J.*

Autoimmun., Bd. 41, S. 92–99, März 2013, doi: 10.1016/j.jaut.2013.01.005.

[60] Y. Liu *u. a.*, „Increased expression of TLR2 in CD4⁺ T cells from SLE patients enhances immune reactivity and promotes IL-17 expression through histone modifications: Clinical immunology“, *Eur. J. Immunol.*, S. n/a-n/a, Juni 2015, doi: 10.1002/eji.201445219.

[61] Y. Yang *u. a.*, „The effect of mycophenolic acid on epigenetic modifications in lupus CD4⁺T cells“, *Clin. Immunol.*, Bd. 158, Nr. 1, S. 67–76, Mai 2015, doi: 10.1016/j.clim.2015.03.005.

[62] A. P. S. Pang, C. Sugai, und A. K. Maunakea, „High-throughput sequencing offers new insights into 5-hydroxymethylcytosine“, *Biomol. Concepts*, Bd. 7, Nr. 3, S. 169–178, Juni 2016, doi: 10.1515/bmc-2016-0011.

[63] M. Zhao *u. a.*, „Increased 5-hydroxymethylcytosine in CD4⁺ T cells in systemic lupus erythematosus“, *J. Autoimmun.*, Bd. 69, S. 64–73, Mai 2016, doi: 10.1016/j.jaut.2016.03.001.

[64] Y. Luo *u. a.*, „Abnormal DNA methylation in T cells from patients with subacute cutaneous lupus erythematosus“, *Br. J. Dermatol.*, Bd. 159, Nr. 4, S. 827–833, 2008, doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08758.x.

[65] C. M. Lanata, S. A. Chung, und L. A. Criswell, „DNA methylation 101: what is important to know about DNA methylation and its role in SLE risk and disease heterogeneity“, *Lupus Sci. Med.*, Bd. 5, Nr. 1, S. e000285, Juli 2018, doi: 10.1136/lupus-2018-000285.

[66] S. Domcke, A. F. Bardet, P. Adrian Ginno, D. Hartl, L. Burger, und D. Schübeler, „Competition between DNA methylation and transcription factors determines binding of NRF1“, *Nature*, Bd. 528, Nr. 7583, S. 575–579, Dez. 2015, doi: 10.1038/nature16462.

[67] U. Lehmann, „DNA-Methylierung: Von der Grundlagenforschung zur Routinediagnostik“, *Pathol.*, Bd. 31, Nr. S2, S. 274–279, Okt. 2010, doi: 10.1007/s00292-010-1300-7.

[68] C. P. Schaaf und J. Zschocke, *Basiswissen Humangenetik*. in Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018. doi: 10.1007/978-3-662-56147-8.

[69] Y. Zhang, X. Li, A. Gibson, J. Edberg, R. P. Kimberly, und D. M. Absher, „Skewed allelic expression on X-chromosome associated with aberrant expression of XIST on systemic lupus erythematosus lymphocytes“, *Hum. Mol. Genet.*, S. ddaa131, Juli 2020, doi: 10.1093/hmg/ddaa131.

[70] K. E. Prothero, J. M. Stahl, und L. Carrel, „Dosage compensation and gene expression on the mammalian X chromosome: one plus one does not always equal two“, *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.*, Bd. 17, Nr. 5, S. 637–648, 2009, doi: 10.1007/s10577-009-9063-9.

[71] A. M. Cotton, E. M. Price, M. J. Jones, B. P. Balaton, M. S. Kobor, und C. J. Brown, „Landscape of DNA methylation on the X chromosome reflects CpG density, functional chromatin state and X-chromosome inactivation“, *Hum. Mol. Genet.*, Bd. 24, Nr. 6, S. 1528–1539, März 2015, doi: 10.1093/hmg/ddu564.

[72] G. M. Kammer, A. Perl, B. C. Richardson, und G. C. Tsokos, „Abnormal T cell signal transduction in systemic lupus erythematosus“, *Arthritis Rheum.*, Bd. 46, Nr. 5, S. 1139–1154, 2002, doi: 10.1002/art.10192.

- [73] B. C. Richardson, „Role of DNA Methylation in the Regulation of Cell Function: Autoimmunity, Aging and Cancer“, *J. Nutr.*, Bd. 132, Nr. 8, S. 2401S-2405S, Aug. 2002, doi: 10.1093/jn/132.8.2401S.
- [74] G. Gorelik, J. Y. Fang, A. Wu, A. H. Sawalha, und B. Richardson, „Impaired T Cell Protein Kinase C δ Activation Decreases ERK Pathway Signaling in Idiopathic and Hydralazine-Induced Lupus“, *J. Immunol.*, Bd. 179, Nr. 8, S. 5553–5563, Okt. 2007, doi: 10.4049/jimmunol.179.8.5553.
- [75] A. Basu und H. Tu, „Activation of ERK during DNA damage-induced apoptosis involves protein kinase C δ “, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Bd. 334, Nr. 4, S. 1068–1073, Sep. 2005, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.06.199.
- [76] D. Ray, F. M. Strickland, und B. C. Richardson, „Oxidative Stress and Dietary Micronutrient Deficiencies Contribute to Overexpression of Epigenetically Regulated Genes by Lupus T Cells“, *Clin. Immunol. Orlando Fla*, Bd. 196, S. 97–102, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.clim.2018.04.003.
- [77] L. S. Kristensen und L. L. Hansen, „PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment“, *Clin. Chem.*, Bd. 55, Nr. 8, S. 1471–1483, Aug. 2009, doi: 10.1373/clinchem.2008.121962.
- [78] Y. Li, Y. Liu, F. M. Strickland, und B. Richardson, „Age-dependent decreases in DNA methyltransferase levels and low transmethylation micronutrient levels synergize to promote overexpression of genes implicated in autoimmunity and acute coronary syndromes“, *Exp. Gerontol.*, Bd. 45, Nr. 4, S. 312–322, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.exger.2009.12.008.
- [79] S. A. Ross und L. Poirier, „Proceedings of the Trans-HHS Workshop: Diet, DNA Methylation Processes and Health“, *J. Nutr.*, Bd. 132, Nr. 8, S. 2329S-2332S, Aug. 2002, doi: 10.1093/jn/132.8.2329S.
- [80] J. T. Attwood, R. L. Yung, und B. C. Richardson, „DNA methylation and the regulation of gene transcription“, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, Bd. 59, Nr. 2, S. 241–257, Feb. 2002, doi: 10.1007/s00018-002-8420-z.
- [81] M. Ehrlich *u. a.*, „Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells.“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 10, Nr. 8, S. 2709–2721, Apr. 1982.
- [82] B. Richardson, „Epigenetically Altered T Cells Contribute to Lupus Flares“, *Cells*, Bd. 8, Nr. 2, S. 127, Feb. 2019, doi: 10.3390/cells8020127.
- [83] B. Richardson, „Primer: epigenetics of autoimmunity“, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, Bd. 3, Nr. 9, S. 521–527, Sep. 2007, doi: 10.1038/ncprheum0573.
- [84] B. C. Richardson, L. Scheinbart, J. R. Strahler, L. Gross, S. Hanash, und M. A. Johnson, „Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis“, 1990, Zugegriffen: 11. September 2015. [Online]. Verfügbar unter: <http://deepblue.lib.umich.edu/handle/2027.42/37783>
- [85] I. J. H. van Vlodrop *u. a.*, „Analysis of Promoter CpG Island Hypermethylation in Cancer: Location, Location, Location!“, *Clin. Cancer Res.*, Bd. 17, Nr. 13, S. 4225–4231, Juli 2011, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3394.
- [86] Q. Lu, „Lupus: The Immunological Impact of Altered DNA Methylation“, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, Bd. 17, Nr. 1, S. 26–28, Juli 2015, doi:

10.1038/jidsymp.2015.4.

- [87] Q. Lu *u. a.*, „Demethylation of ITGAL (CD11a) regulatory sequences in systemic lupus erythematosus“, *Arthritis Rheum.*, Bd. 46, Nr. 5, S. 1282–1291, Mai 2002, doi: 10.1002/art.10234.
- [88] Q. Lu, A. Wu, und B. C. Richardson, „Demethylation of the Same Promoter Sequence Increases CD70 Expression in Lupus T Cells and T Cells Treated with Lupus-Inducing Drugs“, *J. Immunol.*, Bd. 174, Nr. 10, S. 6212–6219, Mai 2005, doi: 10.4049/jimmunol.174.10.6212.
- [89] M. J. Kaplan, Q. Lu, A. Wu, J. Attwood, und B. Richardson, „Demethylation of Promoter Regulatory Elements Contributes to Perforin Overexpression in CD4+ Lupus T Cells“, *J. Immunol.*, Bd. 172, Nr. 6, S. 3652–3661, März 2004, doi: 10.4049/jimmunol.172.6.3652.
- [90] F. M. Strickland, Y. Li, K. Johnson, Z. Sun, und B. C. Richardson, „CD4+ T cells epigenetically modified by oxidative stress cause lupus-like autoimmunity in mice“, *J. Autoimmun.*, Bd. 62, S. 75–80, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.jaut.2015.06.004.
- [91] A. H. Sawalha *u. a.*, „Defective T-cell ERK signaling induces interferon-regulated gene expression and overexpression of methylation-sensitive genes similar to lupus patients“, *Genes Immun.*, Bd. 9, Nr. 4, S. 368–378, Juni 2008, doi: 10.1038/gene.2008.29.
- [92] J. Tost, „Current and Emerging Technologies for the Analysis of the Genome-Wide and Locus-Specific DNA Methylation Patterns“, in *DNA Methyltransferases - Role and Function*, Springer, Cham, 2022, S. 395–469. doi: 10.1007/978-3-031-11454-0_16.
- [93] Š. Šestáková, C. Šálek, und H. Remešová, „DNA Methylation Validation Methods: a Coherent Review with Practical Comparison“, *Biol. Proced. Online*, Bd. 21, Okt. 2019, doi: 10.1186/s12575-019-0107-z.
- [94] T. K. Wojdacz, A. Dobrovic, und L. L. Hansen, „Methylation-sensitive high-resolution melting“, *Nat. Protoc.*, Bd. 3, Nr. 12, S. 1903–1908, 2008, doi: 10.1038/nprot.2008.191.
- [95] M. C. de Andres *u. a.*, „Assessment of global DNA methylation in peripheral blood cell subpopulations of early rheumatoid arthritis before and after methotrexate“, *Arthritis Res. Ther.*, Bd. 17, Nr. 1, S. 233, 2015, doi: 10.1186/s13075-015-0748-5.
- [96] E. Olkhov-Mitsel und B. Bapat, „Strategies for discovery and validation of methylated and hydroxymethylated DNA biomarkers“, *Cancer Med.*, Bd. 1, Nr. 2, S. 237–260, Okt. 2012, doi: 10.1002/cam4.22.
- [97] M. Frommer *u. a.*, „A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands.“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 89, Nr. 5, S. 1827–1831, März 1992.
- [98] P. W. Laird, „The power and the promise of DNA methylation markers“, *Nat. Rev. Cancer*, Bd. 3, Nr. 4, S. 253–266, Apr. 2003, doi: 10.1038/nrc1045.
- [99] S. Kurdyukov und M. Bullock, „DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method“, *Biology*, Bd. 5, Nr. 1, Jan. 2016, doi: 10.3390/biology5010003.
- [100] T. K. Wojdacz und L. L. Hansen, „Reversal of PCR bias for improved sensitivity of the DNA methylation melting curve assay“, *BioTechniques*, Bd. 41, Nr. 3, S. 274, 276, 278, Sep. 2006.
- [101] T. K. Wojdacz und A. Dobrovic, „Methylation-sensitive high resolution melting

- (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 35, Nr. 6, S. e41, 2007, doi: 10.1093/nar/gkm013.
- [102] J. Worm, A. Aggerholm, und P. Guldberg, „In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis“, *Clin. Chem.*, Bd. 47, Nr. 7, S. 1183–1189, 2001.
- [103] I. R. Ferreira *u. a.*, „A rapid and accurate methylation-sensitive high-resolution melting analysis assay for the diagnosis of Prader Willi and Angelman patients“, *Mol. Genet. Genomic Med.*, Bd. 7, Nr. 6, S. e637, 2019, doi: 10.1002/mgg3.637.
- [104] M. Ehrich *u. a.*, „Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Bd. 102, Nr. 44, S. 15785–15790, Nov. 2005, doi: 10.1073/pnas.0507816102.
- [105] N. Hattori und T. Ushijima, „Analysis of Gene-Specific DNA Methylation“, in *Handbook of Epigenetics*, Elsevier, 2017, S. 113–123. doi: 10.1016/B978-0-12-805388-1.00008-0.
- [106] D. D. Gladman, D. Ibañez, und M. B. Urowitz, „The Journal of Rheumatology“, S. 5, 2019.
- [107] L. Eder, M. Urowitz, und D. Gladman, „Damage in lupus patients—what have we learned so far?“, *Lupus*, Bd. 22, Nr. 12, S. 1225–1231, Okt. 2013, doi: 10.1177/0961203313492872.
- [108] A. Rosenbaum, E. Bleck, M. Schneider, G. Pongratz, und S. Vordenbäumen, „Assessment of direct versus indirect magnetic bead-based T-cell isolation procedures followed by magnetic bead-based DNA isolation“, *Lupus Sci. Med.*, Bd. 3, Nr. 1, S. e000167, 2016, doi: 10.1136/lupus-2016-000167.
- [109] S. Vordenbäumen *u. a.*, „Associations of site-specific CD4⁺-T-cell hypomethylation within CD40-ligand promotor and enhancer regions with disease activity of women with systemic lupus erythematosus“, *Lupus*, Bd. 30, Nr. 1, S. 45–51, Jan. 2021, doi: 10.1177/0961203320965690.
- [110] A. Grützkau und A. Radbruch, „Small but mighty: how the MACS-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years“, *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.*, Bd. 77, Nr. 7, S. 643–647, Juli 2010, doi: 10.1002/cyto.a.20918.
- [111] S. Kint, W. De Spiegelaere, J. De Kesel, L. Vandekerckhove, und W. Van Criekinge, „Evaluation of bisulfite kits for DNA methylation profiling in terms of DNA fragmentation and DNA recovery using digital PCR“, *PLOS ONE*, Bd. 13, Nr. 6, S. e0199091, Juni 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0199091.
- [112] E. E. Holmes *u. a.*, „Performance Evaluation of Kits for Bisulfite-Conversion of DNA from Tissues, Cell Lines, FFPE Tissues, Aspirates, Lavages, Effusions, Plasma, Serum, and Urine“, *PLoS ONE*, Bd. 9, Nr. 4, S. e93933, Apr. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0093933.
- [113] B. Izzi, A. M. Binder, und K. B. Michels, „Pyrosequencing Evaluation of Widely Available Bisulfite Conversion Methods: Considerations for Application“, *Med. Epigenetics*, Bd. 2, Nr. 1, S. 28–36, Feb. 2014, doi: 10.1159/000358882.
- [114] L. Shen, Y. Guo, X. Chen, S. Ahmed, und J.-P. J. Issa, „Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis“, *BioTechniques*, Bd. 42, Nr. 1, S. 48–58, Jan. 2007, doi: 10.2144/000112312.

- [115] P. M. Warnecke, C. Stirzaker, J. R. Melki, D. S. Millar, C. L. Paul, und S. J. Clark, „Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA.“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 25, Nr. 21, S. 4422–4426, Nov. 1997.
- [116] T. K. Wojdacz, T. Borgbo, und L. L. Hansen, „Primer design versus PCR bias in methylation independent PCR amplifications“, *Epigenetics*, Bd. 4, Nr. 4, S. 231–234, Mai 2009, doi: 10.4161/epi.9020.
- [117] T. K. Wojdacz, T. H. Møller, B. B. Thestrup, L. S. Kristensen, und L. L. Hansen, „Limitations and advantages of MS-HRM and bisulfite sequencing for single locus methylation studies“, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, Bd. 10, Nr. 5, S. 575–580, Juli 2010, doi: 10.1586/erm.10.46.
- [118] T. K. Wojdacz, „Current methylation screening methods“, *Epigenomics*, Bd. 1, Nr. 2, S. 223–226, Dez. 2009, doi: 10.2217/epi.09.32.
- [119] O. Taryma-Leśniak, K. E. Sokolowska, und T. K. Wojdacz, „Current status of development of methylation biomarkers for in vitro diagnostic IVD applications“, *Clin. Epigenetics*, Bd. 12, S. 100, Juli 2020, doi: 10.1186/s13148-020-00886-6.
- [120] O. Taryma-Lesniak, T. E. Kjeldsen, L. L. Hansen, und T. K. Wojdacz, „Influence of Unequal Amplification of Methylated and Non-Methylated Template on Performance of Pyrosequencing“, *Genes*, Bd. 13, Nr. 8, Art. Nr. 8, Aug. 2022, doi: 10.3390/genes13081418.
- [121] J. Dunn *u. a.*, „Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy“, *Br. J. Cancer*, Bd. 101, Nr. 1, S. 124–131, Juli 2009, doi: 10.1038/sj.bjc.6605127.
- [122] C. Hurtado *u. a.*, „DNA methylation changes on immune cells in Systemic Lupus Erythematosus“, *Autoimmunity*, Bd. 53, Nr. 3, S. 114–121, Apr. 2020, doi: 10.1080/08916934.2020.1722108.
- [123] E. Balada, J. Ordi-Ros, und M. Vilardell-Tarrés, „DNA Methylation and Systemic Lupus Erythematosus“, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Bd. 1108, Nr. 1, S. 127–136, 2007, doi: 10.1196/annals.1422.015.
- [124] W. Lei *u. a.*, „Abnormal DNA methylation in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, and dermatomyositis“, *Scand. J. Rheumatol.*, Bd. 38, Nr. 5, S. 369–374, Jan. 2009, doi: 10.1080/03009740902758875.
- [125] W. Egner, „The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE“, *J. Clin. Pathol.*, Bd. 53, Nr. 6, S. 424–432, Juni 2000, doi: 10.1136/jcp.53.6.424.
- [126] Z. Rezaieyazdi *u. a.*, „Is there any correlation between high sensitive CRP and disease activity in systemic lupus erythematosus?“, *Lupus*, Bd. 20, Nr. 14, S. 1494–1500, Dez. 2011, doi: 10.1177/0961203311418706.
- [127] H. Enocsson *u. a.*, „The Complex Role of C-Reactive Protein in Systemic Lupus Erythematosus“, *J. Clin. Med.*, Bd. 10, Nr. 24, S. 5837, Dez. 2021, doi: 10.3390/jcm10245837.
- [128] A. I. Russell *u. a.*, „Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus“, *Hum. Mol. Genet.*, Bd. 13, Nr. 1, S. 137–147, Jan. 2004, doi: 10.1093/hmg/ddh021.
- [129] P. M. Ridker, C. H. Hennekens, J. E. Buring, und N. Rifai, „C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women“, *N.*

Engl. J. Med., Bd. 342, Nr. 12, S. 836–843, März 2000, doi: 10.1056/NEJM200003233421202.

[130] C. Weber, A. J. R. Habenicht, und P. von Hundelshausen, „Novel mechanisms and therapeutic targets in atherosclerosis: inflammation and beyond“, *Eur. Heart J.*, Bd. 44, Nr. 29, S. 2672–2681, Aug. 2023, doi: 10.1093/eurheartj/ehad304.

6 Anhang

Tabelle 30: Primer-Sequenzen für die MassARRAY-Untersuchung

| Region | UCSC annotation (GRCh38/hg19) | Left Primer | Right Primer |
|------------------------------|--|------------------------------------|-------------------------------------|
| Promotor | chrX:135729818- 135730576 | ATTTTTTAGGAAGTGTGGGTTG TAA | TTTTCATACTAATAAACAATCC AATAACC |
| | chrX:135729818- 135730576 | TATTTATAAAAAGGAAAGTTT GGAAGTGAA | CTTCTAACAAAAAATAACA AAAACAACA |
| | chrX:135729818- 135730576 | TATTTATAAAAAGGAAAGTTT GGAAGTGAA | TCAAATAACCACCTTACTCAA AATTAATT |
| | chrX:135729818- 135730576 | GTTGATGGGATATTAGTTATAA AATTAATT | CCCACACTTCCTAAAAAATATA CTTC |
| | chrX:135729818- 135730576 | TTATGTTGATGGGTAGTTTAGT GGT | AAATCTATAACATTTCAAAAACA AAAATAAA |
| | chrX:135729818- 135730576 | AGAGGTAGTATGAGAAGATTG TTAAAGTGG | TTTCCTTAAACTAATAAACCC AAAAAATT |
| | chrX:135729818- 135730576 | AGAGGTAGTATGAGAAGATTG TTAAAGTGG | TTCCTTAAACTAATAAACCCA AAAAATTA |
| Enhancer 1 | chrX:135728286- 135729309 | GGTAAGGAGGTTGGATAATAA TTGTTTTT | CCAACATCCTATCCTAAACCCA AATC |
| | chrX:135728286- 135729309 | TGGGTAGAAGTTAGATTGTAG GAGGTTG | CCAACATCCTATCCTAAACCCA AATC |
| | chrX:135728286- 135729309 | GAATTAAAGTTTTTGATTTGAT TGATTAAA | CAACTATAAAAATCCCTACCTC ACATCC |
| | chrX:135728286- 135729309 | TGGTTTAGAAATTATGATAAA ATTGTTTTG | ACAAAACCCCTACAACCTCTAA CACTCTC |
| | chrX:135728286- 135729309 | TTTAGAAATTATGATAAAATTG TTTTGATG | TAAAAACCAAACCTCTAACTT AACTAATC |
| | chrX:135728286- 135729309 | GTATTTTGTGGGTTTAGAT TTATGTAG | AACAAAAAATTAACAACAA CTATTTTT |
| | Enhancer 2 | chrX:135725995- 135727005 | GTTTGGGTGATAAAGTTAGATT TTTTTT |
| chrX:135725995- 135727005 | | TAGTTTGGTTAATTTGGTGAAA TTT | CCTAACCTCATAATCTACCAAC CTC |
| chrX:135725995- 135727005 | | TTTGTGTGTTAAGGTTAATTTT TTTT | AACCTAACCAATATAATAAAA CCCC |

| | | |
|------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| chrX:135725995- 135727005 | TTGTTTGTGGTTTGGAGATAAA GTTTTATT | TCTATAATCCCAACACTTTAAA ACACC |
| chrX:135725995- 135727005 | TTTAAGTAGTTGGGATTATAGG TTTG | CAACAAAAAAATTAATACAA AAAAAA |
| chrX:135725995- 135727005 | TGTTGGGATTATAGATGTGAAT TATAG | AACCTAACCAACTTAATAAAA CCCC |

Tabelle 31: Erste Ergebnisse der EpiTYPER-Untersuchung zur Beurteilung der HRM-Analyse

| Position | CpG16 | CpG17 | CpG18 | CpG19 | MW | SD |
|----------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| A1 | 0,42 | 0,54 | 0,54 | 0,62 | 0,53 | 0,08 |
| A2 | 0,08 | 0,08 | 0,19 | 0,23 | 0,15 | 0,08 |
| A3 | 0,20 | 0,59 | 0,46 | 0,52 | 0,44 | 0,17 |
| A4 | 0,22 | 0,47 | 0,54 | 0,66 | 0,47 | 0,19 |
| A5 | 0,12 | 0,51 | 0,50 | 0,53 | 0,42 | 0,19 |
| A6 | 0,33 | 0,48 | 0,50 | 0,38 | 0,42 | 0,08 |
| A7 | 0,47 | 0,63 | 0,60 | 0,50 | 0,55 | 0,08 |
| A8 | 0,28 | 0,53 | 0,47 | 0,67 | 0,49 | 0,16 |
| A9 | 0,27 | 0,62 | 0,49 | 0,62 | 0,50 | 0,17 |
| A10 | 0,19 | 0,46 | 0,44 | 0,71 | 0,45 | 0,21 |
| A11 | 0,04 | 0,12 | 0,06 | 0,14 | 0,09 | 0,05 |
| A12 | 0,23 | 0,52 | 0,51 | 0,67 | 0,48 | 0,18 |
| B1 | 0,20 | 0,53 | 0,54 | 0,64 | 0,48 | 0,19 |
| B2 | 0,15 | 0,47 | 0,45 | 0,59 | 0,42 | 0,19 |
| B3 | 0,15 | 0,51 | 0,48 | 0,59 | 0,43 | 0,20 |
| B4 | 0,03 | 0,03 | 0,08 | 0,08 | 0,06 | 0,03 |
| B5 | 0,15 | 0,47 | 0,47 | 0,60 | 0,42 | 0,19 |
| B6 | 0,17 | 0,49 | 0,49 | 0,61 | 0,44 | 0,19 |
| B7 | 0,22 | 0,48 | 0,43 | 0,62 | 0,44 | 0,17 |
| B8 | 0,09 | 0,49 | 0,51 | 0,66 | 0,44 | 0,25 |
| B9 | 0,15 | 0,54 | 0,45 | 0,64 | 0,44 | 0,21 |
| B10 | 0,17 | 0,63 | 0,31 | 0,65 | 0,44 | 0,24 |
| B11 | 0,21 | 0,49 | 0,49 | 0,59 | 0,44 | 0,16 |
| B12 | 0,13 | 0,50 | 0,46 | 0,59 | 0,42 | 0,20 |
| C1 | 0,19 | NA | 0,49 | 0,59 | 0,42 | 0,21 |

Methylierungswert: 0% 100% Not analyzed:

CpG = Cytosin-Guanin-Dinukleotid, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung,
NA = nicht analysiert

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Stefan Vordenbäumen bedanken, der mir dieses Thema überlassen und mich während jeder Phase der Arbeit stets gefördert hat. Seine Hilfsbereitschaft und durchgehende Unterstützung waren maßgeblich an der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schneider danke ich sehr für die stetige Begleitung und konstruktive Hilfestellung während der gesamten Promotionszeit.

Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. med. Hans Martin Bosse für die Bereitschaft zur Übernahme und Erstellung des Zweitgutachtens.

Der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Michael Rehli aus Regensburg möchte ich meinen Dank aussprechen für die gute Zusammenarbeit und Frau Dr. rer. nat. Claudia Gebhard für den konstruktiven Austausch.

Ein besonders herzlicher Dank gilt Ellen Bleck für die Einarbeitung und Unterstützung in der Laborarbeit. Die persönlichen und motivierenden Gespräche mit ihr haben die Grundlage geschaffen für die Freude an der praktischen Arbeit.

Dem Ehepaar Werner und Brigitte Hiller gilt mein Dank für das Ermöglichen der experimentellen Arbeit durch Gründung des Hiller Forschungszentrums für Rheumatologie.

Allen Patientinnen und Patienten der rheumatologischen Ambulanz möchte ich Danke sagen für die Zustimmung zur Teilnahme an dieser Studie.

Bei meinen Eltern und Geschwistern möchte ich mich hier von Herzen für die bedingungslose Liebe und uneingeschränkte Unterstützung bedanken.

Ein ganz besonderer Dank für einfach alles gilt zuletzt meinem Ehemann und meinen Kindern. Eure Liebe trägt mich.