

**Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Christoph Härtel**

**Methylierung pro- und
antiinflammatorischer T-Helfer-Zell-
spezifischer Transkriptionsfaktoren bei
ausgewählten Krankheitsbildern**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Deborah Hilligardt geb. Rück
aus Würzburg

Würzburg, April 2021



Referentin: Prof. Dr. med. Martina Prelog
Korreferent: Prof. Dr. med. Thomas Haaf
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Oktober 2021

Die Promovendin ist Ärztin

Für Noah.

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1
EPIGENETIK	1
DNA-METHYLIERUNG	2
INFLAMMATION	4
ÜBERSICHT T-ZELLEN	4
T-HELPER ZELLEN	5
T-REGULATORISCHE ZELLEN	6
ZIELGENE	9
FOXP3	9
RORC	14
GATA3	14
STAT	15
STAT3	16
STAT4	16
STAT5	17
TBX21	17
IFNG	18
IL17A	18
IL10	19
CCR6	19
CXCR3	19
ANGSTSTÖRUNG	20
KLASSIFIKATION UND KLINIK	20
EPIDEMIOLOGIE	21
ÄTIOLOGIE	22
THERAPIE	24
SKLERODERMIE	25
DEFINITION	25
EPIDEMIOLOGIE	25
KLASSIFIKATION	25
PATHOGENESE	26
KLINIK	28
DIAGNOSTIK	29
THERAPIE	30
VERLAUF UND PROGNOSE	31
PRÄEKLAMPSIE	32
DEFINITION	32
EINTEILUNG	32
EPIDEMIOLOGIE	33
PATHOPHYSIOLOGIE	33
RISIKOFAKTOREN	34
SYMPTOME	35

DIAGNOSTIK	35
THERAPIE	35
HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG	37

MATERIAL UND METHODEN **39**

MATERIAL	39
PROBANDEN, KONTROLLEN UND ETHIKVOTUM	39
Angsterkrankung	39
Sklerodermie	39
Präeklampsie	40
SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE	40
REAKTIONSKITS	42
REAGENZEN	43
SPEZIELLE GEBRAUCHS- UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	45
GERÄTE	46
SOFTWARE	48
METHODEN	48
VORBEREITUNG	48
Isolierung von Leukozyten	48
Zellzählung	49
Lagerung humaner Lymphozyten	49
Auftauen der Lymphozyten	50
Gewinnung von DNA und RNA aus plazentarem Gewebe	50
Testung der Primer der Polymerasekettenreaktion	51
Testung der Primer der Pyrosequenzierung	54
VERSUCHUNGSDURCHFÜHRUNG	55
DNA- und RNA-Isolation	55
Spektrophotometrische Konzentrations- und Reinheitsanalyse von Nukleinsäuren	55
Photometer	56
Nanodrop	56
Gelelektrophorese der RNA	57
Bisulfitkonvertierung	57
Polymerasekettenreaktion	59
Gelelektrophorese	61
Erstellung eines Agarosegels	61
Durchführung der Gelelektrophorese	62
UV-Licht	62
Pyrosequenzierung	62
Reverse Transkription	65
PCR mit cDNA	66
Gelelektrophorese mit cDNA	66
Quantitative Real Time PCR	67
Real Time PCR Protokoll	67
STATISTISCHE AUSWERTUNG	69

ERGEBNISSE **70**

TESTUNG DES VERSUCHAUFBAUS	70
ANGSTPATIENTEN	73
Demografische Daten	73
Ergebnisse der Pyrosequenzierung	74
SKLERODERMIE	80
Demografische Daten	80
Ergebnisse der Pyrosequenzierung	81
Ergebnisse der Expressionsanalyse (RT-PCR)	100
Korrelationen der Genexpression und der Methylierung bei Sklerodermie	103
PRÄEKLAMPSIE	114
Demografische Daten	114
Ergebnisse der Pyrosequenzierung	114
DISKUSSION	120
DISKUSSION DES MATERIALS UND DER METHODEN	120
DISKUSSION DER ERGEBNISSE	124
ANGSTERKRANKUNG	124
FOXP3 Methylierung bei Angsterkrankung	124
Limitationen	126
SKLERODERMIE	129
Methylierung und Genexpression von FOXP3	129
Methylierung und Genexpression von RORC	131
Methylierung von GATA3	132
Methylierung und Genexpression von TBX21	133
Methylierung und Genexpression von STAT	135
Limitationen	137
PLAZENTARE FOXP3 METHYLIERUNG IN DER SCHWANGERSCHAFT	138
Tregs in der fetomaternalen Immuntoleranz	138
Epigenetik der fetomaternalen Immuntoleranz und der Plazentaentwicklung	139
Methylierung von FOXP3 bei Abort und Interruptio im ersten Trimenon	140
FOXP3 Methylierung in Plazentagewebe im dritten Trimenon	141
Epigenetik der Präeklampsie	142
Methylierung von FOXP3 in Plazentagewebe bei Präeklampsie	143
Limitationen	144
AUSBLICK	145
ZUSAMMENFASSUNG	147
SUMMARY	149
LITERATURVERZEICHNIS	151
APPENDIX	I

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	III
DIAGRAMMVERZEICHNIS	IV
ABDRUCKGENEHMIGUNGEN VON ABBILDUNGEN	VI
DANKSAGUNG	VII
VERÖFFENTLICHUNGEN AUS DATEN DIESER ARBEIT	VIII

EINLEITUNG

EPIGENETIK

„Die Epigenetik macht uns neue Hoffnung, dass auch wir uns verwandeln können, dass wir Macht über unser Erbgut haben. Das Potenzial für ein gesundes, langes Leben und für eine einnehmende Persönlichkeit steckt höchstwahrscheinlich in den Genen der meisten Menschen. Man muss nur den Weg finden, es abzurufen.“

Peter Spork aus: Der zweite Code. Epigenetik - oder wie wir unser Erbgut steuern können (Spork, 2010 S. 67).

Das Wort Epigenetik stammt aus dem Griechischen und bedeutet übersetzt: Zusätzlich zur Genetik. Man versteht darunter die erblichen Eigenschaften einer Zelle, welche nicht auf der Nukleotidsequenz der Desoxyribonukleinsäure (DNA) beruhen (Jacobi & Partovi, 2011). Epigenetik beschäftigt sich mit der Theorie, dass der durch Umwelteinflüsse bedingte Phänotyp durch Methylierung vererbt werden kann und über viele Zellteilungen hin stabil bleibt. Somit ist eine Weitergabe an die nächste Generation möglich (Huehn, Polansky, & Hamann, 2009). Epigenetik wird aktuell als Lehre der Chromatinbiologie betitelt, die Definition des Begriffs ist aber noch nicht zum Abschluss gekommen (Dawson, 2017).

Epigenetische Modifikationen können sowohl Histone als auch die DNA und Ribonukleinsäure (RNA) selbst als Ziel haben. Abbildung 1 zeigt eine Übersicht epigenetischer Mechanismen. Die Genaktivität wird durch die Zugänglichkeit der für die Transkription benötigten Faktoren an den DNA-Regionen reguliert (Huehn et al., 2009). Histone werden durch Acetylierung und Methylierung verändert, sodass die gesamte Chromatinstruktur beeinflusst wird (Weber-Stadlbauer, 2017). Bei dichter Chromatinstruktur ist die genetische Information schlechter abrufbar. Ein weiterer Mechanismus ist das Anheften von Methylgruppen an die Base Cytosin der DNA. Dadurch wird das Ablesen genetischer Informationen verhindert. Zuletzt kann Mikro-RNA das Übersetzen abgelesener Gene in Proteine verhindern (Weber-Stadlbauer, 2017).

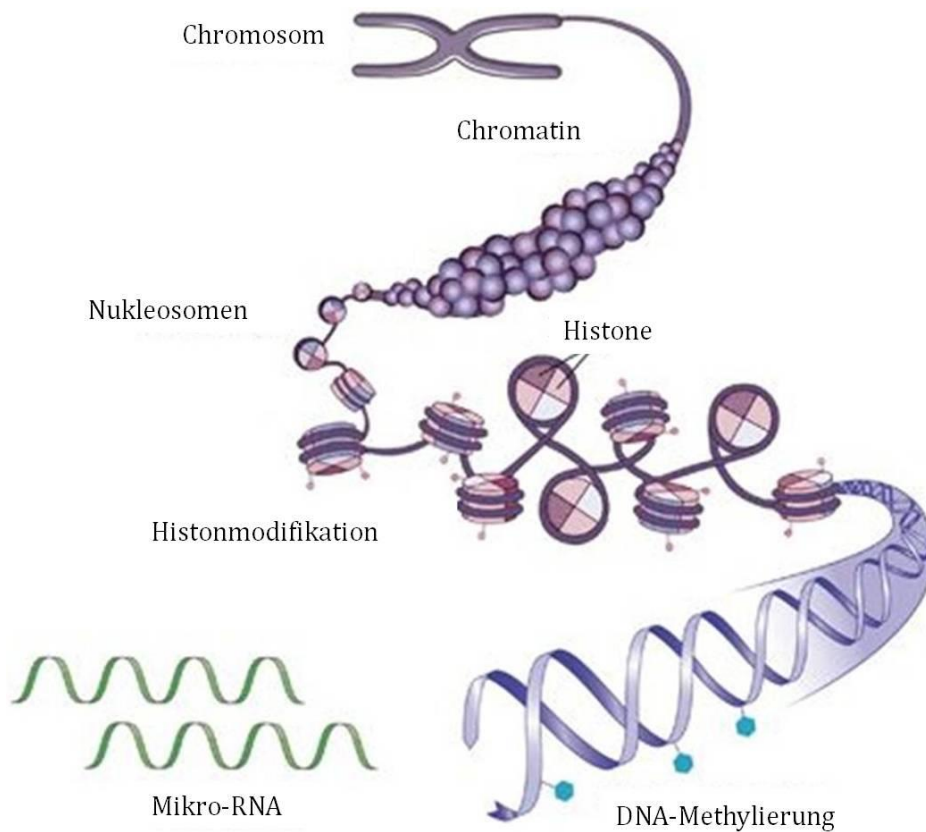


ABBILDUNG 1: ÜBERSICHT EPIGENETISCHER MECHANISMEN

DAS SCHAUBILD ZEIGT MÖGLICHE CHEMISCHE MODIFIKATIONEN WIE HISTONMODIFIKATION, DNA-METHYLIERUNG UND RNA-INTERFERENZ. ABBILDUNG ENTNOMMEN AUS (WEBER-STADLBAUER, 2017) UND MODIFIZIERT.

DNA-METHYLIERUNG

Die DNA-Methylierung ist eine biochemische Modifikation an der Base Cytosin und gilt als der am besten erforschte Bereich der Epigenetik. Sequenzen der DNA mit hoher Cytosin- und Guanindichte nennt man CpG-Inseln, welche meist am Promotor eines Gens liegen. CpG steht für 5'-Cytosin-Phosphat-Guanin-3' (Esteller, 2007). In Abbildung 2 ist die Methylierung und Demethylierung der DNA dargestellt. Methylgruppen binden durch DNA-Methyltransferasen an Cytosin, während Demethylierung durch die Methylcytosindioxygenase 1-3 mit Ten-Eleven- Translokation (TET) katalysiert wird (Q. Deng et al., 2019). Methylierte CpG-Inseln sind häufig mit chromatin-remodelling Faktoren wie z. B. Methyl-DNA-bindenden Proteinen assoziiert (Huehn et al., 2009). Daraus resultiert die Kondensation von Chromatin. Das Gegenteil geschieht bei der Demethylierung. Das

Chromatin lockert auf, sodass die Zugänglichkeit der DNA erleichtert ist und Transkriptionsfaktoren binden können (Huehn et al., 2009).

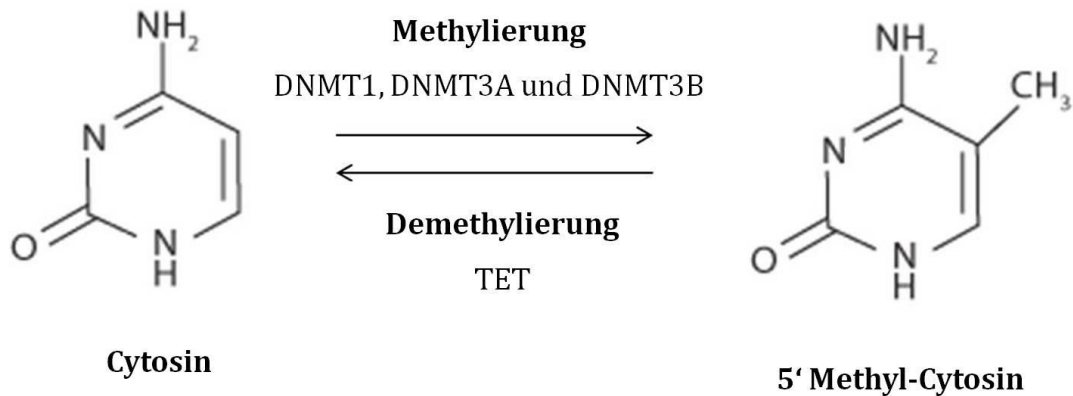


ABBILDUNG 2: DNA-METHYLIERUNG UND DEMETHYLIERUNG

ALS DNA-METHYLIERUNG BEZEICHNET MAN DIE ANHEFTUNG EINER METHYLGRUPPE (CH₃) AN DAS 5' KOHLENSTOFFATOM DES CYTOSIN. KATALYSIERT WIRD DIES DURCH DNA-METHYLTRANSFERASEN (DNMT1, DNMT3A UND DNMT3B), DIE IN ZWEI TYPEN UNTERTEILT WERDEN. DIE DE NOVO METHYLIERUNG WIRD DURCH DNMT3A UND DNMT3B KATALYSIERT, WÄHREND DIE DNMT1 FÜR DEN ERHALT DER METHYLIERUNG BEI SICH TEILENDEN ZELLEN VERANTWORTLICH IST. DAS ENZYM TET METHYLCYTOSINDIOXYGENASE SORGT IM GEGENZUG DAZU FÜR DEMETHYLIERUNG. ABBILDUNG 2 ENTNOMMEN AUS (Q. DENG ET AL., 2019) UND MODIFIZIERT.

Epigenetische Modifikationen sind für die Bildung und den Erhalt von individuellen Zelllinien von großer Wichtigkeit, da hierdurch die linienspezifische Genexpression von der Mutterzelle auf die Tochterzellen vererbt wird. Diese Stabilität ist auch in den verschiedenen Phasen der Immunabwehr wichtig, um anti- und proinflammatorische Zellen in Balance zu halten. Regulatorische T-Zellen (Tregs) sind für die Steuerung der Selbsttoleranz des Immunsystems von zentraler Bedeutung. Schon ein vorübergehender Verlust von Tregs in Mäusen bringt schädliche Folgen wie autoimmunologische Erkrankungen mit sich (Kitagawa, Ohkura, & Sakaguchi, 2014). Eine frühzeitige Immunoseneszenz und eine verminderte Funktion der Tregs werden als ätiopathologische Faktoren von inflammatorischen Erkrankungen diskutiert (Appay, Sauce, & Prelog, 2010; Mayerl & Prelog, 2012; Prelog, 2006; Prelog et al., 2008).

INFLAMMATION

Inflammation ist eine körpereigene Reaktion auf endogene oder exogene Reize, die zu Infektion und Gewebsschädigung führt. Der Körper versucht über eine Immunantwort ein schädigendes Agens beziehungsweise verletztes Gewebe zu zerstören, zu entfernen oder abzukapseln (Medzhitov, 2008). An der Regulation der Immunantwort sind unter anderem Leukozyten und Plasmaproteine beteiligt (Medzhitov, 2008). Das Immunsystem funktioniert über eine Interaktion von lymphatischen Organen, Zellen, humorale Faktoren und Zytokinen (Parkin & Cohen, 2001) und reagiert durch eine angeborene und eine adaptive Immunantwort (Escribese, Gomez-Casado, Barber, & Diaz-Perales, 2015). Zu den Zellen der angeborenen Immunantwort zählen dendritische Zellen, Neutrophile, Monozyten, Makrophagen, Eosinophile und natürliche Killerzellen (Escribese et al., 2015). Zur adaptiven Immunantwort gehören T- und B- Lymphozyten und deren spezifische Zytokine (Parkin & Cohen, 2001). Antigen-präsentierende Zellen wie z. B. dendritische Zellen sind das Verbindungsglied zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort und aktivieren naive T-Zellen im Rahmen der Antigen-spezifischen Stimulation (Gulati K, 2016).

ÜBERSICHT T-ZELLEN

Die Reifung im Thymus ist namensgebend für T-Lymphozyten, auch T-Zellen genannt. Durch verschiedene Chemokine (C-C-Motiv-Chemokinrezeptor (CCR) 7, C-C-Motiv-Chemokinligand (CCL) 19, CCL2, CCL18) wandern die im Knochenmark produzierten Vorläuferzellen schon früh in die T-Zone des Thymus ein. Die unreifen Zellen besitzen keinerlei T-Zell Rezeptoren (TCR) und sind deshalb unfähig Antikörper zu erkennen (X. Zhou, 2003). Im Thymus wird der TCR rekombiniert und exprimiert und nach einem Selektionsprozess verlassen reife T-Zellen den Thymus (Schütt & Bröker, 2011 S. 3+100). Aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle werden T-Zellen in die zwei Hauptgruppen Cluster of Differentiation (CD) 4+ T-Helferzellen und CD8+ zytotoxische T-Zellen unterteilt (X. Zhou, 2003).

T-HELFER ZELLEN

Den größten Teil der CD4+ Zellen bilden T-Helferzellen, welche für die Immunabwehr bedeutend sind. Je nach Signal können aus naiven T-Zellen Helferzellen der Subgruppe 1 (Th1), 2 (Th2), 17 (Th17), 9 (Th9), 22 (Th22) oder Tregs entstehen (Hirahara & Nakayama, 2016; J. Zhu & Paul, 2008). Im Folgenden wird aufgrund der Relevanz dieser Arbeit auf Th1, Th2, Th17 und Treg eingegangen. Abbildung 3 stellt eine Übersicht dieser T-Zellen und deren Differenzierung dar.

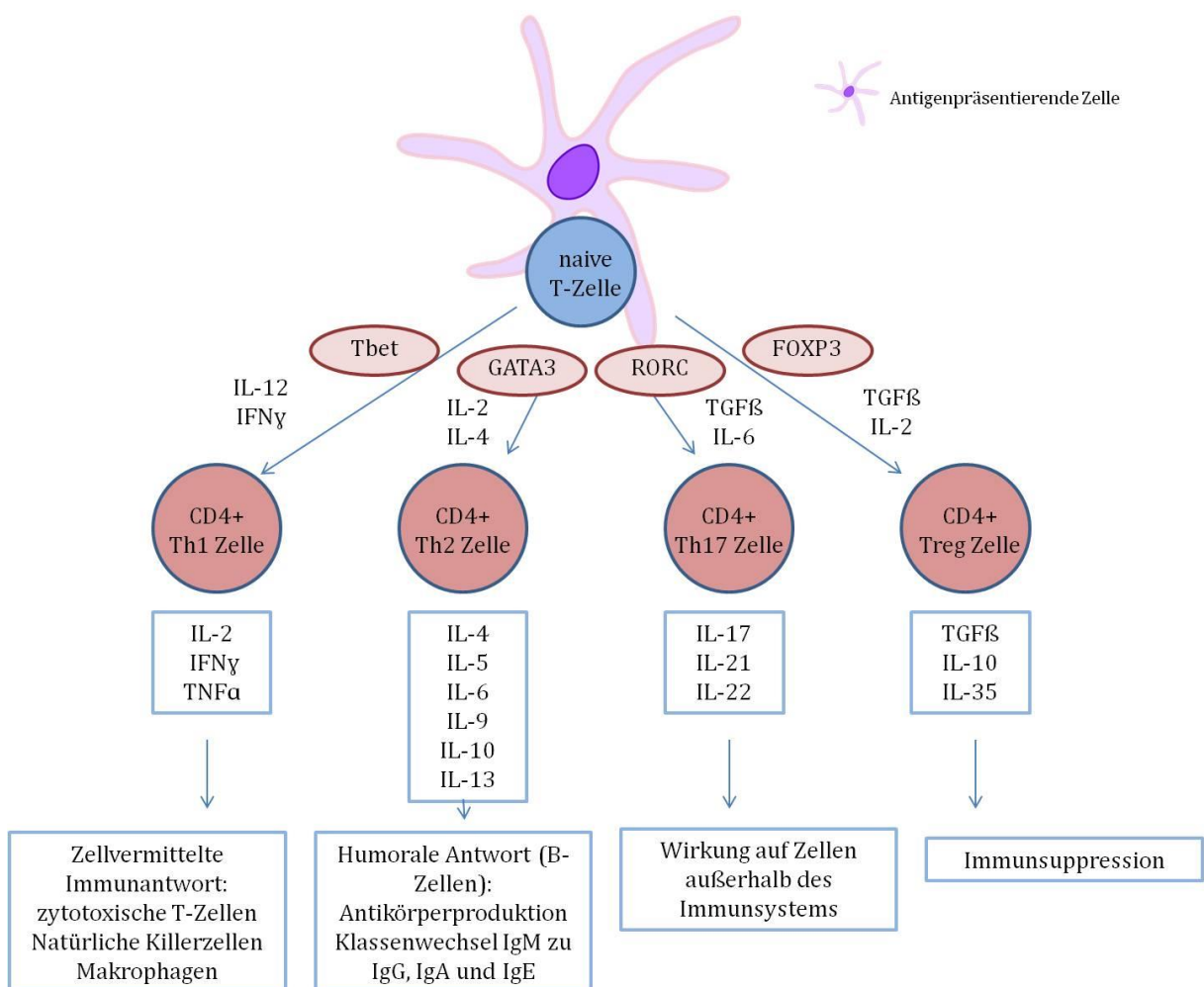


ABBILDUNG 3: ÜBERSICHT T-HELFERZELLEN

DENDRITISCHE ZELLEN PRÄSENTIEREN ANTIGENE, NAIVE T-ZELLEN WERDEN DURCH SIGNALE ZU VERSCHIEDENEN T-ZELLEN AUSGEBILDET UND PRODUZIEREN BOTENSTOFFE WIE INTERLEUKINE. SCHAUBILD ENTNOMMEN AUS (GULATI K, 2016) UND MODIFIZIERT (COTE-SIERRA ET AL., 2004; DARAEI ET AL., 2019; WEAVER, HARRINGTON, MANGAN, GAVRIELI, & MURPHY, 2006; X. ZHOU, 2003; J. ZHU, YAMANE, & PAUL, 2010).

CD4⁺ T-Helfer Zellen entwickeln sich durch Kontakt von naiven T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen wie z. B dendritischen Zellen, Makrophagen oder Monozyten (Gulati K, 2016). Am effektivsten ist die Aktivierung durch dendritische Zellen, die sowohl Haupthistokompatibilitätskomplex I (MHC-I) als auch MHC-II Moleküle an ihrer Oberfläche tragen (X. Zhou, 2003). Die Differenzierung der T-Zellen ist abhängig von den vorhandenen Interleukinen und weiteren Botenstoffen. Ist Interleukin (IL)-12 und Interferon (IFN) γ vorhanden, entwickeln sich Th1-Zellen. Chemokinrezeptoren (CXCR3, CCR5, CCR1) leiten die Zellen ins periphere Gewebe. Th1-Zellen sezernieren IFN γ , Tumornekrosefaktor (TNF) α und IL-2, was zu einer zellvermittelten Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen, natürliche Killerzellen und Makrophagen führt (X. Zhou, 2003). Der Mechanismus dient vor allem zur Abwehr von Viren und intrazellulären Bakterien und zeigt antitumorale Wirkung (Schroder, Hertzog, Ravasi, & Hume, 2004). Th2-Zellen differenzieren sich unter Anwesenheit von IL-2, IL-4 und dem Transkriptionsfaktor GATA3. Sie selbst produzieren dann IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10, was zu einer humoralen Immunantwort führt. B-Zellen schütten daraufhin Antikörper aus und es kommt zum Klassenwechsel von Immunglobulin (Ig) M zu IgG. Bekämpft werden extrazelluläre Toxine und Erreger (Cote-Sierra et al., 2004; Gulati K, 2016; Weaver et al., 2006). Im gleichen Mechanismus entstehen Th17-Zellen. Unter der Wirkung von IL-6, Transforming Growth Factor (TGF) β und dem Transkriptionsfaktor Retinoic Acid-Related Orphan Receptors C (RORC) entwickeln sich die Zellen und bilden dann selbst IL-17, IL-21 und IL-22 (Gulati K, 2016; Hirahara & Nakayama, 2016). Die Interleukine wirken auf Endothelzellen und Fibroblasten und fördern die Ausschüttung von IL-6, was neutrophile Granulozyten anzieht. Die Zielzellen liegen also außerhalb des Immunsystems. Abgewehrt werden vor allem Bakterien und Pilze (Weaver et al., 2006).

T-REGULATORISCHE ZELLEN

Gershon und Kondo stellten 1970 fest, dass T-Zellen die Immunreaktion nicht nur verstärken, sondern auch abschwächen können (Gershon & Kondo, 1970). Eine besondere Rolle innerhalb der CD4⁺ Zellen wird deshalb den Tregs zugeschrieben.

Ihre Aufgabe ist eine Balance zwischen pro- und antiinflammatorischer Immunreaktion herzustellen und eine Abschwächung der Immunantwort zu erzielen. Dadurch kann eine immunologische Toleranz gegen körpereigene Antigene aufgebaut werden (George, 2008; J. Zhu & Paul, 2008).

Die Einteilung und Bezeichnung von Tregs ist vielfältig. Povoleri et al. definierte als Nomenklatur thymus derived Tregs als tTregs, peripherally derived Tregs als pTregs und in vitro induzierte Tregs als iTregs (Povoleri et al., 2013). Diese Nomenklatur soll auch in dieser Arbeit Anwendung finden.

- **tTregs:** Die im Thymus gebildeten, natürlich auftretenden CD4⁺CD25⁺ T-Zellen sind bereits funktionsfähige Tregs, exprimieren konstitutiv den X-chromosomal kodierten Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein 3 (FOXP3) (George, 2008; Mantel et al., 2006) und weisen einen funktionell stabilen Phänotyp auf, der auch in der Peripherie erhalten bleibt (Huehn et al., 2009; Kitagawa et al., 2014).
- **pTregs:** Wie in Abbildung 3 dargestellt, werden die in der Peripherie induzierten T-Zellen durch unreife dendritische Zellen über den TCR stimuliert und differenzieren unter dem Einfluss von IL-10 und TGF β aus naiven T-Zellen (Weaver et al., 2006). pTregs exprimieren IL-10, IL-35 und TGF β (Daraei et al., 2019; G. Deng et al., 2019; Gulati K, 2016). pTregs machen 5-10 % der CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie aus (George, 2008). Ihre Depletion bewirkt einen Verlust der peripheren Selbsttoleranz (Lahl et al., 2007; Sakaguchi, Sakaguchi, Asano, Itoh, & Toda, 1995). Um die konventionellen proinflammatorischen T-Zellen zu unterdrücken, ist eine stabile Expression von FOXP3 entscheidend (Zhao, Liao, & Kang, 2017). In weiteren Studien zeigte sich, dass FOXP3 in der Entwicklung, Funktion und Homöostase von Tregs eine zentrale Rolle zukommt (Campbell & Ziegler, 2007; Y. Zheng & Rudensky, 2007).
- **iTregs:** Die in vitro Antigenstimulation von humanen CD4⁺ T-Zellen und TGF β zeigte eine Induktion der FOXP3 Expression und das Erlangen der suppressiven Funktion (Tran, Ramsey, & Shevach, 2007). Allerdings führt

eine Restimulation in Abwesenheit von TGF β zu einem Verlust der FOXP3 Expression, was auf einen instabilen Phänotyp schließen lässt (Huehn et al., 2009). Im Mausmodell wurde gezeigt, dass sich naive CD4⁺ T-Zellen unter dem Einfluss von TGF β und der Stimulation des TCR zu FOXP3 positiven iTregs umwandeln können (W. Chen et al., 2003).

Die Detektion von Tregs erfolgt meist über den Nachweis von FOXP3, sowie der alpha-Kette des IL-2 Rezeptors CD25 und CD4 (Hiraoka, Onozato, Kosuge, & Hirohashi, 2006). Da jedoch auch andere T-Zellen durch Aktivierung vorübergehend FOXP3 exprimieren können, werden weitere Marker zur Treg Identifikation benötigt (Janson et al., 2008; Minskaia et al., 2018). Aktivierte T-Effektorzellen, die den Marker CD25 aufweisen oder auch induzierte Tregs können FOXP3 negativ sein, wie z. B. CD4⁺CD69⁺CD25⁻FOXP3⁻ T-Zellen, und trotzdem einen regulatorischen Phänotyp ausbilden (Han, Guo, Zhang, Chen, & Cao, 2009).

Eine Unterscheidung zwischen pTregs und tTregs kann aufgrund der Methylierung am FOXP3 Promotor und Enhancer erfolgen (Kennedy et al., 2014; Lal & Bromberg, 2009). Ein weiterer Marker zur Unterscheidung ist die Neuropilin Expression bei tTregs, während pTregs Neuropilin negativ sind (Hirahara & Nakayama, 2016; Yadav et al., 2012). Neuropilin ist ein Molekül der Zelloberfläche, agiert als TGF β Rezeptor und verlängert die Interaktion zwischen Tregs und dendritischen Zellen (Povoleri et al., 2013). Inwiefern sich der Phänotyp und das suppressorische Verhalten von pTreg und tTreg unterscheiden ist Gegenstand intensiver Forschungen (Zhao et al., 2017).

Eine frühzeitige Immunoseneszenz und eine verminderte Funktion der Tregs werden als ätiopathologische Faktoren von inflammatorischen Erkrankungen diskutiert (Appay et al., 2010; Mayerl & Prelog, 2012; Prelog, 2006; Prelog et al., 2008). Immunoseneszenz ist durch einen Verlust der Funktion des Thymus charakterisiert, was durch eine geringere Produktion von naiven T-Zellen gekennzeichnet ist. Um dies zu kompensieren steigt die Anzahl an peripheren Lymphozyten (Mayerl & Prelog, 2012). Durch ein geschwächtes Immunsystem und eine hohe inflammatorische Bereitschaft sind ältere Menschen häufiger von

Arteriosklerose, kardiovaskulären Ereignissen, Infektionen und Krebserkrankungen betroffen (Douek et al., 1998).

ZIELGENE

Transkriptionsfaktoren sind regulatorische Proteine, die über Interaktion mit der DNA die RNA-Polymerase und den Start der Transkription beeinflussen und so aktive oder passive Repressoren sind. Passiv wirkt der Transkriptionsfaktor, indem er an andere Transkriptionsfaktoren bindet und die DNA-Bindestelle für aktivierende Faktoren blockiert. Die aktive Wirkung wird durch Rekrutierung und Bindung von Korepressoren am Genpromotor erzielt.

Die Subtypen der T-Helferzellen lassen sich anhand spezifischer Transkriptionsfaktoren unterscheiden. Sie sind wichtig zur Differenzierung und Funktionsentwicklung.

FOXP3

Der Transkriptionsfaktor FOXP3 ist ein Protein, welches als Modulator für die Entwicklung von CD4⁺/CD25⁺ Tregs fungiert und damit eine wichtige Rolle in der Suppression verschiedener Immunzellen spielt (B. Li & Greene, 2007; Mantel et al., 2006). Ein Mangel an FOXP3 beeinflusst die immunsuppressive Funktion von Tregs (Zhao et al., 2017). Doch die alleinige Expression von FOXP3 ist nicht ausreichend, um die Treg Zellfunktion und den Phänotyp aufrecht zu halten (Zhao et al., 2017). Vielmehr kann FOXP3 als großer Superkomplex angesehen werden, der noch andere Transkriptionsfaktoren wie z. B. FOXP1, FOXP4, Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3), Runt-related Transcription factor (Run) x1 und GATA3 beinhaltet (G. Deng et al., 2019; Zhao et al., 2017). Lange Zeit wurde FOXP3 als Hauptmarker für Tregs angesehen. Erst später konnte gezeigt werden, dass FOXP3 nicht zwingend mit einer immunmodulatorischen Funktion vergesellschaftet ist und auch in Zellen anderen Ursprunges vorkommt (Devaud, Darcy, & Kershaw, 2014).

Aufbau:

FOXP3 stammt aus der Familie der Forkhead-Box-Proteine und wurde als Transkriptionsfaktor der Fruchtfliege *Drosophila* entdeckt, wodurch der erste Name Forkhead entstand (Lehmann, Sowden, Carlsson, Jordan, & Bhattacharya, 2003). Forkhead Gene sind für die Kodierung von Proteinen mit Helix-Turn-Helix Motiven und für die Anordnung von Schleifen, die die β -Stränge mit den α -Helices verbinden, verantwortlich. Sie tragen zur Sekundärstruktur der Makromoleküle bei. Die daraus entstehende schmetterlingsähnliche Struktur führt zu dem weiteren Namen winged Helix Transkriptionsfaktor (Lehmann et al., 2003). Das humane FOXP3 Gen enthält 11 kodierende Exons und liegt am p Arm des X-Chromosoms Xp11.23 (Lehmann et al., 2003; J. Zheng et al., 2013). Durch epigenetische X-Inaktivierung liegt bei Männern deshalb eine Hemizygotie vor (Lehmann et al., 2003). Zu der großen FOX Familie gehört die Untergruppe P mit seinen vier Mitgliedern FOXP1 bis FOXP4. FOXP1 interagiert und reguliert die Chromatinbindung von FOXP3 und koordiniert die suppressive Funktion und die Homöostase von Tregs (G. Deng et al., 2019). Alle FOXP Transkriptionsfaktoren weisen in ihrer Struktur einen hochkonservierten C-Terminus mit tetramerisiertem Bereich, bestehend aus Zinkfingermotiv, Leucine Zipper Domäne und der Forkhead box DNA-bindenden Domäne auf. Das N-terminale Ende von FOXP3 ist im Gegensatz zu anderen FOXP Transkriptionsfaktoren prolinreich anstatt glutaminreich. Das prolinreiche N-terminale Ende interagiert mit vielen molekularen Strukturen und reguliert die Transkription (G. Deng et al., 2019).

Epigenetische Regulation:

Bislang wurden vier Bereiche beschrieben, die an der epigenetischen Regulation von FOXP3 beteiligt sind. Diese werden conserved non-coding sequences (CNS) genannt (Povoleri et al., 2013). Hierzu zählen der Promotor, auf dem ersten Intron, die CNS1 und CNS2 und auf dem zweiten Intron die CNS3 (Povoleri et al., 2013).

Der Promotor des FOXP3 Gens liegt 6,5 Kilobasen oberhalb des ersten kodierenden Exons und hat die Form einer klassischen Nukleotidabfolge TATA und CAAT. Die Promotorregion ist bei tTregs demethyliert (<1 %), bei naiven CD4+

Zellen aber mit 6,6 % teilweise methyliert (Minskaia et al., 2018; Povolero et al., 2013). Durch erhöhte Acetylierung von Histonen an der Promotorregion bei Tregs kommt es zur besseren Bindungsmöglichkeit von Transkriptionsfaktoren wie Nuclear Factor of Activating T-cells (NFAT), dem Activator Protein 1 (AP1) und STAT5, die für die Aktivierung sorgen (Minskaia et al., 2018; Povolero et al., 2013).

Die Sequenz CNS1 fungiert als Enhancer, ist TGF β sensitiv (Povolero et al., 2013) und dort liegt die Bindungsstelle für NFAT und Small Mothers Against Decapentaplegic Homologue 3 (SMAD3). Wie am Promotor sind die Histone in tTregs und iTregs in diesem Bereich acetyliert, nicht aber in naiven T-Zellen (Povolero et al., 2013). Da in der CNS1 keine CpG-Inseln liegen, findet epigenetische Modifikation nur durch Acetylierung der Histone statt (Povolero et al., 2013).

CNS2 wird auch Treg cell specific demethylated region (TSDR) genannt und ist eine hochkonservierte CpG-reiche Region bei Mäusen und Menschen, die als Enhancer fungiert (J. Chen, Liu, & Zhu, 2019; Huehn et al., 2009; Povolero et al., 2013). Eine Entfernung von Methylgruppen am TSDR ermöglicht die Bindung von Transkriptionsfaktoren wie z. B. STAT5 oder Forkhead-Boxprotein-O (Foxo) 1 und Foxo3, was eine erhöhte FOXP3 Expression zur Folge hat (Khosravi et al., 2018). Der TSDR Bereich liegt in CD4⁺ Effektor T-Zellen methyliert vor (Khosravi et al., 2018). Im Gegensatz dazu weisen tTregs eine komplett unmethylierte TSDR Region auf (Khosravi et al., 2018). Partiiell methyliert findet sich der Bereich bei iTregs und pTregs (Sherston et al., 2014), jedoch zeigen in vivo generierte Tregs nach etwa 6 Wochen ebenfalls einen demethylierten TSDR (Povolero et al., 2013). Für eine stabile FOXP3 Expression ist eine komplette Demethylierung notwendig, die bei tTregs bereits im Thymus unabhängig von FOXP3 initiiert wird (G. Deng et al., 2019; Kitagawa et al., 2014; Povolero et al., 2013). Naive T-Zellen können durch CD3/CD28, IL-2 und TGF β Stimulation am TSDR, CNS1 und CNS3 demethyliert werden und dadurch FOXP3 exprimieren (Silva Morales & Mueller, 2018). Welche Signale die Methylierung und Demethylierung in vivo genau kontrollieren ist unklar, aber die Stabilität von FOXP3 in iTregs und tTregs ist dadurch erklärbar (Povolero et al., 2013). Studienergebnisse berichten von der demethylierten TSDR als einen geeigneten prognostischen Marker, um das Risiko eines kutanen

Spinaliomas nach Nierentransplantation einzuschätzen. Es besteht ein erhöhtes Risiko an einem kutanen Plattenepithelkarzinom nach einer Transplantation zu erkranken, wenn die Anzahl an FOXP3+CD4+CD127^{low}TSDR-demethylated Tregs hoch ist (Sherston et al., 2014).

CNS3 wird als Pionierelement bezeichnet und enthält eine DNase hypersensitive Stelle, an die der Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NFkB) bindet (Povoleri et al., 2013). Das Pionierelement führt zu einer wirksamen Steigerung der Generierung von Tregs im Thymus und in der Peripherie (Y. Zheng et al., 2010). Durch bevorzugte Bindung von Transkriptionsfaktoren an CNS3 und nicht an CNS1 oder 2 öffnet sich der FOXP3 Locus und weitere Transkriptionsfaktoren können binden (Povoleri et al., 2013).

Regulation von FOXP3

FOXP3 war ursprünglich als Repressor für die Expression von Zytokinen in T-Zellen identifiziert worden. Für eine Transkription von FOXP3 benötigt es Synergieeffekte durch Signale am TCR, an CD28, am IL-2 Rezeptor und am TGFβ Rezeptor (Huehn et al., 2009). Über den TCR kommt es durch verschiedene Schritte zur Bindung des Proteins cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) - Response-Element, vom Activating Transkription Faktor, dem NFAT und dem AP1 am Promotor von FOXP3. CD28 wirkt als Kostimulator und aktiviert eine Phospholipase, die zusätzlich die Bindung von NFAT und AP1 am Promotor triggert. Die Bindung von IL-2 aktiviert die Januskinase (JAK) 3/STAT5 Kaskade und der Transkriptionsfaktor STAT5 bindet direkt an die DNA des FOXP3 Gens. Durch die Bindung von TGFβ wird SMAD aktiviert und triggert ebenfalls die Synthese von FOXP3 (Huehn et al., 2009).

Die Wichtigkeit der zytokinvermittelten Signale bei der Expression von Foxp3 zeigt der Versuch mit Mäusen mit fehlender γ-Kette des Zytokinrezeptors, wodurch die Signalkette von IL-2 und weiteren wichtigen Zytokinen durchbrochen wird. Es lassen sich keinerlei Tregs in den Mäusen nachweisen (Huehn et al., 2009). Mayack et al. und Yao et al. erforschten bei Stat5^{-/-} Mäuse eine reduzierte Expression von

Foxp3 und bei JAK3^{-/-} Mäusen sogar eine komplett ausgebliebene Foxp3 Expression (Mayack & Berg, 2006; Yao et al., 2007).

Betelli et al. zeigte, dass 50-100 % der CD25⁺ FOXP3⁺ Zellen durch TGF β Stimulation und Kostimulation FOXP3 exprimieren (Betelli et al., 2006). Es gibt eine Reihe von Faktoren, die die TGF β abhängige de novo Induktion der FOXP3 Expression begünstigen. Die Exposition von T-Zellen mit dem Metaboliten Retinsäure führt zu einer erhöhten Expression und Phosphorylierung von SMAD3. Dadurch kommt zu einem Anstieg der FOXP3 Expression was die Differenzierung von inflammatorischen Th17-Zellen verhindert (Huehn et al., 2009). Neben all den Faktoren, die die TGF β abhängige de novo induzierte FOXP3 Expression begünstigen, gibt es Mechanismen, die die Treg-Zelldifferenzierung negativ beeinflussen. Dazu gehören Faktoren der Th1- und Th2- Zellen. Speziell die direkte Bindung von IL-4 induziertem Protein GATA3, STAT6 und dem IFN γ induzierten Protein Interferon-regulatory Factor 1 am Promotor hemmen die Transkription von FOXP3 (Huehn et al., 2009). Durch die Zusammenwirkung von Histonacetyltransferase und Histondeacetylase als Korepressorkomplex unterdrückt FOXP3 die Transkription (B. Li & Greene, 2007). Die Erkenntnis der Wirkung der enzymatischen Faktoren als wichtiger Teil der FOXP3 getriggerten Herunterregulierung der Immunantwort bietet eine Basis für Therapieoptionen.

Posttranslationale Modifikation von FOXP3 Protein

Auch die posttranslationale Modifikation von FOXP3 Proteinen spielt eine Rolle in der Expression. Die Interaktion des FOXP3 Proteins mit chromatin-remodelling Enzymen wie der Histonacetyltransferase und der Histondeacetylase führt zur Acetylierung was Voraussetzung der optimalen FOXP3 Funktion ist. Dies führt aber auch zur Modifikation von Bereichen an die FOXP3 bindet und kann damit die epigenetische Regulation von FOXP3 Zielgenen ermöglichen. Somit kann FOXP3 als Aktivator und Repressor der Transkription fungieren (Huehn et al., 2009).

Erkrankungen:

Bei Foxp3 Deletion in Mäusen konnte gezeigt werden, dass es zur lymphoproliferativen Autoimmunität kommt (G. Deng et al., 2019). Auch beim Menschen hat eine fehlende FOXP3 Expression Autoimmunerkrankungen zur Folge (Silva Morales & Mueller, 2018). Mutationen im FOXP3 Gen führen zu einer polyendokrinen Autoimmunerkrankung, dem X-linked Syndrom, da die Unterdrückung der Immunreaktion durch Tregs fehlt (G. Deng et al., 2019; Workman, Szymczak-Workman, Collison, Pillai, & Vignali, 2009). Die Patienten leiden an Diabetes, Infektionen, Enteropathie, Thrombozytopenie, Anämie, Ekzemen und Kachexie (Mantel et al., 2006).

RORC

ROR steht für Retinoic Acid-Related Orphan Receptors und ist ein Protein, das zur Familie der ROR-Proteine der nuklearen Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren gehört (Zhang, Luo, Wu, & Xu, 2015). Die Unterteilung erfolgt in drei Unterformen (α , β , γ), wobei jede Form von einem eigenen Gen kodiert wird (RORA, RORB, RORC) (Zhang et al., 2015). ROR γ wird wiederum in zwei Formen unterteilt und in vielen Geweben exprimiert (Zhang et al., 2015). ROR γ _T ist streng auf den Thymus begrenzt, wo der Transkriptionsfaktor nur von unreifen Thymozyten produziert wird (Zhang et al., 2015). Die Funktion besteht in der Regulation der Apoptose der Thymozyten und in der Differenzierung zu proinflammatorischen Th17-Zellen (Zhang et al., 2015; J. Zhu et al., 2010).

GATA3

GATA Proteine sind definiert durch zwei hochkonservierte Zinkfinger, die an der DNA-Bindung involviert sind. Die Zinkfingerstruktur ermöglicht die Interaktion mit einer Nukleotidsequenz in regulatorischen Regionen zahlreicher Gene, die sich WGATAR nennt und somit auch namensgebend für die GATA-Familie ist (Miller & Weinmann, 2009). Bei Säugern sind 6 Untergruppen (GATA 1-6) in Geweben bekannt, die als Regulatoren von zellspezifischer Genexpression fungieren. Das

GATA Protein ist ein wichtiger Faktor zur Regulation der T-Zell Entwicklung (Miller & Weinmann, 2009). GATA3 wird durch das Gen GATA3 kodiert, fördert die Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-13 von Th2-Zellen und induziert die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th2-Zellen, während die Differenzierung zu Th1-Zellen unterdrückt wird (Yagi, Zhu, & Paul, 2011; J. Zhu et al., 2010).

STAT

STAT ist die Abkürzung für Signal Transducer and Activator of Transcription. Die Proteine gehören zu einer Familie zytoplasmatischer Transkriptionsfaktoren und werden von den gleichnamigen Genen kodiert. STAT-Proteine lassen sich in sieben Untergruppen (STAT1-STAT6) einteilen und haben einen ähnlichen Aufbau (Abroun et al., 2015). Der Aufbau des inaktiven Proteins ist Tabelle 1 zu entnehmen und gliedert sich in eine N-terminale Region, Coiled-coil Region, einer DNA-bindenden Domäne, einer linken Region, einer Src-homology 2 (SH2) Domäne, einer konservierten Tyrosinregion und einer C-terminalen Transaktivierungsregion (Abroun et al., 2015).

TABELLE 1: AUFBAU EINES STAT PROTEINS

N-terminale Region	Coiled-coil Region	DNA bindende Domäne	Linke Region/ EF – Hand Domäne	SH2 Domäne	Konservierte Tyrosin-region	C-terminale Transaktivierungs-region

ENTNOMMEN AUS (ABROUN ET AL., 2015) UND MODIFIZIERT.

Unstimuliert liegen STAT Proteine meist in monomerer Form im Zytosol der Zelle vor. Um aktiviert zu werden müssen Zytokine oder Wachstumsfaktoren an einen transmembranen Rezeptor binden und eine Signalkaskade aktivieren (Abroun et al., 2015). Dabei phosphorylieren JAK-Kinasen Tyrosineinheiten am Rezeptor, welche als Bindungsstellen der STAT Proteine dienen. Eine Tyrosineinheit der STAT Proteine wird ebenfalls von JAK-Kinasen phosphoryliert und somit aktiviert. Im nächsten Schritt werden die Proteine von der Bindungsstelle freigegeben. Zwei STAT Proteine bilden ein Dimer, welches in den Nukleus transloziert. Das Dimer

bindet wiederum an eine DNA-Bindungsstelle, die durch IFN γ aktiviert wird und reguliert die Transkription der Zielgene (Lin & Leonard, 2000).

STAT3

STAT3 spielt eine wichtige Rolle in der frühen embryonalen Entwicklung (Takeda et al., 1997), in der Involution der laktierenden Brustdrüse (Chapman et al., 1999), bei Hautveränderungen und Migration der Keratinozyten (Sano et al., 1999) und bei der Inaktivierung von Makrophagen und Herunterregulierung von inflammatorischen Zytokinen in der T-Zell Antwort (Takeda et al., 1999).

STAT3 wird nach Stimuli von Zytokinen wie IL-5 und IL-6 und Wachstumsfaktoren durch die Januskinase phosphoryliert und in den Zellkern transloziert. Dort dient es als Aktivator der Transkription und vermittelt die Expression vieler Gene und spielt dadurch eine Schlüsselrolle in zellulären Prozessen wie Zellwachstum und Apoptose (Abroun et al., 2015). STAT3 ist essenziell für die Differenzierung von Th17-Zellen (Abroun et al., 2015). Die Mutation im STAT3 Gen kann das Hyper-IgE Syndrom und eine Assoziation mit infantilen multisystemischen Autoimmunerkrankungen zur Folge haben (Abroun et al., 2015).

STAT4

STAT4 wirkt im adaptiven Immunsystem und befindet sich auf der DNA dem IL-12 Rezeptor nachgeschaltet. Wird in Knockoutmäusen das Stat4-Gen deaktiviert kann keine Th1-Immunantwort und auch nur eine fehlerhafte Produktion von IFN γ als Antwort von IL-12 nachgewiesen werden (Horvath, 2000). STAT4 bindet am Promotor von Genen zur Zytokinproduktion (IFN γ , TNF α), Rezeptoren und Signalfaktoren (Good et al., 2009). Das Protein ist essentiell für die Vermittlung der IL-12 Immunantworten in Lymphozyten und für die Differenzierung von T-Zellen zu proinflammatorischen Th1- und Th17-Zellen (J. Zhu et al., 2010). Eine Mutation des Gens konnte bei Familien mit dem klassischen Kaposi-Sarkom nachgewiesen werden (Aavikko et al., 2015).

STAT5

Die Gruppe 5 wird in STAT5A und STAT5B unterteilt, wobei die Aminosäuresequenzen der beiden Untergruppen in über 91 % identisch sind. STAT5 Proteine werden von zwei verschiedenen, aber eng verwandten Genen auf dem humanen Chromosom 17 und dem murinen Chromosom 11 kodiert (Lin & Leonard, 2000). Zwischen den beiden Untergruppen ist der größte Unterschied im C- und N-terminalen Ende zu sehen. Die starke Ähnlichkeit und die Tandemlokalisierung lassen auf eine Genduplikation in der Entwicklungsgeschichte schließen (Lin & Leonard, 2000). Ursprünglich wurde STAT5 als Prolactin-induced mammary gland factor beschrieben, der die Transkription des β -Casein Gens reguliert. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten zu STAT Proteinen wurde mammary gland factor zu STAT5 benannt.

Um funktionale Proteine zu erhalten ist eine Aktivierung eines transmembranen Rezeptors durch Interferone (IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15), Erythropoetin, Wachstumshormone, Thrombopoetin oder platelet-derived growth factor notwendig (Lin & Leonard, 2000). Dadurch kommt es zu einer Stimulation von Kinasen im Inneren der Zelle. Die aktivierte Kinase phosphoryliert den Tyrosinrezeptor, woran STAT5 mit seiner SH2 Domäne bindet. STAT5 wiederum wird am C-Terminus durch die Kinase phosphoryliert und dissoziiert vom Rezeptor. STAT5 formiert sich als Homo- oder Heterodimer und funktionieren als Repressor der Transkription. Im Zellkern binden die STAT5 Dimere an response Elemente und induzieren die Transkription von speziellen Genen. Eine Upregulation der Genexpression durch STAT5 wurde bei Genen von Zellwachstum, Zellteilung, Proliferation, Apoptose, Differenzierung sowie bei Inflammation festgestellt (Lin & Leonard, 2000). STAT5 ist notwendig für die T-Zell-Differenzierung in Richtung Th2- Zellen und Tregs (J. Zhu et al., 2010).

TBX21

T-box transcription factor TBX21 ist ein Protein, welches durch das gleichnamige Gen kodiert wird. Das Protein wird auch T-box expressed in T-cells (Tbet) genannt.

T-box Gene allgemein kodieren Transkriptionsfaktoren die Wachstumsprozesse regulieren. TBX21 ist ein Th1-zellspezifischer Transkriptionsfaktor, der die Expression von IFN γ kontrolliert (Lazarevic, Glimcher, & Lord, 2013).

IFNG

Das Gen IFNG (Interferon gamma) kodiert das lösliche Zytokin IFN γ , was zu den Typ II Interferonen zählt. Das Protein wird sowohl von Zellen des angeborenen als auch von Zellen des erworbenen Immunsystems sezerniert. Während man ursprünglich dachte, dass nur Th1-Zellen, zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen IFN γ produzieren, weiß man heute, dass auch B-Zellen und antigenpräsentierende Zellen IFN γ sezernieren (Castro, Cardoso, Gonçalves, Serre, & Oliveira, 2018; Schroder et al., 2004). Die aktive Form des Proteins ist ein Homodimer, welches an den IFN γ Rezeptor bindet und dort zelluläre Antworten auf virale und mikrobielle Infektionen triggert (Castro et al., 2018). Mutationen in dem Gen sind mit einer erhöhten Anfälligkeit für virale, bakterielle und parasitäre Infektionen und verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie z. B. systemischer Lupus erythematosus und multipler Sklerose assoziiert (Schroder et al., 2004). Da IFN γ eine wichtige Funktion bei der Differenzierung und Wirkweise der Th1-Zellen hat, wurde dieses Gen in der Promotionsarbeit ausgewählt.

IL17A

Durch das Gen IL17A wird das proinflammatorische Zytokin IL-17A von aktivierten T-Zellen gebildet. Zur IL-17 Zytokinfamilie zählen 6 Proteine (IL-17A bis IL-17F) (Ruiz de Morales et al., 2020). IL-17A ist Kennzeichen der Th17-Zellen, weshalb dieses Gen für die Versuche ausgewählt wurde. IL-6 und TGF β sind zusammen mit STAT3 und RORC wichtig für die Differenzierung zu Th17-Zellen, welche wiederum das proinflammatorische IL-17A sezernieren (Ruiz de Morales et al., 2020; Zhang et al., 2015). Hohe IL-17A Spiegel sind mit verschiedenen chronisch-inflammatorischen Erkrankungen wie z. B. rheumatoider Arthritis, Psoriasis und multipler Sklerose vergesellschaftet (Ruiz de Morales et al., 2020).

IL10

Das durch das Gen IL10 kodierte Protein IL-10 ist ein potentes antiinflammatorisches Zytokin, welches von fast allen Immunzellen produziert wird. IL-10 hat pleiotrope Effekte in der Immunregulation und Inflammation (Steen et al., 2020). Es reguliert die Produktion von proinflammatorischem IFN γ und TNF α von Th1-Zellen (Iyer & Cheng, 2012). Des Weiteren kann IL-10 die NF κ B-Aktivität blockieren und ist in die Regulation des JAK-STAT Signalweges involviert (Iyer & Cheng, 2012). In Knockoutmäusen konnte gezeigt werden, dass IL-10 ein wichtiger Immunregulator des Intestinaltrakt darstellt (Keubler, Buettner, Häger, & Bleich, 2015).

CCR6

Der C-C Chemokinrezeptor Typ 6 gehört zu der Beta-Chemokin-Rezeptorfamilie und ist ein Transmembranprotein, dessen Ligand des Macrophage Inflammatory Protein-3 α ist (Schutyser, Struyf, & Van Damme, 2003). Zahlreiche Zellen wie dendritische Zellen, B-Zellen, Untergruppen von CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ T-Zellen und natürliche Killerzellen exprimieren CCR6, wobei CCR6 als spezifischer Marker für Th17-Zellen und Tregs gilt und diese dadurch von anderen T-Zellen unterscheidet (Ito, Carson, Cavassani, Connett, & Kunkel, 2011).

CXCR3

Der C-X-C Chemokinrezeptor Typ 3 ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor der drei Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 (Abron et al., 2018). Durch die Liganden kommt es zur Chemotaxis von Leukozyten und Th1-Zellen, die wiederum CXCR3 produzieren und die Polarisation zu Th1-Zellen verstärken (Abron et al., 2018). CXCR3 wird auch von Tregs exprimiert und induziert die Differenzierung von peripheren CD4 $^{+}$ T-Zellen in Tregs (Abron et al., 2018). Therapeutisch ist es bisher nicht gelungen den CXCR3 Signalweg zu beeinflussen (Abron et al., 2018).

ANGSTSTÖRUNG

Das Gefühl der Angst ist jedem vertraut. Es ist eine unangenehme und negative Emotion, die evolutionsgeschichtlich als Schutz- und Überlebensmechanismus diente. Durch physiologische Reaktionen sollten Kampf und Flucht gelingen. Ist dieses Angstgefühl verstärkt oder in unangemessenen und ungefährlichen Situationen ausgeprägt, wird dies zur Angststörung und Bedarf einer Therapie, wenn dadurch kein normales Leben geführt werden kann (Strohle, Gensichen, & Domschke, 2018).

KLASSIFIKATION UND KLINIK

Die Klassifikation der Angststörungen erfolgt international nach ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) und im amerikanischen Raum nach Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases (DSM) V (Craske et al., 2017). Da in dieser Arbeit die Patientinnen nach DSM IV klassifiziert und eingeschlossen wurden, ist in Tabelle 2 diese Klassifikation erläutert.

Tabelle 2: Klassifikation, Definition und Klinik von Angststörung nach DSM IV

Angststörung	Beschreibung	Klinik
Panikstörung ohne Agoraphobie (300.01)	Wiederholt unerwartete Panikattacken. Nicht auf Wirkung einer Substanz oder Krankheit zurückzuführen. Andere psychische Störungen erklären nicht die Symptome.	Panikattacken mit Sorge vor weiteren Attacken oder Konsequenzen, Verhaltensänderungen.
Panikstörung mit Agoraphobie (300.21)		Zusätzliche Angst die durch bestimmte Orte oder Situationen ausgelöst wird.
Soziale Phobie (300.23)	Angst vor sozialen oder Leistungssituationen. Angst vor demütigendem oder peinlichem Verhalten. Betroffene erkennen, dass die Angst übertrieben und unbegründet ist. Die Symptome können nicht auf eine Substanz, Erkrankung oder andere psychische Störungen zurückgeführt werden.	Angstreaktion bis hin zur Panikattacke. Vermeidungsverhalten gegenüber der Situation. Beeinträchtigungen im Alltag.

Spezifische Phobien (300.29)	Anhaltende, übertriebene oder unbegründete Angst, die durch Objekte oder Situationen ausgelöst wird. Bei unter 18 Jährigen über mindestens 6 Monate. Beispiele: Höhe, Tier, Umwelt, Spritzen, Blut. Betroffene erkennen, dass die Angst übertrieben und unbegründet ist. Die Symptome können nicht auf eine Substanz, Erkrankung oder andere psychische Störungen zurückgeführt werden.	Angstreaktion durch Konfrontation bis hin zur Panikattacke. Vermeidungsverhalten gegenüber Objekt oder Situation. Einschränkungen im Alltag.
Generalisierte Angststörung (300.02)	Übermäßige Sorgen und Angst im Bezug auf Ereignisse oder Tätigkeiten über mind. 6 Monate an der Mehrheit der Tage. Angst und Sorgen beziehen sich nicht nur auf die Symptome einer anderen Achse-I-Störung. Die Symptome können nicht auf eine Substanz, Erkrankung oder andere psychische Störungen zurückgeführt werden.	Kontrolle der Sorgen nur schwer möglich. Mind. 3 der Symptome begleiten die Angst: Ruhelosigkeit, leichte Ermüdbarkeit, Konzentrationsschwierigkeit, Reizbarkeit, Muskelspannung, Schlafstörungen. Folgen sind Leiden und Einschränkungen in wichtigen Funktionsbereichen.
Angststörung nicht näher bezeichnet (300.00)	Ohne nähere Angaben.	

TABELLE ENTNOMMEN AUS (Hautzinger & Thies, 2009) UND MODIFIZIERT.

EPIDEMIOLOGIE

Angststörungen waren 2010 die häufigsten psychischen Gesundheitsstörungen in Europa, was neben individuellem Verlust der Lebensqualität auch hohe sozioökonomische Kosten mit sich bringt (Strohle et al., 2018; Wittchen et al., 2011). Laut Wittchen et al. betrug die 12-Monatsprävalenz in Europa im Jahr 2010 14 % (Wittchen et al., 2011). Frauen sind zwei bis drei Mal häufiger betroffen als Männer (Strohle et al., 2018).

Die Lebenszeitprävalenz beträgt weltweit derzeit 7,3 %, ist aber von Land zu Land sehr unterschiedlich. Diese Variationen werden durch:

- unterschiedliches kulturelles Verhalten gegenüber psychischen Erkrankungen (z. B. Zurückhaltung im Ausdruck der Symptome, um Verlegenheit zu vermeiden)
- unterschiedlicher und unscharfer Wahrnehmung zwischen physiologischer Stressreaktion und pathologischer Angststörung
- unterschiedliche Auslegung und Formulierung der Fragebogen zur Diagnosestellung
- unterschiedlicher Erfahrung zur Erhebung von Studien (Auswahl der Patienten, Präzision der Durchführung, Qualitätskontrolle)
- tatsächlich Unterschiede in der Prävalenz der psychischen Erkrankungen weltweit

erreicht (Stein, Scott, de Jonge, & Kessler, 2017).

ÄTIOLOGIE

Die Pathogenese wird durch ein Zusammenwirken zahlreicher Faktoren vermutet. Biologische, soziale und psychologische Einflüsse spielen eine Rolle.

Während die genetische Komponente bereits durch zahlreiche Studien belegt wird (Reischl H.-P., 2012; Strohle et al., 2018), ist die Epigenetik Gegenstand der aktuellen Forschung (Domschke et al., 2012; E. J. Kim & Kim, 2018). Ein Augenmerk liegt bei Genen, die mit dem Neurotransmittersystem oder der Stressverarbeitung assoziiert sind (Shimada-Sugimoto, Otowa, & Hettema, 2015). Ein Schlüsselgen bei Angsterkrankung ist Monoaminoxidase A (MAOA) (C. Ziegler et al., 2016).

Domschke et al. zeigte 2012, dass bei Patientinnen mit Panikstörung eine Hypomethylierung des MAOA Gens erkennbar ist und es dadurch zur vermehrten Expression von MAOA kommt, was zu einer erniedrigten Verfügbarkeit von Epinephrin, Norepinephrin und Serotonin am synaptischen Spalt führt. Die Hypomethylierung konnte nur bei weiblichen Patientinnen nachgewiesen werden, was für die Prävalenz bei Frauen spricht (Domschke et al., 2012). In der oben genannten Studie konnten ebenfalls Zusammenhänge von positiven und negativen

Lebensereignissen der vergangenen sechs Monate und dem Methylierungsgrad gezeigt werden. Negative Ereignisse führten zu einer Hypomethylierung am MAOA Gen (Domschke et al., 2012). Veränderungen der Methylierungsmuster durch kognitive Verhaltenstherapie wurde durch Ziegler et al. publiziert. Patientinnen, die auf die kognitive Verhaltenstherapie ansprachen, zeigten erhöhte Methylierungsprofile am MAOA Gen, nahe dem Level der gesunden Kontrollen. Non-Responder zeigten weiterhin eine niedrige Methylierung (C. Ziegler et al., 2016). Als weiteres Gen wurde die Glutamat-Decarboxylase 1 untersucht. Auch hier zeigte sich eine Hypomethylierung bei Patienten mit Angsterkrankung. Letztendlich kann kein epigenetisches Muster die Pathogenese der Panikstörung erklären (E. J. Kim & Kim, 2018).

Eine Angsterkrankung bedeutet für den Körper Stress und somit kommt es zu einer Stressreaktion. Unter Allostase versteht man die normale und gesunde biologische Stressreaktion des Körpers. Fällt diese Reaktion übermäßig aus, können gesundheitsschädliche Folgen entstehen, dies wird allostatischer Load genannt (McEwen & Lasley, 2002 S.56). Chronischer Stress kann Krankheiten hervorrufen, das Herz-Kreislauf-System belasten, das Immunsystem unterdrücken und Prozesse triggern, die zu Diabetes und anderen chronischen Erkrankungen führen (McEwen & Lasley, 2002 S.56).

Albert et al. zeigte 2005, dass Patientinnen mit Angststörung ein erhöhtes Risiko haben an einer kardiovaskulären Erkrankung zu leiden oder an einem Herzinfarkt zu sterben (Albert, Chae, Rexrode, Manson, & Kawachi, 2005). Die erhöhte Morbidität und Mortalität werden mit oxidativem Stress und inflammatorischen Prozessen in Verbindung gebracht. Angstzustände sind mit einer Erhöhung des C-reaktiven Proteins, des IL-6, des TNF α und Fibrinogen assoziiert und zeigen erhöhte periphere proinflammatorische Zytokin- und Chemokinlevel (Hoge et al., 2009; Pitsavos et al., 2006). Patienten, die an einer Angststörung leiden, präsentieren sich ebenfalls häufig mit immunologischen Unverträglichkeiten. Eine weitere Ursache für diese erhöhte Morbidität und Mortalität könnte eine epigenetische Beeinflussung des Thymus und der immunsuppressiven Funktion der Tregs sein (Prelog et al., 2016).

THERAPIE

Laut S3-Leitlinie werden Angsterkrankungen psychotherapeutisch und medikamentös behandelt. Medikamentöse Therapien der Wahl sind Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, Serotonin- und Noradrenalin- Wiederaufnahmehemmer und Calciumkanal-Modulatoren (AWMF, 2014). Die Therapieversagerquote liegt bei ca. 30 %, 20 % brechen die Therapie vorzeitig ab (Taylor, Abramowitz, & McKay, 2012). Die kognitive Verhaltenstherapie ist die Psychotherapie der ersten Wahl (Strohle et al., 2018).

SKLERODERMIE

DEFINITION

Sklerodermie ist eine Autoimmunerkrankung, die zu den Kollagenosen gezählt wird. Der Begriff umfasst eine heterogene Gruppe chronisch-entzündlicher Erkrankungen des kollagenen Bindegewebes, die mit dem klinischen Merkmal der Hautsklerose einhergehen und mit oder ohne Beteiligung innerer Organe ablaufen kann. Die Einteilung erfolgt in zwei Untergruppen: die zirkumskripte Sklerodermie und die systemische Sklerodermie. Der Unterschied liegt darin, dass bei der zirkumskripten Sklerodermie lediglich die Haut betroffen ist, während bei der systemischen Sklerodermie auch innere Organe wie der Gastrointestinaltrakt, der Respirationstrakt, das Herz und die Niere befallen sind. Anfangs zeigt sich eine ödematöse Schwellung im Bereich der Akren, die dann durch Kollagenüberschuss und obliterierender Angiopathie zu einer diffusen Fibrose der Haut und inneren Organen führt (Classen, Diehl, & Kochsiek, 2009 S.816; Fritsch, 2004).

Da in dieser Arbeit ausschließlich mit Proben systemischer Sklerodermie gearbeitet wurde, wird im Folgenden nur auf diese Form eingegangen.

EPIDEMIOLOGIE

Die Inzidenz der Erkrankung liegt in Europa bei 0,6 - 2,3 / 100.000 Einwohnern und ist über die Jahre leicht, aber konstant angestiegen, wobei die Prävalenz 7,2 – 33,9 / 100.000 Einwohnern ist (Bergamasco, Hartmann, Wallace, & Verpillat, 2019). Betroffen sind vor allem Frauen (3,8-11,5:1) bei einem durchschnittlichen Alter von 33,5-59,8 Jahren bei Erstdiagnose (Bergamasco et al., 2019).

KLASSIFIKATION

Die Klassifikation der systemischen Sklerodermie erfolgt seit 2013 nach den Kriterien des American College of Rheumatology und der European League Against Rheumatism (van den Hoogen et al., 2013). Zu den Kriterien gehören die

Hautverdickung an den Fingern beider Hände bis proximal der Metakarpophalangealgelenke (9 Punkte), Hautverdickungen der Finger in Form von geschwollenen Fingern (2 Punkte) oder Sklerodaktylie (4 Punkte), eine Läsion der Fingerkuppe mit Ulcera (2 Punkte) oder vernarbenden Grübchen (3 Punkte), Teleangiektasien (2 Punkte), auffällige Nagelfalzkapillaren (2 Punkte), pulmonal arterielle Hypertonie und / oder eine interstitielle Lungenerkrankung (2 Punkte), das Raynaud Phänomen (3 Punkte) und Autoantikörper wie Antizentromer Antikörper, Anti-Topoisomerase I Antikörper oder Anti-RNA Polymerase III Antikörper (3 Punkte) (van den Hoogen et al., 2013). Eine maximale Punktezahl von 19 kann erreicht werden, die Diagnose einer Sklerodermie ist bei ≥ 9 Punkten erreicht (van den Hoogen et al., 2013).

PATHOGENESE

Genetische Faktoren beeinflussen die Prädisposition und die Schwere der Sklerodermie. Als höchster Risikofaktor zählt die positive Familienanamnese, wobei das Risiko bei monozygoten Zwillingen bei nur 4,7 % und bei Dizygoten bei 5,2 % liegt (Altorok, Almeshal, Wang, & Kahaleh, 2015). Prädisponierende Gene sind Humanes Leukozytenantigen (HLA) und non-HLA Gene, die mit Immunität und Entzündung in Verbindung gebracht werden (Altorok, Almeshal, et al., 2015). Umweltfaktoren, wie die Exposition von Quarz, Lösungsmittel, Epoxidharze oder Brustimplantate triggern die Entwicklung von Sklerodermie in genetisch prädisponierten Individuen (Asano, 2018).

Als erster Schritt der Krankheitsentstehung wird eine überschießende Aktivierung des Immunsystems nach Exposition von Umwelteinflüssen gesehen, die zu einer Schädigung der kleinen Gefäße führt. Eine Reparatur durch Neovaskularisation (Gefäßformation durch Migration präexistenter Endothelzellen) und Gefäßremodelling (de-novo Gefäßformation aus Stammzellen des Knochenmarks) folgt (Asano, 2018). Strukturschäden werden durch eine Dysregulation von pro- und antiangiogenetischen Faktoren hervorgerufen (Asano, 2018). Gleichzeitig führen aktivierte Endothelzellen durch Überexpression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und Zytokinen zu Entzündung und Fibrose. Die Interaktion zwischen

zirkulierenden Immunzellen und Endothelzellen verstärkt die Extravasation, aktiviert weitere Entzündungszellen und fördert Gewebsinfiltration in betroffene Organe (Asano, 2018). Durch Endothelzellen wird die Gerinnung aktiviert und es kommt zu transvasaler Fibrinablagerung mit der Folge von Lumeneinengung und Gefäßobstruktion (Asano, 2018). Eine erhöhte Produktion von Vasokonstriktoren wie Endothelin oder eine verminderte Synthese von Vasodilatoren wie Prostazyklin und Stickstoffmonoxid erklären die Hyperkoagulation, die zu Thrombosen, zur veränderten Blutzirkulation und zur Aktivierung von Fibroblasten führt (Asano, 2018).

In der frühen Entzündungsphase können Th1-Zellen und erhöhte IL-6 und IL-10 und erniedrigte IL-12 Konzentrationen im Gewebe gefunden werden, während im Verlauf der Erkrankung ein Wechsel zu Th2-Zellen mit normale IL-6 und IL-10, erniedrigte IL-4 und erhöhte IL-12 Konzentrationen stattfindet (Baraut, Michel, Verrecchia, & Farge, 2010; Radstake, van Bon, Broen, Hussiani, et al., 2009; Romanowska-Próchnicka, Walczyk, & Olesińska, 2016). Die Rolle der Th17-Zellen in der Pathogenese der Sklerodermie wird kontrovers diskutiert. Einerseits führen Th17-Zellen zur Manifestation der Erkrankung (Rodriguez-Reyna et al., 2012), während in anderen Studien kein IL-17, sondern IL-22 von Th22-Zellen nachgewiesen wurde (Mathian et al., 2012). Vermutet wird ein Ungleichgewicht zwischen Tregs und proinflammatorischen Th17-Zellen (Romanowska-Próchnicka et al., 2016). Antiga et al. fand im Vergleich zu gesunden Kontrollen ein geringeres Level an Tregs und IL-10 in der Haut der Sklerodermiepatienten (Antiga et al., 2010; Veldman, Nagel, & Hertl, 2006). Andere Studien zeigten normale oder erhöhte Level an Tregs (Giovannetti et al., 2010; Klein et al., 2011; Radstake, van Bon, Broen, Wenink, et al., 2009).

Auch epigenetische Regulationen von Transkriptionsfaktoren haben einen Einfluss auf die Pathogenese der Sklerodermie (Altorok, Almeshal, et al., 2015; Jiang et al., 2012; Lei et al., 2009; Ramahi, Altorok, & Kahaleh, 2020; Y. Y. Wang et al., 2014). Einige Beispiele der DNA-Methylierung von Fibroblasten, Lymphozyten und Endothelzellen bei Sklerodermie werden hier aufgeführt. Ein negativer Regulator der Kollagentranskription ist der Transkriptionsfaktor Friend Leukemia

Integration 1, der in den Fibroblasten der Haut von Sklerodermiepatienten durch Hypermethylierung am Promotor herunterreguliert ist und somit für vermehrte Expression von Kollagen sorgt (Ramahi et al., 2020). Außerdem zeigen sich zwei Gene für die Kollagenproduktion (COL23A1 und COL4A2) in Fibroblasten hypomethyliert und werden überexprimiert, woraus ebenfalls eine vermehrte Kollagenbildung resultiert (Ramahi et al., 2020). In Endothelzellen kommt es zur vermehrten Promotormethylierung am Gen der Stickstoffmonoxid-Synthase, woraus eine geringere Konzentration des vasodilatierenden Stickstoffmonoxid entsteht und zu Vasospasmen führt (Ramahi et al., 2020). Die erniedrigte Konzentration von Tregs bei Sklerodermie steht in Verbindung mit einer FOXP3 Promotor Hypermethylierung (Ramahi et al., 2020). In B-Zellen konnten verschiedene Hypo- und Hypermethylierungen von CD nachgewiesen werden, die zu einer erhöhten B-Zell Aktivität führen (Ramahi et al., 2020). Auch epigenetische Veränderungen in Form von Histonmodifikation und Veränderungen der mRNA sind bei Sklerodermie bekannt (Ramahi et al., 2020).

KLINIK

Über 90 % aller PatientInnen zeigen ein Raynaud Phänomen, das durch Kälteexposition oder emotionalen Stress ausgelöst wird. Oft sind auch geschwollenen Finger (puffy fingers) zu sehen. Sklerotische Veränderungen wie Kontrakturen, Sklerodaktylie, periorale Fältelung, Mikrostomie und maskenähnliche Gesichtsteifheit folgen im Verlauf (Knobler et al., 2017). Begleitend können Haarausfall, Hitzewallungen, Hyperpigmentierung und Juckreiz auftreten. 35 % aller SklerodermiepatientInnen weisen digitale Ulzerationen auf. An den Fingerkuppen sind diese durch Ischämie bedingt, während Ulzerationen proximal und distal der Interphalangealgelenke durch erniedrigte Perfusion, fibrotische Hautveränderungen und Traumata hervorgerufen werden. Charakteristisch ist eine paraartikuläre Calcinosis cutis im Bereich der Fingergelenke, die oberflächliche Erosionen und Schmerzen verursacht (Knobler et al., 2017). Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium kommt es zur Organbeteiligung, während sich die Hautfibrose verringert (Knobler et al., 2017).

Viele PatientInnen klagen über muskuloskelettale Schmerzen, Muskelschwäche und Arthralgien, die sich zur Fibromyalgie weiterentwickeln können. Bis zu 10 % der Betroffenen entfalten eine inflammatorische Arthritis (Knobler et al., 2017).

Pulmonale Manifestationen wie die interstitielle Lungenerkrankung betreffen bis zu 65 % der an Sklerodermie erkrankten Personen, meist einhergehend mit einer unspezifischen interstitiellen Pneumonie (Knobler et al., 2017). Eine pulmonal arterielle Hypertonie tritt bei ca. 15 % bei langer Krankheitsdauer und nachweisbaren Anti-Zentromer Antikörpern auf (Knobler et al., 2017).

Auch der Gastrointestinaltrakt, insbesondere der Ösophagus und der Magen sind häufig in Form von Sklerose des Zungenbändchens, Ösophagushypomotilität oder einem adynamischen Ileus betroffen (Knobler et al., 2017).

Ein weiteres Symptom ist die kardiovaskuläre Manifestation in Form einer Myokardfibrose, einer Myo- oder Perikarditis, verursacht durch Lungenfibrose und der Fibrose der kleinen Pulmonalarterien. (Knobler et al., 2017).

Durch die langsame progressive obliterative Vaskulopathie kommt es auch zur chronischen Niereninsuffizienz, die in einem potentiell tödlich verlaufenden Nierenversagen enden kann (Knobler et al., 2017).

DIAGNOSTIK

Unerlässlich ist eine ausführliche Anamnese und klinische Untersuchung mit Bestimmung der Hautdicke an unterschiedlichen Körperstellen nach dem Rodnan Hautscore. Die Haut wird an 17 definierten Stellen von normaler Dicke über schwache, mäßige und schwerwiegende Hautverdickung beurteilt. Ein weiteres Diagnosemerkmal ist der typische kapillarmikroskopische Befund mit Makrokapillaren und avaskulärer Felderung, wodurch ein primäres Raynaud Phänomen von Sklerodermie unterschieden werden kann (Knobler et al., 2017).

In einer Blutuntersuchung wird neben den üblichen Laborparametern auch eine Antikörperdiagnostik durchgeführt. Es zeigen sich schon früh Autoantikörper gegen nukleare Zellbestandteile (ANA) (Knobler et al., 2017). ANA sind wenig spezifisch und können bei 95 % der Erkrankten nachgewiesen werden. Des Weiteren finden sich sklerodermiespezifische Autoantikörper wie Anti-Zentromer-

Antikörper, Anti-Topoisomerase-1 Antikörper, Anti-RNA-Polymerase III-Antikörper, Anti-Exosom-Antikörper, Anti-U1-small nuclear Ribonucleoprotein-Antikörper (Knobler et al., 2017).

Zur Beurteilung des oberen Gastrointestinaltraktes wird eine Endoskopie empfohlen (Knobler et al., 2017). Die Lungenbeteiligung wird durch eine hochauflösende Computertomographie und eine Bodyplethysmographie beurteilt (Knobler et al., 2017). Eine Herzschallographie und eine Elektrokardiographie eignen sich zur Kontrolle der Herzfunktion (Knobler et al., 2017). Durch regelmäßige Blutdruckmessung und Bestimmung der Nierenparameter im Blut und Urin kann eine Nierenbeteiligung detektiert werden (Knobler et al., 2017). Im Falle einer Myositis sollte ein MRT und eine Biopsie durchgeführt werden (Knobler et al., 2017).

Wichtig ist eine lebenslange jährliche Kontrolle bei chronischer Erkrankung. Bei aktivem Krankheitsgeschehen ist eine engmaschigere Überwachung notwendig (Knobler et al., 2017).

THERAPIE

Die Kenntnis über Krankheitsaktivität und Organbeteiligung ist für eine optimale Therapie wichtig. Vor der medikamentösen Therapie steht die Schulung des Patienten. Schutz vor Kälte, konsequente Krankengymnastik und Lymphdrainage, Verzicht auf Rauchen und das Absetzen einer bestehenden Therapie mit Betablockern werden empfohlen. Paraffinbäder sollen bei Hautverdickungen Besserung bringen (Knobler et al., 2017). Neben den Veränderungen des Lebensstils ist eine medikamentöse Therapie indiziert. In erster Linie werden bei Raynaud Phänomen Calciumantagonisten wie Nifedipin oder Amlodipin eingesetzt (Kowal-Bielecka et al., 2017). Aktuelle Studien zeigen, dass auch Phosphodiesterase-5 Inhibitoren wie Sildenafil zur Reduktion der Symptomatik führt (Knobler et al., 2017; Kowal-Bielecka et al., 2017). Bei schwerem Verlauf oder Versagen der oralen Therapie führt die intravenöse Gabe des vasodilatierenden Iloprost über 5 bis 14 Tage in monatlichen Intervallen zur Besserung der Symptomatik (Knobler et al., 2017). Bei digitalen Ulzerationen wird ein

Phosphodiesterase-5 Inhibitor und Iloprost eingesetzt. Bei infizierten Ulcera ist neben Wundpflege auch eine antibiotische Therapie empfohlen, um eine Osteomyelitis oder Amputation vorzubeugen (Knobler et al., 2017). Zur Prävention von digitalen Ulzerationen kann Bosentan, ein nichtselektiver Endothelin-Rezeptor-Antagonist eingesetzt werden (Knobler et al., 2017).

Die Behandlung der Fibrose sollte vom Stadium und der Aktivität abhängig sein. In der Frühphase kann Psoralen und Ultraviolett (UV)-A-Phototherapie in Erwägung gezogen werden (Knobler et al., 2017). Als systemische Therapie der progressiven Hautfibrose steht Methotrexat in einer Dosierung von 10 - 15 mg pro Woche für sechs bis zwölf Monate zur Verfügung. Mycophenolatmofetil mit 1 - 2 g pro Tag wird als Zweitlinientherapie empfohlen (Knobler et al., 2017).

Zur Behandlung der Calcinosis cutis kommen die chirurgische Entfernung oder der Einsatz eines Kohlenstoffdioxidlasers in Frage (Knobler et al., 2017).

Patienten mit interstitieller Lungenerkrankung sollten eine frühe Behandlung mit Cyclophosphamid erhalten, um reversible Schädigungen zu therapieren (Kowal-Bielecka et al., 2017). Eine Fortsetzung der Immunsuppression mit Azathioprin oder Mycophenolatmofetil im Anschluss wird empfohlen. (Kowal-Bielecka et al., 2017). Zur Behandlung der pulmonal arteriellen Hypertonie stehen Endothelin-Rezeptor-Antagonisten oder Phosphodiesterase-5-Hemmer zur Verfügung (Kowal-Bielecka et al., 2017). Bei schwerer Form kommt die Gabe von Epoprostenol i.v. in Betracht (Kowal-Bielecka et al., 2017). Bei Reflux sollte zur Prävention von Ösophagusulzerationen ein Protonenpumpeninhibitor eingenommen werden. Prokinetische Dopaminagonisten können bei Dysphagie und Reflux eingesetzt werden (Kowal-Bielecka et al., 2017). Bei Nierenversagen sollte sofort die Therapie mit Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmern begonnen werden (Knobler et al., 2017).

VERLAUF UND PROGNOSE

Verlauf und Prognose der Sklerodermie sind sehr variabel und hauptsächlich von der Beteiligung innerer Organe abhängig. Die 10-Jahres-Überlebensrate in Europa beträgt 65 - 73 % (Bergamasco et al., 2019).

PRÄEKLAMPSIE

DEFINITION

Die Präeklampsie gehört zu den hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen und wird durch Bluthochdruck von $\geq 140/90$ mmHg mit einer neu aufgetretenen Organmanifestation ohne anderweitige Ursache definiert (DGGG, 2019). Typischerweise ist die Niere mit einer Proteinurie von ≥ 300 mg / 24 h betroffen. Nach den Leitlinien des American College of Obstetricians and Gynecologists müssen bei fehlender Proteinurie eine Thrombozytopenie ($<100.000/\mu\text{l}$), eine Nierenfunktionseinschränkung (Kreatinin $>1,1$ mg/dl), eine Leberwerterhöhung, ein Lungenödem oder neurologische Symptome vorliegen (ACOG, 2019).

EINTEILUNG

Die Einteilung der Präeklampsie mit Definition ist in Tabelle 3 aufgeführt.

TABELLE 3: EINTEILUNG UND DEFINITION DER PRÄEKLAMPSIE (KAINER, 2016 S.360)

Einteilung	Definition	Epidemiologie
Early onset Präeklampsie	bis 33 + 6 Schwangerschaftswochen (SSW)	0,5-1 % der Schwangeren
Late onset Präeklampsie	ab 34 + 0 SSW	1,5 % der Schwangeren
Milde Präeklampsie	Präeklampsie ohne Zeichen einer schweren Präeklampsie	
Schwere Präeklampsie	Blutdruck $>160/110$ mmHg Kreatinin $>0,9$ mg/dl Leberbeteiligung (Transaminasen \uparrow) Lungenödem Thrombozytopenie ($<100.000/\mu\text{l}$) / Hämolyse Neurologische Symptome (Kopfschmerzen, Sehstörungen) Fetale Wachstumsrestriktion (Schätzwicht $<5.$ Perzentile +/ pathologischer Doppler der Arteria umbilicalis)	

EPIDEMIOLOGIE

Präeklampsie betrifft etwa 2 – 5 % aller Schwangerschaften (Apicella, Ruano, Mehats, Miralles, & Vaiman, 2019) und ist ein Grund für mütterliche und kindliche Mortalität und Morbidität (Phipps, Prasanna, Brima, & Jim, 2016). Die Inzidenz zeigt starke geografische Variationen, in Deutschland liegt sie bei ca. 2 % (Kainer, 2016 S.360).

PATHOPHYSIOLOGIE

Die Pathophysiologie ist bis heute nicht abschließend geklärt. Zur Krankheitsentstehung gibt es verschiedene Theorien. Chronische uteroplazentare Ischämie, schlechte immunologische Anpassung, genetisches Imprinting, erhöhte Apoptose oder Nekrose der Trophoblasten oder eine überschießende maternale Immunantwort auf abgestoßene Trophoblasten werden diskutiert (ACOG, 2019). Levine et al. zeigte, dass ein Ungleichgewicht von Faktoren der Angiogenese eine Rolle in der Pathogenese der Präeklampsie spielt (Levine et al., 2006). Im ersten Schritt kommt es durch eine fehlerhafte Implantation der Spiralarterien in das Myometrium zu einer uteroplazentare Minderperfusion und zu einer erhöhten Konzentration von antiangiogenetischen Faktoren (Phipps et al., 2016). Dadurch wird der Blutfluss verlangsamt und die Sauerstoffversorgung der Plazenta verändert, sodass Sauerstoffmangel entsteht und oxidativer Stress, Nekrosen und Inflammation getriggert werden (Apicella et al., 2019). In einem zweiten Schritt gelangen immunogene, toxische und plazentare Substanzen in den mütterlichen Kreislauf, führen zur Schädigung des Endothels und zur peripheren Vasokonstriktion und verursachen die Hypertonie (Phipps et al., 2016).

Die Plazenta produziert bei Präeklampsie vermehrt den löslichen Rezeptor Soluble Fms-like Tyrosinkinase 1 (sFlt-1) und vermindert den Plazental Growth Factor (PlGF), ein plazentares Analogon zum vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF). VEGF bindet normalerweise an seinen Rezeptor und vermittelt proangiogene Signale. sFlt-1 ist eine Splice-Variante des membranständigen VEGF-Rezeptor 1 und kann somit ebenfalls VEGF und PlGF binden, ohne jedoch ein Signal

zu vermitteln (Phipps et al., 2016). Als Folge tritt eine endotheliale Dysfunktion auf (Phipps et al., 2016).

Ein weiterer Faktor der Pathogenese ist das reduzierte Vorkommen von Hämoxigenase, einem Enzym zur Spaltung von Häm in Eisen, Kohlenstoffmonoxid und Biliverdin. Das Kohlenstoffmonoxid wirkt vasodilatatorisch und sorgt für eine gute Perfusion der Plazenta (Phipps et al., 2016). Weiterhin wurde eine verminderte Konzentration von Stickstoffmonoxid nachgewiesen. Die vasodilatierende Substanz sorgt für eine Relaxation der Gefäßmuskulatur. Im Mausmodell führte ein Stickstoffmonoxiddefizit zu einem geringeren Durchmesser der Uterinarterien, zur Verkürzung der Spiralarterien und zu einem verminderten uteroplazentaren Blutfluss (Phipps et al., 2016). Auch eine gesteigerte Produktion des vasokonstriktorisch wirkenden Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Autoantikörper können Ursachen einer Präeklampsie sein (Phipps et al., 2016).

RISIKOFAKTOREN

Unterschieden werden anamnestische Risikofaktoren von schwangerschaftsassozierten Risikofaktoren (DGGG, 2019). Risikofaktoren, die die Mutter betreffen sind eine auf Präeklampsie positive Eigen- oder Familienanamnese, Nulliparität, ansteigendes maternales Alter, diverse Grunderkrankungen wie eine chronische Hypertonie, vorbestehende Nierenerkrankungen, Adipositas, Diabetes mellitus, das Antiphospholipid-Syndrom und Autoimmunerkrankungen (DGGG, 2019). Des Weiteren gilt eine begrenzte Spermiensexposition durch einen neuen Partner oder mechanische Verhütung und die heterologe Insemination als Risiko (Martinez-Varea, Pellicer, Perales-Marin, & Pellicer, 2014). Schwangerschaftsassozierte Risikofaktoren sind eine Mehrlingsgravidität, Gestationsdiabetes, ein erhöhter Widerstand der Arteriae uterinae bzw. bilaterales Notching in der Dopplersonografie, Eizellspende oder in-vitro Fertilisation, fetale Fehlbildungen, Hydrops fetalis, pathologischer Karyotyp und eine Blasenmole (DGGG, 2019).

SYMPTOME

Meist beginnt die Hypertonie bei Präeklampsie frühestens ab der 20. Schwangerschaftswoche (SSW), des Weiteren zeigt sich eine Proteinurie mit über 300 mg/24 h im Urin und ein Ansteigen der Harnsäure (ACOG, 2019). Abhängig vom Schweregrad kann es zu einer Thrombozytopenie, einem Anstieg der Leberwerte und zur Hämolyse kommen (ACOG, 2019). Typische Symptome sind eine Steigerung der Reflexe, Oberbauchschmerzen, Augenflimmern und Kopfschmerzen. Auch ein rasches Auftreten von generalisierten Ödemen oder ein Gesichtsoedem zählen als Warnsymptome (Kainer, 2016 S.364-365).

DIAGNOSTIK

Neben einer ausführlichen Anamnese ist eine regelmäßige und korrekte Blutdruckmessung unumgänglich. Des Weiteren sollte eine Sammlung des Urins über 24 Stunden zur Bestimmung der Eiweißausscheidung erfolgen. Eine Proteinurie über 300 mg/24 Stunden gilt als pathologisch (DGGG, 2019). Eine Präeklampsie ist durch eine verminderte uteroplazentare Perfusion gekennzeichnet. In der Dopplersonografie zeigt sich häufig eine Widerstandserhöhung der Arteriae uterinae mit bilateralem Notch Phänomen (DGGG, 2019). Labordiagnostik mit Bestimmung der Leber- und Nierenwerte, der Harnsäure, des Gesamteiweißes und der Thrombozyten, sowie die Bestimmung des sFlt-1/PIGF-Quotienten als prädiktiver oder diagnostischer Marker sind ein wesentlicher Bestandteil der Diagnostik (DGGG, 2019).

THERAPIE

Als Prophylaxe steht eine tägliche orale Einnahme von 150 mg Acetylsalicylsäure mit Beginn möglichst vor 16. SSW zur Verfügung (DGGG, 2019). Es wird die Zyklooxygenase inaktiviert und dadurch die Synthese von Thromboxan A₂ gehemmt. Unter Therapie mit Acetylsalicylsäure sinkt die Präeklampsieinzidenz, die Frühgeburtsrate und die perinatale Mortalität (Kainer, 2016 S.363). Die Therapie wird bis zur 35. bzw. 37. SSW fortgesetzt (DGGG, 2019).

Die einzige Therapie der Präeklampsie ist die Entbindung, wobei bei Frühgeburtlichkeit immer eine Abwägung zwischen den daraus resultierenden, ungünstigen Folgen für das Frühgeborene und der Schwere der Erkrankung inklusive deren Folgen für die Mutter und das Kind notwendig ist (ACOG, 2019). Bei HELLP-Syndrom oder drohender Eklampsie ist eine sofortige, frühzeitige Entbindung unumgänglich (DGGG, 2019).

Eine antihypertensive Therapie mit α -Methyldopa ist das Therapeutikum der Wahl zur Langzeitbehandlung, um zerebrovaskuläre und kardiovaskuläre Komplikationen der Mutter zu verhindern (DGGG, 2019). Volumengabe kann bei einem Hämatokrit über 38 % notwendig sein, da es sonst zu einer verminderten Perfusion der Plazenta kommt. Aufgrund der Krampfbereitschaft sollten Patientinnen bei schwerer Präeklampsie mit Hyperreflexie eine Therapie mit Magnesiumsulfat erhalten, die postpartal für bis zu 48 Stunden fortgeführt werden sollte (ACOG, 2019; DGGG, 2019).

HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG

Die Erforschung der Epigenetik bringt Aufschlüsse über die Steuerung von Genaktivitäten und liefert damit wichtige Erkenntnisse zur Pathogenese verschiedener Erkrankungen. Die Möglichkeit neuer Therapieansätze verbunden mit der Hoffnung auf Heilung verleiht diesem Forschungsgebiet höchste Bedeutung. Die epigenetische Grundlagenforschung stellt den ersten Schritt für die spätere Entwicklung von epigenetisch wirksamen Medikamenten oder Therapieverfahren dar. Diese Arbeit liefert einen Beitrag zur Erforschung von Methylierungsmustern krankheitsrelevanter pro- und antiinflammatorischer Gene.

Bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen wurden im Vergleich zu gesunden Probanden abweichende DNA-Methylierungsmuster nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass epigenetische Mechanismen eine wichtige Rolle in der Regulation der Entzündungsreaktion spielen. Transkriptionsfaktoren sind notwendig, um die Aktivität von Genen zu steuern, wobei die Transkriptionsfaktoren selbst über epigenetische Mechanismen reguliert sein können. Unser Umfeld und unsere Lebensweise haben einen starken Einfluss auf die Epigenetik. Ziel dieser Arbeit ist den Einfluss verschiedener Stressfaktoren auf die Epigenetik pro- und antiinflammatorischer Transkriptionsfaktor-Gene bei drei bestimmten, voneinander unabhängige Krankheitsbilder zu ermitteln. Ein Projekt war die Auswirkung von psychischem Stress im Ausdruck einer Angsterkrankung auf die Methylierung dieser Gene. Als weiteres Projekt wurde Hypoxie bei Präeklampsie und der damit verbundene oxidative Stress als Grund für veränderte Methylierung untersucht. Auch inflammatorischer Stress im Rahmen einer Sklerodermie könnte Auswirkungen auf die Epigenetik zeigen und wurde hier analysiert.

Die vorliegende Arbeit untersucht den Methylierungsstatus pro- und antiinflammatorischer Gene unter dem Einfluss von Stressoren. Die Hypothese lautet, dass das Methylierungsmuster der Gene durch Stress nicht beeinflusst wird.

Eine Angststörung ist assoziiert mit einer verminderten Thymusfunktion was eine Hypermethylierung von FOXP3 und somit eine reduzierte immunsuppressive Funktion von Tregs zur Folge hat (Prelog et al., 2016).

Eine uteroplazentare Minderperfusion und somit die Hypoxie der Plazenta mit der Folge von oxidativem Stress, Nekrosen und Inflammation bei Präeklampsie führt zu einer Hypermethylierung von FOXP3 im plazentaren Gewebe.

Die Methylierung von Th17 und Tregs spezifischen Transkriptionsfaktoren unterscheidet sich bei Sklerodermiepatienten durch entzündliche und fibrosierende Prozesse mit Vermehrung des Bindegewebes an der Haut im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Als Ziel dieser Arbeit wurde definiert:

- 1) Bestimmung des Methylierungsstatus pro- und antiinflammatorischer Transkriptionsfaktor-Gene von Sklerodermiepatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen.
- 2) Bestimmung der Genaktivität von Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit der Methylierung bei Sklerodermie.
- 3) Bestimmung des FOXP3 Methylierungsmuster von Angstpatientinnen im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Personen.
- 4) Bestimmung der FOXP3 Methylierung in gesundem plazentarem Gewebe.
- 5) Bestimmung der plazentaren FOPX3 Methylierung bei Präeklampsie im Vergleich zur komplikationslosen Schwangerschaft.
- 6) Bestimmung der FOXP3 Methylierung bei Abort im Vergleich zur Interruptio.

MATERIAL UND METHODEN

MATERIAL

PROBANDEN, KONTROLLEN UND ETHIKVOTUM

ANGSTERKRANKUNG

Die DNA von 47 Patienten mit Angststörung und 48 gesunden Kontrollen wurden von der Arbeitsgruppe „Funktionelle Genomik“ der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Universitätsklinikums Münster zur Verfügung gestellt. Aufgrund der Dominanz des weiblichen Geschlechts bei Angststörungen wurden in dieser Arbeit ausschließlich DNA-Proben von Frauen ausgewählt. Einschlusskriterien der Patientinnen waren strukturierte klinische Interviews nach DSM (SCID-1), die die Kriterien der DSM-IV enthielten. Ausgeschlossen wurden Patientinnen mit geistiger Retardierung, neurologischen oder neurodegenerativen Erkrankungen und schweren körperlichen Beeinträchtigungen. Dokumentiert wurde die Einnahme von Antidepressiva und Depression als Komorbidität. Sowohl Patientinnen als auch Kontrollen sind Kaukasier. Die Einstufung als Raucher erfolgte bei einem Konsum von über zwei Zigaretten pro Tag. Das Projekt wurde von dem Ethikkomitee der Universität Münster genehmigt (Protokollnummer: 239/10) und alle teilnehmenden Personen willigten schriftlich ein. Die Studie wurde nach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

SKLERODERMIE

Sowohl die Blutproben der Patienten und Patientinnen mit Sklerodermie als auch die Proben der gesunden Kontrollen sind aus der Klinik für Innere Medizin 2 und aus der Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikum Würzburg. Die Probanden willigten schriftlich ein. Eingeschlossen wurden Patienten und Patientinnen, die nach den Kriterien des American College of Rheumatology und der European League Against Rheumatism (van den Hoogen et

al., 2013) der Diagnose einer systemischen Sklerodermie entsprachen. Ausschlusskriterien waren andere Autoimmunerkrankungen, Immundefekte, genetische Syndrome, eine symptomatische Infektion in den 6 Wochen vor Einschluss in die Studie und der Erhalt von Plasmaprodukten oder Immunglobuline in den letzten drei Monaten. Die Studie wurde nach den Prinzipien der Deklaration von Helsinki 2010 und nach den Vorschriften des lokalen Ethikkomitees der Universität Würzburg (Protokollnummer: 242/11) durchgeführt.

PRÄEKLAMPSIE

Die Gewebeproben wurden uns von Frau Prof. Dr. Zenclussen und der Universitätsfrauenklinik Magdeburg zur Verfügung gestellt. Insgesamt konnte Plazentagewebe von 19 Präeklampsiepatientinnen und 20 gesunden Schwangeren, sowie jeweils 20 Gewebeproben von schwangerschaftstypischem Material bei Abort und Interruptio analysiert werden. Einschlusskriterien wurden nach der oben genannten Definition der Präeklampsie erstellt. Die Studie wurde nach den Prinzipien der Deklaration von Helsinki und nach den Vorschriften des lokalen Ethikkomitees (Protokollnummer: EK28/08) durchgeführt.

SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE

Alle verwendeten synthetischen Oligonukleotide sind mit Gennamen und Sequenz Tabelle 4 zu entnehmen.

TABELLE 4: SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE

Gen	Sequenz (5'-3')	Hersteller
CCR6 F	ATGAACCGATCCTGCCAGA	Eurofins, Luxemburg
CCR6 R	GAGAAGCCTGAGGACTTGT	Eurofins, Luxemburg
CXCR3 F	CTCCACCTAGCTGTAGCAGA	Eurofins, Luxemburg
CXCR3 R	AGGAAGATGAAGTCTGGGAG	Eurofins, Luxemburg
FOXP3 II F	TCATCTGTGGCATCATCCGA	Eurofins, Luxemburg
FOXP3 II R	AGGAACTCTGGGAATGTGCT	Eurofins, Luxemburg
GAPDH F	CCAGCCGAGCCACATCGCTC	Eurofins, Luxemburg
GAPDH R	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT	Eurofins, Luxemburg
IFNG II F	AAGAATTGGAAAGAGGAGAGTGAC	Eurofins, Luxemburg
IFNG II R	TGTATTGCTTTGCGTTGGAC	Eurofins, Luxemburg
IL10 F	CCTGCCTAACATGCTTCGAG	Eurofins, Luxemburg
IL10 R	CAACCCAGGTAACCCTTAAAGTC	Eurofins, Luxemburg
IL17A F	CTCATTGGTGTCACTGCTACTG	Eurofins, Luxemburg
IL17A R	CACCTTGCCTCCAGATCAC	Eurofins, Luxemburg
RORC II F	TTCTCAAAGCAGGAGCAATGG	Eurofins, Luxemburg
RORC II R	TGGGAGAAGTCAAAGATGGAG	Eurofins, Luxemburg
β2 Micro F	CCAGCAGAGAATGGAAAGTC	Eurofins, Luxemburg
β2 Micro R	GATGCTGCTTACATGTCTCG	Eurofins, Luxemburg
STAT1 F	AATACACCTACGAACATGACCCT	Eurofins, Luxemburg
STAT1 R	TTTCACCAACAGTCTCAACTTCAC	Eurofins, Luxemburg
STAT3 F	GGAACGAAGGGTACATCATGG	Eurofins, Luxemburg
STAT3 R	TCCACCCAAGTGAAAGTGAC	Eurofins, Luxemburg
STAT4 F	TTCTTTAATAATCCTCCACCTGCC	Eurofins, Luxemburg
STAT4 R	CCCATGACATACCCATCAATCC	Eurofins, Luxemburg
STAT5 F	ACATTTGAGGAGCTGCGACT	Eurofins, Luxemburg
STAT5 R	CCTCCAGAGACACCTGCTTC	Eurofins, Luxemburg
TBX21 F	GTTCCCATTCCTGTCATTTACTG	Eurofins, Luxemburg
TBX21 R	AGCACAAATCATCTGGGTCAC	Eurofins, Luxemburg

F = FORWARD, R = REVERSE.

REAKTIONSKITS

Tabelle 5 listet alle verwendeten Reaktionskits und deren Hersteller auf.

TABELLE 5: REAKTIONSKITS

Reaktionskit	Hersteller
DNA Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden, D
EpiTect PCR Control DNA Set	Qiagen, Hilden, D
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden, D
EpiTect 96 Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden, D
IQ TM SYBR R Green Supermix	BioRad Laboratories, Hercules, USA
NucleoSpin RNA (250)	Macherey-Nagel, Düren, D
RNA Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden, D
RNeasy Plus Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden, D

REAGENZIEN

Alle Reagenzien dieser Arbeit und deren Hersteller oder die Zusammensetzung sind Tabelle 6 zu entnehmen.

TABELLE 6: REAGENZIEN

Reagenz	Hersteller/Zusammensetzung
10 x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer	12,12 g Tris 0,93 g EDTA 2,85 ml Acetic acid, pH8
1 x TAE	1 ml 1M Tris (pH 8) 0,2 ml 0,5M EDTA 100 ml Aqua dest.
37 % Salzsäure (HCl)	Merck, KGaA, Darmstadt, D
50 x TAE	242 g Tris base 18,6 g EDTA H ₂ O 57,1 ml 100 % Essigsäure
Acedic acid ROTIPURAN® 100 % p.a.	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Agarose peqGold Universal	peqLab, Erlangen, D
Agarose ultra pure	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ampuwa 50 ml und 1l	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
Aqua dest	Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d. Höhe, D
Bovine Serum Albumine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Denaturation buffer (Pyro)	8 g NaOH pellets 1 l Aqua sterile
DNA Gel loading Dye (6x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DNA Ladder 50 bp (Gene ruler) 0,1 µg/µl	Fermentas, Waltham, USA
DNase Exitus Plus	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Einfriermedium (RPMI, 10 % DMSO, 20 % FCS)	40 ml RPMI 5 ml FCS 5 ml DMSO
Erythrozyten-Lyse-Puffer	100 ml Aqua sterile 8,26 g NH ₄ Cl 1 g KHCO ₃ 0,037 g EDTA
Ethanol (EtOH) 70 %	700 ml 100 % EtOH 1 l Aqua dest.
Ethanol absolut ≥ 99,8 % p.a.	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, D Laborhaus Scheller, Euerbach, D
Ethidiumbromidlösung (EtBr) 1 %-ige Lösung in H ₂ O, 10 mg/ml	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, D

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fast Start Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim, D
Fast Start Taq DNA Polymerase PCR-Buffer (10xconc) mit MgCl ₂	Roche, Mannheim, D
FCS (fetales Kälberserum)	Bichrom GmbH, Berlin, D
Ficoll	Linaris GmbH, Dossenheim, D
Gene Ruler™ DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HD Green Plus DNA Stain	Intas Science, Göttingen, D
Isotonische Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %)	Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d. Höhe, D
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Loading Buffer	1 ml H ₂ O 200 µl 6 x loading buffer
Maxima Hot Start Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nährmedium	RPMI + 10% FCS
Natriumchlorid (NaCl), M = 58,44 g/mol	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Natriumhydroxid (NaOH), M = 40,01 g/mol	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, D AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Phosphate Buffer Solution (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
PCR Grade Nucleotide Mix	Roche, Mannheim, D
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen, Hilden, D
PyroMark Binding Buffer	Qiagen, Hilden, D
PyroMark Gold Q96 CDT Reagents	Qiagen, Hilden, D
Red Safe DNA stain	CHEMBIO, Hertfordshire, UK
RLT Puffer	1 ml RLT 10 µl β-Mercaptoethanol
RNase Exitus Plus	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
RPMI	Sigma - Aldrich, St. Louis, USA
HCl	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Streptavidin Sepharose High Performance	GE Healthcare, München, D
Tris Ultra Qualität	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, D
Tris ultrapure (C ₄ H ₁₁ NO ₃), M = 121,12 g/mol	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Trypanblau	Merck, KGaA, Darmstadt, D
Washing Buffer (pH 7,6)	1,21 g Tris base 1 l Aqua sterile 4 M Essigsäure bis zu pH-Wert = 7,6
β-Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS), M = 78,13 g/mol	AppliChem GmbH, Darmstadt, D

SPEZIELLE GEBRAUCHS- UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Tabelle 7 führt alle Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien der durchgeführten Laborarbeiten auf.

TABELLE 7: GEBRAUCHS- UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Gebrauchs-/Verbrauchsmaterial	Hersteller
1,5 ml Microzentrifuge tubes	SARSTEDT AG & Co, Nürmbrecht, D
8er Deckel zum Verschließen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
96er Platte Halbrand	SARSTEDT AG & Co, Nürmbrecht, D
Biosphere® Filterspitzen (0,5 – 1000 µl)	SARSTEDT AG & Co, Nürmbrecht, D
Combitips advanced Biopur 0,2 ml Combitips advanced 0,1 ml Combitips advanced 1 ml	Eppendorf, Hamburg, D
DNA-ExitusPlus™	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Einmalhandschuhe	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, D
Glaspipette (5/10/20ml)	Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
Kryoröhrchen mit Schraubverschluss	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Mikrozentrifugenröhrchen Safe Seal (1,5/2 ml)	SARSTEDT AG & Co, Nürmbrecht, D
Mr. Frosty Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Multiply®-PCR-Platten 96-Well, PCR-performance tested und 8er-Deckelstreifen	SARSTEDT AG & Co, Nürmbrecht, D
Parafilm M	Brand GmbH, Wertheim, D
PCR-Platte, 96-Well	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
PCR-Reaktionsgefäße, 8er-Ketten, PCR-performance tested	SARSTEDT AG & Co, Nürmbrecht, D
PCR-Reaktionsgefäßständer	A. Hartenstein, Versbach, D
peqGOLD Universal Agarose	PeqLab, Erlangen, D
Pipettenspitzen	SARSTEDT AG & Co, Nürmbrecht, D
PyroMark Q96 HS Plate	Qiagen, Hilden, D
PyroMark Q96 HS Capillary Tip (8)	Qiagen, Hilden, D
Quali PCR Tubes (8er)	Kisker Biotech, Steinfurt, D
Quali PCR Tube Deckel (8er)	Kisker Biotech, Steinfurt, D
Reagenzreservoir 10 ml	Integra, Zizers, Schweiz
Reaktionsgefäße 0,5/ 1,5/ 2 ml	Eppendorf, Hamburg, D SARSTEDT AG & Co, Nürmbrecht, D
Terralin® Liquid zur Desinfektion	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, D
Zählkammer Neubauer	Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
Zentrifugenröhrchen Cellstar Tubes 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

GERÄTE

Alle Geräte mit Typenbezeichnung und Hersteller sind Tabelle 8 zu entnehmen.

TABELLE 8: GERÄTE

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Cycler	Mastercycler gradient Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg, D
Gefrierschrank	Comfort K117 HERAfreeze HFU586 Basic	Liebherr, Biberach a.d. Riß, D Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gel Imager		Intas Science Imager Instruments GmbH, Göttin- gen, D
Gelelektrophorese	Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D Pharma Biosystems, Freiburg, D
Gelelektrophorese- kammer	Gene Mate	StarLab, Hamburg, D
Heating Magnetic Stirrer	Star Lab	VELP Scientifica Srl, Usmate Velate, Italien
Mikroskop		Hund, Wetzlar, D
NanoDrop Spectrophotometer	2000c	peqLab, Erlangen, D
pH Meter	pH523	WTW, Weilheim, D
Photometer	Bio Photometer 8,5 mm	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten	0,1-2,5 µl 0,5-10 µl 10-100 µl 30-300 µl 20-200 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten	Research Plus 2,5 / 10 / 100 / 200 / 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
PyroMark® Q96 Capillary / Reagent tips und Q96 Capillary Tip Holder		Qiagen, Hilden, D
Pyrosequencer	PyroMark® MD	Qiagen, Hilden, D
Pyrosequencer Vakuum Arbeitssystem	PyroMark® Q96 MD Vacuum Workstation System	Qiagen, Hilden, D
Rührer (für Rührfisch)	MR3001	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Sterile Werkbank	Gelaire BSB6A	Retsch, Haan, D

Stickstofftank	Cryoson Typ 200VL/R	Consarctic, Westerngrund, D
Thermoblock	TB2	Biometra GmbH, Göttingen, D
Thermocycler	DNA Engine Tetrad 2	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Thermoschüttler	TS-100 20 x 1,5 ml TS-100 20 x 2,0 ml	peqLab, Erlangen, D
Thermoshaker	TS100	peqLab, Erlangen, D
UV-Licht (offen)	UVP Transilluminator TFS-40V high performance UV	UVP Analytik Jena, Jena, D
UV-Bench	AirClean 600 PCR Workstation	StarLab, Hamburg, D
UV-Licht	Gel Doc 2000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Varispenser		Eppendorf, Hamburg, D
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Vortexer	Retsch Mixer	Retsch, Haan, D
Waage	Kern EG4200-2NM	Kern und Sohn, Balingen, D
Waage	Denver TP 3002	Denver Instruments, Arvada, USA
Wasserbad	Typ 1003	GFL, Burgwedel, D
Zeitmesser	-	A. Hartenstein, Versbach, D
Zentrifuge	Mikrozentrifuge für 1,5-2 ml bzw. 250µl PCR-Reaktionsgefäße	A. Hartenstein, Versbach, D
Zentrifuge	Perfect Spin P	peqLab, Erlangen, D
Zentrifuge	Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge	Galaxy 16 DH	VWR, Darmstadt, D
Zentrifugen	Universal 32 R Rotanta 460 Mikro 20	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifugen	Heraeus™ Multifuge X1R Heraeus™ Multifuge 3SR+ Heraeus™ Multifuge X3 Heraeus™ Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

SOFTWARE

Tabelle 9 listet alle in dieser Arbeit verwendete Software auf.

TABELLE 9: SOFTWARE

Software	Firma
IBM SPSS, Version 24 2016	IBM, Armonk, USA
Microsoft Office 2007 und 365 (Word, PowerPoint, Excel)	Microsoft, Luxemburg
NanoDrop 2000	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
PyroMark® Assay Design	Qiagen, Hilden, D
PyroMark® Q-CpG zur Pyrosequenzierung	Qiagen, Hilden, D

METHODEN

VORBEREITUNG

ISOLIERUNG VON LEUKOZYTEN

Um Leukozyten aus frischem Blut zu isolieren, wird nach der Blutabnahme die Gerinnung durch Heparin gehemmt. Innerhalb von acht Stunden folgt die Dichtegradientenzentrifugation, wodurch das Blut den Bestandteilen nach aufgeteilt wird.

In einen 50 ml Falcon Tube wird 10 ml Ficoll Lösung vorgelegt und vorsichtig mit 24 ml Blut überschichtet. Es folgt die ungebremste Zentrifugation des Falcon Tubes mit 1500 rpm für 25 Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Ficollzentrifugation befinden sich in dem Röhrchen verschiedene Schichten. Da Erythrozyten die größte Dichte besitzen, sind diese in der untersten Schicht, gefolgt von einem feinen Granulozytenring, der Ficoll Lösung, einer dünnen Schicht von Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) und Plasma. Die mononukleare Zellschicht wird durch das Plasma hinweg vorsichtig abpipettiert. Die isolierten Leukozyten werden nun einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen, indem sie in einen neuen, mit physiologischer NaCl-Lösung gefüllten Falcon Tube gegeben und für 10 Minuten bei 1700 rpm zentrifugiert werden. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt und das verbleibende Zellpellet mit 5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer

resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wird 10 ml Nährmedium zugegeben. Das Nährmedium besteht aus Zellkulturmedium (RPMI) und 10 % fetalem Kälberserum (FCS). Der Zusatz von FCS dient dem Schutz der Zellen vor Frostschäden bei der Kryokonservierung. Es folgt eine Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 Minuten und das Absaugen des Überstands. Nun ein weiteres Mal in 5 ml Nährmedium resuspendieren und 10 µl der Zellsuspension für die Zellzählung in einen Eppi überführen. Es folgt noch einmal eine 5-minütige Zentrifugation bei 1500 rpm. Im Anschluss daran wird der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 10 ml Einfriermedium resuspendiert. Je 1 ml Zellsuspension wird in ein Kryoröhrchen gegeben, welches mit Inhalt, Name, Geburtsdatum, Zellzahl und Datum beschriftet ist.

ZELLZÄHLUNG

Um die Anzahl der vitalen Zellen zu ermitteln ist eine Zellzählung sowohl nach der Isolation der Lymphozyten, als auch nach dem Auftauen von kryokonservierten Zellen notwendig.

Dazu verwendet man 10 µl der Zellsuspension und 90 µl Trypanblau und mischt es vorsichtig in einem Eppi. Nun einen Tropfen des Gemisches auf eine Zählkammer geben und ein Deckplättchen auflegen. Unter dem Mikroskop werden alle Lymphozyten zweier Quadranten ausgezählt und addiert. Zur Berechnung der Gesamtzellzahl wird folgende Formel verwendet:

$$\text{Anzahl gezählter Zellen} * 10^4 * \text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} * \text{Volumen} = \text{totale Zellzahl}$$

LAGERUNG HUMANER LYMPHOZYTEN

Da humane Lymphozyten bei Raumtemperatur nicht lagerungsfähig sind, werden sie in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die frisch isolierten und in Phosphate Buffer Solution (PBS) mit FCS gelösten Zellen werden in 1,5 ml Tubes gefüllt und in einer Freezing box zunächst bei -80 °C für mindestens 2 Tage und maximal einen Monat zwischengelagert. Dadurch wird eine schnelle Abkühlung von etwa 1 °C pro

Minute gewährleistet, was eine optimale Geschwindigkeit zur Zellkonservierung darstellt. PBS ist eine Pufferlösung, dessen osmotischer Druck, dem des menschlichen Organismus entspricht. Danach können Lymphozyten in flüssigem Stickstoff für mehrere Monate gelagert werden.

AUFTAUEN DER LYMPHOZYTEN

Das Auftauen der Lymphozyten muss rasch erfolgen. Im Wasserbad wird ein Falcon Tube mit 10 ml RPMI Zellkulturmedium mit 10 % FCS auf 37 °C erwärmt. Ist diese Temperatur erreicht, sollen die kryokonservierten Zellen zügig, auf Eis transportiert, von flüssigem Stickstoff in das erwärmte Wasserbad gebracht werden. Ein schnelles Auftauen ist für die Vitalität der Zellen von großer Bedeutung. Ist die Zellsuspension im 1,5 ml Tube aufgetaut, wird diese vorsichtig mit einer Pipette auf die erwärmte RPMI Solution gegeben. Es folgt eine 5-minütige Zentrifugation bei 1500 rpm. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt und das Pellet erneut in 10 ml RPMI mit 10 % FCS gelöst. Nun muss eine Zählung erfolgen, um die Anzahl der noch vitalen Lymphozyten zu ermitteln.

GEWINNUNG VON DNA UND RNA AUS PLAZENTAREM GEWEBE

Bei der Gewinnung von DNA und RNA aus plazentarem Gewebe ist darauf zu achten, dass eine Kontamination verhindert wird. Dazu müssen vor Beginn des Prozesses alle Materialien (Mörserschälchen, Mörser, Pinzette, Skalpell) mit Seife und Chloroform unter dem Abzug gereinigt werden. Anschließend gibt man eine geringe Menge flüssigen Stickstoff in ein Mörserschälchen und legt ein kleines Stück des Plazentagewebes hinein. Das Gewebe gefriert sofort und kann mit dem Mörser zerkleinert werden und in einen Eppi überführt werden. Dazu gibt man 600 µl RLT Puffer und lässt das pulverisierte Gewebe wieder auftauen. Das Gemisch gut vortexen und in eine Shredder-Säule geben. Bei maximaler Geschwindigkeit für 2 Minuten zentrifugieren. Die Flüssigkeit in einen neuen Eppi pipettieren und erneut mit voller Geschwindigkeit für 3 Minuten zentrifugieren. Den Überstand abnehmen und nach dem Protokoll des Herstellers die DNA und RNA Isolation durchführen.

TESTUNG DER PRIMER DER POLYMERASEKETTENREAKTION

Die Testung der Primer der Polymerasekettenreaktion (PCR) hat zum Ziel, die optimalen Reaktionsbedingungen für jeden einzelnen Primer zu bestimmen. Relevante und beeinflussbare Parameter sind zum Einen die Anzahl der Zyklen der PCR und zum Anderen die optimale Reaktionstemperatur.

Die für die PCR notwendigen Primer werden nach Erhalt der Bestellung mit der auf dem Lieferschein stehenden Menge reinem Wasser gelöst. Nach einer Verdünnung auf 1:10 ist einfrieren zur Lagerung möglich.

Um die ideale Anzahl an PCR-Zyklen zu bestimmen, werden Testläufe mit Zykluszahlen von 32, 34, 36, 38 und 40 durchgeführt. Als Standardtemperatur wird 60 °C ausgewählt. Im Anschluss daran muss jeweils eine Gelelektrophorese durchgeführt werden und das Ergebnis in Form von gut abgrenzbaren, kräftigen Banden unter der UV-Kamera beurteilt werden.

Die beste Reaktionstemperatur wird ermittelt, indem man den Cycler mit einem Temperaturgradienten von 54 °C bis 64 °C programmiert. Jeder Primer wird dadurch bei 54 °C, 56,8 °C, 60 °C, 61,4 °C und 63,3 °C getestet. Um Fehlerquellen durch Variationen der DNA zu vermeiden, wird für alle Wells dieselbe DNA verwendet. Die Anzahl der Zyklen für diesen Versuch ist abhängig von dem zuerst durchgeführten Versuch der Primertestung. Tabelle 10 enthält die ermittelte optimale Anzahl an Zyklen und Temperatur je Primer. Welche Sequenz bei der PCR vervielfältigt wurde zeigt Tabelle 11. Tabelle 12 enthält die jeweilige Genlage und die Genlänge. Aus Tabelle 13 sind die jeweiligen Primersequenzen, die Anzahl der enthaltenden CTG Inseln und die Verwendung zu entnehmen.

TABELLE 10: ANGABEN ZUR CYCLEREINSTELLUNG DER JEWEILIGEN PRIMER

Primer	Zyklen	Temperatur in Grad Celsius
FOXP3 Enhancer	39	58,3
FOXP3 Promotor	39	58,3
GATA3	39	58,3
RORC1	35	60
RORC2	35	60
STAT3	35	60
STAT4	35	60
STAT5A	39	58,3
TBX21	39	60

TABELLE 11: ANALYSIERTE SEQUENZEN DURCH PYROSEQUENZIERUNG

Gene	Analysierte Sequenzen
FOXP3 Promotor 1	CYTAACAATTTCCACAAACCAA <u>ACTA</u>
FOXP3 Promotor 2	YACTTCCACACCY <u>TACAACYTAATTTTCTTCTCYATATA</u>
FOXP3 Enhancer 1	TGTTTTY <u>GAGTTTTTATYGT</u> TGTGTTTYGTTTTYGT
FOXP3 Enhancer 2	TTYGTTGTYGTTYGYGYGGTYGTTGGAGYGT
GATA 3	YGGGTGGTGYGTGTTYGGGTGTTGTTYGT
RORC1 Sequenz 1	TATTTTGGYGGGTGGAAATAGTTTTTATYGYGT
RORC1 Sequenz 2	ATTTTTTAAAYGTTTTTTAYGATTGGTTGTT
RORC1 Sequenz 3	GTTAYGTGGGGYGTGTTGTTATTTTATTTATTGTATTT
RORC2 Sequenz 1	TATTTTGGYGGGTGGAAATAGTTTTTATYGYGTGTGGTTGTYGT
RORC2 Sequenz 2	TTTTTTTAAAYGTTTTTTAYGATTGGTTGTTTTTTTTTTTATATT
STAT3	YGYGTTYGTTTTTYGGTATAYGYGTAGTTTTYGGT
STAT4	AGYGGGGTTYGTTTATTTYGA
STAT5A	GGYGTTTAGTTYGATTTTATTAATTTTTTGGGTTTTYGTG
TBX21	YGAGAGTTTGYGYGTATTTTGTAGTTYGAA

TABELLE ENTNOMMEN AUS (PRELOG ET AL., 2016) UND MODIFIZIERT. DIE ANALYSIERTEN CPG-INSELN SIND UNTERSTRICHEN.

A = ADENIN, G = GUANIN, T = THYMIN, Y = POTENZIELL METHYLIERTE SEQUENZ

TABELLE 12: GENLAGE UND GENLÄNGE

Gene	Genlage und Genproduktlänge
FOXP3 Promotor	Chromosom X (49121152-49121485 bp) (len: 333)
FOXP3 Enhancer	Chromosom X (49126597- 49126750 bp) (len: 153)
GATA 3	Chromosom 10 (8045378-8075198 bp)
RORC1	Chromosom 1 (151806071-151832238 bp)
STAT3	Chromosom 17(42313324-42388568 bp)
STAT4	Chromosom 2 (192016133 - 192016247 bp) (len: 114)
STAT5A	Chromosom 17 (42287448- 42287578 bp) (len: 130)

BP = BASENPAAR, LEN = GENPRODUKTLÄNGE

TABELLE 13: PRIMER DER PYROSEQUENZIERUNG

	Primer	Sequenz (5'-3')	Anzahl an CpG	Verwendung
FOXP3 Promotor	forward	AGTTTGGTTTGTGGGAAATTGTT		PCR
	reverse	Biotin-ACCCTATTATCTCATTAATACCTCTCA		PCR
	Sequenz 1	ATAAAAACAAAATTATTTTAAATA	1	Pyro
	Sequenz 2	AAATTATTAAAAAATAATCTAC	4	Pyro
	Sequenz 3	AAAAACCCCCCCA	3	Pyro
FOXP3 Enhancer	forward	ATGAAGGGGAGGAGGAAG		PCR
	reverse	Biotin-CCTCCAACCTCCACCATAAC		PCR
	Sequenz 1	GAGGAAGAGGAGGTT	4	Pyro
	Sequenz 2	GGGTTTTATTTGGTTTTTATATT	7	Pyro
GATA3	forward	GTTTATGTAGGAGTGGTTGAGG		PCR
	reverse	Biotin-TTTAAAAACCTTCTCCTTTACTCAC		PCR
	Sequenz 1	GGAGTGGTTGAGGTT	4	Pyro
RORC1	forward	GGGGTAGGAGGAGTAGAAAT		PCR
	reverse	Biotin-CTAACTCTCTCCCCAATACTTC		PCR
	Sequenz 1	ATTTTGGTTTTTTAGTTAGAAT	3	Pyro
	Sequenz 2	GTATGTGGTTTTGGAA	2	Pyro
	Sequenz 3	ATATTTGTTTTAGTTTTAGATTG	2	Pyro
RORC2	forward	GGGGTAGGAGGAGTAGAAA		PCR
	reverse	Biotin-CCCACCCCCAAAAATACAATAAATA		PCR
	Sequenz 1	ATTTTGGTTTTTTAGTTAGAAT	4	Pyro
	Sequenz 2	GTATGTGGTTTTGGAA	2	Pyro
STAT3	forward	GGTTGAAGGGGTGTAAT		PCR
	reverse	Biotin-CCCTCACCTATTTCTCC		PCR
	Sequenz 1	GGTTTGAGGGAGTTT	7	Pyro
STAT4	forward	GGAAGGGATGGGTAGTTAGGATTAATAAT		PCR
	reverse	Biotin-TAACCCAACCCTCTAAATCAAATC		PCR
	Sequenz 1	ATAGATTTTATTGGTTTTAATTTT	3	Pyro
STAT5A	forward	GAAGTTGGGTAAAGGGGATGGA		PCR
	reverse	Biotin-CAAACCTTACCACAACAATAAATATCC		PCR
	Sequenz 1	GGTAAAGGGGATGGA	3	Pyro
STAT5B-A1	forward	GGGTTTTTAGGGAGAGAGGT		PCR
	reverse	Biotin-ACCACCTAACAATAAAT		PCR
	Sequenz 1	TTAGGGAGAGAGGTG	3	Pyro
TBX21	forward	TAGGGTTTTTTATGGTGGAGAGAA		PCR
	reverse	Biotin-ACCTTTAAACTAAAACCTCAAACCTAAACT		PCR
	Sequenz 1	TTTATGGTGGAGAGAAG	4	Pyro

TABELLE ENTNOMMEN AUS (PRELOG ET AL., 2016) UND MODIFIZIERT.

A = ADENIN, C = CYTOSIN, G = GUANIN, T = THYMIN.

TESTUNG DER PRIMER DER PYROSEQUENZIERUNG

Alle Primer wurden mit der Software PyroMark Assay Design erstellt und sind Tabelle 13 unter Sequenz zu entnehmen. Um die Primer der Pyrosequenzierung zu testen, verwendet man bereits bisulfit-konvertierte DNA, die einmal vollständig methyliert und einmal komplett unmethyliert vorliegt. Pro Primer wird zuerst eine PCR und dann die Pyrosequenzierung mit der Negativkontrolle, 0 %, 25 %, 50 % und 100 % methylierter DNA durchgeführt. 25 % und 50 % methylierte DNA wird durch genaues Mischen der vollständig methylierten und der unmethylierten DNA erzeugt. Ist das entstandene PCR-Produkt durch eine Gelelektrophorese verifiziert, wird die Pyrosequenzierung nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Ziel ist nach der Pyrosequenzierung denselben prozentualen Methylierungsanteil wie in der verwendeten DNA zu erhalten. Bei Diskrepanzen zwischen dem Ergebnis und der eingesetzten DNA muss der Versuch wiederholt werden. Führt dies wieder zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis sollte die PCR erneut durchgeführt werden.

Das letzte Experiment zur Etablierung der Methode vergleicht den kompletten Prozessablauf. Die These des Versuchs ist, dass DNA stets zu gleichem Anteil methyliert sein muss, und keine Veränderung durch den Versuch erfährt.

Aus einer DNA-Probe wird zweimal eine identische Menge entnommen und unabhängig voneinander der Bisulfitkonvertierung unterzogen. Im nächsten Schritt wird ebenfalls unabhängig voneinander die PCR mit demselben Primer durchgeführt. Nachdem das PCR-Produkt durch eine Gelelektrophorese verifiziert ist, folgt die Pyrosequenzierung. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt.

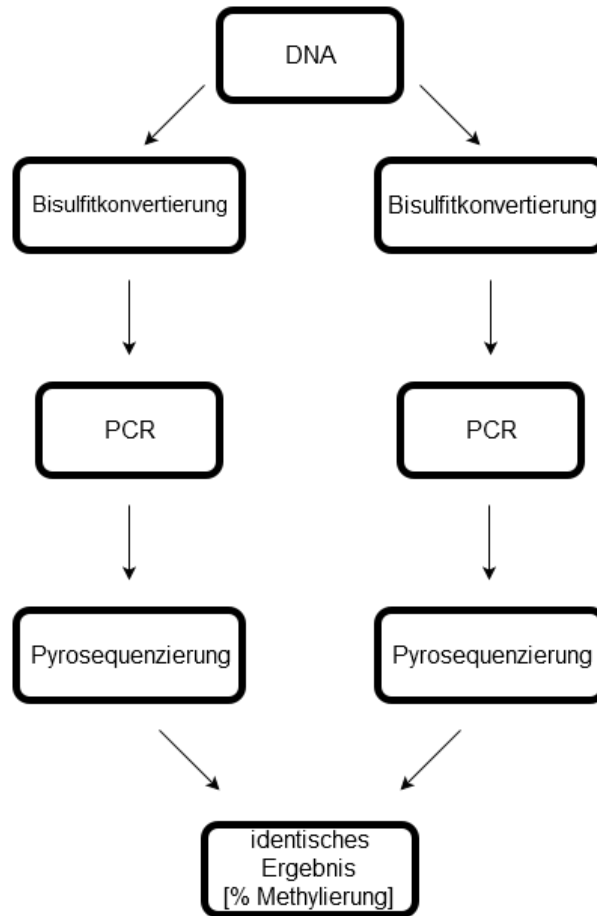


ABBILDUNG 4: VERSUCHSAUFBAU ZUM VERGLEICH DES PROZESSABLAUFS

VERSUCHUNGSDURCHFÜHRUNG

DNA- UND RNA-ISOLATION

Die Extraktion der DNA wurde mit dem DNA-Mini Kit nach Gebrauchsanweisung durchgeführt.

SPEKTROPHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONS- UND REINHEITSANALYSE VON NUKLEINSÄUREN

Die Absorptionsspektrometrie beruht auf der Tatsache, dass DNA- und RNA-Moleküle UV-Licht absorbieren. UV-Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm stellt das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren dar und wird auf die Probe gerichtet. Auf der gegenüberliegenden Seite wird die ankommende Menge an UV-

Strahlen detektiert (Joppien, Maier, & Wendling, 2011). Je mehr Licht von der Probe absorbiert wird, desto höher ist die Konzentration der Nukleinsäure.

Die DNA und RNA Konzentrationen können nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet werden.

$$E(\lambda) = -\lg\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = e_\lambda \times c \times d$$

E: Extinktion = optische Dichte

e_λ : Extinktionskoeffizient der Wellenlänge λ

I_0 : Intensität des eingestrahnten Lichts

I_1 : Intensität des transmittierten Lichts

d: Schichtdicke des durchstrahlten Objekts

Zur Berechnung wird die optische Dichte gemessen und mit einem RNA oder DNA spezifischen Verdünnungs- und Multiplikationsfaktor verrechnet. Zu beachten ist, dass in einem Bereich von ca. 10-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ das Photometergerät keine Messungen tätigen kann und deshalb relativ hohe Konzentrationen notwendig sind (Joppien et al., 2011).

Verunreinigungen werden durch Absorptionsmaxima anderer Wellenlängen aufgezeigt. So gilt für Proteine ein Absorptionsmaximum von 280 nm. Es wird das Verhältnis der optischen Dichte von 260 nm / 280 nm bestimmt. Liegt dieser Wert einer Probe zwischen 1,8 und 2,0 kann von einer weitgehend proteinfreien Lösung ausgegangen werden (Joppien et al., 2011).

PHOTOMETER

Hierfür wird 2 μl der zu messenden Substanz mit 98 μl RNase freiem Wasser verdünnt und in die dafür vorgesehene Quarzkammer gefüllt. Vor der Messung muss noch ein Nullabgleich mit reinem DNase freiem Wasser gemacht werden.

NANODROP

Am Nanodrop kann mit unverdünnter Probe gearbeitet werden. Es wird lediglich 1 μl der zu messenden RNA- oder DNA-Lösung auf den Messkopf gegeben. Auch

hier ist zuvor ein Nullabgleich mit der Substanz, in der die DNA oder RNA gelöst ist, durchzuführen.

Als nicht kontaminiert wird in dieser Arbeit ein Wert der 260/280 Ratio von ca. 1,8 (DNA) und 2,0 (RNA) anerkannt. Bei der 260/230 Ratio liegen die Werte zwischen 1,8 und 2,2.

GELELEKTROPHORESE DER RNA

Die Gelelektrophorese der RNA läuft wie die der DNA ab. Es ist auf die hohe Kontaminationsgefahr durch RNase zu achten. Um dies zu verhindern, werden Gelkammer, Elektrophoresekammer und Kämme gut mit Seife gereinigt, mit DNA Exitus Plus eingesprüht und erst nach 10-20 Minuten Einwirkzeit weitergearbeitet.

BISULFITKONVERTIERUNG

Ziel der Bisulfitkonvertierung ist es, jedes unmethylierte Cytosin in Uracil umzuwandeln. Somit ist bei der folgenden Sequenzierung davon auszugehen, dass jedes in dieser Sequenz enthaltene Cytosin methyliert ist. Um diesen Zustand zu erreichen wird Natriumbisulfit eingesetzt. Dieses Reagenz lässt methyliertes Cytosin unverändert.

Zur Veranschaulichung dient ein Beispiel in Tabelle 14:

TABELLE 14: BEISPIEL EINER BISULFITKONVERTIERUNG

	Ursprüngliche Sequenz	Sequenz nach Bisulfit Behandlung
Unmethylierte DNA	A-C-G-T-C-G-A-C-G-T-G-G	A-U-G-T-U-G-A-U-G-T-G-G
Methylierte DNA	A-C-G-T-C-G-A-C-G-T-G-G	A-C-G-T-C-G-A-C-G-T-G-G

A = ADENIN, C = CYTOSIN, G = GUANIN, T = THYMIN, U = URACIL.

Bei der Bisulfitkonvertierung ist es wichtig jedes unmethylierte Cytosin in Uracil umzuwandeln. Dies wird durch eine Inkubation bei hohen Bisulfitsalzkonzentrationen, hoher Temperatur und niedrigem pH erreicht. Normalerweise führen diese Konditionen zu erhöhter Fragmentation und anschließendem Verlust der DNA während der Aufreinigung. Da Bisulfitsalze und

andere Chemikalien die Sequenzierung inhibieren sind diese Reinigungsverfahren sehr wichtig.

Aus den oben aufgeführten Gründen werden meist große Mengen an DNA benötigt. Bei dem hier verwendeten Kit von Qiagen funktioniert die Bisulfitkonvertierung mit nur 1 ng DNA, da ein spezieller DNA-Schutzpuffer die Fragmentierung verhindert. Gleichzeitig hat er einen Effekt auf die Denaturierung, sodass die zur Konvertierung notwendigen Einzelstränge der DNA erhalten bleiben. Zur Bestätigung des korrekten pH-Wertes färbt der DNA-Schutzpuffer den vorher grünen Reaktionsmix blau.

Reaktionsschritte in der Übersicht:

- 1) Bisulfit-vermittelte Konversion von unmethyliertem Cytosin.
- 2) Bindung der einsträngigen konvertierten DNA an die Membran der EpiTect Säulen.
- 3) Waschschrift.
- 4) Desulfonation der DNA.
- 5) Waschschrift.
- 6) DNA Elution.

Der Bisulfit Mix ist in Aliquots abgepackt und muss vor Gebrauch mit 800 µl RNase freiem Wasser gelöst werden. Wird nicht die komplette Menge des Bisulfit Mix gebraucht kann er bei -20 °C bis zu vier Wochen gelagert werden.

Steht nur weniger als 100 ng genomische DNA zur Verfügung hilft Carrier RNA die geringe Menge DNA an die Membran der Säule zu binden. Sind über 100 ng DNA vorhanden muss keine Carrier RNA hinzugefügt werden.

Die DNA kann bei -20 °C drei Jahre ohne Qualitätsverlust gelagert werden.

Das Bisulfit Kit funktioniert bei DNA-Mengen zwischen 1 ng und 2 µg. Als Richtwert für die folgenden Experimente wird 1,5 µg DNA festgelegt. Diese Menge muss in maximal 20 µl enthalten sein.

Die Bisulfitkonvertierung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Die Programmierung des Cyclers für die Bisulfitkonvertierung ist in Tabelle 15 dargestellt.

TABELLE 15: PROGRAMMIERUNG DES CYCLERS FÜR DIE BISULFITKONVERTIERUNG

Schritt	Zeit (in Minuten)	Temperatur (in Grad Celsius)
Denaturierung	5	95
Inkubation	25	60
Denaturierung	5	95
Inkubation	85	60
Denaturierung	5	95
Inkubation	175	60
Halten	undefiniert	20

Nachdem jedes unmethylierte Cytosin im Cycler in Uracil umgewandelt wurde, wird die komplette Bisulfitreaktion in eine spezielle Säule überführt. Nach einem Waschschrift folgt die Desulfonierung. Danach führt ein zweiter Waschschrift zur reinen bisulfit-konvertierten DNA, die in 20 µl RNase-freiem Wasser gelöst wird.

POLYMERASEKETTENREAKTION

Ziel der PCR ist es millionenfache Kopien einer Nukleotidsequenz zu erstellen. Das dazu benötigte Enzym, die DNA-Polymerase, verbindet die Nukleotide Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin zu langen Molekülsträngen. Um die Startsequenz der PCR festzulegen wird ein Primer mit der entsprechenden Nukleotidabfolge benötigt, woran die DNA-Polymerase die Nukleotide anbaut. Das Template ist das zu kopierende DNA-Stück, was als Vorlage der Nukleotidsequenz dient. Während der PCR werden folgende Schritte mehrfach wiederholt (Joppien et al., 2011):

Denaturierung: Bei einer Temperatur von 95 °C werden die beiden DNA-Stränge aufgetrennt. Dieser Schritt wird möglichst kurzgehalten, um die Polymerase nicht

zu schädigen. Als Enzym wird die Taq-Polymerase verwendet, die Temperaturen von über 100 °C standhält und eigentlich in sehr heißen Quellen vorkommt.

Annealing: Bei diesem Schritt binden die Primer an die DNA-Sequenz. Die Temperatur ist von der Länge des Primers abhängig. Zu hohe Temperaturen verhindern das Anheften, sodass es zu keiner Produktbildung kommt. Zu niedrige Temperaturen führen zur falschen Bindung der Primer, was in unspezifischen Ergebnissen endet.

Elongation: Hier beträgt die Temperatur 72 °C, was die optimale Arbeitstemperatur der Taq-Polymerase darstellt. Die Polymerase füllt, beginnend am 3'-Ende des Primers, die fehlenden Nukleotide auf. Ein DNA-Strang entsteht.

Die Reaktion läuft in einem Thermocycler ab, die Programmierung kann Tabelle 16 entnommen werden.

TABELLE 16: PROGRAMMIERUNG DES CYCLERS FÜR DIE PCR

Schritt		Temperatur	Zeit
	Deckel Kontrollmodus	100 °C	konstant
1	Inkubation	95 °C	5 min
2	Denaturierung	95 °C	30 s
3	Annealing	60 °C	30 s
4	Elongation	72 °C	45 s
	Gehe 39 mal zu Schritt 2		
5	Finale Elongation	72 °C	7 min
6	Ende	10 °C	dauerhaft

°C = GRAD CELSIUS, MIN = MINUTEN, S = SEKUNDEN

Die für die PCR benötigten Reagenzien sind in Tabelle 17 aufgeführt.

TABELLE 17: REAGENZIEN DER PCR

Reagenz	Menge
10 x Buffer	2,5 µl
dNTP	0,5 µl
Primer reverse	1,25 µl
Primer forward	1,25 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
DNA	1 µl
H2O	18,3 µl

GELELEKTROPHORESE

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von molekularen Stoffen, wie z. B. Nukleinsäuren. Dabei wandern die Moleküle unter Anlage eines elektrischen Feldes durch ein in einer ionischen Pufferlösung liegendes Gel. Die Wandergeschwindigkeit der Stoffe zu den Polen des angelegten elektrischen Feldes hängt von deren Polarität und Molekülgröße ab. Kleine, negativ geladene Moleküle wandern schneller zu der positiv geladenen Elektrode. Außerdem wird die Geschwindigkeit durch die Agarosekonzentration und somit der Porengröße beeinflusst. Nach der Auftrennung können die Moleküle anhand verschiedener Färbemethoden sichtbar gemacht werden. Häufig wird dazu Ethidiumbromid verwendet, was Banden im Gel unter UV-Licht erkennbar macht.

ERSTELLUNG EINES AGAROSEGELS

Jede Gelelektrophorese wurde mit 2%-igem Agarosegel durchgeführt. Hierfür werden mit einer Feinwaage 2 g Agarosepulver in einem Wägeschälchen abgewogen und mit 100 ml 1 x TBE aufgefüllt. Die Mischung muss solange vorsichtig erhitzt werden, bis das Pulver vollständig gelöst ist. Anschließend soll das flüssige Gel unter ständigem Schwenken auf ca. 65 °C abkühlen. Hierbei werden die kettenförmigen Agarosemoleküle über Wasserstoffbrückenbindungen quervernetzt. Je höher die Konzentration der Agarose ist, desto kleiner werden die Poren im Gel und desto fester wird es nach dem Abkühlen. Um die DNA unter dem UV-Licht sichtbar zu machen, wird ein DNA-bindender Farbstoff, z. B. Ethidiumbromid, dem noch flüssigen Gel zugegeben. Man verwendet 2 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Gel. Hierbei unbedingt die Gefahrenhinweise beachten. Weitere Färbungsmöglichkeiten sind HDGreen oder RedSafe. Das Gel in beliebiger Größe gießen und Siebkämme einsetzen. Wichtig ist dabei, dass keine Bläschen beim Befüllen entstehen. Die Kämme können herausgenommen werden, sobald das Gel vollständig erhärtet und abgekühlt ist.

Um das Gel wenige Tage im Kühlschrank aufbewahren zu können, muss es in einem mit 1 x TBE getränkten Tuch in einer Plastikfolie im Kühlschrank gelagert werden.

DURCHFÜHRUNG DER GELELEKTROPHORESE

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wird neben dem Gel eine Gelkammer benötigt. An die Kammer wird Strom angeschlossen, sodass ein elektrisches Feld entsteht. Da die Gelkammer mit dem TAE-Puffer gefüllt ist, wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren durch die Gelporen zum Pluspol. Hiermit wird eine Auftrennung der Moleküle der Größe nach erzielt.

Um die zurückgelegte Strecke während der Elektrophorese zu verifizieren, wird dem PCR-Produkt ein Farbstoff zugefügt. Dazu verdünnt man 200 µl 6x Loading Buffer mit 1 ml Wasser (H₂O). Anschließend befüllt man eine 96-Well Platte mit den zu testenden PCR-Produkten. Pro Probe benutzt man 4 µl PCR-Produkt und 6 µl des verdünnten Loading Buffers. Mit einer Multipipette werden nun bis zu 8 Proben gleichzeitig in die Taschen des im Puffer liegenden Gels gegeben. Die Menge beträgt dabei 10 µl. Durch eine mit 6 µl DNA-Leiter befüllte Tasche am Rand eines Gels, kann die Größe der DNA-Fragmente der Probe bestimmt werden. Hierbei ist die Anzahl der Basenpaare pro entstandene Bande bekannt, sodass ein Rückschluss auf die Größe der DNA-Proben gezogen werden kann. Nach Beendigung der Befüllung wird die Gelelektrophorese gestartet. Die markierten Banden müssen beobachtet werden. Die Dauer der Elektrophorese ist abhängig von der Größe des Gels. Nach Erreichen der gewünschten Laufstrecke, wird das Gerät abgeschaltet und das Gel aus dem Puffer geholt.

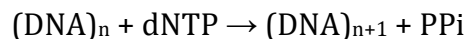
UV-LICHT

Um nun die mit Ethidiumbromid (alternativ Red Safe oder HD Green) markierten DNA-Fragmente sichtbar zu machen, legt man das Gel unter eine UV-Lampe und fotografiert das Ergebnis mit einer Kamera. Bewertet werden die Bandenstärke und die Position der Bande.

PYROSEQUENZIERUNG

Die Pyrosequenzierung ist ein Verfahren, um die Nukleotidabfolge der DNA zu bestimmen. Es dient zum Nachweis unbekannter kurzer DNA-Abschnitte, Methylierungsmuster, bekannter Mutationen oder von Einzelnukleotid

Polymorphismen und erlaubt die Sequenzierung während des Synthesevorgangs. Gemessen wird dabei die Lichtemission, die bei dem Einbau eines Nukleotids entsteht. Zu der zu sequenzierenden DNA werden die vier Nukleotide Guanin, Adenin, Cytosin oder Thymin nacheinander und einzeln in immer wiederkehrender Reihenfolge zugegeben. Ist das Nukleotid komplementär, wird es durch die DNA-Polymerase gebunden und setzt genau ein Pyrophosphat (PPi) frei.

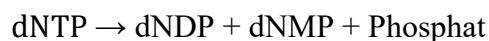


Das Enzym Sulfurylase katalysiert die Reaktion von Adenosinphosphosulfat (APS) und Pyrophosphat zu Adenosintriphosphat (ATP).



Ist ATP vorhanden, oxidiert das Enzym Luciferase D-Luciferin in Oxyluciferin. Fällt es in seinen Grundzustand zurück, wird ein Photon emittiert. Das entstandene Licht wird mittels einer charge-coupled device Kamera detektiert und simultan in einem Pyrogramm als Peak dargestellt. Die Höhe des Peaks ist abhängig von der Menge an emittiertem Licht. Lichtemission ist direkt proportional mit der Menge an gebundenen Nukleotiden.

Nun wird das Enzym Apyrase zugegeben, um ungebundene Nukleotide zu degenerieren. Dies katalysiert zum einen die Reaktion von ATP zu Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinmonophosphat (AMP) und Phosphat, zum anderen die Reaktion von Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) zu Desoxyribonukleosiddiphosphat (dNDP), Desoxyribonukleosidmonophosphat (dNMP) und Phosphat.



Mit Zugabe des nächsten Nukleotids beginnt der Reaktionsablauf von Neuem. Der Vorgang wird solange wiederholt, bis die gesamte DNA sequenziert ist.

Protokoll:

- 1) Pyrosequenzer anschalten und im Programm einen neuen Lauf starten.
- 2) Separate Heizplatte auf 80 °C heizen.
- 3) Gefäße des Vakuumgerätes befüllen. Dabei ist die Reihenfolge zu beachten: 70%iges Ethanol, Denaturierungspuffer, Waschlösung.
- 4) Herstellung des Mastermix. Pro Probe werden 28 µl hochreines Wasser und 40 µl Binding Buffer mit 2 µl Streptavidin Sepharosebeads gemischt. Die Sepharose als Letztes zuzugeben, um ein Absetzen der Beads zu vermeiden.
- 5) Befüllung einer PCR-Platte mit 70 µl Mastermix pro Probe in die entsprechende Öffnung. Nun 10 µl PCR-Produkt dazugeben.
- 6) Die PCR-Platte für 5 Minuten auf eine Rüttelplatte stellen und bei mittlerer Geschwindigkeit mischen.
- 7) In eine zum Pyrosequenzer passende Platte (Q96 HS Plate) 11,5 µl Annealing Buffer und 0,5 µl Primer pro Öffnung pipettieren.
- 8) Vakuumgerät anschalten und für 20 Sekunden mit Wasser spülen.
- 9) Die befüllte PCR-Platte auf die Vorrichtung stellen und den Vakuumkopf für 10-15 Sekunden eintauchen.
- 10) Den Vakuumkopf für jeweils 5 Sekunden zuerst in 70 %-iges Ethanol, dann in Denaturierungslösung und als letzten Schritt in die Waschlösung halten. Wichtig ist, dass zwischen den Waschsritten die komplette Flüssigkeit aus dem Vakuumkopf und dem Schlauch gepumpt wird. Erst dann in das nächste Gefäß eintauchen.
- 11) Die Pyro-Platte an die gekennzeichnete Stelle anbringen und den Vakuumkopf darüber halten. Dabei nicht die Füllung der Platte absaugen.
- 12) Das Vakuum abstellen und die Beads vom Vakuumkopf in die Pyro-Platte schütteln.

- 13) Die Pyro-Platte wird für 2 Minuten auf 80 °C erhitzt.
- 14) Befüllen der Kartusche des Pyrosequenzers. Es werden Substrat, Enzyme und die Nukleotide Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin zugegeben.
- 15) Testdurchgang im Pyrosequenzer und Kontrolle der abgegebenen Tropfen auf Menge und Position.

REVERSE TRANSKRIPTION

Um die isolierte RNA für eine quantitative real time PCR (RT-PCR) verwenden zu können, muss in einem nächsten Schritt komplementäre DNA (cDNA) hergestellt werden. Bei der reversen Transkription wird durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase RNA in DNA umgeschrieben. Synthetisiert wird zuerst der komplementäre DNA-Strang, der mit dem RNA-Strang hybridisiert. Im nächsten Schritt wird die RNA abgebaut und der DNA-Strang durch komplementäre Basen ergänzt. Die so entstandene DNA wird komplementäre DNA (cDNA) genannt (Jacobi & Partovi, 2011). Tabelle 18 enthält die benötigten Reagenzien mit Mengenangaben für die reverse Transkription, Tabelle 19 zeigt die Cyclereinstellungen dafür.

TABELLE 18: REAGENZIEN DER REVERSE TRANSKRIPTION

Reagenz	Menge
1 µg RNA	1 µl
OligodT18	1 µl
dNTP	1 µl
5xRT Puffer	4 µl
RNase Inhibitor	0,5 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
H2O	11,5 µl
Gesamtvolumen	20 µl

TABELLE 19: CYCLEREINSTELLUNG REVERSE TRANSKRIPTION

Zyklus	Temperatur
Deckel	104 °C
30 Minuten	50 °C
5 Minuten	85 °C
Dauerhaft	4 °C

°C = GRAD CELSIUS

PCR MIT CDNA

Um eine quantitative RT-PCR durchführen zu können, wird die entsprechende Sequenz der cDNA durch eine PCR vervielfältigt. Die Reagenzien und die Mengenangaben sind TABELLE 20 zu entnehmen. Die Programmierung des Cyclers ist in Tabelle 21 zu finden.

TABELLE 20: REAGENZIEN DER PCR MIT CDNA

Reagenz	Menge
10 x Buffer	5 µl
dNTP	1 µl
Primer reverse	1 µl
Primer forward	1 µl
Taq-Polymerase	0,25 µl
cDNA	2 µl
H2O	39,75 µl
Gesamtmenge	50 µl

TABELLE 21: CYCLERPROGRAMMIERUNG DER PCR MIT CDNA

Schritt		Temperatur	Zeit
	Deckel Kontrollmodus	105 °C	konstant
1	Inkubation	95 °C	1 min
2	Denaturierung	95 °C	30 s
3	Annealing	60 °C	30 s
4	Elongation	72 °C	1 min
	Gehe 29 mal zu Schritt 2		
6	Ende	4 °C	dauerhaft

°C = GRAD CELSIUS, MIN = MINUTE, S = SEKUNDE

GELELEKTROPHORESE MIT CDNA

Die Herstellung des Gels läuft nach den oben beschriebenen Prinzipien. Es wird allerdings ein 1,2 %-iges Agarosegel hergestellt. Dazu verwendet man 1,2 g Agarosepulver und 100 ml 1 x TBE. Nach dem Erhitzen und Lösen des Agarosepulvers wird 5 µl HDGreen Farbstoff dazugegeben. Das Gel in beliebiger Größe gießen und polymerisieren lassen. Die Elektrophoresekammer wird mit TBE Puffer gefüllt, das Gel eingelegt und die Gelkammern anschließend mit einer Mischung aus 10 µl Stock und 10 µl Loading Buffer befüllt. Auch hier ist an die DNA-Leiter zu denken.

QUANTITATIVE REAL TIME PCR

Ziel einer RT-PCR ist die Quantifizierung des PCR-Produkts. Die Menge des Produktes kann direkt während der Bildung erfasst werden. Es besteht die Möglichkeit die ursprüngliche eingesetzte Menge an DNA zu errechnen, da nach jedem Zyklus genau doppelt so viel DNA vorliegt (Joppien et al., 2011). Eingesetzt wird der interkalierende Farbstoff SYBR Green. SYBR Green fluoresziert wenn es in doppelsträngige DNA interkaliert und anschließend mit Licht angeregt wird. Die Fluoreszenz ist direkt proportional zur amplifizierten DNA-Menge und wird detektiert. Zu beachten ist, dass zu Beginn und zum Ende die Arbeitsbedingungen der DNA-Polymerase nicht ideal sind. Zu Beginn herrscht eine begrenzte Enzymaktivität, am Ende sind die Nukleotide verbraucht (Joppien et al., 2011).

REAL TIME PCR PROTOKOLL

Die in Tabelle 22 genannten Reagenzien werden in eine auf Eis gestellte 96-Well Platte pipettiert. Bei der Plattenbelegung ist zu beachten, dass pro RT-PCR mindestens Duplikate angelegt werden, um später einen Mittelwert bilden zu können. Außerdem müssen auf jeder Platte Housekeeping Gene (HKG) analysiert werden. Ein HKG wird unabhängig vom Zellstadium, Zellzyklus und von äußeren Einflüssen exprimiert und dient als Referenz. Es wurden die drei HKGs Glycerinaldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase (GAPDH), β -Aktin, und Beta-2-Mikroglobulin (β 1M) verwendet. Wichtig ist außerdem eine Verdünnung der cDNA auf 1:10. Es wurde jeweils 1 μ g RNA für die Transkription in cDNA verwendet. Vor dem Einlegen der Platte in den Cyclyer wird diese mit einer Klebefolie abgedeckt und bei 1500 rpm für 2 Minuten zentrifugiert.

TABELLE 22: REAGENZIEN DER RT-PCR

Reagenz	Menge
SYBR Green Mix	10 μ l
cDNA (1:10 verdünnt)	8 μ l
Primer reverse	0,8 μ l
Primer forward	0,8 μ l
H2O	0,4 μ l
Gesamtmenge	20 μ l

Zu Beginn wird durch 10 minütiges Erhitzen die iTaq-Polymerase aktiviert. Dies geschieht durch die Zerstörung eines Antikörpers, der die Polymerase hemmt. In den darauffolgenden Amplifikationszyklen wiederholen sich die Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation für insgesamt 40 Zyklen. Die Denaturierung findet bei 95 °C für 15 Sekunden statt und dient der Trennung der DNA-Doppelstränge. In der Annealing Phase wird die Temperatur für 60 Sekunden auf 60 °C abgesenkt und die Primer lagern sich komplementär an die DNA an. Nun folgt die Elongationsphase, in der die DNA- Polymerase an die Primer bindet und den komplementären DNA-Strang aus dNTPs synthetisiert.

Auswertung der Ergebnisse der RT-PCR:

Die erste Auswertung erfolgt mit der ABI7500 Software.

Von allen Kontrollen wird aus den beiden Cycle Threshold (CT) Werten der Mittelwert gebildet und anschließend ein Mittelwert aller Kontrollen errechnet. Dieser ermittelte Wert dient für alle folgenden Rechnungen als Kontrolle.

CT1 und CT2 einer Probe dürfen maximal eine Differenz von 0,5 aufweisen. Ist dies der Fall, wird der Mittelwert errechnet. Liegt die Differenz der beiden CT-Werte über 0,5 muss die RT-PCR-Messung dieses Patienten wiederholt werden, da eine Verunreinigung zu vermuten ist.

Nun wird das Gen im Vergleich zum Housekeeping Gen beurteilt. Tritt der CT-Wert des Gens zeitlich schneller als der des HKGs auf, spricht man von einer Überproduktion. Umgekehrt liegt eine Unterproduktion vor, wenn die Schmelzkurve nach dem HKG zeitlich versetzt erscheint.

Man berechnet zunächst ΔCT : $CT(\text{Probe}) - CT(\text{HKG}) = \Delta CT$

Nun folgt die Berechnung von $\Delta\Delta CT$: $\Delta CT(\text{Pat}) - \Delta CT(\text{Ko}) = \Delta\Delta CT$

Als letzter Berechnungsschritt wird jetzt $2^{-\Delta\Delta CT}$ errechnet. Dies gilt auch für die Kontrolle. Da $\Delta CT(\text{Ko}) - \Delta CT(\text{Ko}) = \text{Null}$ und $2^0 = 1$ ergibt, ist die Kontrolle immer bei 1 (Fold) angesetzt.

STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistischen Berechnungen wurden eigens mit der Computersoftware IBM SPSS Statistics Version 24 durchgeführt.

Alle Ergebnisse der Pyrosequenzierung und der RT-PCR wurden in SPSS ausgewertet. Im ersten Schritt zeigte der Shapiro-Wilk-Test die Normalverteilung. Die Hypothese des Tests lautet, dass die Stichprobe normalverteilt ist.

Sind die beiden zu vergleichenden Proben normalverteilt, folgte anschließend der Zweistichproben T-Test, da zwei unabhängige Stichproben analysiert wurden. Überprüft wird, ob sich die Mittelwerte der beiden Proben unterscheiden.

Ist mindestens eine der beiden Proben nicht normalverteilt, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt.

Zur Berechnung der Korrelation wurde bei Stichprobe > 20 und Normalverteilung der Korrelationskoeffizient nach Pearson bestimmt. Bei Fallzahlen < 20 wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet.

Auf eine Adjustierung des alpha-Fehlers zur Vermeidung des Effekts durch multiples Testen wurde verzichtet, da bis auf FOXP3 alle Parameter explorativ untersucht wurden.

In dieser Arbeit wurden Resultate mit einem p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Alle Ergebnisse sind tabellarisch festgehalten, signifikante Werte sind unterstrichen und mit * gekennzeichnet.

Die Diagramme wurden in Excel erstellt und in PowerPoint überarbeitet.

ERGEBNISSE

TESTUNG DES VERSUCHAUFBAUS

Um mögliche Störfaktoren bei der Pyrosequenzierung zu reduzieren, wurden verschiedene Vortests durchgeführt. Neben der Zuverlässigkeit der Methylierungsmessung wurden auch Störfaktoren im Ablauf ermittelt.

Artifiziiell hergestellte, bereits Bisulfit-konvertierte, vollständig methylierte und demethylierte DNA wurde verwendet, um die Genauigkeit der Methylierung zu testen. Für jeden Primer wurde zuerst eine PCR und im Anschluss die Pyrosequenzierung durchgeführt. Es wurden eine Negativkontrolle und verschiedene Konzentrationen der Methylierung (0 %, 25 %, 50 %, 100 %) getestet. Ziel war nach der Pyrosequenzierung einen ähnlichen Methylierungsanteil zu erhalten. Die Ergebnisse dieses Vorversuchs in Prozent Methylierung sind in Tabelle 23 aufgelistet.

TABELLE 23: ERGEBNISSE DER TESTUNG: PYROSEQUENZIERUNG ARTFIZIELL METHYLIERTER DNA

Gen [% Methylierung]	0 %	25 %	50 %	100 %
FOXP3 Enhancer 1	6	23	39	82
FOXP3 Enhancer 2	3	24	39	83
FOXP3 Promotor 1	0	24	50	82
FOXP3 Promotor 2	4	24	47	83
FOXP3 Promotor 3	4	21	47	82
GATA3	3	18	40	83
RORC1 Sequenz 1	3	23	47	68
RORC1 Sequenz 2	3	25	41	78
RORC1 Sequenz 3	2	22	32	72
RORC2 Sequenz 1	6	23	47	83
RORC2 Sequenz 2	8	24	43	72
STAT3	4	21	39	95
STAT4	3	34	56	85
STAT5a	5	22	37	81
STAT5B-A1	3	14	50	73
TBX21	2	20	41	89

ANGEGEBEN SIND MITTELWERTE IN PROZENT.

Abweichungen der Methylierung kommen durch das Pipettieren und durch prozessbedingte Ungenauigkeiten zustande. Zusätzlich muss davon ausgegangen werden, dass eine hundertprozentige Methylierung der künstlich methylierten DNA nicht erreicht wird. Toleriert wurden Abweichungen bis zu 10 % bei der Methylierung von 0 %, 25 % und 50 %. Bei 100% wurden Abweichungen bis 20 % toleriert. Nicht in dieser Range liegende Werte mussten erneut gemessen werden. Auch nach wiederholter Testung zeigte sich die ursprünglich 100 % methylierte DNA bei RORC1 (durchschnittlich bei 73%) und STAT5 (durchschnittlich bei 77%) instabil. Alle weiteren Werte lagen im Durchschnitt im oben genannten Bereich.

Des Weiteren sollten ungleiche Methylierungen im Prozess selbst ausgeschlossen werden. Es wurde DNA von zwei verschiedenen Proben (1 und 2) mit den unten genannten Primern pyrosequenziert. Die Proben wurden jeweils nochmal getrennt und eigens isoliert und analysiert (A und B gekennzeichnet). Der Methylierungsgrad sollte sich nach dem Procedere der Bisulfitkonvertierung, der PCR und der Pyrosequenzierung nicht wesentlich unterscheiden. Differenzen von über 3 % in einem Durchgang wurden als fehlerhaft gewertet und wiederholt. Aus Probe 1 war dies die Sequenzierung von RORC2 Pyro 1 mit 6,3 %. Aus der Probe 2 zeigte RORC1 Sequenz 1 mit 4,5 % erhöhte Abweichungen. Tabelle 24 zeigt die Testergebnisse dieses Vorversuchs.

TABELLE 24: TESTERGEBNISSE VORVERSUCH

Probe [% Methylierung]	1			2			3		
	A	B	Δ	A	B	Δ	A	B	Δ
FOXP3 Enhancer 1	2,8	3,8	1,0	5,4	5,0	0,4	5,0	4,8	0,2
FOXP3 Enhancer 2	5,9	4,9	1,0	4,3	5,0	0,7	4,9	4,6	0,3
FOXP3 Promotor 1	60,0	63,0	3,0	64,0	63,0	1,0			
FOXP3 Promotor 2	68,5	70,5	2,0	67,5	69,5	2,0			
RORC1 1	31,8	31,8	0	35,3	30,8	4,5	29,8	27,3	2,5
RORC1 2	20,0	22,0	2,0	19,0	22,0	3,0	27,5	24,5	3,0
RORC2 1	26,0	19,7	6,3	27,7	26,0	1,7	26,2	25,5	0,7
RORC2 2	22,0	23,0	1,0	27,0	24,5	2,5	21,0	21,5	0,5
GATA3	2,5	2,3	0,2	4,0	4,3	0,3			
STAT3	4,6	5,0	0,4	4,0	4,3	0,3			
STAT4	93,0	92,5	0,5	91,8	91,0	0,8			
STAT5A	10,3	7,7	2,6	9,7	10,3	0,6	7,3	9,0	1,7
STAT5B-A1	2,0	2,2	0,2	2,7	3,5	0,8			
TBX21	8,8	9,0	0,2	7,8	8,8	1,0			

GEZEIGT SIND ERGEBNISSE DER PYROSEQUENZIERUNG VON DREI VERSCHIEDENEN DNA PROBEN, DIE IN JEWEILS ZWEI DURCHGÄNGEN VERARBEITET WURDEN. DIE WERTE SIND IN PROZENT METHYLIERUNG ANGEZEIGT. A = DURCHGANG A, B = DURCHGANG B, Δ = DIFFERENZ VON A UND B.

Zur Kontrolle wurden Gene mit einem Methylierungsunterschied über 3 % in einem weiteren Durchgang getestet. Hierzu wurde neues Material (Probe 3) verwendet. Der Mittelwert aller errechneten Differenzen betrug 1,46 %. Die maximale Differenz zweier Durchläufe einer Probe betrug 6,3 %. Da sich dieser hohe Wert nur bei Probe 1 im RORC2 Gen zeigte, nicht aber in der Probe 2 (Differenz 1,7 %) und bei der Kontrollprobe 3 (Differenz 0,7 %), konnte dieser Wert toleriert werden. STAT3 wies mit 0,25 % die geringste Differenz auf. Die größte Differenz zeigte sich mit 2,67 % bei dem Gen RORC1 Sequenz 2.

Beide Vorversuche zeigten stabile Ergebnisse, sodass die Proben gemessen werden konnten.

ANGSTPATIENTEN

DEMOGRAFISCHE DATEN

Alle demografischen Daten sind Tabelle 25 zu entnehmen. Das Alter der Patientinnen mit Angsterkrankung lag durchschnittlich bei $36,5 \pm 11,4$ Jahren und umfasste eine Spannweite von 18-57 Jahren. Es wurden lediglich weibliche Personen eingeschlossen, da Frauen zwei bis dreimal häufiger erkranken als Männer (Strohle et al., 2018). Die Kontrollpersonen waren im Durchschnitt $36,8 \pm 11,3$ Jahre alt und lagen zwischen dem 19. und dem 58. Lebensjahr. Kontrollpersonen wurden den Patientinnen unter Berücksichtigung des Alters und des Geschlechts zugeordnet. Eine Depression als Komorbidität gaben 20 der 47 Angstpatienten an. Als Raucher bezeichneten sich lediglich 15 von 47 Patienten. Bei den gesunden Kontrollen wurden diese Angaben nicht erhoben.

TABELLE 25: DEMOGRAFISCHE DATEN DER ANGSTPATIENTINNEN

	Patientinnen	Kontrollen
Anzahl	47	48
Alter (Jahre) ¹	$36,5 \pm 11,4$	$36,8 \pm 11,3$
Alter bei Krankheitsbeginn (Jahre) ¹	$29,6 \pm 11,8$	-
Krankheitsdauer (Jahre) ¹	$6,77 \pm 7,17$	-
Geschlecht (männlich / weiblich)	0/47	0/48
Depression (ja / nein / nicht dokumentiert) ²	20/21/6	-
Raucher (ja / nein / nicht dokumentiert) ³	15/29/3	-
Agoraphobie (ja / nein / nicht dokumentiert) ⁴	29/18/0	-
Antidepressiva (ja/nein/nicht dokumentiert) ⁵	20/25/2	-

¹ WERTE ANGEZEIGT IN MITTELWERT \pm STANDARDABWEICHUNG.

² DIE DIAGNOSE DEPRESSION ERFOLGTE ANHAND DER DSM-IV KRITERIEN: ≥ 5 SYMPTOME DER FOLGENDEN ÜBER MINDESTENS 2 WOCHEN: DEPRESSIVE VERSTIMMUNG, VERMINDERTES INTERESSE, GEWICHTS-/APPETITVERLUST, SCHLAFLOSIGKEIT/VERMEHRTER SCHLAF, PSYCHOMOTORISCHE UNRUHE/VERLANGSAMUNG, MÜDIGKEIT/ENERGIEVERLUST, GEFÜHLE VON WERTLOSIGKEIT/SCHULD, KONZENTRATIONS- UND ENTSCHEIDUNGSPROBLEME, SUIZIDGEDANKEN ODER -HANDLUNGEN (HAUTZINGER & THIES, 2009).

³ DEFINITION VON RAUCHEN: KONSUM VON MEHR ALS 2 ZIGARETTEN PRO TAG.

⁴ DIE DIAGNOSE AGORAPHOBIE ERFOLGTE ANHAND DER DSM-IV KRITERIEN: ANGST VOR ORTEN, AN DENEN EINE FLUCHT SCHWIERIG ERSCHEINT ODER BEI PANIKATTACKEN KEINE HILFE ERREICHBAR SEIN KÖNNTE. VERMEIDUNGSVERHALTEN DIESER SITUATIONEN ODER DURCHSTEHEN DIESER NUR MIT ANGST MÖGLICH.

⁵ SSRI: N = 18, ATYPISCHES NEUROLEPTIKUM + SSRI: N = 1, TRIZYKLISCHES ANTIDEPRESSIVA: N = 1, TETRAZYKLISCHES ANTIDEPRESSIVA: N = 1, SSRI + NEUROLEPTIKUM (OFF-LABEL USE): N = 1

TABELLE ENTNOMMEN AUS (PRELOG ET AL., 2016) UND MODIFIZIERT.

ERGEBNISSE DER PYROSEQUENZIERUNG

Bei den Proben von Patientinnen mit Angststörung wurden die Gene FOXP3 Promotor und FOXP3 Enhancer analysiert. Die Ergebnisse der Pyrosequenzierung der verschiedenen Gene unterteilt in Patientinnen und Kontrollen, sowie dem p-value sind Tabelle 26 zu entnehmen.

TABELLE 26: ERGEBNISSE PYROSEQUENZIERUNG ANGSTPATIENTINNEN

Gen	Patientinnen	Kontrollen	p-value
	Methylierung in % MW ± SD		
FOXP3 Enhancer Sequenz 1	39,47 ± 2,50	40,29 ± 2,31	0,311
Position 1	40,03 ± 2,85	40,42 ± 3,41	0,376
Position 2	37,48 ± 3,18	38,38 ± 2,85	0,291
Position 3	40,89 ± 3,79	42,09 ± 2,71	0,202
FOXP3 Enhancer Sequenz 2	38,01 ± 2,68	38,18 ± 1,77	0,746
Position 1	37,74 ± 4,05	37,62 ± 3,31	0,877
Position 2	41,00 ± 3,39	40,19 ± 3,56	0,258
Position 3	37,46 ± 3,56	38,71 ± 3,22	0,077
Position 4	30,56 ± 4,61	30,65 ± 3,31	0,699
Position 5	44,51 ± 3,25	44,80 ± 2,63	0,982
Position 6	40,13 ± 3,36	40,70 ± 2,47	0,757
Position 7	34,66 ± 4,02	34,57 ± 3,06	0,909
FOXP3 Enhancer Sequenz 1 + 2	38,45 ± 2,47	38,74 ± 1,66	0,777
FOXP3 Promotor Sequenz 1	69,38 ± 4,72	66,83 ± 4,60	<u>0,006*</u>
FOXP3 Promotor Sequenz 2	79,00 ± 2,33	78,38 ± 1,86	<u>0,030*</u>
Position 1	90,21 ± 2,12	90,20 ± 1,86	0,621
Position 2	75,76 ± 2,36	74,89 ± 1,90	0,054
Position 3	75,03 ± 3,97	74,13 ± 2,98	<u>0,011*</u>
Position 4	75,01 ± 3,31	74,31 ± 2,66	0,171
FOXP3 Promotor Sequenz 1 + 2	77,05 ± 2,37	76,09 ± 2,11	<u>0,011*</u>

VERGLEICH DER PROZENTUALEN METHYLIERUNG ZWISCHEN PATIENTINNEN UND GESUNDEN KONTROLLEN. DIE WERTE FÜR MW ± SD SIND IN PROZENT ANGEZEIGT. MW = MITTELWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Die prozentuale FOXP3 Promotormethylierung der einzeln untersuchten Positionen zeigt Diagramm 1. Sowohl Sequenz 1 (p = 0,06) als auch Sequenz 2 (p = 0,30) zeigten sich bei Angstpatientinnen signifikant höher methyliert als bei der Kontrollgruppe. Über alle Positionen hinweg zeigte sich eine höhere FOXP3 Methylierung in PBMCs bei Angstpatientinnen.

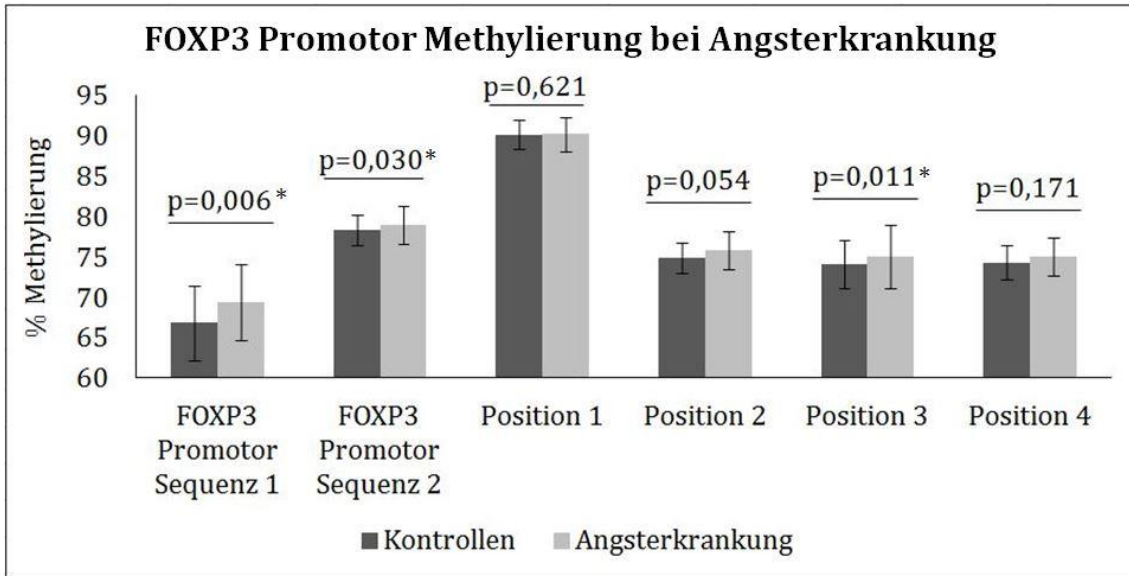


DIAGRAMM 1: FOXP3 PROMOTOR METHYLIERUNG BEI ANGSTERKRANKUNG

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI ANGSTERKRANKUNG UND KONTROLLEN. P = P-VALUE, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Diagramm 2 zeigt die prozentuale Methylierung von FOXP3 Enhancer. Es waren keine signifikanten Unterschiede der Methylierung zwischen Patientinnen mit Angsterkrankung und gesunden Kontrollen eruierbar. Auch durch die Unterteilung der einzelnen Positionen konnte keine Signifikanz erzielt werden.

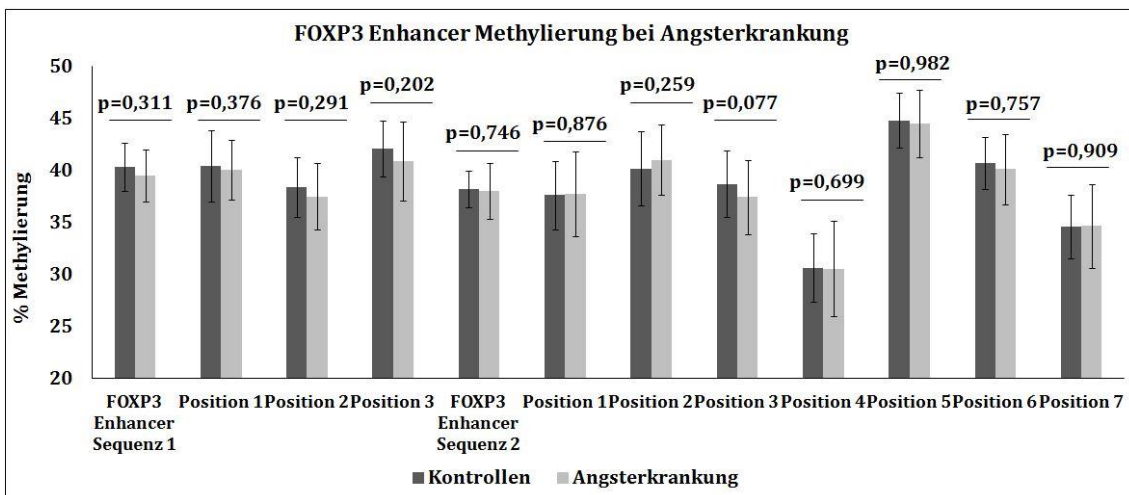


DIAGRAMM 2: FOXP3 ENHANCER METHYLIERUNG BEI ANGSTERKRANKUNG

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI ANGSTERKRANKUNG UND KONTROLLEN. P = P-VALUE, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Rauchende und nicht rauchende Angstpatientinnen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der FOXP3 Methylierung von PBMCs. Als Rauchen wurde ein Konsum von mehr als zwei Zigaretten pro Tag gewertet, was durch die Patientin angegeben wurde. Die prozentuale Methylierung ist in Tabelle 27 angegeben.

TABELLE 27: METHYLIERUNG BEI ANGSTERKRANKUNG BEI RAUCHERN UND NICHTRAUCHERN

Angstpatientinnen	Raucher	Nichtraucher	p-value
	Methylierung in % MW \pm SD		
FOXP3 Enhancer Sequenz 1	39,15 \pm 2,11	39,52 \pm 2,86	0,250
Position 1	39,78 \pm 3,24	40,06 \pm 2,95	0,683
Position 2	36,86 \pm 2,09	37,31 \pm 3,36	0,340
Position 3	40,81 \pm 3,22	41,19 \pm 4,04	0,544
FOXP3 Enhancer Sequenz 2	38,25 \pm 2,23	37,78 \pm 3,04	0,892
Position 1	37,29 \pm 3,14	37,80 \pm 4,23	0,542
Position 2	41,00 \pm 3,27	41,05 \pm 3,68	0,949
Position 3	38,37 \pm 2,96	37,32 \pm 3,77	0,325
Position 4	31,35 \pm 3,44	29,75 \pm 5,12	0,308
Position 5	45,12 \pm 2,31	44,06 \pm 3,79	0,552
Position 6	40,21 \pm 2,93	39,77 \pm 3,67	0,931
Position 7	34,39 \pm 4,24	34,73 \pm 4,16	0,911
FOXP3 Promotor Sequenz 1	70,43 \pm 5,47	68,89 \pm 4,58	0,667
FOXP3 Promotor Sequenz 2	79,21 \pm 2,45	78,74 \pm 2,35	0,328
Position 1	90,15 \pm 2,33	90,14 \pm 2,09	0,638
Position 2	76,09 \pm 1,81	75,25 \pm 1,83	0,074
Position 3	75,08 \pm 5,44	74,77 \pm 3,43	0,386
Position 4	75,50 \pm 2,24	74,81 \pm 3,88	0,814

VERGLEICH DER PROZENTUALEN METHYLIERUNG. ALS RAUCHEN WURDE EIN KONSUM VON MEHR ALS ZWEI ZIGARETTEN PRO TAG DEFINIERT UND DIE ERFASSUNG ERFOLGTE DURCH BEFRAGUNG DER PATIENTIN. DIE WERTE FÜR MW \pm SD SIND IN PROZENT ANGEZEIGT. MW = MITTELWERT, P-VALUE = SIGNIFIKANZWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG.

Patientinnen, die neben der Angsterkrankung noch an Depression leiden, zeigten lediglich an Position 5 der zweiten Sequenz am FOXP3 Enhancer eine signifikant höhere Methylierung als Patientinnen ohne Depression als Komorbidität. Die Ergebnisse sind in Tabelle 28 aufgeführt.

TABELLE 28: METHYLIERUNG BEI ANGSTERKRANKUNG MIT UND OHNE DEPRESSION

Angstpatientinnen	mit Depression	ohne Depression	p-value
	Methylierung in % MW \pm SD		
FOXP3 Enhancer Sequenz 1	39,45 \pm 2,42	39,27 \pm 3,04	0,999
Position 1	39,95 \pm 2,67	39,70 \pm 3,44	0,408
Position 2	36,90 \pm 3,31	37,58 \pm 3,05	0,493
Position 3	41,61 \pm 3,62	40,46 \pm 3,88	0,730
FOXP3 Enhancer Sequenz 2	38,16 \pm 2,31	37,82 \pm 3,39	0,771
Position 1	38,01 \pm 4,10	37,29 \pm 4,25	0,587
Position 2	40,38 \pm 2,68	41,73 \pm 4,13	0,228
Position 3	38,20 \pm 3,51	36,70 \pm 3,90	0,203
Position 4	30,19 \pm 4,46	30,68 \pm 5,13	0,745
Position 5	45,20 \pm 2,92	43,34 \pm 3,78	<u>0,023*</u>
Position 6	39,68 \pm 2,76	40,53 \pm 4,17	0,376
Position 7	34,80 \pm 3,73	35,07 \pm 4,45	0,834
FOXP3 Promotor Sequenz 1	68,55 \pm 5,65	69,81 \pm 3,76	0,985
FOXP3 Promotor Sequenz 2	78,92 \pm 1,83	78,69 \pm 2,75	0,315
Position 1	90,34 \pm 1,72q	90,12 \pm 2,61	0,574
Position 2	75,81 \pm 2,90	75,33 \pm 1,57	0,513
Position 3	75,44 \pm 3,08	74,26 \pm 4,98	0,481
Position 4	74,64 \pm 2,47	74,98 \pm 4,17	0,102

VERGLEICH DER PROZENTUALEN METHYLIERUNG BEI ANGSTERKRANKUNG MIT UND OHNE DEPRESSION ALS KOMORBIDITÄT. DIE DEFINITION DER DEPRESSION IST TABELLE 25 ZU ENTNEHMEN. DIE WERTE FÜR MW \pm SD SIND IN PROZENT ANGEGBEN. MW = MITTELWERT, P-VALUE = SIGNIFIKANZWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Eine Analyse der Patientendaten mit und ohne medikamentöse Therapie zeigte im Enhancer keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse sind in Tabelle 29 dargestellt. Im Promotor jedoch konnte eine signifikant höhere Methylierung durch Medikamente gezeigt werden (p = 0,012). Die Definition der medikamentösen Therapie ist Tabelle 25 zu entnehmen.

TABELLE 29: METHYLIERUNG BEI ANGSTERKRANKUNG MIT UND OHNE MEDIKATION

Angstpatientinnen	mit Medikamenten	ohne Medikamente	p-value
	Methylierung in % MW ± SD		
FOXP3 Enhancer 1	38,95 ± 3,26	39,80 ± 1,76	0,631
Position 1	39,67 ± 3,67	40,27 ± 2,15	0,664
Position 2	36,82 ± 2,76	37,48 ± 3,05	0,454
Position 3	40,35 ± 4,43	41,66 ± 2,90	0,265
FOXP3 Enhancer 2	37,59 ± 3,19	38,21 ± 2,30	0,568
Position 1	36,31 ± 4,63	38,52 ± 3,22	0,079
Position 2	40,33 ± 3,49	41,71 ± 3,31	0,283
Position 3	37,29 ± 3,51	37,73 ± 3,73	0,685
Position 4	31,06 ± 4,42	29,76 ± 4,72	0,346
Position 5	43,93 ± 4,03	44,83 ± 2,60	0,500
Position 6	40,12 ± 3,77	39,95 ± 3,15	0,673
Position 7	34,12 ± 4,04	34,96 ± 4,11	0,497
FOXP3 Enhancer 1 + 2	38,04 ± 3,18	38,69 ± 1,81	0,648
FOXP3 Promotor 1	67,90 ± 4,62	70,35 ± 4,77	0,089
FOXP3 Promotor 2	78,12 ± 2,57	79,65 ± 1,99	<u>0,036*</u>
Position 1	89,51 ± 2,49	90,78 ± 1,16	0,087
Position 2	75,53 ± 3,03	75,95 ± 1,78	0,244
Position 3	73,87 ± 4,77	75,79 ± 3,17	0,157
Position 4	73,58 ± 2,40	76,06 ± 3,66	<u>0,004*</u>
FOXP3 Promotor 1 + 2	75,99 ± 2,54	77,79 ± 1,98	<u>0,012*</u>

VERGLEICH DER PROZENTUALEN METHYLIERUNG BEI ANGSTERKRANKUNG MIT UND OHNE MEDIKAMENTÖSER THERAPIE. DIE DEFINITION DER MEDIKATION IST TABELLE 25 ZU ENTNEHMEN. DIE WERTE FÜR MW ± SD SIND IN PROZENT ANGEZEIGT. MW = MITTELWERT, P-VALUE = SIGNIFIKANZWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Die FOXP3 Promotor Methylierung korreliert negativ mit dem Krankheitsbeginn. Für FOXP3 Sequenz 1 gilt $R = -0,532$ bei $p = 0,0001$ nach Pearson und FOXP3 Sequenz 2 zeigt $R = -0,304$ bei $p = 0,045$ nach Spearman. Damit zeigt sich, dass je früher eine Krankheit beginnt, desto höher ist die Methylierung am Promotor. Am Enhancer ist dieser Zusammenhang nicht eruierbar.

Eine signifikante negative Korrelation zwischen Alter und Methylierung zeigte sich bei FOXP3 Promotor lediglich an Position 4 der zweiten Sequenz. Je höher das Alter, desto niedriger die Methylierung. Signifikante Korrelationen an anderen CpGs oder am FOXP3 Enhancer zeigten sich nicht. Die Korrelationen sind in Tabelle 30 berechnet.

TABELLE 30: KORRELATION DER METHYLIERUNG MIT DEM ALTER, DEM ALTER BEI KRANKHEITSBEGINN UND DER KRANKHEITSDAUER

Angstpatientinnen	Alter		Alter bei Krankheitsbeginn		Krankheitsdauer	
	K	p-value	K	p-value	K	p-value
FOXP3 Promotor 1 (Pearson)	-,004	0,972	-,532	<u>0,0001*</u>	,324	<u>0,034*</u>
FOXP3 Promotor 2 (Spearman)	-,233	0,114	-,304	<u>0,045*</u>	,168	0,282
Position 1 (Spearman)	-,191	0,198	-,336	<u>0,026*</u>	,098	0,533
Position 2 (Pearson)	-,134	0,195	-,120	0,404	,150	0,337
Position 3 (Spearman)	-,058	0,699	-,120	0,439	,109	0,486
Position 4 (Spearman)	-,299	<u>0,041*</u>	-,206	0,179	,009	0,956
FOXP3 Enhancer 1	-,025	0,869	-,001	0,997	-,121	0,439
Position 1 (Spearman)	-,085	0,568	,053	0,731	-,114	0,467
Position 2 (Pearson)	,145	0,161	-,108	0,483	,086	0,585
Position 3 (Spearman)	-,174	0,242	-,017	0,912	-,167	0,285
FOXP3 Enhancer 2	,063	0,672	,064	0,682	-,177	0,255
Position 1 (Pearson)	-,005	0,960	-,031	0,841	-,077	0,623
Position 2 (Pearson)	,098	0,345	-,116	0,453	,091	0,560
Position 3 (Pearson)	,172	0,095	,154	0,319	,097	0,536
Position 4 (Spearman)	-,009	0,954	,010	0,950	-,193	0,216
Position 5 (Spearman)	-,215	0,146	-,116	0,454	-,180	0,249
Position 6 (Spearman)	-,015	0,920	-,092	0,554	-,051	0,747
Position 7 (Pearson)	,262	<u>0,010*</u>	,079	0,612	,187	0,230

K = KORRELATIONSKOEFFIZIENT, P-VALUE = SIGNIFIKANZWERT, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050. IN KLAMMERN IST DER JEWEILS ZUR BERECHNUNG DER KORRELATION ZUGRUNDE LEGENDE TEST JE NACH NORMALVERTEILUNG ANGEGEBEN.

Ist zusätzlich zur Angststörung noch eine Agoraphobie diagnostiziert, gibt es keine signifikante Veränderung der Methylierung am FOXP3 Promotor und Enhancer. Die Ergebnisse der Methylierung sind in Tabelle 31 aufgeführt.

TABELLE 31: METHYLIERUNG BEI ANGSTPATIENTINNEN MIT UND OHNE AGORAPHOBIE

Angstpatientinnen	mit Agoraphobie	ohne Agoraphobie	p-value
	Methylierung in % MW ± SD		
FOXP3 Promotor Sequenz 1	68,87 ± 3,81	70,14 ± 5,87	0,069
FOXP3 Promotor Sequenz 2	78,76 ± 2,32	79,27 ± 2,31	0,646
FOXP3 Enhancer Sequenz 1	39,33 ± 3,35	39,68 ± 2,89	0,381
FOXP3 Enhancer Sequenz 2	37,97 ± 2,38	38,07 ± 3,23	0,694

VERGLEICH DER PROZENTUALEN METHYLIERUNG BEI ANGSTERKRANKUNG MIT UND OHNE AGORAPHOBIE. DIE DEFINITION DER AGORAPHOBIE IST TABELLE 25 ZU ENTNEHMEN. DIE WERTE FÜR MW ± SD SIND IN PROZENT ANGEGEBEN. MW = MITTELWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, P-VALUE = SIGNIFIKANZWERT.

SKLERODERMIE

DEMOGRAFISCHE DATEN

Es wurden 12 männliche und weibliche Patienten, die an Sklerodermie erkrankt sind und 10 gesunde Kontrollen zur Analyse für diese Arbeit ausgewählt. Die demografischen Daten zeigt Tabelle 32. Das Durchschnittsalter der Erkrankten betrug 56,5 Jahre. Das Alter der Kontrollen lag bei 54,3 Jahren. Es wurden 5 männliche und 7 weibliche Patienten ausgewählt und jeweils 5 Kontrollen. Das Alter der Erstmanifestation wurde mit 45,2 Jahre angegeben, die Krankheitsdauer lag durchschnittlich bei 11,6 Jahren.

TABELLE 32: DEMOGRAFISCHE DATEN SKLERODERMIE

	Sklerodermie	Gesunde Kontrollen
Anzahl	12	10
Alter (in Jahren) ¹	56,5 ± 8,23	54,3 ± 7,10
Geschlecht (m/w)	5/7	5/5
Alter bei Diagnose ¹	45,2 ± 13,18	-
Antikörper (ANA/Sc170/andere/nicht dokumentiert)	5/7/4/3	-
Krankheitsdauer ¹	11,6 ± 7,98	-
Medikamente (MTX/Azathioprin/Glucocorticoide/Cyclophosphamid)	(4/3/5/-)	-
Organbeteiligung (ja/nein/keine Angabe) ²	(6/4/2)	-

¹ WERTE ANGEZEIGT IN MITTELWERT ± STANDARDABWEICHUNG

² ORGANBETEILIGUNG BEI ZUTREFFEN VON MINDESTENS EINEM DER FOLGENDEN DEFINITIONEN: NIERE: HISTOLOGISCHER NACHWEIS EINER THROMBOTISCHEN MIKROANGIOPATHIE ODER GLOMERULONEPHRITIS, DOKUMENTIERTES NIERENVERSAGEN AUFGRUND DER SKLERODERMIE. HERZ: PERIKARDERGUSS OHNE ALTERNATIVE URSACHE, HISTOLOGISCH BESTÄTIGTE KARDIOMYOPATHIE ODER TYPISCHE AUFFÄLLIGKEITEN IM MRT OHNE ANDERE URSACHE, PULMONAL ARTERIELLE HYPERTONIE NACH DER DEFINITION DER EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY/EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY. LUNGE: INTERSTITIELLE LUNGENERKRANKUNG DURCH NACHWEIS IM CT.

Die Ergebnisse der Pyrosequenzierung der Sklerodermiepatienten in Prozent Methylierung sind nach Geschlecht getrennt in Tabelle 33 aufgelistet.

ERGEBNISSE DER PYROSEQUENZIERUNG

TABELLE 33: ERGEBNISSE PYROSEQUENZIERUNG SKLERODERMIE (♂ UND ♀ GETRENNT AUSGEWERTET)

Sklerodermie	Kontrolle männlich	Patient männlich	p-value männlich ¹	Kontrolle weiblich	Patient weiblich	p-value weiblich ²
	Methylierung in % MW ± SD			Methylierung in % MW± SD		
FOXP3 Enhancer 1	5,40 ± 2,66	6,68 ± 4,24	0,421	41,80 ± 5,05	43,46 ± 3,15	0,484
Position 1	3,36 ± 1,59	5,01 ± 3,81	0,690	42,12 ± 5,37	43,52 ± 3,05	0,567
Position 2	8,06 ± 3,66	9,57 ± 6,85	0,675	45,34 ± 5,61	45,51 ± 5,22	0,956
Position 3	6,62 ± 3,26	7,32 ± 3,84	0,548	46,01 ± 5,63	44,99 ± 4,73	0,726
FOXP3 Enhancer 2	4,90 ± 3,64	4,98 ± 3,16	0,972	34,82 ± 10,46	38,91 ± 2,78	0,391
Position 1	3,83 ± 3,14	4,17 ± 3,24	0,870	34,53 ± 12,19	35,56 ± 3,30	0,847
Position 2	6,65 ± 4,43	7,19 ± 3,23	0,830	39,05 ± 11,26	41,00 ± 4,17	0,701
Position 3	5,65 ± 4,40	5,28 ± 3,89	0,891	34,36 ± 9,55	40,57 ± 3,66	0,139
Position 4	3,14 ± 2,64	3,55 ± 2,61	0,810	27,83 ± 9,00	32,37 ± 5,95	0,300
Position 5	4,06 ± 3,34	4,50 ± 3,53	0,421	39,44 ± 12,36	45,09 ± 3,96	0,325
Position 6	4,64 ± 3,58	4,08 ± 2,64	0,785	36,40 ± 11,25	40,43 ± 3,35	1,000
Position 7	6,33 ± 4,25	6,08 ± 3,17	0,917	32,13 ± 8,56	37,33 ± 5,13	0,234
FOXP3 Promotor 1	63,59 ± 6,54	65,38 ± 4,47	0,626	63,91 ± 2,74	68,69 ± 4,41	0,059
FOXP3 Promotor 2	71,09 ± 4,02	72,88 ± 1,74	0,388	76,03 ± 3,10	78,32 ± 3,92	0,330
Position 1	83,78 ± 3,22	86,18 ± 1,87	0,188	88,26 ± 2,53	88,30 ± 2,64	0,976
Position 2	68,88 ± 4,08	69,19 ± 3,03	0,893	73,89 ± 3,31	75,11 ± 4,25	0,578
Position 3	69,94 ± 3,78	70,70 ± 2,40	0,713	72,03 ± 4,22	75,13 ± 3,88	0,195
Position 4	61,75 ± 6,20	65,43 ± 2,57	0,255	70,99 ± 5,49	74,71 ± 5,74	0,259
RORC 1 Sequenz 1	29,50 ± 3,88	38,91 ± 8,77	0,059	27,20 ± 5,21	35,70 ± 4,94	<u>0,013*</u>
Position 1	35,26 ± 3,04	43,34 ± 7,79	0,063	33,51 ± 6,17	42,87 ± 4,56	<u>0,002*</u>
Position 2	34,29 ± 5,65	47,05 ± 13,85	0,093	31,85 ± 7,49	40,22 ± 7,00	0,061

Position 3	18,93 ± 3,94	26,35 ± 5,32	<u>0,037*</u>	16,25 ± 3,25	24,02 ± 5,12	<u>0,009*</u>
RORC 1 Sequenz 2	18,90 ± 3,99	22,95 ± 5,68	0,228	17,50 ± 2,43	25,41 ± 3,35	<u>0,001*</u>
Position 1	22,18 ± 4,80	26,60 ± 6,68	0,265	19,96 ± 3,65	29,11 ± 3,80	<u>0,001*</u>
Position 2	15,63 ± 3,42	19,31 ± 4,77	0,198	15,04 ± 1,75	21,70 ± 3,14	<u>0,001*</u>
RORC 1 Sequenz 3	33,09 ± 3,29	39,58 ± 4,85	0,095	30,87 ± 3,52	39,66 ± 5,19	<u>0,002*</u>
Position 1	19,41 ± 3,25	23,18 ± 4,14	0,148	19,98 ± 8,38	25,19 ± 6,15	0,223
Position 2	46,76 ± 3,46	55,99 ± 5,74	<u>0,015*</u>	41,75 ± 5,94	52,13 ± 4,76	<u>0,005*</u>
GATA 3	4,75 ± 2,38	4,79 ± 4,32	0,988	4,28 ± 2,42	3,48 ± 2,30	0,554
Position 1	3,28 ± 2,55	2,84 ± 2,87	0,808	2,49 ± 2,09	2,39 ± 2,14	0,931
Position 2	4,42 ± 2,72	4,86 ± 2,51	0,813	3,72 ± 0,92	2,80 ± 1,78	0,329
Position 3	4,38 ± 1,17	6,00 ± 5,55	0,556	5,45 ± 3,19	3,81 ± 3,04	0,365
Position 4	6,93 ± 3,59	8,03 ± 5,57	0,729	7,29 ± 2,41	6,20 ± 4,49	0,638
RORC 2 Sequenz 1	33,58 ± 6,16	40,75 ± 7,55	0,138	30,99 ± 2,55	39,67 ± 6,66	<u>0,022*</u>
Position 1	37,66 ± 4,93	45,05 ± 6,32	0,073	35,61 ± 2,94	44,81 ± 6,94	<u>0,012*</u>
Position 2	36,17 ± 9,10	46,60 ± 11,80	0,156	34,93 ± 5,30	44,80 ± 8,54	<u>0,032*</u>
Position 3	21,07 ± 5,73	27,10 ± 6,17	0,148	19,32 ± 1,50	26,34 ± 5,61	<u>0,016*</u>
Position 4	39,43 ± 5,70	44,26 ± 7,64	0,290	34,08 ± 3,52	42,75 ± 6,71	<u>0,018*</u>
RORC 2 Sequenz 2	20,43 ± 4,81	26,23 ± 4,99	0,098	20,88 ± 2,93	25,35 ± 4,18	0,051
Position 1	24,77 ± 6,04	30,34 ± 6,39	0,194	25,44 ± 3,32	29,75 ± 5,71	0,133
Position 2	16,09 ± 3,71	22,11 ± 3,71	<u>0,033*</u>	16,31 ± 2,78	20,94 ± 2,94	<u>0,014*</u>
STAT 3	4,60 ± 3,78	5,50 ± 4,56	1,000	4,28 ± 2,66	4,03 ± 1,64	0,641
Position 1	1,71 ± 2,38	2,52 ± 2,59	0,620	1,70 ± 1,75	2,17 ± 1,37	0,600
Position 2	3,32 ± 3,89	4,17 ± 3,48	0,690	39,05 ± 11,26	41,00 ± 4,17	0,701
Position 3	4,88 ± 3,72	5,64 ± 5,18	0,548	34,36 ± 9,55	40,57 ± 3,66	0,139
Position 4	3,83 ± 3,95	4,78 ± 3,31	0,548	4,01 ± 3,28	4,26 ± 2,84	0,534
Position 5	7,60 ± 4,46	7,98 ± 5,56	0,909	6,99 ± 4,10	6,90 ± 3,21	0,966
Position 6	3,23 ± 2,21	3,02 ± 2,20	0,885	2,22 ± 1,63	2,16 ± 1,21	0,943
Position 7	7,63 ± 6,30	10,38 ± 10,17	0,841	32,13 ± 8,56	37,33 ± 5,13	0,203

STAT 4	96,40 ± 3,09	98,33 ± 0,57	0,238	96,87 ± 1,79	96,50 ± 1,88	0,726
Position 1	93,61 ± 4,92	95,28 ± 1,14	0,841	94,25 ± 1,52	95,30 ± 1,52	0,240
Position 2	98,21 ± 1,65	99,89 ± 0,24	0,222	98,29 ± 2,28	97,32 ± 3,49	0,628
Position 3	97,49 ± 3,54	99,81 ± 0,43	0,548	98,07 ± 2,96	96,89 ± 2,58	0,534
STAT 5A	8,67 ± 2,41	8,08 ± 3,55	0,767	9,31 ± 2,18	7,96 ± 3,25	0,410
Position 1	9,47 ± 1,29	5,58 ± 1,40	<u>0,002*</u>	10,19 ± 0,93	6,84 ± 2,27	<u>0,035*</u>
Position 2	4,11 ± 1,72	4,65 ± 2,08	0,665	4,63 ± 1,16	4,23 ± 2,09	0,684
Position 3	12,44 ± 5,19	14,02 ± 8,23	1,000	13,10 ± 5,24	12,83 ± 6,22	0,934
TBX21	9,71 ± 3,10	9,98 ± 2,36	0,880	7,66 ± 3,92	10,57 ± 2,51	0,295
Position 1	4,96 ± 1,98	5,80 ± 1,37	0,458	4,28 ± 2,16	5,68 ± 2,17	0,270
Position 2	12,97 ± 3,81	13,99 ± 3,30	0,663	12,62 ± 1,27	14,49 ± 2,86	0,205
Position 3	9,51 ± 2,43	9,36 ± 5,35	0,548	7,50 ± 3,91	11,32 ± 3,61	0,094
Position 4	11,40 ± 4,94	10,78 ± 2,97	1,000	10,03 ± 2,29	10,79 ± 3,25	0,664

VERGLEICH DER PROZENTUALEN METHYLIERUNG ZWISCHEN JEWEILS WEIBLICHEN UND MÄNNLICHEN PATIENTEN UND GESUNDEN KONTROLLEN. DIE WERTE FÜR MW ± SD SIND IN PROZENT ANGEZEIGT. MW = MITTELWERT, P-VALUE = SIGNIFIKANZWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050, ¹ = VERGLEICH ZWISCHEN PATIENT UND KONTROLLE MÄNNLICH, ² = VERGLEICH ZWISCHEN PATIENTIN UND KONTROLLE WEIBLICH.

Tabelle 34 listet die Auswertung der Pyrosequenzierung bei Sklerodermie geschlechterübergreifend auf. Pro Gen ist die prozentuale Methylierung mit Standardabweichung und p-value zu sehen.

TABELLE 34: ERGEBNISSE PYROSEQUENZIERUNG SKLERODERMIE (♂ + ♀)

Sklerodermie	Kontrollen (♂ + ♀)	Patienten (♂ + ♀)	p-value
	Methylierung in % MW ± SD		
FOXP3 Promotor 1	63,75 ± 4,73	67,31 ± 4,56	0,088
FOXP3 Promotor 2	73,92 ± 4,32	76,05 ± 4,16	0,243
Position 1	86,22 ± 3,58	87,42 ± 2,51	0,360
Position 2	71,61 ± 4,36	72,65 ± 4,74	0,591
Position 3	71,08 ± 3,98	73,28 ± 3,94	0,196
Position 4	70,85 ± 6,57	66,79 ± 7,33	0,176
RORC 1 Sequenz 1	28,24 ± 4,59	37,04 ± 6,64	<u>0,001*</u>
Position 1	34,30 ± 4,85	43,07 ± 5,78	<u>0,001*</u>
Position 2	32,96 ± 6,52	43,07 ± 10,43	<u>0,012*</u>
Position 3	17,47 ± 3,67	24,99 ± 5,10	<u>0,001*</u>
RORC 1 Sequenz 2	18,14 ± 3,14	24,38 ± 4,41	<u>0,001*</u>
Position 1	20,97 ± 4,15	28,06 ± 5,08	<u>0,002*</u>
Position 2	15,30 ± 2,51	20,71 ± 3,89	<u>0,001*</u>
RORC 1 Sequenz 3	31,87 ± 3,45	39,04 ± 4,85	<u>0,001*</u>
Position 1	19,72 ± 6,28	24,35 ± 5,28	<u>0,016*</u>
Position 2	44,03 ± 5,41	53,74 ± 5,32	<u>0,0001*</u>
RORC 2 Sequenz 1	32,18 ± 4,50	40,12 ± 6,73	<u>0,003*</u>
Position 1	36,54 ± 3,89	44,91 ± 6,39	<u>0,001*</u>
Position 2	35,49 ± 6,90	45,55 ± 9,55	<u>0,009*</u>
Position 3	20,12 ± 3,89	26,66 ± 5,58	<u>0,004*</u>
Position 4	36,52 ± 5,19	43,38 ± 6,81	<u>0,013*</u>
RORC 2 Sequenz 2	20,67 ± 3,69	25,71 ± 4,33	<u>0,007*</u>
Position 1	25,13 ± 4,50	30,00 ± 5,72	<u>0,035*</u>
Position 2	16,21 ± 3,06	21,43 ± 3,18	<u>0,001*</u>
GATA 3	4,49 ± 2,29	4,02 ± 3,18	0,691
Position 1	2,85 ± 2,23	2,58 ± 2,35	0,780
Position 2	4,07 ± 1,95	3,62 ± 2,23	0,579
Position 3	4,96 ± 2,44	4,72 ± 4,19	0,869
Position 4	7,11 ± 2,89	6,93 ± 4,74	0,919
STAT 3	4,42 ± 3,05	4,64 ± 3,10	0,833
Position 1	1,71 ± 1,95	2,32 ± 1,87	0,413
Position 2	3,53 ± 2,96	3,47 ± 2,28	0,976
Position 3	5,09 ± 3,34	5,58 ± 3,49	0,566
Position 4	3,93 ± 3,41	4,48 ± 2,91	0,288
Position 5	7,27 ± 4,04	7,35 ± 4,14	0,928
Position 6	2,68 ± 1,89	2,52 ± 1,66	0,832

Position 7	6,78 ± 4,68	7,78 ± 6,89	0,880
STAT 4	96,66 ± 2,34	97,26 ± 1,71	0,695
Position 1	93,91 ± 3,31	95,29 ± 1,31	0,316
Position 2	98,26 ± 1,92	98,39 ± 2,90	0,566
Position 3	97,80 ± 3,08	98,10 ± 2,44	0,976
STAT 5A	9,02 ± 2,20	8,01 ± 3,22	0,151
Position 1	9,86 ± 1,11	6,31 ± 1,99	<u>0,0001*</u>
Position 2	4,39 ± 1,39	4,40 ± 2,00	0,988
Position 3	12,80 ± 4,96	13,33 ± 6,79	0,786
TBX21	8,59 ± 3,56	10,33 ± 2,36	0,180
Position 1	4,59 ± 2,01	5,73 ± 1,80	0,166
Position 2	12,80 ± 2,69	14,28 ± 2,91	0,231
Position 3	8,41 ± 3,33	10,50 ± 4,31	0,210
Position 4	10,71 ± 3,70	10,79 ± 3,00	0,771

VERGLEICH DER PROZENTUALEN METHYLIERUNG ZWISCHEN SKLERODERMIE UND GESUNDEN KONTROLLEN. DIE WERTE FÜR MW ± SD SIND IN PROZENT ANGEZEIGT. MW = MITTELWERT, P-VALUE = SIGNIFIKANZWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050, ♂ = MÄNNLICH, ♀ = WEIBLICH.

Bei dem Projekt der Sklerodermieerkrankung wurden alle oben beschriebenen Gene analysiert und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte geschlechtsübergreifend und ein weiteres Mal geschlechtergetrennt.

FOXP3 Promotor und FOXP3 Enhancer zeigten sich weder bei weiblichen noch bei männlichen Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant unterschiedlich methyliert. Bei Männern lag die Methylierung zwischen 5 % und 7 %. Bei Frauen war das Gen zwischen 35 % und 44 % methyliert. Da das Gen auf dem X-Chromosom sitzt, konnte die Auswertung nicht geschlechterübergreifend durchgeführt werden. Diagramm 3 zeigt die prozentuale FOXP3 Enhancer Methylierung bei männlichen Sklerodermiepatienten, während Diagramm 4 die der weiblichen Patientinnen zeigt.

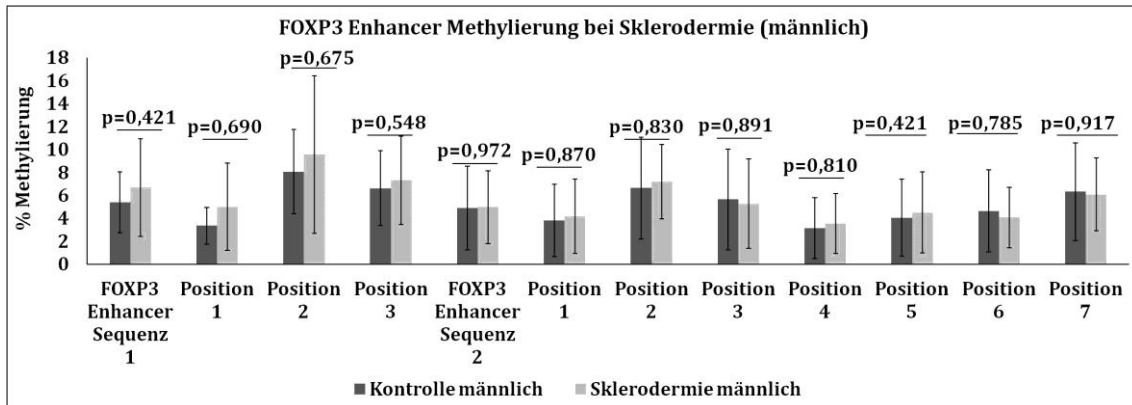


DIAGRAMM 3: FOXP3 ENHANCER METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (MÄNNLICH)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE.

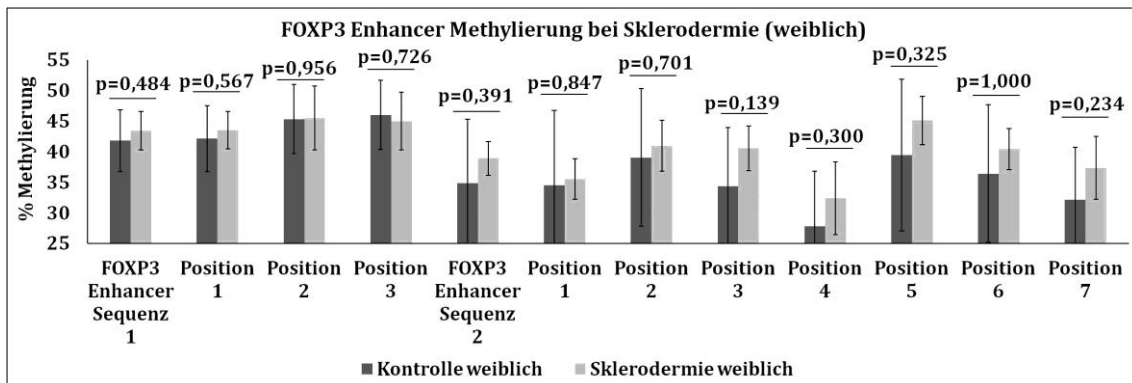


DIAGRAMM 4: FOXP3 ENHANCER METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (WEIBLICH)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE.

Der FOXP3 Promotor zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Methylierung von Patienten und gesunden Kontrollen. Die Methylierung beider Geschlechter lag durchschnittlich zwischen 64 % und 69 %. In Diagramm 5 ist die FOXP3 Promotor Methylierung bei männlichen Patienten und Kontrollen dargestellt, Diagramm 6 zeigt die Methylierung bei weiblichen Patientinnen und Kontrollen und Diagramm 7 zeigt die geschlechterübergreifende Auswertung.

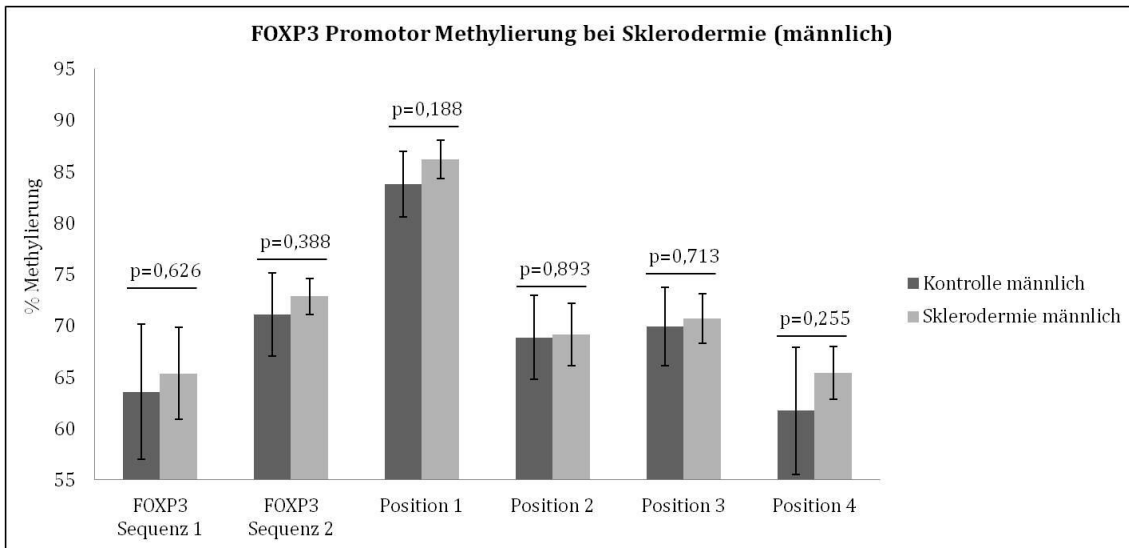


DIAGRAMM 5: FOXP3 PROMOTOR METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (MÄNNLICH)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE.

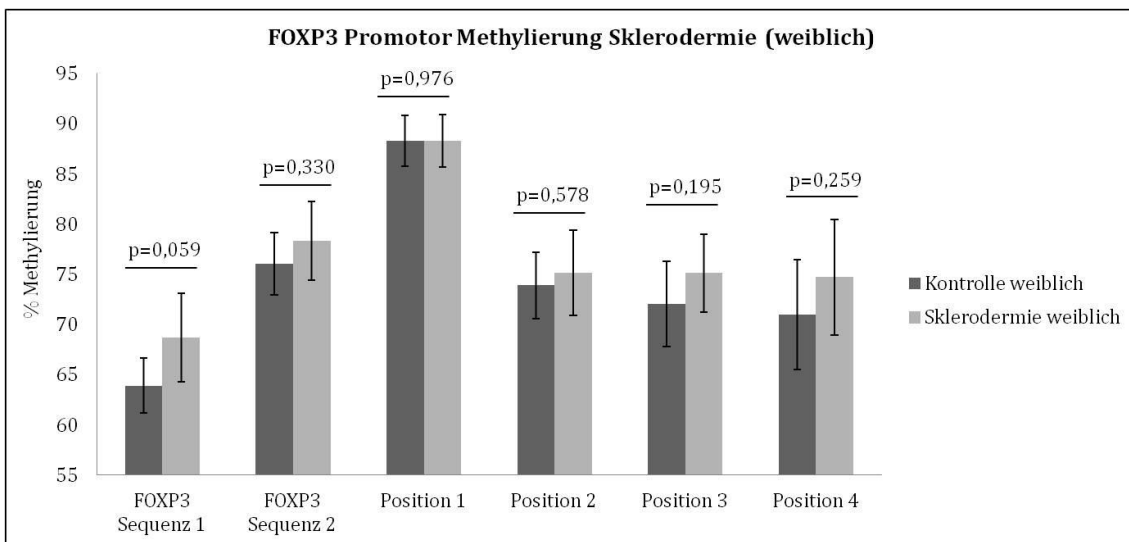


DIAGRAMM 6: FOXP3 PROMOTOR METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (WEIBLICH)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE.

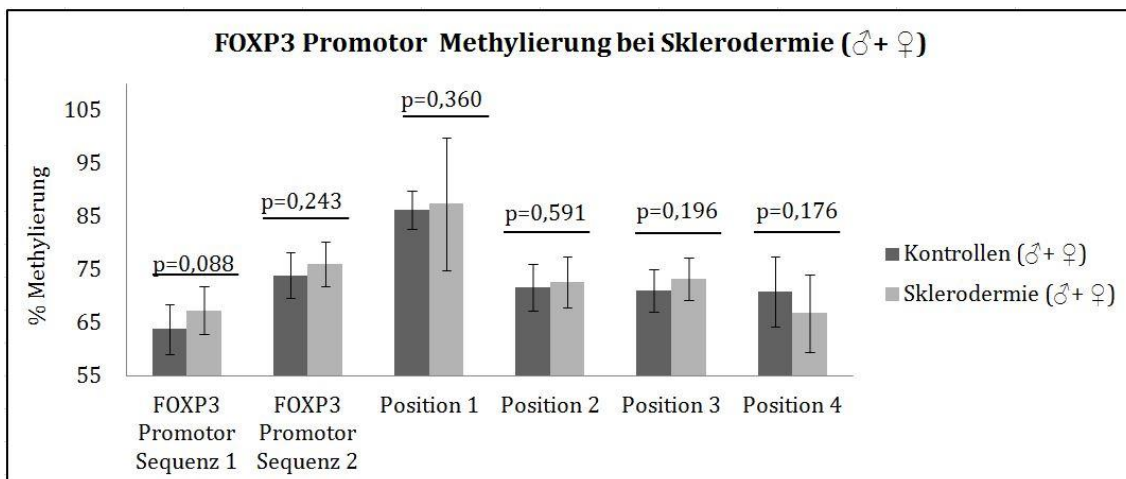


DIAGRAMM 7: FOXP3 PROMOTOR METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (♂+♀)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE, ♂ = MÄNNLICH, ♀ = WEIBLICH.

Im Gegensatz dazu konnte eine signifikant höhere Methylierung bei männlichen Sklerodermiepatienten im RORC1 Gen festgestellt werden. Diagramm 8 zeigt die prozentuale RORC1 Methylierung bei männlichen Patienten und Kontrollen. Position 3 im ersten Sequenzierungsabschnitt und Position 2 im dritten Sequenzierungsabschnitt zeigten einen signifikanten Methylierungsunterschied.

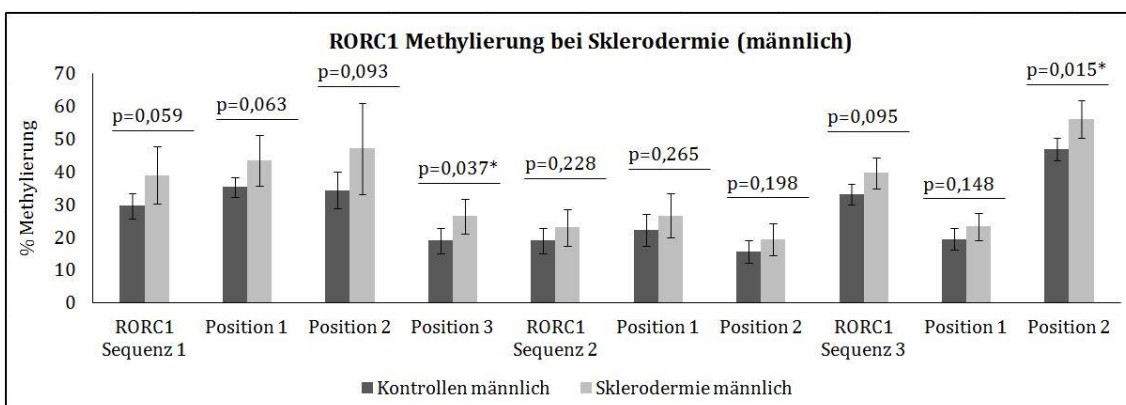


DIAGRAMM 8: RORC1 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (MÄNNLICH)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Bei weiblichen Sklerodermiepatientinnen konnte die höhere Methylierung im RORC1 Gen noch deutlicher gezeigt werden. Mit Ausnahme von zwei Positionen zeigten sich alle gemessenen Stellen signifikant stärker methyliert. Der Mittelwert der Methylierung in Prozent über alle Sequenzierungsabschnitte hinweg betrug

bei den gesunden weiblichen Kontrollen 25,2 % im Vergleich zu den weiblichen Sklerodermiepatientinnen mit 33,6 %. Die Darstellung der RORC1 Methylierung bei weiblichen Patienten und Kontrollen ist Diagramm 9 zu entnehmen.

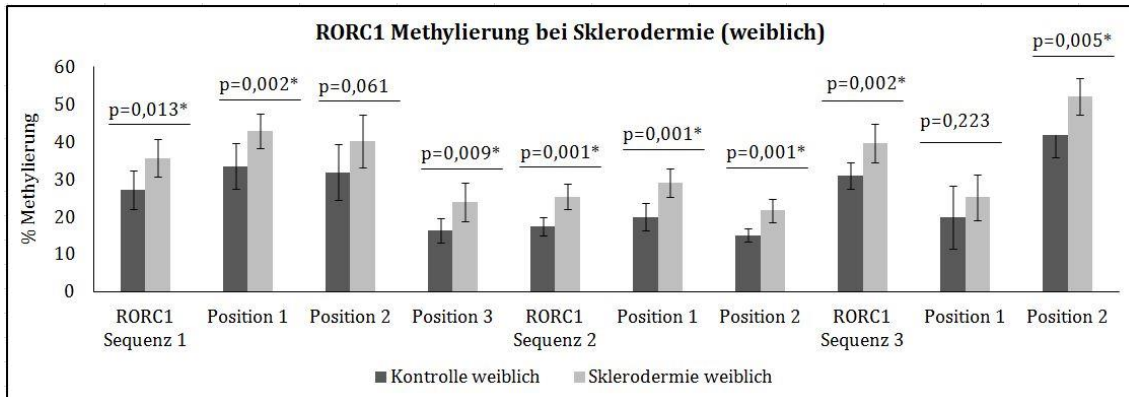


DIAGRAMM 9: RORC1 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (WEIBLICH)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Bei der Analyse ohne Geschlechtertrennung in Diagramm 10 zeigte sich eine signifikant höhere Methylierung an allen Positionen des RORC1 Gens bei den Sklerodermiepatienten.

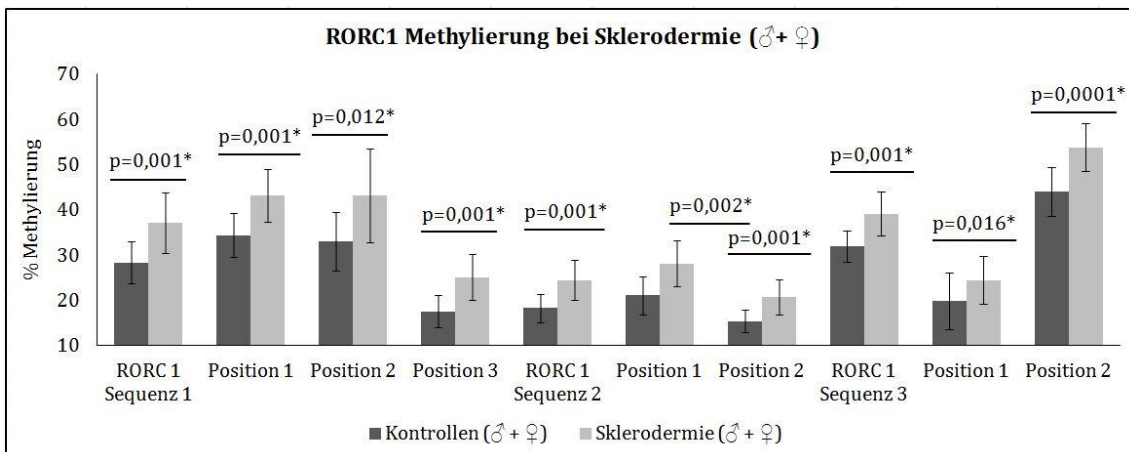


DIAGRAMM 10: RORC1 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (♂ + ♀)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050, ♂ = MÄNNLICH, ♀ = WEIBLICH.

Das Gen RORC2 wies ein ähnliches Methylierungsmuster wie RORC1 auf. Diagramm 11 zeigt die prozentuale RORC2 Methylierung bei Sklerodermiepatienten und Kontrollen. Es konnte lediglich an Position 2 des

zweiten Sequenzierungsabschnittes eine signifikant höhere Methylierung gezeigt werden, während bei den weiblichen Patientinnen und Kontrollen im RORC2 Gen fünf Positionen signifikant unterschiedlich methyliert waren. Die Darstellung der Ergebnisse der RORC2 Methylierung bei weiblichen Patientinnen und Kontrollen zeigt Diagramm 12.

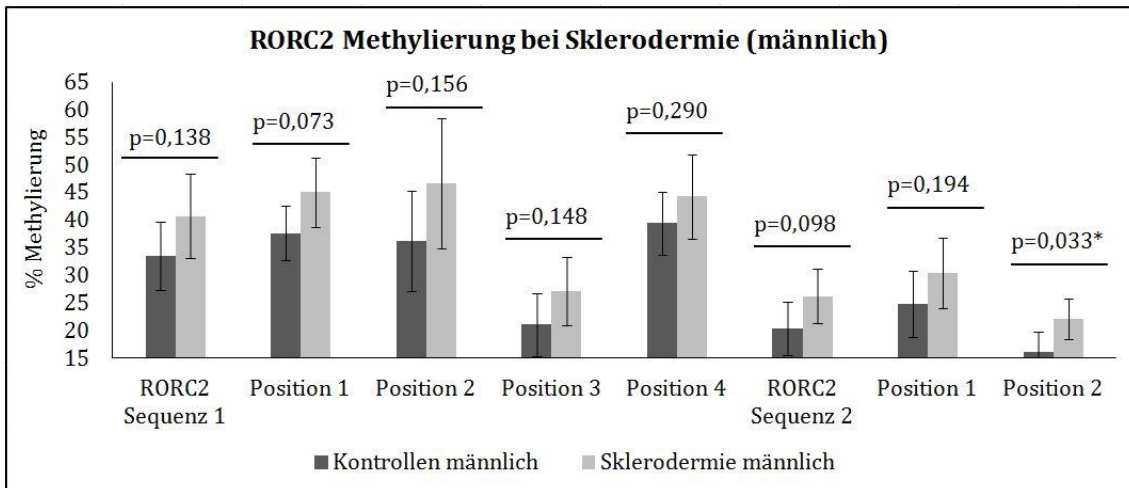


DIAGRAMM 11: RORC2 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (MÄNNLICH)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

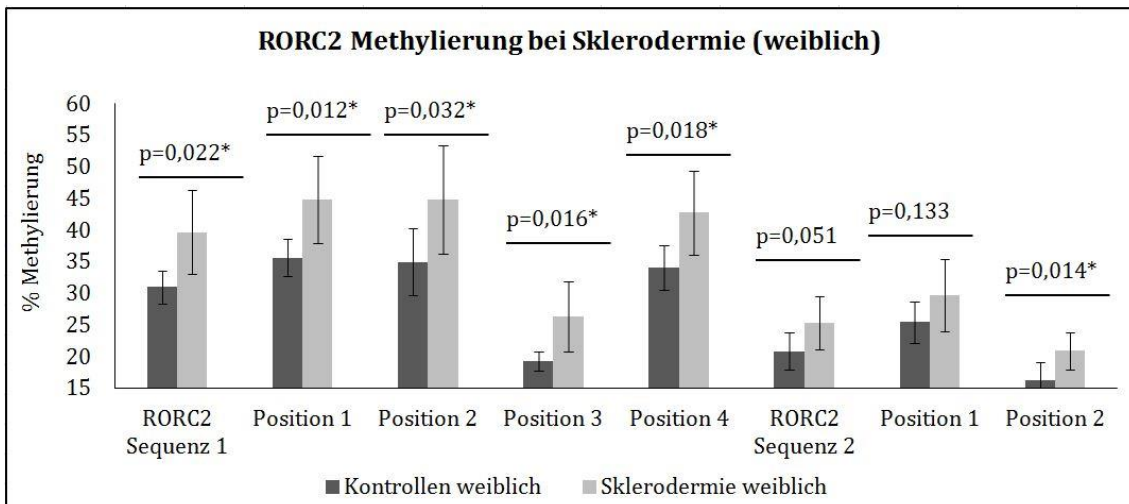


DIAGRAMM 12: RORC2 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (WEIBLICH)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

In Diagramm 13 ist die Methylierung von RORC2 von beiden Geschlechtern zusammen dargestellt. Eine Signifikanz ist bei allen Positionen des Gens zu ermitteln. Patienten und Patientinnen, die an Sklerodermie erkrankt sind, hatten demnach eine deutlich höhere Methylierung des Gens als die gesunden Kontrollen.

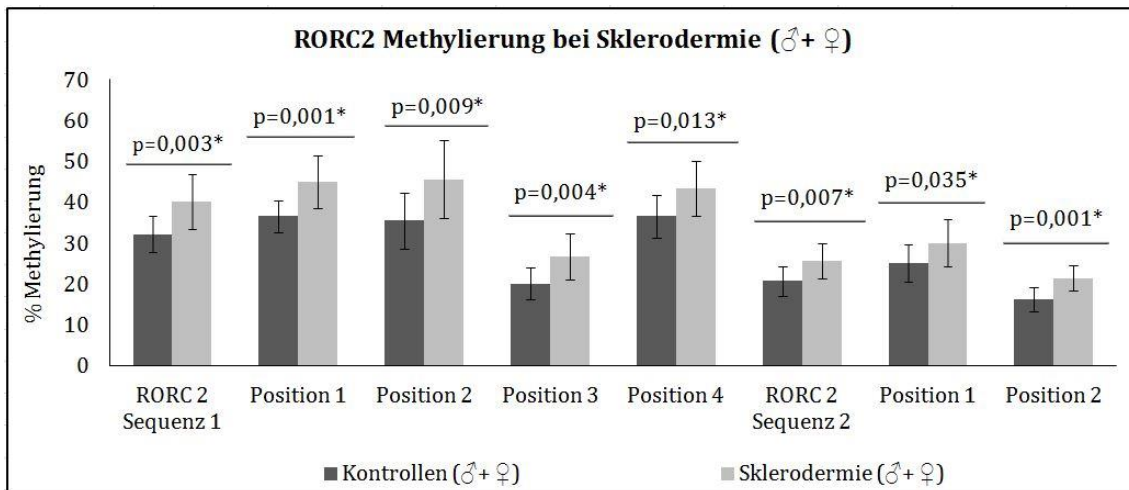


DIAGRAMM 13: RORC2 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (♂ + ♀)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050, ♂ = MÄNNLICH, ♀ = WEIBLICH.

Bei der Methylierung des Gens GATA3 konnten keine signifikanten Unterschiede bei Patienten und Kontrollen aufgezeigt werden. Diagramm 14 zeigt die GATA3 Methylierung in Prozent bei männlichen Probanden und Kontrollen. Sie wiesen einen durchschnittlichen Methylierungsgrad von 4,8 % auf. Weibliche Kontrollpersonen waren zu 4,3 % methyliert. Im Vergleich zeigten die Sklerodermie Patientinnen 3,5 % Methylierung auf. Die GATA3 Methylierung der weiblichen Patientinnen und Kontrollen zeigt Diagramm 15. Diagramm 16 veranschaulicht die geschlechterübergreifende Methylierung von GATA3.

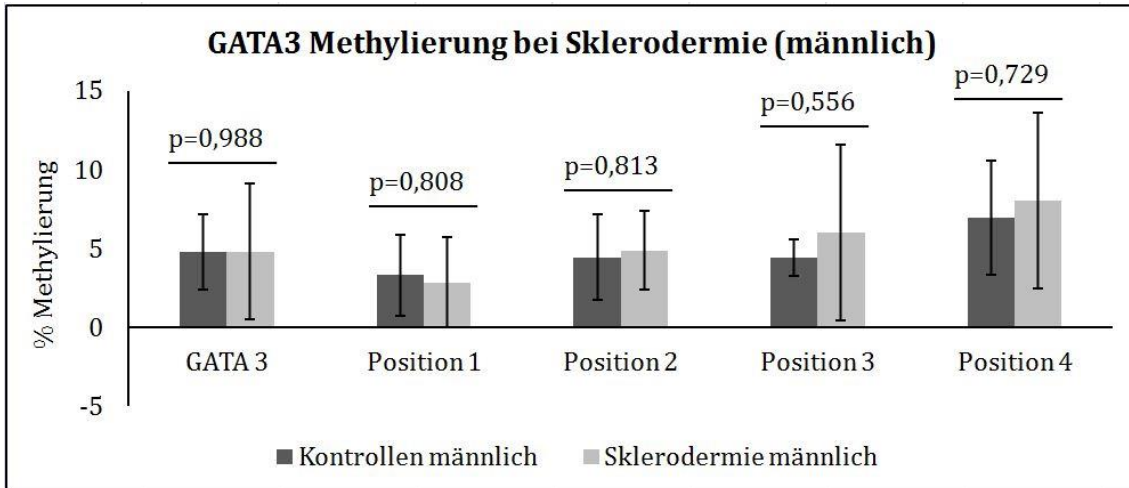


DIAGRAMM 14: GATA3 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (MÄNNLICH)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE.

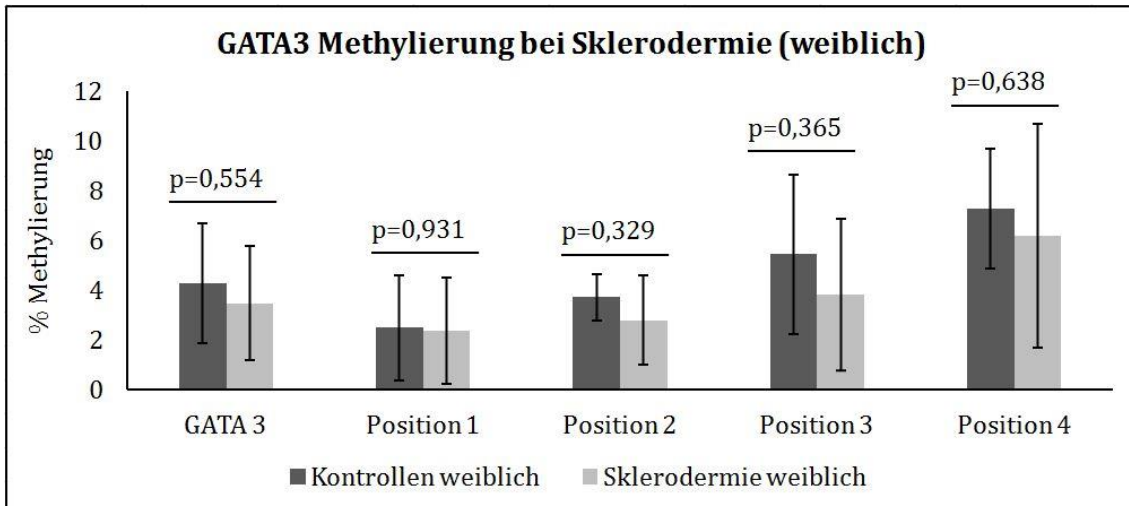


DIAGRAMM 15: GATA3 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (WEIBLICH)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE.

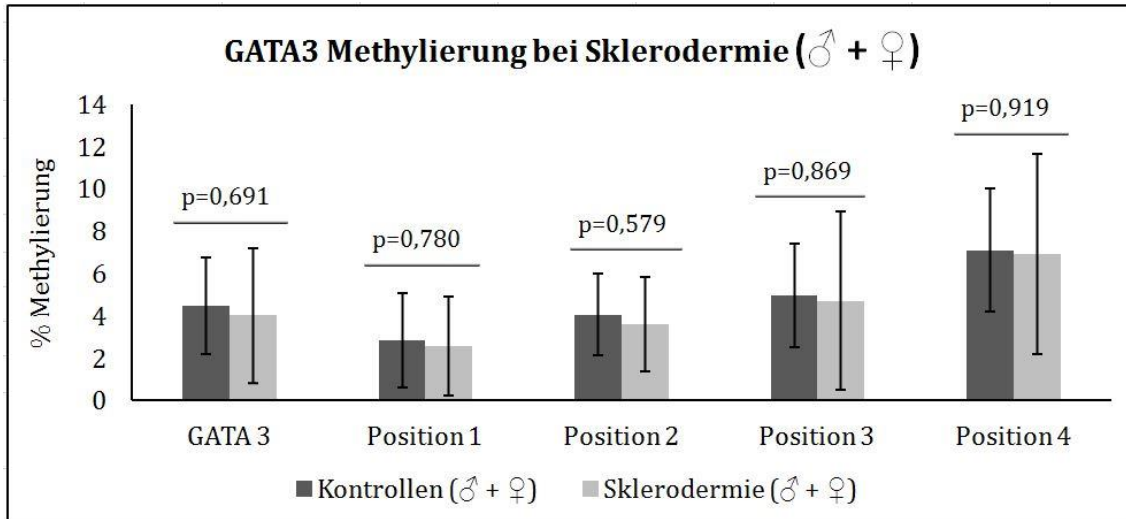


DIAGRAMM 16: GATA3 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (♂ + ♀)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE, ♂ = MÄNNLICH, ♀ = WEIBLICH.

Die Methylierung von STAT3 zeigte keine signifikante Differenz zwischen männlichen und weiblichen Sklerodermiepatienten und gesunden Kontrollen und ist in Diagramm 17 und Diagramm 18 dargestellt.

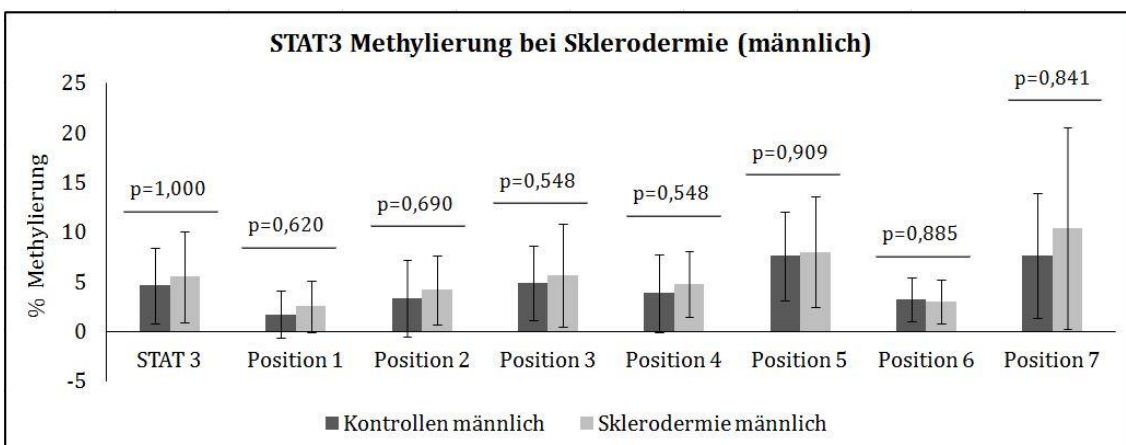


DIAGRAMM 17: STAT3 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (MÄNNLICH)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE.

Bei der Betrachtung der weiblichen Sklerodermiepatientinnen zeigte sich ein deutlich unterschiedliches Methylierungsniveau innerhalb des Gens. Die Positionen zwei, drei und sieben waren mit 30-40 % Methylierung höher methyliert als die Positionen eins, vier, fünf und sechs mit einer Methylierung von

jeweils unter 10 %. Zwischen Sklerodermiepatientinnen und den Kontrollen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

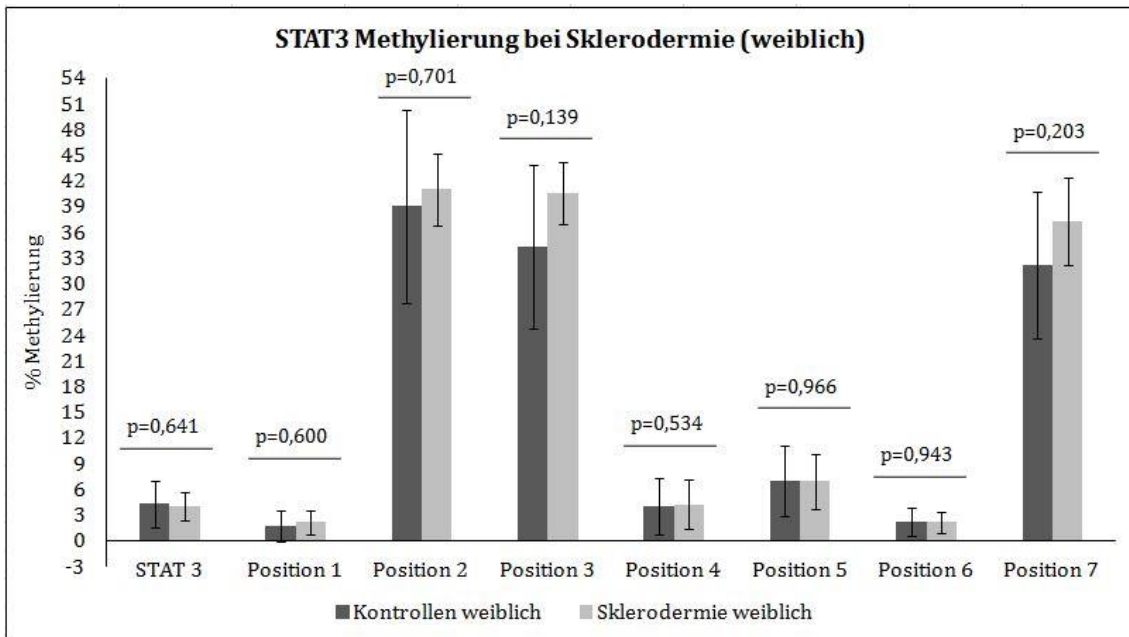


DIAGRAMM 18: STAT3 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (WEIBLICH)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT \pm STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE.

Diagramm 19 stellt die geschlechterübergreifende Auswertung der prozentualen STAT3 Methylierung bei Sklerodermie und Kontrollen dar.

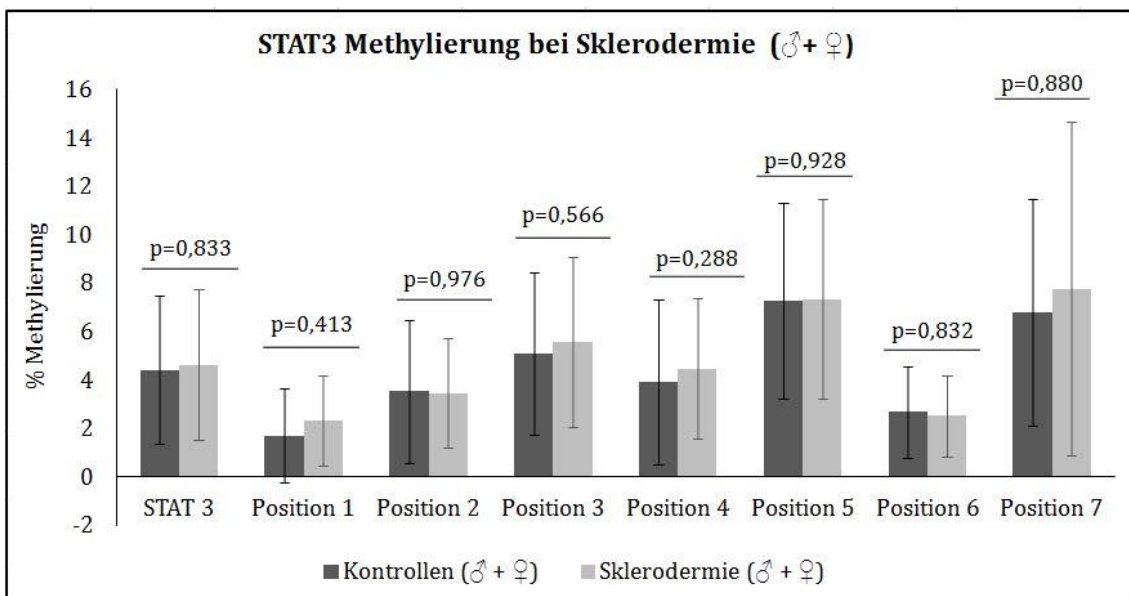


DIAGRAMM 19: STAT3 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (♂ + ♀)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT \pm STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE, ♂ = MÄNNLICH, ♀ = WEIBLICH.

STAT4 ist ein stark methyliertes Gen. Die Analyse zeigte bei männlichen Sklerodermiepatienten eine Methylierung von 96,4 % und bei männlichen gesunden Kontrollen 98,3 %. Ein signifikanter Unterschied bestand nicht. Die Darstellung der prozentualen Methylierung von STAT4 bei männlichen Sklerodermiepatienten und Kontrollen zeigt Diagramm 20 und bei weiblichen Patientinnen Diagramm 21. Frauen waren mit 96,5 % (Kontrollen) und 96,7 % (Patienten) ähnlich methyliert.

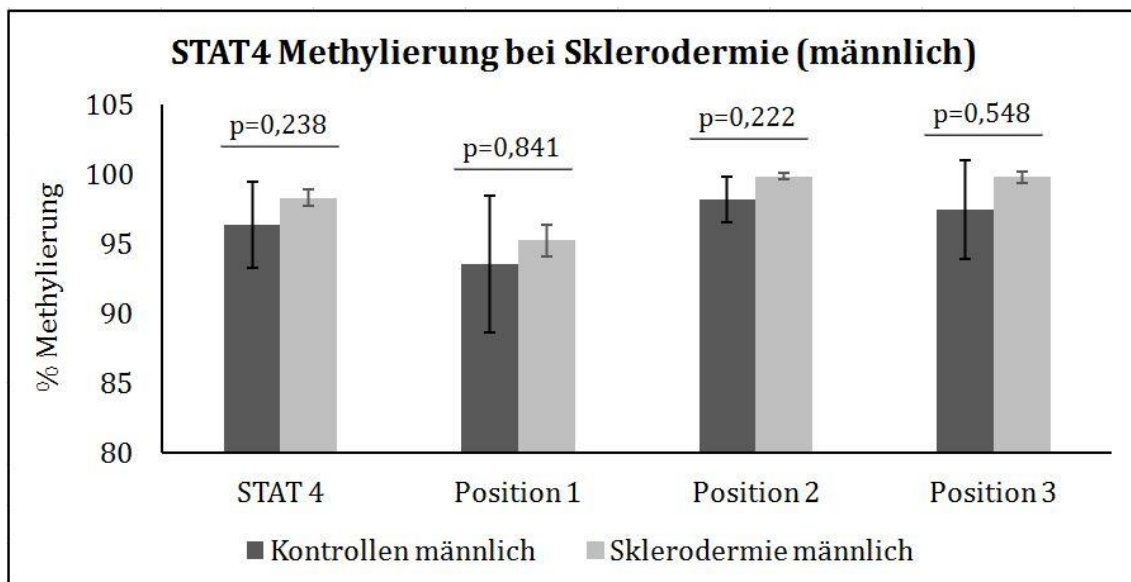


DIAGRAMM 20: STAT4 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (MÄNNLICH)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT \pm STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE.

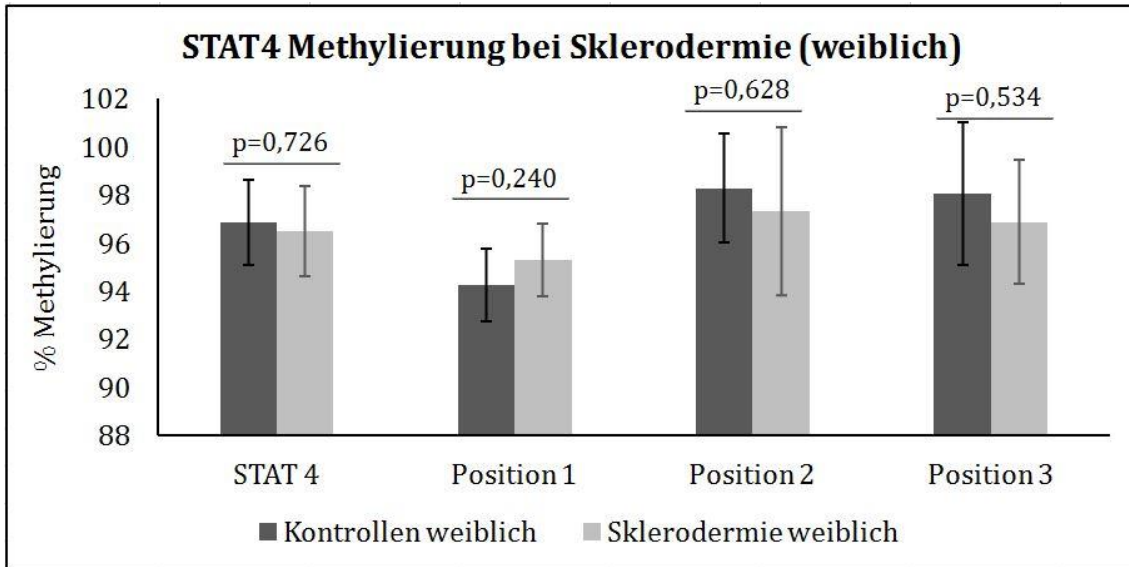


DIAGRAMM 21: STAT4 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (WEIBLICH)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT \pm STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE.

Auch geschlechterübergreifend konnte kein bedeutender Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen gezeigt werden. Diagramm 22 stellt die STAT4 Methylierung in Prozent bei geschlechterübergreifender Auswertung dar.

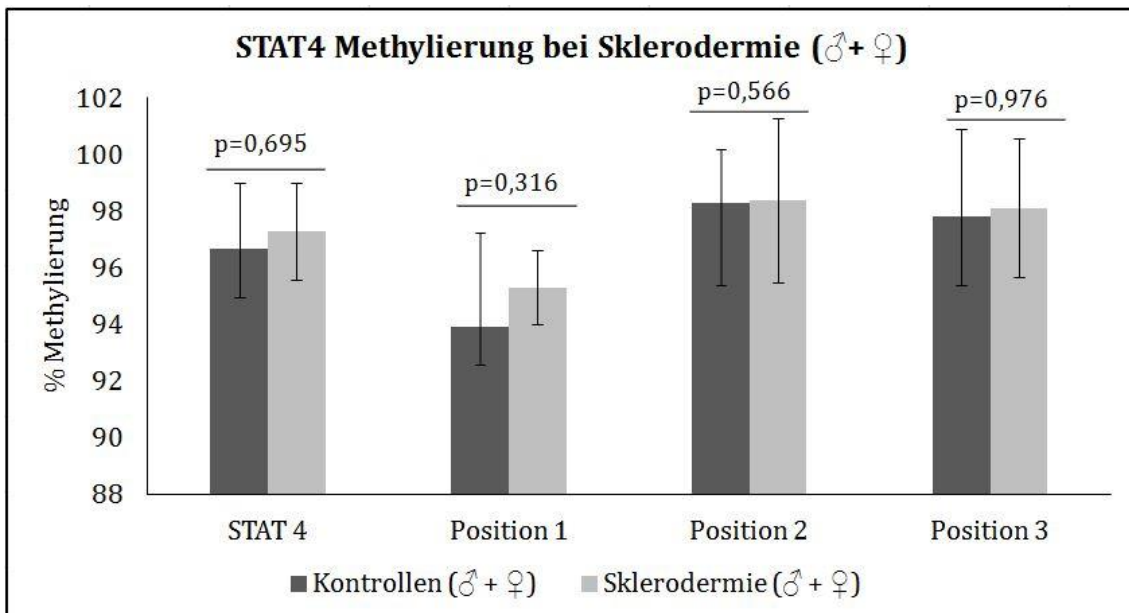


DIAGRAMM 22: STAT4 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (♂ + ♀)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT \pm STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE, ♂ = MÄNNLICH, ♀ = WEIBLICH.

STAT5A war im Durchschnitt bei Patienten 8 % methyliert und bei Kontrollen 9 %. Eine signifikant niedrigere Methylierung zeigte sich an Position eins sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Patienten im Vergleich zu den Kontrollen. Im Durchschnitt aller analysierten Positionen führte dies aber nicht zu einer signifikant unterschiedlichen Methylierung. Diagramm 23, Diagramm 24 und Diagramm 25 zeigen die prozentuale STAT5A Methylierung bei Sklerodermie und Kontrollen bei Männern, Frauen und bei einer Auswertung von beiden Geschlechtern zusammen.

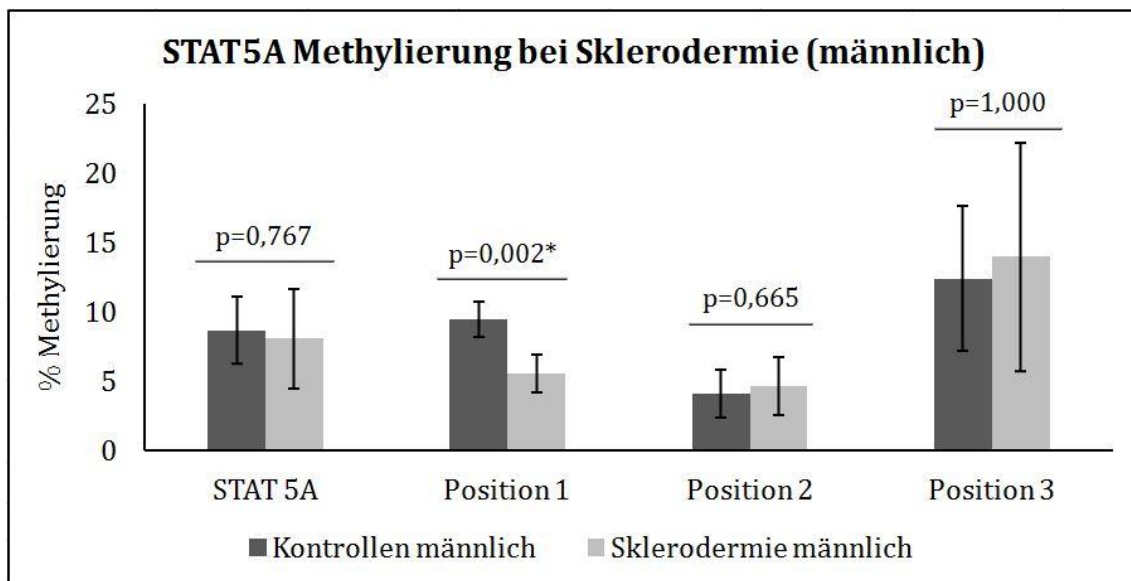


DIAGRAMM 23: STAT5A METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (MÄNNLICH)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

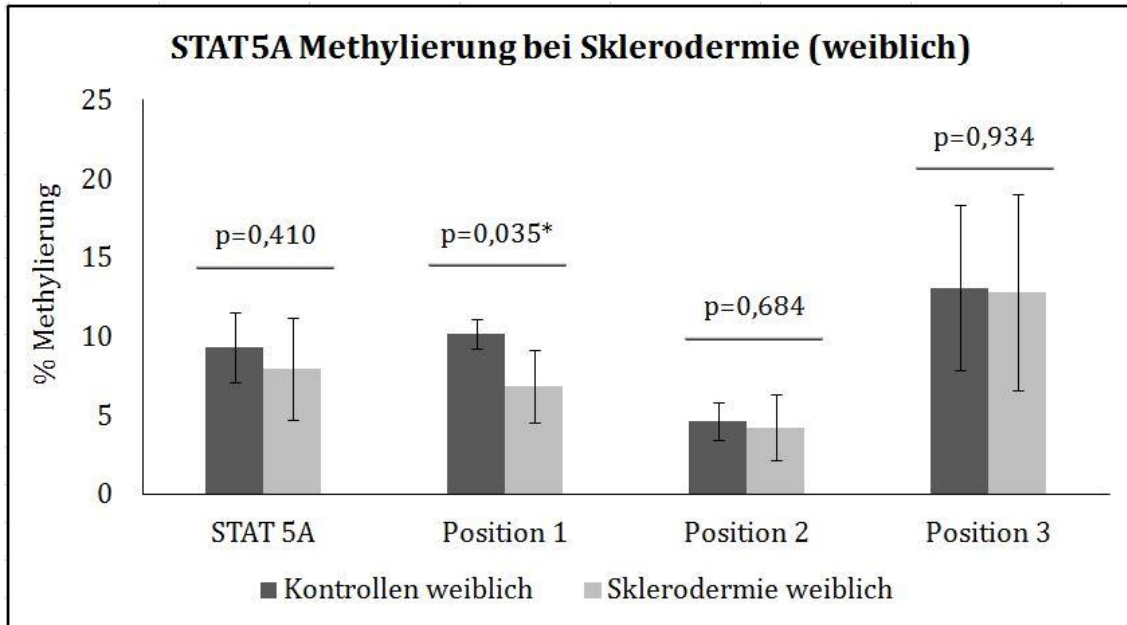


DIAGRAMM 24: STAT5A METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (WEIBLICH)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

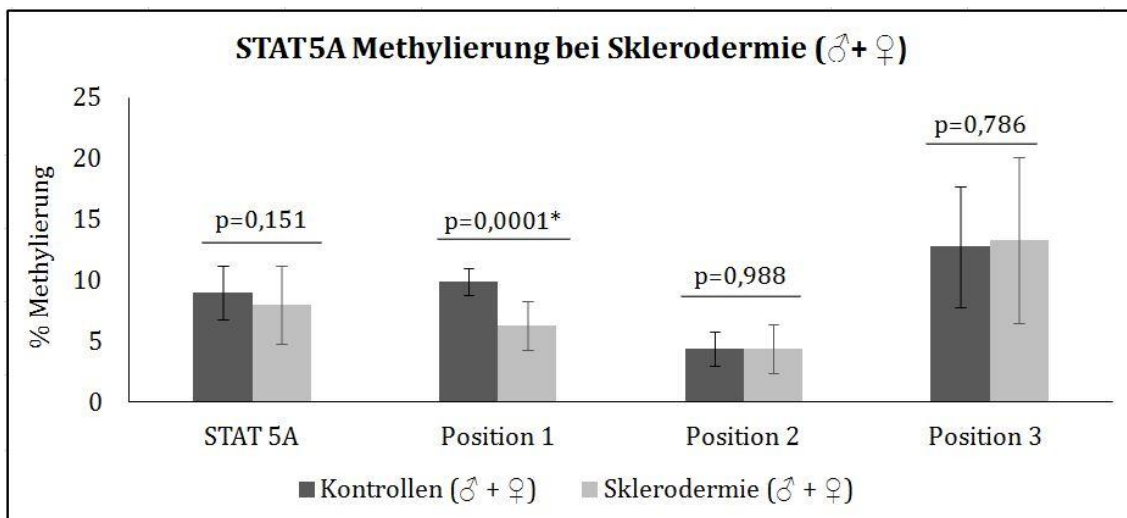


DIAGRAMM 25: STAT5A METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (♂ + ♀)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050, ♂ = MÄNNLICH, ♀ = WEIBLICH.

Das Gen TBX21 war geschlechterübergreifend 8,6 % bei den gesunden Kontrollen und 10,3 % bei den Sklerodermiepatienten methyliert. Weder bei Frauen noch bei Männern zeigten sich signifikante Unterschiede in der Methylierung. Dargestellt sind die einzelnen Positionen der TBX Methylierung bei männlichen Sklerodermiepatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen in Diagramm 26,

weibliche Patientinnen und gesunde Kontrollen in Diagramm 27 und eine geschlechterübergreifende Auswertung ist in Diagramm 28 gezeigt.

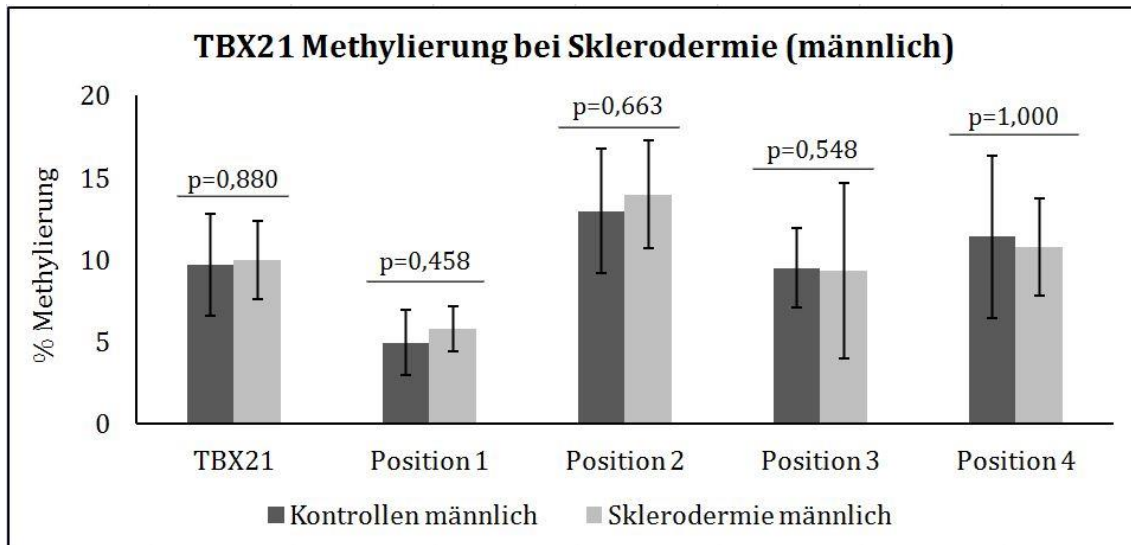


DIAGRAMM 26: TBX21 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (MÄNNLICH)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE.

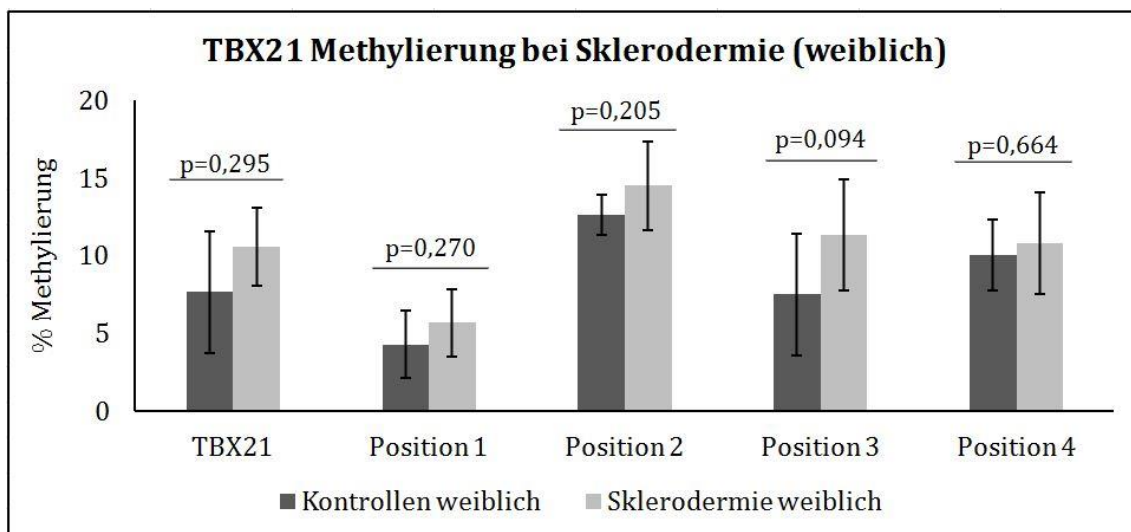


DIAGRAMM 27: TBX21 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (WEIBLICH)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE.

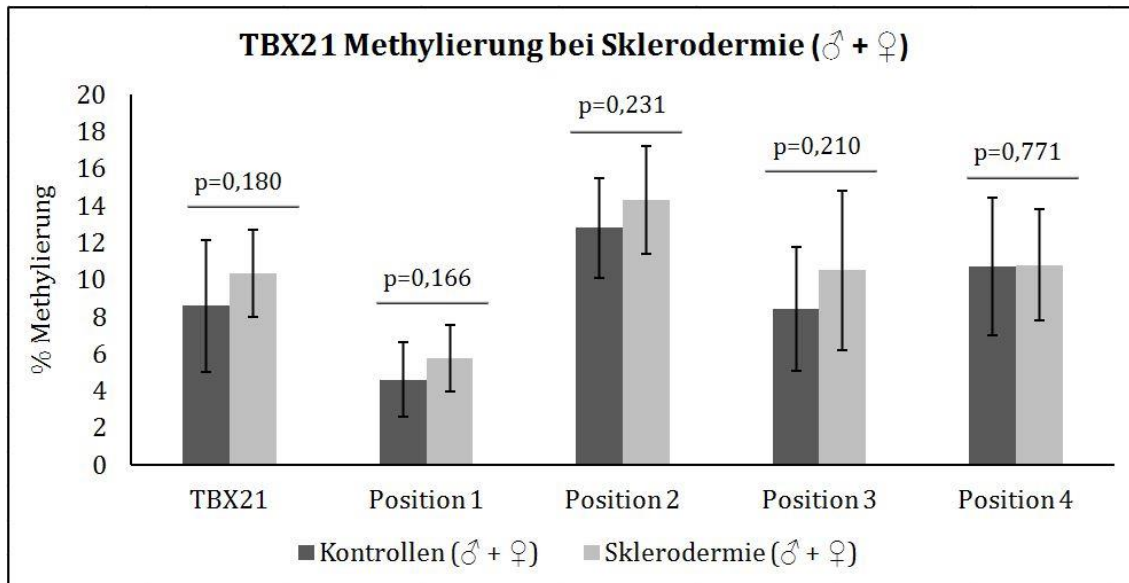


DIAGRAMM 28: TBX21 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE (♂ + ♀)

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT \pm STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. P = P-VALUE, ♂ = MÄNNLICH, ♀ = WEIBLICH.

ERGEBNISSE DER EXPRESSIONSANALAYSE (RT-PCR)

Die Ergebnisse der RT-PCR der Sklerodermiepatienten und Kontrollen inklusive der Berechnung der $\Delta\Delta CT$ Methode mit $\beta 2$ Mikroglobulin ($\beta 2M$) als HKG ist Tabelle 35 zu entnehmen. Wurde als Referenzgen $\beta 2M$ gewählt, zeigte sich eine signifikant unterschiedliche Genexpression bei Sklerodermiepatienten und gesunden Kontrollen bei den Genen RORC, STAT4, IL17A, IFNG, CXCR3, TBX21 und CCR6. Je niedriger der CT-Wert, desto mehr Probe liegt vor und desto höher ist die Genexpression. Auffallend ist, dass die Genexpression bei allen getesteten Genen bei Sklerodermiepatienten niedriger ist als bei gesunden Kontrollen.

TABELLE 35: RT-PCR-ERGEBNISSE BERECHNET NACH DER $\Delta\Delta CT$ METHODE (HKG: $\beta 2M$).

Sklerodermie ($\beta 2M$)	ΔCT Patient	ΔCT Kontrolle	p-value	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	$-1/2^{-\Delta\Delta CT}$
CCR6	12,03 \pm 1,25	8,62 \pm 1,32	<u>0,005*</u>	3,41	0,09	-10,63
CXCR3	13,09 \pm 1,10	9,78 \pm 1,04	<u>0,003*</u>	3,31	0,10	-9,92
FOXP3	13,63 \pm 1,11	13,08 \pm 0,98	0,484	0,55	0,68	-1,46
IFN γ	13,48 \pm 2,43	8,58 \pm 1,54	<u>0,010*</u>	4,9	0,03	-29,86
IL-10	15,87 \pm 1,83	14,42 \pm 0,77	0,188	1,45	0,37	-2,73
IL-17A	13,89 \pm 1,34	9,68 \pm 0,78	<u>0,001*</u>	4,21	0,05	-18,51
RORC	13,62 \pm 0,95	11,53 \pm 0,87	<u>0,049*</u>	2,09	0,23	-4,26
STAT1	8,67 \pm 1,28	8,16 \pm 1,09	0,546	0,51	0,70	-1,42
STAT3	8,67 \pm 0,7	7,90 \pm 0,35	0,086	0,77	0,59	-1,71
STAT4	10,86 \pm 1,21	8,70 \pm 0,45	<u>0,012*</u>	2,16	0,22	-4,47
STAT5	10,22 \pm 1,30	9,05 \pm 0,42	0,116	1,17	0,44	-2,25
TBX21	12,16 \pm 1,89	9,72 \pm 1,00	<u>0,016*</u>	2,44	0,18	-5,43

ANGEGEBEN SIND MW \pm SD ALS ΔCT WERT VON PATIENTEN UND KONTROLLEN. DIE BERECHNUNG IST DEM KAPITEL RT-PCR-PROTOKOLL ZU ENTNEHMEN. MW = MITTELWERT, P-VALUE = SIGNIFIKANZWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Bei der Analyse mit GAPDH als HKG zeigte lediglich CXCR3 und CCR6 eine signifikant unterschiedliche Genexpression zwischen Patienten und Kontrollen. Dabei ist die Genproduktion von CXCR3 bei Erkrankten um das 2,8-fache erniedrigt und bei CCR6 um das 2-fache. Die RT-PCR-Ergebnisse mit GAPDH als Referenzgen können aus Tabelle 36 entnommen werden.

TABELLE 36: RT-PCR-ERGEBNISSE BERECHNET NACH DER $\Delta\Delta CT$ METHODE (HKG: GAPDH).

Sklerodermie (GAPDH)	ΔCT Patient	ΔCT Kontrolle	p-value	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	$-1/2^{-\Delta\Delta CT}$
CCR6	6,25 \pm 0,75	5,22 \pm 0,60	<u>0,041*</u>	1,03	0,49	-2,04
CXCR3	7,64 \pm 0,94	6,15 \pm 0,55	<u>0,016*</u>	1,49	0,36	-2,81
FOXP3	7,81 \pm 0,98	8,59 \pm 1,31	0,357	-0,78	1,72	-0,58
IFN γ	7,56 \pm 2,32	5,20 \pm 2,13	0,132	2,36	0,19	-5,13
IL-10	10,08 \pm 1,85	10,51 \pm 0,91	0,654	-0,43	1,35	-0,74
IL-17A	8,12 \pm 1,01	7,30 \pm 2,90	0,151	0,82	0,57	-1,77
RORC	8,43 \pm 0,71	7,51 \pm 1,12	0,400	0,92	0,53	-1,89
STAT1	3,22 \pm 0,70	4,34 \pm 1,44	0,171	-1,12	2,17	-0,46
STAT3	3,08 \pm 0,70	3,97 \pm 1,01	0,140	-0,89	1,85	-0,54
STAT4	5,41 \pm 0,68	4,76 \pm 1,23	0,337	0,65	0,64	-1,57
STAT5	3,98 \pm 0,40	5,06 \pm 1,03	0,061	-1,08	2,11	-0,47
TBX21	6,23 \pm 1,70	5,43 \pm 1,37	0,425	0,8	0,57	-1,74

ANGEGEBEN SIND MW \pm SD ALS ΔCT WERT VON PATIENTEN UND KONTROLLEN. DIE BERECHNUNG IST DEM KAPITEL RT-PCR-PROTOKOLL ZU ENTNEHMEN. MW =

MITTELWERT, P-VALUE = SIGNIFIKANZWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Das dritte Referenzgen β -Aktin zeigte bei STAT4, IL-17A, IFN γ , CXCR3, TBX21 und CCR6 eine signifikant unterschiedliche Genexpression von Patienten und Kontrollen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 37 aufgelistet. Auch hier zeigte sich, dass die Genexpression über alle Gene hinweg bei Patienten niedriger ist als bei gesunden Kontrollen.

TABELLE 37: RT-PCR-ERGEBNISSE BERECHNET NACH DER $\Delta\Delta$ CT METHODE (HKG: β -AKTIN).

Sklerodermie (β -Aktin)	Δ CT Patient	Δ CT Kontrolle	p-value	$\Delta\Delta$ CT	$2^{\Delta\Delta$ CT	$-1/2^{\Delta\Delta$ CT
CCR6	9.59 \pm 1.50	6.82 \pm 1.03	<u>0.014*</u>	2.77	0.42	-6.82
CXCR3	11.40 \pm 1.41	7.97 \pm 0.69	<u>0.003*</u>	3.43	0.09	-10.78
FOXP3	12.34 \pm 1.75	11.20 \pm 0.88	0.305	1.14	0.45	-2.20
IFN γ	11.22 \pm 2.80	6.77 \pm 1.66	<u>0.022*</u>	4.45	0.05	-21.86
IL-10	13.85 \pm 2.47	12.61 \pm 0.52	0.366	1.24	0.42	-2.36
IL-17A	12.46 \pm 1.35	7.87 \pm 0.61	<u>0.001*</u>	4.59	0.04	-24.08
RORC	11.34 \pm 1.69	9.86 \pm 0.97	0.276	1.48	0.36	-2.79
STAT1	7.57 \pm 1.27	6.35 \pm 1.33	0.211	1.22	0.43	-2.33
STAT3	6.41 \pm 1.21	6.10 \pm 0.39	0.611	0.31	0.81	-1.24
STAT4	9.17 \pm 1.02	6.89 \pm 0.78	<u>0.007*</u>	2.28	0.21	-4.86
STAT5	7.63 \pm 0.45	7.24 \pm 0.21	0.413	0.39	0.76	-1.31
TBX21	9.90 \pm 1.06	7.56 \pm 0.57	<u>0.005*</u>	2.34	0.20	-5.06

ANGEGEBEN SIND MW \pm SD ALS Δ CT WERT VON PATIENTEN UND KONTROLLEN. DIE BERECHNUNG IST DEM KAPITEL RT-PCR-PROTOKOLL ZU ENTNEHMEN. MW = MITTELWERT, P-VALUE = SIGNIFIKANZWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Zu den weiteren Berechnungen und Auswertungen wurde das HKG β 2M verwendet. Diagramm 29 stellt das Genexpressionsniveau von an Sklerodermie erkrankten Personen im Vergleich zu gesunden Kontrollen dar.

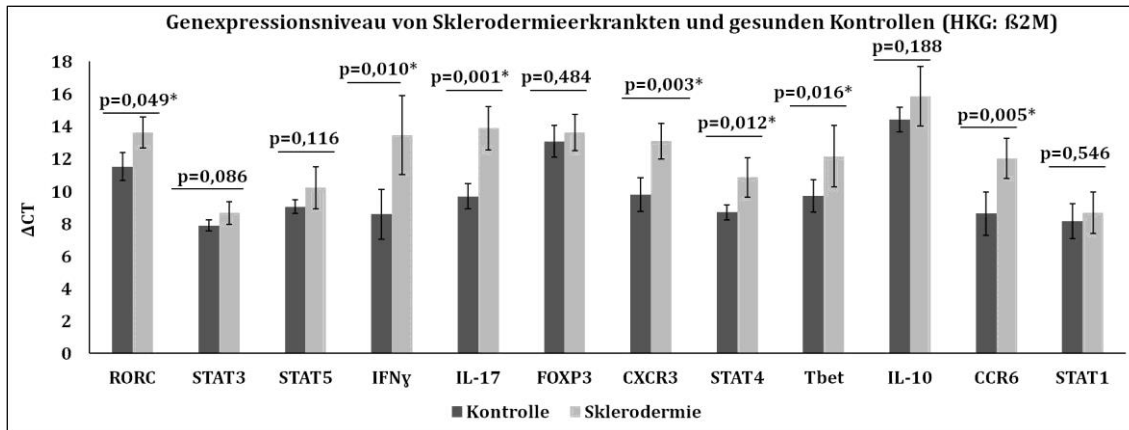


DIAGRAMM 29: GENEXPRESSIONSNIVEAU PRO- UND ANTIINFLAMMATORISCHER GENE BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN
DARGESTELLT IST DER MITTELWERT VON Δ CT \pm STANDARDABWEICHUNG BEI SKLERODERMIE UND KONTROLLEN. HKG = HOUSEKEEPING GEN, P = P-VALUE, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

In Diagramm 29 angegeben ist der Δ CT Wert. Das bedeutet je niedriger der Wert, desto höher die Genexpression. Als HKG diente β 2M. Die exakten Δ CT Werte können Tabelle 37 entnommen werden.

Der Th17-spezifische Transkriptionsfaktor RORC, der Regulator der Th17 Differenzierung STAT3 sowie der Treg spezifische Transkriptionsfaktor FOXP3 und STAT5, der die Treg Differenzierung reguliert, werden bei GAPDH und β -Aktin als HKG sowohl in Sklerodermiepatienten als auch in gesunden Kontrollen in peripheren Lymphozyten gleichermaßen exprimiert.

KORRELATIONEN DER GENEXPRESSION UND DER METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE

Tabelle 38 zeigt die Korrelation der Genmethylierung mit dem Alter, dem Alter bei Krankheitsbeginn und der Krankheitsdauer.

TABELLE 38: KORRELATION DER GENMETHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE MIT KRANKHEITSBEGINN, KRANKHEITSDAUER UND ALTER.

Sklerodermie (Methylierung)	Alter		Alter bei Krankheitsbeginn			Krankheitsdauer		
	K	p	K	p	n	K	p	n
FOXP3 Promotor 1	-,194	,545	,440	,203	10	-,627	,052	10
FOXP3 Promotor 2	-,303	,338	-,037	,920	10	-,146	,687	10
FOXP3 Promotor 1+2	-,381	,222	-,018	,960	10	-,238	,508	10
FOXP3 Enhancer 1	,028	,931	,079	,828	10	-,012	,973	10
FOXP3 Enhancer 2	-,250	,432	,018	,960	10	-,116	,750	10
FOXP3 Enhancer 1+2	-,159	,622	-,012	,973	10	-,061	,867	10
GATA3	-,098	,787	-,345	,364	9	,669	<u>,049*</u>	9
RORC1 Sequenz 1	,250	,432	,012	,973	10	,372	,290	10
RORC1 Sequenz 2	,176	,583	,238	,508	10	,116	,750	10
RORC1 Sequenz 3	-,018	,957	,085	,815	10	,196	,589	10
RORC1 1+2+3	,205	,524	,098	,789	10	,311	,382	10
RORC2 Sequenz 1	,190	,553	,146	,687	10	,098	,789	10
RORC2 Sequenz 2	,074	,819	,146	,687	10	,012	,973	10
RORC2 1+2	,169	,599	,165	,649	10	,061	,867	10
STAT3	-,240	,453	-,482	,159	10	,744	<u>,014*</u>	10
STAT4	-,067	,836	-,067	,854	10	,311	,382	10
STAT5A	-,384	,217	-,585	,075	10	,665	<u>,036*</u>	10
TBX21	-,384	,217	-,591	,072	10	,671	<u>,034*</u>	10

DIE KORRELATIONEN WURDEN NACH SPEARMAN BERECHNET.

K = KORRELATIONSKOEFFIZIENT, N = FALLZAHL, P = SIGNIFIKANZWERT, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Aufgrund der niedrigen Fallzahlen der Sklerodermiepatienten und Kontrollen wurde für die Berechnung des Korrelationskoeffizienten K der Test nach Spearman verwendet. Die Methylierung der Gene bei Sklerodermieerkrankung zeigten keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Alter und dem Alter bei Krankheitsbeginn der untersuchten Personen. Jedoch zeigte sich bei den Genen GATA3, TBX21, STAT3 und STAT5A eine signifikant höhere Methylierung bei längerer Krankheitsdauer.

Tabelle 39 zeigt die Korrelationen von FOXP3 Promotor mit allen untersuchten Genen. Hier zeigte sich vor allem, dass es einen signifikanten positiven Zusammenhang der beiden untersuchten Genabschnitte von FOXP3 Promotor gibt. Die Unterteilung des Gens in mehrere Sequenzierungsschritte ist also problemlos durchführbar. Eine signifikante negative Korrelation zeigte sich zwischen FOXP3 Promotor und des ersten Sequenzierungsabschnittes von RORC1 (K = - 0,629; p =

0,028). Über das gesamte Gen RORC1 konnte kein Zusammenhang mit FOXP3 Promotor errechnet werden (K = -0,399; p = 0,199).

TABELLE 39: KORRELATION DER FOXP3 PROMOTOR METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE MIT ALLEN GENEN

Sklerodermie Patienten (Methylierung)	FOXP3 Promotor 1		FOXP3 Promotor 2		FOXP3 Promotor 1+2	
	K	p	K	p	K	p
n = 12						
FOXP3 Promotor 1	1	-	,585	,046*	,623	,030*
FOXP3 Promotor 2	,585	,046*	1	-	,986	,0001*
FOXP3 Promotor 1+2	,623	,030*	,986	,0001*	1	-
FOXP3 Enhancer 1	,277	,384	,350	,265	,280	,379
FOXP3 Enhancer 2	,571	,053	,706	,010*	,692	,013*
FOXP3 Enhancer 1+2	,361	,249	,483	,112	,441	,152
GATA3	-,547	,102	-,370	,293	-,406	,244
RORC1 Sequenz 1	-,315	,318	-,643	,024*	-,629	,028*
RORC1 Sequenz 2	,102	,753	-,175	,587	-,210	,513
RORC1 Sequenz 3	,203	,527	-,238	,457	-,238	,457
RORC1 1+2+3	,032	,923	-,399	,199	-,399	,199
RORC2 Sequenz 1	,007	,983	-,503	,095	-,490	,106
RORC2 Sequenz 2	,042	,897	-,497	,101	-,455	,138
RORC2 1+2	-,004	,991	-,524	,080	-,503	,095
STAT3	-,161	,617	-,077	,812	-,091	,779
STAT4	-,070	,829	-,308	,331	-,301	,342
STAT5A	,028	,931	-,049	,880	-,091	,779
TBX21	-,357	,254	-,140	,665	-,133	,681

DIE KORRELATIONEN WURDEN NACH SPEARMAN BERECHNET.

K = KORRELATIONSKOEFFIZIENT, N= FALLZAHL, P = SIGNIFIKANZWERT, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Auch die einzelnen Genabschnitte von FOXP3 Enhancer weisen untereinander eine sehr starke positive signifikante Korrelation auf. Eine positive Korrelation besteht ebenfalls zwischen dem zweiten Sequenzierungsabschnitt von FOXP3 Enhancer und der Methylierung von FOXP3 Promotor (K = 0,692; p = 0,013), aufgelistet in Tabelle 40.

TABELLE 40: KORRELATION DER FOXP3 ENHANCER METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE MIT ALLEN GENEN

Sklerodermie Patienten (Methylierung)	FOXP3 Enhancer 1			FOXP3 Enhancer 2			FOXP3 Enhancer 1+2		
	K	p	n	K	p	n	K	p	n
FOXP3 Promotor 1	,277	,384	12	,571	,053	12	,361	,249	12
FOXP3 Promotor 2	,350	,265	12	,706	,010*	12	,483	,112	12
FOXP3 Promotor 1+2	,280	,379	12	,692	,013*	12	,441	,152	12
FOXP3 Enhancer 1	1	-	12	,769	,003*	12	,909	,0001*	12
FOXP3 Enhancer 2	,769	,003*	12	1	-	12	,923	,0001*	12
FOXP3 Enhancer 1+2	,909	,0001*	12	,923	,0001*	12	1	-	12
GATA3	,103	,777	10	,006	,987	10	,139	,701	10
RORC1 Sequenz 1	,070	,829	12	-,259	,417	12	-,112	,729	12
RORC1 Sequenz 2	,601	,039*	12	,217	,499	12	,441	,152	12
RORC1 Sequenz 3	,224	,484	12	-,091	,779	12	-,028	,931	12
RORC1 1+2+3	,329	,297	12	,007	,983	12	,147	,649	12
RORC2 Sequenz 1	,378	,226	12	-,021	,948	12	,175	,587	12
RORC2 Sequenz 2	,294	,354	12	-,014	,966	12	,147	,649	12
RORC2 1+2	,322	,308	12	-,056	,863	12	,140	,665	12
STAT3	,371	,236	12	,259	,417	12	,329	,297	12
STAT4	-,524	,080	12	-,497	,101	12	-,503	,095	12
STAT5A	,406	,191	12	,266	,404	12	,399	,199	12
TBX21	,357	,255	12	,175	,587	12	,308	,331	12

DIE KORRELATIONEN WURDEN NACH SPEARMAN BERECHNET.

K = KORRELATIONSKOEFFIZIENT, N = FALLZAHL, P = SIGNIFIKANZWERT, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Sowohl die unterschiedlichen Sequenzierungsabschnitte des Gens RORC1, als auch alle Abschnitte des Gens RORC2 zeigten eine starke positive Korrelation mit RORC1. Einen signifikanten Zusammenhang ließ sich auch bei RORC1 und STAT3 ermitteln (K = 0,678; p = 0,015). Die Korrelationen mit jeweiligem p-value sind in Tabelle 41 aufgelistet.

TABELLE 41: KORRELATION DER RORC1 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE MIT ALLEN GENEN

Sklerodermie Patienten (Methylierung)	RORC1 Sequenz 1		RORC1 Sequenz 2		RORC1 Sequenz 3		RORC1 Sequenz 1+2+3	
	K	p	K	p	K	p	K	p
n=12								
FOXP3 Promotor 1	-,315	,318	,102	,753	,203	,527	,032	,923
FOXP3 Promotor 2	-,643	<u>,024*</u>	-,175	,587	-,238	,457	-,399	,199
FOXP3 Promotor 1+2	-,929	<u>,028*</u>	-,210	,513	-,238	,457	-,399	,199
FOXP3 Enhancer 1	,070	,829	,601	<u>,039*</u>	,224	,484	,329	,297
FOXP3 Enhancer 2	-,259	,417	,217	,499	-,091	,779	,007	,983
FOXP3 Enhancer 1+2	-,112	,729	,441	,152	-,028	,931	,147	,649
GATA3	,636	<u>,048*</u>	,152	,676	,345	,328	,345	,328
RORC1 Sequenz 1	1	-	,587	<u>,045*</u>	,699	<u>,011*</u>	,888	<u>,0001*</u>
RORC1 Sequenz 2	,587	<u>,045*</u>	1	-	,650	<u>,022*</u>	,825	<u>,001*</u>
RORC1 Sequenz 3	,699	<u>,011*</u>	,650	<u>,022*</u>	1	-	,811	<u>,001*</u>
RORC1 1+2+3	,888	<u>,0001*</u>	,825	<u>,001*</u>	,811	<u>,001*</u>	1	-
RORC2 Sequenz 1	,846	<u>,001*</u>	,846	<u>,001*</u>	,769	<u>,003*</u>	,937	<u>,0001*</u>
RORC2 Sequenz 2	,818	<u>,001*</u>	,776	<u>,003*</u>	,741	<u>,006*</u>	,881	<u>,0001*</u>
RORC2 1+2	,839	<u>,001*</u>	,853	<u>,0001*</u>	,755	<u>,005*</u>	,923	<u>,0001*</u>
STAT3	,671	<u>,017*</u>	,462	,131	,545	,067	,678	<u>,015*</u>
STAT4	,154	,633	,007	,983	,315	,319	,112	,729
STAT5A	,259	,417	,287	,366	,434	,159	,343	,276
TBX21	,566	,055	,448	,145	,413	,183	,524	,080

DIE KORRELATIONEN WURDEN NACH SPEARMAN BERECHNET.

K = KORRELATIONSKOEFFIZIENT, N = FALLZAHL, P = SIGNIFIKANZWERT, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Das Gen RORC2 zeigte nur innerhalb der verschiedenen Sequenzierungsabschnitte des eigenen Gens signifikante positive Korrelationen, wie Tabelle 42 zu entnehmen ist.

TABELLE 42: KORRELATION DER RORC2 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE MIT ALLEN GENEN

Sklerodermie Patienten (Methylierung)	RORC2 Sequenz 1		RORC2 Sequenz 2		RORC2 Sequenz 1+2	
	K	p	K	p	K	p
n=12						
FOXP3 Promotor 1	,007	,983	,042	,897	-,004	,991
FOXP3 Promotor 2	-,503	,095	-,497	,101	-,524	,080
FOXP3 Promotor 1+2	-,490	,106	-,455	,138	-,503	,095
FOXP3 Enhancer 1	,378	,226	,294	,354	,322	,308
FOXP3 Enhancer 2	-,021	,948	-,014	,966	-,056	,863
FOXP3 Enhancer 1+2	,175	,587	,147	,649	,140	,665
GATA3	,212	,556	,273	,446	,200	,580
RORC1 Sequenz 1	,846	<u>,001*</u>	,818	<u>,001*</u>	,839	<u>,001*</u>
RORC1 Sequenz 2	,846	<u>,001*</u>	,776	<u>,003*</u>	,853	<u>,0001*</u>
RORC1 Sequenz 3	,769	<u>,003*</u>	,74	<u>,006*</u>	,755	<u>,005*</u>
RORC1 1+2+3	,937	<u>,0001*</u>	,881	<u>,0001*</u>	,923	<u>,0001*</u>
RORC2 Sequenz 1	1	-	,972	<u>,0001*</u>	,993	<u>,0001*</u>
RORC2 Sequenz 2	,972	<u>,0001*</u>	1	-	,979	<u>,0001*</u>
RORC2 1+2	,993	<u>,0001*</u>	,979	<u>,0001*</u>	1	-
STAT3	,510	,090	,476	,118	,476	118
STAT4	,070	,829	,168	,602	,126	,697
STAT5A	,294	,354	,287	,366	,252	,430
TBX21	,503	,095	,531	,075	,490	,106

DIE KORRELATIONEN WURDEN NACH SPEARMAN BERECHNET.

K = KORRELATIONSKOEFFIZIENT, N = FALLZAHL, P = SIGNIFIKANZWERT, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Wie Tabelle 43 zu entnehmen ist, konnte eine signifikante Korrelation zwischen den STAT Genen kaum aufgezeigt werden. Lediglich STAT3 und STAT5A hatten einen positiven signifikanten Zusammenhang (K = 0,650; p = 0,022). Die Methylierung von STAT3 und STAT5A korrelierte signifikant mit GATA3. Des Weiteren konnte ein positiver Zusammenhang mit hoher Signifikanz zwischen STAT3 und TBX21 aufgezeigt werden (K = 0,832; p = 0,001). Die Werte dazu sind in Tabelle 44 aufgeführt.

TABELLE 43: KORRELATION DER STAT METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE MIT ALLEN GENEN.

Sklerodermie Patienten (Methylierung)	STAT3		STAT4		STAT5A	
	K	p	K	p	K	p
n=12						
FOXP3 Promotor 1	-,161	,617	-,070	,829	,028	,931
FOXP3 Promotor 2	-,077	,812	-,308	,331	-,049	,880
FOXP3 Promotor 1+2	-,091	,779	-,301	,342	-,091	,779
FOXP3 Enhancer 1	,371	,236	-,524	,080	,406	,191
FOXP3 Enhancer 2	,259	,417	-,497	,101	,266	,404
FOXP3 Enhancer 1+2	,329	,297	-,503	,095	,399	,199
GATA3	,806	<u>,005*</u>	,261	,467	,709	<u>,022*</u>
RORC1 Sequenz 1	,671	<u>,017*</u>	,154	,633	,259	,417
RORC1 Sequenz 2	,462	,131	,007	,983	,287	,366
RORC1 Sequenz 3	,545	,067	,315	,319	,434	,159
RORC1 1+2+3	,678	<u>,015*</u>	,112	,729	0,343	,276
RORC2 Sequenz 1	,510	,090	,070	,829	,294	,354
RORC2 Sequenz 2	,476	,118	,168	,602	,287	,366
RORC2 1+2	,476	,118	,126	,697	,252	,430
STAT3	1	-	-,021	,948	,650	<u>,022*</u>
STAT4	-,021	,948	1	-	,231	,471
STAT5A	,650	<u>,022*</u>	,231	,471	1	-
TBX21	,832	<u>,001*</u>	,028	,931	,545	,067

DIE KORRELATIONEN WURDEN NACH SPEARMAN BERECHNET.

K = KORRELATIONSKOEFFIZIENT, N = FALLZAHL, P = SIGNIFIKANZWERT, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

TABELLE 44: KORELLATION DER GATA3 UND TBX21 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE MIT ALLEN GENEN

Sklerodermie Patienten (Methylierung)	GATA3		TBX21	
	K	p	K	p
n=12				
FOXP3 Promotor 1	-,547	,102	-,357	,254
FOXP3 Promotor 2	-,370	,293	-,140	,665
FOXP3 Promotor 1+2	-,406	,244	-,133	,681
FOXP3 Enhancer 1	,103	,777	,357	,255
FOXP3 Enhancer 2	,006	,987	,175	,587
FOXP3 Enhancer 1+2	,139	,701	,308	,331
GATA3	1	-	,733	<u>,016*</u>
RORC1 Sequenz 1	,636	<u>,048*</u>	,566	,055
RORC1 Sequenz 2	,152	,676	,448	,145
RORC1 Sequenz 3	,345	,328	,413	,183
RORC1 1+2+3	,345	,328	,524	,080
RORC2 Sequenz 1	,212	,556	,503	,095
RORC2 Sequenz 2	,273	,446	,531	,075
RORC2 1+2	,200	,580	,490	,106
STAT3	,806	<u>,005*</u>	,832	<u>,001*</u>
STAT4	,261	,467	,028	,931
STAT5A	,709	<u>,022*</u>	,545	,067
TBX21	,733	<u>,016*</u>	1	-

DIE KORRELATIONEN WURDEN NACH SPEARMAN BERECHNET.

K = KORRELATIONSKOEFFIZIENT, N = FALLZAHL, P = SIGNIFIKANZWERT, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Sämtliche Korrelationsberechnungen zwischen Methylierung und Genexpression sind in dieser Arbeit vorsichtig zu betrachten. Die Fallzahl der Genexpressionsbestimmung liegt bei 3-5 pro Gen. Dadurch ist ein Zusammenhang kaum darstellbar. Weitere Versuchsdurchführungen mit größerer Fallzahl sind unbedingt notwendig und aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Unter der geringen Fallzahl ergibt sich ein negativer Zusammenhang zwischen dem PCR-Produkt von RORC und der Methylierung von FOXP3 Promotor Sequenz 1 (K = -0,900; p = 0,037). Alle Ergebnisse der Korrelationsberechnungen zu FOXP3 sind Tabelle 45 und Tabelle 46 zu entnehmen.

TABELLE 45: KORRELATION DER GENEXPRESSION MIT DER FOXP3 PROMOTOR METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE

Sklerodermie Patienten (Methylierung →) (Genexpression ↓)	FOXP3 Promotor 1			FOXP3 Promotor 2			FOXP3 Promotor 1+2		
	K	p	n	K	p	n	K	p	n
CCR6	-,700	,188	5	-,300	,624	5	-,300	,624	5
CXCR3	,100	,873	5	,500	,391	5	,500	,391	5
FOXP3	-,600	,400	4	,400	,600	4	,400	,600	4
IFN γ	,100	,873	5	,000	1	5	,000	1	5
IL-10	,100	,873	5	,000	1	5	,000	1	5
IL-17A	-,200	,747	5	-,500	,391	5	-,500	,391	5
RORC	-,500	,667	3	1	-	3	1	-	3
STAT1	-,300	,624	5	,200	,747	5	,200	,747	5
STAT3	-,900	,037*	5	-,400	,505	5	-,400	,505	5
STAT4	-,500	,391	5	,100	,873	5	,100	,873	5
STAT5	-,600	,285	5	,100	,873	5	,100	,873	5
TBX21	-,300	,624	5	,300	,624	5	,300	,624	5

DIE KORRELATIONEN WURDEN NACH SPEARMAN BERECHNET.

K = KORRELATIONSKOEFFIZIENT, N = FALLZAHL, P = SIGNIFIKANZWERT, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

TABELLE 46: KORRELATION DER GENEXPRESSION MIT DER FOXP3 ENHANCER METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE

Sklerodermie Patienten (Methylierung →) (Genexpression ↓)	FOXP3 Enhancer 1			FOXP3 Enhancer 2			FOXP3 Enhancer 1+2		
	K	p	n	K	p	n	K	p	n
CCR6	-,900	,037*	5	-,900	,037*	5	-,900	,037*	5
CXCR3	-,300	,624	5	-,300	,624	5	-,300	,624	5
FOXP3	-,800	,200	4	-,800	,200	4	-,800	,200	4
IFN γ	,200	,747	5	,200	,747	5	,200	,747	5
IL-10	,200	,747	5	,200	,747	5	,200	,747	5
IL-17A	-,900	,037*	5	-,900	,037*	5	-,900	,037*	5
RORC	-1	-	3	-1	-	3	-1	-	3
STAT1	-,600	,285	5	-,600	,285	5	-,600	,285	5
STAT3	-,800	,104	5	-,800	,104	5	-,800	,104	5
STAT4	-,500	,391	5	-,500	,391	5	-,500	,391	5
STAT5	-,700	,188	5	-,700	,188	5	-,700	,188	5
TBX21	-,100	,873	5	-,100	,873	5	-,100	,873	5

DIE KORRELATIONEN WURDEN NACH SPEARMAN BERECHNET.

K = KORRELATIONSKOEFFIZIENT, N = FALLZAHL, P = SIGNIFIKANZWERT, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Einen negativen Zusammenhang scheint auch die FOXP3 Enhancer Methylierung mit der IL-17A und CCR6 Genexpression aufzuweisen (K = -0,900; p = 0,037).

Leider konnte weder für die FOXP3 Promotor noch für FOXP3 Enhancer Methylierung eine signifikante Korrelation mit der FOXP3 Genexpression detektiert werden.

Tabelle 47 und Tabelle 48 zeigen, dass zwischen der Methylierung von RORC1, RORC2, GATA3, STAT4 und STAT5A und der Genexpression keine signifikante Korrelation nachweisbar war. Lediglich die Methylierung von STAT3 hatte einen signifikanten, positiven Zusammenhang mit der Genexpression von TBX21 (K = 0,900; p = 0,037).

TABELLE 47: KORRELATION DER GENEXPRESSION MIT DER RORC1, RORC2 UND GATA3 METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE

Sklerodermie Patienten (Methylierung →)	RORC1			RORC2			GATA3		
	K	p	n	K	p	n	K	p	n
(Genexpression ↓)									
CCR6	-,100	,188	5	-,300	,624	5	,500	,667	5
CXCR3	-,200	,747	5	-,400	,505	5	,500	,667	5
FOXP3	-,400	,600	4	-,800	,200	4	1	-	4
IFN γ	-,700	,188	5	-,400	,505	5	,500	,667	5
IL10	-,700	,188	5	-,400	,505	5	,500	,667	5
IL17A	,400	,505	5	,300	,624	5	-,500	,667	5
RORC	-,500	,667	3	-1	-	3	1	-	3
STAT1	,000	1	5	-,300	,624	5	,500	,667	5
STAT3	,200	,747	5	-,100	,873	5	,500	,667	5
STAT4	,300	,624	5	-,100	,873	5	,500	,667	5
STAT5	-,200	,747	5	-,500	,391	5	,500	,667	5
TBX21	,400	,505	5	,000	1	5	,500	,667	5

DIE KORRELATIONEN WURDEN NACH SPEARMAN BERECHNET.

K = KORRELATIONSKOEFFIZIENT, N = FALLZAHL, P = SIGNIFIKANZWERT.

TABELLE 48: KORRELATION DER GENEXPRESSION MIT DER STAT METHYLIERUNG BEI SKLERODERMIE

Sklerodermie Patienten (Methylierung →) (Genexpression ↓)	STAT3			STAT4			STAT5A		
	K	p	n	K	p	n	K	p	n
CCR6	,000	1	5	,200	,747	5	-,500	,391	5
CXCR3	,300	,624	5	,400	,505	5	,300	,624	5
FOXP3	,400	,600	4	,200	,800	4	,000	1	4
IFN γ	-,700	,188	5	-,100	,873	5	,300	,624	5
IL-10	-,700	,188	5	-,100	,873	5	,300	,624	5
IL-17A	-,100	,873	5	,700	,188	5	-,600	,285	5
RORC	,500	,667	3	,500	,667	3	,500	,667	3
STAT1	,400	,505	5	,300	,624	5	-,100	,873	5
STAT3	,300	,624	5	-,100	,873	5	-,700	,188	5
STAT4	,700	,188	5	,000	1	5	-,300	,624	5
STAT5	,300	,624	5	,100	,873	5	-,200	,747	5
TBX21	,900	<u>,037*</u>	5	-,200	,747	5	-,100	,873	5

DIE KORRELATIONEN WURDEN NACH SPEARMAN BERECHNET.

K = KORRELATIONSKOEFFIZIENT, N = FALLZAHL, P = SIGNIFIKANZWERT, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

PRÄEKLAMPSIE

DEMOGRAFISCHE DATEN

Für die Studie zu Präeklampsie wurden uns Plazenten oder schwangerschaftstypisches Gewebe von insgesamt 79 Patientinnen zur Verfügung gestellt. Bei 20 Proben wurde das Gewebe einer Interruptio analysiert. Die Frauen waren durchschnittlich 26,2 Jahre alt und der Abbruch wurde in 10,7 SSW durchgeführt. Weitere 20 Proben untersuchten wir von Abortmaterial. Der Abgang war im Schnitt in rechnerisch 8,7 SSW bei einem Durchschnittsalter der Schwangeren von 29,4 Jahren. Außerdem wurden 20 Plazenten von physiologischen Geburten um den errechneten Termin analysiert. Die Entbindung fand im Schnitt mit 30,0 Jahren in 39,2 SSW statt. Geboren wurden 15 Jungen und 6 Mädchen, davon eine Geminigeburt mit zwei Jungen. Weiterhin erhielten wir die Plazenten von 19 Patientinnen, die an Präeklampsie erkrankt waren. Das Durchschnittsalter der Schwangeren betrug 31,7 Jahre und die Entbindung fand im Schnitt mit 34,0 SSW statt. Die Verteilung der Geschlechter lag bei 12 männlichen und 9 weibliche Neugeborenen. Hierunter waren zwei Zwillingsschwangerschaften mit einmal zwei Jungen und einmal einem Mädchen und einem Jungen. Tabelle 49 enthält eine Übersicht über alle demografischen Daten zum Präeklampsieprojekt.

TABELLE 49: DEMOGRAFISCHE DATEN DES PRÄEKLAMPSIEPROJEKTS

	Interruptio	Abort	Geburt	Präeklampsie
Anzahl der Plazenten	20	20	20	19
Alter (Jahre) ¹	26,2 ± 10,7	29,4 ± 7,0	30,0 ± 5,1	31,7 ± 6,8
Geschlecht (m/w)	-	-	15/6	12/9
Geminigravidität (Anzahl)	-	-	1	2
Schwangerschaftswoche ¹	10,7 ± 2,0	8,7 ± 3,0	39,2 ± 1,4	34,0 ± 4,9

¹ WERTE ANGEGEBEN IN MITTELWERT ± STANDARDABWEICHUNG
M = MÄNNLICH, W = WEIBLICH.

ERGEBNISSE DER PYROSEQUENZIERUNG

Alle berechneten Ergebnisse der Methylierungsmessung bei Präeklampsie sind in Tabelle 50 aufgeführt.

TABELLE 50: FOXP3 METHYLIERUNG IN PLAZENTAGEWEBE IM 1. UND 3. TRIMENON

	Interruptio	Fehlgeburt	p-value ¹	Normale Geburt	Präeklampsie	p-value ²
	Methylierung in % MW ± SD			Methylierung in % MW ± SD		
FOXP3 Enhancer 1	28,38 ± 11,37	32,44 ± 11,04	0,142	12,49 ± 11,11	17,00 ± 13,06	0,141
Position 1	25,44 ± 11,99	31,37 ± 10,90	0,086	9,66 ± 9,71	12,93 ± 10,86	0,175
Position 2	26,37 ± 10,98	30,75 ± 10,39	0,211	12,98 ± 10,32	19,58 ± 16,01	0,224
Position 3	33,33 ± 12,93	35,19 ± 12,44	0,461	14,82 ± 14,17	18,49 ± 14,13	0,127
FOXP3 Enhancer 2	27,23 ± 11,72	32,61 ± 10,28	0,108	10,63 ± 10,41	15,66 ± 13,01	0,120
Position 1	27,14 ± 12,20	33,58 ± 10,80	0,076	10,38 ± 10,98	14,23 ± 12,64	0,351
Position 2	30,81 ± 12,91	36,45 ± 10,93	0,091	14,85 ± 15,35	17,67 ± 13,73	0,283
Position 3	29,89 ± 13,03	33,66 ± 11,01	0,060	9,46 ± 10,07	15,37 ± 13,68	0,283
Position 4	21,15 ± 10,26	26,03 ± 8,93	0,096	6,48 ± 6,17	13,56 ± 12,53	0,079
Position 5	35,92 ± 15,02	38,39 ± 12,67	0,698	15,47 ± 17,01	21,09 ± 17,93	0,127
Position 6	25,92 ± 12,07	32,13 ± 10,76	0,091	7,75 ± 7,07	12,56 ± 10,06	0,107
Position 7	22,79 ± 11,61	28,04 ± 9,20	0,201	10,05 ± 11,81	15,17 ± 12,88	0,019*
FOXP3 Promotor 1	54,90 ± 15,03	63,30 ± 12,56	0,099	70,87 ± 15,55	57,80 ± 14,57	0,011*
FOXP3 Promotor 2	78,25 ± 5,32	80,82 ± 5,53	0,114	84,75 ± 5,73	83,33 ± 6,14	0,270
Position 1	88,81 ± 5,13	90,19 ± 2,72	0,799	92,64 ± 5,96	93,15 ± 2,16	0,351
Position 2	74,40 ± 5,65	78,56 ± 3,40	0,008*	81,32 ± 5,71	81,01 ± 3,65	0,283
Position 3	71,82 ± 9,15	75,61 ± 7,76	0,142	79,27 ± 8,03	75,68 ± 11,88	0,322
Position 4	77,96 ± 8,44	78,93 ± 10,78	0,529	85,75 ± 8,25	83,48 ± 9,71	0,235
FOXP3 Promotor 3	62,54 ± 9,66	66,31 ± 8,01	0,211	65,03 ± 11,47	59,58 ± 10,33	0,035*
Position 1	33,84 ± 10,28	37,95 ± 9,32	0,231	35,95 ± 10,10	27,52 ± 9,91	0,012*
Position 2	72,01 ± 11,12	75,13 ± 9,41	0,242	82,48 ± 10,98	73,37 ± 14,59	0,024*
Position 3	81,77 ± 10,32	85,87 ± 6,54	0,165	76,66 ± 17,56	77,87 ± 10,13	0,478

VERGLEICH DER PROZENTUALEN METHYLIERUNG ZWISCHEN DEM 1. TRIMENON (INTERRUPTIO UND ABORT) UND DEM 3. TRIMENON (PRÄEKLAMPSIE UND NORMALE GEBURT). DIE WERTE FÜR MW ± SD SIND IN PROZENT ANGEZEIGT. MW = MITTELWERT, P = SIGNIFIKANZWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050, ¹ = VERGLEICH ZWISCHEN INTERRUPTIO UND ABORT, ² = VERGLEICH ZWISCHEN PRÄEKLAMPSIE UND NORMALER GEBURT.

Am FOXP3 Gen der Proben im ersten Trimenon konnte lediglich an Position zwei in der zweiten Sequenz eine signifikant unterschiedliche Methylierung zwischen Abort und Interruptio erreicht werden. Jedoch zeigte das Gewebe bei Interruptio an allen Positionen eine niedrigere Methylierung – wenn auch nicht signifikant. Dargestellt ist die prozentuale FOXP3 Promotor Methylierung im 1. Trimenon Diagramm 30.

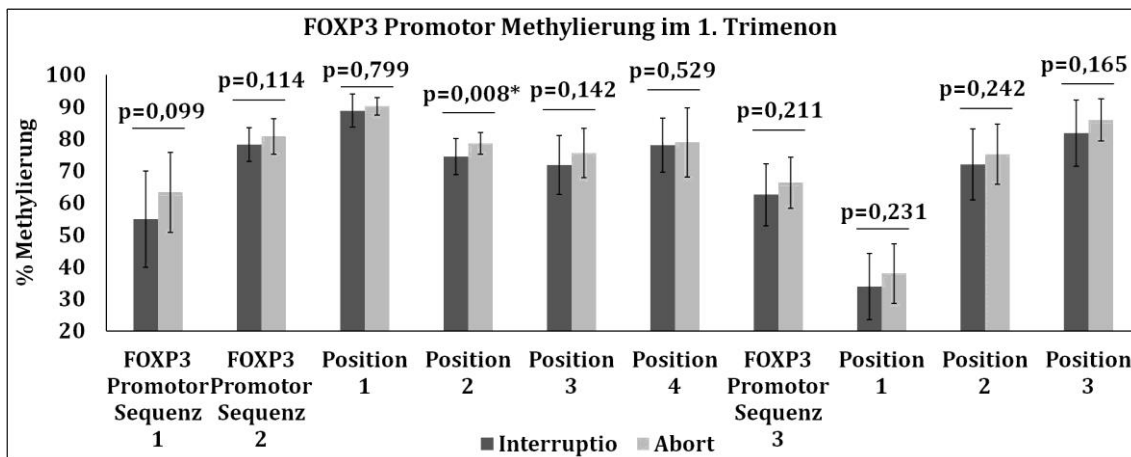


DIAGRAMM 30: FOXP3 PROMOTOR METHYLIERUNG IM 1. TRIMENON

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT ± STANDARDABWEICHUNG BEI INTERRUPTIO UND ABORT. P = P-VALUE.

Diagramm 31 zeigt die prozentuale FOXP3 Promotor Methylierung im 3. Trimenon bei normaler Geburt und bei Präeklampsie. Bei Betrachtung der Proben zeigte sich ein signifikanter Methylierungsunterschied in der ersten und der dritten Sequenz. Dabei war Plazentagewebe von Patientinnen mit Präeklampsie weniger stark methyliert als die der Vergleichsgruppe.

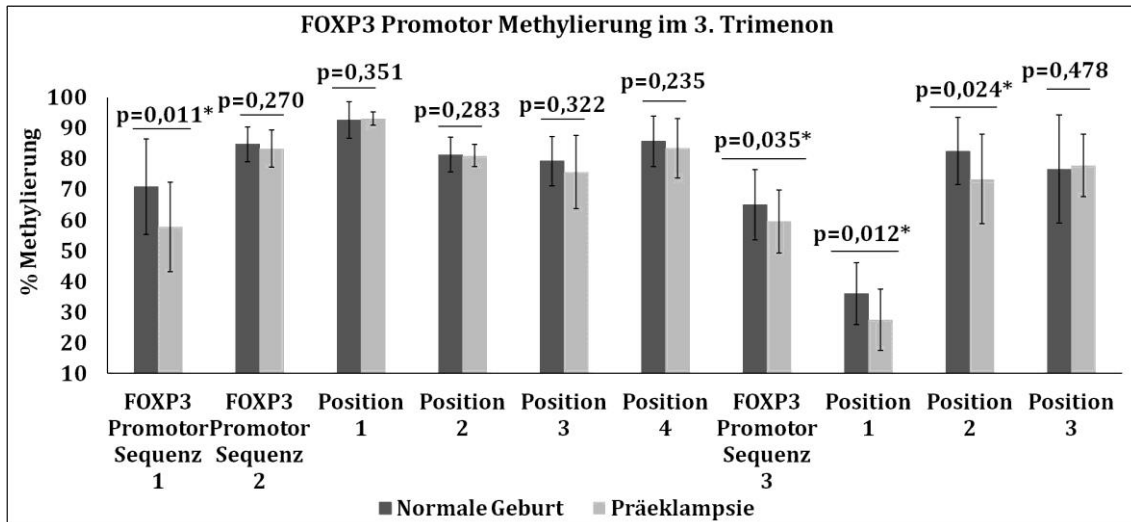


DIAGRAMM 31: FOXP3 PROMOTOR METHYLIERUNG IM 3. TRIMENON

DARGESTELLT IST DER MITTELWERT DER METHYLIERUNG IN PROZENT \pm STANDARDABWEICHUNG BEI PRÄEKLAMPSIE UND BEI NORMALER GEBURT. P = P-VALUE, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Das Gen FOXP3 Enhancer wurde aufgrund seiner X-chromosomalen Lage noch für weibliche und männliche Neugeborene getrennt ausgewertet. Über den Durchschnitt aller Sequenzen hinweg war kein signifikanter Methylierungsunterschied bei männlichen oder weiblichen Neugeborenen feststellbar (Tabelle 51 und Tabelle 52). Bei Mädchen war die vierte Position der zweiten Sequenz bei Präeklampsie signifikant höher methyliert. Bei den männlichen Neugeborenen konnte eine Signifikanz an Position 5 und 7 der zweiten Sequenz festgestellt werden. Hier lag ebenfalls eine Hypermethylierung bei Präeklampsie vor.

TABELLE 51: FOXP3 ENHANCER METHYLIERUNG IN PLAZENTAGEWEBE BEI PRÄEKLAMPSIE UND PHYSIOLOGISCHER GEBURT VON WEIBLICHEN NEUGEBORNEN.

	Normale Geburt (Kind weiblich)	Präeklampsie (Kind weiblich)	p-value
	Methylierung in % MW ± SD		
FOXP3 Enhancer 1	26,63 ± 4,75	28,68 ± 7,21	0,597
Position 1	20,98 ± 7,96	21,05 ± 9,42	0,939
Position 2	26,23 ± 3,57	33,63 ± 9,48	0,059
Position 3	32,70 ± 6,96	31,37 ± 9,47	0,686
FOXP3 Enhancer 2	23,93 ± 4,29	26,82 ± 5,79	0,292
Position 1	23,66 ± 7,60	23,82 ± 7,60	0,944
Position 2	32,90 ± 12,15	29,09 ± 7,35	0,806
Position 3	20,63 ± 9,55	25,99 ± 9,79	0,457
Position 4	13,72 ± 4,78	23,66 ± 7,78	0,020*
Position 5	37,61 ± 3,95	38,67 ± 5,15	0,908
Position 6	16,68 ± 3,36	20,44 ± 4,46	0,144
Position 7	22,31 ± 12,92	26,04 ± 7,15	0,352
FOXP3 Enhancer 1+2	25,64 ± 4,33	28,15 ± 3,36	0,231

VERGLEICH DER PROZENTUALEN METHYLIERUNG IM 3. TRIMENON BEI WEIBLICHEN NEUGEBORNEN. DIE WERTE FÜR MW ± SD SIND IN PROZENT ANGEGEBEN. MW = MITTELWERT, P = SIGNIFIKANZWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

TABELLE 52: FOXP3 ENHANCER METHYLIERUNG IN PLAZENTAGEWEBE BEI PRÄEKLAMPSIE UND PHYSIOLOGISCHER GEBURT VON MÄNNLICHEN NEUGEBORNEN

	Normale Geburt (Kind männlich)	Präeklampsie (Kind männlich)	p-value
	Methylierung in % ± SD		
FOXP3 Enhancer 1	4,87 ± 0,76	6,16 ± 1,53	0,184
Position 1	3,58 ± 0,66	5,17 ± 1,63	0,086
Position 2	5,80 ± 1,13	6,31 ± 1,72	0,756
Position 3	5,21 ± 0,92	6,99 ± 1,78	0,130
FOXP3 Enhancer 2	3,36 ± 0,62	4,76 ± 1,63	0,197
Position 1	3,07 ± 0,57	4,28 ± 2,19	0,182
Position 2	5,02 ± 0,85	6,48 ± 1,73	0,102
Position 3	3,36 ± 1,04	4,81 ± 2,18	0,169
Position 4	2,48 ± 0,91	3,52 ± 1,61	0,132
Position 5	3,37 ± 0,82	5,36 ± 1,99	0,030*
Position 6	2,89 ± 0,76	4,42 ± 1,94	0,091
Position 7	3,32 ± 0,65	4,49 ± 0,58	0,008*
FOXP3 Enhancer 1+2	3,91 ± 0,66	5,27 ± 1,44	0,081

VERGLEICH DER PROZENTUALEN METHYLIERUNG IM 3. TRIMENON BEI MÄNNLICHEN NEUGEBORNEN. DIE WERTE FÜR MW ± SD SIND IN PROZENT ANGEGEBEN. MW = MITTELWERT, P = SIGNIFIKANZWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

Bei der Korrelationsanalyse nach Spearman zeigte sich bei der Auswertung der 39 gesunden Schwangeren aus dem ersten und dritten Trimenon eine signifikant positive Korrelation der SSW mit der FOXP3 Promotor Methylierung. Bei der FOXP3 Enhancer Methylierung ist der negative Zusammenhang mit der SSW ebenfalls signifikant. Das heißt je weiter die Schwangerschaft ist, desto weniger stark ist der FOXP3 Enhancer methyliert. Umgekehrt ist es bei dem Promotor von FOXP3. Je weiter die Schwangerschaft, desto höher ist der Promotor methyliert. Weiterhin konnte bewiesen werden, dass innerhalb des Gens eine signifikante Korrelation herrscht. Die Aufspaltung der Analyse in verschiedene Untersequenzen ist daher problemlos möglich. Allerdings zeigte sich zwischen Enhancer und Promotor eine negative signifikante Korrelation, je höher der Promotor methyliert ist, desto niedriger ist der Enhancer methyliert. Eine signifikante Korrelation zwischen dem Alter der Schwangeren und der FOXP3 Methylierung konnte nicht aufgezeigt werden. Tabelle 53 zeigt die Korrelation der FOXP3 Plazentamethylierung bei gesunden Schwangeren mit der SSW und der FOXP3 Methylierung.

TABELLE 53: KORRELATIONEN DER FOXP3 PLAZENTAMETHYLIERUNG BEI GESUNDEN SCHWANGEREN IM 1. UND 3. TRIMENON MIT DER SSW UND DER FOXP3 METHYLIERUNG

Plazentamethylierung bei gesunden Schwangeren	SSW		FOXP3 Promotor gesamt		FOXP3 Enhancer gesamt	
	K	p	K	p	K	p
n=39						
FOXP3 Promotor 1	,348	<u>0,035*</u>	,854	<u>0,0001*</u>	-,420	<u>0,010*</u>
FOXP3 Promotor 2	,437	<u>0,005*</u>	,946	<u>0,0001*</u>	-,561	<u>0,0001*</u>
FOXP3 Promotor 3	,213	0,194	,866	<u>0,0001*</u>	-,318	<u>0,049*</u>
FOXP3 Promotor gesamt	,343	<u>0,033*</u>	1,000	-	-,503	<u>0,001*</u>
FOXP3 Enhancer 1	-,525	<u>0,001*</u>	-,481	<u>0,002*</u>	,982	<u>0,0001*</u>
FOXP3 Enhancer 2	-,534	<u>0,0001*</u>	-,509	<u>0,001*</u>	,990	<u>0,0001*</u>
FOXP3 Enhancer gesamt	-,528	<u>0,001*</u>	-,503	<u>0,001*</u>	1,000	-

DIE KORRELATIONEN WURDEN NACH SPEARMAN BERECHNET.

K = KORRELATIONSKOEFFIZIENT, N = FALLZAHL, P = SIGNIFIKANZWERT, SSW = SCHWANGERSCHAFTSWOCHEN, * = SIGNIFIKANT MIT P-VALUE < 0,050.

DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit untersucht den Methylierungsstatus pro- und antiinflammatorischer Gene unter dem Einfluss von Stressoren. Zum Vergleich werden gesunde Kontrollgruppen herangezogen. Als Stressfaktoren dienen oxidativer Stress in Form einer Präeklampsie, psychischer Stress im Ausdruck einer Angsterkrankung und inflammatorischer Stress durch Sklerodermie. Im Folgenden werden die Stärken und Schwächen der Methoden, sowie die Ergebnisse der durchgeführten Experimente diskutiert.

DISKUSSION DES MATERIALS UND DER METHODEN

Ziel der Arbeit ist es, neue Erkenntnisse über die Methylierung pro- und antiinflammatorischer Gene zu gewinnen. Als Kontrollgruppe dienten gesunde Personen, die in Alter und Geschlecht mit den Patienten und Patientinnen übereinstimmten. Die Erkrankungen Sklerodermie, Präeklampsie und Angststörung wurden aufgrund der unterschiedlichen Stressoren verwendet.

Als Untersuchungsmaterial diente Vollblut oder Plazentagewebe, was jeweils zu einem Zeitpunkt im Sinne einer Querschnittsanalyse entnommen wurde.

Aus den gewonnenen Blutproben der Patienten und gesunden Kontrollen wurden zunächst PBMCs isoliert. Eine weitere Zellseparation, etwa durch magnetisch-aktivierte Zellsortierung, erfolgte nicht, weshalb der Methylierungsstatus der untersuchten T-Zellspezifischen Transkriptionsfaktoren gemittelt auf alle im peripheren Blut vorhandenen Zellen zu betrachten ist. Ob sich die Methylierung bei den einzelnen T-Zell-Subpopulationen und anderen Leukozytenpopulationen unterscheidet, wird kontrovers diskutiert. Philbert et al. publizierte 2010, dass die DNA-Methylierung am MAOA Promotor aus Vollblut keinen signifikanten Unterschied zur Methylierung der DNA der Lymphoblastenlinie aufweist (Philibert et al., 2010). Dagegen zeigte Wang et al. 2012, dass sich die DNA-Methylierung vom SLC6A4 Gen zwischen T-Zellen und Monozyten unterscheidet (D. Wang et al., 2012). Eine unterschiedliche Methylierung zwischen mononukleären Zellen aus Vollblut und den verschiedenen Untergruppen der Leukozyten durch Exposition

von Tabak veröffentlichte auch Su et al. 2016 (Su et al., 2016). Welches Zellmaterial für epigenetische Analysen am geeignetsten erscheint, wird aktuell noch diskutiert.

Die Patienten mit Sklerodermie und Angsterkrankungen hatten unterschiedliche immunsuppressive Therapien bzw. Therapie mit Anxiolytika und Antidepressiva. Es ist unklar, ob diese Heterogenität in der Therapie die Methylierung an den untersuchten Genen für T-Zellspezifische Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Für weitere Untersuchungen könnten Sequenzierungen vor und nach krankheitsspezifischer Therapie (z. B. der Sklerodermie oder Angsterkrankung) von großem Interesse sein, um die Dynamik der Methylierung im Krankheitsverlauf zu erkennen. Zahlreiche Studien zeigen, dass Methylierungsmuster durch Therapie schnell veränderbar sind. Beispiele dafür sind die Veränderung der Methylierung unter Metformintherapie bei Diabetes mellitus (Bridgeman, Ellison, Melton, Newsholme, & Mamotte, 2018) und die erneute bzw. erhöhte Methylierung von MAOA nach 6-wöchiger Psychotherapie bei Panikstörung. Bei nicht Anschlägen der Psychotherapie wurde ein Abfallen des Methylierungsgrades gemessen (C. Ziegler et al., 2016). Kurzfristige Änderungen der DNA-Methylierung konnten durch Unternaehrer et al. bewiesen werden. In dieser Studie zeigten Probanden schon 10 Minuten nach einem psychischen Stressereignis eine signifikant veränderte Methylierung am Oxytozinrezeptor im Vollblut (Unternaehrer et al., 2012).

Da Epigenetik durch zahlreiche Faktoren beeinflusst wird, sollte die Auswertung der Ergebnisse Nebeneffekte berücksichtigen. Leider ist es in der aktuellen Forschung nicht möglich Störfaktoren auszuschalten. Um diese Verzerrung möglichst gering zu halten wäre eine größere Fallzahl wünschenswert. Ebenso hätten mehr Details zur Lebensweise und zu Komorbiditäten der Probanden erfasst werden sollen. Die DNA-Methylierung wird unter anderem vom Geschlecht (Uddin, Sipahi, Li, & Koenen, 2013), dem Alter der Person (Pal & Tyler, 2016), der Ethnizität (Xia et al., 2014), sowie vom Rauchen (Gao, Jia, Zhang, Breitling, & Brenner, 2015) beeinflusst. Der Raucherstatus wurde im Falle der Patienten mit Angsterkrankungen erfasst, jedoch nicht näher in starke und schwache Raucher

differenziert, bzw. auch der Cotinin-Gehalt in der Haarwurzel wurde nicht gemessen, um Hinweise auf das Rauchverhalten zu erhalten. Es zeigte sich in diesem Projekt kein Unterschied in der FOXP3 Promotor oder Enhancer Methylierung von Raucherinnen und Nichtraucherinnen bei Angsterkrankung. Ergebnisse zum Alter zeigten bei Angststörung lediglich bei FOXP3 Enhancer Sequenz 2 Position 7 ($K = 0,262$, $p = 0,010$) und bei FOXP3 Promotor Sequenz 2 Position 4 ($K = -0,299$, $p = 0,041$) eine signifikante Korrelation zur Genmethylierung. Über die mittlere prozentuale Methylierung aller Positionen hinweg zeigte sich keine signifikante Korrelation zum Alter. Auch bei den Sklerodermiepatienten und -patientinnen konnte keine signifikante Korrelation zwischen Genmethylierung und Alter detektiert werden. Pal und Tyler beschreiben den Zusammenhang von Epigenetik und Altern folgendermaßen: Auf der Ebene der DNA-Methylierung wird eine generelle Hypomethylierung im Alter beschrieben, ausgelöst durch verminderte Aktivität der DNMT1 (Pal & Tyler, 2016). Gleichzeitig kann es bei bestimmten Genen zur vermehrten Methylierung kommen, um die Expression gezielt zu verringern (Pal & Tyler, 2016). Im Einklang damit steht, dass die Methylierung fast aller hier untersuchten Gene eine negative Korrelation im Bezug zum Alter zeigten. Lediglich RORC bei Sklerodermie und FOXP3 Enhancer bei Angstpatientinnen wiesen eine positive, wenn auch nicht signifikante Korrelation auf.

Die oben beschriebenen Gene wurden für diese Arbeit ausgewählt, da sie relevant in der T-Zell Differenzierung und somit in der immunologischen Balance sind. Ein besonderer Schwerpunkt wurde auf Tregs und auf das Gen FOXP3 gelegt. Kim et al. veröffentlichte 2006, dass FOXP3 ein für Tregs spezifischer Marker darstellt (J. M. Kim & Rudensky, 2006). Bereits im Jahr 2007 widerlegte Ziegler diese These und vermutet, dass FOXP3 nicht zellspezifisch für Tregs ist (S. F. Ziegler, 2007). Inzwischen ist bekannt, dass FOXP3 auch in anderen Arten von lymphatischen und myeloischen Zellen und in Epithelzellen nachweisbar ist und auch von aktivierten T-Zellen exprimiert wird, die keine regulatorische Funktion aufweisen (Devaud et al., 2014). Aus diesem Grund kann in dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der Ergebnisse der FOXP3 Methylierung auch von anderen Zellen als

Tregs oder aktivierten T-Zellen, z. B. im Rahmen der Entzündungssituation, bestimmt wurde. Um Tregs eindeutig zu identifizieren müssten weitere Marker zur Selektion verwendet werden, die DNA aus separierten Treg Zellen isoliert und auf ihren Methylierungsgrad an den Zielgenen untersucht werden. Interessant wäre auch die Fragestellung, ob sich die Methylierung von induzierten und natürlichen Tregs unterscheidet. Bisher ist bekannt, dass sich die Methylierung der beiden Tregs am Promotor und Enhancer von FOXP3 unterscheidet, wobei tTregs am FOXP3 Enhancer komplett demethyliert (Khosravi et al., 2018) und sowohl pTregs als auch iTregs partiell methyliert vorliegen (Sherston et al., 2014).

Um den Einfluss der Epigenetik auf die Genexpression zu bewerten, wurde bei einem Teil der Proben die Genexpression mittels RT-PCR ermittelt. Hier zeigte sich bei allen untersuchten Genen eine niedrigere Expression bei an Sklerodermie erkrankten Personen im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Als signifikant berechnet wurde dies bei RORC, STAT4, TBX21 und IL-17A. Die FOXP3 Expression zeigte sich bei Patienten und Patientinnen ebenfalls niedriger als bei Kontrollen. Die negative Korrelation zwischen Methylierung und Genexpression von FOXP3 beschreibt auch Wang et al. bei Sklerodermie (Y. Y. Wang et al., 2014). Das Zytokin IFN γ wurde in diesen Versuchen bei Sklerodermie 30 fach niedriger exprimiert als bei gesunden Kontrollen. Im Gegensatz dazu konnte Gonçalves et al. bei Biopsien von betroffenen Hautstellen eine signifikant höhere IFN γ Expression feststellen (Gonçalves et al., 2019).

Der Frage, ob Pyrosequenzierung mit PyroMark Q24 eine geeignete Methode zur Bestimmung der Methylierung ist, widmete sich Xiang et al. 2019. Bei einem Vergleich von Pyrosequenzierung mit PyroMark Q24 und Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitanalyse (MALDI-TOF MS) konnte gezeigt werden, dass beide Methoden verlässlich, schnell, geeignet und kosteneffektiv sind und sich somit zur klinischen Forschung eignen (Xiang, Chen, He, Li, & Wang, 2019).

Während man lange Zeit davon ausging, dass die DNA-Methylierung an der Base Cytosin stattfindet, zeigen neue Erkenntnisse eine mögliche Methylierung auch an

der Base Adenin (Willyard, 2017). Somit kann die Zugänglichkeit der DNA durch Methylierung auch an anderen Basen als an Cytosin beeinflusst werden.

Diese Studie erhebt den Methylierungsgrad verschiedener pro- und antiinflammatorischer Gene als Grundlage für weitere Forschungsvorhaben. Ziel ist eine Therapieoption auf epigenetischer Ebene zu finden, um Menschen mit bisher schwer therapierbaren Erkrankungen adäquat helfen zu können. Des Weiteren wäre ein Ziel durch epigenetische Untersuchungen Erkrankungen prognostizieren zu können und ggf. vor Krankheitsbeginn präventive Maßnahmen zu ergreifen.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

ANGSTERKRANKUNG

FOXP3 METHYLIERUNG BEI ANGSTERKRANKUNG

Stress führt zu inflammatorischen Veränderungen im Immunsystem und aktiviert proinflammatorische Zytokine. Psychische Erkrankungen führen häufig zu Stressreaktionen im Körper. Wie sich Tregs bei Menschen mit Angsterkrankungen verändern ist bisher noch wenig bekannt. Bei Depression allerdings wird neben zahlreichen Faktoren auch eine gestörte Immuntoleranz als Teil der Pathogenese angenommen (Mohd Ashari et al., 2019). Das Level an Tregs ist bei schwerer Depression im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erniedrigt (Y. Li et al., 2010). Durch medikamentöse antidepressive Therapie konnte die Anzahl der Tregs erhöht werden (Y. Li et al., 2010; Mohd Ashari et al., 2019). Im Mausmodell ist bei stressinduzierter Depression eine Dysfunktion der Tregs bekannt. Des Weiteren ist eine verminderte Thymusfunktion eruiert (Hong et al., 2013; Schmidt et al., 2010). Auch andere psychische Erkrankungen, wie z. B. bipolare Störungen, zeigen veränderte Level an Tregs (do Prado et al., 2013). Ziel dieses Projekts war es, die FOXP3 Methylierung in PBMCs im Rahmen einer Angsterkrankung zu messen und mit gesunden Kontrollen zu vergleichen.

In dieser Studie konnte eine signifikante Hypermethylierung an einem Teil der FOXP3 Promotorregion bei weiblichen Patientinnen mit Angsterkrankung gezeigt werden, was vermutlich in einer reduzierten immunsuppressiven Funktion der Tregs resultiert. Am Enhancer war in diesem Projekt keine signifikant unterschiedliche Methylierung festzustellen.

In einem Folgeprojekt wurde die Anzahl der Angstpatientinnen erhöht und zeitgleich um männliche Angstpatienten mit jeweils zugeordneten gesunden Kontrollen erweitert. In dieser größeren Patientenkohorte konnte bei den weiblichen Probanden eine signifikante Hypermethylierung an allen untersuchten Sequenzen an der FOXP3 Promotorregion im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt werden (Prelog et al., 2016). Bei männlichen Patienten war keine Hypermethylierung messbar (Prelog et al., 2016). Generell findet sich bei Autoimmunerkrankungen eine deutliche Neigung zum weiblichen Geschlecht (Dai & Ahmed, 2014). Die hierfür zugrundeliegenden Mechanismen sind nicht vollständig bekannt. Eine Rolle spielt die Abwesenheit eines zweiten X-Chromosoms bei männlichen Personen, Geschlechtshormone und geschlechterspezifische Unterschiede in der Genregulation z. B. durch Umweltfaktoren.

Durch Rauchen wird die Methylierung von Genen beeinflusst (Bakulski & Fallin, 2014; Morrow et al., 2020). Dogan et al. publizierte 2014, dass chronische Raucher veränderte Methylierungslevel in PBMCs an Genen zur Inflammation, Immunfunktion und Koagulation zeigten (Dogan et al., 2014). In dieser Arbeit konnte kein Unterschied zwischen der FOXP3 Methylierung von Rauchern und Nichtrauchern bei Angstpatientinnen gemessen werden. Allerdings war die Untersuchungsgröße mit 15 Rauchern und 29 Nichtrauchern gering. Als Raucher galt, wer mindestens zwei Zigaretten pro Tag konsumierte. Die Dauer des Rauchens wurde nicht erhoben. Jedoch zeigt Philibert et al., dass auch Personen mit einer Tabakexposition unter einem halben Pack-Year schon eine Hypomethylierung am Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-Repressor Gen in peripheren Zellen aufwiesen (Philibert, Beach, & Brody, 2012). Bei den gesunden Kontrollen wurde in dieser Studie kein Raucherstatus erfragt.

Wie oben beschrieben konnte im Zusammenhang mit einer schweren Depression eine verminderte Anzahl von Tregs im Blut von Patienten gemessen werden (Mohd Ashari et al., 2019). Demethylierte oder hypomethylierte CpG-Regionen im Promotor und Enhancer sorgen für eine stabile Expression des FOXP3 Gens und induzieren damit einen stabilen Treg Phänotyp (Prelog et al., 2016). Hypothetisch könnte eine verminderte FOXP3 Expression durch Hypermethylierung am Promotor zu einer Reduktion der Tregs führen. In dieser Arbeit wurden die Angstpatientinnen nach Depression als Komorbidität befragt. Dabei gaben 20 Patientinnen an, zusätzlich an Depression zu leiden. Bei 21 Patientinnen war lediglich die Angsterkrankung diagnostiziert. Weder am FOXP3 Promotor, noch am FOXP3 Enhancer konnte über alle Sequenzen hinweg eine signifikant unterschiedliche Methylierung bei Angstpatientinnen mit und ohne Depression gesehen werden. Lediglich eine CpG-Position am Enhancer zeigte eine signifikant höhere Methylierung bei Angstpatientinnen mit Depression.

Eine signifikante negative Korrelation besteht zwischen dem Alter bei Krankheitsbeginn und der Methylierung. Je früher die Angsterkrankung begann, desto höher ist die Methylierung am FOXP3 Gen.

Im Alter zeigt sich eine generelle Hypomethylierung im Vergleich zu jüngeren Menschen (Agrawal, Tay, Yang, Agrawal, & Gupta, 2010). Den Zusammenhang zwischen Alter und Hypomethylierung von Foxp3 mit einer daraus folgenden verminderten Funktion der immunsuppressiven Tregs konnte bereits in Mäusen festgestellt werden (Garg et al., 2014). Im Zusammenhang mit einer Angsterkrankung konnte in dieser Arbeit nur an einer CpG-Insel im FOXP3 Promotor eine negative signifikante Korrelation hergestellt werden. Je älter die Angstpatientin war, desto niedriger zeigte sich die Methylierung.

LIMITATIONEN

Da als Studiendesign eine Querschnittstudie gewählt wurde, muss bei der Interpretation der Ergebnisse auf Faktoren geachtet werden, die inflammatorische Prozesse ebenfalls beeinflussen. Dazu gehören z. B. die Fettmasse bei

Übergewichtigen, Diabetes oder eine latente Infektion mit dem Cytomegalievirus (Geerlings & Hoepelman, 1999; Milner & Beck, 2012; Prelog, 2006; Prelog et al., 2016).

Eine Limitation dieser Studie ist, dass keine Aufteilung der Lymphozyten in natürliche Tregs (CD25+CD4+FOXP3+), naive CD4+ T-Zellen und andere Subtypen erfolgte. Baron et al. konnten bereits 2007 herausfinden, dass naive T-Zellen und Tregs unterschiedliche Methylierungsmuster in der FOXP3 Enhancerregion aufweisen (Baron et al., 2007). Die verschiedenen Subpopulationen, die den Pool der PBMCs bilden, könnten ein Grund dafür sein, dass keine signifikanten Unterschiede in der Methylierung der analysierten CpG-Enhancerregionen und nur leichte Unterschiede in der Promotorregion nachweisbar waren.

Des Weiteren ist unklar, ob die veränderte Methylierung als ein Auslöser der Erkrankung zu interpretieren ist, oder ob es durch die Erkrankung zur stressinduzierten Veränderung des Methylierungsgrades kam. Abnehmende Immunabwehr durch Stress konnte in Mausmodellen bewiesen werden (Gimsa et al., 2012; Harpaz et al., 2013; Manfro et al., 2003; Viveros, Arranz, Hernanz, Miquel, & De la Fuente, 2007).

Interessant wäre die Durchführung einer RT-PCR gewesen, um Aussagen über die Genexpression von FOXP3 bei Angstpatientinnen im Vergleich zur Methylierung treffen zu können. Bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis konnte gezeigt werden, dass eine Demethylierung des FOXP3 Upstream Enhancer zu einer erhöhten Aktivität der Transkription von FOXP3 führte. Dabei wurden durch Methotrexat-Therapie fehlerhafte Tregs durch Demethylierung in ihrer Funktion wiederhergestellt (Cribbs et al., 2015).

Am FOXP3 Promotor waren prozentual nur kleine Unterschiede in der Methylierung zu sehen, welche nur gering höher als das Grundrauschen der Methode messbar waren. Eine differenzierte Interpretation zur Methylierung des Promotors ist deshalb nicht möglich. Jedoch beeinflussen kleinste Unterschiede in der Methylierung des Promotors die Zugänglichkeit der Gene und somit die Möglichkeit einer stabilen Genexpression (Cribbs et al., 2015).

Als weitere Einschränkung dieser Arbeit zählt, dass Bisulfitkonvertierung nicht zwischen 5-Methylcytosin und 5-Hydroxymethylcytosin unterscheiden kann. Bei der Interpretation kann also nicht nur von 5-Methylcytosin ausgegangen werden. 5-Hydroxycytosin spielt eine Rolle in der Demethylierung und ermöglicht eine passive Demethylierung, was wiederum zu erhöhter Gentranskription führt (J. U. Guo, Su, Zhong, Ming, & Song, 2011).

SKLERODERMIE

Als weiteres Projekt wurde der Methylierungsgrad von pro- und antiinflammatorischen Genen bei an Sklerodermie erkrankten Patienten und Patientinnen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe bestimmt. Bei Sklerodermie kommt es zu einer umfassenden generellen Hypomethylierung der DNA (Matatiele, Tikly, Tarr, & Gulumian, 2015). Matatiele et al. veröffentlichte 2015, dass sowohl das globale als auch das genspezifische Methylierungsmuster zwischen diffuser und limitierter kutaner Sklerose in PBMCs gleich ist (Matatiele et al., 2015). Im Gegensatz dazu steht allerdings die Arbeit von Altorok et al. welche besagt, dass bei Fibroblasten der beiden Subtypen Abweichungen in der Methylierung bestehen (Altorok, Tsou, Coit, Khanna, & Sawalha, 2015). Drei Gene zeigten sich in der Arbeit von Matatiele allerdings hypermethyliert. Dazu zählten FOXP3, Integrin α -L und Perforin 1 (Matatiele et al., 2015).

METHYLIERUNG UND GENEXPRESSION VON FOXP3

Multiple Veränderungen in immunologischen Prozessen können mit dem Schweregrad und der Entwicklung der Sklerodermie in Verbindung gebracht werden (Sun et al., 2018). Tregs weisen immunsuppressive Fähigkeiten auf und spielen deshalb eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Selbsttoleranz und schützen vor schweren Autoimmunerkrankungen. FOXP3 ist der wichtigste Transkriptionsfaktor, der zur Treg Differenzierung und Funktion führt (Sun et al., 2018). Kontinuierliche FOXP3 Expression ist für einen stabilen T-regulatorischem Phänotyp notwendig und wird durch Demethylierung am FOXP3 Promotor erreicht (Janson et al., 2008). Die Bedeutung von Tregs an der Pathogenese der Sklerodermie wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Klein et al. veröffentlichte 2011, dass weder die Anzahl der Tregs in PBMCs noch deren immunsuppressive Funktion bei systemischer Sklerodermie im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant verändert sind (Klein et al., 2011). An Hautläsionen konnte jedoch ein verringertes Level an Tregs gezeigt werden (Klein et al., 2011). Eine erhöhte Anzahl von Tregs wurde von Radstake et al. in PBMCs bei Sklerodermie beschrieben (Radstake, van Bon, Broen, Wenink, et al., 2009). Im

Gegensatz dazu beschreibt Antiga et al. eine verminderte Anzahl an Tregs in PBMCs und Hautbiopsien bei Patienten mit Sklerodermie (Antiga et al., 2010).

In dieser Arbeit wurden PBMCs von Patienten und Patientinnen mit systemischer Sklerodermie untersucht. Hier konnte kein signifikanter ($p = 0,088$) Methylierungsunterschied am FOXP3 Promotor bei Patienten ($67,31 \% \pm 4,56 \%$) im Vergleich zu Kontrollen ($63,75 \% \pm 4,73 \%$) gezeigt werden. Auch bei einer nach Geschlecht getrennten Auswertung konnte weder am Promotor noch am Enhancer eine Signifikanz detektiert werden. Jedoch zeigte sich an allen CpGs eine relative Hypermethylierung am FOXP3 Promotor bei weiblichen und männlichen Sklerodermiekranken im Vergleich zu den Kontrollen. Dies widerspiegelt die Ergebnisse von Wang et al.. Die Arbeitsgruppe konnte eine signifikante Hypermethylierung am FOXP3 Promotor mit negativer Korrelation zur Expression in CD4+ T Zellen feststellen (Y. Y. Wang et al., 2014). Auch Matatiele et al. beschrieb eine Hypermethylierung am FOXP3 Promotor (Matatiele et al., 2015). Allerdings unterscheidet die Studie von Matatiele nicht in Patienten mit und ohne Therapie. Es gibt Studien die besagen, dass die Methylierung von Genen durch Therapie von Sklerodermie beeinflusst wird (Sun et al., 2018) oder keinen Unterschied hervorruft (Hagemann et al., 2012).

In der Genexpression zeigte Wang et al. eine negative Korrelation zur FOXP3 Methylierung (Y. Y. Wang et al., 2014). Je höher die Methylierung am Gen, desto niedriger dessen Expression. Auch in dieser Arbeit wurde die Genexpression von FOXP3 bestimmt. Es konnte keine signifikant unterschiedliche Expression von FOXP3 bei Sklerodermie und Kontrollen ($p = 0,484$) aufgezeigt werden. Allerdings war die relative Genexpression der Kontrollgruppe im Vergleich zur Gruppe der Sklerodermiepatienten leicht erhöht. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Wang et al. (Y. Y. Wang et al., 2014).

Wie bereits generell in der Epigenetik beschrieben wird auch die Methylierung von FOXP3 z. B. durch Altern und durch Umwelteinflüsse verändert (Alegria-Torres, Baccarelli, & Bollati, 2011; Shu et al., 2017).

METHYLIERUNG UND GENEXPRESSION VON RORC

In der frühen Krankheitsphase der Sklerodermie, bei schweren Verläufen und einer aktiven Erkrankung kann eine erhöhte Anzahl an Th17-Zellen und eine vermehrte Produktion von IL-17A nachgewiesen werden (Baraut et al., 2010; Radstake, van Bon, Broen, Hussiani, et al., 2009). Zytokine der Th17-Zellen können sowohl Inflammation als auch Fibrose induzieren (Y. Zhou et al., 2015). Der Transkriptionsfaktor RORC ist mit der Differenzierung naiver T-Zellen in Richtung Th17-Zellen assoziiert. RORC γ und RORC γ T sind Genprodukte von RORC1 und RORC2 (Almanzar et al., 2016). 50 % der RORC-exprimierenden T-Zellen produzieren IL-17A, während bei einem Mangel an RORC nur geringe Zytokinlevel von IL-17A detektierbar sind (J. Zhu et al., 2010).

Bei hoher Anzahl an Th17-Zellen wird eine hohe Expression des Transkriptionsfaktors RORC vermutet. Um viel RORC zu exprimieren sollte eine geringe Methylierung am Gen vorliegen. Der Methylierungsstatus von RORC wurde gemessen, um die Aktivität der Transkription zu eruieren. Entgegen unseren Erwartungen konnte in dieser Arbeit eine signifikante Hypermethylierung bei Sklerodermiepatienten gefunden werden. Sowohl RORC1 als auch RORC2 zeigten sich über alle untersuchten CpGs hinweg prozentual höher methyliert als die gesunden Kontrollen. Bei einer Aufteilung nach Geschlecht zeigte sich bei weiblichen Patientinnen an fast jedem CpG eine erhöhte Methylierung. Bei erkrankten Männern war dies insgesamt weniger häufig signifikant. Bei allen gemessenen Positionen gab es eine relative Hypermethylierung. Die fehlende Signifikanz bei Männern könnte auf die geringere Probandenanzahl zurückgeführt werden. Während von insgesamt zwölf an Sklerodermie erkrankten nur fünf männlichen Geschlechts waren, wurden sieben weibliche Patientinnen rekrutiert. Bei geringer Fallzahl zeigt ein Unterschied von zwei Patienten eine statistische Relevanz. RORC2 ist unterschiedlich methyliert in klassischen CD4+CD161-CCR6-IFN γ + Th1-Zellen, in Th1/Th17-Zellen CD4+CD161+CCR6+IL17A+IFN γ + Zellen und in nicht klassischen CD4+CD161+CCR6+IFN γ + Th1-Zellen (Mazzoni et al., 2015). Die Hypermethylierung von RORC in dieser Arbeit könnte von Th1 oder Th2-Zellen anstatt der relativen kleinen Subpopulation der Th17-Zellen stammen,

da eine Aufteilung der PBMCs nicht erfolgte. Ein weiterer Grund für die Hypermethylierung von RORC bei Sklerodermie könnte sein, dass in dieser Arbeit keine Unterscheidung in verschiedene Krankheitsphasen und in die Schwere des Verlaufs vorgenommen wurde. Th17-Zellen lassen sich vor allem in der frühen Krankheitsphase der Sklerodermie nachweisen (Almanzar et al., 2016).

Durch die RORC Hypermethylierung der an Sklerodermie erkrankten in dieser Arbeit ist auch eine geringere Genexpression von RORC zu erwarten. Dies konnte in der RT-PCR nachgewiesen werden. Die gesunden Kontrollen zeigten eine gerade noch signifikant höhere Genexpression im Vergleich zu den Patienten ($p = 0,049$). Deutlich signifikant unterschiedlich war die Genexpression von IL-17A ($p = 0,001$). Hier zeigten die Kontrollen ($\Delta CT = 9,86 \pm 0,78$) eine 18-fach höhere Expression als bei Sklerodermie ($\Delta CT = 13,89 \pm 1,34$). Des Weiteren wurde die Genexpression von CCR6 als Marker für IL-17A produzierende Zellen analysiert. Auch hier konnte eine signifikant höhere Genexpression bei Kontrollen im Vergleich zur Sklerodermie detektiert werden ($p = 0,005$). Die Ergebnisse des Methylierungsstatus und der Genexpression von RORC sind schlüssig in sich, wenn auch anders als erwartet.

Die Methylierung von RORC1 und RORC2 zeigte eine hohe gegenseitige Korrelation.

METHYLIERUNG VON GATA3

Bei Sklerodermie sind vor allem in der späteren Krankheitsphase Th2-Zellen bedeutend (Baraut et al., 2010). Durch die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 kommt es zur fortschreitenden Fibrose (Baraut et al., 2010). Der Transkriptionsfaktor GATA3 führt zur Differenzierung von naiven T-Zellen in Th2-Zellen und hemmt gleichzeitig die Th1-Differenzierung (Yagi et al., 2011), er wird also je nach Differenzierung hoch- oder herunterreguliert (Ho, Tai, & Pai, 2009; Usui et al., 2006; Yagi et al., 2011). Eine detektierbare Expression von GATA3 wurde auch bei naiven CD4⁺ T-Zellen gemessen (Ho et al., 2009). Der Entzug von GATA3 führte zu einer verminderten Anzahl an Th2-Zellen (Yamashita et al., 2004). Durch eine Gata3 Deletion im Mausmodell fehlt die Th2-Differenzierung (Pai, Truitt, & Ho,

2004; J. Zhu et al., 2004). GATA3 bindet direkt an den IL-13 und IL-5 Promotor und an den Enhancer von IL-4 (Agarwal, Avni, & Rao, 2000; Kishikawa, Sun, Choi, Miaw, & Ho, 2001; Yagi et al., 2011).

Medsger et al. zeigte eine signifikant höhere Proteinexpression von GATA3 in CD8+ T-Zellen bei Patienten mit diffuser kutaner Sklerodermie im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Medsger et al., 2011). Bereits bei anderen Erkrankungen konnte die Korrelation zwischen einer verminderten GATA3 Methylierung und einer erhöhten Expression von GATA3 gezeigt werden (Almutairi et al., 2019). Bei aktivem Morbus Behçet, einer Autoimmunerkrankung, die zur Gruppe der Vaskulitiden gehört, konnte eine Hypermethylierung am GATA3 Gen gezeigt werden (Y. Zhu et al., 2017). Zur Methylierung von GATA3 bei Sklerodermie findet sich nur wenig Literatur. In dieser Arbeit wurde vermutet, dass eine verminderte Methylierung von GATA3 bei Patienten mit Sklerodermie vorliegt. Es zeigte sich jedoch keine signifikant unterschiedliche Methylierung im GATA3 Gen zwischen gesunden Kontrollen und Sklerodermiekranken. Auch eine Aufteilung nach Geschlecht brachte keinen wesentlichen Unterschied der Methylierung.

An 3 CpGs konnte bei Rauchern eine Hypomethylierung von GATA3 festgestellt werden (Gao, Zhang, Breitling, & Brenner, 2016). Eine Auswertung unter Berücksichtigung des Raucherstatus erfolgte in dieser Arbeit aufgrund zu geringer Fallzahlen nicht.

METHYLIERUNG UND GENEXPRESSION VON TBX21

TBX21 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der zur T-Zell Differenzierung in Richtung Th1-Zellen führt (Szabo et al., 2000). Diese Subgruppe der T-Zellen findet man vor allem zusammen mit Th17-Zellen in der frühen Krankheitsphase in Hautbiopsien bei Sklerodermie und führt über proinflammatorische Zytokine wie IFN γ , IL-2 und IL-10 zur Entzündung (Baraut et al., 2010). In Tbet knockout Zellen kommt es zu einem schweren Defekt der Th1-Zelldifferenzierung in vivo und in vitro (Szabo et al., 2002). Aliprantis et al. konnte 2007 zeigen, dass eine Tbet Deletion bei Mäusen zur erhöhten Produktion von Th2-spezifischen Zytokinen

fürte. Die Produktion von IFN γ war dadurch erniedrigt (Aliprantis et al., 2007). Des Weiteren reguliert TBX21 durch Antagonisierung von GATA3 die Expression von Th2-Zytokinen, wie z. B. das profibrotische IL-13 und stellt somit einen Repressor der dermalen Sklerose dar (Afkarian et al., 2002; Aliprantis et al., 2007; Szabo et al., 2000; J. Zhu et al., 2010). Durch Phosphorylierung wird TBX21 leichter an GATA3 gebunden. Dadurch kann GATA3 nicht an IL-4, IL-5 oder IL-13 Zytokine binden. Die Folge ist, dass weniger Th2-typische Zytokine exprimiert werden (Hwang, Szabo, Schwartzberg, & Glimcher, 2005). Eine Überexpression von TBX21 in T-Zellen zeigte keinen Effekt auf die Fibrosierung (Aliprantis et al., 2007). Neben der Th1-Balance ist TBX21 ein weiterer wichtiger regulatorischer Faktor in dendritischen Zellen, CD8 $^+$ Zellen, B-Zellen und natürlichen Killerzellen (Szabo et al., 2002; Werneck, Lugo-Villarino, Hwang, Cantor, & Glimcher, 2008). Unter der Annahme, dass eine verminderte Th1-Differenzierung zur Erhöhung der Th2-Zellen und den damit verbundenen profibrotischen Zytokinen (IL-4, IL-10 und TGF β) führt, könnte auch eine Hypermethylierung am TBX21 Gen zur verminderten Th1-Differenzierung führen.

In dieser Arbeit konnte bei TBX21 über alle CpG-Inseln hinweg eine höhere Methylierung bei Patienten und Patientinnen als bei gesunden Kontrollen gemessen werden. Eine Signifikanz konnte nicht erreicht werden. Bei M. Behçet wurde dieser Effekt ebenfalls nachgewiesen, es zeigt sich keine signifikant unterschiedliche Methylierung (Y. Zhu et al., 2017).

Des Weiteren wurde die Genexpression von TBX21 analysiert. Hierbei zeigte sich bei den Kontrollen ($\Delta\text{CT} = 9,72 \pm 1,00$) ein signifikant höheres Expressionslevel ($p = 0,016$) als bei an Sklerodermie erkrankten Personen ($\Delta\text{CT} = 12,16 \pm 1,89$). Dies ist erwartungsgemäß der höheren Methylierung von TBX21 bei Sklerodermie.

METHYLIERUNG UND GENEXPRESSION VON STAT

Die Expression vieler inflammatorischer Zytokine wird über den JAK/STAT-Signalweg reguliert. STAT Transkriptionsfaktoren spielen damit eine wichtige Rolle in der Th-Zell-Differenzierung und deren Ausbreitung (J. Zhu et al., 2010).

STAT3

Die Zytokine IL-6, IL-21 und IL-23, die auch an der Th17-Zell Differenzierung und dem Erhalt beteiligt sind, aktivieren STAT3 (Korn et al., 2007; Korn, Bettelli, Oukka, & Kuchroo, 2009; Veldhoen, Hocking, Atkins, Locksley, & Stockinger, 2006). Weitere STAT3 aktivierende Interleukine sind IL-10 und IL-27 (L. Guo et al., 2009). Im Mausmodell führt eine Deletion von Stat3 zum Verlust der IL-17 produzierenden T-Zellen (Mathur et al., 2007).

STAT3 bindet auch an IL-17 selbst (Z. Chen et al., 2006), an IL-21 (Wei, Laurence, Elias, & O'Shea, 2007) und ist verantwortlich für die Induktion von ROR γ T, IL-23R und IL-17A (Yang et al., 2007; L. Zhou et al., 2007).

Außerdem ist durch IL-6 aktiviertes STAT3 für die Herunterregulierung von FOXP3 in Tregs verantwortlich (Korn et al., 2007; Xu, Kitani, Fuss, & Strober, 2007; Yang et al., 2008; Yang et al., 2007). In Zellkulturen unter Th17-Konditionen wird bei fehlendem STAT3 das FOXP3 hochreguliert (Yang et al., 2008).

Unsere Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied der DNA-Methylierung von STAT3 bei Sklerodermiekranken und gesunden Kontrollen. Auch eine Auftrennung der Patienten nach Geschlecht brachte keine Signifikanz. Die Ergebnisse der RT-PCR zur STAT3 Analyse zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Sklerodermie und Kontrollen ($p = 0,086$).

STAT4

STAT4 ist für die Th1-Antwort in vivo und in vitro wichtig und wird stärker in Th1-Zellen als in Th2-Zellen exprimiert (Usui, Nishikomori, Kitani, & Strober, 2003; J. Zhu et al., 2010). Verstärkt wird die STAT4 Expression durch IFN γ und vermindert durch IL-4 und GATA3 (Frucht et al., 2000; Usui et al., 2003). Sowohl die IFN γ

Produktion als auch die Expression von IL-12R β 2 und TBX21 werden durch STAT4 induziert (Usui et al., 2003; Usui et al., 2006). Durch IL-12 aktiviertes STAT4 kann zusammen mit IL-18 eine TCR-unabhängige IFN γ Produktion induziert werden (J. Zhu et al., 2010).

Eine Inaktivierung von Stat4 im Mausmodell zeigte, dass weniger inflammatorische Zytokine und keine Bleomycin-induzierte Fibrose detektierbar waren (Avouac et al., 2011). Daraus resultiert, dass ein inaktives STAT4 Gen protektiv auf die Erkrankung wirkt. In unseren Messungen zeigte sich, wie schon bei STAT3, keinen signifikanten Unterschied der Methylierung von STAT4. Zu beachten ist, dass von Avouac et al. Hautläsionen in Mäusen untersucht wurden. In unseren Messungen wurden PBMCs verwendet, die nicht nach T-Zell Subpopulationen aufgetrennt waren.

Die Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR ergab bei STAT4 allerdings einen signifikanten Unterschied zwischen Sklerodermie und gesunden Kontrollen. Die Expression bei den Erkrankten war viermal niedriger ($p = 0,012$).

STAT5

STAT5a und STAT5b sind die beiden Isoformen von STAT5. Sie werden auf zwei verschiedenen Genen kodiert, ihr Genprodukt ist aber zu 90% identisch. STAT5 ist wichtig für das Signal von Zytokinen, die eine γ -Kette als Untereinheit ihres Rezeptors besitzen (Lin & Leonard, 2000). STAT5 ist für die Th1-Differenzierung und die Th17-Zellexpansion wichtig. Verstärkte STAT5 Expression supprimiert die Th1- und Th17-Differenzierung, während die Th2- und Treg-Differenzierung verstärkt wird (J. Zhu et al., 2010). Durch Deletion werden zelluläre Antworten und Zellproliferation beeinflusst (Moriggl et al., 1999).

In STAT5a knockout Zellen kommt es zu Störungen in der Th2-Zelldifferenzierung, selbst wenn STAT5b vorhanden ist (Cote-Sierra et al., 2004; J. Zhu, Cote-Sierra, Guo, & Paul, 2003). Außerdem zeigten diese Zellen eine vermehrte Reaktion mit IL-12, was zu einer Th1-Differenzierung führt (Takatori et al., 2005).

Eine STAT5 Aktivierung durch IL-2 und die Bindung an den FOXP3 Promotor ist wichtig für die Entwicklung von Tregs (Burchill, Yang, Vogtenhuber, Blazar, & Farrar, 2007; Yao et al., 2007).

STAT5A zeigte an einer der 3 CpG-Positionen eine signifikante Hypomethylierung bei Sklerodermie. Die anderen beiden CpG-Inseln zeigten keine signifikant unterschiedliche Methylierung. In der Literatur ist wenig über die Methylierung von STAT5a bei Sklerodermie bekannt. Auch bei der Genexpression von STAT5 konnten zwischen Kontrollen und Patienten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden.

LIMITATIONEN

Limitierend zeigt sich die geringe Fallzahl der Studie. Bei lediglich zwölf an Sklerodermie erkrankten Personen, davon sieben weiblich und fünf männlich und zehn Kontrollpersonen sollten Studien mit größeren Fallzahlen erfolgen.

Aufgrund der unzureichenden Probenmenge konnte keine Aufteilung der PBMCs in T-Zellsubpopulationen erfolgen. Die Methylierung der einzelnen Untergruppen könnte exaktere Aussagen liefern. Allerdings ist die Isolierung von Tregs aufgrund des intrazellulär liegenden FOXP3 nicht mittels magnetischer Antikörper möglich.

Des Weiteren sollten in Zukunft Hautproben der von Sklerodermie betroffenen Stellen analysiert werden. Dadurch könnte die Frage beantwortet werden, ob eine Methylierungsanalyse von PBMCs Rückschlüsse auf das lokale Geschehen zulässt.

Limitierend ist außerdem, dass pro Patient nur eine Blutprobe entnommen wurde. Interessant wäre, die Methylierung und Genexpression im Verlauf der Erkrankung und unter Therapie zu beobachten.

Wie bereits oben erwähnt wird Epigenetik durch viele Umweltfaktoren beeinflusst. Darunter zählen vor allem auch Komorbiditäten, Herkunft und Lebensstil. Diese Faktoren sollten in weiteren Studien detaillierter erfasst werden.

PLAZENTARE FOXP3 METHYLIERUNG IN DER SCHWANGERSCHAFT

TREGS IN DER FETOMATERNALEN IMMUNTOLERANZ

Schon zu Beginn der Menstruation und durch Kontakt mit Sperma werden im Körper Immunreaktionen ausgelöst (Martinez-Varea et al., 2014; Moldenhauer et al., 2019). Der Schlüssel für eine normal verlaufende Schwangerschaft ist die Immuntoleranz gegenüber dem Embryo. Zur maternofetalen Immunologie gehören zahlreiche Mechanismen und Zellen wie uterine natürliche Killerzellen, Regulation der Trophoblasteninvasion, antigenpräsentierende Zellen, Makrophagen, Antigen- und Trophoblastenaktivität, systemische maternale Immunantwort und Tregs (Martinez-Varea et al., 2014). Je größer der genetische Unterschied zwischen Fet und Mutter, z. B. bei einer Eizellspende, desto höher muss die immunologische Toleranz sein (Martinez-Varea et al., 2014). Tregs spielen bei der maternalen Toleranz gegenüber dem Antigen des Vaters, bei der Implantation und somit für eine gesunde Schwangerschaft eine wichtige Rolle (Care et al., 2018; Hou et al., 2016; Keller, Eikmans, van der Hoorn, & Lashley, 2020). Schwangerschaftskomplikationen wie z. B. Präeklampsie und habituelle Aborte sind häufig mit einer niedrigen Treg Konzentration im Blut und in der Plazenta assoziiert (X. Chen, Gan, Liao, Chen, & Xiao, 2013; Martinez-Varea et al., 2014; Sasaki et al., 2007). Im Verlauf einer Schwangerschaft steigen zunächst die zirkulierenden Tregs an, finden ihren Höhepunkt im zweiten Trimester und fallen postpartal wieder ab (Somerset, Zheng, Kilby, Sansom, & Drayson, 2004).

Die Rolle der Tregs wurde in zahlreichen Studien mit Mäusen bewiesen. So zeigte Moldenhauer et al. 2019, dass sich die Konzentration von Tregs im Uterus und uterusdrainierenden Lymphknoten bei Mäusen nach Paarung signifikant erhöhte (Moldenhauer et al., 2019). Die Akkumulation von FOXP3 im Uterus geschieht durch Steroidhormone, paternale Antigenpräsentation in den Lymphknoten und durch Chemotaxis (Care et al., 2018; Martinez-Varea et al., 2014). Care et al. zeigte, dass eine Treg Depletion bei Mäusen zu einer erhöhten Abortrate und einer erhöhten proinflammatorischen Zytokinkonzentration führt (Care et al., 2018). Zu

einer starken mütterlichen Entzündungsreaktion mit zytokinvermittelten Endothelschäden durch erniedrigte Treg Konzentrationen kommt es auch in der Pathogenese der Präeklampsie in der Frühschwangerschaft (X. Chen et al., 2013). Ein Mangel an Tregs ruft zusätzlich eine Dysfunktion der Uterinarterien bei Mäusen hervor (Care et al., 2018). Die uterine Gefäßversorgung passt sich in der Schwangerschaft durch Vasodilatation, verminderte Vasokonstriktion und erniedrigtem Gefäßwiderstand an, um die Versorgung des Feten zu gewährleisten (Care et al., 2018). Im Mausmodell führte eine Depletion der Tregs in den Uterinarterien zu einer Erhöhung des Resistance Index um 15 % und des Pulsatility Index um 20 % im Ultraschall. Ein erhöhter Pulsatility Index korreliert signifikant mit einem erhöhten Risiko für Präeklampsie und intrauterine Wachstumsretardierung (Martin, Bindra, Curcio, Cicero, & Nicolaidis, 2001). Auch wenn die exakte Pathogenese der Erkrankung nicht bekannt ist, wird eine fehlerhafte Plazentation mit der Entstehung einer Präeklampsie assoziiert (Martinez-Varea et al., 2014).

EPIGENETIK DER FETOMATERNALEN IMMUNTOLERANZ UND DER PLAZENTAENTWICKLUNG

Grundlagen für die Entwicklung von Erkrankungen, wie z. B. Übergewicht oder Krebs, werden bereits in der frühesten Embryonalentwicklung beeinflusst (Hoyo et al., 2012). Dass sich epigenetische Veränderungen um den Zeitpunkt der Befruchtung auch Jahrzehnte später auswirken, konnte eine Studie über den dänischen Hungerwinter 1944/1945 zeigen. Die Kinder von Frauen, die in der Hungersnot schwanger wurden, zeigten 2008 noch eine deutlich geringe Methylierung der differenziell methylierten Regionen des Insulin-like growth factors II als ihre gleichgeschlechtlichen Geschwister (Heijmans et al., 2008). Eine Exposition der rationierten Ernährung über mindestens 10 Wochen in der späteren Schwangerschaft brachte keine Veränderung der Methylierung (Heijmans et al., 2008). Auch im Mausmodell beeinflusst Ernährung die Epigenetik von Säugern bereits in der frühen Entwicklungsphase (Heijmans et al., 2008). Simner et al. untersuchte in Gewebe von 18 Aborten und 14 Plazenten von physiologischen Geburten Gene die Aminosäuretransporter kodieren (Simner et

al., 2017). Es konnte gezeigt werden, dass sich die Methylierung der Gene im Schwangerschaftsverlauf verändert und sich auch die Genexpression unterscheidet (Simner et al., 2017). Je nach Gen wurde eine Hyper- oder Hypomethylierung gezeigt (Simner et al., 2017). DNA-Methylierung kann nicht nur die Transkription beeinflussen, sondern auch langfristiges Gen-Silencing bewirken. Eine präzise Regelung der Genexpression ist dadurch allerdings nur schwer möglich (Simner et al., 2017).

METHYLIERUNG VON FOXP3 BEI ABORT UND INTERRUPTIO IM ERSTEN TRIMENON

Zahlreiche Studien existieren zur Methylierung in schwangerschaftstypischem Material bei Abort (Hou et al., 2016; Keller et al., 2020). Als Kontrollgruppe dient in der Regel, wie auch in dieser Arbeit, Gewebe von Interruptiones. Hou et al. zeigte 2016, dass bei habituellen Aborten ohne erkennbaren Grund die FOXP3 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant geringer ist. Passend zu diesem Ergebnis war in dieser Studie die Methylierung am FOXP3 Promotor signifikant erhöht. Es besteht eine negative Korrelation (Hou et al., 2016).

In dieser Arbeit wurde nicht zwischen habituellem Abort und ein- oder zweimaligem Abortgeschehen unterschieden. Doch auch bei spontanem Abort ist die Anzahl an CD4+CD25+ Zellen in der Dezidua wesentlich niedriger als bei induziertem Abort (Hou et al., 2016). Eine signifikant erhöhte Methylierung konnte in dieser Arbeit lediglich an einer Position am FOXP3 Promotor bei Abort im Vergleich zur Interruptio untersucht werden. Im Gegensatz dazu konnte Mei et al. zeigen, dass die FOXP3 Expression und die Anzahl an Tregs bei habituellen Aborten sowohl im Blut, als auch in der Dezidua signifikant erniedrigt waren (Mei, Tan, Chen, Chen, & Zhang, 2010). Es ist zu erwarten, dass deshalb die Methylierung signifikant höher ist. Es bleibt die Frage, welche Umwelteinflüsse und anderweitige Störfaktoren die FOXP3 Methylierung beeinflusst. Sicherlich müsste zunächst die Fallzahl erhöht werden. Hier wurden jeweils 20 Gewebeproben jeder Gruppe untersucht.

Um eine bessere Aussagefähigkeit zu erzielen, sollten in weiteren Versuchen eine Trennung von Tregs und eine weitere Teilung in tTreg und pTreg aus dem Plazentagewebe erfolgen. Bei Modenhauer et al. konnten nur wenige Tregs aus dem Mäuseuterus gewonnen werden, doch die Verteilung lag bei 70% pTregs und 30% tTregs. Es zeigte sich kein Unterschied von gepaarten und ungepaarten Mäusen. Auch in der Methylierung des FOXP3 Promotors waren Unterschiede erkennbar. Tregs hatten die geringste Methylierung, gefolgt von pTregs und am meisten methyliert zeigten sich Tconv. Durch die Paarung wurde aber nur die Methylierung von tTregs reduziert, nicht aber von pTregs und Tconv (Moldenhauer et al., 2019). Es könnte also sein, dass in dieser Arbeit durch ein gemischtes Zellbild keine signifikant veränderte Methylierung zu detektieren war. Des Weiteren ist womöglich das Methylierungsmuster der pTreg und tTreg Zellen unterschiedlich (Janson et al., 2008; Kennedy et al., 2014).

FOXP3 METHYLIERUNG IN PLAZENTAGEWEBE IM DRITTEN TRIMENON

Es gibt zahlreiche Studien zur Methylierung in Plazentagewebe (Apicella et al., 2019; Simner et al., 2017). Zur FOXP3 Methylierung in Plazentagewebe bei gesunden Schwangeren sind bisher keine Daten verfügbar. Am FOXP3 Promoter zeigten die drei Sequenzen 70,87 %, 84,75 % und 65,03 % Methylierung. Der FOXP3 Enhancer zeigte in der Plazenta bei weiblichen Neugeborenen eine Methylierung von 26,63 % an Position 1, 23,93 % an Position 2 und 25,64 % an Position 3. Bei männlichen Neugeborenen betrug die Methylierung lediglich 4,87 %, 3,36 % und 3,91 %. Vergleicht man nun diese Daten mit der Methylierung des FOXP3 Gens bei Interruptio zeigt sich am FOXP3 Promotor eine durchweg geringere Methylierung im ersten Trimenon. Also erhöht sich im Verlauf einer Schwangerschaft die Methylierung am FOXP3 Promotor. Hou et al. besagt, dass die Treg Konzentration in Dezidua bei habituellem Abort negativ mit der Promotormethylierung korreliert (Hou et al., 2016). Unser Resultat steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Somerset et al., welche besagen, dass die Anzahl an Tregs im Blut ihren Höhepunkt im zweiten Trimester nimmt und kein signifikanter Unterschied im dritten Trimester darstellbar ist (Somerset et al.,

2004). Die Anzahl an CD4+CD25+ Zellen lag bei Somerset et al. im ersten Trimenon bei 6,7 % und erhöhte sich im dritten Trimenon auf 8,9 % (Somerset et al., 2004). Unter Annahme einer negativen Korrelation müsste die Methylierung im Verlauf der Schwangerschaft abnehmen. Außerdem müssten Tregs im Blut und in der Plazenta von der Anzahl korrelieren.

EPIGENETIK DER PRÄEKLAMPSIE

Im Mittelpunkt der Pathogenese der Präeklampsie steht die Plazenta. Durch fehlerhafte tiefe Invasion der Zytotrophoblasten und durch villöse Trophoblastendefekte kommt es zu einem verminderten Blutfluss und zu Sauerstoffmangel in der Plazenta. Die daraus resultierende Hypoxie führt zu oxidativem Stress, Nekrose und Inflammation (Apicella et al., 2019; Huppertz, 2008). Gegenteilig gibt es auch die Meinung, dass Hyperoxie zur Schädigung der Plazenta führt (Apicella et al., 2019).

Apicella et al. teilt die Pathogenese der Präeklampsie in vier molekulare Mechanismen ein (Apicella et al., 2019).

Erstens kommt es über verschiedene Faktoren wie z. B. abnorme Sauerstoffsignale zu einer mitochondrialen Dysfunktion mit Erhöhung der Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (Apicella et al., 2019). Reaktive Sauerstoffspezies haben eine gute Reaktionsfähigkeit und können zur oxidativen Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden führen. Dadurch entsteht oxidativer Stress, welcher zu einer frühzeitigen Alterung der Trophoblastzellen und eine Verkürzung der Telomerlänge führt (Apicella et al., 2019).

Zweitens spielt Methylierung, Histonmodifikation und mikroRNA in der Trophoblasteninvasion eine wichtige Rolle (Apicella et al., 2019).

Der dritte Mechanismus ist die endotheliale Dysfunktion, wie bereits oben erwähnt. Der lösliche Rezeptor sFlt und Methylierung von TET2 hemmen das Signalmolekül VEGF, welches für die Angiogenese und Vaskulogenese wichtig ist. Durch mRNA kommt es außerdem zur Hemmung der endothelialen

Stickstoffmonoxid-Synthase und damit zur verminderten Freisetzung von Stickstoffmonoxid. Stickstoffmonoxid führt zur Dilatation von Gefäßen. Dieser Mangel begründet einen Faktor der Hypertonie (Apicella et al., 2019).

Viertens kommt es zu einer Veränderung von Tregs, worauf eine Entzündungsreaktion folgt. mRNA hemmt den Transkriptionsfaktor FOXP3. Durch RNA wird auch der Transkriptionsfaktor STAT3 beeinflusst. Beides führt zu Veränderungen der Tregs. Die Methylierung von FOXP3 wurde bisher noch nicht untersucht, weshalb die Ergebnisse dieser Studie einen Beitrag zur Pathologie der Präeklampsie leisten können (Apicella et al., 2019).

METHYLIERUNG VON FOXP3 IN PLAZENTAGEWEBE BEI PRÄEKLAMPISIE

Durch das Absinken der Tregs im dritten Trimenon könnte eine Präeklampsie ausgelöst werden (Martinez-Varea et al., 2014). Durch Spermaexposition vor einer Schwangerschaft kann der Körper eine überschießende Immunreaktion bei Konzeption verhindern und dadurch auch die Inzidenz der Präeklampsie verringern (Sasaki et al., 2007). Sasaki et al. berichtete, dass das Level an Tregs in der Peripherie bei einer schwangeren Frau signifikant höher ist als bei nicht schwangeren Kontrollen. Gleichzeitig zeigte die Studie, dass bei Präeklampsie weniger Tregs im Blut vorhanden sind als bei einer normalen Schwangerschaft (Sasaki et al., 2007). Im Plazentabett konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl an T-Zellen bei Präeklampsie nicht verändern, aber sich der Anteil an zytotoxischen T-Zellen erhöht (Sasaki et al., 2007). Außerdem sinken bei einer Präeklampsie die Tregs in der Plazenta signifikant im Vergleich zur unauffälligen Schwangerschaft (Sasaki et al., 2007). Bei sinkender Anzahl an plazentaren Tregs wäre eine erhöhte Methylierung am FOXP3 Gen zu erwarten. In den Messungen dieser Studie konnte am FOXP3 Promotor bei zwei von drei Sequenzen eine signifikante ($p=0,011$ und $p=0,035$) Hypomethylierung bei Präeklampsie im Vergleich zu normalen Schwangerschaften detektiert werden. Am FOXP3 Enhancer zeigten sich sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Neugeborenen nur an einzelnen Positionen signifikante Unterschiede. Da eine Teilung der Proben wegen X-chromosomaler Vererbung in beide Geschlechter vorgenommen werden musste,

erniedrigte sich die Fallzahl stark. Teilweise lag $n < 5$. Trotzdem zeigte Position 4 der zweiten Sequenz von FOXP3 Enhancer bei Mädchen eine signifikant erhöhte Methylierung bei Präeklampsie im Vergleich zur normalen Schwangerschaft (13,7 % und 23,7 %. $p = 0,02$). Bei Jungen sind Position 5 und 7 bei Präeklampsie signifikant hypermethyliert ($p = 0,003$ und $p = 0,008$).

LIMITATIONEN

Die Untersuchung von Plazentagewebe hat eine Zellheterogenität, die die Messungen beeinflussen kann (Simner et al., 2017). Das stark heterogene Zellbild in Plazentagewebe macht eine Zellsortierung z. B. mittels MACS und FACS notwendig, um genauere Aussagen treffen zu können. Die Plazentaprobe der Präeklampsie spiegeln nur das Bild der Tregs und Methylierung bei Entbindung wider. Leider kann aufgrund fehlender Verfügbarkeit von Proben zu anderen Zeitpunkten keine Studie über den Verlauf der Methylierung von FOXP3 innerhalb einer Schwangerschaft am Plazentagewebe durchgeführt werden. In den meisten Studien dienen als Kontrollgruppe von Plazentagewebe unauffällige Schwangerschaften. Physiologische Entbindungen finden in der Regel zeitlich deutlich später statt als Geburten bei Präeklampsie und könnten daher unterschiedliche Methylierungslevel aufweisen. Bei vielen Studien ist der Zeitpunkt von Blut- und Plazentaentnahme nicht dokumentiert (Keller et al., 2020). Um eine Korrelation der FOXP3 Methylierung von Tregs in Plazentagewebe mit der FOXP3 Expression zu eruieren, sollte in einer Folgestudie zusätzlich die Genexpression bestimmt werden. Da Epigenetik und auch Methylierung sehr sensibel auf Umwelteinflüsse reagieren, sind Störfaktoren mit einzuberechnen. Diese werden auch in Zukunft nicht komplett entfernt und eruiert werden können. Zur Limitation dieser Ergebnisse ist auch zu erwähnen, dass andere genetische Einflüsse wie oben genannt auch bei Präeklampsie eine Rolle spielen. Diese können in dieser Studie nicht ausgeschlossen werden.

AUSBLICK

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten und Ergebnisse leisten einen Beitrag zu neuen Erkenntnissen in der Grundlagenforschung der Epigenetik. Die epigenetische Regulation pro- und antiinflammatorischer Gene durch Stressoren stellt einen Faktor dar, der zur Pathogenese einer jeder Erkrankung beitragen könnte. Deshalb ist weitere Forschung in diesem Gebiet zwingend notwendig. Die niedrigen Fallzahlen schränken die Aussagekraft der vorliegenden Studie ein. Vor allem im Bereich der Sklerodermie müssten weitere Untersuchungen mit höheren Fallzahlen durchgeführt werden, um valide Rückschlüsse auf die Beteiligung epigenetischer Modifikationen und Mechanismen ziehen zu können. Des Weiteren wären Untersuchungen von betroffenen Hautstellen gewinnbringend. Noch ist unklar, ob mit der Untersuchung von PBMCs als einfach zugänglichem Probenmaterial valide Rückschlüsse auf die Methylierungsmuster der in den lokalen, veränderten Arealen vorherrschenden Immunzellpopulation gezogen werden können. Leider lassen sich meist aus der veränderten Haut nur wenige Immunzellen isolieren, sodass sich die Bestimmung des Methylierungslevel und der Genexpression schwierig gestaltet.

Ein weiterer Grund für die Erhöhung der Fallzahl ist die leichte Beeinflussung der Epigenetik. Zahlreiche, bisher sicherlich noch nicht vollständig erforschte Faktoren führen zur Methylierung und Demethylierung an Genen. Je größer die untersuchte Population, desto weniger Einfluss haben diese Störfaktoren auf die Ergebnisse. Ziel weiterer Forschungen müsste eine konkrete Möglichkeit zur Veränderung der Methylierung beinhalten. Dadurch könnten viele Menschen durch Verminderung ihres Leidens oder durch Heilung einer Erkrankung profitieren.

Die Methylierung zu verändern, ist ein erfolgsversprechender Therapieansatz für zahlreiche Erkrankungen. Gene könnten dadurch gezielt aktiviert oder inaktiviert werden. Hauptsächlich wird an zwei Medikamentengruppen geforscht: DNA-Methyltransferasen - und Histondeacetylaseinhibitoren (Lal & Bromberg, 2009). Epigenetische Regulation könnte auch als Immuntherapie fungieren (Lal & Bromberg, 2009). Tregs als Regulator der Immunantwort stehen in besonderem

Fokus. Tregs zu generieren ist oft teuer und ineffektiv (Lal & Bromberg, 2009). Die Arbeitsgruppe von Sun et al. konnte zeigen, dass sich durch die Gabe von einem aktiven Vitamin A Derivat (All-Trans-Retinoinsäure) mit Zugabe von TGF β in vitro sowohl die Anzahl an Tregs vermehrte, also auch eine erhöhte FOXP3 Expression und eine Hypomethylierung am FOXP3 Promotor bei systemischen Sklerodermiepatienten zu detektieren war (Sun et al., 2018). Die Methylierungsänderung zeigte sich unabhängig von der TGF β -Zugabe (Sun et al., 2018).

Auch im Bereich der Präeklampsie könnten weitere Erkenntnisse zur Epigenetik Fortschritte im Bereich der Diagnose und der Therapie liefern. Die Arbeitsgruppe um Mayne et al. konnte ein vorzeitiges Altern des Plazentagewebes anhand der Methylierung erkennen und somit einen hohen Risikofaktor für Präeklampsie benennen (Mayne et al., 2017). Könnte die Methylierung ein prognostischer Marker schon lange vor Entstehung der Präeklampsie und den teils gravierenden Folgen sein? Des Weiteren könnte auch in der Schwangerschaft die Immunreaktion durch Medikamente, die die Epigenetik verändern, moduliert werden. Um zu diesem Ziel zu gelangen sind noch viele wissenschaftliche Erforschungen in diesem Gebiet notwendig.

Eine Angsterkrankung bedeutet wiederholt exzessiven Stress für den Körper, wodurch sich das Methylierungsmuster von Immunzellen verändert und dies teilweise verantwortlich für die hohe Rate an Komorbiditäten ist (Prelog et al., 2016). Betroffene Personen profitieren von einer gezielten Prävention und einer frühzeitigen effektiven Behandlung, damit die Veränderung der Epigenetik der Immunzellen nicht eintritt. Damit könnte die Rate an Autoimmunstörungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs und Infektionskrankheiten im Zusammenhang mit einer Angsterkrankung deutlich gesenkt werden und somit auch die sozioökonomischen Kosten verringern und gleichzeitig die Lebensqualität der Betroffenen steigern. Mechanismen für die Sicherstellung einer stabilen Epigenetik könnten zum Einen das Verringern der Angstsymptome und dadurch des Stresslevels und zum Anderen der direkte Einfluss auf die Methylierung sein.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Erforschung der Epigenetik bringt Aufschlüsse über die Steuerung von Genaktivitäten und liefert damit wichtige Erkenntnisse zur Pathogenese verschiedenster Erkrankungen. Die epigenetische Grundlagenforschung stellt den ersten Schritt für die spätere Entwicklung von epigenetisch wirksamen Medikamenten oder Therapieverfahren dar.

Untersucht wurde die Methylierung pro- und antiinflammatorischer Gene im hypoxischen Setting hervorgerufen durch Präeklampsie, durch Angsterkrankung und durch Inflammation bei Sklerodermie. Als Untersuchungsmaterial dienten PBMCs und Plazentagewebe. Zur Bestimmung der prozentualen Methylierung wurde Pyrosequenzierung durchgeführt. Bei einem Teil der Proben erfolgte zusätzlich die Bestimmung der Genexpression mittels Real Time PCR.

Bei Patientinnen mit Angsterkrankung zeigte sich eine signifikante Hypermethylierung am Promotor des Treg spezifischen Transkriptionsfaktors FOXP3. Dies könnte eine Erklärung für die beeinträchtigte Funktion der Tregs bei Angsterkrankung und somit die erhöhte Komorbidität mit verschiedenen Erkrankungen sein. Des Weiteren konnte eine signifikant niedrigere Methylierung durch medikamentöse Therapie am FOXP3 Promotor aufgezeigt werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass Medikamente die Methylierung effektiv beeinflussen können und eine immunologische Balance wiederherstellen. Außerdem konnte der Zusammenhang zwischen frühem Krankheitsbeginn und erhöhter Methylierung am FOXP3 Promotor detektiert werden.

In der Gruppe der an Sklerodermie erkrankten Personen zeigte sich keine signifikant unterschiedliche Methylierung am FOXP3 Promotor oder Enhancer. Dafür konnte entgegen den Erwartungen eine signifikant höhere RORC1 und RORC2 Methylierung bei Sklerodermie nachgewiesen werden. Eine Genexpressionsanalyse erbrachte eine signifikant niedrigere Expression von RORC bei Sklerodermie im Vergleich zu gesunden Kontrollen unter Verwendung der internen Kontrolle β 2Mikroglobulin. Es ist bekannt, dass in der aktiven

Krankheitsphase der Sklerodermie oder bei schweren Verläufen vermehrt Th17-Zellen nachweisbar sind. Der Transkriptionsfaktor RORC führt zur Differenzierung naiver T-Zellen in Richtung Th17. Eine geringere Methylierung von RORC ist zu erwarten. Diese überraschenden Ergebnisse könnten der Methodik geschuldet sein. Auf eine Auftrennung der verschiedenen T-Zellen vor Messung der Methylierung wurde verzichtet. So könnte die hohe RORC Methylierung von anderen Subpopulationen wie Th1 oder Th2-Zellen stammen. Außerdem sind die verschiedenen Krankheitsphasen durch unterschiedliche Subpopulationen der T-Zellen dominiert. In die unterschiedlichen Stadien der Erkrankung wurde aufgrund der geringen Fallzahl nicht unterteilt.

Plazentagewebe bei Präeklampsie zeigte eine signifikant geringere Methylierung am FOXP3 Promotor als Plazentagewebe von gesunden Schwangeren. Am FOXP3 Enhancer konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden. Auch im 1. Trimenon der Schwangerschaft zeigte sich zwischen Abort und Interruptio keine signifikanten Methylierungsunterschiede am FOXP3 Gen.

Die Regulation krankheitsrelevanter Gene und deren Proteine über Veränderungen in der DNA-Methylierung stellen einen wichtigen und zugleich noch unzureichend erforschten Bereich bei Erkrankungen mit inflammatorischer Komponente dar. Die Veränderbarkeit der DNA-Methylierung durch äußere Einflüsse und Medikamente stellt hierbei einen vielversprechenden Ansatzpunkt für zukünftige Therapien dar und sollte in weiteren Studien konkretisiert werden.

SUMMARY

Epigenetic research offers new insights about the regulation of gene activities and provides important knowledge of the pathogenesis of diseases. To develop drugs or treatments with epigenetic effects basic research is necessary.

Hypoxic conditions through preeclampsia, panic disease and inflammation in systemic sclerosis were used to measure the methylation level of pro- and anti-inflammatory genes. The analyses were performed with PBMCs and placental tissue. To determine the methylation level pyrosequencing was used. Gene expression through real time PCR was additionally analyzed with part of the samples.

A significant hypermethylation of the promoter of the Treg specific transcription factor FOXP3 in patients with panic diseases was shown. This could be a reason for the impaired function of Tregs in panic disorder and could cause the comorbidity of several diseases. Furthermore a lower methylation status of FOXP3 promoter was detected in patients with medical therapy. The methylation level seems to be effectively affected by drugs and can probably restore immunology balance. There was also a relation between an early beginning of the disease and a higher FOXP3 promoter methylation detected.

Systemic sclerosis does not affect the methylation of FOXP3 promoter or enhancer. Against expectations the transcription factor RORC1 and RORC2 was significantly higher methylated in patients with scleroderma and the gene expression was lower compared to the healthy control group. It is known that active disease periods and severe progresses are linked to an increased number of Th17-cells. RORC is responsible for the differentiation of naive t-cells to Th17-cells. It is expected that lower methylation levels of RORC are detectable. This surprising result might be caused through the used methods: t-cells were not divided into their subgroups. It could be possible that Th1- and Th2-cells are responsible for the hypermethylation of RORC. Furthermore, there are variable t-cell

subpopulations in the different stages of scleroderma and the patients group was not split due to the little number of cases.

Placental tissue of patients with preeclampsia showed significant lower methylation levels of the FOXP3 promoter than tissue of healthy pregnant women. The FOXP3 enhancer did not show this effect. The comparison between tissue of abortion and interruptions in the first trimester of pregnancy did not show a different methylation of the FOXP3 gene as well.

The regulation of genes and their proteins through methylation is an important but still inadequately known part of diseases with inflammatory component. The convertibility of DNA methylation with external factors and pharmaceuticals is a promising approach for therapies and should be substantiated in future studies.

LITERATURVERZEICHNIS

- Aavikko, M., Kaasinen, E., Nieminen, J. K., Byun, M., Donner, I., Mancuso, R., . . . Aaltonen, L. A. (2015). Whole-Genome Sequencing Identifies STAT4 as a Putative Susceptibility Gene in Classic Kaposi Sarcoma. *J Infect Dis*, *211*(11), 1842-1851. doi:10.1093/infdis/jiu667
- Abron, J. D., Singh, N. P., Murphy, A. E., Mishra, M. K., Price, R. L., Nagarkatti, M., . . . Singh, U. P. (2018). Differential role of CXCR3 in inflammation and colorectal cancer. *Oncotarget*, *9*(25), 17928-17936. doi:10.18632/oncotarget.24730
- Abroun, S., Saki, N., Ahmadvand, M., Asghari, F., Salari, F., & Rahim, F. (2015). STATs: An Old Story, Yet Mesmerizing. *Cell J*, *17*(3), 395-411.
- ACOG. (2019). ACOG Practice Bulletin No 202 Gestational Hypertension and Preeclampsia.
- Afkarian, M., Sedy, J. R., Yang, J., Jacobson, N. G., Cereb, N., Yang, S. Y., . . . Murphy, K. M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. *Nat Immunol*, *3*(6), 549-557. doi:10.1038/ni794
- Agarwal, S., Avni, O., & Rao, A. (2000). Cell-type-restricted binding of the transcription factor NFAT to a distal IL-4 enhancer in vivo. *Immunity*, *12*(6), 643-652. doi:10.1016/s1074-7613(00)80215-0
- Agrawal, A., Tay, J., Yang, G. E., Agrawal, S., & Gupta, S. (2010). Age-associated epigenetic modifications in human DNA increase its immunogenicity. *Aging (Albany NY)*, *2*(2), 93-100. doi:10.18632/aging.100121
- Albert, C. M., Chae, C. U., Rexrode, K. M., Manson, J. E., & Kawachi, I. (2005). Phobic anxiety and risk of coronary heart disease and sudden cardiac death among women. *Circulation*, *111*(4), 480-487. doi:10.1161/01.CIR.0000153813.64165.5D
- Alegria-Torres, J. A., Baccarelli, A., & Bollati, V. (2011). Epigenetics and lifestyle. *Epigenomics*, *3*(3), 267-277. doi:10.2217/epi.11.22
- Aliprantis, A. O., Wang, J., Fathman, J. W., Lemaire, R., Dorfman, D. M., Lafyatis, R., & Glimcher, L. H. (2007). Transcription factor T-bet regulates skin sclerosis through its function in innate immunity and via IL-13. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(8), 2827-2830. doi:10.1073/pnas.0700021104
- Almanzar, G., Klein, M., Schmalzing, M., Hillgardt, D., El Hajj, N., Kneitz, H., . . . Prelog, M. (2016). Disease Manifestation and Inflammatory Activity as Modulators of Th17/Treg Balance and RORC/FoxP3 Methylation in Systemic Sclerosis. *Int Arch Allergy Immunol*, *171*(2), 141-154. doi:10.1159/000450949
- Almanzar, G., Schmalzing, M., Klein, M., Hillgardt, D., Morris, P., Hofner, K., . . . Prelog, M. (2019). Memory CD4+ T cells lacking expression of CCR7 promote pro-inflammatory cytokine production in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Eur J Dermatol*, *29*(5), 468-476. doi:10.1684/ejd.2019.3645
- Almutairi, B., Charlet, J., Dallosso, A. R., Szemes, M., Etchevers, H. C., Malik, K. T. A., & Brown, K. W. (2019). Epigenetic deregulation of GATA3 in neuroblastoma is associated with increased GATA3 protein expression and with poor outcomes. *Sci Rep*, *9*(1), 18934. doi:10.1038/s41598-019-55382-6
- Altork, N., Almeshal, N., Wang, Y., & Kahaleh, B. (2015). Epigenetics, the holy grail in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*, *54*(10), 1759-1770. doi:10.1093/rheumatology/keu155
- Altork, N., Tsou, P. S., Coit, P., Khanna, D., & Sawalha, A. H. (2015). Genome-wide DNA methylation analysis in dermal fibroblasts from patients with diffuse and limited systemic sclerosis reveals common and subset-specific DNA methylation aberrancies. *Ann Rheum Dis*, *74*(8), 1612-1620. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205303

- Antiga, E., Quaglino, P., Bellandi, S., Volpi, W., Del Bianco, E., Comessatti, A., . . . Caproni, M. (2010). Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphea. *Br J Dermatol*, *162*(5), 1056-1063. doi:10.1111/j.1365-2133.2010.09633.x
- Apicella, C., Ruano, C. S. M., Mehats, C., Miralles, F., & Vaiman, D. (2019). The Role of Epigenetics in Placental Development and the Etiology of Preeclampsia. *Int J Mol Sci*, *20*(11). doi:10.3390/ijms20112837
- Appay, V., Sauce, D., & Prelog, M. (2010). The role of the thymus in immunosenescence: lessons from the study of thymectomized individuals. *Aging (Albany NY)*, *2*(2), 78-81. doi:10.18632/aging.100122
- Asano, Y. (2018). Systemic sclerosis. *J Dermatol*, *45*(2), 128-138. doi:10.1111/1346-8138.14153
- Avouac, J., Furnrohr, B. G., Tomcik, M., Palumbo, K., Zerr, P., Horn, A., . . . Distler, J. H. (2011). Inactivation of the transcription factor STAT-4 prevents inflammation-driven fibrosis in animal models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, *63*(3), 800-809. doi:10.1002/art.30171
- AWMF. (2014). S3 Leitlinie Behandlung von Angststörungen.
- Bakulski, K. M., & Fallin, M. D. (2014). Epigenetic epidemiology: promises for public health research. *Environ Mol Mutagen*, *55*(3), 171-183. doi:10.1002/em.21850
- Baraut, J., Michel, L., Verrecchia, F., & Farge, D. (2010). Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. *Autoimmun Rev*, *10*(2), 65-73. doi:10.1016/j.autrev.2010.08.003
- Baron, U., Floess, S., Wiczorek, G., Baumann, K., Grutzkau, A., Dong, J., . . . Huehn, J. (2007). DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol*, *37*(9), 2378-2389. doi:10.1002/eji.200737594
- Bergamasco, A., Hartmann, N., Wallace, L., & Verpillat, P. (2019). Epidemiology of systemic sclerosis and systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Clin Epidemiol*, *11*, 257-273. doi:10.2147/cep.s191418
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., . . . Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, *441*(7090), 235-238. doi:10.1038/nature04753
- Bridgeman, S. C., Ellison, G. C., Melton, P. E., Newsholme, P., & Mamotte, C. D. S. (2018). Epigenetic effects of metformin: From molecular mechanisms to clinical implications. *Diabetes Obes Metab*, *20*(7), 1553-1562. doi:10.1111/dom.13262
- Burchill, M. A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B. R., & Farrar, M. A. (2007). IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol*, *178*(1), 280-290. doi:10.4049/jimmunol.178.1.280
- Campbell, D. J., & Ziegler, S. F. (2007). FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, *7*(4), 305-310. doi:10.1038/nri2061
- Care, A. S., Bourque, S. L., Morton, J. S., Hjartarson, E. P., Robertson, S. A., & Davidge, S. T. (2018). Reduction in Regulatory T Cells in Early Pregnancy Causes Uterine Artery Dysfunction in Mice. *Hypertension*, *72*(1), 177-187. doi:10.1161/hypertensionaha.118.10858
- Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., & Oliveira, M. J. (2018). Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front Immunol*, *9*, 847. doi:10.3389/fimmu.2018.00847
- Chapman, R. S., Lourenco, P. C., Tonner, E., Flint, D. J., Selbert, S., Takeda, K., . . . Watson, C. J. (1999). Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev*, *13*(19), 2604-2616.

- Chen, J., Liu, W., & Zhu, W. (2019). Foxp3(+) Treg Cells Are Associated with Pathological Process of Autoimmune Hepatitis by Activating Methylation Modification in Autoimmune Hepatitis Patients. *Med Sci Monit*, *25*, 6204-6212. doi:10.12659/msm.915408
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., . . . Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, *198*(12), 1875-1886. doi:10.1084/jem.20030152
- Chen, X., Gan, T., Liao, Z., Chen, S., & Xiao, J. (2013). Foxp3 (-/ATT) polymorphism contributes to the susceptibility of preeclampsia. *PLoS One*, *8*(4), e59696. doi:10.1371/journal.pone.0059696
- Chen, Z., Laurence, A., Kanno, Y., Pacher-Zavisin, M., Zhu, B. M., Tato, C., . . . O'Shea, J. J. (2006). Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(21), 8137-8142. doi:10.1073/pnas.0600666103
- Classen, M., Diehl, V., & Kochsiek, K. (2009). *Innere Medizin*. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Cote-Sierra, J., Foucras, G., Guo, L., Chiodetti, L., Young, H. A., Hu-Li, J., . . . Paul, W. E. (2004). Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(11), 3880-3885. doi:10.1073/pnas.0400339101
- Craske, M. G., Stein, M. B., Eley, T. C., Milad, M. R., Holmes, A., Rapee, R. M., & Wittchen, H. U. (2017). Anxiety disorders. *Nat Rev Dis Primers*, *3*, 17024. doi:10.1038/nrdp.2017.24
- Cribbs, A. P., Kennedy, A., Penn, H., Amjadi, P., Green, P., Read, J. E., . . . Williams, R. O. (2015). Methotrexate Restores Regulatory T Cell Function Through Demethylation of the FoxP3 Upstream Enhancer in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*, *67*(5), 1182-1192. doi:10.1002/art.39031
- Dai, R., & Ahmed, S. A. (2014). Sexual dimorphism of miRNA expression: a new perspective in understanding the sex bias of autoimmune diseases. *Ther Clin Risk Manag*, *10*, 151-163. doi:10.2147/tcrm.s33517
- Daraei, N., Ghafourian, M., Ghadiri, A., Amari, A., Najafian, M., & Rokhafrooz, S. (2019). Evaluation of Exhausted Regulatory T Cells in Preeclampsia. *Iran J Immunol*, *16*(2), 163-169. doi:10.22034/IJI.2019.80259
- Dawson, M. A. (2017). The cancer epigenome: Concepts, challenges, and therapeutic opportunities. *Science*, *355*(6330), 1147-1152. doi:10.1126/science.aam7304
- Deng, G., Song, X., Fujimoto, S., Piccirillo, C. A., Nagai, Y., & Greene, M. I. (2019). Foxp3 Post-translational Modifications and Treg Suppressive Activity. *Front Immunol*, *10*, 2486. doi:10.3389/fimmu.2019.02486
- Deng, Q., Luo, Y., Chang, C., Wu, H., Ding, Y., & Xiao, R. (2019). The Emerging Epigenetic Role of CD8+T Cells in Autoimmune Diseases: A Systematic Review. *Front Immunol*, *10*, 856. doi:10.3389/fimmu.2019.00856
- Devaud, C., Darcy, P. K., & Kershaw, M. H. (2014). Foxp3 expression in T regulatory cells and other cell lineages. *Cancer Immunol Immunother*, *63*(9), 869-876. doi:10.1007/s00262-014-1581-4
- DGGG, O., SGGG. (2019). Hypertensive Pregnancy Disorders: Diagnosis and Therapy. Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics (S2k-Level, AWMF-Registry No. 015/018) 1.1. Retrieved from <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/015-018.html> Zugriff am 11.02.2021
- do Prado, C. H., Rizzo, L. B., Wieck, A., Lopes, R. P., Teixeira, A. L., Grassi-Oliveira, R., & Bauer, M. E. (2013). Reduced regulatory T cells are associated with higher levels of Th1/TH17 cytokines and activated MAPK in type 1 bipolar disorder. *Psychoneuroendocrinology*, *38*(5), 667-676. doi:10.1016/j.psyneuen.2012.08.005

- Dogan, M. V., Shields, B., Cutrona, C., Gao, L., Gibbons, F. X., Simons, R., . . . Philibert, R. A. (2014). The effect of smoking on DNA methylation of peripheral blood mononuclear cells from African American women. *BMC Genomics*, *15*, 151. doi:10.1186/1471-2164-15-151
- Domschke, K., Tidow, N., Kuithan, H., Schwarte, K., Klauke, B., Ambree, O., . . . Deckert, J. (2012). Monoamine oxidase A gene DNA hypomethylation - a risk factor for panic disorder? *Int J Neuropsychopharmacol*, *15*(9), 1217-1228. doi:10.1017/s146114571200020x
- Douek, D. C., McFarland, R. D., Keiser, P. H., Gage, E. A., Massey, J. M., Haynes, B. F., . . . Koup, R. A. (1998). Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, *396*(6712), 690-695. doi:10.1038/25374
- Escribese, M. M., Gomez-Casado, C., Barber, D., & Diaz-Perales, A. (2015). Immune Polarization in Allergic Patients: Role of the Innate Immune System. *J Investig Allergol Clin Immunol*, *25*(4), 251-258.
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics*, *8*(4), 286-298. doi:10.1038/nrg2005
- Fritsch, P. (2004). *Dermatologie, Venerologie*. Berlin [u.a.]: Springer.
- Frucht, D. M., Aringer, M., Galon, J., Danning, C., Brown, M., Fan, S., . . . O'Shea, J. J. (2000). Stat4 is expressed in activated peripheral blood monocytes, dendritic cells, and macrophages at sites of Th1-mediated inflammation. *J Immunol*, *164*(9), 4659-4664. doi:10.4049/jimmunol.164.9.4659
- Gao, X., Jia, M., Zhang, Y., Breitling, L. P., & Brenner, H. (2015). DNA methylation changes of whole blood cells in response to active smoking exposure in adults: a systematic review of DNA methylation studies. *Clin Epigenetics*, *7*, 113. doi:10.1186/s13148-015-0148-3
- Gao, X., Zhang, Y., Breitling, L. P., & Brenner, H. (2016). Tobacco smoking and methylation of genes related to lung cancer development. *Oncotarget*, *7*(37), 59017-59028. doi:10.18632/oncotarget.10007
- Garg, S. K., Delaney, C., Toubai, T., Ghosh, A., Reddy, P., Banerjee, R., & Yung, R. (2014). Aging is associated with increased regulatory T-cell function. *Aging Cell*, *13*(3), 441-448. doi:10.1111/accel.12191
- Geerlings, S. E., & Hoepelman, A. I. (1999). Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol*, *26*(3-4), 259-265. doi:10.1111/j.1574-695X.1999.tb01397.x
- George, J. (2008). Mechanisms of disease: the evolving role of regulatory T cells in atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, *5*(9), 531-540. doi:10.1038/ncpcardio1279
- Gershon, R. K., & Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, *18*(5), 723-737.
- Gimsa, U., Kanitz, E., Otten, W., Tuchscherer, M., Tuchscherer, A., & Ibrahim, S. M. (2012). Tumour necrosis factor receptor deficiency alters anxiety-like behavioural and neuroendocrine stress responses of mice. *Cytokine*, *59*(1), 72-78. doi:10.1016/j.cyto.2012.04.001
- Giovannetti, A., Rosato, E., Renzi, C., Maselli, A., Gambardella, L., Giammarioli, A. M., . . . Pierdominici, M. (2010). Analyses of T cell phenotype and function reveal an altered T cell homeostasis in systemic sclerosis. Correlations with disease severity and phenotypes. *Clin Immunol*, *137*(1), 122-133. doi:10.1016/j.clim.2010.06.004
- Gonçalves, R. S. G., Pereira, M. C., Dantas, A. T., Almeida, A. R., Rego, M., Lima, E. A., . . . Pitta, M. (2019). CCL3, IL-7, IL-13 and IFN γ transcripts are increased in skin's biopsy of systemic sclerosis. *Exp Dermatol*, *28*(10), 1172-1175. doi:10.1111/exd.13982

- Good, S. R., Thieu, V. T., Mathur, A. N., Yu, Q., Stritesky, G. L., Yeh, N., . . . Kaplan, M. H. (2009). Temporal induction pattern of STAT4 target genes defines potential for Th1 lineage-specific programming. *J Immunol*, *183*(6), 3839-3847. doi:10.4049/jimmunol.0901411
- Gulati K, G. S., Joshi J, Rai N, Ray A. (2016). Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. *MOJ Immunology*, *4*(2). doi:10.15406/moji.2016.04.00121
- Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. L., & Song, H. (2011). Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle*, *10*(16), 2662-2668. doi:10.4161/cc.10.16.17093
- Guo, L., Wei, G., Zhu, J., Liao, W., Leonard, W. J., Zhao, K., & Paul, W. (2009). IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(32), 13463-13468. doi:10.1073/pnas.0906988106
- Hagemann, S., Kuck, D., Stresemann, C., Prinz, F., Brueckner, B., Mund, C., . . . Sommer, A. (2012). Antiproliferative effects of DNA methyltransferase 3B depletion are not associated with DNA demethylation. *PLoS One*, *7*(5), e36125. doi:10.1371/journal.pone.0036125
- Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., Chen, Z., & Cao, X. (2009). CD69+ CD4+ CD25- T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol*, *182*(1), 111-120.
- Harpaz, I., Abutbul, S., Nemirovsky, A., Gal, R., Cohen, H., & Monsonego, A. (2013). Chronic exposure to stress predisposes to higher autoimmune susceptibility in C57BL/6 mice: glucocorticoids as a double-edged sword. *Eur J Immunol*, *43*(3), 758-769. doi:10.1002/eji.201242613
- Hautzinger, M., & Thies, E. (2009). *Klinische Psychologie: Psychische Störungen kompakt* (Vol. 1. Auflage): Beltz.
- Heijmans, B. T., Tobi, E. W., Stein, A. D., Putter, H., Blauw, G. J., Susser, E. S., . . . Lumey, L. H. (2008). Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(44), 17046-17049. doi:10.1073/pnas.0806560105
- Hirahara, K., & Nakayama, T. (2016). CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int Immunol*, *28*(4), 163-171. doi:10.1093/intimm/dxw006
- Hiraoka, N., Onozato, K., Kosuge, T., & Hirohashi, S. (2006). Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res*, *12*(18), 5423-5434. doi:10.1158/1078-0432.ccr-06-0369
- Ho, I. C., Tai, T. S., & Pai, S. Y. (2009). GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, *9*(2), 125-135. doi:10.1038/nri2476
- Hoge, E. A., Brandstetter, K., Moshier, S., Pollack, M. H., Wong, K. K., & Simon, N. M. (2009). Broad spectrum of cytokine abnormalities in panic disorder and posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety*, *26*(5), 447-455. doi:10.1002/da.20564
- Hong, M., Zheng, J., Ding, Z. Y., Chen, J. H., Yu, L., Niu, Y., . . . Wang, L. L. (2013). Imbalance between Th17 and Treg cells may play an important role in the development of chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice. *Neuroimmunomodulation*, *20*(1), 39-50. doi:10.1159/000343100
- Horvath, C. M. (2000). STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci*, *25*(10), 496-502.
- Hou, W., Li, Z., Li, Y., Fang, L., Li, J., Huang, J., . . . You, Z. (2016). Correlation between protein expression of FOXP3 and level of FOXP3 promoter methylation in recurrent spontaneous abortion. *J Obstet Gynaecol Res*, *42*(11), 1439-1444. doi:10.1111/jog.13076

- Hoyo, C., Fortner, K., Murtha, A. P., Schildkraut, J. M., Soubry, A., Demark-Wahnefried, W., . . . Murphy, S. K. (2012). Association of cord blood methylation fractions at imprinted insulin-like growth factor 2 (IGF2), plasma IGF2, and birth weight. *Cancer Causes Control*, 23(4), 635-645. doi:10.1007/s10552-012-9932-y
- Huehn, J., Polansky, J. K., & Hamann, A. (2009). Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol*, 9(2), 83-89. doi:10.1038/nri2474
- Huppertz, B. (2008). Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension*, 51(4), 970-975. doi:10.1161/hypertensionaha.107.107607
- Hwang, E. S., Szabo, S. J., Schwartzberg, P. L., & Glimcher, L. H. (2005). T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science*, 307(5708), 430-433. doi:10.1126/science.1103336
- Ito, T., Carson, W. F. t., Cavassani, K. A., Connett, J. M., & Kunkel, S. L. (2011). CCR6 as a mediator of immunity in the lung and gut. *Exp Cell Res*, 317(5), 613-619. doi:10.1016/j.yexcr.2010.12.018
- Iyer, S. S., & Cheng, G. (2012). Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*, 32(1), 23-63. doi:10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30
- Jacobi, B., & Partovi, S. (2011). *Basics molekulare Zellbiologie*. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Janson, P. C., Winerdal, M. E., Marits, P., Thorn, M., Ohlsson, R., & Winqvist, O. (2008). FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. *PLoS One*, 3(2), e1612. doi:10.1371/journal.pone.0001612
- Jiang, H., Xiao, R., Lian, X., Kanekura, T., Luo, Y., Yin, Y., . . . Lu, Q. (2012). Demethylation of TNFSF7 contributes to CD70 overexpression in CD4+ T cells from patients with systemic sclerosis. *Clin Immunol*, 143(1), 39-44. doi:10.1016/j.clim.2012.01.005
- Joppien, S., Maier, S. L., & Wendling, D. S. (2011). *Basics experimentelle Doktorarbeit*. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Kainer, F. (2016). *Facharztwissen Geburtsmedizin* (Vol. 3. Auflage): Elsevier.
- Keller, C. C., Eikmans, M., van der Hoorn, M. P., & Lashley, L. (2020). Recurrent miscarriages and the association with regulatory T cells; A systematic review. *J Reprod Immunol*, 139, 103105. doi:10.1016/j.jri.2020.103105
- Kennedy, A., Schmidt, E. M., Cribbs, A. P., Penn, H., Amjadi, P., Syed, K., . . . Brennan, F. M. (2014). A novel upstream enhancer of FOXP3, sensitive to methylation-induced silencing, exhibits dysregulated methylation in rheumatoid arthritis Treg cells. *Eur J Immunol*, 44(10), 2968-2978. doi:10.1002/eji.201444453
- Keubler, L. M., Buettner, M., Häger, C., & Bleich, A. (2015). A Multihit Model: Colitis Lessons from the Interleukin-10-deficient Mouse. *Inflamm Bowel Dis*, 21(8), 1967-1975. doi:10.1097/mib.0000000000000468
- Khosravi, M., Bidmeshkipour, A., Cohen, J. L., Moravej, A., Hojjat-Assari, S., Naserian, S., & Karimi, M. H. (2018). Induction of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells by mesenchymal stem cells is associated with modulation of ubiquitination factors and TSDR demethylation. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1). doi:10.1186/s13287-018-0991-1
- Kim, E. J., & Kim, Y. K. (2018). Panic disorders: The role of genetics and epigenetics. *AIMS Genet*, 5(3), 177-190. doi:10.3934/genet.2018.3.177
- Kim, J. M., & Rudensky, A. (2006). The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev*, 212, 86-98. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00426.x

- Kishikawa, H., Sun, J., Choi, A., Miaw, S. C., & Ho, I. C. (2001). The cell type-specific expression of the murine IL-13 gene is regulated by GATA-3. *J Immunol*, *167*(8), 4414-4420. doi:10.4049/jimmunol.167.8.4414
- Kitagawa, Y., Ohkura, N., & Sakaguchi, S. (2014). Epigenetic control of thymic Treg-cell development. *Eur J Immunol*. doi:10.1002/eji.201444577
- Klein, S., Kretz, C. C., Ruland, V., Stumpf, C., Haust, M., Hartschuh, W., . . . Kuhn, A. (2011). Reduction of regulatory T cells in skin lesions but not in peripheral blood of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*, *70*(8), 1475-1481. doi:10.1136/ard.2009.116525
- Knobler, R., Moizadeh, P., Hunzelmann, N., Kreuter, A., Cozzio, A., Mouthon, L., . . . Krieg, T. (2017). European Dermatology Forum S1-guideline on the diagnosis and treatment of sclerosing diseases of the skin, Part 1: localized scleroderma, systemic sclerosis and overlap syndromes. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, *31*(9), 1401-1424. doi:10.1111/jdv.14458
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T. B., . . . Kuchroo, V. K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*, *448*(7152), 484-487. doi:10.1038/nature05970
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*, *27*, 485-517. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710
- Kowal-Bielecka, O., Fransen, J., Avouac, J., Becker, M., Kulak, A., Allanore, Y., . . . Müller-Ladner, U. (2017). Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*, *76*(8), 1327-1339. doi:10.1136/annrheumdis-2016-209909
- Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Eberl, G., . . . Sparwasser, T. (2007). Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med*, *204*(1), 57-63. doi:10.1084/jem.20061852
- Lal, G., & Bromberg, J. S. (2009). Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood*, *114*(18), 3727-3735. doi:10.1182/blood-2009-05-219584
- Lazarevic, V., Glimcher, L. H., & Lord, G. M. (2013). T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, *13*(11), 777-789. doi:10.1038/nri3536
- Lehmann, O. J., Sowden, J. C., Carlsson, P., Jordan, T., & Bhattacharya, S. S. (2003). Fox's in development and disease. *Trends Genet*, *19*(6), 339-344. doi:10.1016/s0168-9525(03)00111-2
- Lei, W., Luo, Y., Lei, W., Luo, Y., Yan, K., Zhao, S., . . . Lu, Q. (2009). Abnormal DNA methylation in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, and dermatomyositis. *Scand J Rheumatol*, *38*(5), 369-374. doi:10.1080/03009740902758875
- Levine, R. J., Lam, C., Qian, C., Yu, K. F., Maynard, S. E., Sachs, B. P., . . . Karumanchi, S. A. (2006). Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*, *355*(10), 992-1005. doi:10.1056/NEJMoa055352
- Li, B., & Greene, M. I. (2007). FOXP3 actively represses transcription by recruiting the HAT/HDAC complex. *Cell Cycle*, *6*(12), 1432-1436.
- Li, Y., Xiao, B., Qiu, W., Yang, L., Hu, B., Tian, X., & Yang, H. (2010). Altered expression of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and its 5-HT(1a) receptor in patients with major depression disorder. *J Affect Disord*, *124*(1-2), 68-75. doi:10.1016/j.jad.2009.10.018
- Lin, J. X., & Leonard, W. J. (2000). The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene*, *19*(21), 2566-2576. doi:10.1038/sj.onc.1203523
- Manfro, G. G., Alexandre Netto, C., Pollack, M., Mezzomo, K. M., Preffer, F., & Kradin, R. (2003). Stress regulates the lymphocyte homing receptor CD62L (L-selectin). *Arg Neuropsiquiatr*, *61*(1), 20-24.

- Mantel, P. Y., Ouaked, N., Ruckert, B., Karagiannidis, C., Welz, R., Blaser, K., & Schmidt-Weber, C. B. (2006). Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol*, *176*(6), 3593-3602.
- Martin, A. M., Bindra, R., Curcio, P., Cicero, S., & Nicolaidis, K. H. (2001). Screening for preeclampsia and fetal growth restriction by uterine artery Doppler at 11-14 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*, *18*(6), 583-586. doi:10.1046/j.0960-7692.2001.00594.x
- Martinez-Varea, A., Pellicer, B., Perales-Marin, A., & Pellicer, A. (2014). Relationship between maternal immunological response during pregnancy and onset of preeclampsia. *J Immunol Res*, *2014*, 210241. doi:10.1155/2014/210241
- Matatiele, P., Tikly, M., Tarr, G., & Gulumian, M. (2015). DNA methylation similarities in genes of black South Africans with systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis. *J Biomed Sci*, *22*, 34. doi:10.1186/s12929-015-0142-2
- Mathian, A., Parizot, C., Dorgham, K., Trad, S., Arnaud, L., Larsen, M., . . . Gorochov, G. (2012). Activated and resting regulatory T cell exhaustion concurs with high levels of interleukin-22 expression in systemic sclerosis lesions. *Ann Rheum Dis*, *71*(7), 1227-1234. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200709
- Mathur, A. N., Chang, H. C., Zisoulis, D. G., Stritesky, G. L., Yu, Q., O'Malley, J. T., . . . Kaplan, M. H. (2007). Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *J Immunol*, *178*(8), 4901-4907. doi:10.4049/jimmunol.178.8.4901
- Mayack, S. R., & Berg, L. J. (2006). Cutting edge: an alternative pathway of CD4+ T cell differentiation is induced following activation in the absence of gamma-chain-dependent cytokine signals. *J Immunol*, *176*(4), 2059-2063.
- Mayerl, C., & Prelog, M. (2012). Immunosenescence and juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmun Rev*, *11*(5), 297-300. doi:10.1016/j.autrev.2010.02.015
- Mayne, B. T., Leemaqz, S. Y., Smith, A. K., Breen, J., Roberts, C. T., & Bianco-Miotto, T. (2017). Accelerated placental aging in early onset preeclampsia pregnancies identified by DNA methylation. *Epigenomics*, *9*(3), 279-289. doi:10.2217/epi-2016-0103
- Mazzoni, A., Santarasci, V., Maggi, L., Capone, M., Rossi, M. C., Querci, V., . . . Annunziato, F. (2015). Demethylation of the RORC2 and IL17A in human CD4+ T lymphocytes defines Th17 origin of nonclassic Th1 cells. *J Immunol*, *194*(7), 3116-3126. doi:10.4049/jimmunol.1401303
- McEwen, B. S., & Lasley, E. N. (2002). *The end of stress as we know it*: The Joseph Henry Press.
- Medsger, T. A., Jr., Ivanco, D. E., Kardava, L., Morel, P. A., Lucas, M. R., & Fuschiotti, P. (2011). GATA-3 up-regulation in CD8+ T cells as a biomarker of immune dysfunction in systemic sclerosis, resulting in excessive interleukin-13 production. *Arthritis Rheum*, *63*(6), 1738-1747. doi:10.1002/art.30489
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, *454*(7203), 428-435. doi:10.1038/nature07201
- Mei, S., Tan, J., Chen, H., Chen, Y., & Zhang, J. (2010). Changes of CD4+CD25high regulatory T cells and FOXP3 expression in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril*, *94*(6), 2244-2247. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.11.020
- Miller, S. A., & Weinmann, A. S. (2009). Common themes emerge in the transcriptional control of T helper and developmental cell fate decisions regulated by the T-box, GATA and ROR families. *Immunology*, *126*(3), 306-315. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03040.x
- Milner, J. J., & Beck, M. A. (2012). The impact of obesity on the immune response to infection. *Proc Nutr Soc*, *71*(2), 298-306. doi:10.1017/s0029665112000158
- Minskaia, E., Saraiva, B. C., Soares, M. M. V., Azevedo, R. I., Ribeiro, R. M., Kumar, S. D., . . . Lacerda, J. F. (2018). Molecular Markers Distinguishing T Cell Subtypes With TSDR Strand-Bias Methylation. *Front Immunol*, *9*, 2540. doi:10.3389/fimmu.2018.02540

- Mohd Ashari, N. S., Mohamed Sanusi, S. N. F., Mohd Yasin, M. A., Che Hussin, C. M., Wong, K. K., & Shafei, M. N. (2019). Major depressive disorder patients on antidepressant treatments display higher number of regulatory T cells. *Malays J Pathol*, *41*(2), 169-176.
- Moldenhauer, L. M., Schjenken, J. E., Hope, C. M., Green, E. S., Zhang, B., Eldi, P., . . . Robertson, S. A. (2019). Thymus-Derived Regulatory T Cells Exhibit Foxp3 Epigenetic Modification and Phenotype Attenuation after Mating in Mice. *J Immunol*, *203*(3), 647-657. doi:10.4049/jimmunol.1900084
- Moriggl, R., Topham, D. J., Teglund, S., Sexl, V., McKay, C., Wang, D., . . . Ihle, J. N. (1999). Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity*, *10*(2), 249-259. doi:10.1016/s1074-7613(00)80025-4
- Morrow, J. D., Make, B., Regan, E., Han, M., Hersh, C. P., Tal-Singer, R., . . . DeMeo, D. L. (2020). DNA Methylation is Predictive of Mortality in Current and Former Smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. doi:10.1164/rccm.201902-0439OC
- Pai, S. Y., Truitt, M. L., & Ho, I. C. (2004). GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(7), 1993-1998. doi:10.1073/pnas.0308697100
- Pal, S., & Tyler, J. K. (2016). Epigenetics and aging. *Sci Adv*, *2*(7), e1600584. doi:10.1126/sciadv.1600584
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet*, *357*(9270), 1777-1789. doi:10.1016/s0140-6736(00)04904-7
- Philibert, R. A., Beach, S. R., & Brody, G. H. (2012). Demethylation of the aryl hydrocarbon receptor repressor as a biomarker for nascent smokers. *Epigenetics*, *7*(11), 1331-1338. doi:10.4161/epi.22520
- Philibert, R. A., Beach, S. R. H., Gunter, T. D., Brody, G. H., Madan, A., & Gerrard, M. (2010). The effect of smoking on MAOA promoter methylation in DNA prepared from lymphoblasts and whole blood. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, *153b*(2), 619-628. doi:10.1002/ajmg.b.31031
- Phipps, E., Prasanna, D., Brima, W., & Jim, B. (2016). Preeclampsia: Updates in Pathogenesis, Definitions, and Guidelines. *Clin J Am Soc Nephrol*, *11*(6), 1102-1113. doi:10.2215/cjn.12081115
- Pitsavos, C., Panagiotakos, D. B., Papageorgiou, C., Tsetsekou, E., Soldatos, C., & Stefanadis, C. (2006). Anxiety in relation to inflammation and coagulation markers, among healthy adults: the ATTICA study. *Atherosclerosis*, *185*(2), 320-326. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.06.001
- Povoleri, G. A., Scotta, C., Nova-Lamperti, E. A., John, S., Lombardi, G., & Afzali, B. (2013). Thymic versus induced regulatory T cells - who regulates the regulators? *Front Immunol*, *4*, 169. doi:10.3389/fimmu.2013.00169
- Prelog, M. (2006). Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity? *Autoimmun Rev*, *5*(2), 136-139. doi:10.1016/j.autrev.2005.09.008
- Prelog, M., Hilligardt, D., Schmidt, C. A., Przybylski, G. K., Leierer, J., Almanzar, G., . . . Domschke, K. (2016). Hypermethylation of FOXP3 Promoter and Premature Aging of the Immune System in Female Patients with Panic Disorder? *PLoS One*, *11*(6), e0157930. doi:10.1371/journal.pone.0157930
- Prelog, M., Schwarzenbrunner, N., Sailer-Hock, M., Kern, H., Klein-Franke, A., Ausserlechner, M. J., . . . Brunner, J. (2008). Premature aging of the immune system in children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*, *58*(7), 2153-2162. doi:10.1002/art.23599
- Radstake, T. R., van Bon, L., Broen, J., Hussiani, A., Hesselstrand, R., Wuttge, D. M., . . . Lafyatis, R. (2009). The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with

- intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes. *PLoS One*, 4(6), e5903. doi:10.1371/journal.pone.0005903
- Radstake, T. R., van Bon, L., Broen, J., Wenink, M., Santegoets, K., Deng, Y., . . . Lafyatis, R. (2009). Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGFbeta expression. *PLoS One*, 4(6), e5981. doi:10.1371/journal.pone.0005981
- Ramahi, A., Altorok, N., & Kahaleh, B. (2020). Epigenetics and systemic sclerosis: An answer to disease onset and evolution? *Eur J Rheumatol*, 7(Suppl 3), S147-s156. doi:10.5152/eurjrheum.2020.19112
- Reischl H.-P., E. A. (2012). Genetik der Angsterkrankung. *Psychotherapie*, 17, 74-86.
- Rodriguez-Reyna, T. S., Furuzawa-Carballeda, J., Cabiedes, J., Fajardo-Hermosillo, L. D., Martinez-Reyes, C., Diaz-Zamudio, M., & Llorente, L. (2012). Th17 peripheral cells are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis compared with limited illness: a cross-sectional study. *Rheumatol Int*, 32(9), 2653-2660. doi:10.1007/s00296-011-2056-y
- Romanowska-Próchnicka, K., Walczyk, M., & Olesińska, M. (2016). Recognizing systemic sclerosis: comparative analysis of various sets of classification criteria. *Reumatologia*, 54(6), 296-305. doi:10.5114/reum.2016.64906
- Ruiz de Morales, J. M. G., Puig, L., Daudén, E., Cañete, J. D., Pablos, J. L., Martín, A. O., . . . González-Gay, M. (2020). Critical role of interleukin (IL)-17 in inflammatory and immune disorders: An updated review of the evidence focusing in controversies. *Autoimmun Rev*, 19(1), 102429. doi:10.1016/j.autrev.2019.102429
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155(3), 1151-1164.
- Sano, S., Itami, S., Takeda, K., Tarutani, M., Yamaguchi, Y., Miura, H., . . . Takeda, J. (1999). Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *Embo j*, 18(17), 4657-4668. doi:10.1093/emboj/18.17.4657
- Sasaki, Y., Darmochwal-Kolarz, D., Suzuki, D., Sakai, M., Ito, M., Shima, T., . . . Saito, S. (2007). Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol*, 149(1), 139-145. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03397.x
- Schmidt, D., Reber, S. O., Botteron, C., Barth, T., Peterlik, D., Uschold, N., . . . Lechner, A. (2010). Chronic psychosocial stress promotes systemic immune activation and the development of inflammatory Th cell responses. *Brain Behav Immun*, 24(7), 1097-1104. doi:10.1016/j.bbi.2010.04.014
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 75(2), 163-189. doi:10.1189/jlb.0603252
- Schütt, C., & Bröker, B. (2011). *Grundwissen Immunologie*. Heidelberg: Spektrum.
- Schutyser, E., Struyf, S., & Van Damme, J. (2003). The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14(5), 409-426. doi:10.1016/s1359-6101(03)00049-2
- Sherston, S. N., Vogt, K., Schlickeiser, S., Sawitzki, B., Harden, P. N., & Wood, K. J. (2014). Demethylation of the TSDR Is a Marker of Squamous Cell Carcinoma in Transplant Recipients. *Am J Transplant*, 14(11), 2617-2622. doi:10.1111/ajt.12899
- Shimada-Sugimoto, M., Otowa, T., & Hettema, J. M. (2015). Genetics of anxiety disorders: Genetic epidemiological and molecular studies in humans. *Psychiatry Clin Neurosci*, 69(7), 388-401. doi:10.1111/pcn.12291

- Shu, Y., Hu, Q., Long, H., Chang, C., Lu, Q., & Xiao, R. (2017). Epigenetic Variability of CD4+CD25+ Tregs Contributes to the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*, 52(2), 260-272. doi:10.1007/s12016-016-8590-3
- Silva Morales, M., & Mueller, D. (2018). Anergy into T regulatory cells: an integration of metabolic cues and epigenetic changes at the Foxp3 conserved non-coding sequence 2. *F1000Res*, 7. doi:10.12688/f1000research.16551.1
- Simner, C., Novakovic, B., Lillycrop, K. A., Bell, C. G., Harvey, N. C., Cooper, C., . . . Cleal, J. K. (2017). DNA methylation of amino acid transporter genes in the human placenta. *Placenta*, 60, 64-73. doi:10.1016/j.placenta.2017.10.010
- Somerset, D. A., Zheng, Y., Kilby, M. D., Sansom, D. M., & Drayson, M. T. (2004). Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology*, 112(1), 38-43. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01869.x
- Spork, P. (2010). *Der zweite Code: Epigenetik - oder wie wir unser Erbgut steuern können: Rowohlt.*
- Steen, E. H., Wang, X., Balaji, S., Butte, M. J., Bollyky, P. L., & Keswani, S. G. (2020). The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 9(4), 184-198. doi:10.1089/wound.2019.1032
- Stein, D. J., Scott, K. M., de Jonge, P., & Kessler, R. C. (2017). Epidemiology of anxiety disorders: from surveys to nosology and back. *Dialogues Clin Neurosci*, 19(2), 127-136.
- Strohle, A., Gensichen, J., & Domschke, K. (2018). The Diagnosis and Treatment of Anxiety Disorders. *Dtsch Arztebl Int*, 155(37), 611-620. doi:10.3238/arztebl.2018.0611
- Su, D., Wang, X., Campbell, M. R., Porter, D. K., Pittman, G. S., Bennett, B. D., . . . Bell, D. A. (2016). Distinct Epigenetic Effects of Tobacco Smoking in Whole Blood and among Leukocyte Subtypes. *PLoS One*, 11(12), e0166486. doi:10.1371/journal.pone.0166486
- Sun, X., Xiao, Y., Zeng, Z., Shi, Y., Tang, B., Long, H., . . . Xiao, R. (2018). All-Trans Retinoic Acid Induces CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells by Increasing FOXP3 Demethylation in Systemic Sclerosis CD4+ T Cells. *J Immunol Res*, 2018, 8658156. doi:10.1155/2018/8658156
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100(6), 655-669. doi:10.1016/s0092-8674(00)80702-3
- Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Stemmann, C., Satoskar, A. R., Sleckman, B. P., & Glimcher, L. H. (2002). Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science*, 295(5553), 338-342. doi:10.1126/science.1065543
- Takatori, H., Nakajima, H., Kagami, S., Hirose, K., Suto, A., Suzuki, K., . . . Iwamoto, I. (2005). Stat5a inhibits IL-12-induced Th1 cell differentiation through the induction of suppressor of cytokine signaling 3 expression. *J Immunol*, 174(7), 4105-4112. doi:10.4049/jimmunol.174.7.4105
- Takeda, K., Clausen, B. E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Forster, I., & Akira, S. (1999). Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*, 10(1), 39-49.
- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., . . . Akira, S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(8), 3801-3804.
- Taylor, S., Abramowitz, J. S., & McKay, D. (2012). Non-adherence and non-response in the treatment of anxiety disorders. *J Anxiety Disord*, 26(5), 583-589. doi:10.1016/j.janxdis.2012.02.010

- Tran, D. Q., Ramsey, H., & Shevach, E. M. (2007). Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood*, *110*(8), 2983-2990. doi:10.1182/blood-2007-06-094656
- Uddin, M., Sipahi, L., Li, J., & Koenen, K. C. (2013). Sex differences in DNA methylation may contribute to risk of PTSD and depression: a review of existing evidence. *Depress Anxiety*, *30*(12), 1151-1160. doi:10.1002/da.22167
- Unternaehrer, E., Luers, P., Mill, J., Dempster, E., Meyer, A. H., Staehli, S., . . . Meinlschmidt, G. (2012). Dynamic changes in DNA methylation of stress-associated genes (OXTR, BDNF) after acute psychosocial stress. *Transl Psychiatry*, *2*(8), e150. doi:10.1038/tp.2012.77
- Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A., & Strober, W. (2003). GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity*, *18*(3), 415-428. doi:10.1016/s1074-7613(03)00057-8
- Usui, T., Preiss, J. C., Kanno, Y., Yao, Z. J., Bream, J. H., O'Shea, J. J., & Strober, W. (2006). T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J Exp Med*, *203*(3), 755-766. doi:10.1084/jem.20052165
- van den Hoogen, F., Khanna, D., Fransen, J., Johnson, S. R., Baron, M., Tyndall, A., . . . Pope, J. E. (2013). 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*, *65*(11), 2737-2747. doi:10.1002/art.38098
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., & Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, *24*(2), 179-189. doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001
- Veldman, C., Nagel, A., & Hertl, M. (2006). Type I regulatory T cells in autoimmunity and inflammatory diseases. *Int Arch Allergy Immunol*, *140*(2), 174-183. doi:10.1159/000092576
- Viveros, M. P., Arranz, L., Hernanz, A., Miquel, J., & De la Fuente, M. (2007). A model of premature aging in mice based on altered stress-related behavioral response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation*, *14*(3-4), 157-162. doi:10.1159/000110640
- Wang, D., Szyf, M., Benkelfat, C., Provençal, N., Turecki, G., Caramaschi, D., . . . Booij, L. (2012). Peripheral SLC6A4 DNA methylation is associated with in vivo measures of human brain serotonin synthesis and childhood physical aggression. *PLoS One*, *7*(6), e39501. doi:10.1371/journal.pone.0039501
- Wang, Y. Y., Wang, Q., Sun, X. H., Liu, R. Z., Shu, Y., Kanekura, T., . . . Xiao, R. (2014). DNA hypermethylation of the forkhead box protein 3 (FOXP3) promoter in CD4+ T cells of patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol*, *171*(1), 39-47. doi:10.1111/bjd.12913
- Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M., & Murphy, K. M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, *24*(6), 677-688. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.002
- Weber-Stadlbauer, U. (2017). Epigenetic and transgenerational mechanisms in infection-mediated neurodevelopmental disorders. *Transl Psychiatry*, *7*, e1113. doi:10.1038/tp.2017.78
- Wei, L., Laurence, A., Elias, K. M., & O'Shea, J. J. (2007). IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem*, *282*(48), 34605-34610. doi:10.1074/jbc.M705100200
- Werneck, M. B., Lugo-Villarino, G., Hwang, E. S., Cantor, H., & Glimcher, L. H. (2008). T-bet plays a key role in NK-mediated control of melanoma metastatic disease. *J Immunol*, *180*(12), 8004-8010. doi:10.4049/jimmunol.180.12.8004

- Willyard, C. (2017). An epigenetics gold rush: new controls for gene expression. *Nature*, 542(7642), 406-408. doi:10.1038/542406a
- Wittchen, H. U., Jacobi, F., Rehm, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Jonsson, B., . . . Steinhausen, H. C. (2011). The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol*, 21(9), 655-679. doi:10.1016/j.euroneuro.2011.07.018
- Workman, C. J., Szymczak-Workman, A. L., Collison, L. W., Pillai, M. R., & Vignali, D. A. (2009). The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci*, 66(16), 2603-2622. doi:10.1007/s00018-009-0026-2
- Xia, Y. Y., Ding, Y. B., Liu, X. Q., Chen, X. M., Cheng, S. Q., Li, L. B., . . . Wang, Y. X. (2014). Racial/ethnic disparities in human DNA methylation. *Biochim Biophys Acta*, 1846(1), 258-262. doi:10.1016/j.bbcan.2014.07.001
- Xiang, D., Chen, C., He, S., Li, M., & Wang, C. (2019). Comparing PyroMark Q24 Pyrosequencing and MALDI-TOF MS for Identification of CYP2D6*10. *Clin Lab*, 65(5). doi:10.7754/Clin.Lab.2018.180909
- Xu, L., Kitani, A., Fuss, I., & Strober, W. (2007). Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol*, 178(11), 6725-6729. doi:10.4049/jimmunol.178.11.6725
- Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J. M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., . . . Bluestone, J. A. (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med*, 209(10), 1713-1722, S1711-1719. doi:10.1084/jem.20120822
- Yagi, R., Zhu, J., & Paul, W. E. (2011). An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *Int Immunol*, 23(7), 415-420. doi:10.1093/intimm/dxr029
- Yamashita, M., Ukai-Tadenuma, M., Miyamoto, T., Sugaya, K., Hosokawa, H., Hasegawa, A., . . . Nakayama, T. (2004). Essential role of GATA3 for the maintenance of type 2 helper T (Th2) cytokine production and chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci. *J Biol Chem*, 279(26), 26983-26990. doi:10.1074/jbc.M403688200
- Yang, X. O., Nurieva, R., Martinez, G. J., Kang, H. S., Chung, Y., Pappu, B. P., . . . Dong, C. (2008). Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*, 29(1), 44-56. doi:10.1016/j.immuni.2008.05.007
- Yang, X. O., Panopoulos, A. D., Nurieva, R., Chang, S. H., Wang, D., Watowich, S. S., & Dong, C. (2007). STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem*, 282(13), 9358-9363. doi:10.1074/jbc.C600321200
- Yao, Z., Kanno, Y., Kerenyi, M., Stephens, G., Durant, L., Watford, W. T., . . . O'Shea, J. J. (2007). Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood*, 109(10), 4368-4375. doi:10.1182/blood-2006-11-055756
- Zhang, Y., Luo, X. Y., Wu, D. H., & Xu, Y. (2015). ROR nuclear receptors: structures, related diseases, and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*, 36(1), 71-87. doi:10.1038/aps.2014.120
- Zhao, H., Liao, X., & Kang, Y. (2017). Tregs: Where We Are and What Comes Next? *Front Immunol*, 8, 1578. doi:10.3389/fimmu.2017.01578
- Zheng, J., Deng, J., Jiang, L., Yang, L., You, Y., Hu, M., . . . Zhou, Y. (2013). Heterozygous genetic variations of FOXP3 in Xp11.23 elevate breast cancer risk in Chinese population via skewed X-chromosome inactivation. *Hum Mutat*, 34(4), 619-628. doi:10.1002/humu.22284

- Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X. P., Forbush, K., & Rudensky, A. Y. (2010). Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature*, *463*(7282), 808-812. doi:10.1038/nature08750
- Zheng, Y., & Rudensky, A. Y. (2007). Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol*, *8*(5), 457-462. doi:10.1038/ni1455
- Zhou, L., Ivanov, I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., . . . Littman, D. R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol*, *8*(9), 967-974. doi:10.1038/ni1488
- Zhou, X. (2003). CD4+ T cells in atherosclerosis. *Biomed Pharmacother*, *57*(7), 287-291.
- Zhou, Y., Hou, W., Xu, K., Han, D., Jiang, C., Mou, K., . . . Lu, S. (2015). The elevated expression of Th17-related cytokines and receptors is associated with skin lesion severity in early systemic sclerosis. *Hum Immunol*, *76*(1), 22-29. doi:10.1016/j.humimm.2014.12.008
- Zhu, J., Cote-Sierra, J., Guo, L., & Paul, W. E. (2003). Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity*, *19*(5), 739-748. doi:10.1016/s1074-7613(03)00292-9
- Zhu, J., Min, B., Hu-Li, J., Watson, C. J., Grinberg, A., Wang, Q., . . . Paul, W. E. (2004). Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat Immunol*, *5*(11), 1157-1165. doi:10.1038/ni1128
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, *112*(5), 1557-1569. doi:10.1182/blood-2008-05-078154
- Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol*, *28*, 445-489. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101212
- Zhu, Y., Qiu, Y., Yu, H., Yi, S., Su, W., Kijlstra, A., & Yang, P. (2017). Aberrant DNA methylation of GATA binding protein 3 (GATA3), interleukin-4 (IL-4), and transforming growth factor-beta (TGF-beta) promoters in Behcet's disease. *Oncotarget*, *8*(38), 64263-64272. doi:10.18632/oncotarget.19500
- Ziegler, C., Richter, J., Mahr, M., Gajewska, A., Schiele, M. A., Gehrman, A., . . . Domschke, K. (2016). MAOA gene hypomethylation in panic disorder-reversibility of an epigenetic risk pattern by psychotherapy. *Transl Psychiatry*, *6*, e773. doi:10.1038/tp.2016.41
- Ziegler, S. F. (2007). FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur J Immunol*, *37*(1), 21-23. doi:10.1002/eji.200636929

APPENDIX

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMP/ADP/ATP	Adenosinmonophosphat/diphosphat/triphosphat
ANA	Antinukleäre Antikörper
AP1	Activator Protein 1
CCL	C-C-Motiv-Chemokinligand
CCR	C-C-Motiv-Chemokinrezeptor
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary DNA
CH3	Methylgruppe
CNS	Conserved non-coding sequence
CpG	5'-C-Phosphat-G-3'
CT	Cycle Threshold
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNDP/dNMP	Desoxyribonukleosiddiphosphat/Monophosphat
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F	Forward
FCS	Fresh Calb Serum
FOXO	Forkhead-Box-Protein 0
FOXP3	Forkhead-Box-Protein 3
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H2O	Wasser
HCl	Salzsäure
HELLP	Haemolysis, Elevated Liver Enzyme Levels, Low Platelet Count
HKG	Housekeeping Gene
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iTregs	in vitro induzierte T-regulatorische Zelle
i.v.	intravenös
JAK	Januskinase
KHCO3	Kaliumhydrogencarbonat

MAO	Monoaminoxidase
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NaCl	Natriumchlorid
NFAT	Nuclear Factor of Activating T-Cells
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffer Solution
PCR	Polymerasekettenreaktion
PlGF	Placental Growth Factor
pTregs	periphere T-regulatorische Zelle
R	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RORC	Retinoic Acid-Related Orphan Receptors
Rpm	round per minute
RPMI	Zellkulturmedium (Roswell Park Memorial Institute)
RR	Blutdruck
RT-PCR	Real Time Polymerasekettenreaktion
SD	Standardabweichung
sFlt-1	Soluble Fms-like Tyrosinkinase-1
SH2	Src-homology 2
SMAD3	Small Mothers Against Decapentaplegic Homologue 3
β ₂ M	β-2-Mikroglobulin
SSRI	Selektiver Serotonin Reuptake Inhibitor
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SYBR	asymmetrischer Cyanin-Farbstoff
TAE Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TATA	Nukleotidabfolge
TBE Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
Tbet	T-box expressed in T-cells
TBX	T-box Transcription Factor
TCR	T-cell receptor
TET	Ten-Eleven-Translocation
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T-Helferzelle
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Treg	T-regulatorische Zelle
TSDR	T-reg cell Specific Demethylated Region
tTregs	thymus derived T-regulatorische Zelle
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WGATAR	Erkennungssequenz für T- Zell-spezifische Transkriptionsfaktoren
z. B.	zum Beispiel

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Übersicht epigenetischer Mechanismen.....	2
Abbildung 2: DNA-Methylierung und Demethylierung	3
Abbildung 3: Übersicht T-Helferzellen	5
Abbildung 4: Versuchsaufbau zum Vergleich des Prozessablaufs	55

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Aufbau eines STAT Proteins.....	15
Tabelle 2: Klassifikation, Definition und Klinik von Angststörung nach DSM IV	20
Tabelle 3: Einteilung und Definition der Präeklampsie (Kainer, 2016 S.360)	32
Tabelle 4: Synthetische Oligonukleotide.....	41
Tabelle 5: Reaktionskits.....	42
Tabelle 6: Reagenzien	43
Tabelle 7: Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien.....	45
Tabelle 8: Geräte	46
Tabelle 9: Software	48
Tabelle 10: Angaben zur Cyclereinstellung der jeweiligen Primer.....	52
Tabelle 11: Analytierte Sequenzen durch Pyrosequenzierung.....	52
Tabelle 12: Genlage und Genlänge.....	52
Tabelle 13: Primer der Pyrosequenzierung.....	53
Tabelle 14: Beispiel einer Bisulfitkonvertierung.....	57
Tabelle 15: Programmierung des Cyclers für die Bisulfitkonvertierung	59
Tabelle 16: Programmierung des Cyclers für die PCR	60
Tabelle 17: Reagenzien der PCR.....	60
Tabelle 18: Reagenzien der reversen Transkription	65
Tabelle 19: Cyclereinstellung reverse Transkription.....	65
Tabelle 20: Reagenzien der PCR mit cDNA	66
Tabelle 21: Cyclusprogrammierung der PCR mit cDNA.....	66
Tabelle 22: Reagenzien der RT-PCR.....	67
Tabelle 23: Ergebnisse der Testung: Pyrosequenzierung artifizell methylierter DNA	70
Tabelle 24: Testergebnisse Vorversuch	72
Tabelle 25: Demografische Daten der Angstpatientinnen.....	73
Tabelle 26: Ergebnisse Pyrosequenzierung Angstpatientinnen	74
Tabelle 27: Methylierung bei Angsterkrankung bei Rauchern und Nichtrauchern.....	76
Tabelle 28: Methylierung bei Angsterkrankung mit und ohne Depression	77
Tabelle 29: Methylierung bei Angsterkrankung mit und ohne Medikation	78
Tabelle 30: Korrelation der Methylierung mit dem Alter, dem Alter bei Krankheitsbeginn und der Krankheitsdauer	79
Tabelle 31: Methylierung bei Angstpatientinnen mit und ohne Agoraphobie.....	79
Tabelle 32: Demografische Daten Sklerodermie	80
Tabelle 33: Ergebnisse Pyrosequenzierung Sklerodermie (♂ und ♀ getrennt ausgewertet) 81	
Tabelle 34: Ergebnisse Pyrosequenzierung Sklerodermie (♂ + ♀).....	84
Tabelle 35: RT-PCR-Ergebnisse berechnet nach der $\Delta\Delta CT$ Methode (HKG: $\beta 2M$).....	101
Tabelle 36: RT-PCR-Ergebnisse berechnet nach der $\Delta\Delta CT$ Methode (HKG: GAPDH).....	101
Tabelle 37: RT-PCR-Ergebnisse berechnet nach der $\Delta\Delta CT$ Methode (HKG: β -Aktin)	102

Tabelle 38: Korrelation der Genmethylierung bei Sklerodermie mit Krankheitsbeginn, Krankheitsdauer und Alter.....	104
Tabelle 39: Korrelation der FOXP3 Promotor Methylierung bei Sklerodermie mit allen Genen.....	105
Tabelle 40: Korrelation der FOXP3 Enhancer Methylierung bei Sklerodermie mit allen Genen.....	106
Tabelle 41: Korrelation der RORC1 Methylierung bei Sklerodermie mit allen Genen.....	107
Tabelle 42: Korrelation der RORC2 Methylierung bei Sklerodermie mit allen Genen.....	108
Tabelle 43: Korrelation der STAT Methylierung bei Sklerodermie mit allen Genen.....	109
Tabelle 44: Korrelation der GATA3 und TBX21 Methylierung bei Sklerodermie mit allen Genen.....	110
Tabelle 45: Korrelation der Genexpression mit der FOXP3 Promotor Methylierung bei Sklerodermie.....	111
Tabelle 46: Korrelation der Genexpression mit der FOXP3 Enhancer Methylierung bei Sklerodermie.....	111
Tabelle 47: Korrelation der Genexpression mit der RORC1, RORC2 und GATA3 Methylierung bei Sklerodermie.....	112
Tabelle 48: Korrelation der Genexpression mit der STAT Methylierung bei Sklerodermie.....	113
Tabelle 49: Demografische Daten des Präeklampsieprojekts.....	114
Tabelle 50: FOXP3 Methylierung in Plazentagewebe im 1. und 3. Trimenon.....	115
Tabelle 51: FOXP3 Enhancer Methylierung in Plazentagewebe bei Präeklampsie und physiologischer Geburt von weiblichen Neugeborenen.....	118
Tabelle 52: FOXP3 Enhancer Methylierung in Plazentagewebe bei Präeklampsie und physiologischer Geburt von männlichen Neugeborenen.....	118
Tabelle 53: Korrelationen der FOXP3 Plazentamethylierung bei gesunden Schwangeren im 1. und 3. Trimenon mit der SSW und der FOXP3 Methylierung.....	119

DIAGRAMMVERZEICHNIS

Diagramm 1: FOXP3 Promotor Methylierung bei Angsterkrankung.....	75
Diagramm 2: FOXP3 Enhancer Methylierung bei Angsterkrankung.....	75
Diagramm 3: FOXP3 Enhancer Methylierung bei Sklerodermie (männlich).....	86
Diagramm 4: FOXP3 Enhancer Methylierung bei Sklerodermie (weiblich).....	86
Diagramm 5: FOXP3 Promotor Methylierung bei Sklerodermie (männlich).....	87
Diagramm 6: FOXP3 Promotor Methylierung bei Sklerodermie (weiblich).....	87
Diagramm 7: FOXP3 Promotor Methylierung bei Sklerodermie (♂+ ♀).....	88
Diagramm 8: RORC1 Methylierung bei Sklerodermie (männlich).....	88
Diagramm 9: RORC1 Methylierung bei Sklerodermie (weiblich).....	89
Diagramm 10: RORC1 Methylierung bei Sklerodermie (♂ + ♀).....	89
Diagramm 11: RORC2 Methylierung bei Sklerodermie (männlich).....	90
Diagramm 12: RORC2 Methylierung bei Sklerodermie (weiblich).....	90
Diagramm 13: RORC2 Methylierung bei Sklerodermie (♂ + ♀).....	91
Diagramm 14: GATA3 Methylierung bei Sklerodermie (männlich).....	92
Diagramm 15: GATA3 Methylierung bei Sklerodermie (weiblich).....	92
Diagramm 16: GATA3 Methylierung bei Sklerodermie (♂ + ♀).....	93
Diagramm 17: STAT3 Methylierung bei Sklerodermie (männlich).....	93
Diagramm 18: STAT3 Methylierung bei Sklerodermie (weiblich).....	94
Diagramm 19: STAT3 Methylierung bei Sklerodermie (♂ + ♀).....	94

Diagramm 20: STAT4 Methylierung bei Sklerodermie (männlich).....	95
Diagramm 21: STAT4 Methylierung bei Sklerodermie (weiblich).....	96
Diagramm 22: STAT4 Methylierung bei Sklerodermie (♂ + ♀).....	96
Diagramm 23: STAT5A Methylierung bei Sklerodermie (männlich).....	97
Diagramm 24: STAT5A Methylierung bei Sklerodermie (weiblich).....	98
Diagramm 25: STAT5A Methylierung bei Sklerodermie (♂ + ♀).....	98
Diagramm 26: TBX21 Methylierung bei Sklerodermie (männlich).....	99
Diagramm 27: TBX21 Methylierung bei Sklerodermie (weiblich).....	99
Diagramm 28: TBX21 Methylierung bei Sklerodermie (♂ + ♀).....	100
Diagramm 29: Genexpressionsniveau pro- und antiinflammatorischer Gene bei Sklerodermie und Kontrollen.....	103
Diagramm 30: FOXP3 Promotor Methylierung im 1. Trimenon.....	116
Diagramm 31: FOXP3 Promotor Methylierung im 3. Trimenon.....	117

ABDRUCKGENEHMIGUNGEN VON ABBILDUNGEN

Abbildung 1:

Modifizierte Abbildung eines Artikels von Weber-Stadlbauer (2017). Es handelt sich um einen Open-Access Artikel unter den Bedingungen der Creative Commons CC BY Lizenz, welches die uneingeschränkte Nutzung, Verbreitung und Reproduktion in jedem Medium bei korrekter Zitation der Originalarbeit erlaubt.

Abbildung 2:

Modifizierte Abbildung eines Artikels von Deng et al. (2019). Es handelt sich um einen Open-Access Artikel unter den Bedingungen der Creative Commons CC BY Lizenz, welches die uneingeschränkte Nutzung, Verbreitung und Reproduktion in jedem Medium bei korrekter Zitation der Originalarbeit erlaubt.

Abbildung 3:

Modifizierte Abbildung eines Artikels von Gulati et al. (2016). Es handelt sich um einen Open-Access Artikel unter den Bedingungen der Creative Commons CC BY & NC Lizenz, welches die uneingeschränkte nicht kommerzielle Nutzung, Verbreitung und Reproduktion bei korrekter Zitation der Originalarbeit erlaubt.

Abbildung 4:

Hierbei handelt es sich um eigens erstellte, unveröffentlichte Abbildungen. Es ist daher keine Abdruckgenehmigung notwendig.

DANKSAGUNG

Mein Dank geht an erster Linie an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Prelog, die mit viel Enthusiasmus und Engagement hinter der Arbeit stand und stets bei Fragen und Problemen verfügbar war.

Des Weiteren möchte ich meinem Betreuer Giovanni Almanzar von ganzem Herzen danken. Er stand mir von der ersten Minute der Einarbeitung an bis zum letzten Auswerten mit Rat und Tat zur Seite. Danke für die unglaublich große Geduld und deinen unendlichen Einsatz im Labor. Trotz vieler Doktoranden, Bauarbeiten, Hoch- und Tiefpunkten warst du als treue Seele immer vor Ort.

Danken möchte ich außerdem dem ganzen Team der AG Prelog! Danke für die Austauschmöglichkeit – nicht nur von laborrelevanten Themen.

Den größten Teil meiner Arbeit absolvierte ich in der Humangenetik der Universität Würzburg. Der kompletten Arbeitsgruppe AG Haaf danke ich für die freundliche Aufnahme, für die Offenheit bei jeglichen Fragen, für das Kühlstellen meiner PCRs, für die guten Gespräche und die schönen Mittagspausen. Vielen Dank Herr Prof. Haaf für die Möglichkeit die Pyrosequenzierungen im Labor der Humangenetik durchzuführen. Vielen Dank Nady El Hajj für die gute Einarbeitung und Betreuung über die 1,5 Jahre.

Zuletzt möchte ich meinem Mann Julian, meiner Familie und meinen Freunden für all die Geduld und Unterstützung während meiner Promotion danken.

VERÖFFENTLICHUNGEN AUS DATEN DIESER ARBEIT

Ergebnisse dieser Arbeit wurden in abgewandelter Form publiziert:

Martina Prelog, Deborah Hilligardt, Christian A. Schmidt, Grzegorz K. Przybylski, Johannes Leierer, Giovanni Almanzar, Nady El Hajj, Klaus-Peter Lesch, Volker Arolt, Peter Zwanzger, Thomas Haaf, Katharina Domschke:

Hypermethylation of FOXP3 Promoter and Premature Aging of the Immune System in Female Patients with Panic Disorder?

PLoS One, 2016. 11(6): p. e0157930. (Prelog et al., 2016)

Giovanni Almanzar, Matthias Klein, Marc Schmalzing, Deborah Hilligardt, Nady El Hajj, Hermann Kneitz, Vanessa Wild, Andreas Rosenwald, Sandrine Benoit, Henning Hamm, Hans-Peter Tony, Thomas Haaf, Matthias Goebeler, Martina Prelog:

Disease Manifestation and Inflammatory Activity as Modulators of Th17/Treg Balance and RORC/FoxP3 Methylation in Systemic Sclerosis.

Int Arch Allergy Immunol, 2016. 171(2): p. 141-154. (Almanzar et al., 2016)

Giovanni Almanzar, Marc Schmalzing, Matthias Klein, Deborah Hilligardt, Patrick Morris, Kerstin Hofer, Nady El Hajj, Hermann Kneitz, Vanessa Wild, Andreas Rosenwald, Sandrine Benoit, Henning Hamm, Hans-Peter Tony, Thomas Haaf, Matthias Goebeler, Martina Prelog:

Memory CD4+ T cells lacking expression of CCR7 promote pro-inflammatory cytokine production in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis.

Eur J Dermatol, 2019. 29(5): p. 468-476. (Almanzar et al., 2019)