

**Charakterisierung der solitären
retroviralen Promotoren *DQ-LTR3* und *DQ-LTR13*
im Kontext der Pathogenese des
Typ 1 Diabetes mellitus**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
KatrIn Krach geb. Bieda
aus Bremen

Frankfurt 2003
(DF1)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2000 bis Mai 2003 am Universitätsklinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt und am Paul-Ehrlich-Institut in Langen durchgeführt.

An dieser Stelle sei all denen gedankt, die dazu beigetragen haben, daß die vorliegende Arbeit zustande gekommen ist. Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Löwer und Herrn Prof. Dr. Usadel für die Bereitstellung der Arbeitsplätze am Paul-Ehrlich-Institut und am Universitätsklinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität.

Herrn PD Dr. Ralf Tönjes und Herrn Prof. Dr. Badenhoop für die Vergabe des Themas, die Betreuung, die wissenschaftliche Beratung sowie die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Frau Prof. Dr. Starzinski-Powitz für die fachübergreifende Betreuung dieser Arbeit.

Den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Fachgebietes "Xenogene Zelltherapeutika" am Paul-Ehrlich-Institut und der Molekularendokrinologie des Universitätsklinikums für die sehr gute Zusammenarbeit, die praktische Unterstützung und die sehr ausgeprägte Diskussions- und Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit, was insgesamt zu einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen hat: Nicole Fischer, Yvonne Buckendahl, Gundula Braun, Gregor Scheef und Marcus Niebert sowie Maren Krause, Michael Pani und Jeffrey Wood.

Herrn Bartel für die Unterstützung beim Ausdruck zahlreicher Posterpräsentationen.

Allen, die hier nicht explizit erwähnt werden, mir aber bei meinen zahlreichen Fragen hilfreich mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ganz besonders den Menschen, die mir nahe stehen und mich in einer Weise unterstützt haben, die weit über fachliche und technische Unterstützung hinaus geht: meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Freunden und vor allem Ulrich.

Vielen Dank!

Einige Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Krach K, Pani MA, Seidl C, van Autreve J, van der Auwera BJ, Gorus FK, Tönjes RR, Badenhoop K

DQ-LTR13 modifies type I diabetes (IDDM) susceptibility on high risk *DQ* haplotypes: reply to the comments of Pascual et al.. *Diabetologia* (im Druck)

Wood JP, Bieda K, Segni M, Herwig J, Krause M, Usadel KH, Badenhoop K

CD45 exon 4 point mutation does not confer susceptibility to type 1 diabetes mellitus or Graves' disease.

Eur J Immunogenetics (2002) **29**: 73-74.

Bieda K, Pani MA, van der Auwera B, Seidl C, Tönjes RR, Gorus F, Usadel KH, Badenhoop K

A retroviral long terminal repeat adjacent to the HLA DQB1 gene (DQ-LTR13) modifies Type I diabetes susceptibility on high risk DQ haplotypes.

Diabetologia (2002) **45**: 443-447.

Pani MA, Wood JP, Bieda K, Tönjes RR, Usadel KH, Badenhoop K

The variable endogenous retroviral insertion in the human complement C4 gene: a transmission study in type I diabetes mellitus.

Hum Immunol (2002) **63**: 481-484.

Pani MA, Seidl C, Bieda K, Seissler J, Krause M, Seifried E, Usadel KH, Badenhoop K

Preliminary evidence that an endogenous retroviral long-terminal repeat (LTR13) at the HLA-DQB1 gene confers susceptibility to Addison's disease.

Clin Endocrinol (2002) **56**: 773-777.

Wood JP, Pani MA, Bieda K, Meyer G, Usadel KH, Badenhoop K

A recently described polymorphism in the CD28 gene on chromosome 2q33 is not associated with susceptibility to type I diabetes.

Eur J Immunogenet (2002) **29**: 347-349.

Inhaltsübersicht

Einleitung

Retroelemente	1
Retroviren	6
Klassifikation der Retroviren	8
Endogene Retroviren	10
Humane endogene Retroviren (HERV)	11
Typ I Diabetes mellitus	15
Klinik und Epidemiologie	15
Immunsystem und Pathogenese	17
Genetische Risikomarker	22
Zielsetzung der Arbeit	27

Material und Methoden

Klinische Untersuchungen	
Familien und Patienten	28
Statistische Analysen zur Familienassoziationsstudie	28
Molekulare Charakterisierung solitärer LTRs	
Organismen	33
Zellkultur	35
Transfektionen	36
Kulturbedingungen der Bakterienstämme	38
Dual Luciferase Assay und Reporter-gen-Plasmide	39
Molekularbiologische Methoden	40

Ergebnisse

Charakterisierung der solitären LTR <i>DQ-LTR13</i> als genetischen Risikomarker für Typ 1 Diabetes: Resultate der Familienassoziationsstudie	54
Strukturelle Analyse und funktionelle Charakterisierung der IDDM assoziierten solitären LTRs <i>DQ-LTR3</i> und <i>DQ-LTR13 in vitro</i>	60
Transkriptionsregulatorische Wirkung von <i>DQ-LTR13</i> auf ausgewählte <i>DQB1</i> Gene <i>in vivo</i>	71

Diskussion

Charakterisierung von <i>DQ-LTR13</i> als genetischen Risikomarker für Typ 1 Diabetes mellitus	73
Strukturelle Analyse und funktionelle Charakterisierung der IDDM assoziierten solitären LTRs <i>DQ-LTR3</i> und <i>DQ-LTR13 in vitro</i>	76
Einfluß von <i>DQ-LTR13</i> auf die Transkriptionsrate ausgewählter <i>DQ</i> -Gene <i>in vivo</i>	86

Zusammenfassung

Abkürzungsverzeichnis

Literaturverzeichnis

90
91
94

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Retroelemente	1
1.2 Retroviren	6
1.3 Klassifikation der Retroviren	8
1.4 Endogene Retroviren	10
1.5 Humane endogene Retroviren (HERV)	11
1.6 Typ I Diabetes mellitus	15
1.6.1 Klinik und Epidemiologie	15
1.6.2 Immunsystem und Pathogenese	17
1.6.3 Genetische Risikomarker	22
1.7 Zielsetzung der Arbeit	27

2. Material und Methoden

2.1 Familien und Patienten	28
2.2 Statistische Auswertung	28
2.2.1 Linkage Disequilibrium	28
2.2.2 Chi ² -Vierfeldertest	29
2.2.3 Transmission Disequilibrium Test (TDT)	30
2.2.4 Extended Transmission Disequilibrium Test (ETDT)	31
2.2.5 Positive predictive value (PPV)	32
2.2.6 Negative predictive value (NPV)	32
2.2.7 Relatives Risiko (RR)	33
2.3 Organismen	33
2.3.1 Bakterienstämme	33
2.3.2 Säugerzelllinien	34
2.4 Zellkultur	35
2.4.1 Kultivierung von Säugerzellen	35
2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen	36
2.5 Transfektionen	36
2.5.1 Transfektion von adhärent wachsenden Säugerzelllinien	36
2.5.2 Transfektion von Suspensionszelllinien	37
2.5.3 Hormoninduktion	38
2.6 Kulturbedingungen der Bakterienstämme	38

2.6.1	Kulturmedien	38
2.6.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	38
2.7	Dual Luciferase Assay und Reporter-gen-Plasmide	39
2.8	Molekularbiologische Methoden	40
2.8.1	Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut	40
2.8.2	Zellkernisolierung	41
2.8.2.1	Zellkernisolierung aus mononukleären Zellen	41
2.8.2.2	Zellkernisolierung aus Suspensionszellen	41
2.8.3	Isolierung von Nukleinsäuren	42
2.8.3.1	Isolierung von genomischer DNA aus Zellen	42
2.8.3.2	Isolierung von genomischer DNA aus Vollblut	42
2.8.3.3	Isolierung von cytoplasmatischer RNA	43
2.8.3.4	Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien	43
2.8.3.4.1	Minipräparation durch alkalische Lyse	43
2.8.3.4.2	Midi- und Maxipräparation	43
2.8.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	44
2.8.5	Agarosegelelektrophorese	44
2.8.6	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	44
2.8.7	Dephosphorylierung von DNA	44
2.8.8	Ligation	45
2.8.9	T/A-Klonierung von PCR-Amplifikaten	45
2.8.10	Herstellung kompetenter Bakterien	45
2.8.11	Transformation von Bakterien	46
2.8.12	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	46
2.8.12.1	Typisierung der <i>DQA1</i> und <i>DQB1</i> Allele	46
2.8.12.2	<i>DQ-LTR3</i> und <i>DQ-LTR13</i> Genotypisierung	47
2.8.13	DNA Sequenzierung	48
2.8.14	Verwendete Oligonukleotide	48
2.8.15	Sequenzanalysen	50
2.8.16	Sondenherstellung	50
2.8.17	Sondenmarkierung	51
2.8.18	Nuclear Run-On Transkription	51
2.8.19	Kapillarblotting nach Northern	52
2.8.20	Hybridisierung	52

3. Ergebnisse

3.1 Familienanalyse und statistische Bewertung der Assoziation von <i>DQ-LTR13</i> mit dem Risiko einer Erkrankung an Typ 1 Diabetes mellitus	54
3.1.1 Kombinierte Transmission von <i>DQ-LTR13</i> mit ausgewählten <i>DQ</i> Haplotypen	54
3.1.2 Kombinierte Transmission von <i>DQ-LTR13</i> mit DRB1*0401 und <i>DQ8</i>	57
3.1.3 Kalkulation von PPV, NPV und RR	57
3.1.4 Maternale und paternale Transmission von <i>DQ-LTR13</i> zu männlichen und weiblichen Nachkommen der Risikohaplotypen <i>DQ2</i> und <i>DQ8</i>	59
3.2 Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der solitären LTRs <i>DQ-LTR3</i> und <i>DQ-LTR13</i>	60
3.2.1 Sequenzanalyse der beiden solitären LTRs im Vergleich zur proviralen LTR aus HERV- K(C7)	60
3.2.2 Funktionalität putativer Hormon-responsiver Elemente innerhalb der solitären LTRs	62
3.2.3 Charakterisierung potentieller Promotoreigenschaften der solitären LTRs <i>DQ-LTR3</i> und <i>DQ-LTR13</i> unter Verwendung des Dual Luciferase Reporter Assay Systems	62
3.2.4 Induzierbarkeit von <i>DQ-LTR3</i> und <i>DQ-LTR13</i> mit β-Estradiol und Hydrocortison	64
3.2.5 Einfluss von <i>DQ-LTR3</i> und <i>DQ-LTR13</i> auf die Aktivität des <i>DQ8</i>- bzw. <i>DQ2</i>- Promotors in Abhängigkeit von Orientierung und Position der LTRs relativ zum Promotor	66
3.2.6 Transkriptionsregulatorische Wirkung von <i>DQ-LTR13</i> auf ausgewählte <i>DQB1</i> Gene <i>in vivo</i>	71
4. Diskussion	
4.1 Charakterisierung der retroviralen solitären LTR <i>DQ-LTR13</i> als genetischer Risikomarker für eine Erkrankung an Typ 1 Diabetes mellitus auf der Grundlage einer Familienassoziationsstudie	73
4.2 Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von <i>DQ-LTR3</i> und <i>DQ-LTR13</i>	76
4.3 Einfluß von <i>DQ-LTR13</i> auf die Transkriptionsrate ausgewählter <i>DQB1</i> Gene <i>in vivo</i>	86
5. Zusammenfassung	90

6. Abkürzungsverzeichnis

91

7. Literaturverzeichnis

94

1. Einleitung

1.1 Retroelemente

Mobile transponierbare genetische Elemente, die Struktur- und Sequenzhomologien zu Retroviren aufweisen, werden in ihrer Gesamtheit als Retroelemente bezeichnet und sind in der Natur weit verbreitet. Eukaryotische, aber auch einige prokaryotische Genome, enthalten eine Vielzahl dieser DNA-Sequenzen (Garfinkel 1992; Temin 1992), die in ihrem Replikationszyklus obligat ein RNA-Intermediat durchlaufen. Dabei wird das DNA-Element zunächst durch die zelluläre RNA-Polymerase II transkribiert. Die so erzeugte mRNA dient als Template für eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die sog. Reverse Transkriptase, welche wiederum die mRNA in eine doppelsträngige DNA-Kopie revers transkribiert. Diese Kopie kann in das Genom reintegriert werden. Dazu wird die zelluläre DNA zunächst endonukleolytisch unter Ausbildung kurzer einzelsträngiger Überhänge gespalten, die durch Insertion der Retroelemente wieder aufgefüllt werden.

Da die Reverse Transkriptase eine neue Kopie eines Elements generiert, wird durch jede Transposition die Kopienzahl des betreffenden Elements im Genom erhöht, so daß dieses in variierender Kopienzahl von 10 bis 10^5 im Genom vorliegt.

Grundsätzlich unterliegt die Wahl des Integrationsortes keiner Einschränkung, so daß die Kopien über das gesamte Genom verteilt sind. Darüber hinaus lastet auf den meisten Retroelementen kein Selektionsdruck, weshalb diese in der Regel Mutationen und auch Deletionen aufweisen, die dazu führen, daß häufig keine funktionellen Proteine mehr exprimiert werden können (Coffin 1984; Wilkinson et al. 1994). Nach Schätzungen besteht das humane Genom zu 43-45% aus transponierten Sequenzen, also solchen RNA Transkripten, die nach reverser Transkription in das Genom reintegriert wurden (Lander et al. 2001; Li et al. 2001).

Die Gruppe der Retroelemente setzt sich aus mehreren Vertretern zusammen, die nach Kodierungskapazität, dem Vorhandensein der für die Kodierung der reversen Transkriptase (RT) notwendigen Gene, Promotorsequenzen und terminal gelegenen direkten Sequenzwiederholungen (long terminal repeats, LTRs) eingeordnet werden (Abb. 1.1). Die in der Literatur verwendete Nomenklatur der Retroelemente ist nicht einheitlich. Synonyme Bezeichnungen für die einzelnen Elemente sind deshalb in Tab. 1.1 aufgeführt.

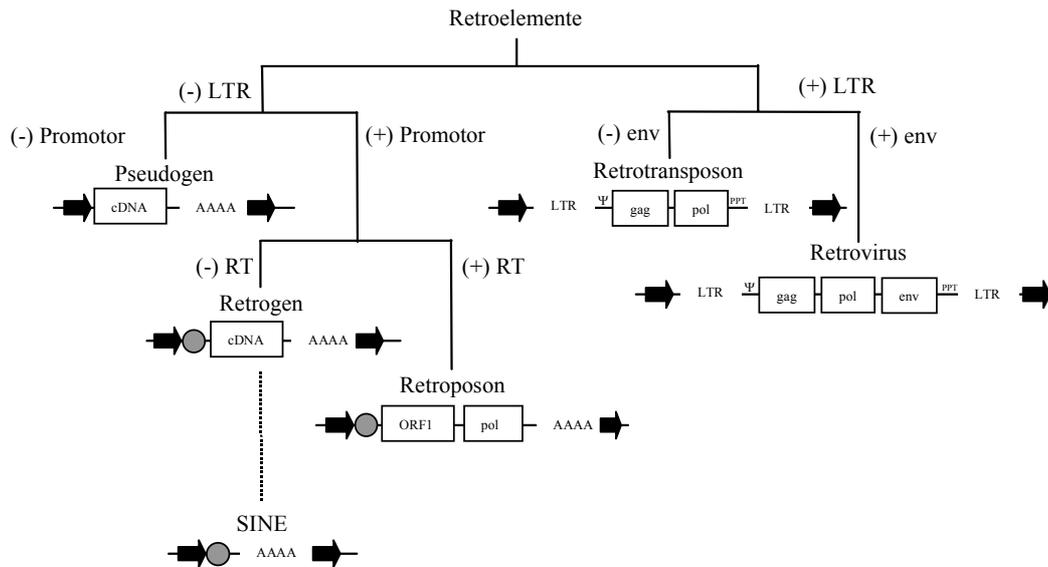


Abb. 1.1 Klassifizierung der Retroelemente. Schematische Einordnung der wichtigsten Retroelemente nach Kodierungskapazität, dem Vorhandensein von LTRs, Promotorsequenzen und kodierenden *env* und *RT* Sequenzen. Erläuterungen im Text. (Abbildung modifiziert nach Wilkinson et al. 1994 und Löwer et al. 1996). ►: direkte Wiederholung zellulärer DNA; ●: Promotor; PPT: Polypurintrakt; ψ: Verpackungssignal.

Pseudogene stellen reverse Transkripte prozessierter, zellulärer Gene dar, die in das Genom reintegriert wurden. Da ihnen jegliche Promotorsequenzen fehlen, sind sie „dead on arrival“ (Petrov et al. 2000). Pseudogene dagegen, die über zelluläre Promotorsequenzen verfügen und deshalb aktiv transkribiert werden können, werden auch als Retrogene bezeichnet (Löwer et al. 1996). Zu dieser Kategorie werden auch die „short interspersed nuclear elements“ (SINEs) gezählt, die zwar Promotorsequenzen für die RNA Polymerase III, im Gegensatz zu Retrogenen jedoch keine Kodierungskapazität besitzen (Löwer et al. 1996; Weiner 2000). Ihr Anteil am humanen Genom beträgt etwa 13% (Lander et al. 2001; Li et al. 2001). SINEs sind zwischen 100 und 300 Basenpaaren (bp) lang und haben ihren Ursprung in Struktur-RNA Pseudogenen (Deininger und Batzer 1993; Smit und Riggs 1995). Die am besten charakterisierten Vertreter dieser Klasse sind die Alu-Elemente, die sich von der 7SL RNA ableiten und mit ca. 10^5 - 10^6 Kopien im humanen Genom vorhanden sind (Lander et al. 2001; Li et al. 2001; Ullu und Tschudi 1984), was ca. 11% des Genoms ausmacht (Lander et al. 2001; Li et al. 2001). Weitere Vertreter der SINEs sind die SINE-R-Elemente, die mit 10^3 Kopien im humanen Genom vorkommen und sich von partiell deletierten HERV-K-LTRs ableiten. Sie sind etwa 630 bp lang (Weiner et al. 1986) und besitzen, zusätzlich zu den HERV-K-Sequenzen, einen RNA Polymerase II Promotor (Ono et al. 1987a). Mit den Pseudogenen ist diesen Elementen gemein, daß sie zum einen am 3'-Ende poly(A) bzw. oligo(A) Sequenzen

besitzen und zum anderen an der Integrationsstelle variable Sequenzduplikationen ausgebildet sind. Außerdem kodieren sie nicht für funktionale Genprodukte (Boeke und Stoye 1997), da sie in hohem Maße Punktmutationen und Deletionen aufweisen (Löwer et al. 1996).

Den Prototyp der Retroposons stellen LINEs (long interspersed nuclear elements) dar (Singer 1982). Ihre Bezeichnung grenzt sie deutlich von der Gruppe der SINEs ab. Im Gegensatz zu diesen sind z.B. Elemente der humanen Familie LINE-1 (L1) 6,1 Kilobasen (kb) groß (Dombroski et al. 1991). LINEs besitzen einen internen RNA Polymerase II Promotor (Swergold 1990), sind am 3'-Ende poly- oder oligoadenyliert und kodieren für zwei offene Leserahmen (open reading frames, ORFs) (Dombroski et al. 1991). Das Genprodukt des ersten Leserahmens ORF1 stellt ein RNA-bindendes Protein dar, dessen Funktion noch nicht eindeutig bestimmt werden konnte. Im Falle des humanen Proteins wurde ein „Leucinzipper“-ähnliches Motiv nachgewiesen (Holmes et al. 1992). In den ORFs vieler anderer Retroposons wurden putative „Zinkfinger“-Motive gefunden, die Homologien zu entsprechenden Motiven der Gag (group specific antigen; Polyprotein der viralen Strukturproteine) Proteine anderer Retroelemente zeigen (Covey 1986). Darüber hinaus zeigte sich für das humane L1, daß das ORF1 Protein in einem hochmolekularen, zytoplasmatischen Komplex eingebunden ist, aus dem es durch RNase Behandlung freigesetzt werden konnte (Boeke und Stoye 1997). Für das Genprodukt des zweiten offenen Leserahmens der LINEs wurde die enzymatische Aktivität der reversen Transkriptase nachgewiesen (Ivanov et al. 1991; Mathias et al. 1991). Dieser Leserahmen ist somit analog zum *pol* (Polymerase) Gen der Retrotransposons und der Retroviren. Man geht davon aus, daß die von Retroposons kodierte Transpositionsmaschinerie *in trans* von Pseudogenen und SINEs genutzt wird (Weiner 2000).

Im humanen Genom sind drei Familien von LINEs vertreten (LINE1 bis LINE3 bzw. L1-L3), von denen jedoch nur L1 aktiv ist (Lander et al. 2001). LINEs liegen in etwa 8×10^5 - 1×10^6 Kopien im humanen Genom vor und machen damit etwa 19-20% des Genoms aus (Lander et al. 2001). Die meisten dieser Elemente, in der Maus mehr als 90% (Martin 1991), sind durch Punktmutationen und Deletionen in ihrer Funktionalität gestört (Hutchinson et al. 1989). Man geht im Falle des menschlichen Genoms davon aus, daß 30-60 aktive L1-Elemente existieren (Sassaman et al. 1997). Transpositionelle Aktivität von Säuger-LINEs konnte bisher sowohl für die Keimbahn (Bratthauer und Fanning 1992; Holmes et al. 1994; Katzir et al. 1985; Kingsmore et al. 1994; Kohrman et al. 1996; Narita et al. 1993; Perou et al. 1997; Takahara et al. 1996) als auch für somatische Zellen

nachgewiesen werden (Miki et al. 1992; Morse et al. 1988). Ähnliche Elemente wurden auch in Insekten, Protozoen, Pflanzen und Pilzen nachgewiesen (Eickbush 1992). Eine Ausnahme bei den Eukaryoten bildet die Hefe *Saccharomyces*, in der keine L1-ähnlichen Elemente vorhanden sind (Boeke und Stoye 1997).

Der Zweig der Retroelemente, der sich durch das Vorhandensein von LTRs auszeichnet, unterteilt sich in Retrotransposons und Retroviren. Retrotransposons unterscheiden sich von Retroviren dadurch, daß sie kein *env* (Envelope; Hüllprotein) Gen besitzen und damit, wie SINEs, LINEs und Retroposons, nicht infektiös sind. Retrotransposons werden entweder als Vorläufer oder als Derivate von Retroviren eingeordnet (Löwer et al. 1996). Die Übereinstimmungen mit den Retroviren reichen von den LTRs, die die Promotorsequenzen beinhalten (Löwer et al. 1996), über die Primer bindende Sequenz (primer binding site, PBS) und den Polypurintrakt (PPT) (Boeke und Stoye 1997), die beide für die Umschreibung der RNA in DNA erforderlich sind, bis zum Verpackungssignal (ψ , psi site) für die spezifische Einlagerung der viralen RNA in zytoplasmatische Virus-ähnliche Partikel (virus-like particles, VLPs) (Löwer et al. 1996). Konservierte Aspekte im funktionellen Bereich der Virusreplikation zwischen Retroviren und Retrotransposons findet man in der Transposition mittels reverser Transkription, der Bildung von "virus-like particles" (VLPs), die das Intermediat der Retrotransposition darstellen, und in der Abhängigkeit von Enzymen, die die Retrotransposition vermitteln, wie die Protease (PR), RT, RNase H und Integrase (IN) (Boeke und Stoye 1997).

Der zweite Leserahmen der Retrotransposons, der das *gag* Gen (group specific antigen) beinhaltet, kodiert für Proteine, die äquivalent zu den retroviralen Kapsidproteinen sind. Diese Proteine sind für die Bildung der VLPs verantwortlich. Man nimmt an, daß in diesen Intermediaten die reverse Transkription stattfindet (Garfinkel 1992).

Das Vorkommen der Retrotransposons erstreckt sich von Protozoen bis zu den Menschen (Garfinkel 1992; Mager und Henthorn 1984). Zu den am besten charakterisierten gehören die Ty-Elemente der Hefe (bekannt sind Ty1 bis Ty5) (Boeke und Stoye 1997) und die *copia*- sowie *gypsy*-Elemente von *Drosophila melanogaster*. Diese lassen sich in zwei Familien unterteilen, die Ty1-*copia*- und die Ty3-*gypsy*-Familie (Boeke und Stoye 1997). Der entscheidende Unterschied zwischen diesen beiden Familien besteht in einer Inversion der Reihenfolge der Domänen im *pol* Gen der Ty1-*copia*-Familie (PR, IN, RT) im Gegensatz zu der von Retroviren bekannten Reihenfolge (PR, RT, IN), die so auch in der Ty3-*gypsy*-Familie vorliegt (Boeke und Stoye 1997).

Ty1-Elemente sind 5,9 kb groß und sind im Genom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zwischen 25 und 10.000 mal vertreten (Boeke und Stoye 1997; Garfinkel 1992). *Copia*-Elemente weisen eine Größe von 5,1 kb auf und liegen im Genom von *Drosophila melanogaster* in etwa 60 Kopien vor (Boeke und Stoye 1997).

Im humanen Genom existieren etwa 240.000 Kopien sogenannter „transposon-like human elements“ (THE). Dabei handelt es sich um Retrotransposon-ähnliche Elemente, die eine Größe von 2-3 kb aufweisen und keine erkennbaren ORFs besitzen (Lander et al. 2001; Paulson et al. 1985). Da sie darüber hinaus keine Homologie zur RT zeigen, werden sie auch als „mammalian apparent LTR-retrotransposons“ (MaLRs) bezeichnet (Smit und Riggs 1995). Daneben wurden Sequenzen des humanen endogenen Retrovirus vom Typ H (HERV-H) beschrieben, die die Struktur von Retrotransposons besitzen (Mager und Henthorn 1984).

Dem Vorgang der reversen Transkription, wie er durch einige der beschriebenen Retroelementen stattfindet, wird allgemein eine wichtige Rolle bei der Formung des eukaryotischen Genoms zugeschrieben (Baltimore 1985). Man geht unter anderem davon aus, daß die Balance zwischen Zunahme an DNA, durch Retrotransposition und andere Prozesse, und Verlusten an DNA einen Faktor darstellt, der die Größe des eukaryotischen Genoms beeinflusst (Petrov et al. 2000).

Tab. 1.1 Nomenklatur der Retroelemente (modifiziert nach Boeke und Stoye 1997)

<i>Namen</i>	<i>Synonyme oder Subtypen*</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Beispiel (Wirt)</i>
Endogene Retroviren	diverse (siehe Tab. 1.2)	als Provirus in der Keimbahn vorhandenes Retrovirus; oft nicht infektiös; meist defekt	MLV (Maus), HERV (Mensch), PERV (Schwein)
LTR Retrotransposons	Typ I Retrotransposons; virale Retroposons	LTR-tragendes Retrotransposon; nicht infektiös als Teil des normalen Lebenszyklus	Ty1 (Hefe)
Poly (A) Retrotransposons	nicht-LTR Retrotransposons; Typ II Retrotransposons; nicht-virale Retroposons; LINE	Retrotransposon ohne terminale Wiederholungen; gewöhnlich poly (A) Trakt oder ähnliche Struktur am 3'-Ende; viele sind mit Wirts DNA Wiederholungen assoziiert	L1 (Mensch)
Pararetroviren	Hepadnavirus* Caulimovirus*	infektiöse DNA Viren, die über RNA-Intermediate replizieren	HHBV (Mensch)
Retroplasmide		Plasmid kodierte RT; Hinweise für RNA-Replikationsintermediate	Mauriceville (<i>Neurospora</i>)
Retrointrons	mobiles Gruppe II Intron	Intron, das für RT kodiert; mögliche RT-abhängige Intronmobilität	aI2 (Hefe)

Retrotranskripte	Retroposon ² ; SINE*; prozessierte Pseudogene*; Retrogen ¹	Elemente, die nicht für RT kodieren und anscheinend über RNA-Intermediate transponieren; können durch Pol II oder III transkribiert sein; können von Poly (A) Retrotransposons zur Mobilisierung abhängig sein	<i>Alu</i> Sequenzen (Mensch)
Retrons	msDNA	ungewöhnlich verzweigte Nukleinsäure mit DNA und RNA Anteilen; liegt oft auf „Retrophagen“	msDNA (Bakterien)

Die mit * markierten Bezeichnungen sind Subtypen der in der Spalte „Namen“ angegebenen Bezeichnungen. ¹nach (Löwer et al. 1996) besitzen Retrogene Kodierungskapazität. ² wird nach (Löwer et al. 1996) zu den Poly(A) Retrotransposons gezählt.

1.2 Retroviren

Retroviren stellen die komplexesten Vertreter der Retroelemente dar. Sie unterscheiden sich von den Retrotransposons durch die Anwesenheit einer zusätzlichen kodierenden Region. Neben den *gag* und *pol* Genen besitzen Retroviren ein *env* Gen, das für die viralen Hüllproteine kodiert. Diese vermitteln die Bindung des Virions an zelluläre Rezeptoren und dessen Eintritt in die Wirtszelle (Löwer et al. 1996) und sind damit verantwortlich für die Infektiosität der Retroviren.

Evolutionär leiten sich Retroviren vermutlich von Retrotransposons ab (Temin 1980). Die Genomorganisation 5'-LTR-*gag-pro-pol-env*-LTR-3', die bei den einfachen Retroviren wie z.B. dem murinen Leukämievirus (MLV) vorliegt (Coffin 1996), ist prinzipiell allen Retroviren gemein (Coffin 1996; Teich 1984). Komplexere Viren, wie das humane T-Zell Leukämievirus (auch humanes T-lymphotropes Virus; HTLV), das humane Spumaretrovirus (HSRV) oder das humane Immundefizienz Virus (HIV), besitzen zusätzliche Gene, die für regulatorische und akzessorische Proteine kodieren (Coffin 1996).

Das retrovirale Genom weist vier Eigenschaften auf, die sie unter den Viren einzigartig machen. Sie sind zum einen die einzigen Viren, die ein diploides Genom besitzen. Zum anderen sind sie die einzigen Viren, die nur durch die zelleigene Transkriptionsmaschinerie synthetisiert und prozessiert werden. Darüber hinaus ist ihr Genom als einziges mit einer spezifischen zellulären tRNA assoziiert und sie sind die einzigen (+)-Strang mRNA Viren, deren Genom nach der Infektion nicht direkt zur Synthese von Proteinen dient (Coffin 1996).

Historisch reichen Untersuchungen von Retroviren bis Anfang des 20. Jahrhunderts zurück, als Peyton Rous 1911 mit dem Rous-Sarcoma Virus (RSV) das infektiöse Agens für die Bildung von spontanen Sarcomata in Hühnern isolierte (Rous 1911). Dem vorangegangen waren 1908 Untersuchungen von Ellermann und Bank, in denen sie zeigen konnten, daß Leukämie in Hühnern durch die Injektion von zellfreien Gewebefiltraten übertragen werden kann (Ellermann und Bang 1908). Da Leukämien zu diesem Zeitpunkt noch nicht als Krebserkrankungen definiert worden waren, fanden ihre Ergebnisse nicht die gleiche Anerkennung wie die von Rous drei Jahre später (Weiss 1984). Es folgte die Entdeckung von Retroviren in einer Vielzahl von Eukaryoten. 1964 formulierte Temin die Hypothese der reversen Transkription (Temin 1964), die 1970 durch die Entdeckung der reversen Transkriptase bewiesen wurde (Temin und Mizutani 1970; Baltimore 1970). 1969 stellten Huebner und Todaro die „Onkogen-Hypothese“ auf, die besagt, daß Karzinogene durch Induktion der Expression von ansonsten kryptischen retroviralen Genen wirken, die bereits in den Wirtszellen vorhanden sind. Onkogene wären demnach genetische Elemente und Krebs entstünde nicht als pathogenetische Reaktion auf ein Virus. Heute ist bekannt, daß Vertebratenzellen Gene besitzen, die homolog zu viralen Onkogenen sind, deren Ursprung jedoch zellulär ist (Bishop und Varmus 1984). 1980 wurde das erste humanpathogene Retrovirus HTLV isoliert (Poiesz et al. 1980). 1983 folgte die Entdeckung des humanen Immundefizienz Virus HIV (Barre-Sinoussi et al. 1985; Gallo et al. 1984).

Morphologisch betrachtet handelt es sich bei Retroviren um umhüllte Viren, die typischerweise einen Durchmesser von 90-140 nm besitzen (Nermut und Hockley 1996). Ihre Hülle entstammt der Zytoplasmamembran der Wirtszelle und ist mit Proteinen besetzt, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als „Spikes“ zu erkennen sind. Diese Hüllproteine, die als Oligomere vorliegen, sind, abhängig vom Virus, zwischen 5 nm (Mason-Pfizer monkey virus, M-PMV) (Coffin 1992; Gelderblom 1987) und 10 nm (HIV) (Nermut und Hockley 1996) lang. Unter der Membran liegt eine Membran-assoziierte Schale (gag shell, Matrix). Der Kern der Retroviren, das Kapsid (auch coreshell), variiert in der Form und ist, je nach Virus, entweder zylindrisch, konisch oder ikosaedrisch gebaut (Nermut und Hockley 1996) und enthält, neben den retroviralen Enzymen RT, IN und PR, den Ribonukleoproteinkomplex, der sich aus dem viralen Genom und dem Nukleokapsid zusammensetzt. Eine schematische Darstellung eines Virions ist in Abb. 1.2 gezeigt.

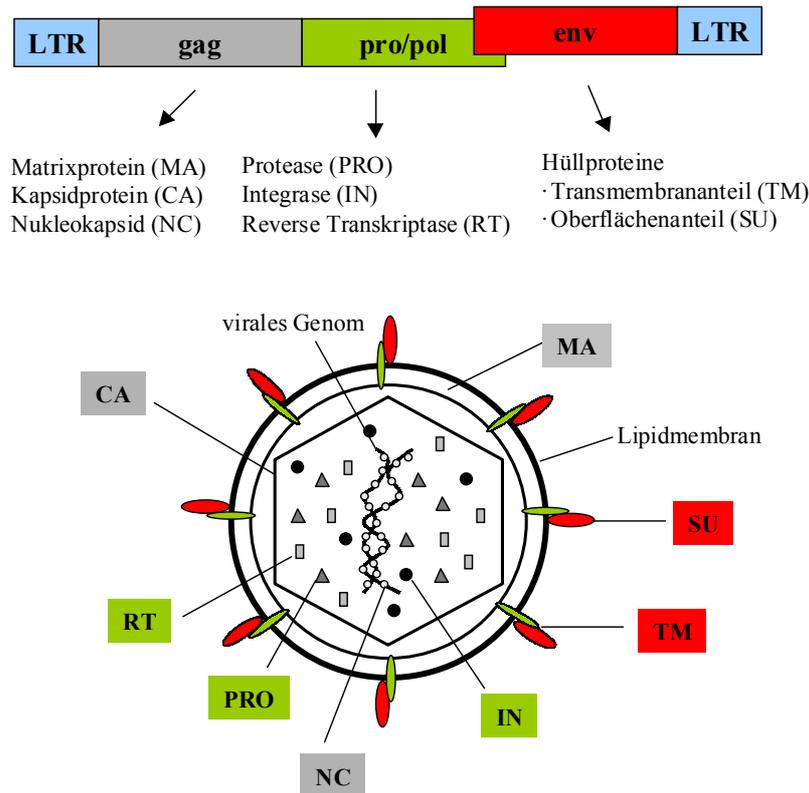


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der proviralen Genomstruktur eines Retrovirus und eines Virions
 Die Genprodukte der viralen Leseramen sind unter den jeweiligen Genen aufgeführt (oben) und im Virion mit den Farben der jeweiligen Gene gekennzeichnet (unten). Im reifen Viruspartikel liegt das RNA-Genom mit Nukleokapsidproteinen assoziiert vor. Die Lipidmembran entstammt der Zytoplasmamembran der Wirtszelle. LTR: long terminal repeat; *gag*: group specific antigen; *pro/pol*: Protease/Polymerase; *env*: envelope (modifiziert nach Patience et al. 1997).

1.3 Klassifikation der Retroviren

Der zur reversen Transkription befähigten Klasse der Viren gehören drei Familien an: die *Retroviridae*, die *Metaviridae* und die *Pseudoviridae*. Während die beiden letztgenannten Familien in Hefen, Pilzen und Invertebraten zu finden sind, infizieren die *Retroviridae* Vertebraten (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/overview/dnaandrna.html>). Eine grobe Einteilung in simple und komplexe Retroviren basiert auf dem Vorhandensein zusätzlicher akzessorischer Gene neben *gag*, *pro*, *pol* und *env* (Coffin 1992; Murphy et al. 1994). Auf dieser Grundlage werden die Retroviren in sieben Gruppen eingeteilt, von denen die Lentiviren, die Spumaviren und das HTLV (human T-cell leukemia virus) den komplexen Viren zugeordnet werden (Coffin 1992). Fünf dieser sieben Gruppen, ausgenommen die Lentiviren und die Spumaviren, besitzen onkogenes Potential und werden deshalb auch als Onkoviren bezeichnet (Coffin 1992).

Elektronenmikroskopisch lassen sich nach morphologischen Gesichtspunkten vier Typen von Retroviren unterscheiden (Teich 1984). A-Typ Partikel liegen nur intrazellulär vor und sind nicht infektiös. Der Prototyp der Gruppe der B-Typ Partikel ist MMTV (mouse mammary tumor virus). Es zeichnet sich durch Bildung intrazytoplasmatischer toroidaler Strukturen an der Knospungsstelle und elektronendichte, exzentrische Kerne in reifen Partikeln aus. Die meisten der bisher isolierten Retroviren gehören jedoch zur Gruppe der C-Typ Partikel. Ein Hauptmerkmal dieser Gruppe ist, daß bis zum Knospen des Virions keine intrazytoplasmatischen Virusstrukturen zu erkennen sind. Reife C-Typ Partikel besitzen zentral gelegene, elektronendichte Kerne. D-Typ Retroviren werden durch M-MPV repräsentiert. Reife Virionen dieser Gruppe zeigen Ähnlichkeit zu den B-Typ Viren, tragen jedoch kürzere „Spikes“ auf der Oberfläche (Teich 1984).

Die Art und Weise des Zusammenbaus der Viruspartikel stellt ein weiteres Kriterium zur Einteilung von Retroviren dar. Demnach können B-Typ und C-Typ Retroviren unterschieden werden, wobei die C-Typ Gruppe zwei Untergruppen enthält. Die eine Gruppe stellt die Retroviren der Säuger und Vögel dar, die andere die HTLV/BLV-Gruppe und die Lentiviren (Nermut und Hockley 1996) (siehe Tab. 1.2).

Nach morphologischen Gesichtspunkten und der evolutionären Verwandtschaft wird die Familie der *Retroviridae* in sieben Gattungen eingeteilt, die in Tab. 1.2 aufgeführt sind. Eine weitere Gattung wäre nötig, um die in *Drosophila melanogaster* als echte Retroviren identifizierten *gypsy*-Sequenzen (Kim et al. 1994; Song et al. 1994) in die bestehende Taxonomie einzugliedern. Darüber hinaus sind auch die vor einiger Zeit charakterisierten Retroviren der Fische (Holzschu et al. 1995) keiner definierten Gattung zuzuordnen, werden jedoch evolutionsgeschichtlich im phylogenetischen Stammbaum in der Nähe der MLV verwandten Retroviren eingeordnet (Herniou et al. 1998)

Tab. 1.2 Klassifizierung der Retroviridae

<i>Gattung</i>	<i>Typspezies</i>	<i>ICTV¹ Nomenklatur</i>	<i>Viruszusam- menbau</i>	<i>Genom</i>
Avian C-Typ Retroviren (Aviane-Leukosis-Sarcoma Virusgruppe)	Rous Sarcoma Virus (RSV)	Alpharetroviren ²	C-Typ	simpel
MLV ³ -verwandte Retroviren ⁴	MLV	Epsilonretroviren ⁵	C-Typ	simpel
Säuger B-Typ Retroviren	Mouse mammary tumor virus (MMTV)	Gammaretroviren	B-Typ	simpel
D-Typ Retroviren	Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV)	Betaretroviren	B-Typ	simpel
HTLV/BLV Gruppe ⁶	HTLV, BLV	Deltaretroviren	C-Typ	komplex

Lentiviren	Humanes Immundefizienz Virus (HIV) -1 und -2	Lentiviren	C-Typ	komplex
Spumaviren	Humanes Foamy Virus (HFV ⁷)	Spumaviren	B-Typ	komplex

¹International committee on taxonomy of viruses (<http://www.ncbi.nlm.gov/ICTV>); ²die Typspezies des ICTV für diese Gattung ist das Aviane Leukosisvirus; ³Murines Leukämievirus (murine leukemia virus, MLV); ⁴Subgattung davon: Säuger C-Typ Retroviren (Petropoulos 1997), ⁵die Typspezies des ICTV für diese Gattung ist das Walley Dermal Sarcomavirus; ⁶Humanes T-Zell Leukämievirus-1 und -2, Bovines Leukämievirus; ⁷HFV wird auch als HSRV bezeichnet (Petropoulos 1997).

1.4 Endogene Retroviren

Endogene Retroviren (ERVs) sind, im Gegensatz zu den exogenen Vertretern, ein integraler Bestandteil des Genoms ihrer Wirtsspezies. Ihre Vererbung erfolgt deshalb nach Mendelschen Regeln (Coffin 1984). Abgesehen von wenigen Ausnahmen, wie dem MMTV und dem JSRV (Jaagsiekte Schaf Retrovirus) (Wilkinson et al. 1994), die evolutionäre Übergangsformen darstellen, fehlt endogenen Retroviren ein exogener Lebenszyklus. Dieser Umstand unterbindet die horizontale Verbreitung (durch Infektion), so daß die Weitergabe ausschließlich vertikal, d.h. durch Vererbung von einer Generation auf die nächste, stattfindet.

Endogene Retroviren sind vermutlich aus Keimbahn-Infektionen durch exogene Retroviren hervorgegangen, könnten aber auch Vorläufer exogener Retroviren darstellen. Ihr Genom entspricht im proviralen Zustand dem von exogenen, durch Infektion vermittelten Retroviren, sie zeigen aber, evolutionär betrachtet, keine stabile Assoziation mit ihrem Wirt (Coffin 1984). Eine Vielzahl von Vertebraten weisen endogene Retroviren auf (Herniou et al. 1998), die meisten sind jedoch defekt und, durch zahlreiche Terminationsignale innerhalb der Strukturgene, apathogen für ihren Wirt (Coffin 1984; Löwer et al. 1996; Wilkinson et al. 1994). Eine Zusammenstellung einiger endogener Retroviren unterschiedlicher Spezies ist in Tab.1.3 dargestellt.

Tab. 1.3 Auswahl endogener Retroviren unterschiedlicher Spezies (modifiziert nach Boeke und Stoye 1997)

Name	Kopien im haploiden Genom	Genomgröße (kb)	Organisation	Referenz
Maus				
MLV				
Ecotrop	0-10	8,8	LTR-gag-pol-env-LTR	(Herr 1984)
Xenotrop	5-30	8,8	LTR-gag-pol-env-LTR	(O'Neill et al. 1985)

Polytrop	10-30	9,2	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	(Stoye und Coffin 1987)
MMTV	0-10	10,0	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR (<i>sag</i>) ¹ (sag) ¹	(Moore et al. 1987)
Huhn				
ALV	0-10	8,2	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	(Hughes 1982)
Katzen				
FeLV	8-12		LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	(Stewart et al. 1986)
Schwein				
PERV	30-50	8,9	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	(Patience et al. 1997) (Czuderna et al. 2000)
Koala				
KoERV	-	8,4	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	(Hanger et al. 2000)
Pavian				
BaEV	5-15	8,9	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	(Kato et al. 1987)
Mensch Klasse I				
HERV-E	35-50	8,8	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	(Repaske et al. 1985)
HERV-R	10	9,9	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	(O'Connell et al. 1984)
HERV-H	900	5,8	LTR- <i>gag-Δpol-env</i> -LTR	(Mager und Freeman 1987)
	100	8,7	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	(Hirose et al. 1993)
Mensch Klasse II				
HERV-K	50	9,2	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR rev?	(Ono et al. 1986) (Löwer et al. 1993)
HERV-L	200	6,5	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	(Cordonnier et al. 1995)

¹ *sag*, offener Leserahmen innerhalb der U3 Region der flankierenden LTRs, kodiert für Proteine mit Superantigen-Funktion (Petropoulos 1997).

1.5 Humane endogene Retroviren (HERV)

Das menschliche Genom besteht zu etwa 8% aus Retroelementen (Lander et al. 2001). Bezogen auf den haploiden Chromosomensatz beinhaltet diese Zahl etwa 50-100 Kopien unterschiedlicher Vollängen-HERVs (Leib-Mösch et al. 1990) und zusätzlich 10.000-20.000 solitäre LTRs, die zufällig über die meisten Chromosomen verteilt sind (Leib-Mösch et al. 1993). Die bisher beschriebenen HERVs haben prinzipiell die gleiche genomische Struktur wie die provirale Form exogener Retroviren inklusive der

flankierenden LTRs. Vollängen HERVs umfassen damit Sequenzen, die homolog zu den *gag*, *pol* und *env* Genen infektiöser Retroviren sind. Zahlreiche Punktmutationen, Deletionen und Stop-Codons innerhalb der kodierenden Regionen (Mager und Freeman 1987; Ono et al. 1986; Repaske et al. 1985) verhindern jedoch die Bildung funktioneller Proteine, so daß bis heute keine infektiösen HERVs nachgewiesen werden konnten.

HERVs wurden entweder mit Hilfe von Sonden fremder Spezies identifiziert, wie im Falle von HERV-K, das mit Hilfe einer Sonde aus der *pol* Region von MMTV detektiert wurde (Callahan et al. 1982), oder es wurden Sonden exogener Retroviren eingesetzt (Leib-Mösch et al. 1986; Perl et al. 1989).

Die Klassifizierung der HERVs erfolgte nach unterschiedlichen Kriterien. Sequenzhomologien innerhalb der *pol* Gene führte zur Einteilung der Viren in zwei Klassen (siehe Tab. 1.4.) (Callahan 1988). HERVs, die Homologien zu C-Typ Retroviren der Säugetiere aufweisen, wurden der Klasse I, solche, die Homologien zu A- und B-Typ Retroviren aufweisen, wurden der Klasse II zugeordnet (Callahan 1988). Ein anderes System zur Klassifizierung der humanen endogenen Retroviren basiert auf der tRNA, die als Primer für die reverse Transkription eingesetzt wird. Danach wird z.B. die retrovirale RNA, die eine PBS homolog zum 3'-Ende der Lysin-tRNA trägt, basierend auf dem Einbuchstaben-Code für Aminosäuren, als HERV-K bezeichnet (Larsson et al. 1989; Leib-Mösch et al. 1990).

HERVs können durch Umweltfaktoren aktiviert werden (Coffin et al. 1997) und die meisten HERVs werden gewebsspezifisch exprimiert, besonders in Geweben embryonalen Charakters oder solchen, die an der Fortpflanzung beteiligt sind (siehe Tab. 1.4). So wird z.B. HERV-E vor allem in Brustkarzinom, Darmkarzinom und der Plazenta exprimiert (Löwer et al. 1996; Repaske et al. 1985; Wilkinson et al. 1994) und HERV-W in erster Linie in der Plazenta (Blond et al. 2000). Diese Zelltyp-abhängige Expression ist auf spezifische regulatorische Elemente innerhalb der U3 Region der flankierenden LTRs zurückzuführen (Majors 1990). Diese Region umfaßt alle Signalstrukturen, die für die Initiation der Transkription notwendig sind, inklusive Promotoren, Enhancern und Transkriptionsfaktorbindestellen. Die Struktur einer LTR ist in Abb. 1.3 dargestellt. Die Charakteristika einiger ausgewählter HERV-Familien sind in der folgenden Tabelle (1.4) beschrieben.

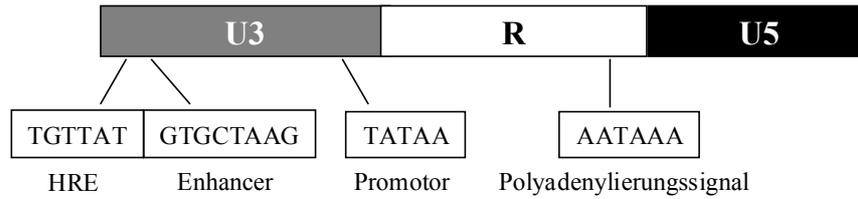


Abb. 1.3 Prinzipielle Struktur einer retroviralen LTR am Beispiel einer HERV-K LTR mit den relativen Positionen eines putativen hormonresponsiven Elements (HRE), des Enhancers, der TATA Box (Promotor) und des Polyadenylierungssignals (modifiziert nach Sverdlov 1998).

Tab. 1.4 Charakteristika einiger ausgewählter HERV-Familien (modifiziert nach Löwer et al. 1996, Löwer 1999 und Boeke und Stoye 1997)

<i>Name</i>	<i>Kopienzahl</i>	<i>mRNA Expression</i>	<i>Protein Expression</i>	<i>Referenz</i>
Mensch Klasse I				
HERV-E	35-50	Plazenta, Gehirn, Darm, Brustkrebs-Zelllinie	keine	(Löwer et al. 1996; Repaske et al. 1985; Wilkinson et al. 1994)
ERV-3	1	Plazenta, fötales Gewebe, männliche Keimzelltumore	trunkiertes Env	(Lin et al. 1999; Löwer et al. 1996; Wilkinson et al. 1994) (Horsfall et al. 1998)
HERV-H	50-1000	Teratokarzinom Zelllinien	ORF im <i>env</i>	(Lindeskog et al. 1999; Löwer et al. 1996; Wilkinson et al. 1994)
ERV-9	30-50	Teratokarzinom Zelllinien, Plazenta	keine	(Löwer et al. 1996; Wilkinson et al. 1994)
HERV-W	10-100	Plazenta	ORF im <i>gag, pro/pol</i> und <i>env</i> Expression von Env in der Plazenta	(Blond et al. 2000)
HERV-R	10	hohe Expression in der Plazenta, geringe Expression in normalem Gewebe, fötalem Gewebe und der Makrophagen Zelllinie U937	Env	(O'Connell et al. 1984)
Mensch Klasse II				
HERV-K(C4)	30-50	-	-	(Dangel et al. 1994; Löwer et al. 1996; Wilkinson et al. 1994)
HTDV/HERV-K	30-50	Keimzelltumoren, Plazenta	Gag, cORF, Protease, RT, Integrase und Env	(Löwer et al. 1996; Tönjes et al. 1999; Wilkinson et al. 1994) (Ono et al. 1986; Tönjes et al. 1997)

HERV-K/T47D	30-50	Brustkrebs Zelllinie T47D, Plazenta	keine	(Seifarth et al. 1998)
HERV-L	200	-	-	(Cordonnier et al. 1995)

Das pathogene Potential humaner endogener Retroviren ist bisher nicht eindeutig nachgewiesen worden. Einige Untersuchungen beschäftigen sich jedoch mit ihrer möglichen Rolle bei der Genregulation, der Immunsuppression und, als pathogenes Agens, bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen (Conrad et al. 1997; Hohenadl et al. 1996; Temin 1993; Urnovitz und Murphy 1996; Vogetseder et al. 1993). Die retrovirale Integration erfolgt oftmals in der Nähe zellulärer Gene, so daß in manchen Fällen deren normale Funktion gestört sein kann. Ein denkbarer Mechanismus für eine direkte Beteiligung endogener Retroviren an der Entstehung einer Erkrankung wäre deren Funktion als Superantigen (siehe 1.6.2). Indirekt könnten retrovirale Proteine über ein molekulares Mimikri (siehe 1.6.2) an einer Immunantwort beteiligt sein, da retrovirale Proteine teilweise Homologien zu mehr als 15 unterschiedlichen Autoantigenen besitzen (Bjork, Jr. 1991; Garry 1990; Kion und Hoffmann 1991; Ono et al. 1987b; Patarca und Haseltine 1985; Talal et al. 1990; Trauger et al. 1990; Zinkernagel et al. 1990). Einige dieser Antigene dienen als Ziele für Autoantikörper, die charakteristisch für spezifische Autoimmunerkrankungen sind (Garry 1990; Krieg et al. 1992). Darüber hinaus können HERV Proteine selbst als Autoantigene wirken und eine Autoimmunantwort auslösen. So kodiert z.B. HRES-1, ein humanes endogenes Retrovirus mit Homologien zu HTLV, für ein 28 kDa-Protein p28 (Banki et al. 1992). In Seren von Patienten mit unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen konnten Antikörper gegen synthetisch hergestellte HRES-1 Peptide nachgewiesen werden, was auf eine Funktion von HRES-1/p28 als Autoantigen hinweist (Banki et al. 1992; Brookes et al. 1992). Grundsätzlich können retrovirale Integrationen innerhalb zellulärer Gene diese inaktivieren (Krieg und Steinberg 1990), während Integrationen in der Nähe eines Gens einen Einfluss auf dessen Expression haben können (Yamada et al. 1991). Darüber hinaus können defekte exogene Retroviren mit endogenen Retroviren rekombinieren und dadurch neue infektiöse Viren bilden (Martinelli und Goff 1990).

LTRs kommen in zwei unterschiedlichen Formen im menschlichen Genom vor. Zum einen im Kontext der retroviralen Gene *gag*, *pol* und *env*, zum anderen als solitäre LTRs. Letztere sind durch Retrotransposition von Vollängen-HERVs entstanden, nachdem diese transkribiert, gespleißt, revers transkribiert und in das Genom reinseriert worden sind (Goodchild et al. 1995; Leib-Mösch et al. 1993; Mager und Goodchild 1989). Sie sind

meist funktionellen Genen benachbart und können daher in die Regulation zellulärer Gene involviert sein. Beide Formen der LTRs besitzen eine Reihe transkriptions-regulatorischer Elemente wie Promotoren, Enhancer, Hormon-responsive Elemente und Polyadenylierungssignale, die signifikante Veränderungen im Expressionsmuster benachbarter zellulärer Gene hervorrufen könnten (Di et al. 1995; Feuchter-Murthy et al. 1993; Kato et al. 1990; Kowalski et al. 1997; Liu und Abraham 1991; Schulte et al. 1996; Strazzullo et al. 1998; Ting et al. 1992). Man nimmt an, daß Insertionen von HERVs in die Keimbahn sogar zur Änderung der Gewebsspezifität humaner Gene führen könnten (Schulte et al. 1996; Ting et al. 1992). Beschrieben wurde dieser Vorgang z.B. für den Fall der Integration eines endogenen Retrovirus in die 5'-flankierende Region des Amylase Gens (Ting et al. 1992). Dies führt, zusätzlich zur normalen Expression in der Bauchspeicheldrüse, zu dessen Expression in der Speicheldrüse des Menschen (Ting et al. 1992). Für solitäre LTRs der Familie der humanen endogenen Retroviren HERV-K wurde eine bidirektionale Promotoraktivität in Teratokarzinomzellen nachgewiesen (Domansky et al. 2000). Darüber hinaus besitzen diese LTRs eine Art Silencer in der U5 Region, der ihre eigene Promotoraktivität herabsetzt (Domansky et al. 2000). In unmittelbarer Nähe des *DQBI* Genortes sind drei solitäre LTRs lokalisiert, *LTR3*, *LTR5* und *LTR13* (Horton et al. 1998) (siehe Kapitel 1.6.3) (Kambhu et al. 1990). Neuere Untersuchungen zeigen für *LTR3* einen additiven Effekt bei der Beteiligung des *DQBI* Gens an der Prädisposition für Typ 1 Diabetes mellitus (Donner et al. 1999). Über die Funktionalität der LTRs in diesem spezifischen Kontext ist bisher nichts bekannt.

1.6 Typ 1 Diabetes mellitus

1.6.1 Klinik und Epidemiologie

Beim Typ 1 Diabetes mellitus (IDDM; insulin-dependent Diabetes mellitus) handelt es sich um eine durch Insulinmangel bedingte Störung der Glukoseverwertung (Palmer und Lernmark 1990). Ursache dafür ist eine autoimmunologisch vermittelte Zerstörung der β -Zellen der Langerhansschen Inseln im Pankreas (Bach 1994; Lernmark et al. 1995). Durch den daraus resultierenden Mangel an Insulin ist die zelluläre Aufnahme von Glukose, dem wichtigsten Energielieferanten, stark vermindert. Bei Überschreiten einer Blutglukose-Konzentration von 180 mg/dL, der sogenannten Nierenschwelle, kommt es zur Glukosurie

(lat. *mellitus*, Honig), die durch Sättigung der renalen Glukose-Rückresorptionsmechanismen entsteht. Die erhöhte Urin-Osmolalität führt zu einer Polyurie (gr. *diabetes*, Flut), Nykturie (nächtliches Wasserlassen) und Polydipsie (krankhaft gesteigertes Durstgefühl). Insgesamt kann es dadurch zu einer Dehydratation des Körpers kommen.

Zum Ausgleich des intrazellulären Energiemangels setzt eine verstärkte Lipolyse ein. Die dadurch vermehrt im Blut zirkulierenden freien Fettsäuren werden in der Leber zu Ketonkörpern abgebaut, deren Anhäufung zur metabolischen Ketoazidose (Übersäuerung des Blutes) bis hin zum Koma führen kann. Die langfristig bestehende Hyperglykämie eines unbehandelten Diabetes mellitus führt durch nicht-enzymatische Glykosylierung von Strukturproteinen zu vielfältigen Gewebeveränderungen, die vor allem Augen, Nieren, Nerven und Blutgefäße betreffen, und die als Folgeerkrankungen den größten Teil diabetischer Komplikationen ausmachen.

In der vorliegenden Arbeit wird nur die Assoziation zwischen dem Vorkommen spezieller retroviraler Insertionen und dem Typ 1 Diabetes mellitus (WHO Study Group Diabetes Mellitus 1985) betrachtet. Auf andere Diabetesformen, wie Typ 2 Diabetes mellitus (NIDDM), MODY ("**M**aturity **O**nset **D**iabetes in the **Y**oung") und sekundäre Diabetesformen, die nicht autoimmunologisch vermittelt sind und keinen Bezug zum HLA (humanes Leukozyten Antigen) aufweisen, wird hier nicht eingegangen.

Typ 1 Diabetes mellitus ist die häufigste Autoimmunerkrankung bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen und stellt etwa 10% aller Diabetesformen dar. Es kann jedoch auch im Erwachsenenalter zum Auftreten von IDDM kommen. Die Inzidenzraten zwischen einzelnen Ländern, aber auch zwischen ethnischen Gruppen, unterscheiden sich teilweise erheblich voneinander, was für eine Beteiligung sowohl von genetischen als auch von Umweltfaktoren (Diabetes Epidemiology Research International Group 1988) (Karvonen et al. 1993; Vaarala et al. 1999) bei der Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus spricht. International liegt Skandinavien, insbesondere Finnland, an der Spitze mit einer Inzidenz von jährlich bis zu 30 pro 100.000 (Diabetes Epidemiology Research International Group 1988; Dorman et al. 1990; Joner und Sovik 1989). Untersuchungen in Staaten mit etablierten Diabetes-Registern zeigen, daß die IDDM-Inzidenz in den letzten 10 Jahren um jährlich 2% zugenommen hat (Bingley und Gale 1989; Dahlquist et al. 1991; Tuomilehto et al. 1991). Auch das Erkrankungsalter sinkt stetig: das Auftreten der Erkrankung vor dem 10. Lebensjahr ist inzwischen sehr häufig (Metcalf und Baum 1991) und in Finnland

treten 50% aller IDDM-Fälle im Alter von unter 20 Jahren auf (Dahlquist et al. 1982; Nystrom et al. 1990). Eine hinreichende Erklärung für beide Erscheinungen gibt es bisher nicht.

In Deutschland liegt die Prävalenz des Typ 1 Diabetes mellitus bei ungefähr 0,4% (Michaelis und Iutzi 1991). Etwa 10% der Patienten haben eine positive Familienanamnese bezüglich IDDM (Krolewski et al. 1987). Das Risiko einer Erkrankung für Geschwister von Patienten ist 7-8mal höher als in der Normalbevölkerung; Kinder von IDDM-Patienten erkranken 10mal häufiger als Kinder von nicht-Diabetikern (Gorsuch et al. 1982; Thomson et al. 1988). Die Konkordanz bei eineiigen Zwillingen beträgt 30% (Olmos et al. 1988). Diese Zahlen zeigen deutlich eine Beteiligung genetischer Faktoren bei der Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus, schließen diese jedoch gleichzeitig als einzigen Verursacher dieser Erkrankung aus.

1.6.2 Immunsystem und Pathogenese

Aufgabe des Immunsystems ist der Schutz des Körpers vor eingedrungenen Mikroorganismen, sowie die Erkennung und Eliminierung veränderter und bösartiger körpereigener Zellen. Dazu stehen dem Körper verschiedene Mechanismen zur Verfügung, die unterschiedliche Komponenten benötigen.

Einen zentralen Pfeiler des Immunsystems bilden die Makrophagen, die sowohl im Rahmen der angeborenen, unspezifischen, als auch im Rahmen der erworbenen Immunität zytotoxisch aktiv sind. Ihre Ziele sind dabei vor allem Bakterien, die phagozytiert und durch Sauerstoffradikal-abhängige Reaktionen zerstört werden. Die Phagozytose von Antikörper- oder Komplement-markierten Bakterien wird durch spezielle Rezeptoren (F_c , CR3b) auf der Oberfläche von Makrophagen erleichtert. Genau wie dendritische Zellen sind Makrophagen zur Antigen-Prozessierung befähigt und fungieren als Antigen-präsentierende Zellen (APC). Das prozessierte Antigen wird von T-Lymphozyten nur dann erkannt, wenn es mit einem körpereigenen HLA-Molekül auf der Oberfläche der APCs präsentiert wird. HLA Klasse I-Moleküle werden dabei von zytotoxischen ($CD8^+$) T-Zellen erkannt. T-Helferzellen ($CD4^+$) erkennen HLA Klasse II-gebundene Antigene. Während HLA Klasse I-Moleküle auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, ist die Expression der HLA Klasse II-Moleküle normalerweise auf Lymphozyten und Antigen-präsentierende Zellen beschränkt, kann aber durch $IFN-\gamma$ auf anderen Zellen induziert werden (Janeway und Travers 1995).

Die meisten mikrobiellen Antigene werden von APCs prozessiert und zusammen mit HLA Klasse II-Molekülen an der Zelloberfläche CD4⁺, naiver T-Helferzellen (T_{H0}) präsentiert. Die aktivierte CD4⁺ T-Zelle kann nun mit B-Lymphozyten interagieren und so eine Antikörper-vermittelte humorale Immunantwort induzieren. Alternativ dazu führt ihre Interaktion mit Makrophagen, mit nachfolgender Ausschüttung von TNF- α sowie Sauerstoff- und Stickstoffradikalen zu einer zellulären Immunantwort. In den meisten Fällen findet man eine Verknüpfung beider Immunantworten.

Die Differenzierung naiver T_{H0}-Zellen zu T_{H1}-Zellen, die mit Makrophagen die zelluläre Immunantwort einleiten, oder zu T_{H2}-Zellen, die zusammen mit B-Lymphozyten die humorale Immunantwort induzieren, wird durch eine Reihe exogener (Mosmann und Coffman 1989) und genetischer (Hsieh et al. 1995; Murray et al. 1989) Faktoren beeinflusst. T_{H1}- und T_{H2}-Zellen unterscheiden sich außerdem hinsichtlich des von ihnen produzierten Zytokin-Repertoires und ihrer Interaktionen mit anderen Zelltypen (Romagnani 1995). Bei gesunden Individuen liegen T_{H0}-, T_{H1}- und T_{H2}-Zellen im Verhältnis von etwa 4:2:1 vor (De Carli et al. 1994). Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen T_{H1}- und T_{H2}-Zellen wird für eine Reihe von Autoimmunerkrankungen verantwortlich gemacht (Romagnani 1994). In diesem Zusammenhang geht man z.B. von einer Beteiligung der T_{H1}-Zellen (Foulis et al. 1991) und der von ihnen freigesetzten Zytokine (Pankewycz et al. 1995) an der Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus aus (Trembleau et al. 1995; Trembleau et al. 1997), während den T_{H2}-Zellen in diesem Fall eine eher protektive Rolle zugesprochen wird (Trembleau et al. 1997).

Charakteristika der erworbenen Immunität sind die Epitop-Spezifität und die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses, das beim erneuten Kontakt mit dem gleichen Antigen eine schnellere und effizientere Immunantwort erlaubt. Um der Vielfalt der möglichen Antigene gerecht zu werden, bildet der menschliche Organismus zunächst gegen alle denkbaren Peptide Lymphozyten, auch gegen körpereigene. Zur Unterscheidung von "Fremdantigen" und körpereigenem Antigen bedient sich das Immunsystem unterschiedlicher Mechanismen. Den neu entstehenden T- und B-Lymphozyten werden im lymphatischen System zahlreiche körpereigene Epitope präsentiert. Ein Erkennen dieser Epitope führt zu diesem Zeitpunkt zum Absterben des spezifischen Lymphozytenklons. Dieser Vorgang wird als klonale Deletion oder auch zentrale Toleranz bezeichnet (von Boehmer und Kisielow 1990). Entgehen autoreaktive Lymphozyten diesem Prozess der klonalen Deletion und erkennen im gereiften Stadium körpereigene Epitope, kommt es zur peripheren Toleranz oder auch Anergie. Diese basiert auf dem Fehlen kostimulatorischer

Signale, wodurch eine Immunantwort verhindert wird (Ramsdell und Fowlkes 1990; Schwartz 1989). Darüber hinaus existieren sog. T-Suppressor-Zellen, die eine überschießende Immunantwort gegen autologe Antigene unterbinden (Bloom et al. 1992; Dorf et al. 1992).

Der Typ 1 Diabetes mellitus ist gekennzeichnet durch eine selektive und vollständige Zerstörung der pankreatischen β -Zellen, während die übrigen, direkt benachbarten endokrinen Inselzellen intakt bleiben. Dies legt die Vermutung nahe, daß es sich bei der β -Zellzerstörung um eine erworbene, spezifische Immunreaktion handelt. Die Mehrzahl der Patienten weist bei Erkrankungsbeginn in die Langerhansschen Inseln eingewanderte mononukleäre Zellen auf (Gepts 1965). Auch T- und B-Lymphozyten können Bestandteil der Infiltrate sein (Foulis et al. 1991), wobei ihre Anwesenheit für die β -Zellzerstörung nicht unbedingt notwendig erscheint (Hananberg et al. 1989; Itoh et al. 1993; Lernmark et al. 1995). Neben zerstörten Zellen finden sich viele morphologisch intakte β -Zellen, deren Insulinsekretion jedoch stark eingeschränkt ist. Eine direkte Beteiligung von Interferon α (IFN- α) ist sehr wahrscheinlich, da dieses Zytokin im Pankreas von IDDM-Patienten verstärkt exprimiert wird (Huang et al. 1995) und durch Applikation von rekombinantem IFN- α , zumindest experimentell, Autoimmunität erzeugt werden konnte.

Ob die Infiltration der Langerhansschen Inseln sekundär aufgrund einer viralen Infektion der β -Zellen mit nachfolgender T-Zellaktivierung erfolgt (Atkinson und Maclaren 1994) oder ob die Einwanderung der Immunzellen primär auf eine Zerstörung der β -Zellen zielt (Hanninen et al. 1992), ist bisher nicht sicher geklärt.

Ein weiteres Anzeichen für die autoimmunologisch vermittelte Entstehung des Typ 1 Diabetes mellitus stellt die Entdeckung von Antikörpern gegen β -Zell assoziierte Proteine dar. Etwa die Hälfte aller neu erkrankten Patienten besitzt Autoantikörper gegen Insulin (Landin-Olsson et al. 1989; Palmer et al. 1983). Weitere Autoantigene bilden die in β -Zellen exprimierte Glutamat-Dehydrogenase (GAD65) (Baekkeskov et al. 1990), gegen die bei über 75% der Neuerkrankten Antikörper nachgewiesen werden können (Karlsen et al. 1992; Lernmark 1996; Seissler et al. 1993), sowie eine membranassoziierte Protein-Tyrosin-Phosphatase (IA-2) (Lan et al. 1994; Rabin et al. 1994). Gegen letztere sind in etwa 50% der Fälle Antikörper nachweisbar (Bonifacio et al. 1995; Verge et al. 1996). Nahezu 100% der IDDM Patienten besitzen Antikörper gegen eines der beiden genannten Autoantigene, und ein Screening auf diese Antikörper hat einen sehr hohen positiven Vorhersagewert für das Erkrankungsrisiko von Verwandten eines Typ 1 Diabetikers.

Die Entstehung des Typ 1 Diabetes mellitus wird zu 50-60% von genetischen und zu 40-50% von Umweltfaktoren bestimmt. Es gibt dabei eine Vielzahl von Umweltfaktoren, die als mögliche Beteiligte an der Entstehung des Typ 1 Diabetes mellitus heute von Bedeutung erscheinen, von denen im folgenden Abschnitt nur einige beschrieben werden. Als erstes sei die Möglichkeit einer viralen Infektion genannt. Hierbei gibt es vor allem für Coxsackie B, Rubella, Mumps (Lindberg et al. 1999) und neonatale Infektionen (EURODIAB Substudy 2 Study Group 2000; McKinney et al. 1999), sowie für die exogen angeregte Reaktivierung endogener Retroviren (HERV) (Conrad et al. 1997; Nakagawa und Harrison 1996) entsprechende Hinweise. Bis zu 20% der Kinder mit kongenitaler Rubella-Infektion erkranken in ihrem späteren Leben an Typ 1 Diabetes mellitus; in der Subgruppe mit den HLA-Allelen *DR3-DQ2* und *DR4-DQ8* (siehe 1.6.3) sind es bis zu 70% (Ginsberg-Fellner et al. 1984). Desweiteren erhöhen Enterovirus-Infektionen der Mutter während der Schwangerschaft das IDDM-Risiko des Kindes deutlich (Dahlquist et al. 1995; Hyoty et al. 1995). Als zusätzliche Risikofaktoren für eine IDDM-Erkrankung werden das Alter der Mutter (Dahlquist et al. 1991) und die Ernährung (Dahlquist et al. 1991) diskutiert. Dabei wurde das Auftreten von IDDM sowohl mit der Dauer des Stillens als auch mit dem Zeitpunkt der Erstexposition gegenüber bestimmten Nahrungsbestandteilen assoziiert. Zwar konnte eine Beteiligung des Kuhmilchproteins BSA (Rinderserum-Albumin) in experimentellen Situationen nachgewiesen werden (Karjalainen et al. 1992), die klinische Bedeutung von BSA-Antikörpern sowie die Rolle der Stilldauer (McKinney et al. 1999) und des Zeitpunkts der Exposition gegenüber Kuhmilch bleiben jedoch weiter unklar (Atkinson et al. 1993; Couper et al. 1999; Harrison und Honeyman 1999; Hyponen et al. 1999; Virtanen et al. 2000). Auch eine frühe Gewichtszunahme im Kleinkindalter wird als möglicher Risikofaktor betrachtet (Hyponen et al. 1999). Neuere Studien diskutieren darüber hinaus die Möglichkeit einer Erhöhung des Erkrankungsrisikos unter dem Einfluß von saurem Leitungswasser in Haushalten mit erkrankten Kindern (Stene et al. 2002).

Für den Fall einer viralen Beteiligung an der Entstehung des Typ 1 Diabetes mellitus werden unterschiedliche exogen angeregte oder genetisch modulierte Mechanismen diskutiert. Für Varianten des Coxsackie B-Virus ist ein β -Zell-Tropismus beschrieben worden (Szopa et al. 1990). Trotz intakter Morphologie der infizierten Zellen war die Insulinsynthese und -sekretion beeinträchtigt (Szopa et al. 1989; Szopa et al. 1993). Von Kindern, die nach grippeähnlichen Symptomen einen Diabetes entwickelten, konnten im Pankreasgewebe Coxsackie-Viren nachgewiesen werden (Yoon et al. 1979). Diese Viren

waren in der Lage, kultivierte Maus-Inselzellen zu infizieren (Bopegamage und Petrovicova 1994). Die im Zuge einer viralen Infektion gebildeten Zytokine IFN- γ und TNF- α können die Expression von HLA, kostimulatorischen und Adhäsionsmolekülen verstärken (Campbell et al. 1988; Campbell et al. 1989) und so die Präsentation von Autoantigenen fördern. Ein ähnlicher Mechanismus wäre für reaktivierte HERVs denkbar. Aufgrund der zum Teil weitgehenden Übereinstimmung zwischen körperfremden und körpereigenen Proteinen könnte es nach einer Infektion und klonaler T-Zellproliferation zu einem molekularen Mimikri, einer „Verwechslung“ von viralem und körpereigenem Epitop entweder durch Antikörper oder durch T-Zellen kommen. Dieser Mechanismus kann sowohl auf einer Konformations- als auch auf einer Peptidsequenz-Homologie der Epitope beruhen. Das beste Beispiel für eine solche Sequenzhomologie stellt das Coxsackie-Virus-Antigen P2-C dar (Kaufman et al. 1992), denn es verfügt über ein mit GAD65 identisches Hexapeptid. Polyklonale Antikörper gegen P2-C kreuzreagieren mit GAD65 (Hou et al. 1994) *in vitro* und die Existenz von gegen dieses Epitop gerichteten humanen T-Helferzellen ist sehr wahrscheinlich (Kwok et al. 1996b; Lernmark 1996). Die bei Typ 1 Diabetes-Patienten vorkommenden Autoantikörper gegen GAD65 kreuzreagieren allerdings nach bisherigen Erkenntnissen nicht mit dem viralen Peptid (Richter et al. 1994).

Eine weitere mögliche Erklärung für die Rolle von Viren bei der Pathogenese von IDDM wäre deren Funktion als Superantigen. Superantigene sind immunogene Proteine, die eine Vielzahl von T-Zellklonen aktivieren, indem sie HLA Klasse II-abhängig an das V β -Segment des T-Zellrezeptors (TCR) binden (Friedman et al. 1993). Durch die Bindung der HLA Klasse II-Moleküle der Antigen-präsentierenden Zelle mit der relativ wenig polymorphen variablen β -Kette (V β) wird, im Vergleich zur Reaktion eines konventionellen Antigens, eine bis zu 10^5 -fache Anzahl an T-Zellen aktiviert. Die in der Regel 20 bis 30 kDa großen Superantigene vermögen sowohl CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen als auch B-Zellen ohne vorherige intrazelluläre Prozessierung zu aktivieren. Anders als beim Mechanismus des molekularen Mimikri beinhalten Superantigene keine kreuzreagierenden Epitope. Vielmehr kommt es im Zuge der breiten Immunzell-Aktivierung auch zur Induktion von Zellen, die gegen potentielle Autoepitope gerichtet sind (Conrad et al. 1994). Der oligoklonale Ursprung der in einigen Autoimmunerkrankungen exprimierten T-Zellrezeptoren impliziert die Beteiligung von Superantigenen an der Pathogenese dieser Erkrankungen. Eine Superantigen-Funktion humaner endogener Retroviren bei der IDDM-Pathogenese konnte jedoch bisher nicht eindeutig bestätigt werden (Löwer et al. 1998).

Wie bereits zu Beginn dargestellt, wird eine CD4⁺ T-Zell vermittelte Immunantwort gegen ein Antigen nur eingeleitet, wenn es zusammen mit körpereigenen HLA Klasse II-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert wird, ein Vorgang der als HLA-Restriktion bezeichnet wird. HLA Klasse II-Moleküle werden nur auf Antigen präsentierenden Zellen exprimiert, so daß Oberflächenproteine anderer, gesunder Körperzellen eine Immunreaktion normalerweise nicht induzieren können. Vor allem eine Reihe endokriner Zellen bildet hiervon eine Ausnahme, da sie unter bestimmten Bedingungen HLA Klasse II-Moleküle exprimieren und so zu einer CD4⁺ vermittelten Immunantwort gegen autologe Proteine führen können. IFN- γ und TNF- α , die im Rahmen einer viralen Infektion des Pankreas gebildet werden, verstärken die HLA Klasse II-Expression auf pankreatischen β -Zellen (Bottazzo et al. 1985).

1.6.3 Genetische Risikomarker

Etwa 60% des genetischen Risikos einer Diabeteserkrankung wird der HLA-Genregion (IDDM1; siehe Tab.1.5) zugeschrieben (van Der et al. 1995), dem ersten Locus, von dem eine Assoziation mit Typ 1 Diabetes mellitus beschrieben wurde (Nerup et al. 1974; Singal und Blajchman 1973). Die HLA-Genregion ist Teil des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), der sich über 4 Megabasenpaare auf Chromosom 6q21 erstreckt (Campbell und Trowsdale 1993). Die HLA Klasse I liegt telomerwärts und kodiert für die hochpolymorphen Moleküle HLA-A, -B und -C. Die Gene der HLA Klasse II-Region, HLA-DR, -DQ und -DP, kodieren jeweils für eine α - und eine β -Kette, die zusammen als α/β -Heterodimere das intakte Klasse II-Molekül bilden. Die HLA-DR-Moleküle bestehen aus einer DRA-kodierten α -Kette und einer β -Kette, die durch einen der Loci HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 oder -DRB5 kodiert wird. Da meist nur zwei der vier β -Gene pro Allel gleichzeitig exprimiert werden, kodiert ein Haplotyp für zwei und ein heterozygoter Genotyp für vier DR-Moleküle. Die Komplexe HLA-DQ und -DP bestehen jeweils nur aus einem einzelnen α - und β -Gen. Von HLA-DRB1 sind über 200 Allele beschrieben, von DQB1 39 und DPB1 84 Allele, die sich manchmal in 20-30 Aminosäuren voneinander unterscheiden, oft aber auch nur in einer einzigen. Genauere Angaben über die komplexe Nomenklatur der HLA-Allele und-Haplotypen finden sich bei Marsh et al. (2001).

Innerhalb der HLA Klasse II-Region sind drei retrovirale solitäre LTRs lokalisiert (siehe Abb.1.4).

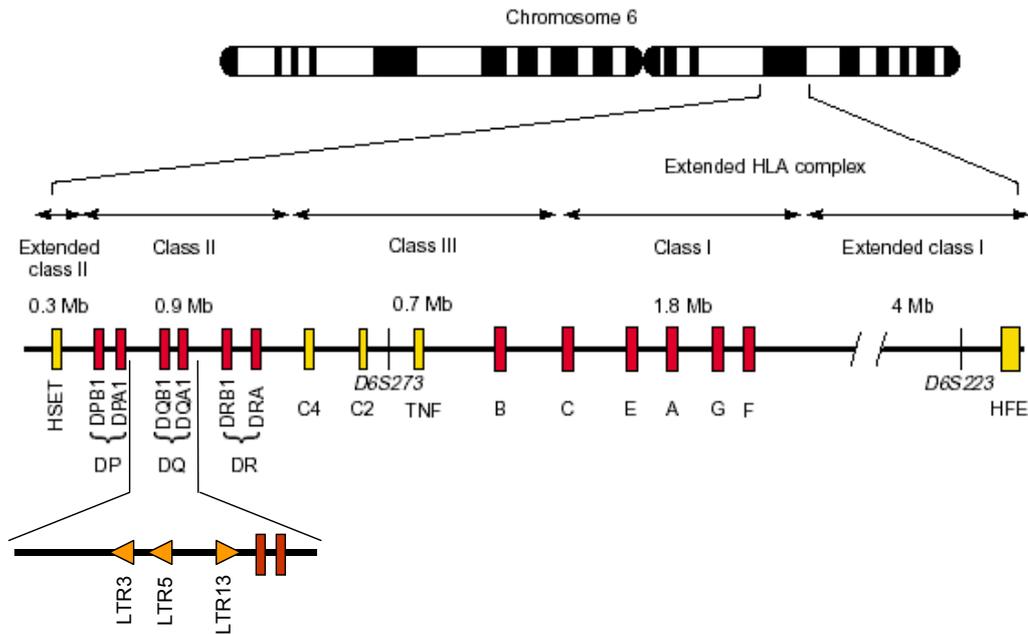


Abb. 1.4 Lokalisation der retroviralen solitären LTRs *DQ-LTR3*, *DQ-LTR5* und *DQ-LTR13* innerhalb der HLA Klasse II-Genregion in unmittelbarer Nähe zum *DQB1* Gen (modifiziert nach Undlien et al. 2001).

DQ-LTR3 und *DQ-LTR5* gehören zur Familie der humanen endogenen Retroviren HERV-K und befinden sich 15 bzw. 10 kb stromaufwärts vom *DQB1* Gen in reverser transkriptioneller Orientierung. *DQ-LTR13* läßt sich bisher keiner Familie zuordnen, befindet sich jedoch nur 1,3 kb stromaufwärts vom *DQB1* Gen in normaler transkriptioneller Orientierung. Basierend auf der Anwesenheit von regulatorischen Elementen innerhalb der LTR und der damit verbundenen möglichen Promotoraktivität, wird *DQ-LTR13* im folgenden auch als stromaufwärts gelegenes Element bezeichnet ("upstream element"). Aufgrund der unmittelbaren Nähe der LTR zu einem funktionellen Gen innerhalb einer Genregion, der ein sehr hoher Anteil am Risiko einer Diabeteserkrankung zugesprochen wird (van Der et al. 1995), wurde *DQ-LTR13* für die statistischen und funktionellen Analysen der vorliegenden Arbeit ausgewählt (siehe Kapitel 1.7).

Bei der Entdeckung der Assoziation der HLA-Genregion mit Typ 1 Diabetes mellitus ging man zunächst davon aus, daß die Klasse I-Allele *B8* und *B15* für die Erkrankung prädisponierend sind (Nerup et al. 1974; Singal und Blajchman 1973). Später konnten die für die Diabetes-Assoziation verantwortlichen Loci den Klasse II-Genen DR (Platz et al. 1981) und schließlich DQ (Nepom et al. 1986; Owerbach et al. 1983) zugeordnet werden. Die mit IDDM assoziierten HLA-Haplotypen unterscheiden sich in verschiedenen

Populationen teilweise erheblich voneinander. Durch die starke Kopplung der Klasse II-Gene miteinander bilden jedoch überall relativ wenige Allele einen Großteil der jeweiligen Haplotypen.

In der kaukasischen Bevölkerungsgruppe (Livak et al. 1995) sind die Allele *DQ8* (*DQA1*0301-DQB1*0302*) und *DQ2* (*DQA1*0501-DQB1*0201*) am stärksten prädisponierend für Typ 1 Diabetes mellitus (Badenhoop et al. 1995). Dabei ist die Prädisposition im Falle von *DQ8* abhängig von dessen Kombination mit unterschiedlichen *DR4* Allelen (Undlien et al. 2001) (siehe Abb.1.5). *DQ2* wirkt dagegen zusammen mit *DR3* prädisponierend (Undlien et al. 2001). Über 40% der Patienten besitzen den Genotyp *DQ8/DQ2* (Nepom 1993; Sanjeevi et al. 1996). Als zusätzlicher, unabhängiger Risikomarker erwies sich bereits die in Abb.1 gezeigte LTR *DQ-LTR3* (Donner et al. 1999).

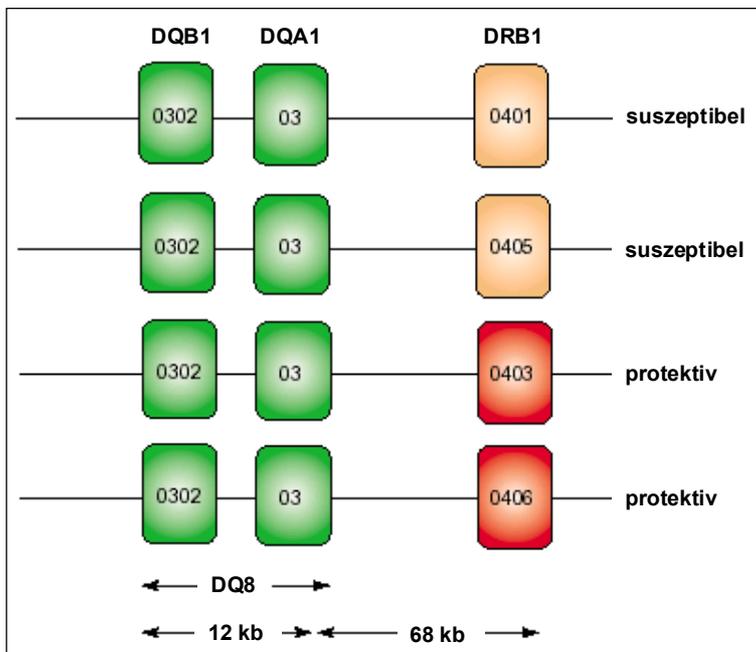


Abb. 1.5 Das von *DQ8* vermittelte Risiko einer IDDM Erkrankung wird durch dessen Kombination mit unterschiedlichen *DR4* Subtypen beeinflusst. So entsteht durch das Auftreten von *DRB1*0401* oder *DRB1*0405* ein suszeptibler Haplotyp, während die Kombination mit *DRB1*0403* oder *DRB1*0406* eher protektiv gegenüber einer Erkrankung wirkt (modifiziert nach Undlien et al. 2001).

Von besonderer Bedeutung war die Entdeckung, daß sich *DQ7*, ein für IDDM bei Individuen kaukasischen Ursprungs protektives Allel, in nur 4 Aminosäuren von *DQ8* unterscheidet. Dies legt die Vermutung nahe, daß die durch einen Aminosäureaustausch bedingte Ladungsänderung die Konformation des DQ-Moleküls derart verändert, daß sowohl die Peptid- (Kwok et al. 1996a; Kwok et al. 1996b; Nepom et al. 1996) als auch die T-Zellrezeptorbindung (Penzotti et al. 1996) beeinflusst wird. Das veränderte Bindungsverhalten könnte dann sowohl nach dem Modell des molekularen Mimikri als auch nach der Vorstellung der HLA-Restriktion die Entstehung autoimmunogener T-Zellklone begünstigen (Atkinson und Maclaren 1994; Bell et al. 1989; Todd et al. 1988).

Bei der Suche nach den Faktoren, die für die restlichen 40% des genetisch vermittelten Risikos einer Diabeteserkrankung verantwortlich sind, werden sog. Kandidatengene hinsichtlich ihrer möglichen Assoziation und ihrer Kopplung mit IDDM untersucht. Auf diese Weise fand man eine Assoziation des VNTR (variable nucleotide tandem repeat)-Polymorphismus am 5'-Ende des Insulingens (*IDDM2*) mit Typ 1 Diabetes mellitus, die später durch Linkage-Studien bestätigt werden konnte (Davies et al. 1994; Lucassen et al. 1993). Das vermittelte Risiko, das diesem Locus zugeschrieben wird, wird auf 2-3% geschätzt, wobei es in Subpopulationen mit höherem Erkrankungsalter wahrscheinlich größer ist (Thorsby und Ronningen 1993).

Durch die Verfügbarkeit einer Karte des menschlichen Erbgutes ist es möglich, in einem sogenannten „Genomscan“ das gesamte Genom mit Hilfe eines dichten Netzes von Mikrosatellitenmarkern auf Assoziationen mit Typ 1 Diabetes mellitus zu untersuchen. Auf diese Weise wurden bisher einige potentielle Kandidatengenorte identifiziert, die im folgenden (Tab. 1.5) zusammengefasst sind. Einige dieser Assoziationen konnten in weiteren Studien bisher nicht bestätigt werden, was zum Teil in der Heterogenität der untersuchten Population begründet ist. Einzelne Kandidatengenorte dürften nur in Subpopulationen mit Typ 1 Diabetes mellitus assoziiert sein. Bestätigt werden konnte unter anderem das Linkage von *IDDM7* auf Chromosom 2q31 (Copeman et al. 1995) in mehreren Populationen und von *IDDM8* auf Chromosom 6q25-q27 (Luo et al. 1995); ebenso sicher ist die Beteiligung von *CTLA4* (*IDDM12*) am genetischen Risiko für IDDM (Nistico et al. 1996). Dieses Gen kodiert für ein T-Zell spezifisches Membranprotein, das an der klonalen Deletion aktivierter T-Lymphozyten beteiligt ist. Für eine ausführliche Darstellung der Linkage- und Assoziationsstudien sei auf die entsprechende Referenz verwiesen (Todd und Farrall 1996).

Tab. 1.5 Risiko-Kandidatengene für Typ 1 Diabetes mellitus

Genort	Chromosom	Kandidatengen	Referenz
<i>IDDM1</i>	6p21.3	HLA-DQB1, -DRB1	(Nerup et al. 1974; Singal und Blajchman 1973)
<i>IDDM2</i>	11p15.5	Insulin VNTR	(Bennett et al. 1995; Davies et al. 1994; Lucassen et al. 1993)
<i>IDDM3</i>	15q26	D15S107	(Field et al. 1994)

<i>IDDM4</i>	11q13.3	FGF3, ZFM1, ICE	(Davies et al. 1994; Hashimoto et al. 1994; Luo et al. 1996)
<i>IDDM5</i>	6q25-q26	MnSOD, ESR, D6S467, D6S448	(Davies et al. 1994; Luo et al. 1996)
<i>IDDM6</i>	18q12-q21	D18S64	(Merriman et al. 1997)
<i>IDDM7</i>	2q31-q33	D2S152, NEUROD	(Copeman et al. 1995; Esposito et al. 1998)
<i>IDDM8</i>	6q25-q27	D6S281	(Davies et al. 1994; Davies et al. 1996; Luo et al. 1995; Luo et al. 1996)
<i>IDDM9</i>	3q21-q25	D3S1303	(Moczulski et al. 1998; Rowe et al. 1995)
<i>IDDM10</i>	10p11-q11	D10S193	(Reed et al. 1997)
<i>IDDM11</i>	14q24.3-q31	D14S67, ENSA	(Field et al. 1996)
<i>IDDM12</i>	2q33	CTLA4	(Nistico et al. 1996)
<i>IDDM13</i>	2q34	IGFBP-2, -5	(Morahan et al. 1996)
<i>IDDM15</i>	6q21	D6S283	(Delepine et al. 1997)
<i>IDDM17</i>	10q25	D10S592, D10S554	(Verge et al. 1998)
<i>IDDM18</i>	5q31.1-q33.1	IL12B	(Morahan et al. 2001)
unbenannt	1q42	D1S1617	(Concannon et al. 1998)
unbenannt	16q22-q24	D16S3098	(Mein et al. 1998)
unbenannt	19p13	D19S247	(Mein et al. 1998)
unbenannt	19q13	D19S225	(Mein et al. 1998)
unbenannt	Xp13-p11	DXS1068	(Cucca et al. 1998; Davies et al. 1994)
unbenannt	7p13	GCK	(Rowe et al. 1995)
unbenannt	12q14-q15	IFNG	(Awata et al. 1994; Jahromi et al. 2000)

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit umfaßt zwei thematische Schwerpunkte. Im ersten Projekt, dem statistisch-klinischen Teil der Arbeit, sollte mit Hilfe einer Familienassoziationsstudie die kombinierte Transmission von *DQ-LTR13* mit bestimmten DR-DQ-Haplotypen analysiert und statistisch erfaßt werden. Eine besondere Bedeutung hatte dabei die Betrachtung der für Typ 1 Diabetes prädisponierenden Risiko-Haplotypen DQ2 und DQ8. Das zur Verfügung stehende Familienkollektiv aus 284 Familien, jeweils bestehend aus den Eltern und einem erkrankten Kind, sollte dazu für die Merkmale *DQA1*, *DQB1* und *DQ-LTR13* genotypisiert und deren Segregation analysiert werden. Ziel dieser Analyse war die Charakterisierung der proviralen solitären LTR *DQ-LTR13* als zusätzlichen genetischen Risikomarker für eine Erkrankung an Typ 1 Diabetes mellitus.

Der zweite Teil der Arbeit umfaßt die funktionelle Charakterisierung der beiden solitären LTRs *DQ-LTR3* und *DQ-LTR13*. Mit Hilfe eines Reporterassays sollte die mögliche Promotor- oder Enhancer-Aktivität der LTRs in Abhängigkeit von ihrer Position und Orientierung relativ zum Reporter gen und gleichzeitig ihre Induzierbarkeit durch unterschiedliche Hormone untersucht werden. Darüber hinaus sollte im gleichen Testsystem der Einfluss der beiden LTRs auf die Aktivität des *DQB1* Promotors *in vitro* analysiert werden. Die Resultate sollten in einem zweiten Testsystem *in vivo* unter Verwendung stabiler B-lymphoblastoider Zelllinien definierter HLA Haplotypen verifiziert werden. Intention dieser Analysen war, eine mögliche Funktion der beiden untersuchten LTRs im Kontext ihrer natürlichen genomischen Umgebung nachzuweisen und damit ihre mögliche Beteiligung an der Entstehung des Typ 1 Diabetes mellitus zu verdeutlichen. Die gewonnenen Erkenntnisse sind ein weiterer Schritt zum besseren Verständnis der komplexen Ätiologie dieser Autoimmunerkrankung.

2. Material und Methoden

2.1 Familien und Patienten

Untersucht wurden insgesamt 284 Familien kaukasischen Ursprungs mit mindestens einem an Typ 1 Diabetes mellitus erkrankten Kind. Es handelte sich dabei um 203 deutsche Familien, in denen von 21 Familien nur der eine Elternteil bekannt war, und um 81 belgische Familien, so daß insgesamt 831 Individuen analysiert wurden. In beiden Gruppen herrschte ein m/w-Verhältnis von 0,92.

Die Familien wurden in der endokrinologischen Ambulanz, dem Diabetes-Schulungszentrum der Medizinischen Klinik I, dem Zentrum der Kinderheilkunde des Universitätsklinikums Frankfurt am Main sowie dem Belgian Diabetes Registry rekrutiert. Alle Personen gaben ihr Einverständnis zur Erhebung und Verarbeitung ihrer klinischen genetischen Daten zu wissenschaftlichen Zwecken. Die Diagnose "Typ 1 Diabetes mellitus" erfolgte nach WHO-Kriterien (1979).

2.2 Statistische Auswertung

2.2.1 Linkage Disequilibrium

Bei Genen, die auf unterschiedlichen Chromosomen liegen, kann man im allgemeinen davon ausgehen, daß sie entsprechend der Mendelschen Regel unabhängig voneinander vererbt werden. Gene hingegen, die auf demselben Chromosom lokalisiert sind, werden aufgrund der räumlichen Nähe oft auch gemeinsam vererbt. Die Wahrscheinlichkeit der gemeinsamen Vererbung sinkt mit zunehmendem Abstand der Loci voneinander. Grund hierfür ist das sogenannte Crossing-Over während der Meiose. Hierbei lagern sich homologe Nichtschwester-Chromatiden aneinander (Chiasmata) und tauschen ihr telomerwärts gelegenes chromosomales Material aus. Daraus wird deutlich, daß die Wahrscheinlichkeit für einen, die genetische Kopplung durchbrechenden, Chromatinaustausch mit zunehmendem Abstand der beiden Loci voneinander steigt.

Betrachtet man zwei polymorphe Loci (A/a und B/b), müßten sich die Genotyphäufigkeiten (h_{AB}) aus der Multiplikation der Allelhäufigkeiten ($h_A \times h_B$) ergeben, wenn keine genetische Kopplung vorliegt. Das Abweichen von diesen erwarteten Häufigkeiten beschreibt das "Linkage Disequilibrium" (Kopplungsungleichgewicht) und

stellt somit ein Maß für die Kopplung oder die Unabhängigkeit zweier polymorpher Loci dar (Weir und Cockerham 1979).

Neben dem Abstand der Loci zueinander beeinflussen weitere Faktoren das "Linkage Disequilibrium": natürliche Selektion (durch funktionelle Unterschiede der resultierenden Haplotypen), Migration, nicht zufällige Partnerwahl und das evolutionäre Alter eines Locus bzw. eines Polymorphismus.

2.2.2 Chi²-Vierfeldertest

Der Chi²-Vierfeldertest untersucht, ob die Verteilung von Merkmalen in zwei Gruppen signifikant voneinander abweicht oder ob beide Gruppen mit "einer gemeinsamen Realität" vereinbar sind. Am Beispiel des Auftretens der Krankheit K bei Jungen und Mädchen sei das Prinzip erläutert:

beobachtet	krank	gesund	Summe
Jungen	24	12	36
Mädchen	2	34	36
Summe	26	46	72

Geht man davon aus, daß das Geschlecht bei der Erkrankung K keine Rolle spielt, könnte man die Untergruppen (Jungen und Mädchen) als zufällige Stichproben der Gesamtpopulation ansehen und würde daher folgende Verteilung erwarten:

erwartet	krank	gesund	Summe
Jungen	$\frac{26}{72} \times 36 = 13$	$\frac{46}{72} \times 36 = 23$	36
Mädchen	$\frac{46}{72} \times 36 = 23$	$\frac{26}{72} \times 36 = 13$	36
Summe	36	36	72

Beim Chi²-Vierfeldertest werden die beobachteten Werte (B) mit den erwarteten Werten (E) verglichen:

$$\text{Chi}^2 = \sum \frac{(B_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} = 29,1371$$

Normalerweise untersucht man im Vergleich zur Gesamtpopulation nur sehr kleine Gruppen, so daß eine Stetigkeitskorrektur der Werte nach Yates (Sachs 1997) erforderlich wird, auf deren Berechnung hier nicht näher eingegangen wird. Für obiges Beispiel ergibt sich dadurch:

$$\text{Chi}^2 = 26,5485 \quad (\text{nach Yates-Korrektur})$$

Die in der vorliegenden Arbeit angegebenen Ergebnisse des Chi²-Vierfeldertests wurden nach Yates korrigiert und eine sich daraus ergebende Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als signifikant akzeptiert. Es erfolgte ebenfalls eine Korrektur der p-Werte nach Anzahl der Freiheitsgrade, sofern explizit angegeben. Ein Freiheitsgrad ist definiert als $n-1$, wenn n gleich der Anzahl der in der Analyse betrachteten Allele ist.

Der Chi²-Vierfeldertest diente somit dem Vergleich der transmittierten bzw. nicht-transmittierten Allele zwischen den einzelnen, zur Untersuchung herangezogenen Subgruppen.

2.2.3 Transmission Disequilibrium Test (TDT)

Der im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Chi²-Vierfeldertest eignet sich für Assoziationsstudien, bei denen das Auftreten eines Polymorphismus, zum Beispiel bei kranken und gesunden Individuen, miteinander verglichen wird. Die Auswahl einer Kontrollgruppe, die sich lediglich durch die Abwesenheit der Erkrankung von der Patientengruppe unterscheiden soll, bereitet oft Schwierigkeiten und kann bei der Analyse sowohl zu falsch positiven als auch zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Die Familienanalyse umgeht das Problem der Auswahl einer repräsentativen Kontrollgruppe und ermöglicht so eine sensitivere und spezifischere Untersuchung des fraglichen Polymorphismus in Bezug auf seine Krankheitsassoziation. Bei diesem Verfahren werden die Häufigkeiten der an den Patienten transmittierten und nicht transmittierten Allele mit Hilfe eines Chi²-Tests miteinander verglichen und als "Haplotype Relative Risk" (HRR) bezeichnet (Falk und Rubinstein 1987). Im Vergleich zur einfachen Assoziationsstudie fungieren die Häufigkeiten der nicht transmittierten Allele als interne Kontrollgruppe.

Auch beim TDT vergleicht man die Häufigkeiten von transmittierten (t) und nicht transmittierten (nt) Allelen innerhalb einer Familie miteinander. Zur Erhöhung der Sensitivität der Analyse berücksichtigt der TDT jedoch nur Eltern, die für den fraglichen Polymorphismus heterozygot sind und bei denen somit eine "echte" Alternative zwischen der Vererbung des einen oder anderen Allels besteht. Die Wahrscheinlichkeit eines heterozygoten Individuums, ein bestimmtes Allel zu vererben, liegt natürlicherweise bei 50%. Der TDT mißt die Wahrscheinlichkeit, daß ein Abweichen der beobachteten Verteilung von der 50:50-Erwartung zufällig ist (Spielman et al. 1993).

$$\text{Chi}^2 = \frac{(t - nt)^2}{t + nt}$$

Eine Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als signifikant angenommen. Es erfolgte, sofern nötig und explizit angegeben, eine Korrektur der p-Werte der TDTs nach der Anzahl der Freiheitsgrade (siehe 2.2.2).

2.2.4 Extended Transmission Disequilibrium Test (ETDT)

Der TDT untersucht jeweils nur ein Allel pro Analyse. Für die Betrachtung eines multiallelischen Markers sind demnach mehrere aufeinander folgende Berechnungen nötig. Der allelische "Extended Transmission Disequilibrium Test" (ETDT) (Sham und Curtis 1995) untersucht das Vererbungsungleichgewicht dieses multiallelischen Markers und liefert eine exaktere Abschätzung der tatsächlichen Wahrscheinlichkeiten. Dabei wird jedem Allel ein Parameter zugeordnet, der dem natürlichen Logarithmus des Wahrscheinlichkeits-Verhältnisses jedes Allels eines Haplotyps, an den Patienten vererbt zu werden, entspricht. Für den Haplotyp AB errechnet sich das Parameterpaar "a - b" wie folgt und definiert die allelische Alternativhypothese des ETDT (t für Transmission):

$$\ln \frac{p(t_A|AB)}{p(t_B|AB)} = a - b$$

Diese Parameter werden mit der Nullhypothese "keine Abweichung von der erwarteten Vererbungswahrscheinlichkeit von 50%" durch logistische Regression verglichen und entsprechend dem Freiheitsgrad korrigiert:

L_0 = natürlicher Logarithmus der Wahrscheinlichkeit unter der Nullhypothese

L_1 = natürlicher Logarithmus der Wahrscheinlichkeit unter der Alternativhypothese

χ^2 (allelischer ETDT) = $2 \times (L_1 - L_0)$; *Freiheitsgrad*: $n - 1$

n : Anzahl der Allele

Einzelheiten der Berechnung würden den Rahmen dieser Arbeit überschreiten und es sei deshalb an dieser Stelle auf die entsprechende Referenz (Sham und Curtis 1995) verwiesen. Eine Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als signifikant angenommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der ETDT verwendet, um insgesamt das Vererbungsungleichgewicht des multiallelischen Polymorphismus zwischen dem deutschen und dem belgischen Kollektiv zu vergleichen. Dies geschah mit Hilfe logistischer Regressionsanalyse unter Verwendung des Programms Proc Logistic (SAS Institute, USA).

2.2.5 Positive Predictive Value (PPV)

Das "Positive Predictive Value" (PPV) gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der Personen, die positiv für einen bestimmten genetischen Marker, in der vorliegenden Arbeit für *DQ-LTR13*, getestet wurden, eine bestimmte Erkrankung aufweisen, hier Typ 1 Diabetes mellitus.

Der Wert berechnet sich wie folgt:

$$PPV = \frac{A}{(A + B)}$$

A: HLA-Haplotyp X, t

B: HLA-Haplotyp X, nt

2.2.6 Negative Predictive Value (NPV)

Das "Negative Predictive Value" (NPV), im Gegensatz zum PPV (siehe 2.2.5), gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der Personen, die negativ für einen bestimmten genetischen Marker getestet wurden, eine bestimmte Erkrankung nicht aufweisen.

Der Wert berechnet sich wie folgt:

$$NPV = \frac{D}{(C + D)}$$

C: alle transmittierten HLA-Haplotypen minus A (siehe oben)

D: alle nicht transmittierten HLA-Haplotypen minus B (siehe oben)

2.2.7 Relatives Risiko (RR)

Eine weitere statistische Größe zur Analyse von Assoziationen eines genetischen Polymorphismus mit einer Erkrankung ist das relative Risiko (RR). Das RR entspricht dabei der relativen Inzidenz und berechnet sich nach folgender Formel (PPV siehe 2.2.5, NPV siehe 2.2.6):

$$RR = \frac{PPV}{NPV}$$

Betrachtet man die nt-Haplotypen als interne Kontrollgruppe, so ergibt sich ein Wert > 1 , wenn der Anteil der Patienten, die den genetischen Marker tragen, größer ist als der Anteil der Kontrollpersonen. Ein Wert < 1 ergibt sich, wenn sich das Verhältnis umkehrt. Bei identischer Verteilung des genetischen Markers ergibt sich ein RR gleich 1. Je größer das relative Risiko ist, desto stärker ist der genetische Marker mit der untersuchten Erkrankung assoziiert und, umgekehrt betrachtet, je kleiner das RR ist, desto größer ist die Protektion vor einer Erkrankung.

2.3 Organismen

2.3.1 Bakterienstämme

DH5 α : *Escherichia coli* Stamm mit dem Genotyp: F Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺) *phoA supE44* λ *thi-1 gyrA96 relA1* (Life Technologies)

DH10B: *Escherichia coli* Stamm mit dem Genotyp: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsd RMS-mcrBC*) Φ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 *deoR recA1 endA1 araD139* Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK* λ *rpsL nupG* (Life Technologies)

2.3.2 Säugerzelllinien

Tab. 2.1 Für die funktionelle Untersuchung eingesetzte Zelllinien und deren entsprechende DQA1/DQB1 Typisierung

Bezeichnung	Typ	DQA1 / DQB1	DQ-LTR13
GH	Teratokarzinom	*0201 *0301 / *0301 *0302	n.b.
A3.01	T-Zelle, lymphobl.	*0501 *0201 / *0201	n.b.
HUT-78	T-Zelle, lymphobl.	*0301 *0401 / *0302 *0402	n.b.
Jurkat	T-Zelle, leukäm.	*0102 *0201 / *0502 *0201	n.b.
Eva/SP (ECACC 9135)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0201	neg/neg
Bai/NJ (ECACC 9168)	B-Zelle, lymphobl.	*03 / *0302	pos/pos
VAVY (ECACC 9023)	B-Zelle, lymphobl.	*05011 / *0201	neg/neg
JHAF (ECACC 9030)	B-Zelle, lymphobl.	*0301 / *0301	n.b.
BOLETH (ECACC 9031)	B-Zelle, lymphobl.	*03011 / *0302	pos/pos
SAVC (ECACC 9034)	B-Zelle, lymphobl.	*03 / *0302	pos/pos
BM16 (ECACC 9038)	B-Zelle, lymphobl.	*05013 / *0301	n.b.
BM21 (ECACC 9043)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0301	n.b.
ALJ5 (ECBR 6230)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0201	pos/pos
IBW9 (ECBR 6219)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0201	neg/neg
POH (ECBR 6334)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0201	pos/neg
PE117 (ECBR 7691)	B-Zelle, lymphobl.	*03 / *0302	pos/pos
BM14 (ECBR 7458)	B-Zelle, lymphobl.	*03 / *0302	pos/pos
KT17 (ECBR 7785)	B-Zelle, lymphobl.	*03 / *0302	pos/pos
BM92 (ECBR 8892)	B-Zelle, lymphobl.	*03 / *0302	pos/pos
MOSI (ECBR 3866)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0201	neg/neg
LIB (ECBR 5312)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0201	neg/neg
STWO (ECBR 4949)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0201	neg/neg
BEAN (ECBR 4790)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0201	neg/neg
F42 (ECBR 3907)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0201	neg/neg
OTC (ECBR 3397)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0201	neg/neg
MEPE (ECBR 3421)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0201	neg/neg

Bezeichnung	Typ	DQA1 / DQB1	DQ-LTR13
HICH (ECBR 3384)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0201	neg/neg
KIJ (ECBR 6311)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0201	pos/pos
BOR (ECBR 6364)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0201	neg/neg
NIHG (ECBR 6398)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0201	pos/neg
NIMA (ECBR 6401)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0201	pos/neg
SHS (ECBR 6007)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0201	neg/neg
BER (ECBR 8893)	B-Zelle, lymphobl.	*0501 / *0201	neg/neg

n.b.: nicht bestimmt

Die hier aufgeführten Zelllinien bildeten die Grundlage für alle folgenden Analysen. Basierend auf ihrer DQ Haplotypisierung (siehe Kapitel 2.8.12.1 bzw. nach Angaben von ECACC oder ECRB) und der An- bzw. Abwesenheit von *DQ-LTR13* (siehe Kapitel 2.8.12.2) wurden sie für die funktionellen Analysen ausgewählt. Es handelt sich bei allen o.a. Zelllinien um Zellen humanen Ursprungs. Alle B-Zelllinien wurden durch EBV-Transformation hergestellt. ECACC steht für "European Collection of Cell Cultures", ECRB für "European Collection for Biomedical Research". Die ECRB-Zelllinien wurden freundlicherweise von Prof. Grosse-Wilde, Universitätsklinikum Essen, zur Verfügung gestellt.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Kultivierung von Säugerzelllinien

Die adhärent wachsende Teratokarzinom Zelllinie GH wurde in CMRL (Connaught Medical Research Laboratories 1069) Medium, supplementiert mit Bicarbonat (3,7 g/l), 1,25% L-Glutamin, 0,4% SP (100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin) und 5% inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) kultiviert. Die Zellen wurden einmal wöchentlich trypsiniert (10 ml 2,5% Trypsin Melnick, 15 ml Versen (159 mM NaCl, 3mM KCl, 6,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 M KH₂PO₄, 0,2 mM Titriplex) und 30 ml PBS ohne Mg/Ca) und im Verhältnis 1:5 bis 1:10 gesplittet.

Die Kultivierung der T- und B-lymphoblastoiden Zelllinien erfolgte in RPMI (Rosewell Park Memorial Institute 1640) Medium supplementiert mit L-Glutamin (s.o.), SP (s.o.), nicht-essentiellen Aminosäuren (8,9 mg/l L-Alanin, 15,0 mg/l L-Asparagin, 13,3 mg/l L-

Asparaginsäure, 14,7 mg/l L-Glutaminsäure, 7,5 mg/l Glycin, 11,5 mg/l L-Prolin, 10,5 mg/l L-Serin) und 10% inaktiviertem FKS (für alle lymphoblastoiden T-Zelllinien und die B-Zelllinien von ECACC) bzw. 16% FKS (für alle B-Zelllinien aus der ECBR Datenbank). Die Zellen wurden ein- bis zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:3 bis 1:10 gesplittet. Die Kultivierung erfolgte in Zellinkubatoren (Heraeus) bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂.

2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

Zellen aus einer mittelgroßen Flasche (80 cm²; Nunc) wurden bei 200 x g, 3 min, 4°C pelletiert. Die adhären wachsende Zelllinie GH wurde zuvor trypsinisiert und in 30 ml Medium aufgenommen. Die Zellen wurden je nach Zahl in 6-8 ml Einfrierlösung (90% FKS, 10% DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma)) aufgenommen, in Cryo Vials (Greiner) überführt und, nach Lagerung für 2 h bei -20°C und über Nacht bei -80°C, in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.5 Transfektionen

2.5.1 Transfektion von adhären wachsenden Säugerzelllinien

Zur Expression des Luciferase-Gens innerhalb von Reportergenkonstrukten in humanen Zellen wurde das Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) verwendet. Ziel der Untersuchung war die Darstellung der Auswirkung bestimmter Promotor- und Enhancer-Elemente auf die Expression des Reportergens,

In den promotorlosen Plasmid (p)-Vektor pGL3-Basic wurden über unterschiedliche Schnittstellen verschiedene Fragmente kloniert, um deren Einfluss auf die Expression des Luciferase-Gens zu untersuchen. Als Negativkontrolle diente der Basisvektor ohne inseriertes Fragment, als Positivkontrolle pGL3-Control (Promega), der einen SV40 Promotor enthält. Zur internen Standardisierung wurde pRL-CMV co-transfiziert. *DQ-LTR3* und *DQ-LTR13* wurden aus genomischer DNA entsprechender Patientenproben amplifiziert. Die provirale LTR aus HERV-K(C7), die als Beispiel für eine funktionale LTR eingesetzt wurde, stammte aus dem Plasmid pGTE-5'FlaC7 SD invers (Tönjes et al. 1999).

Zur Transfektion wurden $1-3 \times 10^5$ Zellen in jede Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät. Nach etwa 24 h wurden die Zellen mit den unterschiedlichen Plasmiden transfiziert. Der DNA-Mix pro Ansatz entsprach:

- 1 µg rekombinante Reportergenvektor DNA
- 333 pg interner Standard (pRL-CMV)
- 0,1 ml OptiMEM 1 (GIBCO)

Der Transfektionsmix pro Ansatz entsprach:

- 0,1 ml OptiMEM 1 (GIBCO)
- 10 µl Lipofectamin (Invitrogen)

Beide Ansätze wurden im Polystyrol-Röhrchen (Greiner) vermischt, nach einer Inkubationszeit von 30 min mit OptiMEM 1 auf 1 ml aufgefüllt und auf die in der Zwischenzeit mit PBS und OptiMEM 1 gewaschenen Zellen gegeben. Nach 5 h Inkubation bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ wurde in jede Vertiefung der 6-Loch-Platte 1 ml CMRL-Medium, supplementiert mit 20% FKS, gegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 48 h unter gleichen Bedingungen wurde die Lumineszenz gemessen (siehe 2.7).

2.5.2 Transfektion von Suspensionszelllinien

Zur Transfektion von Suspensionszellen mit den o.a. Reportergenkonstrukten wurde ein DNA-Mix hergestellt, der folgendes enthielt:

- 1 µg rekombinante Reportergenvektor DNA
- 333 pg interner Standard (pRL-CMV)
- 0,5 ml OptiMEM 1 (GIBCO)

Der Transfektionsmix enthielt:

- 0,5 ml OptiMEM 1 (GIBCO)
- 3,5 µl DMRIE-C (Invitrogen)

Beide Ansätze wurden in der Vertiefung einer 6-Loch-Platte vermischt und 30 min inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Suspensionszellen aus einer mittleren Zellkulturflasche (80 cm², Nunc) abzentrifugiert (200 x g, 3 min, RT), mit PBS gewaschen und anschließend in der Hälfte des ursprünglichen Volumens RPMI 1640 ohne Zusätze aufgenommen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 5×10^5 Zellen in jede Vertiefung der 6-Loch-Platte gegeben und nach weiteren 5 h (bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5%

CO₂) 0,5 ml 30%iges FKS zugefügt. Die abschließende Inkubation vor der Messung der Luciferaseaktivität (siehe 2.7) erfolgte für 48 h unter o.a. Bedingungen.

2.5.3 Hormoninduktion

Eine mögliche Induzierbarkeit der LTRs durch Hormone über deren Wechselwirkung mit in den LTRs nachgewiesenen putativen Hormon-responsiven Elementen (HRE) wurde durch den Einsatz von Hydrocortison (Sigma) und Estradiol (Sigma) untersucht. Dazu wurden die zu induzierenden Zellen nach der Transfektion mit den entsprechenden Reportergenkonstrukten 5 h inkubiert. Bei der anschließenden Medienzugabe erfolgte gleichzeitig auch die Zugabe des zu untersuchenden Hormons, das zuvor ins Medium gegeben worden war. Dazu wurde Hydrocortison in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt, Estradiol in einer Konzentration von 15 ng/ml. Als interner Standard wurde in diesen Untersuchungen das Plasmid pRL-Null (Promega) eingesetzt, das zuvor auf nicht-Induzierbarkeit durch die entsprechenden Hormone getestet worden war.

2.6 Kulturbedingungen der Bakterienstämme

2.6.1 Kulturmedien

Die Herstellung von Kulturmedien erfolgte, falls nicht anders erwähnt, nach Sambrook *et al.*, 1989. Festmedien wurden mit 1,5% Agarose (w/v) versetzt.

2.6.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E.coli* erfolgte in TB-Medium (Terrific Broth; 12 g/l Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 4 ml Glycerin, 17 mM KH₂PO₄, 72mM K₂HPO₄; autoklaviert) oder LB-Medium (Luria-Bertani; 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,0; autoklaviert) bei 37°C. Flüssigkulturen wurden bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Zur Selektion von transformierten Bakterien wurde das Antibiotikum Ampicillin (50 µg/µl; Boehringer Mannheim) dem Medium zugegeben.

2.7 Dual Luciferase Assay und Reporter-Plasmide

Das Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) diente zur Untersuchung der Wirkung retroviraler LTRs auf die Expression des Luciferase-Gens. Die Bezeichnung "Dual" in Kombination mit "Reporter" bezieht sich auf die gleichzeitige Expression und Analyse zweier unabhängiger Reporterenzyme in einem Versuchsansatz. Dazu wurden unterschiedliche Vektoren eingesetzt: der promotorlose Basisvektor pGL3-Basic (Promega) enthält das Luciferase-Gen des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*), mit der man die Aktivität des zu untersuchenden Promotors nachweist. In die multiple Klonierungsstelle dieses Vektors wurden, unter Verwendung unterschiedlicher Restriktionsschnittstellen, die zu untersuchenden Fragmente einkloniert. Der co-transfizierte Standard pRL-CMV enthält dagegen das Luciferase-Gen der Seeanemone (*Renilla reniformis*), das unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors steht und so zur Standardisierung verwendet werden kann. Beide Enzyme benötigen unterschiedliche Substrate, so daß die Messung beider Aktivitäten nacheinander im gleichen Versuchsansatz erfolgen kann.

Die Reaktion der Luciferase des Glühwürmchens verläuft unter Verwendung von Luciferin als Substrat folgendermaßen:



Die Reaktion der *Renilla*-Luciferase unter Verwendung von Coelenterazin verläuft wie folgt:



Zur Kontrolle des Erfolgs der Transfektion wurde, anstelle des experimentellen Plasmids, das Plasmid pGL3-Control zur Co-Transfektion eingesetzt. Dieses Plasmid enthält das Luciferase-Gen unter der Kontrolle des SV40-Promotors.

Die so co-transfizierten Zellen wurden nach 48 h mit Passive Lysis Buffer (PLB; Promega) lysiert. Die PLB Gebrauchslösung wird aus einer 5-fach Stammlösung hergestellt. Adhärent wachsende Zellen werden dazu in den einzelnen Vertiefungen der 6-Loch-Platte mit PBS gewaschen und anschließend mit 300 µl PLB 1x lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT auf einem Taumelwipptisch (Biometra) wird das Lysat

in Eppendorfgläser überführt und zentrifugiert (12.000 x g, 30 s, RT). Vom Überstand wurden 20 µl für den Luciferase-Assay eingesetzt.

Für die Aufarbeitung der Suspensionszellen wurde der gesamte Transfektionsansatz aus jeder Vertiefung der 6-Loch-Platte in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Ansätze wurden zentrifugiert (100 x g, 3 min, RT), mit PBS gewaschen und in jeweils 100 µl PLB 1x lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurden die Proben nochmals zentrifugiert (12.000 x g, 30 s, RT) und vom Überstand wiederum 20 µl für den Luciferase-Assay eingesetzt.

Die Messung erfolgte in 96-Loch-Platten im MicroLumat Plus LB 96V (EG&G Berthold). Zu jedem Ansatz wurden 50 µl Firefly Luciferase Substrat (LAR II; Promega) gegeben und nach 2 s Verzögerung für 10 s die Lichtemission gemessen. In den gleichen Ansatz wurden anschließend 50 µl Stop&Glo Substrat (Promega) pipettiert. Dieses Reagenz stoppt die Reaktion der Firefly Luciferase und stellt gleichzeitig das Substrat für die *Renilla* Luciferase dar. Nach einer Verzögerung von 2 s wurde wiederum für 10 s die Lichtemission gemessen.

Für jede Zelllinie und für jeden Reportergenvektor wurden insgesamt drei unabhängige Transfektionsexperimente durchgeführt, in denen jeweils Triplikate für jedes Konstrukt verwendet wurden. Um die Aktivität des experimentellen Vektors mit Hilfe des internen Kontrollvektors pRL-CMV zu standardisieren und damit die Variabilität der experimentellen Bedingungen zu minimieren, wurden die Meßwerte für den internen Standard gleich eins gesetzt und der Quotient aus $RLU_{\text{experimenteller Vektor}} / RLU_{\text{pRL-CMV}}$ (RLU, relative light units) als Ergebnis angegeben. Für jedes Triplikat wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut

Zur Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut wurden Leucosep Filterröhrchen (Greiner) verwendet. Diese bestehen aus einem 50 ml-Röhrchen und einer darin enthaltenen Filterscheibe. Das vom Hersteller angegebene Protokoll zur Isolierung der Zellen wurde in einigen Punkten modifiziert. Zu Beginn wurde das Röhrchen mit Histopaque (Sigma) bis zur 35 ml-Marke über der Filterscheibe gefüllt und zentrifugiert (800 x g, 10 min, RT). Das zur Isolierung verwendete Citrat-Blut wurde im Verhältnis 1:1

mit Hank's-Medium (139 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,1 mM CaCl₂, 0,8 mM MgSO₄, 0,34 mM Na₂HPO₄, 0,44 mM KH₂PO₄, 4,16 mM NaHCO₃, 5,56 mM Glukose, 0,025 mM Phenolrot) verdünnt und in dieser Form zur Überschichtung des Histopaque verwendet. Das so befüllte Röhrchen wurde zentrifugiert (800 x g, 30 min, 4°C, ohne Bremse). Die anschließend im Röhrchen entstandene Schichtung enthält, direkt unter der oberen Plasmaschicht, die mononukleären Zellen. Diese wurden in ein 50 ml-Falcon überführt, zweimal mit Hank's-Medium gewaschen (Zentrifugation bei 650 x g, 10 min, 4°C) und abschließend in 10 ml PBS resuspendiert.

2.8.2 Zellkernisolierung

2.8.2.1 Zellkernisolierung aus mononukleären Zellen

Zur Isolierung der Zellkerne aus mononukleären Zellen wurde das Nuclei EZ Prep Nuclei Isolation Kit (Sigma) verwendet. Die Lysierung mit allen Zentrifugationsschritten und die anschließende Aufnahme der isolierten Zellkerne in Einfriermedium erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zum Einsatz kamen dabei ausschließlich die im Kit enthaltenen Puffer und Lösungen.

2.8.2.2 Zellkernisolierung aus Suspensionszellen

Zur Isolation der Zellkerne aus Suspensionszellen wurden die Zellen einer mittleren Zellkulturflasche (80 cm²; Nunc) abzentrifugiert (200 x g, 5 min, RT), gewaschen und, nach Überführung in ein 10 ml-Röhrchen, nochmals zentrifugiert (200 x g, 5 min, 4°C). Das Zentrifugat wurde in 5 ml Lysierpuffer (10 mM Tris-HCl [pH 7,6], 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40) resuspendiert und für 3 min auf Eis inkubiert. Nach zwei weiteren Zentrifugations- (200 x g, 5 min, 4°C) und Waschschritten (mit kaltem PBS ohne Mg/Ca) wurde das Zentrifugat, das die Zellkerne enthält, in 100 µl Einfrierpuffer (50 mM Tris-HCl [pH 8,3], 40% Glycerin, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA) aufgenommen und für weitere Analysen bei -80°C gelagert.

2.8.3 Isolierung von Nukleinsäuren

2.8.3.1 Isolierung von genomischer DNA aus Zellen

Zur Herstellung von Kernextrakten wurde die Kultur einer mittleren Zellkulturflasche (80 cm²; Nunc) in ein 50 ml-Falcon überführt, zentrifugiert (200 x g, 5 min, 4°C), dreimal mit kaltem PBS (ohne Mg/Ca) gewaschen und in 10 ml kaltem PBS aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation (500 x g, 10 min, 4°C) wurden die Zellen in 4 ml Lysierpuffer (10 mM Tris-HCl [pH 7,6], 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,5% NP40) aufgenommen und mit Hilfe eines Vortex lysiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (1.600 x g, 2 min, 4°C) wurde das Zentrifugat, das die Zellkerne enthält, in 500 µl Proteinase K-Puffer (10 mM Tris-HCl [pH 7,8], 0,5% SDS) und 2,5 µl Proteinase K (20 mg/ml; Boehringer Mannheim) resuspendiert und für 4 h (bis über Nacht) bei 50°C verdaut. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde für die im Abschnitt 2.8.3.3 beschriebene Isolierung cytoplasmatischer RNA verwendet.

Die Isolation genomischer DNA erfolgte über Phenol/Chloroform-Extraktion mit zusätzlicher Sevag-Aufreinigung (Chloroform/Isoamylalkohol; 24:1) und anschließender Äthanol-fällung.

2.8.3.2 Isolierung von genomischer DNA aus Vollblut

Zur Gewinnung genomischer DNA aus Vollblut wurde 8-10 ml Blut der Probanden eingesetzt. Das Blut wurde zur Gerinnungshemmung in einer Kalium-EDTA-Monovette abgenommen. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die so extrahierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte gelelektrophoretisch oder wie in Kapitel 2.8.4 beschrieben. Die gelelektrophoretische Methode beruht auf dem Vergleich der Bandenintensität eines Markers bekannter Konzentration mit der Bandenintensität der Proben unbekannter Konzentration gleicher Fragmentgröße nach Auftrennung der Proben auf einem 0,7%igen Agarosegel, das mit 0,01% SYBR Green[®] (Pharmacia Biotech) gefärbt wurde. Die Auswertung erfolgt unter UV-Transillumination (254 nm).

2.8.3.3 Isolierung von cytoplasmatischer RNA

Die Isolierung cytoplasmatischer RNA erfolgte aus dem Überstand der Lyse der DNA-Präparation (siehe 2.8.3.1) unter Verwendung von saurem Phenol/0,5% SDS (vorgewärmt auf 65°C) und Phenol/Chloroform, sowie anschließender Präzipitation mit Natriumacetat (3M, pH 4,8-5,2) und Äthanol (100%) für 30 min bei -80°C (bis über Nacht bei -20°C). Nach abschließender Zentrifugation (16.000 x g, 20 min, 4°C) wurde das Zentrifugat in DEPC-Wasser (Diethyl-Pyrocbonat; 0,1% in H₂O) aufgenommen.

2.8.3.4 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien

2.8.3.4.1 Minipräparation durch alkalische Lyse

Die Plasmidaufreinigung aus Minikulturen von Bakterien erfolgte nach einer Methode von Birnboim und Doly (1979). Zellen aus einer 5 ml Übernachtskultur wurden mittels Zentrifugation (16.000 x g, 30 s, RT) geerntet und in 100 µl kaltem GTE-Puffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl [pH 8,0], 10 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lysispuffer (200 mM NaOH, 1% SDS) wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert. Zur anschließenden Neutralisation wurden 150 µl Natriumacetat (3 M) zugegeben, um dann die Zelltrümmer und chromosomale DNA abzuzentrifugieren (16.000 x g, 5 min, RT). Die Plasmid DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 2 Volumen 100% Äthanol und anschließender Inkubation für 2 min auf Eis gefällt und dann durch Zentrifugation pelletiert (16.000 x g, 5 min, RT). Das Zentrifugat wurde in 60 µl RNase A- (0,1 mg/ml; Boehringer Mannheim) haltigem TE Puffer (5 mM Tris/HCl [pH 7,5], 10 mM EDTA) resuspendiert.

2.8.3.4.2 Midi- und Maxi-Präparation

Die Präparation von DNA im Midi- und Maximaßstab erfolgte mit dem QIAGEN Midi- bzw. Maxi Kit nach den Angaben des Herstellers. Zellen aus 50 bzw. 250 ml Übernachtskulturen wurden durch Zentrifugation (6.000 x g, 15 min, 4°C) pelletiert und unter Verwendung des im Kit mitgelieferten Puffers lysiert. Die Aufreinigung der Plasmid DNA erfolgte an Anionenaustauschersäulen. Die Verwendung von Endo-free Puffern

gewährleistete die Entfernung bakterieller Endotoxine, die die Transfektion eukaryotischer Zellen erschweren können.

2.8.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von Nukleinsäuren beruht auf den unterschiedlichen Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren (260 nm) und Proteinen (280 nm). Für reine DNA liegt der Quotient OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,6 und 1,8, für RNA zwischen 1,8 und 2,0. Die Messung erfolgte im RNA/DNA Calculator (Pharmacia).

2.8.5 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA Fragmenten erfolgte elektrophoretisch. Dazu wurde Agarose (Life Technologies) in 1x TAE Puffer (40 mM Tris/Acetat, 1 M EDTA, pH 8,0) aufgekocht und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Roth) versetzt. Bei Fragmenten mit einer Größe unter 500 bp wurden Gele in 1x TBE (5x TBE Puffer: 54 g Tris Base, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA [pH8,0] ad 1 l mit H₂O) verwendet. Zum Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 1/5 Volumen Gelbeladepuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glycerin) versetzt. In Abhängigkeit von der Fragmentgröße erfolgte die Auftrennung bei 5 bis 12 V/cm über einen Zeitraum von 2-20 Stunden in 0,7 bis 1,5%igen Agarosegelen.

2.8.6 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des Jetsorb Gel Extraction Kit (Genomed). Nach der chemischen Zersetzung der Agarosegelmatrix wurde die DNA an die Matrix Glasmilch gebunden, von der sie mit Wasser eluiert werden kann. An die Aufreinigung schloß sich eine Konzentrationsbestimmung an (siehe 2.8.4).

2.8.7 Dephosphorylierung von DNA

Zur Unterbindung der Rezirkulierung linearisierter Vektoren wurden diese vor dem Einfügen des gewünschten Fragments dephosphoryliert. Restringierte Vektoren wurden erst für 20 min mit 0,5 U alkalischer Phosphatase des Kalbes (Pharmacia) bei 37°C und

anschließend für 20 min mit 1 U bakterieller alkalischer Phosphatase bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Äthanol-fällung wurde die Vektor DNA zur Ligation eingesetzt.

2.8.8 Ligation

Die Verknüpfung von Insert und Vektor DNA erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Life Technologies). 10-50 ng Vektor DNA wurden mit 4 µl 5x Ligase-Puffer, 1 µl Enzym (4,5 Weiss Einheiten) und der äquimolaren Menge Insert DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl über Nacht bei 16°C inkubiert. 4 µl des Ligationsansatzes wurden für die Transformation (siehe 2.8.11) in kompetente *E.coli* Stämme (siehe 2.8.10) (DH5α, DH10B) eingesetzt.

2.8.9 T/A-Klonierung von PCR-Amplifikaten

Bei der Klonierung von PCR-Produkten (siehe 2.8.12) macht man sich die Eigenschaft der Taq DNA Polymerase, die für die PCR verwendet wird, zu Nutze, Template-unabhängig einen Desoxyadenosin-Überhang am 3'-Ende des Amplifikates zu erzeugen. In Vektorsysteme, die einen Desoxythymidin-Überhang besitzen, können die PCR Produkte so direkt kloniert werden. Ein solches Vektorsystem stellt der hier verwendete Vektor pGEM-T-Easy (Promega) dar, in den die Amplifikate aus den PCR Reaktionen direkt durch Ligation (siehe 2.8.8) einkloniert wurden. An diese Reaktion schloß sich eine Transformation (siehe 2.8.11) in kompetente Zellen (siehe 2.8.10) an, die eine Aufnahme entsprechend großer Plasmide erlaubten.

2.8.10 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur effizienten Transformation von Bakterien müssen diese in einen Zustand der Kompetenz gebracht werden. Dazu wurden 100 ml Kulturen der Bakterienstämme DH5α und DH10B bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,55 kultiviert. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen pelletiert (3.700 x g, 10 min, 4°C) und in 20 ml Lösung TFB1 (30 mM KAc, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂•2 H₂O, 50 mM MnCl₂ • 4 H₂O, 15% Glycerin (v/v), pH 5,8) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach

erneutem Pelletieren wurden die Zellen in 2 ml Lösung TFB2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% Glycerin (v/v), pH 6,5) aufgenommen und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Zum Abschluß wurden 100 µl-Aliquots auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.8.11 Transformation von Bakterien

Kompetente Bakterien wurden aufgetaut und mit 1-10 ng Plasmid DNA oder 4 µl eines Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (45 s, 42°C) wurden die Zellen für 1 h in SOC-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,05% NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glucose, pH 7,0) bei 37°C im Schüttler regeneriert, auf Selektivnährböden ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.8.12 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation spezifischer DNA Bereiche erfolgte mittels PCR (Saiki et al. 1985). Die Reaktion erfolgte unter Verwendung der rekombinanten, thermostabilen DNA-abhängigen DNA Polymerase AmpliTaq (Applied Biosystems).

Eine Standard PCR enthielt 1 x PCR Puffer (10 mM Tris-HCl [pH 8,5], 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% Gelatine), je 1 µM Primer, 100 ng DNA und 2,5 U Taq-Polymerase in einem 50 µl Ansatz.

Die verwendeten PCR Programme unterschieden sich hinsichtlich der Temperatur, der Primerbindung (Annealing) und der Dauer der Elongation, die jeweils Amplifikat- und Primer-spezifisch waren. Die Zyklen Denaturierung, Annealing und Elongation wurden, je nach PCR, zwischen 25 und 30 mal wiederholt. Es folgte eine finale Elongation von 4-10 min.

Für die PCRs wurden die Thermocycler Multicycler PTC 200 (Biozym), Mastercycler Gradient (Eppendorf), Genius (Techne) und der Trio-Block (Biometra) eingesetzt.

2.8.12.1 Typisierung der *DQA1* und *DQB1* Allele

Die *DQA1* und *DQB1* Allele der Patienten und ihrer Eltern wurden mit Hilfe sequenzspezifischer Primer basierend auf der WHO HLA Nomenklatur bestimmt (Marsh 1998; Olerup et al. 1993). Allele, die in Patienten nachgewiesen wurden, wurden mit t

bezeichnet, während die elterlichen Allele, die nicht im Patienten nachgewiesen wurden, mit nt bezeichnet wurden. Es wurde keine Rekombination beobachtet und alle Familien folgten dem Segregationsmuster der Mendelschen Vererbung.

2.8.12.2 *DQ-LTR3* und *DQ-LTR13* Genotypisierung

Der genomische Nachweis für *DQ-LTR3* wurde für alle untersuchten Individuen bereits im Vorfeld dieser Arbeit abgeschlossen (Donner et al. 1999). Die An- bzw. Abwesenheit von *DQ-LTR13* wurde mit Hilfe eines nested PCR-Ansatzes bestimmt. Die dafür verwendeten Oligonukleotide basieren auf einer Sequenz, die unter der Nummer #Z80898 in der GenBank abgelegt ist. Sie sind in der Liste der verwendeten Nukleotide (siehe 2.8.14) unter den Bezeichnungen LTR13ex_forward, LTR13ex_revers, LTR13int_forward und LTR13int_revers aufgeführt.

Alle folgenden PCRs wurden in einem Multicycler PTC 200 (Biozym) durchgeführt. Für die Amplifizierung wurde die Taq Polymerase (Promega) verwendet. Die PCR Fragmente wurden auf einem 2%igen, mit SYBR Green® (Pharmacia Biotech) gefärbten Gel aufgetrennt und photographisch dokumentiert.

Die initiale externe PCR mit den Primern LTR13ex_forward und LTR13ex_revers ergab ein 1057 bp großes Fragment in Anwesenheit der LTR und ein 51 bp großes Fragment bei deren Abwesenheit. Für diese Reaktion wurden 200 ng genomische DNA, 8 mmol/l dNTPs, 15 pmol von jedem Primer, 10 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l KCl, 1,5 mmol/l MgCl₂ und 1 U (Unit) Taq Polymerase eingesetzt. Das PCR-Programm bestand aus 30 Zyklen, ein Zyklus bestehend aus 94°C für 50 s, 57°C für 50 s und 72°C für 55 s, nach einer initialen Denaturierung bei 94°C und einer finalen Extension von 4 min. Für die folgende interne PCR wurde das Produkt der externen PCR im Verhältnis 1:100 verdünnt und von der Verdünnung 2 µl eingesetzt. Die Amplifizierung mit den Primern LTR13int_forward und LTR13int_revers, die so gewählt wurden, daß sie den Bereich im Übergang der nicht-codierenden HLA-Region zur *DQ-LTR13* überspannen, ergibt im positiven Fall ein Fragment der Größe 1035 bp. Die PCR-Bedingungen entsprachen denen der externen PCR. Um die im nested Ansatz erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde eine weitere PCR-Reaktion durchgeführt. Die Kontroll-PCR mit den Primern LTR13S_forward und LTR13S_revers ergab ein Fragment der Größe 1530 bp bei Anwesenheit der LTR und ein Fragment der Größe 530 bp bei deren Abwesenheit. Das PCR-Programm bestand ebenfalls aus 30 Zyklen, ein Zyklus bestehend aus 94°C für 1 min, 60°C für 1 min und 72°C für 1

min 40 s nach einer initialen Denaturierung von 4 min und einer ebenso langen finalen Extension.

2.8.13 DNA Sequenzierung

Sequenzierungen wurden dankenswerterweise von Herrn Martin Selbert, Paul-Ehrlich-Institut, unter Verwendung der automatischen DNA-Sequenzier Modelle 373 bzw. 377 (Applied Biosystems) durchgeführt. Die computergestützte Auswertung der Sequenzen erfolgte mit den Programmen Sequence-Navigator und –Editor (ABI), DNAsis (Hitachi) und MacVector™6.5 (Oxford Molecular). Datenbankabgleiche wurden via Internet mit dem Programm BLASTN (NCBI, Washington) vorgenommen.

2.8.14 Verwendete Oligonukleotide

Die Bezugssequenzen aus der Genbank (NCBI, Washington), auf deren Basis die Oligonukleotide ausgewählt wurden, sind durch unterschiedliche Indizes gekennzeichnet und am Ende der Tabelle näher bezeichnet. Die Orientierung der Primer ist in 5′-3′ Richtung angegeben.

Tab. 2.2 Übersicht über die zur PCR-Amplifikation verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz	Position
5'-HERV-K LTR	CAGTGAGGTACCTGTGGGGAAAAGCAAGAGAG	nt 427-446*
3'-HERV-K LTR	CAGTGAAGATCTTGTAGGGGTGGGTTGCCCT	nt 1394-1375*
5'-LTR13	CAGTGAGGTACCAGTCTGTAGGTGCCAGCCCTA	nt 19173-19193**
3'-LTR13	CAGTGAAGATCTCTGGTGTGGGCAGCAAGCCAC	nt 20180-20160**
5'-LTR13anti	CAGTGAAGATCTAGTCTGTAGGTGCCAGCCCTA	nt 19173-19193**
3'-LTR13anti	CAGTGAGGTACCCTGGTGTGGGCAGCAAGCCAC	nt 20180-20160**
5'-LTR3anti	CAGTGAAGATCTTGTGGGGAAAAGCAAGAGAG	nt 1-20***
3'-LTR3anti	CAGTGAGGTACCTGTAGGGGTGGGTTGCCCT	nt 967-948***
LTR13a_for	GTCAGAAGTAATGTTTGCCAG	nt 19154-19174**
LTR13b_rev	CATCGCCAGCATCAAGGTC	nt 21532-21514**
LTR13c_for	CAGTGAGGTACCAGTCTGTAGGTGCCAGCCCTA	nt 19173-19193**

LTR13d_for	CAGTGAGGT <u>ACCCACCAGGC</u> ATTGTTCTAATTGC	nt 20175-20196**
LTR13e_for	CAGTGAGGT <u>ACCCTTTGGCTTCTT</u> AAAATCCCTTAG	nt 21138-21161**
LTR13f_rev	CAGTGAA <u>AGCTTCGCAA</u> AGCCTTCTTCCAAGAC	nt 21483-21463**
LTR13forBam	CAGTGAGGATCCAGTCTGTAGGTGCCAGCCCTA	nt 19173-19193**
LTR13revBam	CAGTGAGGATCCCTGGTGTGGGCAGCAAGCCAC	nt 20180-20160**
1309forXho	CAGTGACTCGAGCACCAGGCATTGTTCTAATTGC	nt 20175-20196**
1309revHind	CAGTGAA <u>AGCTTCGCAA</u> AGCCTTCTTCCAAGAC	nt 21483-21463**
LTR13forXho	CAGTGACTCGAGAGTCTGTAGGTGCCAGCCCTA	nt 19173-19193**
LTR13revKpn	CAGTGAGGT <u>ACCCTGGTGTGGGC</u> AGCAAGCCAC	nt 20180-20160**
LTR13for_Kpn	CAGTGAGGT <u>ACCAGTCTGTAGGT</u> GCCAGCCCTA	nt 19173-19193**
LTR13rev_Xho	CAGTGACTCGAGCTGGTGTGGGCAGCAAGCCAC	nt 20180-20160**
Exon1_forward	CTTGGAAGAAGGCTTTGCG	nt 21465-21483**
Exon2_forward	CGTGTTCAGTTTAAGGGC	nt 23031-2049**
Exon4_reversA	CACTCAGCATCTTGCTCTG	nt 26659-26641**
Exon4_reversB	TCTGACTCCTGTGATGGATA	nt 26728-26709**
DQ-LTR3Xho_for	CAGTGACTCGAGTAGCTCTGTTCTGTGGCTC	nt 4941-4959**
DQ-LTR3Kpn_rev	CAGTGAGGT <u>ACCCTCCTGATC</u> AGGAGTACAG	nt 6200-6182**
DQ-LTR3Kpn_for	CAGTGAGGT <u>ACCTAGCTCTGTTCT</u> GTGGCTC	nt 4941-4959**
DQ-LTR3Xho_rev	CAGTGACTCGAGCTCCTGATCAGGAGTACAG	nt 6200-6182**
2311Xho_for	CAGTGACTCGAGAGTCTGTAGGTGCCAGCCCTA	nt 19173-19193**
LTR13ex_forward	GGTCAGAAGTAATGTTTGCC	nt 19153-19172**
LTR13ex_revers	TAATGGTTATAAAGCAATTAGAAC	nt 20209-20186**
LTR13int_forward	AGTAATGTTTGCCAGTCTGTAG	nt 19159-19181**
LTR13int_revers	AATTAGAACAATGCCTGGTGTG	nt 20194-20175**
LTR13S_forward	CCAGTCTCAGGTGCTCTAGAA	nt 18908-18928**
LTR13S_revers	TGAAGCATTCCTAGGTCCTGA	nt 20437-20416**
LTR3ex_forward	AATGCTGATTAGAAGTAGCTCTG	nt 4926-4948**
LTR3ex_revers	ACAAGGACATCTCCTGATCAG	nt 6210-6190**

LTR3int_forward	GGTGGAGCAACAGCCCACCCGGAAGT	nt 5077-5102**
LTR3int_revers	CCCCTTGTGACTTCTGTGGGGAAAAGC	nt 6084-6058**

*GenBank #Y17832; ** GenBank #Z80898; *** GenBank #M33841; ¹ die Positionsangaben beziehen sich auf eine Sequenz, die unter der folgenden Adresse abgelegt ist: ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/imgt/mhc/hla/DQB1_nuc.msf. Die unterstrichenen Sequenzabschnitte markieren die innerhalb der Oligonukleotide rekombinant eingefügten Schnittstellen für Restriktionsenzyme, die später zur Restriktion der Fragmente aus den, bzw. zur Klonierung der Fragmente in die entsprechenden Vektoren verwendet wurden. In unmittelbarer Nachbarschaft befinden sich in 5'-Orientierung sog. "Stuffer"-Sequenzen, die die Restriktion der Fragmente erleichtern.

2.8.15 Sequenzanalysen

Die Sequenzen beider solitärer LTRs wurden mit Hilfe des Programms MatInspector (Quandt et al. 1995) auf die Anwesenheit von Glucocorticoid- (GRE) und Östrogenresponsiven Elementen (ERE) hin untersucht, um auf dieser Basis eine mögliche geschlechtsspezifisch induzierbare Funktion der LTRs zu analysieren. Hormon-responsive Elemente (HREs) sind typischerweise aus zwei palindromisch angeordneten Hälften mit einer Kernsequenz aufgebaut. Das Programm MatInspector unterscheidet zwischen der Kernsequenz und der nicht-Kernsequenz. Während ein Nukleotidaustausch in der Kernsequenz sehr bedeutsam für die Funktionalität des HRE sein kann, führt ein Austausch in der die Kernsequenz umgebenden Region (Matrix) nicht zwangsläufig zu einer funktionellen Veränderung. Zur Charakterisierung der LTRs im Hinblick auf mögliche HREs wurde eine Kernsequenz-Homologie von 75% und eine Matrix-Homologie von 85% als Standard eingesetzt.

Die Sequenzvergleiche zwischen der proviralen LTR aus HERV-K(C7) (GenBank #Y17832) und den beiden solitären LTRs *DQ-LTR3* und *DQ-LTR13* wurden mit dem Programm DNASIS (Hitachi) durchgeführt. Ziel dieses Vergleichs war die Dokumentation von Unterschieden innerhalb möglicher funktioneller regulatorischer Sequenzabschnitte.

2.8.16 Sondenherstellung

Zur Detektion radioaktiv markierter mRNA-Transkripte des *DQBI* Gens unterschiedlicher Haplotypen wurden unmarkierte einzelsträngige DNA-Sonden eingesetzt. Dazu wurden Bereiche aus Exon 3 des entsprechenden Gens via PCR mittels sequenzspezifischer Primer

amplifiziert (siehe Tab. 2.2) und anschließend in den Vektor pGEM-T-Easy (Promega) kloniert. Als Positivkontrollen wurden das Plasmid p91BE1.2 (500 bp Fragment aus dem Enten Histon H4-Gen in pSP64) (Tönjes et al. 1989) und das Plasmid p-tMet (Tönjes et al. 1992) verwendet. Als Negativkontrolle diente der Vektor pGEM-T-Easy ohne inseriertes Fragment. Alle so hergestellten Sonden wurden vor ihrer Verwendung im Northern Blot (siehe 2.8.19) getestet. Während ihr Einsatz im Nuclear Run-On Assay in unmarkierter Form erfolgte, wurden sie für die Verwendung bei der Hybridisierung des Northern Blots radioaktiv markiert (siehe 2.8.16).

2.8.17 Sondenmarkierung

Die radioaktive Markierung der als Sonden einzusetzenden DNA Fragmente erfolgte mit dem Megaprime DNA Labelling Kit (Amersham). 5-50 ng DNA wurden in Gegenwart von 5 μ l eines randomisierten Hexanukleotidgemisches sowie 10 μ l eines 5x Puffers denaturiert (5 min, 100°C) und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 U Klenow-Fragment und 5 μ l α -³²P-dCTP (50 μ Ci \cong 1,85 mBq) wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l EDTA gestoppt. Nicht inkorporierte Radionukleotide wurden im Anschluß über Sephadex G50 Säulen (Pharmacia) fraktioniert. Die spezifische Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde im Szintillationszähler (Cerenkov-Messung; Einheit: counts per min (cpm)) bestimmt.

2.8.18 Nuclear Run-On Transkription

Bei der Nuclear Run-On Transkription werden nur RNA-Moleküle elongiert und radioaktiv markiert, deren Transkription im Zellkern zum Zeitpunkt des Zellaufschlusses bereits initiiert war. Die verwendete Methode wurde in Anlehnung an Tönjes et al. (1992) modifiziert. 5×10^6 - 5×10^7 Zellkerne (Isolation siehe 2.8.2.2) wurden dazu mit 30 μ l 5x Run-On-Puffer (25 mM Tris-HCl [pH 8,0], 12,5 mM MgCl₂, 750 mM KCl, jeweils 1,25 mM ATP, GTP und CTP (alle Boehringer Mannheim), 100 μ Ci α -³²P-UTP (Amersham)) und 0,06% Sarkosyl (N-Lauroylsarkosin; Serva) versetzt und für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 5 μ l DNaseI (30 U/ μ l, Roche) zugegeben und die Inkubation für 15 min fortgesetzt. Die Isolierung der RNA erfolgte mittels einer Trizol-Chloroform-Extraktion (Chomczynski und Sacchi 1987) gefolgt von einer Isopropanol-Fällung. Die Inkorporation von ³²P wurde vor Einsatz der RNA für die Hybridisierung mittels Cerenkov-Messung (siehe 2.8.17) kontrolliert.

2.8.19 Kapillarblotting nach Northern

Parallel zur Bestimmung der Menge an gebildeter RNA mittels Nuclear Run-On wurde zur Bestimmung des "steady-state-levels" der RNA-Konzentration im Cytoplasma ein Northern Blot (Alwine et al. 1977) herangezogen. Hierfür wurden 20 µg RNA mit 8 µl DMSO-Mix (1750 µl DMSO (Sigma), 70 µl 0,5 M NaPO₄ [pH 7,0], 35 µl 20% SDS, 150 µl H₂O) und 1,25 µl Glyoxal (Serva, 40%ig in H₂O, deionisiert) für 1 h bei 50°C glyoxiliert und anschließend auf Eis gestellt.

In der nachfolgenden Gelelektrophorese wurden die Proben mit 4 µl 5x Sample Buffer (10 mM NaPO₄ [pH 6,8], 10% Ficoll, 0,4% Bromphenolblau) versetzt und auf einem 1,0-1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Der Transfer der RNA Banden aus dem Gel erfolgte über Nacht in 20x SSC mittels eines Kapillarstroms auf eine amphoterische Nylonmembran (Porablot NY amp; Macherey-Nagel). Der Blot wurde gemäß Sambrook *et al.* (Sambrook et al. 1989) aufgebaut. Im Anschluß an den Transfer wurde die Membran gewaschen (6x SSC, 5 min). Durch UV-Bestrahlung (UV Stratalinker 1800, Stratagene) wurde die RNA dann kovalent an die Membran gebunden und zur endgültigen Fixierung für 1-2 h bei 80°C gebacken. Die Membran wurde direkt für Hybridisierungen eingesetzt.

2.8.20 Hybridisierung

Die Identifizierung und Quantifizierung der spezifischen RNA im Gesamt-RNA-Isolat erfolgte im Anschluß an die Nuclear Run-On Transkription (siehe 2.8.18) mit Hilfe eines reversen Dot-Blot-Verfahrens. Dazu wurde eine zur gesuchten RNA komplementäre DNA-Sonde mit Hilfe einer Dot-Blot-Apparatur (Minifold II; Schleicher&Schuell) auf einen Membranfilter aus Cellulosenitrat (Schleicher&Schuell) aufgetragen, durch Backen für 2h bei 80°C unter Vakuum immobilisiert und anschließend mit der aus der Nuclear Run-On Transkription isolierten, radioaktiv markierten RNA hybridisiert (Tönjes et al. 1992). Um eine korrekte Mengenbestimmung der elongierten Transkripte zu gewährleisten, mußte die Hybridisierung quantitativ ablaufen, und daher die Sonden-DNA (etwa 6 µg Plasmid) in hohem molaren Überschuß eingesetzt werden.

Nach Prähybridisierung der Membran (2 h, 65°C, 2x Denhardt, 10% Polyethylenglykol (PEG), 1,4 M NaCl, 325 µg/ml Hefe tRNA, 100 µg/ml Heringssperma-DNA) und einem Präinkubationsschritt (10 min, 500U RNAsin (Promega) 40 mM Dithiothreitol) wurde die radioaktiv markierte RNA zugegeben (etwa 3x10⁶ counts/min) und für 16-42 hybridisiert.

Nach dieser Reaktion erfolgten mehrere Waschstschritte, um die überschüssige RNA zu entfernen (2x SSC/0,1%SDS, 30 min, 65°C; 1x SSC/0,1% SDS, 30 min, 65°C; 0,5x SSC/0,1%SDS, 30 min, 65°C; 0,5x SSC/0,1%SDS, 10 µg/ml RNaseA, 15 min, 37°C; 0,5x SSC/0,1%SDS, 15 min, RT).

Die Identifizierung und Quantifizierung der RNA im Rahmen des Northern Blots (siehe 2.8.19) erfolgte in einem abweichenden Verfahren. Vor der eigentlichen Reaktion der immobilisierten RNA mit den radioaktiv markierten Sonden (siehe 2.8.17) wurden die Membranen prähybridisiert (6x SSC, 2x Denhardt's Reagenz [50x enthält 5 g Ficoll, 5 g Polyvinylpyrrolidon, 5 g BSA, H₂O ad 500 ml; Gebrauchslösung wird 1:10 in 6x SSC verdünnt], 0,1% SDS, 1-2 h, 68°C). Anschließend wurden die radioaktiv markierten Sonden zugegeben und die Inkubation für 16-24 h fortgesetzt. Es folgten mehrere Waschstschritte (1x SSC, 0,1% SDS, 20 min, RT und 0,2x SSC, 0,1% SDS, 3 x 20 min, 68°C).

Zum Abschluß beider Hybridisierungsverfahren wurden die Membranen in Folie eingeschweißt und die Hybridisierungssignale durch Autoradiographie für 24-72 h bei -80°C detektiert.

3. Ergebnisse

3.1 Familienanalyse und statistische Bewertung der Assoziation von *DQ-LTR13* mit dem Risiko einer Erkrankung an Typ 1 Diabetes mellitus

3.1.1 Kombinierte Transmission von *DQ-LTR13* mit ausgewählten *DQ*-Haplotypen

Zur Betrachtung der Segregation von *DQ-LTR13* mit unterschiedlichen *DQ* Haplotypen wurden alle Proben für die Merkmale *DQA1*, *DQB1* und *DQ-LTR13* genotypisiert. Die Ergebnisse einer Typisierung für *DQ-LTR13* sind in Abb. 3.1 dargestellt. Die unterschiedlichen Fragmentgrößen sind auf die Verwendung unterschiedlicher PCR-Primer zurückzuführen (siehe 2.8.12.2).

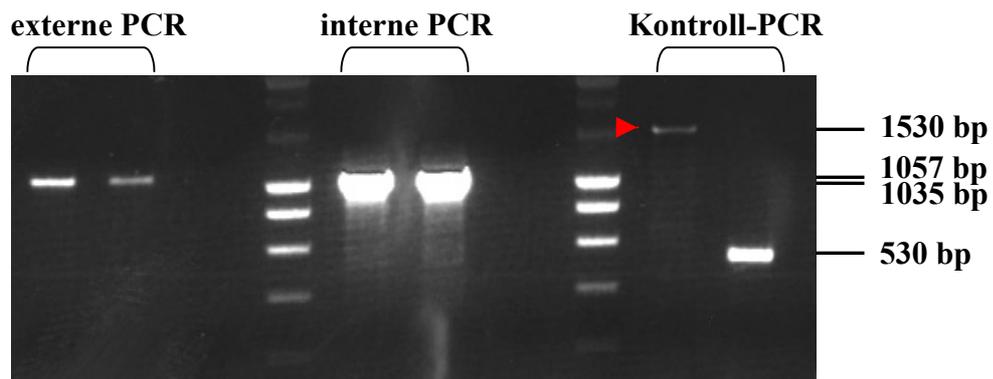


Abb. 3.1 Typisierungsergebnisse für *DQ-LTR13*. Dargestellt sind die Fragmentgrößen nach externer, interner und Kontroll-PCR. Die externe PCR ergab im positiven Fall ein Fragment von 1057 bp, im negativen ein Fragment von 51 bp (hier nicht gezeigt und in den meisten Fällen auch nicht zu sehen). Die interne PCR, für die das Produkt der externen PCR in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt wurde, zeigte ein Fragment der Größe 1035 bp für den *DQ-LTR13*-positiven Fall, kein Fragment für den -negativen Fall. Die zusätzlich durchgeführte Kontroll-PCR unterschied zwischen den Fragmentgrößen 1530 bp (positiv) und 530 bp (negativ). Die Fragmente wurden in einem 2%igen, mit SYBR Green® gefärbten Agarosegel aufgetrennt. Der verwendete Längenstandard ist die Smart Ladder (Eurogentec).

Für die statistische Bewertung der signifikanten Vererbung von *DQ-LTR13* zusammen mit den IDDM Risikohaplotypen *DQ8* (*DQA1**03 *DQB1**0302) und *DQ2* (*DQA1**0501 *DQB1**0201) wurden insgesamt 284 Familien analysiert, die jeweils ein an Typ 1 Diabetes mellitus erkranktes Kind enthielten. Diese Zahl setzt sich zusammen aus 203 deutschen und 81 belgischen Familien. Für die Analyse wurden alle nicht-*DQ2* und nicht-*DQ8* Haplotypen in einer Gruppe zusammengefasst. Für jeden Haplotyp wurde darüber hinaus

zwischen *DQ-LTR13*-positiv und -negativ unterschieden, so daß insgesamt sechs Haplotypen untersucht wurden. Durch einen ETDT wurde gezeigt, daß im Hinblick auf die untersuchten Haplotypen kein signifikanter Unterschied zwischen dem deutschen und dem belgischen Kollektiv bestand ($\chi^2 = 6,0468$; $df = 5$, $p = 0,3017$). Beide Populationen konnten deshalb, wie in Tab. 3.1 gezeigt, sowohl getrennt voneinander als auch als gemeinsames Kollektiv betrachtet werden.

Die Analyse der Familien, die sowohl für *DQ-LTR13* als auch für *DQ-LTR3* typisiert worden waren, ergab für die beiden LTRs ein Kopplungsungleichgewicht von 0,1329 bei einer Standardabweichung von $\pm 0,0125$.

Tab. 3.1 zeigt die Ergebnisse zur Untersuchung der kombinierten Transmission ausgewählter *DQA1/DQB1* Haplotypen zusammen mit *DQ-LTR13*. Das Ergebnis des o.a. ETDT bestätigte sich bei dieser Untersuchung. Aufgrund der sehr viel kleineren Fallzahl war die Signifikanz der Ergebnisse zwar im belgischen, verglichen mit dem deutschen Kollektiv, weniger stark ausgeprägt, die Tendenz war jedoch eindeutig zu erkennen und so wurden für die statistische Auswertung beide Populationen als ein gemeinsames Kollektiv betrachtet. Die kombinierten Haplotypen *DQ8/LTR13*⁺ ($p^{\text{TDT}} = 1,67 \times 10^{-14}$) und *DQ2/LTR13*⁻ ($p^{\text{TDT}} = 1,03 \times 10^{-7}$) wurden signifikant häufiger an die erkrankten Nachkommen weitergegeben als bei einer zufälligen Vererbung zu erwarten wäre (siehe Tab 3.1). Im Gegensatz dazu wurde für die Kombinationen *DQ8/LTR13*⁻ und *DQ2/LTR13*⁺ keine bevorzugte Transmission nachgewiesen.

Zusätzlich wurde mit Hilfe eines χ^2 -Tests innerhalb der beiden Subgruppen *DQ8* und *DQ2* zwischen An- bzw. Abwesenheit von *DQ-LTR13* unterschieden (Tab. 3.1). Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Transmission von *DQ8/LTR13*⁺ mit *DQ8/LTR13*⁻ Haplotypen. Von insgesamt 167 untersuchten *DQ8/LTR13*⁺ Haplotypen wurden 139 transmittiert, während von 37 *DQ8/LTR13*⁻ Haplotypen nur 20 an das erkrankte Kind weitergegeben wurden. Die Signifikanz dieses Ergebnisses spiegelte sich in einem p-Wert von $p^{\chi^2} = 2,58 \times 10^{-4}$ wieder. Ein ähnlicher Unterschied, wenn auch weniger signifikant, wurde bei der bevorzugten Transmission von *DQ2* in Abwesenheit von *DQ-LTR13* im Vergleich zur Transmission in Anwesenheit von *DQ-LTR13* beobachtet ($p^{\chi^2} = 0,01$) (Tab. 3.1). Alle anderen Haplotypen (nicht-*DQ2*/nicht-*DQ8*) wurden zwar signifikant häufiger nicht transmittiert (52 Haplotypen von insgesamt 73 bzw. 238 Haplotypen von insgesamt 306) (Tab. 3.1), insgesamt bestand jedoch in der Transmissionshäufigkeit beider Gruppen in Abhängigkeit von *DQ-LTR13* kein signifikanter Unterschied ($p^{\chi^2} = 0,30$).

Tab. 3.1 Kombinierte Transmission von *DQ-LTR13* mit ausgewählten *DQA1/DQB1* Haplotypen in Familien mit einem an Typ 1 Diabetes mellitus erkrankten Kind. (t = transmittierte Haplotypen; nt = nicht transmittierte Haplotypen; *DQ2* = *DQA1*0501 DQB1*0201*; *DQ8* = *DQA1*03 DQB1*0302*)

LTR13	DQB1	DQA1	deutsches Kollektiv				belgisches Kollektiv				gesamtes Kollektiv			
			t n=289	nt n=289	p-Wert TDT	p-Wert χ^2	t n=110	nt n=110	p-Wert TDT	p-Wert χ^2	t n=399	nt n=399	p-Wert TDT	p-Wert χ^2
LTR13	0302	03	99	16	1.27x10⁻¹¹	7.9x10⁻⁵	40	12	0.01	0.68	139	28	1.67x10⁻¹⁴	2.58x10⁻⁴
	0302	03	14	14	1.00		6	3	0.96		20	17	1.00	
LTR13	0201	0501	3	7	0.90	0.01	1	1	1.00	0.38	4	8	0.93	0.01
	0201	0501	106	46	2.50x10⁻⁴		41	10	2.06x10⁻³		147	56	1.03x10⁻⁷	
LTR13	nicht DQ2 / nicht DQ8		17	37	0.19	0.25	4	15	0.27	1.00	21	52	0.02	0.30
	nicht DQ2/ nicht DQ8		50	169	1.32x10⁻¹²		18	69	1.55x10⁻⁵		68	238	7.82x10⁻¹⁹	

3.1.2 Kombinierte Transmission von *DQ-LTR13* mit *DRB1*0401* und *DQ8*

Eine mögliche Abhängigkeit der bisher gewonnenen Ergebnisse vom *DRB1*-Haplotyp wurde in einer zusätzlichen Untersuchung geprüft. Dazu wurden 216 der untersuchten Probanden für das Merkmal *DRB1*0401* genotypisiert. Das Ergebnis dieser Typisierung ist in Tab. 3.2 dargestellt. Für den Haplotypen *DRB1*0401-DQ8/LTR13⁺* wurde eine signifikant erhöhte Transmission beobachtet (83 von insgesamt 98) im Vergleich zu *DRB1*0401-DQ8/LTR13⁻* (6 von insgesamt 11). Der Vergleich der Transmission der beiden Haplotypen ergab damit einen signifikanten p-Wert von $p^{\chi^2} = 0,02$ (siehe Tab. 3.2). Trotz der geringen Fallzahlen wurde für alle nicht-*DRB1*0401-DQ8*-Haplotypen eine ähnliche Tendenz beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Tab. 3.2 Kombinierte Transmission von *DQ-LTR13* mit *DRB1*0401* und *DQ8* nach Subtypisierung von 216 Kind-Eltern-Trios für das Merkmal *DRB1*0401* Positivität/Negativität (t = transmittierte Haplotypen; nt= nicht transmittierte Haplotypen)

LTR13	DQB1	DQA1	DRB1	t	nt	p-Wert χ^2
LTR13	0302	03	0401	83	13	0.02
	0302	03	0401	6	5	

3.1.3 Kalkulation des PPV, NPV und RR

Das durch die Anwesenheit von *DQ-LTR13* vermittelte Risiko einer IDDM-Erkrankung wird unter anderem durch statistische Größen wie "positive predictive value" (PPV), "negative predictive value" (NPV) und das relative Risiko (RR) beschrieben, deren Kalkulation in den Abschnitten 2.2.5 bis 2.2.7 beschrieben und in Tab. 3.3 gezeigt ist.

Tab. 3.3 Kalkulation des "positive predictive value" (PPV), "negative predictive value" (NPV) und relativen Risikos (RR) mit Angabe des 95% Konfidenzintervalls (CI) für die Transmission ausgewählter *HLA DQ* und *DQ-LTR13* Haplotypen. (t = transmittierte Haplotypen; nt = nicht transmittierte Haplotypen; *DQ2* = DQA1*0501 DQB1*0201; *DQ8* = DQA1*03 DQB1*0302)

LTR13	DQB1	DQA1	t n=399	nt n=399	homozygote Eltern	PPV	NPV	Relatives Risiko	
								RR	95% CI (RR)
LTR13	0302	03	139	28	13	0.79	0.44	1.81	1.59-2.06
	0302	03	20	17	1	0.54	0.62	0.87	0.66-1.13
LTR13	0201	0501	4	8	0	0.33	0.50	0.66	0.33-1.33
	0201	0501	147	56	24	0.68	0.44	1.54	1.35-1.75
LTR13	nicht DQ2/ nicht DQ8		21	52	0	0.29	0.52	0.56	0.41-0.76
	nicht DQ2/ nicht DQ8		68	238	87	0.32	0.65	0.50	0.44-0.57

Durch die Berechnungen konnte ein erhöhtes PPV für die Haplotypen $DQ8/LTR13^+$ (PPV = 0,79) und $DQ2/LTR13^-$ (PPV = 0,68) gezeigt werden. Das relative Risiko einer IDDM Erkrankung, das durch diese beiden Haplotypen vermittelt wird, konnte für $DQ8/LTR13^+$ mit 1,81 (95%-CI = 1,59-2,06) und für $DQ2/LTR13^-$ mit 1,54 (95%-CI = 1,35-1,75) kalkuliert werden. Die Suszeptibilität für eine Erkrankung an Typ 1 Diabetes mellitus wird demnach durch die An- bzw. Abwesenheit von $DQ-LTR13$, zusätzlich zu der durch die Risikohaplotypen $DQ8$ und $DQ2$ vermittelten Prädisposition, erhöht.

3.1.4 Maternale und paternale Transmission von $DQ-LTR13$ zu männlichen und weiblichen Nachkommen der Risikohaplotypen $DQ2$ und $DQ8$

Eine mögliche geschlechtsspezifische Vererbung von $DQ-LTR13$ wurde für die ausgewählten Haplotypen $DQ8$ und $DQ2$ untersucht, indem die Transmission von $DQ-LTR13$, ausgehend von beiden Elternteilen, zwischen Mutter und Vater verglichen wurde. Dabei wurde zusätzlich differenziert, ob sich die Transmission zu männlichen von der zu weiblichen Nachkommen unterscheidet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Der dazu verwendete TDT bestätigte zwar die bevorzugte Transmission von $DQ8/LTR13^+$ und $DQ2/LTR13^-$ Haplotypen (siehe p^{TDT} -Werte in Tab. 3.4), es konnte jedoch für $DQ2$, unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von $DQ-LTR13$, kein signifikanter Unterschied zwischen maternaler und paternaler Vererbung, weder zu männlichen noch zu weiblichen Nachkommen, nachgewiesen werden (siehe p^{χ^2} -Werte in Tab. 3.4). Allerdings wurde der $DQ8/LTR13^-$ Haplotyp signifikant häufiger von der Mutter ($p^{\chi^2} = 0,01$) und an die weiblichen Nachkommen ($p^{\chi^2} = 0,04$) weitergegeben.

Tab. 3.4 Maternale und paternale Transmission von *DQ-LTR13* zu männlichen und weiblichen Nachkommen mit Typ 1 Diabetes mellitus. Ausgewählt wurden für diese Analyse nur die Familien, in denen die Risiko-Haplotypen *DQ8* und *DQ2* vertreten waren. (t = transmittierte Haplotypen; nt = nicht transmittierte Haplotypen; *DQ2* = DQA1*0501 DQB1*0201; *DQ8* = DQA1*03 DQB1*0302)

DQ8	LTR13+				LTR13-			
	t	nt	p-Wert TDT	p-Wert χ^2	t	nt	p-Wert TDT	p-Wert χ^2
männlich	65	16	5.20×10^{-8}		4	10	0.11	
weiblich	74	12	2.30×10^{-11}	0.43	16	7	0.06	0.04
maternal	81	11	2.92×10^{-13}		14	4	0.02	
paternal	58	17	2.20×10^{-6}	0.10	6	13	0.11	0.01
DQ2	t	nt	p-Wert TDT	p-Wert χ^2	t	nt	p-Wert TDT	p-Wert χ^2
männlich	2	0	0.16		78	29	2.17×10^{-6}	
weiblich	2	8	0.06	0.09	69	27	1.81×10^{-5}	1.00
maternal	3	4	0.71		73	24	6.52×10^{-7}	
paternal	1	4	0.18	0.58	74	32	4.52×10^{-5}	0.48

3.2 Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der solitären LTRs *DQ-LTR3* und *DQ-LTR13*

3.2.1 Sequenzanalyse der beiden solitären LTRs im Vergleich zur proviralen LTR aus HERV-K(C7)

Zur Untersuchung der Sequenzvariabilität der beiden solitären LTRs *DQ-LTR3* und *DQ-LTR13* untereinander und im Vergleich zu einer proviralen LTR aus HERV-K(C7), von der bekannt ist, daß sie in der humanen Teratokarzinomzelllinie GH aktiv ist (Löwer et al. 1995; Tönjes et al. 1997; Tönjes et al. 1999), wurde ein Sequenzabgleich mit Hilfe des Programms DNAsis (Hitachi) durchgeführt, der in Abb. 3.1 gezeigt ist.

```

1
C7-LTR 1 TGTGGGAAAAGCAAGAGAGA---TCAGATTGTTACTGTGTCTGTGTAGAAAGAAGTAGACATAG-----AGACTCCATTTTGT 85
DQ-LTR3 1 TGTGGGAAAAGCAAGAGAGA---TCAGATTGTTACTGTGTCTGTGTAGAAAGAAGTAGACATAG-----AGACTCCATTTTGT 85
DQ-LTR13 1 TGTAGGGGCCAGCCCTACAGGGTCTGTGGGTCTTTCCCTGTGTGCGGAGACGAGGGATCGTAGAAATAAGACACAAGACAAA
86 Enhancer poly A site 170
TATGTACTAAGAATAAATTCTTCTGCCTTGAGATTCTGTTAATCTATGACCT-----TACCCCCAACCCCGTCTCTGAAACA
TATGTACTAAGAATAAATTCTTCTGCCTTGAGATTCTGTTAATCTATAACCT-----TACCCCCAACCCCGTCTCTGAAACA
GAGATAGAAGAAAAGACAGCTGGGCCCGGGGACCCTACCACCAAGAGGCGGAGACTGTTAGTGGCCCCGAATGCCAGGCTGCC
171 GRE** 255
-TGTGCTGTGTCCACTCAGGTTAAATGGATTAAG--GGCGGTGCAGGATGTGCTTTGTTAAACAGATGCTGAAGGCAGCATGC
-TGTGCTGTGTCCACTCAGGTTAAATGGATTAAG--GGCGGTGCAGGATGTGCTTTGTTAAACAGATGCTGAAGGCAGCATGC
CTATTATATATTGGATACAAGACAAGGGGCGAGGTAAGGAGTGTGAGCCATCTCCAATGATAGTTAAGGTCACGTTGGGTCATGT
ERE revers** 340
256
TCCTTAAGAGTCATCACCCTCCCTAATCTCAAGTACCCAGGGACACAAAACTGCGGAAGGC---CGCAGGGACTTCTGCCTAG
TCCTTAAGAGTCATCACCCTCCCTAATCTCAAGTACCCAGGGACACAAAACTGCGGAAGGC---CGCAGGGACTTCTGCCTAG
GTCCACTGGACAGGGGCCCTTCCCTGTCT-AGCAGCCGAGGCGGAGAGAGAGAGAGAGACAGCTTACGTTCTTATTCTGCATTT
341 425
GAAAGCCAGGTATTGTCCAACGTTTCTCCCATGTGATAGCTGAAA-TATGGCCTCGTGGGAAGGGAAAGACCTGACCGTCCCC
GAAAGCCAGGTATTGTCCAACGTTTCTCCCATGTGATAGCTGAAA-TATGGCCTCGTGGGAAGGGAAAGACCTGACCAATCCCC
CAGAGACTTTTAGTACTTTCACTAATCTGCTACTGCTATCTAGAAGGCAGAGCCAGGTGTACAGGGTGGAAACATGAAAGCGGAC
426 510
CAGCCCGACACCCGTAAAGGGTCTGTGCTGAGGAGGATTAGTAAAAGAGGAAGGAATGCCTCTTCAGTTGAGACAAGAGGAAGG
CAGCCCGACACCCGTAAAGGGTCTGTGCTGAGGAGGATTAGTAAAAGAGGAAGGAATGCCTCTTCAGTTGAGACAAGAGGAAGG
CAGGAACGTGACCGCTGAAGCACAGCATCACAGGGAGACTGTTAG-GCCTCCGATAACGGCGGGCGGCCCTGACTGATGTCAGG
511 TATA box 595
CATCTGTCTCCTGCCTGTCCCTGGGCAATGGAATGTCTCGTATAAAACCCGATTGTATG-CTCCATCTACTGAGATAGGGAAAA
CATCTGTCTCCTGCCTGTCCCTGGGCAATGGAATGTCTCGTATAAAACCCGATTGTATG-CTCCATCTACTGAGATAGGGAAAA
CCC---TCCACAAGAGGTGGTGGAGCAGAGGCTTCTCTAACTCCCCCGGGAAAGGGAGACTCCCTTTCCCGGTCTGCTAAGTA
596 680
ACCGCC-TTAGGGCTGGAGGTGGGACCTGCGGGCAGCAATACTGCTTTGTAAAGCATTGAGATGTTTATGTTGATGCATATCTAA
ACTGCC-TTAGGGCTGGAGGTGGGACCTGCGGGCAGCAATACTGCTTTGTAAAGCATTGAGATGTTTATGTTGATGCATATCTAA
ACGGGTGCTTTTTCTAGGTACTGATGCTACCGCTAG-ACCAAGTCCGCTAGGCAACGGGCGTCTTCCAGGTGCTGGCGT-TAC
681 SV40 Enhancer 765
AAGCACAGCACTTAATCCCTTACATTGTCTATGATGCAAGACCTTTGTTCACATGTTTGTCTGCTGACCCCTCTCCCCACAATTG
AAGCACAGCACTTAATCCCTTACATTGTCTATGATGCAAGACCTTTGTTCACATGTTTGTCTGCTGACCCCTCTCCCCACAATTG
CGCTAGACCAAGTAGCCCTCTA-GTGGCCCTGTCTGGGCATCACAGAAGGCTCACACTTGTCTTCTGGTCACTTCTCACCATATC
766 ERE** poly A site ERE revers** 850
TCTGTGACCCCTGAC-----ACATCCCCCTCTTCGAGAAACACCCACAGATGATCAGTAAATATAAGGGAACTCAGAGGCTGGC
TCTGTGACCCCTGAC-----ACATCCCCCTCTTCGAGAAACACCCACAAATGATCAATAAATACTAAGGGAACTCAGAGGCTGGC
CCTTCAGCTCCTATCTCTGTATGGCTGGTTTTTCTAGATTATGATTGTAGAGCGAAGATTATTATAATATTGGAATGAAGAGT
851 poly A site 935
GGGATCCTCCGATGCTGAACGCTGGTCCCGGGTCCCTTCTTTCTTCTCTATACTTTGTCTCTGTGCTTTTCTTTTCCCA
GGGATCCTCCGATGCTGAACGCTGGTCCCGGGTCCCTTCTTTCTTCTCTATACTTTGTCTCTGTGCTTTTCTTTTCTTCTA
AATTGCTACAACTAATGATTAATGATATTCATATATAATCATATATATGATCTATATCTAGTATAACTATTCTTATTTTATATA
936 1007
AATCTCTCGTCCACCTTACGAGAAACACCCACAGGTGTGTAGGGGCAACCCACCCCTACA-----
AGTCTCTCGTCCACCTTACGAGAAACACCCACAGGTGTGTAGGGGCAACCCACCCCTACA-----
TTTTCTTTATTATACTGGAACAGCTCGTCCCTCGGTCTGTTGCCCTCAGCACCTGGGTGGCTTGTGCCCA

```

Abb. 3.1 Sequenzvergleich der solitären LTRs DQ-LTR3 und DQ-LTR13 mit einer proviralen LTR aus HERV-K(C7). Dargestellt ist der direkte Vergleich der proviralen LTR mit *DQ-LTR3*. Einzelne Punktmutationen sind grau unterlegt. Im Gegensatz dazu weist die *DQ-LTR13* eine davon stark abweichende Sequenz auf, was kein direktes "Alignment" zulässt. ■ markiert die U3-Region, ■ die R-Region und ■ die U5-Region der proviralen LTR und *DQ-LTR3*. Für *DQ-LTR13* ist eine solche Abgrenzung der Regionen nicht eindeutig. Sie enthält jedoch ein 53-bp Tandem-Repeat (→), eine AT-reiche Region (→), welche TATA-Box-ähnliche Elemente enthält und eine GC-reiche Region (→). Weitere wichtige Elemente wie poly A site, Enhancer und TATA box sind in der jeweiligen Sequenz markiert. GRE: Glucocorticoid-responsives Element; * nach Ono et al. (1986), ** nach Quandt et al. (1995); ERE: Estradiol-responsives Element nach Quandt et al. (1995).

Anhand dieses Sequenzabgleichs wird deutlich, daß sich *DQ-LTR3* nur durch einzelne Punktmutationen von der proviralen LTR unterscheidet und somit der Familie HERV-K zuzuordnen ist. Ihre Aufteilung in U3-, R- und U5-Region ist eindeutig definiert. *DQ-LTR13* weist im Gegensatz dazu eine von beiden LTRs stark abweichende Sequenz auf (nur etwa 37% Sequenzhomologie), ähnelt ihnen jedoch in ihrer grundsätzlichen Struktur: sie besitzt ebenfalls einen putativen Promotor, repräsentiert durch eine AT-reiche Region, die TATA-Box ähnliche Elemente enthält, ein Polyadenylierungssignal und Enhancer-Sequenzen, die in Abb. 3.1 markiert sind. Bisher konnte *DQ-LTR13* zwar keiner bekannten Familie der humanen endogenen Retroviren eindeutig zugeordnet werden, sie besitzt jedoch Sequenzhomologien zu HML-4 bzw. HERV-K T47D (persönliche Mitteilung von Prof. J. Blomberg, Universität Uppsala).

3.2.2 Funktionalität putativer Hormon-responsive Elemente innerhalb der solitären LTRs

Mit Hilfe des Programms MatInspector (Quandt et al. 1995) wurden alle LTRs zusätzlich auf die Anwesenheit Hormon-responsiver Elemente untersucht. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 3.1 gezeigt. Es wurden sowohl Glucocorticoid-responsive Elemente (GREs) als auch Estrogen-responsive Elemente (EREs) nachgewiesen, die in den LTR-Sequenzen markiert und bezeichnet sind. *DQ-LTR3* besitzt demnach wie die provirale LTR sowohl putative GREs als auch EREs, während *DQ-LTR13* lediglich EREs aufweist. Die mit Hilfe des verwendeten Programms gewonnenen Ergebnisse gaben jedoch nur eine statistische Wahrscheinlichkeit für die Funktionalität dieser Elemente an. Dabei wurde zwischen der Ähnlichkeit in der Kernsequenz des responsiven Elements und der in der umgebenden Sequenz differenziert. Erstere lag bei etwa 85%, letztere bei 75%. Die tatsächliche Funktionalität dieser Elemente wurde im Dual Luciferase Reporter Assay System (siehe 2.7 und 3.2.3) überprüft.

3.2.3 Charakterisierung potentieller Promotoreigenschaften der solitären LTRs *DQ-LTR3* und *DQ-LTR13* unter Verwendung des Dual Luciferase Reporter Assay Systems

Zur Charakterisierung möglicher Promotoreigenschaften der beiden solitären LTRs wurde das Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) verwendet. Zur Transfektion

unterschiedlicher Zelllinien wurden die beiden solitären LTRs sowie die provirale LTR aus HERV-K(C7), die als Positivkontrolle in GH-Zellen eingesetzt wurde (Tönjes et al. 1999), in den promotorlosen Reporter-genvektor pGL3-Basic stromaufwärts vom Luciferase Gen kloniert. Dabei wurde zusätzlich die natürliche, reverse Orientierung von *DQ-LTR3* berücksichtigt. 48 h nach Transfektion wurde die Luciferaseaktivität gemessen. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.5 dargestellt.

Tab. 3.5 Promotoraktivität der proviralen und solitären LTRs in unterschiedlichen Zelllinien. Die Promotoraktivität der LTRs wurde mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) bestimmt. Der promotorlose Vektor pGL3-Basic (Promega), in den die LTRs in unterschiedlichen transkriptionellen Orientierungen stromaufwärts vom Reporter-gen einkloniert wurden, diente zur transienten Transfektion der humanen Teratokarzinom Zelllinie GH, der T-Zelllinien A3.01, Jurkat und HUT78 sowie verschiedener B-lymphoblastoider Zelllinien. Die Ergebnisse wurden mit dem co-transfizierten Plasmid pRL-CMV (Promega) standardisiert. Die Luciferaseaktivität des promotorlosen Reporter-plasmids pGL3-Basic wurde gleich 1.0 gesetzt und die Ergebnisse als Vielfaches dieses Wertes angegeben. Alle Transfektionen wurden in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt, in denen jeweils Triplikate der entsprechenden Plasmide verwendet wurden. (RLU: "relative light units"; SD: "standard deviation").

Zelllinie	HERV-K(C7)-LTR		DQ-LTR3		DQ-LTR13		HERV-K(C7)-LTR revers		DQ-LTR3 revers	
	RLU	SD	RLU	SD	RLU	SD	RLU	SD	RLU	SD
GH	239	7.78	206	17.7	0.57	0.13	229	1.41	178	0.71
A3.01	0.69	0.10	0.53	0.01	1.56	0.25	5.41	1.37	6.14	1.76
Jurkat	0.23	0.16	0.52	0.38	0.44	0.28	0.58	0.06	1.35	0.26
HUT78	0.34	0.12	0.33	0.06	0.33	0.06	0.31	0.01	0.41	0.04
Bai, NJ	1.07	0.26	0.95	0.11	1.35	0.07	1.55	0.02	0.95	0.08
Eva,SP	0.70	0.01	0.78	0.01	0.81	0.03	0.81	0.01	0.96	0.04
VAVY	0.59	0.21	0.53	0.18	0.57	0.23	0.48	0.12	0.43	0.07
BM16	1.41	0.16	1.86	0.04	0.97	0.11	0.79	0.04	0.97	0.01
BM21	1.11	0.16	1.16	0.18	0.66	0.04	1.02	0.03	1.23	0.12
Boleth	0.91	0.08	0.78	0.04	0.74	0.03	0.61	0.04	0.61	0.01
SAVC	0.87	0.08	0.90	0.01	1.15	0.10	0.92	0.03	0.77	0.03
JHAF	1.09	0.01	0.84	0.09	0.37	0.03	0.28	0.02	0.32	0.01

Von allen getesteten Zelllinien wurde nur in der Teratokarzinom Zelllinie GH, die als Positivkontrolle eingesetzt worden war (siehe rote Markierung Tab. 3.5), eine signifikante Promotoraktivität für die provirale LTR aus HERV-K(C7) (RLU=239) und die der gleichen Familie zugeordnete solitäre *DQ-LTR3* (RLU=206) detektiert. In beiden Fällen wurde damit die Aktivität des promotorlosen Vektors pGL3-Basic (RLU=1) um ein Vielfaches übertroffen. Diese Beobachtung war unabhängig von der relativen Orientierung

der LTRs, denn sie erlangten beide in der reversen Orientierung ähnliche Ergebnisse. In keiner der darüber hinaus untersuchten Zelllinien konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. In allen eingesetzten lymphoblastoiden B-Zelllinien wurde in den meisten Fällen sogar nur eine Aktivität gemessen, die der des promotorlosen Vektors pGL3-Basic (Negativkontrolle) entsprach.

Für *DQ-LTR13* konnte in keiner der untersuchten Zelllinien eine signifikante Promotoraktivität nachgewiesen werden.

3.2.4 Induzierbarkeit von *DQ-LTR3* und *DQ-LTR13* mit β -Estradiol und Hydrocortison

In weiteren Untersuchungen, in denen die Zellen nach Transfektion entweder mit Estradiol oder Hydrocortison behandelt wurden, wurde die Funktionalität der putativen Hormonresponsiven Elemente (siehe 3.2.2) überprüft und die mögliche Wirkung ausgewählter Hormone auf die Promotorstärke der LTRs analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 3.2 gezeigt. Mit Hilfe des Hormons β -Estradiol sollte eine mögliche geschlechtsspezifische Induzierbarkeit der beiden solitären LTRs untersucht werden. Die eingesetzten Hormonkonzentrationen orientierten sich an den Angaben des Herstellers. Die Effektivität der eingesetzten β -Estradiol-Konzentration wurde zu Beginn der Versuche in unterschiedlichen Zelllinien am pRL-CMV (Promega) getestet (Daten nicht gezeigt). Als Positivkontrolle für die Effektivität der eingesetzten Hydrocortison-Konzentration wurde die MMTV-LTR verwendet, von der bekannt ist, daß sie ein funktionales Glucocorticoid-responsives Element besitzt (Ringold 1985). Diese Funktionalität konnte jedoch nur in den Zelllinien A3.01 und Bai/NJ, nicht aber in GH-Zellen gezeigt werden. In dieser Teratokarzinom-Zelllinie erwies sich die MMTV-LTR als nicht-induzierbar oder aber die Zelllinie als nicht-suszeptibel für die Aufnahme von Glucocorticoid-Hormonen (Daten nicht gezeigt). Die Effektivität der eingesetzten Konzentration wurde deshalb mit Hilfe der anderen beiden Zelllinien verifiziert.

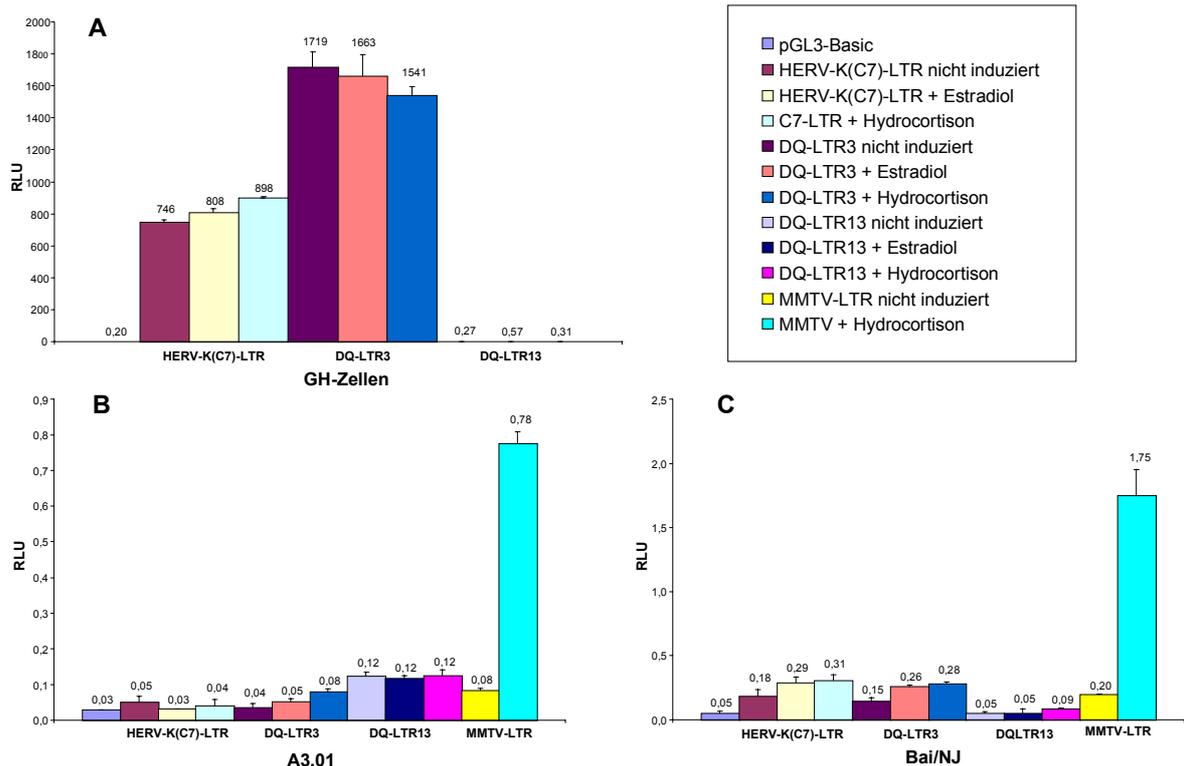


Abb. 3.2 Induktion der transfizierten Zellen mit β -Estradiol oder Hydrocortison. Die mit den unterschiedlichen LTR-Reportergen-Vektoren transfizierten Zellen wurden 5 h nach Transfektion mit Hydrocortison (100 ng/ml) oder β -Estradiol (15 ng/ml) induziert und nach 48 h die Luciferase-Aktivität gemessen. Als interner Standard wurde der pRL-Null-Vektor (Promega) verwendet, der zuvor auf seine nicht-Induzierbarkeit getestet wurde. Die MMTV-LTR wurde als Positivkontrolle für die Induktion mit Hydrocortison eingesetzt. Als Negativkontrolle diente der promotorlose Vektor pGL3-Basic. **A** zeigt die Ergebnisse der Transfektion und Induktion von GH-Zellen, **B** die der T-Zelllinie A3.01, **C** die der lymphoblastoiden B-Zelllinie Bai/NJ.

Wie in Abb. 3.2 deutlich zu erkennen ist, war keine der eingesetzten LTRs in einer der untersuchten Zelllinien durch die Zugabe von β -Estradiol bzw. Hydrocortison induzierbar und die Aktivität der LTRs als Promotor zeigte nach der Induktion nahezu keine Veränderung im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen. Lediglich die MMTV-LTR entwickelte eine deutlich höhere Promotoraktivität nach Zugabe von Hydrocortison in den beiden Zelllinien A3.01 und Bai/NJ. Dies macht deutlich, daß die verwendeten Zelllinien prinzipiell suszeptibel für eine Behandlung mit Hydrocortison waren und die verwendeten Zellen die notwendigen Rezeptoren auf ihrer Oberfläche trugen. Die untersuchten putativen HREs erwiesen sich jedoch in diesen Zellen als nicht-funktional.

3.2.5 Einfluss von *DQ-LTR3* und *DQ-LTR13* auf die Aktivität des *DQ8*- bzw. *DQ2*-Promotors in Abhängigkeit von Orientierung und Position der LTRs relativ zum Promotor

Die unmittelbare Nähe der beiden solitären LTRs zum *DQB1* Gen und ihre kombinierte Transmission mit den beiden IDDM Risikohaplotypen *DQ2* bzw. *DQ8* führte zur Untersuchung ihres direkten Effekts auf die Aktivität der Promotoren beider *DQB1* Gene. Im Folgenden wird der Promotor des *DQB1**0302 Gens als *DQ8* Promotor bezeichnet, der des *DQB1**0201 Gens als *DQ2* Promotor. Für die Analysen wurden unterschiedliche Reporter-genkonstrukte hergestellt, die in Abb. 3.3 aufgelistet sind. Dabei wurden sowohl unterschiedliche Orientierungen als auch Positionen relativ zum Reporter-gen und zum untersuchten Promotor berücksichtigt.

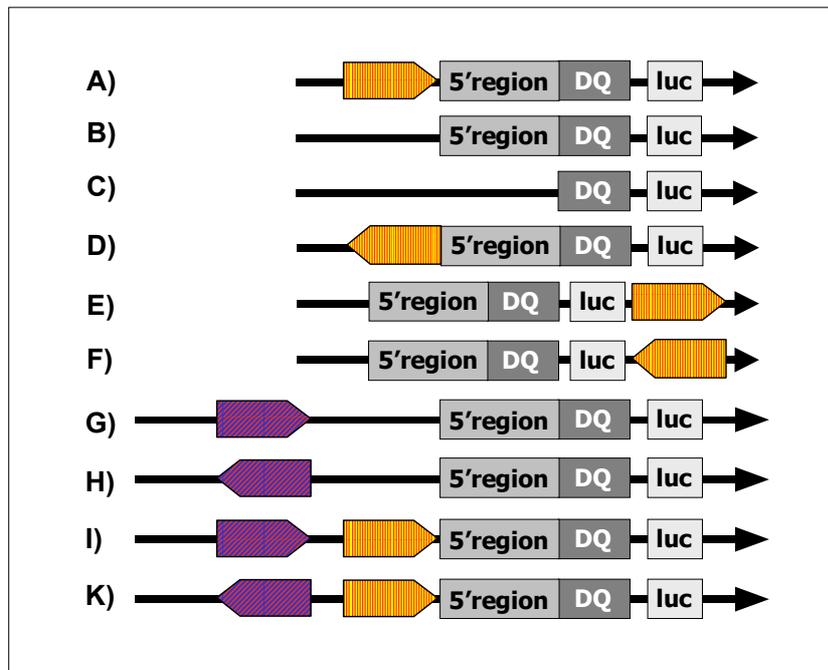


Abb. 3.3 Konstrukte, die zur Transfektion unterschiedlicher Zelllinien verwendet wurden, um *DQ-LTR13* als möglichen Enhancer und *DQ-LTR3* als zusätzliches regulatorisches Element zu charakterisieren. **A** pGL3-Basic/2311 (*DQ-LTR13* + 5'-flankierende Region + DQ-Promotor) **B** pGL3-Basic/1309 (5'-flankierende Region + DQ-Promotor) **C** pGL3-Basic/346 (*DQB1*-Promotor) **D** pGL3-Basic/2311rev (*DQ-LTR13* in reverser Orientierung, stromaufwärts des Promotors) **E** pGL3-Basic/LTR13norm_back (*DQ-LTR13* in normaler Orientierung, stromabwärts des Promotors) **F** pGL3-Basic/LTR13rev_back (*DQ-LTR13* in reverser Orientierung, stromabwärts des Promotors) **G** pGL3-Basic/LTR3_DQ8 (*DQ-LTR3* in normaler Orientierung + **B**) **H** pGL3-Basic/LTR3rev_DQ8 (*DQ-LTR3* in reverser Orientierung + **B**) **I** pGL3-Basic/LTR3_LTR13_DQ8 (*DQ-LTR3* in normaler Orientierung + **A**) **K** pGL3-Basic/LTR3rev_LTR13_DQ8 (*DQ-LTR3* in reverser Orientierung + **A**)

In den folgenden Experimenten wurde zunächst ausschließlich *DQ-LTR13* berücksichtigt, da diese sich in unmittelbarer Nähe zum *DQB1* Gens befindet. Die Konstrukte enthielten deshalb neben dem Promotor des *DQB1* Gens dessen 5'-flankierende Region und die solitäre LTR. Im zweiten Teil der Experimente wurde darüber hinaus ein möglicher Effekt von *DQ-LTR3* auf *DQ-LTR13* und den Promotor untersucht, indem diese entweder allein oder zusammen mit *DQ-LTR13* vor den Promotor und das Reportergen kloniert wurden. Zuerst wurde der Einfluß von *DQ-LTR13* auf den DQ8 Promotor untersucht. Dazu wurden die in Abb. 3.3 dargestellten Konstrukte A-C zur Transfektion unterschiedlicher Zelllinien verwendet. Beobachtet wurde dabei die Fähigkeit des Promotors, die Expression des Reportergens, in diesem Fall des Luciferase Gens, in Abhängigkeit von der solitären LTR zu aktivieren. Dazu wurde die Aktivität des *DQ8*-Promotors allein, zusammen mit der 5'-flankierenden Region und in Anwesenheit der LTR bestimmt. Gemessen wurde dabei die Expressionsrate des Reportergens, repräsentiert durch die Darstellung der Luciferaseaktivität in RLU ("relative light units"). Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 3.4 dargestellt.

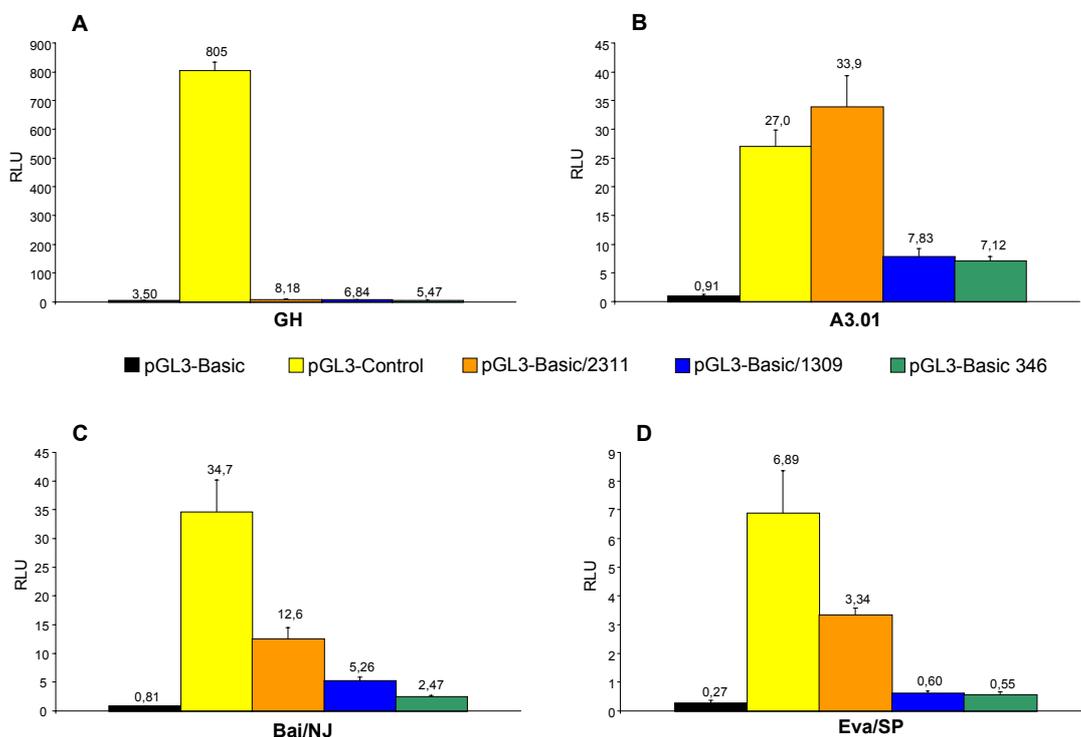


Abb. 3.4 Wirkung von *DQ-LTR13* auf den DQ8 Promotor. Die Luciferaseaktivität für den Promotor in Anwesenheit der solitären LTR ist in ■ dargestellt, die Aktivität zusammen mit der 5'-flankierenden Region in ■ und die Aktivität des Promotors allein in ■. Die Basalaktivität wird durch den promotorlosen Vektor pGL3-Basic (■) repräsentiert. Als Positivkontrolle diente der Vektor pGL3-Control, der einen SV40-Promotor besitzt. Zur Transfektion wurden die Teratokarzinomzelllinie GH, die T-Zelllinie A3.01 sowie die B-Zelllinien Bai/NJ und Eva/SP eingesetzt. (RLU = "relative light units")

In der Teratokarzinomzelllinie GH war der Einfluss von *DQ-LTR13* auf die Aktivität des untersuchten Promotors relativ gering, die Aktivität des Promotors unter dem Einfluß der LTR nur um den Faktor 1,5 erhöht. In der T-Zelllinie A3.01 und den beiden B-Zelllinien Bai/NJ und Eva/SP zeigte sich dagegen eine deutliche Beeinflussung der Aktivität des DQB1-Promotors durch die solitäre LTR. Im Vergleich zur Aktivität des Promotors allein oder auch zusammen mit der 5'-flankierenden Region, ergab sich eine etwa 5-6 fach erhöhte Aktivität des Promotors in Anwesenheit von *DQ-LTR13*.

Zur Überprüfung, ob es sich bei *DQ-LTR13* um einen klassischen Enhancer handelt, dessen Wirkung unabhängig von seiner Orientierung ist und der seine Wirkung über größere Entfernungen entfalten kann, wurden zusätzliche Analysen durchgeführt. Die dazu hergestellten Konstrukte enthielten die LTR in reverser Orientierung stromaufwärts vom Promotor und in normaler und reverser Orientierung stromabwärts vom Luciferase-Gen. Die Zusammensetzung der so entstandenen Plasmide ist in Abb. 3.3 durch die Konstrukte D-F dargestellt. Nach Transfektion und Messung der Luciferase-Aktivität zeigte sich das in Abb. 3.5 an der Zelllinie Bai/NJ exemplarisch dargestellte Ergebnis.

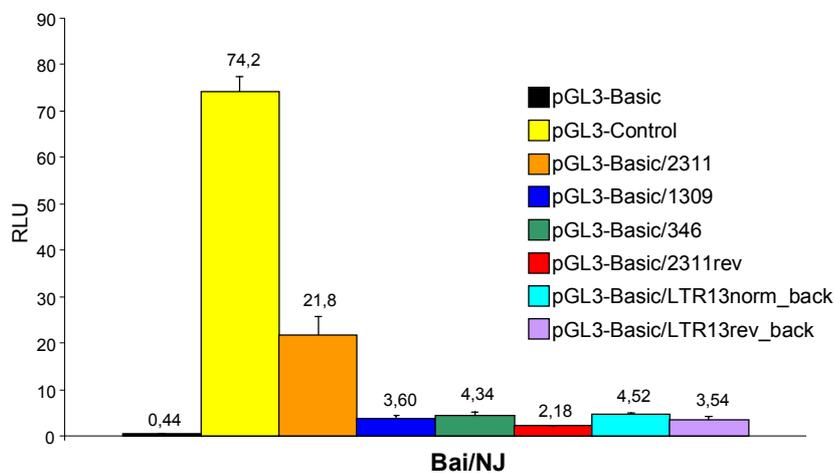


Abb. 3.5 Untersuchung der Wirkungsweise von *DQ-LTR13* als möglicher Enhancer. Zusätzlich zu den bisher verwendeten Konstrukten wurden unterschiedliche Positionen und Orientierungen von *DQ-LTR13* berücksichtigt. Das ■ dargestellte Konstrukt enthält die LTR in reverser Orientierung stromaufwärts vom Promotor, ■ zeigt die LTR in normaler Orientierung und ■ in reverser Orientierung hinter dem Luciferase Gen. (RLU = "relative light units")

Sehr deutlich zeigte sich für den Promotor in Anwesenheit von *DQ-LTR13* eine nach wie vor etwa 5-fach erhöhte Aktivität (RLU von 21,8 im Vergleich zu 4,34 bzw. 3,60). Dieser Effekt ließ sich jedoch darüber hinaus in keiner anderen Orientierung oder Position relativ

zum Promotor bestätigen. Damit ist die Funktionalität der LTR in Bezug auf den *DQ8* Promotor auf ihre, auch im humanen Genom, natürlicherweise vorliegende Position und Orientierung beschränkt.

DQ2, der zweite Risikohaplotyp für eine Erkrankung an Typ 1 Diabetes mellitus, war Gegenstand der folgenden Untersuchung. Um festzustellen, ob ein ähnlicher Effekt von *DQ-LTR13* auch auf den *DQ2* Promotor ausgeht, wurde der *DQ8* Promotor durch diesen ersetzt und mit den daraus entstandenen Konstrukten wurden weitere Transfektionen durchgeführt. Nach Messung der Luciferaseaktivität zeigte sich am Beispiel der B-Zelllinie Bai/NJ und der T-Zelllinie A3.01 (siehe Abb. 3.6) folgendes Ergebnis.

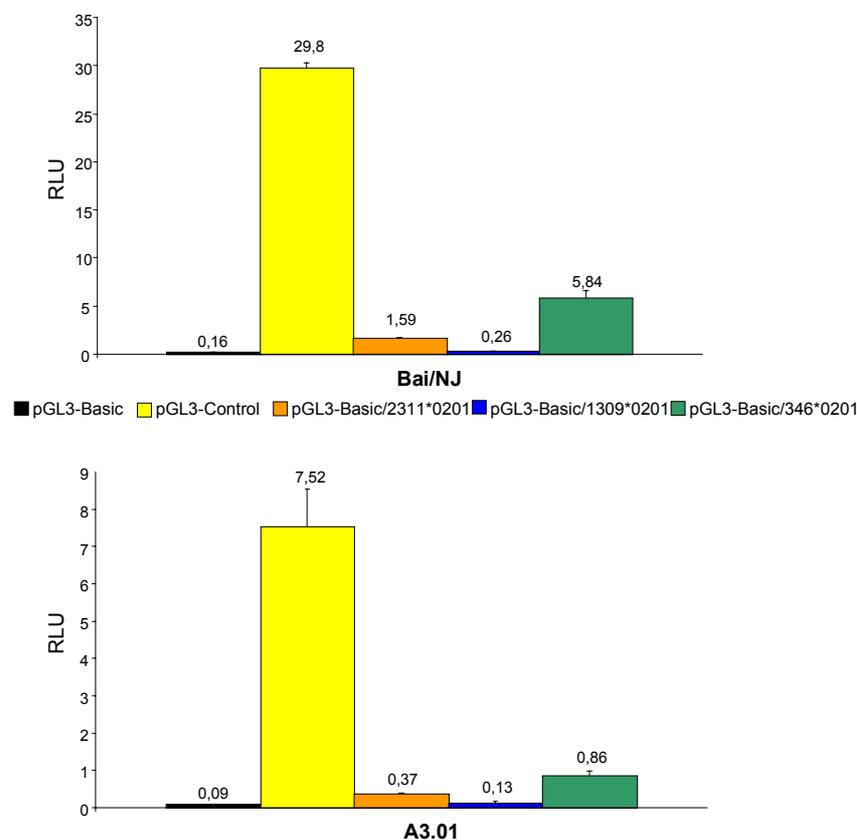


Abb. 3.6 Wirkung von *DQ-LTR13* auf den *DQ2* Promotor. Die in den Farben ■ ■ ■ markierten Balken repräsentieren die Luciferaseaktivität für die in Abb. 3.3 dargestellten Konstrukte A-C. Bei dem untersuchten Promotor handelt es sich jedoch in diesem Fall um den Promotor des *DQB1*0201* Gens (*DQ2*). (RLU = "relative light units")

Der beobachtete Einfluss der solitären LTR auf die Aktivität des *DQ2* Promotors (*DQB1*0201*) war wesentlich weniger signifikant als der auf den *DQ8* Promotor (*DQB1*0302*). Darüber hinaus zeigte die Wirkungsweise eine reverse Tendenz. Das

bedeutet, in Anwesenheit der LTR zeigte sich eine Reduktion der gemessenen Luciferaseaktivität auf weniger als die Hälfte.

Im natürlichen Kontext des menschlichen Genoms befinden sich die solitären LTRs *DQ-LTR3* und *DQ-LTR13* beide in relativer Nähe zum DQB1 Gen etwa 15 kb voneinander entfernt. Für beide wurde eine Rolle als genetischer Risikomarker gezeigt. In den vorangegangenen Analysen wurde jedoch bisher lediglich der Einfluss von *DQ-LTR13* auf die Aktivität des DQB1 Promotors *in vitro* untersucht. Im Folgenden sollte *DQ-LTR3* als zusätzlicher oder alleiniger Effektor untersucht werden.

Dazu wurden weitere Reporter-Plasmide hergestellt, die zusätzlich zu der Kombination bestehend aus *DQ-LTR13*, der 5'-flankierenden Region und dem *DQ8* Promotor, in stromaufwärts gelegener Position die *DQ-LTR3* beinhalteten (siehe Abb. 3.3 Konstrukte I und K). Die ebenfalls in Abb. 3.3 dargestellten Plasmide G und H beinhalteten nur die *DQ-LTR3* ohne *DQ-LTR13*. Diese Plasmide wurden für weitere Transfektionen eingesetzt. Das Ergebnis der anschließenden Luciferase-Assays ist in Abb. 3.7 dargestellt.

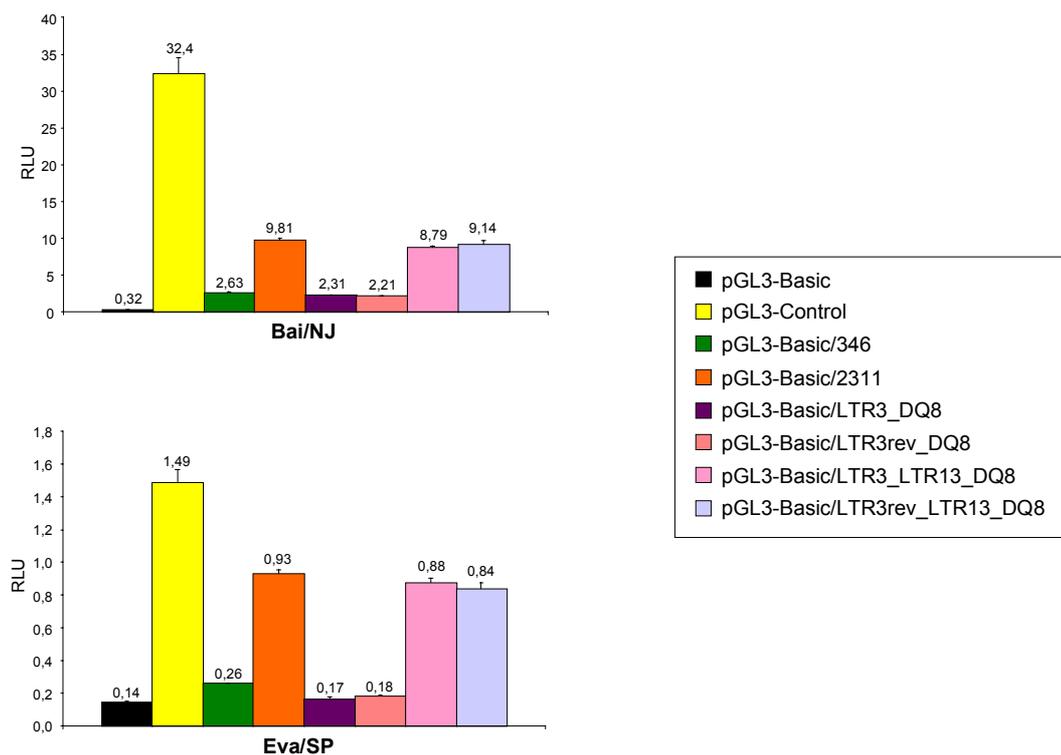


Abb. 3.7 Wirkung von *DQ-LTR3* auf *DQ-LTR13* und den *DQ8* Promotor. Die genaue Zusammensetzung der für diese Transfektionen eingesetzten Plasmide ist in Abb. 3.3 unter G-K gezeigt. Die Konstrukte enthalten zusätzlich (■ pGL3-Basic/LTR3_LTR13_DQ8 bzw. □ pGL3-Basic/LTR3rev_LTR13_DQ8) oder anstelle der bisher untersuchten *DQ-LTR13* (■ pGL3-Basic/LTR3_DQ8 bzw. ■ pGL3-Basic/LTR3rev_DQ8) *DQ-LTR3*. Als Negativkontrolle dient der promotorlose pGL3-Basic (■), als Positivkontrolle der unter der Kontrolle des SV40-Promotors stehende pGL3-Control (■). Darüber hinaus wurden zum Vergleich der *DQ8* Promotor allein (■ pGL3-Basic/346) und in Anwesenheit von *DQ-LTR13* (■ pGL3-Basic/2311) hinzugezogen. (RLU = "relative light units")

In den beiden untersuchten lymphoblastoiden B-Zelllinien Bai/NJ und Eva/SP bestätigte sich der deutliche Effekt von *DQ-LTR13* auf den *DQ8* Promotor. In beiden Fällen wurde eine Steigerung der Aktivität des Promotors von 2,63 auf 9,81 bzw. 0,26 auf 0,93 durch die Anwesenheit der LTR erreicht. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für die Konstrukte, die beide LTRs enthielten (repräsentiert durch pGL3-Basic/LTR3_LTR13_DQ8 und pGL3-Basic/LTR3rev_LTR13_DQ8). Ein zusätzlicher Effekt von *DQ-LTR3* war jedoch nicht zu beobachten und auch ohne *DQ-LTR13* hatte *DQ-LTR3* keinen aktivierenden Einfluss auf den *DQ8* Promotor. Dieses Ergebnis war unabhängig von der transkriptionellen Orientierung von *DQ-LTR3*, die im natürlichen Kontext relativ zu *DQ-LTR13* und zum Promotor in reverser Orientierung vorliegt.

3.2.6 Transkriptionsregulatorische Wirkung von *DQ-LTR13* auf ausgewählte *DQB1* Gene *in vivo*

Zur Untersuchung der tatsächlichen Wirkung von *DQ-LTR13* in einem *in vivo* System wurde ein Nuclear Run-On Assays zum Nachweis quantitativer Unterschiede bei der Initiation und Transkription unterschiedlicher *DQ* Gene etabliert. Dazu wurden verschiedene EBV-transformierte lymphoblastoide B-Zelllinien eingesetzt, die zwar für den gleichen *DQ* Haplotypen homozygot waren, sich jedoch in der An- bzw. Abwesenheit von *DQ-LTR13* unterschieden. Aufgrund der zeitlichen Verfügbarkeit konnten ausschließlich *DQ2* homozygote Zellen zur Analyse herangezogen werden. Aus ihnen wurden die Zellkerne isoliert und zur Nuclear Run-On Reaktion mit anschließender Isolation und Detektion der radioaktiv markierten mRNA eingesetzt. Die Ergebnisse sind am Beispiel von zwei Zelllinien in Abb. 3.8 gezeigt.

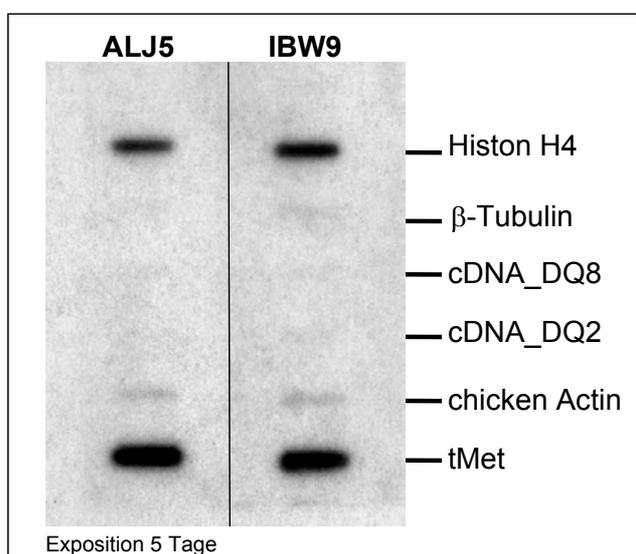


Abb. 3.8 Nuclear Run-On Assay. Zur radioaktiven Markierung wurden Kerne der Zelllinien ALJ5 (*DQ2/LTR13+*) und IBW9 (*DQ2/LTR13-*) eingesetzt. Die während der Reaktion gebildete mRNA wurde mit spezifischen Sonden für die Gene Histone H4, β-Tubulin, *DQ8*, *DQ2*, Actin und tMet (siehe Abschnitt 2.8.16) detektiert. Auf dem Film deutlich zu erkennen sind die Signale für die beiden Positivkontrollen Histone H4 und tMet. Für die beiden eingesetzten *DQ*-Sonden (cDNA_DQ8 und cDNA-DQ2) sind nur sehr schwache Signale zu erkennen. Expositionszeit, 5 Tage bei -80°C .

Die Zelllinien ALJ5 und IBW9 sind beide homozygot für *DQ2* (siehe Tab. 2.1). Während ALJ5 jedoch homozygot positiv für *DQ-LTR13* ist, ist die LTR in der Zelllinie IBW9 auf keinem der beiden homologen Chromosomen anwesend. Die quantitative Detektion der radioaktiv markierten RNA aus der Nuclear Run-On Reaktion mit den als Positivkontrollen eingesetzten Sonden für das Histon H4 Gen und die für die tRNA^{Met} kodierende Sonde tMet (Sonden siehe Abschnitt 2.8.16) ergaben sehr starke Signale. Die Bindung an die Actin- und an die β -Tubulin-Sonde war schwach ausgeprägt, zeigte aber deutlich erkennbare Banden. Eine Bindung an die beiden *DQ*-Sonden cDNA_DQ8 und cDNA_DQ2 war kaum zu erkennen und ermöglichte keinen quantitativen Vergleich in Abhängigkeit von *DQ-LTR13*.

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung der solitären retroviralen LTR *DQ-LTR13* als genetischer Risikomarker für eine Erkrankung an Typ 1 Diabetes mellitus auf der Grundlage einer Familienassoziationsstudie

Die vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Analyse einer möglichen Korrelation der solitären retroviralen LTR *DQ-LTR13* mit dem Auftreten einer Erkrankung an Typ 1 Diabetes mellitus (IDDM). Im Rahmen dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, daß *DQ-LTR13* das genetische Risiko einer Erkrankung, zusätzlich zu dem, vermittelt durch die HLA Risikohaplotypen *DQ2* und *DQ8*, signifikant verändert. Im Gegensatz zu *DQ-LTR3* (Donner et al. 1999a), die sich 15 kb stromaufwärts vom *DQB1* Gen befindet, liegt *DQ-LTR13* diesem Gen mit nur 1,3 kb wesentlich näher. Die Berechnung des zwischen den beiden LTRs bestehenden Kopplungsungleichgewichts (LD) ergab, daß sich zwar beide in einem positiven, aber nicht sehr stark ausgeprägten, LD befinden. Bei einer 100%igen Kopplung wäre der Wert für das Kopplungsungleichgewicht gleich 0,5, ist keine Kopplung vorhanden, gleich null. Ein Zahlenwert von 0,139 (+/-0,0125) mit positivem Vorzeichen bedeutet für *DQ-LTR3* und *DQ-LTR13*, daß sie zwar präferentiell, aber nicht ausschließlich zusammen auf einem Haplotypen vorkommen. Aus diesem Grund können beide LTRs als unabhängige genetische Marker bewertet werden.

Auf der Grundlage einer Familienassoziationsstudie wurde die Transmission von *DQ-LTR13* zusammen mit ausgewählten *HLA DQ* Haplotypen untersucht. Ziel der Studie war, die Vererbung der LTR zusammen mit den bekannten Risikohaplotypen *DQ2* und *DQ8* von den Eltern an das erkrankte Kind aufzuzeigen, statistisch zu erfassen und dabei zu bewerten, ob die An- oder Abwesenheit von *DQ-LTR13* das Risiko einer Erkrankung an Typ 1 Diabetes mellitus beeinflusst.

Die Kopplung von *DQ-LTR13* an die Risikohaplotypen *DQ2* und *DQ8* unterschied sich signifikant zwischen transmittierten und nicht-transmittierten Haplotypen. Die Analyse des gesamten Familienkollektivs zeigte, daß die *DQ8/LTR13*⁺ Haplotypen, im Vergleich zu den *DQ8/LTR13*⁻ Haplotypen, signifikant häufiger als bei einer zufälligen Vererbung erwartet, an die Patienten transmittiert wurden. Dieses Resultat wurde nicht durch die Anwesenheit von DR4 beeinflusst, denn es konnte auch nach einer Subtypisierung der *DRB1* Merkmale, sowohl für *DRB1*0401-DQ8* als auch für nicht-*DRB1*0401-DQ8*-

Haplotypen, bestätigt werden. Daraus ergibt sich eine erhöhte IDDM-Suszeptibilität durch die Anwesenheit von *DQ-LTR13* auf dem *DQ8* Risikohaplotypen.

Das Gegenteil zeigte sich für den zweiten IDDM-Risikohaplotypen *DQ2*. Die *DQ2/LTR13⁻* Haplotypen wurden bevorzugt an das erkrankte Kind transmittiert, während zwei Drittel der *DQ2/LTR13⁺* Haplotypen nicht transmittiert wurden. Alle nicht-*DQ2*/nicht-*DQ8*-Haplotypen wurden signifikant häufiger nicht transmittiert, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von *DQ-LTR13*. Dieses Ergebnis läßt sich durch die Zusammensetzung des für die Analyse ausgewählten Kollektivs erklären. Für das statistische Verfahren des TDT wurden ausschließlich heterozygote Eltern berücksichtigt, da nur sie eine Alternative bei der Vererbung des einen oder anderen Allels besitzen. Im Kontext des Typ 1 Diabetes mellitus bedeutet das, wenn die Eltern auf einem ihrer homologen Chromosomen einen der beiden Risikohaplotypen *DQ2* oder *DQ8* besitzen, wird dieser bevorzugt vererbt während der nicht-Risikohaplotyp auf dem zweiten Chromosom nicht transmittiert wird. Das Entscheidende war jedoch, daß kein Unterschied in der Transmissionshäufigkeit von nicht-*DQ2*/nicht-*DQ8*-Haplotypen in Abhängigkeit von *DQ-LTR13* bestand. Das beobachtete Vererbungsmuster für die nicht-*DQ2*/nicht-*DQ8*-Haplotypen war demnach nicht auf die An- bzw. Abwesenheit von *DQ-LTR13* zurückzuführen, wie bei den beiden Risikohaplotypen *DQ2* und *DQ8*, sondern war durch die Heterozygotie der ausgewählten Parentalgeneration bedingt.

Das höchste PPV aller untersuchten Allel/*DQ-LTR13* Kombinationen, bezogen auf Typ 1 Diabetes mellitus, zeigten genau diese beiden signifikant bevorzugt transmittierten Haplotypen. Die Wahrscheinlichkeit einer IDDM Erkrankung für Individuen, die das Merkmal *DQ8/LTR13⁺* trugen, lag bei 79%, das für *DQ2/LTR13⁻* Individuen bei 68%.

Das relative Risiko, das durch die An- bzw. Abwesenheit von *DQ-LTR13* zusätzlich zu *DQ8* und *DQ2* (RR = 9,5 bzw. 2,4) (Klein und Sato 2000) vermittelt wird, liegt bei 1,8 bzw. 1,5. Damit wird das Risiko einer IDDM Erkrankung, gegenüber dem durch die Risikohaplotypen *DQ2* und *DQ8* allein vermittelten, zusätzlich deutlich erhöht.

Unterschiedliche Studien haben gezeigt, daß Typ 1 Diabetes mellitus häufiger vom erkrankten Vater an die Kinder vererbt wird als von der erkrankten Mutter (el Hashimy et al. 1995; Tuomilehto et al. 1995; Warram et al. 1984). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurden bei Kindern mit erkrankten Müttern in wesentlich weniger Fällen Autoantikörper nachgewiesen als bei Kindern mit erkrankten Vätern (Roll et al. 1996; Verge et al. 1996). Zusätzlich wurde eine bevorzugte Transmission der Erkrankung vom

Vater an weibliche Nachkommen und von der Mutter an männliche Nachkommen gezeigt (Tuomilehto et al. 1995), die jedoch von der EURODIAB Gruppe nur für den ersten Fall bestätigt werden konnte, nicht jedoch für die erhöhte Transmissionshäufigkeit von der Mutter zum Sohn (1998). Der beobachtete Effekt war jedoch generell nur schwach ausgeprägt.

Der genaue Grund für eine möglicherweise vom Geschlecht des erkrankten Elternteils abhängige Vererbung ist nicht bekannt. Eine Ursache könnte sein, daß für den Typ 1 Diabetes mellitus prädisponierende Gene weniger diabetogen sind, wenn sie von der Mutter vererbt werden (Field 2002). Einen solchen Vorgang, der bisher nicht erwiesen ist, würde man als "genetic imprinting" bezeichnen. In einem solchen Fall würde man bei der Transmission der für den Typ 1 Diabetes mellitus prädisponierenden Allele ein ähnliches Vererbungsmuster erwarten. Deshalb wurde im Rahmen der Familienassoziationsstudie bei der Betrachtung der parentalen Transmission der Risikohaplotypen $DQ8/LTR13^+$ und $DQ2/LTR13^-$ zusätzlich zwischen der Vererbung ausgehend vom Vater und von der Mutter differenziert (siehe Tab. 3.4). Zwar wurden dabei die bisher gewonnenen Ergebnisse für die beiden Risikohaplotypen unter Verwendung des TDT bestätigt (siehe Tab. 3.4), das erwartete Vererbungsmuster konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, da sich für keinen der beiden Risikohaplotypen eine geschlechtsspezifische Präferenz in der Vererbung, unabhängig von $DQ-LTR13$, herausstellte. Einzig die Transmission des nicht-Risikohaplotypen $DQ8/LTR13^-$ fand tendenziell häufiger von maternaler Seite aus und in Richtung erkrankter weiblicher Nachkommen statt (siehe Tab. 3.4). Die Signifikanz des Ergebnisses war jedoch aufgrund des kleinen Patientenkollektivs nur sehr schwach ausgeprägt. Von 23 untersuchten Allelen wurden 16 an weibliche Nachkommen transmittiert, während, ausgehend von der mütterlichen Seite, von insgesamt 18 untersuchten Allelen 14 transmittiert wurden. Für einen eindeutigen Nachweis müßte die untersuchte Fallzahl im Kollektiv erhöht werden. Tendenziell deutete das Ergebnis jedoch auf eine sowohl vom Geschlecht der Eltern als auch vom Geschlecht der Nachkommen unabhängige Transmission der Risikohaplotypen $DQ8/LTR13^+$ und $DQ2/LTR13^-$ hin. Weitergehende Analysen wurden daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

Auf der Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Familienassoziationsstudie wird deutlich, daß $DQ-LTR13$ die durch den Risikohaplotypen $DQ8$ vermittelte Suszeptibilität für Typ 1 Diabetes mellitus erhöht. Zusätzlichen Einfluß auf die Häufigkeit der

Transmission von $DQ8/LTR13^{+/-}$ könnte möglicherweise der zweite Haplotyp jedes Individuums nehmen, der sich auf dem homologen Chromosom 6 befindet. Dieser mögliche Effekt könnte ausgeschlossen werden, indem man nur Eltern berücksichtigt würde, die für das Merkmal $DQ8$ homozygot sind (Lie et al. 1999) und sich nur in der Anwesenheit von $DQ-LTR13$ unterscheiden würden. Für diese Fragestellung würde man jedoch, aufgrund der gegebenen Allelhäufigkeiten innerhalb der kaukasischen Bevölkerungsgruppe, etwa 1000 Familien benötigen, um den für die Analyse notwendigen Anteil an $DQ8$ homozygoten Eltern zu erhalten. Da man aber davon ausgehen kann, daß die Allelfrequenzen des zweiten Haplotyps in der hier vorgestellten Studie zufällig zwischen $DQ8^+/LTR13^+$ - und $DQ8^+/LTR13^-$ -Eltern verteilt sind, kann ihr Einfluss auf die Ergebnisse dieser Analyse ausgeschlossen werden. Gleiches gilt für die Transmission von $DQ2/LTR13^{+/-}$.

Warum $DQ-LTR13$ in manche Haplotypen häufiger integriert ist als in andere, ist derzeit noch nicht klar (Donner et al. 2000). Möglicherweise waren diese Elemente an der Ausbildung des immunogenetischen Repertoires in Übereinstimmung mit der infektiösen Umgebung während der Evolution beteiligt. Innerhalb des MHC existieren einige Retroelemente, für die bisher jedoch nicht nachgewiesen wurde, ob sie einen Einfluß auf spezifische Genfunktionen haben (Andersson et al. 1998). Davon abgesehen könnten sie jedoch theoretisch die Transkription funktioneller Gene durch direkte, indirekte oder gewebsspezifische Regulation beeinflussen (Domansky et al. 2000).

4.2 Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von $DQ-LTR3$ und $DQ-LTR13$

Im Rahmen der Familienassoziationsstudie konnte gezeigt werden, daß zwei Haplotypen existieren, die über einen bisher unbekanntem Mechanismus eine erhöhte Suszeptibilität für Typ 1 Diabetes mellitus vermitteln: $DQ8$ mit $DQ-LTR13$ und $DQ2$ ohne $DQ-LTR13$. Ein ähnlicher Einfluß wurde in früheren Analysen für $DQ-LTR3$ gezeigt (Donner et al. 1999b). Die sich daraus entwickelnde Frage nach einem möglichen Einfluss beider LTRs auf die Expression des $DQB1$ Gens, wurde in weiterführenden funktionellen Analysen bearbeitet, um sie, über ihre Funktion eines genetischen Risikomarkers hinaus, als mögliche regulatorische Elemente zu charakterisieren.

Das humane Genom enthält etwa 443.000 Kopien von LTR-Elementen (Lander et al. 2001), von denen über 10.000 solitäre LTRs der Familie HERV-K angehören (Leib-Mösch et al. 1993). Davon scheinen jedoch nur wenige in der Lage zu sein, die Transkription stromabwärts genauso wie stromaufwärts gelegener funktioneller Gene zu begünstigen (Domansky et al. 2000). Während *DQ-LTR3* eindeutig zur Familie HERV-K gehört (Kambhu et al. 1990), ist *DQ-LTR13* zwar bisher keiner bekannten Familie der humanen endogenen Retroviren eindeutig zuzuordnen (Liao et al. 1998) besitzt jedoch Sequenzhomologien zu HML-4 bzw. HERV-K T47D (persönliche Mitteilung von Prof. J. Blomberg, Universität Uppsala). Sie ist damit anderen retroviralen LTRs, trotz fehlender Sequenzähnlichkeiten, strukturell sehr ähnlich und besitzt ebenfalls, wie in Abb. 3.1 dargestellt, einen putativen Promotor, ein Polyadenylierungs-Signal sowie ein 53 bp Tandem-Repeat (Liao et al. 1998). Diese Enhancer-ähnliche Sequenz umfasst das Sequenzmotiv CCCAG, für das bereits beschrieben worden ist, daß es eine Rolle bei der Funktion des SV40 Enhancers spielt (Liao et al. 1998; Zenke et al. 1986). Basierend auf diesen regulatorischen Elementen könnten sowohl *DQ-LTR3* als auch *DQ-LTR13*, wie für HERV-K LTRs bereits beschrieben (Domansky et al. 2000), über eine bidirektionale Promotoraktivität verfügen und damit in die Regulation benachbarter zellulärer Gene involviert sein. Ein mögliches Kandidatengen im Kontext des Typ 1 Diabetes mellitus ist das *DQB1* Gen im MHC Komplex. Die relative Nähe beider LTRs zu diesem Gen und ihre signifikante Transmission zusammen mit den IDDM-Risikoallelen DQB1*0201 (*DQ2*) und DQB1*0302 (*DQ8*) läßt eine funktionelle Untersuchung im Kontext der Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus für beide Elemente notwendig erscheinen. Daher wurde in einem *in vitro* Experiment die Fähigkeit der LTRs untersucht, als Promotor auf die Expression eines Reportergens zu wirken. Für die Transfektionen wurden unterschiedliche EBV-transformierte B-lymphoblastoide Zelllinien variabler *DQ*-Haplotypen eingesetzt. Als Vertreter der Antigen-präsentierenden Zellen, die MHC Klasse II Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, stellten sie das geeignete System zur Untersuchung der Funktion der beiden solitären LTRs im Zusammenhang mit der Ätiologie des Typ 1 Diabetes mellitus dar. In den mit den LTR/Reportergen-Konstrukten transfizierten Zellen konnte jedoch keine deutliche Luciferase-Aktivität, die über die des promotorlosen Vektors pGL3-Basic hinausging, nachgewiesen werden. Auch die Berücksichtigung der natürlichen reversen transkriptionellen Orientierung von *DQ-LTR3* im genomischen Kontext führte zu keinem anderen Resultat, so daß eine Funktion der solitären LTRs als Promotor in lymphoblastoiden B-Zelllinien damit ausgeschlossen werden konnte.

Ganz anders stellte sich das Ergebnis nach Transfektion der Teratokarzinom Zelllinie GH (Löwer et al. 1984) unter Verwendung der gleichen Konstrukte dar. Hier zeigte sich für die provirale LTR aus HERV-K(C7) (Tönjes et al. 1999), die als Positivkontrolle eingesetzt worden war, und für *DQ-LTR3* eine bidirektionale Promotoraktivität (siehe Tab. 3.5), die sogar über der des gleichfalls transfizierten pGL3-Control (Kontrolle des SV40 Promotors) lag (Daten nicht gezeigt). Die solitäre LTR gehört, wie die provirale, zur Familie HERV-K. Beide weisen daher hohe Sequenzhomologien auf (Abb. 3.1). Es ist bereits beschrieben worden, daß Mitglieder der Familie HERV-K in der Teratokarzinom Zelllinie GH (Löwer et al. 1984) die Vertreter der humanen endogenen Retroviren mit der höchsten Aktivität sind (Tönjes et al. 1996). Die Fähigkeit der proviralen LTR und *DQ-LTR3*, die Expression des promotorlosen Reportergens in genau dieser Zelllinie zu fördern, ist deshalb als Bestätigung früherer Ergebnisse zu bewerten.

Der Nachweis einer Promotoraktivität in den ausgewählten B-lymphoblastoiden Zelllinien konnte dagegen, unabhängig vom Haplotyp der transfizierten Zellen, nicht erbracht werden. In der T-lymphoblastoiden Zelllinie A3.01 konnten zwar Aktivitäten gezeigt werden, die ein Vielfaches des promotorlosen Vektors pGL3-Basic darstellten (siehe Tab. 3.5), die Standardabweichung (SD) war jedoch so hoch, daß die Aussagekraft des Ergebnisses stark eingeschränkt wurde. Definitionsgemäß sollte ein signifikantes Ergebnis das 3-fache der Standardabweichung überschreiten. Da die Ergebnisse nach Transfektion von A3.01-Zellen diese Vorgabe nur wenig überschritten, wurden sie als "nicht signifikant" definiert und daher keiner weiteren Analyse unterzogen.

Innerhalb der beiden solitären LTRs *DQ-LTR3* und *DQ-LTR13* wurden in Sequenzanalysen putative hormonresponsive Elemente für Glucocorticoide und Estradiol (Klasse der Östrogene) gefunden (siehe Abb. 3.1), die beide zur Klasse der Steroidhormone gehören. Glucocorticoide sind vorwiegend an der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels und in geringerem Maße an der Regulation des Lipidstoffwechsels beteiligt. Darüber hinaus unterstützen sie die Anpassung des Organismus in Stressituationen und wirken in großen Dosen immunsuppressiv. Ihre Wirkungsweise ist im Gegensatz zu den Östrogenen in keinem Fall geschlechtsspezifisch. Die Rezeptoren der Steroidhormone werden durch Bindung ihres Liganden im Cytosol aktiviert und translozieren in den Nukleus. Dort kann nach Bindung des Dimers an ein entsprechendes hormonresponsives Element eine Transkriptionsaktivierung oder Repression erfolgen (Beato et al. 1989).

Bei den nachgewiesenen hormonresponsiven Elementen (HREs) handelt es sich um Derivate des hexamerischen DNA-Kern-Motivs 5'-XGGTCA-3', wobei X entweder Adenin (A) oder Guanin (G) sein kann. Die Elemente sind typischerweise aus zwei Hälften aufgebaut, die sich durch ihre Sequenz, deren Orientierung sowie die Anzahl der Basenpaare, die zwischen den beiden Hälften liegen, definieren. Das zur Sequenzanalyse verwendete Programm unterscheidet zwischen der Kern-Sequenz und der nicht-Kern-Sequenz (Matrixsequenz) eines HRE. Ein Nukleotidaustausch in der Kernsequenz kann bereits zu einer gravierenden funktionellen Veränderung des Elements führen, während eine Veränderung der Matrixsequenz nicht zwangsläufig eine Änderung der Funktionalität bedeutet. Auf der Suche nach putativen funktionalen HREs innerhalb der LTR-Sequenzen kann der Suchalgorithmus so ausgewählt werden, daß der gewünschte Grad an Sequenzhomologie zu funktionalen HREs als Standard angegeben wird. Dadurch wird im Ergebnis die Wahrscheinlichkeit angegeben, mit der es sich bei dem identifizierten Element tatsächlich um ein funktionales HRE handelt. In der vorliegenden Analyse wurde die Kern-Sequenz-Homologie mit 75% angegeben und die Matrix-Sequenz-Homologie mit 85%. Die Auswahl höherer Homologien führte zu keinem Ergebnis. Damit lag die Wahrscheinlichkeit dafür, daß es sich bei den gefundenen HREs tatsächlich um funktionale Elemente handelt, weit unter 100%.

Die für die Induktionsversuche eingesetzten lymphoblastoiden B-Zellen sind grundsätzlich in der Lage über den entsprechenden Rezeptor mit den ausgewählten Hormonen zu interagieren (Quaia et al. 2000). Die Induktion der Promotoraktivität der beiden solitären LTRs *DQ-LTR3* und *DQ-LTR13* und der proviralen Kontroll-LTR aus HERV-K(C7) konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die eingesetzten Hormonkonzentrationen richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Die Effektivität der eingesetzten Estradiol-Konzentration wurde zu Beginn der Analysen am Plasmid pRL-CMV (Promega) in unterschiedlichen Zelllinien getestet (Daten nicht gezeigt). Als Positivkontrolle für die verwendete Hydrocortison-Konzentration wurde die MMTV-LTR eingesetzt, von der bekannt ist, daß sie ein funktionales Glucocorticoid-responsives Element besitzt (Ringold 1985). In der Teratokarzinom Zelllinie GH konnte diese Funktionalität nicht verifiziert werden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte das Fehlen der notwendigen Rezeptoren im Zytosol von GH-Zellen sein. Glucocorticoide diffundieren durch die Zellmembran in die Zielzelle und binden dort an den zytosolischen Glucocorticoid-Rezeptor. Nach Bindung transloziert der Rezeptor vom Zytosol in den Zellkern und bindet dort an entsprechende GRES. Bei Fehlen des zytosolischen Rezeptors

in GH-Zellen wäre die Induktion einer LTR in dieser Zelle mit Glucocorticoid-Hormonen dementsprechend nicht möglich, auch wenn die LTR, wie im Falle der MMTV-LTR, ein GRE besitzen würde.

In den verwendeten B- und T-Zelllinien war zwar die Induktion der MMTV-LTR deutlich zu erkennen (siehe Abb. 3.2), die provirale und die beiden solitären LTRs zeigten jedoch auch hier nahezu keine Reaktion auf die Behandlung mit Estradiol bzw. Hydrocortison, obwohl die Rezeptorspezifität der Zellen offensichtlich gewährleistet war. Die Überprüfung der Funktionalität der hormonresponsiven Elemente innerhalb der LTRs war damit negativ zu bewerten, eine hormoninduzierte Regulation der LTRs in den untersuchten Zelllinien unwahrscheinlich.

Der Nachweis der Induzierbarkeit der beiden solitären LTRs durch Estradiol hätte auf eine mögliche geschlechtsspezifische Regulation der LTRs hinweisen können, denn eine charakteristische Eigenschaft von Autoimmunerkrankungen im allgemeinen ist ihr häufig geschlechtsspezifisches Auftreten. Die meisten Autoimmunerkrankungen, unter ihnen rheumatoide Arthritis und multiple Sklerose, treten überwiegend bei Frauen auf (Beeson 1994). Typ 1 Diabetes dagegen ist die einzige organspezifische Autoimmunerkrankung, die nicht diese Tendenz besitzt (Gale und Gillespie 2001). Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten unter 15 Jahren ist nahezu ausgeglichen (Beeson 1994). Mit zunehmendem Lebensalter bildet sich jedoch ein Verhältnis männlich:weiblich von 3:2 aus (Gale und Gillespie 2001). Diese offensichtlich geschlechtsspezifische Diabetesmanifestation wird besonders bei der Unterscheidung von prä- und postpubertären Erkrankungsdaten deutlich (Weets et al. 2001). Die in der Pubertät vermehrt stattfindende Ausschüttung von Estradiol im weiblichen Organismus spielt demnach keine Rolle bei der Manifestation der Erkrankung. In Übereinstimmung mit ihrer möglichen Rolle im Kontext des Typ 1 Diabetes mellitus ließen sich auch die beiden solitären LTRs nicht durch eine Behandlung mit Estradiol induzieren.

Insgesamt haben die Ergebnisse der Hormoninduktions-Versuche damit gezeigt, daß weder *DQ-LTR3* noch *DQ-LTR13* funktionale HREs besitzen, wie sie für Vertreter der Familie HERV-W beschrieben worden sind (Blond et al. 2000). Ihre hormonabhängige und vor allem geschlechtsspezifische Regulation im Kontext der Ätiologie des Typ 1 Diabetes mellitus erscheint damit, bezogen auf das untersuchte Zellkollektiv, unwahrscheinlich.

Eine Promotor-ähnliche Funktion in Bezug auf die Expression des Luciferase-Reportergens in Vertretern Antigen-präsentierender Zellen und ein damit verbundener

möglicher Einfluß auf die Transkription des DQB1 Gens konnte bisher für keine der beiden LTRs nachgewiesen werden. Das DQB1 Gen ist jedoch im Besitz eines eigenen Promotors, der ebenfalls als funktionelles Ziel beider solitärer LTRs dienen könnte. *DQ-LTR3* und *DQ-LTR13* könnten als Enhancer-ähnliche Elemente auf die Transkription und damit auch die Expression des DQB1 Gens wirken. Eine vergleichbare Aktivität, wenn auch in einem anderen zellulären Kontext, konnte für HERV-H (RTVL-H) LTRs in transienten Transfektionsversuchen bereits gezeigt werden (Feuchter und Mager 1990). Die generelle Beteiligung von LTRs an der Regulation der Transkription verschiedener Gene wurde in mehreren Studien demonstriert (Di et al. 1995; Feuchter-Murthy et al. 1993; Feuchter et al. 1992; Kato et al. 1990; Liu und Abraham 1991). Ein spezieller Nachweis der transkriptionellen Regulation des DQB1 Gens durch benachbarte LTRs wurde jedoch bisher nicht erbracht.

Aufgrund ihrer unmittelbaren Nähe zum DQB1 Gen wurde zunächst die Funktionalität von *DQ-LTR13* als möglicher Enhancer untersucht. Besondere Beachtung fand dabei ihre Bedeutung für die Risikoallele DQB1*0302 (*DQ8*) und DQB1*0201 (*DQ2*). Der Promotor des Risikoallels DQB1*0302 zeigte unter dem Einfluß von *DQ-LTR13* in den untersuchten lymphoblastoiden B- und T-Zelllinien eine 4-6-fach höhere Aktivität im Vergleich zu der des Promotors ohne die LTR (siehe Abb. 3.4). Dieser Effekt war jedoch abhängig von Orientierung und Position der LTR relativ zum Promotor. Transfektionen mit zusätzlichen Konstrukten, die die LTR in reverser Orientierung stromaufwärts vom Promotor und in normaler und reverser transkriptioneller Orientierung stromabwärts vom Luciferase-Gen enthielten, ergaben keinen verstärkenden Effekt auf die Expression des Luciferase-Gens. Demzufolge ist die Wirkung von *DQ-LTR13* auf den Promotor des Risikoallels DQB1*0302 auf deren natürliche Position und Orientierung im genomischen Kontext beschränkt. Die klassischen Merkmale eines Enhancers, nämlich dessen Funktionalität unabhängig von seiner Orientierung und über große Entfernungen, sind damit nicht erfüllt. Man kann die LTR in dem gegebenen Kontext eher als ("upstream regulatory") stromaufwärts gelegenes regulatorisches Element bezeichnen.

Ein anderes Bild zeigte sich für die Wirkung von *DQ-LTR13* auf den Promotor des Risikoallels DQB1*0201. Dieser Promotor zeigte unter dem Einfluß der LTR eine um den Faktor 2-3-fach verminderte Aktivität (siehe Abb. 3.6). Der Effekt der gleichen solitären LTR war damit zum einen weniger stark und zum anderen gegenteilig ausgeprägt.

Die unterschiedliche Ausprägung der Wirkungsweise der LTR bezogen auf die beiden Risikoallele stimmt mit ihrer unterschiedlichen Risikovermittlung überein. Die

Suszeptibilität einer Erkrankung an Typ 1 Diabetes mellitus, die von den beiden Risikohaplotypen *DQ2* und *DQ8* vermittelt wird, wird von *DQ-LTR13* ebenfalls auf unterschiedliche Weise beeinflusst. Während für den *DQ8* Haplotypen die Anwesenheit von *DQ-LTR13* die Suszeptibilität erhöht, ist es für *DQ2* deren Abwesenheit. Die Signifikanz der erhöhten Transmissionsrate von *DQ8/LTR13*⁺ gegenüber *DQ2/LTR13*⁻ Haplotypen ist wesentlich stärker ausgeprägt (siehe Tab. 3.1; $p^{\chi^2}=2,58 \times 10^{-4}$ gegenüber $p^{\chi^2}=0,01$). Darüber hinaus ist das durch die beiden Haplotypen vermittelte relative Risiko einer Erkrankung an Typ 1 Diabetes mellitus unterschiedlich groß (siehe Tab. 3.3), nämlich 1,81 für *DQ8/LTR13*⁺ gegenüber 1,54 für *DQ2/LTR13*⁻. In den funktionellen Analysen zeigte sich, daß genau die LTR-Allel-Kombination eine höhere Aktivität des spezifischen Promotors bewirkte, die zuvor in der Familienassoziationsstudie als der genetische Risikomarker mit der höheren Signifikanz definiert worden war. Darüber hinaus zeigte sogar die Ausprägung der Aktivitätssteigerungen Korrelationen zur Größe des durch die unterschiedlichen Risikohaplotypen vermittelten relativen Risikos für eine Erkrankung an Typ 1 Diabetes mellitus.

In weiterführenden Untersuchungen wurde ein möglicher zusätzlicher Einfluß der zweiten im MHC lokalisierten LTR *DQ-LTR3* auf *DQ-LTR13* bzw. auf den Promotor des *DQB1* Gens analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.7 dargestellt. Exemplarisch wurde hierfür der Promotor des Risikoallels *DQB1*0302* ausgewählt. *DQ-LTR3* zeigte jedoch weder einen der *DQ-LTR13* vergleichbaren alleinigen Einfluß auf die Aktivität des Promotors noch einen zu dem durch *DQ-LTR13* vermittelten zusätzlichen Effekt. Die solitäre LTR der Familie HERV-K zeigte damit im genomischen Kontext des MHC bezüglich des ausgewählten IDDM Risikoallels keine über die eines genetischen Risikomarkers im Rahmen einer statistischen Bewertung hinausgehenden funktionellen Eigenschaften.

Das unter der Kontrolle der untersuchten Promotoren stehende *DQB1* Gen kodiert für die β -Kette des als glykosyliertes α/β -Heterodimer auf der Zelloberfläche exprimierten MHC-Moleküls (Kappes und Strominger 1988). Dessen Expression wird durch komplexe Mechanismen gesteuert, die sowohl *cis*- als auch *trans*-regulierende Elemente beinhalten (Benoist und Mathis 1990; Glimcher und Kara 1992).

Es wurden bereits einige *trans*-regulierende Proteine identifiziert u.a. NF-X1 (Song et al. 1994), NF-Y (Hooft et al. 1990; Mantovani et al. 1992; Mantovani et al. 1994; Reith et al. 1994; Sinha et al. 1995; Zeleznik et al. 1991), YB-1 (Ting et al. 1994; Wolffe 1994) und NF-J (Sugawara et al. 1995), für die eine Bindung an den *DQ*-Promotor bereits

demonstriert wurde (Mach et al. 1996). Darüber hinaus wurde ein allelischer Polymorphismus in der 5'-flankierenden regulatorischen Region des DQB1 Gens beschrieben, der Auswirkungen auf die transkriptionelle Aktivität und die Affinität für DNA-Bindungsfaktoren hat (Andersen et al. 1991). Ein TG-Dinukleotid-Polymorphismus an Position -179/-180 innerhalb der sog. "upstream regulatory region" (URR), zwischen der X- und der W-Box, ist dabei von besonderer Bedeutung (Andersen et al. 1991). Er ist zum einen nicht in allen *DQ*-Allelen ausgeprägt und es konnte gezeigt werden, daß im Zellkern ein DNA-Bindungsprotein bzw. ein Komplex aus Proteinen existiert, der nur an Allele bindet, die dieses TG-Dinukleotid enthalten (Shewey et al. 1992). Die möglichen DNA-Bindungsproteine sind bisher nicht im einzelnen identifiziert. Die Abwesenheit des TG-Nukleotids in einigen Allelen bewirkt nicht nur das Fehlen einer potentiellen Proteinbindungsstelle, sondern verringert zusätzlich den Abstand zwischen der X- und der W-Box innerhalb der URR. Dies hat einen signifikanten Einfluß auf die Allel-spezifische Expressionsrate (Beaty et al. 1995).

Während das Allel DQB1*0302 des IDDM Risikohaplotypen *DQ8* das TG-Dinukleotid trägt, fehlt es dem zweiten Risikoallel DQB1*0201 (*DQ2*) (Reichstetter et al. 1994). In einem Vergleich zwischen DQB1*0302 (TG-positiv) und DQB1*0301 (TG-negativ) konnte bereits gezeigt werden, daß die Anwesenheit des TG-Dinukleotids in einer reduzierten Expression des spezifischen Allels resultiert (Beaty et al. 1995).

Ein ähnlicher Unterschied könnte in der Expression von DQB1*0302 und DQB1*0201 (TG-negativ) bestehen. Möglicherweise kann *DQ-LTR13* auf dem Risikoallel DQB1*0302 nur dann positiven Einfluß auf die Transkription des spezifischen Gens nehmen, wenn dort gleichzeitig die bereits erwähnten DNA-Bindungsproteine an das TG-Nukleotid gebunden vorliegen. Eine dadurch potentiell stattfindende Wechselwirkung zwischen LTR und Protein/TG-Komplex könnte über einen bisher unbekanntem Mechanismus zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität des Promotors führen. Im Falle des Allels DQB1*0201 wären dessen Interaktionen mit *DQ-LTR13* aufgrund des nicht-vorhandenen Partners für die spezifischen DNA-Bindungsproteine möglicherweise anders ausgeprägt, die Wirkung der LTR auf den spezifischen Promotor tendenziell negativ-regulatorisch. In einem solchen Fall wäre zwar die Expression des Allels durch die Anwesenheit von *DQ-LTR13* negativ beeinflusst, die Aktivität des Promotors jedoch durch die Abwesenheit des TG-Dinukleotids natürlicherweise erhöht. Der Einfluß der retroviralen LTR könnte damit Risikoallel-spezifisch differentiell ausgeprägt sein.

Auf der Grundlage dieses Erklärungsmodells wäre *DQ-LTR13* als zufällige Integration zu betrachten, die dadurch charakterisiert ist, daß sie in der Lage ist, eine auf Sequenzunterschieden innerhalb der Promotorregion des *DQB1* Gens basierende Differenz in der Expressionsstärke (Beaty et al. 1995) *DQB1*-Allel-spezifisch auszugleichen bzw. umzukehren. Die LTR könnte auf dieser Basis die im Luciferase Assay beobachtete unterschiedlich ausgeprägte Promotoraktivität der IDDM Risikoallele *DQB1*0201* und *DQB1*0302* bewirken. Eine genaue Analyse der putativen Transkriptionsfaktor-Bindestellen innerhalb der LTR und die eindeutige Identifizierung von speziellen Bindungsproteinen innerhalb des Proteinkomplexes im Zusammenhang mit dem TG-Dinukleotid-Polymorphismus könnte einen Beitrag zur Charakterisierung möglicher Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten leisten.

Die genetische Prädisposition für eine Erkrankung an Typ 1 Diabetes mellitus, die durch spezifische *DQB1* Allele vermittelt wird, liegt in deren Struktur begründet (Todd et al. 1987). Die Allele, die Resistenz gegen eine Erkrankung an Typ 1 Diabetes mellitus vermitteln, tragen an Position 57 ihrer β -Kette Asparaginsäure, während Allele wie *DQB1*0201* und *DQB1*0302*, die an dieser Position eine neutrale Aminosäure wie Alanin, Valin oder Serin tragen, eine erhöhte Suszeptibilität vermitteln (Erlich 1989; Horn et al. 1988; Todd et al. 1987). Die Anwesenheit einer ungeladenen Aminosäure gegenüber einer negativ geladenen könnte die Stabilität der α/β -Konformation des Heterodimers verändern und so dessen Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor beeinträchtigen (Erlich 1989). Der Mechanismus, durch den spezifische Allele Suszeptibilität für oder Protektion gegen Diabetes vermitteln, ist noch nicht vollständig geklärt. Ein Erklärungsansatz basiert jedoch darauf, daß suszeptible Moleküle diabetogene Antigene mit einer geringen Affinität binden, während protektive Moleküle eine höhere Affinität besitzen (Ridgway und Fathman 1998). Das würde dazu führen, daß im ersten Fall autoreaktive T-Zell-Klone während der Ontogenese des Immunsystems der negativen Selektion entgehen könnten, wohingegen im zweiten Fall eine erfolgreiche negative Selektion der potentiell autoreaktiven T-Zellen im Thymus stattfände (Ridgway und Fathman 1998).

Ein möglicher Einfluß von *DQ-LTR13* in diesem speziellen Kontext könnte darin bestehen, die Expression der für Typ 1 Diabetes mellitus "suszeptiblen" Allele zu erhöhen. Dadurch würde das Risiko eines Fehlers in der negativen Selektion vergrößert werden und es könnten vermehrt potentiell autoreaktive T-Zellen auftreten.

Es gibt diverse Erklärungsansätze für die tatsächliche Ursache des Ausbruchs von Typ 1 Diabetes mellitus, von denen sich einige mit den unterschiedlichen Populationen von T-Lymphozyten und deren Autoreaktivität beschäftigen. Ein begrenztes Repertoire an autoreaktiven T-Zellen ist auch in jedem gesunden Individuum vorhanden und kann im Verlauf von Infektionen aktiviert werden (Wucherpfennig und Strominger 1995). Zytokine scheinen bei diesem Prozess eine Schlüsselrolle zu spielen, da sie die notwendigen Signale liefern. Wenn das Zytokinprofil autoreaktiver T-Zellen sich in Richtung inflammatorischer Th1-Zellen verschiebt, kann dies zu Autoimmunerkrankungen führen (Liblau et al. 1995; Tian et al. 1998). Die Entscheidung darüber, ob es zu einer Erkrankung kommt oder nicht, sowie die Kinetik der Krankheit hängen jedoch entscheidend von der Zahl autoreaktiver T-Zellen ab. Die natürlicherweise in jedem Individuum vorkommende Zahl an naiven autoreaktiven Zellen und deren Grad an Aktivierung ist im Normalfall zu gering, um eine Autoimmunerkrankung auszulösen (Steinman 1996). Wenn jedoch externe Faktoren wie z.B. eine Virus-induzierte Kreuzreaktivität oder auch prädisponierende genetische Faktoren wie die o.a. Risikoallele im MHC auftreten, könnte sich das immunologische Gleichgewicht verschieben und es würde ein Prozeß ausgelöst werden, der in Autoimmunität resultieren kann (Steinman 1996). *DQ-LTR13* könnte dabei einen Beitrag leisten, indem sie die Expression prädisponierender Allele durch An- oder Abwesenheit spezifisch erhöht und damit die Zahl autoreaktiver T-Zellen gegenüber gesunden Individuen, die kein Risikoallel tragen, über einen Schwellenwert (Steinman 1996) hinaus vergrößert.

Der Ausbruch des Typ 1 Diabetes mellitus könnte darüber hinaus durch die gestörte Funktion einer spezifischen T-Zell-Population begünstigt werden. In gesunden Individuen befinden sich potentiell autoreaktive T-Zellen, die im Fall des Typ 1 Diabetes mellitus gegen Epitope körpereigener Antigene wie Insulin und Glutamat-Decarboxylase (GAD65) gerichtet sind (Roep 1996), unter der Kontrolle sogenannter T-Suppressor-Zellen, die deren Aktivität unterdrücken. Kommt es jedoch durch MHC II-vermittelte Antigenpräsentation zu einer Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten bei gestörter Suppressorfunktion, könnte es zu einer unkontrollierten klonalen Expansion dieser Zellen kommen, die eine Kaskade spezifischer, gegen die körpereigenen β -Zellen des Pankreas gerichteter, Reaktionen und unspezifischer Entzündungsreaktionen auslösen würde, was letztendlich eine Zerstörung der Insulin-produzierenden β -Zellen zur Folge hätte (Rabinovitch und Skyler 1998). Darüber hinaus zeigen sich auch in den der Antigenpräsentation folgenden Abläufen häufig Störungen: verminderte Aktivität von T-

Suppressorzellen (CD8-positiv) gegenüber GAD65 (Togun et al. 1997), Anstieg der Zahl zirkulierender CD4-positiver T-Lymphozyten (Petersen et al. 1996) und gesteigerte Reaktivität peripher zirkulierender T-Lymphozyten gegen β -Zell Membranbestandteile (Roep et al. 1995). Der genaue Mechanismus dieser Zell-vermittelten Autoimmunität ist noch nicht aufgeklärt. Häufig diskutiert wird die Beteiligung des Coxsackie Virus B4 an der Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen (King et al. 1983). Für diesen Aspekt gibt es zwei mögliche Erklärungsansätze. Zum einen ist bekannt, daß das Coxsackie B Virus Inselzellen *in vitro*, und im Pankreas *in vivo*, infizieren kann (Jenson und Rosenberg 1984), was gegen eine autoimmunologisch vermittelte Reaktion und für eine direkte Zerstörung der β -Zellen sprechen würde. Andererseits ist bereits mehrfach die Möglichkeit eines molekularen Mimikry zwischen dem Virusprotein P2C des Coxsackie Virus B4 und dem Autoantigen Glutamat-Decarboxylase (GAD) beschrieben worden (Hou et al. 1994; Kukreja und Maclaren 2000). Dadurch würden autoreaktive T-Lymphozyten in einer Kreuzreaktion sowohl virale als auch körpereigene Determinanten als fremd erkennen und zerstören (Barnett und Fujinami 1992; Baum et al. 1996; Oldstone 1987).

4.3 Einfluß von *DQ-LTR13* auf die Transkriptionsrate ausgewählter *DQB1* Gene *in vivo*

Die Wirkung von *DQ-LTR13* auf die Expression der IDDM Risikoallele *DQB1*0201* und *DQB1*0302* über deren Promotor wurde in der vorliegenden Arbeit bisher nur *in vitro*, basierend auf einem Reportergenassay betrachtet. Die Rolle von *DQ-LTR13* in der sehr komplexen Ätiologie des Typ 1 Diabetes mellitus als putativ regulatorisches Element sollte darüber hinaus in *in vivo* Analysen im sog. "Nuclear Run-On Assay" charakterisiert und verifiziert werden. Dabei sollte die tatsächliche Aktivität ausgewählter Promotoren in Abhängigkeit der LTR in einem Vergleichsexperiment analysiert werden. Da der *in vitro* zu beobachtende Einfluß der LTR nicht sehr stark ausgeprägt war, basierten die weiterführenden Untersuchungen auf der Verwendung homozygoter B-lymphoblastoider Zelllinien, die für den betrachteten *DQ*-Haplotypen homozygot sind und sich nur in der An- und Abwesenheit der solitären LTR unterscheiden. So wurde zum einen die Beeinflussung des Ergebnisses durch einen zweiten *DQ*-Haplotypen ausgeschlossen und die Grundlage für die größtmögliche, von *DQ-LTR13* ausgehende, Wirkung geschaffen. Jede Heterozygotie in diesem Bereich würde den möglicherweise zu beobachtenden Effekt

halbieren. In diesem Fall würde die Sensitivität der verwendeten mRNA-Analysen möglicherweise nicht ausreichen.

Die Problematik des geplanten Versuchs bestand in der Auswahl des zu analysierenden Kollektivs. Benötigt wurden für die entsprechenden Merkmale homozygote Zelllinien oder Probanden der Haplotypen *DQ2/LTR13*⁺ im Vergleich zu *DQ2/LTR13*⁻ und *DQ8/LTR13*⁺ im Vergleich zu *DQ8/LTR13*⁻. Etwa 20% der kaukasischen Bevölkerungsgruppe sind positiv für *DQ2*, während nur etwa 10% positiv für *DQ8* sind (Marsh et al. 2000), nur einige davon sind homozygot für die betrachteten Merkmale. Aufgrund dieser Allelverteilung konnten bisher nur *DQ2* homozygote Zelllinien identifiziert werden, die nach Genotypisierung für *DQ-LTR13* die entsprechenden Anforderungen erfüllten. Für *DQ8* wurden nach Typisierung bisher nur homozygot *DQ-LTR13*-positive bzw. heterozygote Zelllinien und Individuen identifiziert.

Die in Abb. 3.8 dargestellten Ergebnisse für die Zelllinien ALJ5 (*DQ2/LTR13*⁺) und IBW9 (*DQ2/LTR13*⁻) zeigen zwar für die verwendeten Positivkontrollen sehr starke Banden, die Bindung der radioaktiv markierten RNA an die für *DQ* spezifischen Sonden ist jedoch sehr schwach ausgeprägt, so daß ein quantitativer Vergleich in Abhängigkeit von *DQ-LTR13* nicht möglich war. Zur Detektion der gebildeten mRNA wurden zwei verschiedene cDNA-Sonden eingesetzt, die aus RNA unterschiedlicher Zelllinien generiert wurden. Für keine der beiden konnte eine sichtbar positivere Reaktion gezeigt werden.

Für dieses Ergebnis gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten, die jedoch beide auf eine geringe Transkriptionsrate der MHC Klasse II-Gene und damit eine schwache Expression der Moleküle auf der Zelloberfläche der untersuchten Zelllinien zurückzuführen sind.

Ein Ansatz beruht auf der Verwendung EBV-transformierter Zelllinien. Untersuchungen haben gezeigt, daß die MHC Klasse II-Expression auf EBV-transformierten Zellen, die sich in der Phase des lytischen Zyklus befinden, um etwa 40-50% reduziert ist (Keating et al. 2002). Dies könnte zu einer Abschwächung des Signals im Nuclear Run-On Assay führen und möglicherweise sogar die Nachweisgrenze unterschreiten.

Der zweite Ansatz basiert auf der gegebenen Regulation der MHC Klasse II Expression auf der Zelloberfläche. Die EBV-transformierten B-Zellen wurden für die Untersuchungen ausgewählt, da sie als Vertreter der Antigen-präsentierenden Zellen konstitutiv MHC Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die konstitutive oder auch basale MHC Klasse II-Expression positiver Zellen wird abhängig vom Entwicklungsstatus der Zelle reguliert, kann jedoch durch unterschiedliche Stimuli moduliert werden. Für B-Zellen ist IL-4 der Regulator mit der höchsten Effektivität (Burstein et al. 1991; Erb et al. 1994).

Generell wird die Expression der MHC Klasse II-Gene auf der Stufe der Transkription reguliert. Sowohl die konstitutive als auch die induzierbare Form der Expression werden durch den Transaktivator CIITA vermittelt (Steimle et al. 1994), der dabei die Rolle eines übergeordneten Regulators übernimmt (Mach et al. 1996; Reith et al. 1995). Untersuchungen haben gezeigt, daß es zu einer strikten Co-Expression von CIITA und MHC II kommt, die sowohl qualitativ als auch quantitativ korreliert (Otten et al. 1998). Bisher konnte keine direkte Bindung von CIITA an den MHC Klasse II-Promotor beobachtet werden (Steimle et al. 1993). Man vermutet deshalb, daß CIITA als eine Art Co-Aktivator seine Wirkung entfaltet (Steimle et al. 1993), der mit Faktoren interagiert, die an MHC Klasse II-Promotoren binden (Steimle et al. 1993; Zhou und Glimcher 1995). Dieser Co-Aktivator wird wiederum durch unterschiedliche IFN- γ -Konzentrationen reguliert (Otten et al. 1998). Ein mögliches Regulationsmodell für die Kontrolle der MHC Klasse II-Expression, beruhend auf der spezifischen Aktivierung unterschiedlicher Promotoren, ist in Abb. 4.1 gezeigt.

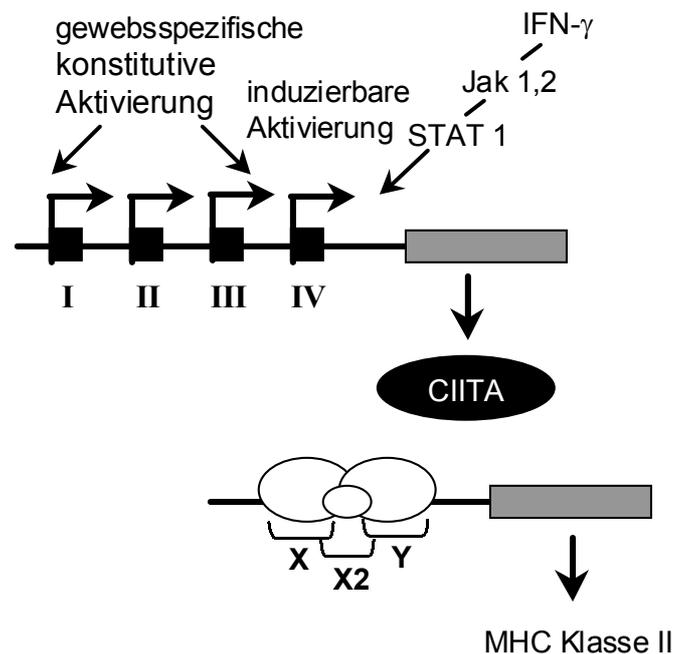


Abb. 4.1 Schematische Darstellung des Promotor-spezifischen Kontrollmechanismus zur CIITA- und MHC II-Expression modifiziert nach Muhlethaler-Mottet et al. (1997)

Dieses Modell basiert auf der Entwicklung eines Promotor-Systems zur Feinregulation der CIITA-Expression durch unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, die an verschiedene

Promotoren binden und in unterschiedlichen Zelltypen auf variable Signale reagieren (Muhlethaler-Mottet et al. 1997).

Die sehr schwach ausgeprägten Banden des Nuclear Run-On Assays lassen eine sehr geringe Expression der MHC Klasse II-Moleküle auf der Zelloberfläche der untersuchten Zellen vermuten. Dies könnte auf eine fehlende Induktion durch unterschiedliche Stimuli zurückzuführen sein. Eine Behandlung der Zellen mit IL-4 bzw. IFN- γ vor der eigentlichen Analyse könnte zu einer verstärkten Transkription der entsprechenden Gene führen und damit die nachzuweisende Menge an neu gebildeter mRNA deutlich erhöhen.

Zukünftige Untersuchungen mit dem Ziel der eindeutigen Charakterisierung des Einflusses von *DQ-LTR13* auf ausgewählte *DQB1*-Promotoren *in vivo* sollten unter Verwendung von Zellen stattfinden, die vor der Zellkernisolierung unter unterschiedlichen Kulturbedingungen gehalten wurden. Dazu müßte in einem Vorversuch der Einfluß von IL-4 und IFN- γ auf die MHC Klasse II-Expression in B-Zellen z.B. in FACS-Analysen definiert werden. Zusätzlich wäre es sinnvoll primäre Antigen-präsentierende Zellen definierter *DQ*-Haplotypen zu verwenden, um einen möglichen Einfluß der EBV-Transformation auf die Expression der MHC Klasse II-Moleküle auszuschließen.

Weitergehende Untersuchungen zur transkriptionsregulatorischen Wirkung von *DQ-LTR13* *in vivo* unter Einbeziehung interner Faktoren wie z.B. der Wirkungsweise unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren oder externer Faktoren wie z.B. Virusinfektionen könnten einen Beitrag zur Aufklärung der multifaktoriellen Ätiologie des Typ 1 Diabetes mellitus leisten.

5. Zusammenfassung

Der Typ 1 Diabetes mellitus (IDDM) ist eine multifaktorielle Erkrankung deren Risiko zu 50-60% von genetischen Faktoren vermittelt werden, wobei dem HLA-System auf Chromosom 6 (IDDM1) eine Schlüsselrolle zugesprochen wird. Innerhalb dieser Genregion befinden sich die beiden solitären retroviralen "long terminal repeats" (LTRs) *DQ-LTR3* und *DQ-LTR13*. Sie können theoretisch mit Hilfe ihrer regulatorischen Elemente die Expression benachbarter funktioneller Gene beeinflussen. Im Rahmen der Fragestellung nach einer möglichen Funktion retroviraler LTRs im Kontext des Typ 1 Diabetes mellitus ist das unmittelbar benachbarte *DQB1* Gen ein Kandidatengen von besonderer Bedeutung.

Im Rahmen einer Familienassoziationsstudie wurde *DQ-LTR13* als potentieller genetischer Risikomarker charakterisiert und es konnte gezeigt werden, daß die Haplotypen *DQ8/LTR13⁺* und *DQ2/LTR13⁻* signifikant häufiger transmittiert werden als bei einer zufälligen Vererbung erwartet. Gleichzeitig unterscheidet sich ihr Segregationsmuster signifikant von dem der Haplotypen *DQ8/LTR13⁻* und *DQ2/LTR13⁺*. Das Kopplungsungleichgewicht zwischen *DQ-LTR3* und *DQ-LTR13* ist so ausgeprägt, daß sie zwar präferentiell aber nicht ausschließlich zusammen auf einem Haplotypen vorkommen. Die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung an IDDM in Zusammenhang mit einem der beiden Risikohaplotypen *DQ8/LTR13⁺* bzw. *DQ2/LTR13⁻* liegt bei 76% bzw. 68%. Aufgrund dieser Ergebnisse ist *DQ-LTR13* insgesamt als unabhängiger genetischer Risikomarker für Typ 1 Diabetes mellitus zu bewerten, zusätzlich zu den bekannten Risikohaplotypen *DQ8* und *DQ2* und unabhängig von *DQ-LTR3*.

Im Rahmen funktioneller Analysen unter Verwendung eines Reporter-gen-Assays konnte nach Transfektion diverser EBV-transformierter lymphoblastoider B-Zellen für keine der beiden LTRs die Fähigkeit nachgewiesen werden, als eigenständiger Promotor auf die Expression des Reporter-gens Luciferase zu wirken. Diese Fähigkeit konnte auch nicht durch die Gabe von Hydrocortison bzw. β -Estradiol induziert werden.

DQ-LTR13 ist jedoch *in vitro* in der Lage, abhängig von transkriptioneller Orientierung und Position, über den Promotor des *DQB1* Gens verstärkend auf die Expression des Luciferase-Gens zu wirken. Dieser Effekt ist darüber hinaus, bezüglich der beiden Risikoallele *DQB1*0302* und *DQB1*0201*, differentiell ausgeprägt. Eine Verifizierung des beobachteten Effekts *in vivo* war im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit leider nicht möglich.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
APC	Antigen präsentierende Zelle ("antigen presenting cell")
Asp	Asparaginsäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum-Albumin ("bovine serum albumine")
CD	Immunzellenoberflächenmarker("cluster of differentiation")
CI	Konfidenzintervall
CTLA4	zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen 4
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ("deoxyribonucleic acid")
dNTP	Desoxyribonukleotid-Trisphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Env	Oberflächenmolekül der Retroviren ("envelope")
EBV	Epstein-Barr Virus
ERE	Estrogen-responsives Element ("estrogen responsive element")
ETDT	erweiterter TDT ("extended transmission distortion test")
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (gravitation $9,84 \text{ N/kg}^2$)
GAD	Glutamatdehydrogenase ("glutamic acid dehydrogenase")
Gag	Polyprotein der Struktur-Virusproteine ("group specific antigen")
GRE	Glucocorticoid-responsives Element ("glucocorticoid responsive element")
HERV	humanes endogenes Retrovirus ("human endogenous retrovirus")
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HLA	humanes Leukozyten Antigen ("human leucocyte antigen")
HRR	"haplotype relative risk"
HSRV	humanes Spumaretrovirus
HTLV	humanes T-lymphotropes Virus
IDDM	Typ 1 Diabetes mellitus ("insulin-dependent diabetes mellitus")
IFN	Interferon
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LD	Kopplungsungleichgewicht ("linkage disequilibrium")

LTR	"long terminal repeat"
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ("major histocompatibility complex")
MLV	murines Leukämievirus
MODY	"maturity-onset diabetes of the young"
M-PMV	Mason-Pfizer monkey virus
mRNA	"messenger ribonucleic acid"
m/w	Verhältnis männlich/weiblich
n.b.	nicht bestimmt
NIDDM	Typ 2 Diabetes ("non-insulin-dependent diabetes mellitus")
NOD	"non-obese diabetes"
NPV	"negative predictive value"
nt	nicht transmittiert
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen ("open reading frame")
p	Plasmid
PBS	Phosphat gepufferte Saline ("phosphate buffered saline")
PCR	Polymerase Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")
PPT	Polypurintrakt
RNA	Ribonukleinsäure ("ribonucleic acid")
Pol	Polymerase
PPV	"positive predictive value"
Pro	Protease
RR	relatives Risiko
RSV	Rous-Sarcoma Virus
RT	reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung ("standard deviation")
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Streptomycin, Penicillin
SSC	Natriumcitrat ("saline sodium citrate")
t	transmittiert / Transmission
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCR	T-Zellrezeptor ("T cell receptor")

TDT	"transmission disequilibrium test"
TNF	Tumornekrosefaktor ("tumor necrosis factor")
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit ("unit")
URR	"upstream regulatory region"
UV	ultraviolett
VLP	"virus-like particles"
VNTR	"variable number of tandem repeats"
WHO	Weltgesundheitsorganisation ("World Health Organization")

7. Literaturverzeichnis

1. (1979) Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National Diabetes Data Group. *Diabetes* 28:1039-57
2. (1998) Familial risk of type I diabetes in European children. The Eurodiab Ace Study Group and The Eurodiab Ace Substudy 2 Study Group. *Diabetologia* 41:1151-6
3. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74:5350-4
4. Andersen LC, Beaty JS, Nettles JW, Seyfried CE, Nepom GT, Nepom BS (1991) Allelic polymorphism in transcriptional regulatory regions of HLA-DQB genes. *J. Exp. Med.* 173:181-92
5. Andersson G, Svensson AC, Setterblad N, Rask L (1998) Retroelements in the human MHC class II region. *Trends. Genet.* 14:109-14
6. Atkinson MA, Bowman MA, Kao KJ, Campbell L, Dush PJ, Shah SC, Simell O, Maclaren NK (1993) Lack of immune responsiveness to bovine serum albumin in insulin-dependent diabetes. *N. Engl. J. Med.* 329:1853-8
7. Atkinson MA, Maclaren NK (1994) The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 331:1428-36
8. Awata T, Matsumoto C, Urakami T, Hagura R, Amemiya S, Kanazawa Y (1994) Association of polymorphism in the interferon gamma gene with IDDM. *Diabetologia* 37:1159-62
9. Bach JF (1994) Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr. Rev.* 15:516-42
10. Badenhop K, Walfish PG, Rau H, Fischer S, Nicolay A, Bogner U, Schleusener H, Usadel KH (1995) Susceptibility and resistance alleles of human leukocyte antigen (HLA) DQA1 and HLA DQB1 are shared in endocrine autoimmune disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 80:2112-7
11. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, DeCamilli P, Camilli PD (1990) Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347:151-6
12. Baltimore D (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226:1209-11
13. Baltimore D (1985) Retroviruses and retrotransposons: the role of reverse transcription in shaping the eukaryotic genome. *Cell* 40:481-2
14. Banki K, Maceda J, Hurley E, Ablonczy E, Mattson DH, Szegedy L, Hung C, Perl A (1992) Human T-cell lymphotropic virus (HTLV)-related endogenous sequence,

- HRES-1, encodes a 28-kDa protein: a possible autoantigen for HTLV-I gag-reactive autoantibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:1939-43
15. Barnett LA, Fujinami RS (1992) Molecular mimicry: a mechanism for autoimmune injury. *FASEB J.* 6:840-4
 16. Barre-Sinoussi F, Mathur-Wagh U, Rey F, Brun-Vezinet F, Yancovitz SR, Rouzioux C, Montagnier L, Mildvan D, Chermann JC (1985) Isolation of lymphadenopathy-associated virus (LAV) and detection of LAV antibodies from US patients with AIDS. *JAMA* 253:1737-9
 17. Baum H, Davies H, Peakman M (1996) Molecular mimicry in the MHC: hidden clues to autoimmunity? *Immunol. Today* 17:64-70
 18. Beato M, Chalepakis G, Schauer M, Slater EP (1989) DNA regulatory elements for steroid hormones. *J. Steroid Biochem.* 32:737-47
 19. Beaty JS, West KA, Nepom GT (1995) Functional effects of a natural polymorphism in the transcriptional regulatory sequence of HLA-DQB1. *Mol. Cell Biol.* 15:4771-82
 20. Beeson PB (1994) Age and sex associations of 40 autoimmune diseases. *Am. J. Med.* 96:457-62
 21. Bell JI, Todd JA, McDevitt HO (1989) The molecular basis of HLA-disease association. *Adv. Hum. Genet.* 18:1-41
 22. Bennett ST, Lucassen AM, Gough SC, Powell EE, Undlien DE, Pritchard LE, Merriman ME, Kawaguchi Y, Dronsfield MJ, Pociot F, . (1995) Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat. Genet.* 9:284-92
 23. Benoist C, Mathis D (1990) Regulation of major histocompatibility complex class-II genes: X, Y and other letters of the alphabet. *Annu. Rev. Immunol.* 8:681-715.:681-715
 24. Bingley PJ, Gale EA (1989) Rising incidence of IDDM in Europe. *Diabetes Care* 12:289-95
 25. Bishop JM, Varmus H (1984) Functions and origins of retroviral transforming genes. In: Weiss R, Teich N., Varmus H, Coffin J (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp 999-1108
 26. Bjork RL, Jr. (1991) HIV-1: seven facets of functional molecular mimicry. *Immunol. Lett.* 28:91-6
 27. Blond JL, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F, Cosset FL (2000) An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J. Virol.* 74:3321-9
 28. Bloom BR, Salgame P, Diamond B (1992) Revisiting and revising suppressor T cells. *Immunol. Today* 13:131-6

29. Boeke JD, Stoye JP (1997) Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp 343-436
30. Bonifacio E, Genovese S, Braghi S, Bazzigaluppi E, Lampasona V, Bingley PJ, Rogge L, Pastore MR, Boggetti E, Bottazzo GF, . (1995) Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity. *Diabetologia* 38:816-22
31. Bopegamage SA, Petrovicova A (1994) In vitro infection of mouse pancreatic islet cells with coxsackie viruses. *Acta Virol.* 38:251-5
32. Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PG, Gamble DR (1985) In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N. Engl. J. Med.* 313:353-60
33. Bratthauer GL, Fanning TG (1992) Active LINE-1 retrotransposons in human testicular cancer. *Oncogene* 7:507-10
34. Brookes SM, Pandolfino YA, Mitchell TJ, Venables PJ, Shattles WG, Clark DA, Entwistle A, Maini RN (1992) The immune response to and expression of cross-reactive retroviral gag sequences in autoimmune disease. *Br. J. Rheumatol.* 31:735-42
35. Burstein HJ, Tepper RI, Leder P, Abbas AK (1991) Humoral immune functions in IL-4 transgenic mice. *J. Immunol.* 147:2950-6
36. Callahan R (1988) Two families of human endogenous retroviral genomes. In: Lambert M, McDonald J, Weinstein I (eds) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp 91-100
37. Callahan R, Drohan W, Tronick S, Schlom J (1982) Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79:5503-7
38. Campbell IL, Cutri A, Wilkinson D, Boyd AW, Harrison LC (1989) Intercellular adhesion molecule 1 is induced on isolated endocrine islet cells by cytokines but not by reovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86:4282-6
39. Campbell IL, Oxbrow L, West J, Harrison LC (1988) Regulation of MHC protein expression in pancreatic beta-cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Mol. Endocrinol.* 2:101-7
40. Campbell RD, Trowsdale J (1993) Map of the human MHC. *Immunol. Today* 14:349-52
41. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-9
42. Coffin JM (1984) Endogenous retroviruses. In: Weiss R., Teich N., Varmus H, Coffin J (eds) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp 1109-203

43. Coffin JM (1992) Structure and classification of retroviruses. In: Levy JA (ed) Plenum, New York, pp 19-50
44. Coffin JM (1996) Retroviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. (eds) Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, pp 1767-847
45. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (1997) Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
46. Concannon P, Gogolin-Ewens KJ, Hinds DA, Wapelhorst B, Morrison VA, Stirling B, Mitra M, Farmer J, Williams SR, Cox NJ, Bell GI, Risch N, Spielman RS (1998) A second-generation screen of the human genome for susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nat. Genet.* 19:292-6
47. Conrad B, Weidmann E, Trucco G, Rudert WA, Behboo R, Ricordi C, Rodriguez-Rilo H, Finegold D, Trucco M (1994) Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology. *Nature* 371:351-5
48. Conrad B, Weissmahr RN, Boni J, Arcari R, Schupbach J, Mach B (1997) A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* 90:303-13
49. Copeman JB, Cucca F, Hearne CM, Cornall RJ, Reed PW, Ronningen KS, Undlien DE, Nistico L, Buzzetti R, Tosi R, . (1995) Linkage disequilibrium mapping of a type 1 diabetes susceptibility gene (IDDM7) to chromosome 2q31-q33. *Nat. Genet.* 9:80-5
50. Cordonnier A, Casella JF, Heidmann T (1995) Isolation of novel human endogenous retrovirus-like elements with foamy virus-related pol sequence. *J. Virol.* 69:5890-7
51. Couper JJ, Steele C, Beresford S, Powell T, McCaul K, Pollard A, Gellert S, Tait B, Harrison LC, Colman PG (1999) Lack of association between duration of breast-feeding or introduction of cow's milk and development of islet autoimmunity. *Diabetes* 48:2145-9
52. Covey SN (1986) Amino acid sequence homology in gag region of reverse transcribing elements and the coat protein gene of cauliflower mosaic virus. *Nucleic Acids Res.* 14:623-33
53. Cucca F, Goy JV, Kawaguchi Y, Esposito L, Merriman ME, Wilson AJ, Cordell HJ, Bain SC, Todd JA (1998) A male-female bias in type 1 diabetes and linkage to chromosome Xp in MHC HLA-DR3-positive patients. *Nat. Genet.* 19:301-2
54. Czauderna F, Fischer N, Boller K, Kurth R, Tönjes RR (2000) Establishment and characterization of molecular clones of porcine endogenous retroviruses replicating on human cells. *J. Virol.* 74:4028-38
55. Dahlquist G, Blom L, Lonnberg G (1991) The Swedish Childhood Diabetes Study-a multivariate analysis of risk determinants for diabetes in different age groups. *Diabetologia* 34:757-62

56. Dahlquist G, Gustavsson KH, Holmgren G, Hagglof B, Larsson Y, Nilsson KO, Samuelsson G, Sterky G, Thalme B, Wall S (1982) The incidence of diabetes mellitus in Swedish children 0-14 years of age. A prospective study 1977-1980. *Acta Paediatr. Scand.* 71:7-14
57. Dahlquist GG, Ivarsson S, Lindberg B, Forsgren M (1995) Maternal enteroviral infection during pregnancy as a risk factor for childhood IDDM. A population-based case-control study. *Diabetes* 44:408-13
58. Dangel AW, Mendoza AR, Baker BJ, Daniel CM, Carroll MC, Wu LC, Yu CY (1994) The dichotomous size variation of human complement C4 genes is mediated by a novel family of endogenous retroviruses, which also establishes species-specific genomic patterns among Old World primates. *Immunogenetics* 40:425-36
59. Davies JL, Cucca F, Goy JV, Atta ZA, Merriman ME, Wilson A, Barnett AH, Bain SC, Todd JA (1996) Saturation multipoint linkage mapping of chromosome 6q in type 1 diabetes. *Hum. Mol. Genet.* 5:1071-4
60. Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, Reed PW, Gough SC, Jenkins SC, Palmer SM (1994) A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 371:130-6
61. De Carli M, D'Elis MM, Zancuoghi G, Romagnani S, Del Prete G (1994) Human Th1 and Th2 cells: functional properties, regulation of development and role in autoimmunity. *Autoimmunity* 18:301-8
62. Deininger PL, Batzer MA (1993) In: Hecht MK, MacIntyre RJ, Cleggs MT (eds) Plenum, New York, pp 157-96
63. Delepine M, Pociot F, Habita C, Hashimoto L, Froguel P, Rotter J, Cambon-Thomsen A, Deschamps I, Djoulah S, Weissenbach J, Nerup J, Lathrop M, Julier C (1997) Evidence of a non-MHC susceptibility locus in type I diabetes linked to HLA on chromosome 6. *Am. J. Hum. Genet.* 60:174-87
64. Di CA, Strazullo M, Longo L, La MG (1995) Characterization and genomic mapping of the ZNF80 locus: expression of this zinc-finger gene is driven by a solitary LTR of ERV9 endogenous retroviral family. *Nucleic. Acids. Res.* 23:2823-30
65. Diabetes Epidemiology Research International Group (1988) Geographic patterns of childhood insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 39:1113-9
66. Domansky AN, Kopantzev EP, Snezhkov EV, Lebedev YB, Leib-Mösch C, Sverdlov ED (2000) Solitary HERV-K LTRs possess bi-directional promoter activity and contain a negative regulatory element in the U5 region. *FEBS Lett.* 472:191-5
67. Dombroski BA, Mathias SL, Nanthakumar E, Scott AF, Kazazian HH, Jr. (1991) Isolation of an active human transposable element. *Science* 254:1805-8
68. Donner H, Tönjes RR, Bontrop RE, Kurth R, Usadel KH, Badenhop K (1999a) Intronic sequence motifs of HLA-DQB1 are shared between humans, apes and Old

- World monkeys, but a retroviral LTR element (DQLTR3) is human specific. *Tissue Antigens*. 53:551-8
69. Donner H, Tönjes RR, Bontrop RE, Kurth R, Usadel KH, Badenhop K (2000) MHC diversity in Caucasians, investigated using highly heterogeneous noncoding sequence motifs at the DQB1 locus including a retroviral long terminal repeat element, and its comparison to nonhuman primate homologues [In Process Citation]. *Immunogenetics* 51:898-904
 70. Donner H, Tönjes RR, Van der Auwera B, Siegmund T, Braun J, Weets I, Herwig J, Kurth R, Usadel KH, Badenhop K (1999b) The presence or absence of a retroviral long terminal repeat influences the genetic risk for type 1 diabetes conferred by human leukocyte antigen DQ haplotypes. *Belgian Diabetes Registry. J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:1404-8
 71. Dorf ME, Kuchroo VK, Collins M (1992) Suppressor T cells: some answers but more questions. *Immunol. Today* 13:241-3
 72. Dorman JS, LaPorte RE, Stone RA, Trucco M (1990) Worldwide differences in the incidence of type I diabetes are associated with amino acid variation at position 57 of the HLA-DQ beta chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87:7370-4
 73. Eickbush TH (1992) Transposing without ends: the non-LTR retrotransposable elements. *New Biol.* 4:430-40
 74. el Hashimy M, Angelico MC, Martin BC, Krolewski AS, Warram JH (1995) Factors modifying the risk of IDDM in offspring of an IDDM parent. *Diabetes* 44:295-9
 75. Ellermann V., Bang O. (1908) Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralb. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig.* 46:595-609
 76. Erb KJ, Holtschke T, Muth K, Horak I, Schimpl A (1994) T cell subset distribution and B cell hyperreactivity in mice expressing interleukin-4 under the control of major histocompatibility complex class I regulatory sequences. *Eur. J. Immunol.* 24:1143-7
 77. Erlich HA (1989) HLA and insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 337:415
 78. Esposito L, Hill NJ, Pritchard LE, Cucca F, Muxworthy C, Merriman ME, Wilson A, Julier C, Delepine M, Tuomilehto J, Tuomilehto-Wolf E, Ionesco-Tirgoviste C, Nistico' L, Buzzetti R, Pozzilli P, Ferrari M, Bosi E, Pociot F, Nerup J, Bain SC, Todd JA (1998) Genetic analysis of chromosome 2 in type 1 diabetes: analysis of putative loci IDDM7, IDDM12, and IDDM13 and candidate genes NRAMP1 and IA-2 and the interleukin-1 gene cluster. *IMDIAB Group. Diabetes* 47:1797-9
 79. EURODIAB Substudy 2 Study Group (2000) Infections and vaccinations as risk factors for childhood type I (insulin-dependent) diabetes mellitus: a multicentre case-control investigation. *Diabetologia* 43:47-53
 80. Falk CT, Rubinstein P (1987) Haplotype relative risks: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations. *Ann. Hum. Genet.* 51:227-33

81. Feuchter-Murthy AE, Freeman JD, Mager DL (1993) Splicing of a human endogenous retrovirus to a novel phospholipase A2 related gene. *Nucleic Acids Res.* 21:135-43
82. Feuchter A, Mager D (1990) Functional heterogeneity of a large family of human LTR-like promoters and enhancers. *Nucleic Acids Res.* 18:1261-70
83. Feuchter AE, Freeman JD, Mager DL (1992) Strategy for detecting cellular transcripts promoted by human endogenous long terminal repeats: identification of a novel gene (CDC4L) with homology to yeast CDC4. *Genomics* 13:1237-46
84. Field LL (2002) Genetic linkage and association studies of Type I diabetes: challenges and rewards. *Diabetologia* 45:21-35
85. Field LL, Tobias R, Magnus T (1994) A locus on chromosome 15q26 (IDDM3) produces susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nat. Genet.* 8:189-94
86. Field LL, Tobias R, Thomson G, Plon S (1996) Susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus maps to a locus (IDDM11) on human chromosome 14q24.3-q31. *Genomics* 33:1-8
87. Foulis AK, McGill M, Farquharson MA (1991) Insulitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man--macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. *J. Pathol.* 165:97-103
88. Friedman SM, Tumang JR, Crow MK (1993) Microbial superantigens as etiopathogenic agents in autoimmunity. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 19:207-22
89. Gale EA, Gillespie KM (2001) Diabetes and gender. *Diabetologia* 44:3-15
90. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, . (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224:500-3
91. Garfinkel D (1992) Retroelements in microorganisms. In: Levy J.A. (ed) Plenum Press, New York, pp 107-58
92. Garry RF (1990) Extensive antigenic mimicry by retrovirus capsid proteins. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 6:1361-2
93. Gelderblom HR (1987) Oncovirinae: type D oncovirus. In: Nermut MV, Steven AC (eds) Elsevier, Amsterdam, pp 289-94
94. Gepts W (1965) Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 14:619-33
95. Ginsberg-Fellner F, Witt ME, Yagihashi S, Dobersen MJ, Taub F, Fedun B, McEvoy RC, Roman SH, Davies RG, Cooper LZ (1984) Congenital rubella syndrome as a model for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: increased prevalence of islet cell surface antibodies. *Diabetologia* 27 Suppl:87-9.:87-9

96. Glimcher LH, Kara CJ (1992) Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription. *Annu. Rev. Immunol.* 10:13-49.:13-49
97. Goodchild NL, Freeman JD, Mager DL (1995) Spliced HERV-H endogenous retroviral sequences in human genomic DNA: evidence for amplification via retrotransposition. *Virology* 206:164-73
98. Gorsuch AN, Spencer KM, Lister J, Wolf E, Bottazzo GF, Cudworth AG (1982) Can future type I diabetes be predicted? A study in families of affected children. *Diabetes* 31:862-6
99. Hanenberg H, Kolb-Bachofen V, Kantwerk-Funke G, Kolb H (1989) Macrophage infiltration precedes and is a prerequisite for lymphocytic insulitis in pancreatic islets of pre-diabetic BB rats. *Diabetologia* 32:126-34
100. Hanger JJ, Bromham LD, McKee JJ, O'Brien TM, Robinson WF (2000) The nucleotide sequence of koala (*Phascolarctos cinereus*) retrovirus: a novel type C endogenous virus related to Gibbon ape leukemia virus. *J. Virol.* 74:4264-72
101. Hanninen A, Jalkanen S, Salmi M, Toikkanen S, Nikolakaros G, Simell O (1992) Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest* 90:1901-10
102. Harrison LC, Honeyman MC (1999) Cow's milk and type 1 diabetes: the real debate is about mucosal immune function. *Diabetes* 48:1501-7
103. Hashimoto L, Habita C, Beressi JP, Delepine M, Besse C, Cambon-Thomsen A, Deschamps I, Rotter JI, Djoulah S, James MR, . (1994) Genetic mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q. *Nature* 371:161-4
104. Herniou E, Martin J, Miller K, Cook J, Wilkinson M, Tristem M (1998) Retroviral diversity and distribution in vertebrates. *J. Virol.* 72:5955-66
105. Herr W (1984) Nucleotide sequence of AKV murine leukemia virus. *J. Virol.* 49:471-8
106. Hirose Y, Takamatsu M, Harada F (1993) Presence of env genes in members of the RTVL-H family of human endogenous retrovirus-like elements. *Virology* 192:52-61
107. Hohenadl C, Leib-Mösch C, Hehlmann R, Erfle V (1996) Biological significance of human endogenous retroviral sequences. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 13 Suppl 1:S268-S273
108. Holmes SE, Dombroski BA, Krebs CM, Boehm CD, Kazazian HH, Jr. (1994) A new retrotransposable human L1 element from the LRE2 locus on chromosome 1q produces a chimaeric insertion. *Nat. Genet.* 7:143-8
109. Holmes SE, Singer MF, Swergold GD (1992) Studies on p40, the leucine zipper motif-containing protein encoded by the first open reading frame of an active human LINE-1 transposable element. *J. Biol. Chem.* 267:19765-8

110. Holzschu DL, Martineau D, Fodor SK, Vogt VM, Bowser PR, Casey JW (1995) Nucleotide sequence and protein analysis of a complex piscine retrovirus, walleye dermal sarcoma virus. *J. Virol.* 69:5320-31
111. Hooft vH, Li XY, Black D, Matthes H, Benoist C, Mathis D (1990) Co-evolution from yeast to mouse: cDNA cloning of the two NF-Y (CP-1/CBF) subunits. *EMBO J.* 9:3119-27
112. Horn GT, Bugawan TL, Long CM, Erlich HA (1988) Allelic sequence variation of the HLA-DQ loci: relationship to serology and to insulin-dependent diabetes susceptibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:6012-6
113. Horsfall AC, Neu E, Forrest G, Venables PJ, Field M (1998) Maternal autoantibodies and congenital heart block: clues from two consecutive pregnancies, one in which there was congenital complete heart block and one in which the fetus was healthy. *Arthritis Rheum.* 41:2079-80
114. Horton R, Niblett D, Milne S, Palmer S, Tubby B, Trowsdale J, Beck S (1998) Large-scale sequence comparisons reveal unusually high levels of variation in the HLA-DQB1 locus in the class II region of the human MHC. *J. Mol. Biol.* 282:71-97
115. Hou J, Said C, Franchi D, Dockstader P, Chatterjee NK (1994) Antibodies to glutamic acid decarboxylase and P2-C peptides in sera from coxsackie virus B4-infected mice and IDDM patients. *Diabetes* 43:1260-6
116. Hsieh CS, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM (1995) T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro. *J. Exp. Med.* 181:713-21
117. Huang X, Yuang J, Goddard A, Foulis A, James RF, Lernmark A, Pujol-Borrell R, Rabinovitch A, Somoza N, Stewart TA (1995) Interferon expression in the pancreases of patients with type I diabetes. *Diabetes* 44:658-64
118. Hughes SH (1982) Sequence of the long terminal repeat and adjacent segments of the endogenous avian virus Rous-associated virus 0. *J. Virol.* 43:191-200
119. Hutchinson CA, Hardies SC, Loeb DD, Shehee WR, Edgell MH (1989) LINE and related retroposins: long interspersed repeated sequences in the eucaryotic genome. In: Berg D, Howe M (eds) American Society for Microbiology, Washington D.C., pp 599-617
120. Hyoty H, Hiltunen M, Knip M, Laakkonen M, Vahasalo P, Karjalainen J, Koskela P, Roivainen M, Leinikki P, Hovi T, . (1995) A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes* 44:652-7
121. Hypponen E, Kenward MG, Virtanen SM, Piitulainen A, Virta-Autio P, Tuomilehto J, Knip M, Akerblom HK (1999) Infant feeding, early weight gain, and risk of type 1 diabetes. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes Care* 22:1961-5

122. Itoh N, Hanafusa T, Miyazaki A, Miyagawa J, Yamagata K, Yamamoto K, Waguri M, Imagawa A, Tamura S, Inada M (1993) Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J. Clin. Invest* 92:2313-22
123. Ivanov VA, Melnikov AA, Siunov AV, Fodor II, Ilyin YV (1991) Authentic reverse transcriptase is coded by jockey, a mobile Drosophila element related to mammalian LINES. *EMBO J.* 10:2489-95
124. Jahromi M, Millward A, Demaine A (2000) A CA repeat polymorphism of the IFN-gamma gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes. *J. Interferon Cytokine Res.* 20:187-90
125. Janeway CA, Travers P (1995) *Grundbegriffe der Immunologie.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp 1-43
126. Jenson AB, Rosenberg HS (1984) Multiple viruses in diabetes mellitus. *Prog. Med. Virol.* 29:197-217
127. Joner G, Sovik O (1989) Increasing incidence of diabetes mellitus in Norwegian children 0-14 years of age 1973-1982. *Diabetologia* 32:79-83
128. Kambhu S, Falldorf P, Lee JS (1990) Endogenous retroviral long terminal repeats within the HLA-DQ locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:4927-31
129. Kappes D, Strominger JL (1988) Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 57:991-1028.:991-1028
130. Karjalainen J, Martin JM, Knip M, Ilonen J, Robinson BH, Savilahti E, Akerblom HK, Dosch HM (1992) A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 327:302-7
131. Karlsten AE, Hagopian WA, Petersen JS, Boel E, Dyrberg T, Grubin CE, Michelsen BK, Madsen OD, Lernmark A (1992) Recombinant glutamic acid decarboxylase (representing the single isoform expressed in human islets) detects IDDM-associated 64,000-M(r) autoantibodies. *Diabetes* 41:1355-9
132. Karvonen M, Tuomilehto J, Libman I, LaPorte R (1993) A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. World Health Organization DIAMOND Project Group. *Diabetologia* 36:883-92
133. Kato N, Shimotohno K, VanLeeuwen D, Cohen M (1990) Human proviral mRNAs down regulated in choriocarcinoma encode a zinc finger protein related to Kruppel. *Mol. Cell Biol.* 10:4401-5
134. Kato S, Matsuo K, Nishimura N, Takahashi N, Takano T (1987) The entire sequence of baboon endogenous virus DNA: A chimeric structure of murine Type C and simian type C retroviruses. *J. Genet.* 62:127-37

135. Katzir N, Rechavi G, Cohen JB, Unger T, Simoni F, Segal S, Cohen D, Givol D (1985) "Retroposon" insertion into the cellular oncogene c-myc in canine transmissible venereal tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82:1054-8
136. Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ (1992) Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest* 89:283-92
137. Keating S, Prince S, Jones M, Rowe M (2002) The lytic cycle of Epstein-Barr virus is associated with decreased expression of cell surface major histocompatibility complex class I and class II molecules. *J. Virol.* 76:8179-88
138. Kim A, Terzian C, Santamaria P, Pelisson A, Purd'homme N, Bucheton A (1994) Retroviruses in invertebrates: the gypsy retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:1285-9
139. King ML, Shaikh A, Bidwell D, Voller A, Banatvala JE (1983) Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in children with insulin-dependent (juvenile-onset; type I) diabetes mellitus. *Lancet* 1:1397-9
140. Kingsmore SF, Giros B, Suh D, Bieniarz M, Caron MG, Seldin MF (1994) Glycine receptor beta-subunit gene mutation in spastic mouse associated with LINE-1 element insertion. *Nat. Genet.* 7:136-41
141. Kion TA, Hoffmann GW (1991) Anti-HIV and anti-anti-MHC antibodies in alloimmune and autoimmune mice. *Science* 253:1138-40
142. Klein J, Sato A (2000) The HLA system. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* 343:782-6
143. Kohrman DC, Harris JB, Meisler MH (1996) Mutation detection in the med and medJ alleles of the sodium channel Scn8a. Unusual splicing due to a minor class AT-AC intron. *J. Biol. Chem.* 271:17576-81
144. Kowalski PE, Freeman JD, Nelson DT, Mager DL (1997) Genomic structure and evolution of a novel gene (PLA2L) with duplicated phospholipase A2-like domains. *Genomics* 39:38-46
145. Krieg AM, Gourley MF, Perl A (1992) Endogenous retroviruses: potential etiologic agents in autoimmunity. *FASEB J.* 6:2537-44
146. Krieg AM, Steinberg AD (1990) Retroviruses and autoimmunity. *J. Autoimmun.* 3:137-66
147. Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Kahn CR (1987) Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications. *N. Engl. J. Med.* 317:1390-8
148. Kukreja A, Maclaren NK (2000) Current cases in which epitope mimicry is considered as a component cause of autoimmune disease: immune-mediated (type 1) diabetes. *Cell Mol. Life Sci.* 57:534-41

149. Kwok WW, Domeier ME, Johnson ML, Nepom GT, Koelle DM (1996a) HLA-DQB1 codon 57 is critical for peptide binding and recognition. *J. Exp. Med.* 183:1253-8
150. Kwok WW, Domeier ML, Raymond FC, Byers P, Nepom GT (1996b) Allele-specific motifs characterize HLA-DQ interactions with a diabetes-associated peptide derived from glutamic acid decarboxylase. *J. Immunol.* 156:2171-7
151. Lan MS, Lu J, Goto Y, Notkins AL (1994) Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. *DNA Cell Biol.* 13:505-14
152. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la BM, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, Szustakowki J, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921

153. Landin-Olsson M, Karlsson A, Dahlquist G, Blom L, Lernmark A, Sundkvist G (1989) Islet cell and other organ-specific autoantibodies in all children developing type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Sweden during one year and in matched control children. *Diabetologia* 32:387-95
154. Larsson E, Kato N, Cohen M (1989) Human endogenous proviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 148:115-32
155. Leib-Mösch C, Brack-Werner R, Werner T, Bachmann M, Faff O, Erfle V, Hehlmann R (1990) Endogenous retroviral elements in human DNA. *Cancer Res.* 50:5636S-42S
156. Leib-Mösch C, Brack R, Werner T, Erfle V, Hehlmann R (1986) Isolation of an SSAV-related endogenous sequence from human DNA. *Virology* 155:666-77
157. Leib-Mösch C, Haltmeier M, Werner T, Geigl EM, Brack-Werner R, Francke U, Erfle V, Hehlmann R (1993) Genomic distribution and transcription of solitary HERV-K LTRs. *Genomics* 18:261-9
158. Lernmark A (1996) Glutamic acid decarboxylase--gene to antigen to disease. *J. Intern. Med.* 240:259-77
159. Lernmark A, Kloppel G, Stenger D, Vathanaprida C, Falt K, Landin-Olsson M, Baskin DG, Palmer JP, Gown AM, Petersen JS, . (1995) Heterogeneity of islet pathology in two infants with recent onset diabetes mellitus. *Virchows Arch.* 425:631-40
160. Li WH, Gu Z, Wang H, Nekrutenko A (2001) Evolutionary analyses of the human genome. *Nature* 409:847-9
161. Liao D, Pavelitz T, Weiner AM (1998) Characterization of a novel class of interspersed LTR elements in primate genomes: structure, genomic distribution, and evolution. *J. Mol. Evol.* 46:649-60
162. Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO (1995) Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol. Today* 16:34-8
163. Lie BA, Todd JA, Pociot F, Nerup J, Akselsen HE, Joner G, Dahl-Jorgensen K, Ronningen KS, Thorsby E, Undlien DE (1999) The predisposition to type 1 diabetes linked to the human leukocyte antigen complex includes at least one non-class II gene. *Am. J. Hum. Genet.* 64:793-800
164. Lin L, Xu B, Rote NS (1999) Expression of endogenous retrovirus ERV-3 induces differentiation in BeWo, a choriocarcinoma model of human placental trophoblast. *Placenta* 20:109-18
165. Lindberg B, Ahlfors K, Carlsson A, Ericsson UB, Landin-Olsson M, Lernmark A, Ludvigsson J, Sundkvist G, Ivarsson SA (1999) Previous exposure to measles, mumps, and rubella--but not vaccination during adolescence--correlates to the prevalence of pancreatic and thyroid autoantibodies. *Pediatrics* 104:e12
166. Lindeskog M, Mager DL, Blomberg J (1999) Isolation of a human endogenous retroviral HERV-H element with an open env reading frame. *Virology* 258:441-50

167. Liu AY, Abraham BA (1991) Subtractive cloning of a hybrid human endogenous retrovirus and calbindin gene in the prostate cell line PC3. *Cancer Res.* 51:4107-10
168. Livak KJ, Marmaro J, Todd JA (1995) Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nat. Genet.* 9:341-2
169. Löwer R, Boller K, Hasenmaier B, Korbmacher C, Müller-Lantzsch N, Löwer J, Kurth R (1993) Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:4480-4
170. Löwer R, Löwer J, Frank H, Harzmann R, Kurth R (1984) Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses. *J. Gen. Virol.* 65:887-98
171. Löwer R, Löwer J, Kurth R (1996) The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:5177-84
172. Löwer R, Tönjes RR, Boller K, Denner J, Kaiser B, Phelps RC, Löwer J, Kurth R, Badenhop K, Donner H, Usadel KH, Miethke T, Lapatschek M, Wagner H (1998) Development of insulin-dependent diabetes mellitus does not depend on specific expression of the human endogenous retrovirus HERV-K. *Cell* 95:11-4
173. Löwer R, Tönjes RR, Korbmacher C, Kurth R, Löwer J (1995) Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K. *J. Virol.* 69:141-9
174. Lucassen AM, Julier C, Beressi JP, Boitard C, Froguel P, Lathrop M, Bell JI (1993) Susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR. *Nat. Genet.* 4:305-10
175. Luo DF, Bui MM, Muir A, Maclaren NK, Thomson G, She JX (1995) Affected-sib-pair mapping of a novel susceptibility gene to insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM8) on chromosome 6q25-q27. *Am. J. Hum. Genet.* 57:911-9
176. Luo DF, Buzzetti R, Rotter JI, Maclaren NK, Raffel LJ, Nistico L, Giovannini C, Pozzilli P, Thomson G, She JX (1996) Confirmation of three susceptibility genes to insulin-dependent diabetes mellitus: IDDM4, IDDM5 and IDDM8. *Hum. Mol. Genet.* 5:693-8
177. Mach B, Steimle V, Martinez-Soria E, Reith W (1996) Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* 14:301-31
178. Mager DL, Freeman JD (1987) Human endogenous retroviruslike genome with type C pol sequences and gag sequences related to human T-cell lymphotropic viruses. *J. Virol.* 61:4060-6
179. Mager DL, Goodchild NL (1989) Homologous recombination between the LTRs of a human retrovirus-like element causes a 5-kb deletion in two siblings. *Am. J. Hum. Genet.* 45:848-54
180. Mager DL, Henthorn PS (1984) Identification of a retrovirus-like repetitive element in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81:7510-4

181. Majors J (1990) The structure and function of retroviral long terminal repeats. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 157:49-92
182. Mantovani R, Li XY, Pessara U, Hooft vH, Benoist C, Mathis D (1994) Dominant negative analogs of NF-YA. *J. Biol. Chem.* 269:20340-6
183. Mantovani R, Pessara U, Tronche F, Li XY, Knapp AM, Pasquali JL, Benoist C, Mathis D (1992) Monoclonal antibodies to NF-Y define its function in MHC class II and albumin gene transcription. *EMBO J.* 11:3315-22
184. Marsh SG (1998) HLA class II region sequences, 1998. *Tissue Antigens.* 51:467-507
185. Marsh SG, Bodmer JG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI (2001) Nomenclature for factors of the HLA system, 2000. *Eur. J. Immunogenet.* 28:377-424
186. Marsh SG, Parham P, Barber LD (2000) *The HLA Facts Book.* Academic Press,
187. Martin SL (1991) Ribonucleoprotein particles with LINE-1 RNA in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell Biol.* 11:4804-7
188. Martinelli SC, Goff SP (1990) Rapid reversion of a deletion mutation in Moloney murine leukemia virus by recombination with a closely related endogenous provirus. *Virology* 174:135-44
189. Mathias SL, Scott AF, Kazazian HH, Jr., Boeke JD, Gabriel A (1991) Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science* 254:1808-10
190. McKinney PA, Parslow R, Gurney KA, Law GR, Bodansky HJ, Williams R (1999) Perinatal and neonatal determinants of childhood type 1 diabetes. A case-control study in Yorkshire, U.K. *Diabetes Care* 22:928-32
191. Mein CA, Esposito L, Dunn MG, Johnson GC, Timms AE, Goy JV, Smith AN, Sebag-Montefiore L, Merriman ME, Wilson AJ, Pritchard LE, Cucca F, Barnett AH, Bain SC, Todd JA (1998) A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom. *Nat. Genet.* 19:297-300
192. Merriman T, Twells R, Merriman M, Eaves I, Cox R, Cucca F, McKinney P, Shield J, Baum D, Bosi E, Pozzilli P, Nistico L, Buzzetti R, Joner G, Ronningen K, Thorsby E, Undlien D, Pociot F, Nerup J, Bain S, Barnett A, Todd J (1997) Evidence by allelic association-dependent methods for a type 1 diabetes polygene (IDDM6) on chromosome 18q21. *Hum. Mol. Genet.* 6:1003-10
193. Metcalfe MA, Baum JD (1991) Incidence of insulin dependent diabetes in children aged under 15 years in the British Isles during 1988. *BMJ* 302:443-7
194. Michaelis D, Iutzi E (1991) Diabeteshaeufigkeiten in der BRD. *Diabetes Journal* 4-7

195. Miki Y, Nishisho I, Horii A, Miyoshi Y, Utsunomiya J, Kinzler KW, Vogelstein B, Nakamura Y (1992) Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer Res.* 52:643-5
196. Moczulski DK, Rogus JJ, Antonellis A, Warram JH, Krolewski AS (1998) Major susceptibility locus for nephropathy in type 1 diabetes on chromosome 3q: results of novel discordant sib-pair analysis. *Diabetes* 47:1164-9
197. Moore R, Dixon M, Smith R, Peters G, Dickson C (1987) Complete nucleotide sequence of a milk-transmitted mouse mammary tumor virus: two frameshift suppression events are required for translation of gag and pol. *J. Virol.* 61:480-90
198. Morahan G, Huang D, Tait BD, Colman PG, Harrison LC (1996) Markers on Distal Chromosome 2q Linked to Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Science* 272:1808-10
199. Morahan G, Huang D, Ymer SI, Cancilla MR, Stephen K, Dabadghao P, Werther G, Tait BD, Harrison LC, Colman PG (2001) Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele. *Nat. Genet.* 27:218-21
200. Morse B, Rotherg PG, South VJ, Spandorfer JM, Astrin SM (1988) Insertional mutagenesis of the myc locus by a LINE-1 sequence in a human breast carcinoma. *Nature* 333:87-90
201. Mosmann TR, Coffman RL (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145-73
202. Muhlethaler-Mottet A, Otten LA, Steimle V, Mach B (1997) Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *EMBO J.* 16:2851-60
203. Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MS (1994) Virus taxonomy: The classification and nomenclature of viruses. In: Summers MS (ed) Springer-Verlag, Wien
204. Murray JS, Madri J, Tite J, Carding SR, Bottomly K (1989) MHC control of CD4+ T cell subset activation. *J. Exp. Med.* 170:2135-40
205. Nakagawa K, Harrison LC (1996) The potential roles of endogenous retroviruses in autoimmunity. *Immunol. Rev.* 152:193-236
206. Narita N, Nishio H, Kitoh Y, Ishikawa Y, Ishikawa Y, Minami R, Nakamura H, Matsuo M (1993) Insertion of a 5' truncated L1 element into the 3' end of exon 44 of the dystrophin gene resulted in skipping of the exon during splicing in a case of Duchenne muscular dystrophy. *J. Clin. Invest* 91:1862-7
207. Nepom BS, Nepom GT, Coleman M, Kwok WW (1996) Critical contribution of beta chain residue 57 in peptide binding ability of both HLA-DR and -DQ molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:7202-6

208. Nepom BS, Palmer J, Kim SJ, Hansen JA, Holbeck SL, Nepom GT (1986) Specific genomic markers for the HLA-DQ subregion discriminate between DR4+ insulin-dependent diabetes mellitus and DR4+ seropositive juvenile rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* 164:345-50
209. Nepom GT (1993) Immunogenetics and IDDM. *Diabetes Rev* 1:93-103
210. Nermut MV, Hockley DJ (1996) Comparative morphology and structural classification of retroviruses. In: Kräusslich HG (ed) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 1-24
211. Nerup J, Platz P, Andersen OO, Christy M, Lyngsoe J, Poulsen JE, Ryder LP, Nielsen LS, Thomsen M, Svejgaard A (1974) HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet* 2:864-6
212. Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, van Der AB, Giovannini C, Bosi E, Larrad MT, Rios MS, Chow CC, Cockram CS, Jacobs K, Mijovic C, Bain SC, Barnett AH, Vandewalle CL, Schuit F, Gorus FK, Tosi R, Pozzilli P, Todd JA (1996) The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum. Mol. Genet.* 5:1075-80
213. Nystrom L, Dahlquist G, Rewers M, Wall S (1990) The Swedish childhood diabetes study. An analysis of the temporal variation in diabetes incidence 1978-1987. *Int. J. Epidemiol.* 19:141-6
214. O'Connell C, O'Brien S, Nash WG, Cohen M (1984) ERV3, a full-length human endogenous provirus: chromosomal localization and evolutionary relationships. *Virology* 138:225-35
215. O'Neill RR, Buckler CE, Theodore TS, Martin MA, Repaske R (1985) Envelope and long terminal repeat sequences of a cloned infectious NZB xenotropic murine leukemia virus. *J. Virol.* 53:100-6
216. Oldstone MB (1987) Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 50:819-20
217. Olerup O, Aldener A, Fogdell A (1993) HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens.* 41:119-34
218. Olmos P, A'Hern R, Heaton DA, Millward BA, Risley D, Pyke DA, Leslie RD (1988) The significance of the concordance rate for type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins. *Diabetologia* 31:747-50
219. Ono M, Kawakami M, Takezawa T (1987a) A novel human nonviral retroposon derived from an endogenous retrovirus. *Nucleic Acids Res.* 15:8725-37
220. Ono M, Kawakami M, Ushikubo H (1987b) Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D. *J. Virol.* 61:2059-62
221. Ono M, Yasunaga T, Miyata T, Ushikubo H (1986) Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J. Virol.* 60:589-98

222. Otten LA, Steimle V, Bontron S, Mach B (1998) Quantitative control of MHC class II expression by the transactivator CIITA. *Eur. J. Immunol.* 28:473-8
223. Owerbach D, Lernmark A, Platz P, Ryder LP, Rask L, Peterson PA, Ludvigsson J (1983) HLA-D region beta-chain DNA endonuclease fragments differ between HLA-DR identical healthy and insulin-dependent diabetic individuals. *Nature* 303:815-7
224. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL (1983) Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 222:1337-9
225. Palmer JP, Lernmark A (1990) Pathophysiology of type 1 (insulin-dependent) diabetes. Elsevier, New York, pp 414-35
226. Pankewycz OG, Guan JX, Benedict JF (1995) Cytokines as mediators of autoimmune diabetes and diabetic complications. *Endocr. Rev.* 16:164-76
227. Patarca R, Haseltine WA (1985) A major retroviral core protein related to EPA and TIMP. *Nature* 318:390
228. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA (1997) Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med.* 3:282-6
229. Patience C, Wilkinson DA, Weiss RA (1997) Our retroviral heritage. *Trends Genet.* 13:116-20
230. Paulson KE, Deka N, Schmid CW, Misra R, Schindler CW, Rush MG, Kadyk L, Leinwand L (1985) A transposon-like element in human DNA. *Nature* 316:359-61
231. Penzotti JE, Doherty D, Lybrand TP, Nepom GT (1996) A structural model for TCR recognition of the HLA class II shared epitope sequence implicated in susceptibility to rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* 9:287-93
232. Perl A, Rosenblatt JD, Chen IS, DiVincenzo JP, Bever R, Poiesz BJ, Abraham GN (1989) Detection and cloning of new HTLV-related endogenous sequences in man. *Nucleic Acids Res.* 17:6841-54
233. Perou CM, Pryor RJ, Naas TP, Kaplan J (1997) The bg allele mutation is due to a LINE1 element retrotransposition. *Genomics* 42:366-8
234. Petersen LD, Duinkerken G, Bruining GJ, van Lier RA, de Vries RR, Roep BO (1996) Increased numbers of in vivo activated T cells in patients with recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Autoimmun.* 9:731-7
235. Petropoulos C (1997) Retroviral taxonomy, protein, structure, sequences, and genetic maps. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp 757-806
236. Petrov DA, Sangster TA, Johnston JS, Hartl DL, Shaw KL (2000) Evidence for DNA loss as a determinant of genome size. *Science* 287:1060-2

237. Platz P, Jakobsen BK, Morling N, Ryder LP, Svejgaard A, Thomsen M, Christy M, Kromann H, Benn J, Nerup J, Green A, Hauge M (1981) HLA-D and -DR antigens in genetic analysis of insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 21:108-15
238. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC (1980) Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77:7415-9
239. Quaiia M, Zancai P, Cariati R, Rizzo S, Boiocchi M, Dolcetti R (2000) Glucocorticoids promote the proliferation and antagonize the retinoic acid-mediated growth suppression of Epstein-Barr virus-immortalized B lymphocytes. *Blood* 96:711-8
240. Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 23:4878-84
241. Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, Yoo-Warren H, Oles J, Hicks JM, Goldstein DE, Rae PM (1994) Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J. Immunol.* 152:3183-8
242. Rabinovitch A, Skyler JS (1998) Prevention of type 1 diabetes. *Med. Clin. North Am.* 82:739-55
243. Ramsdell F, Fowlkes BJ (1990) Clonal deletion versus clonal anergy: the role of the thymus in inducing self tolerance. *Science* 248:1342-8
244. Reed P, Cucca F, Jenkins S, Merriman M, Wilson A, McKinney P, Bosi E, Joner G, Ronningen K, Thorsby E, Undlien D, Merriman T, Barnett A, Bain S, Todd J (1997) Evidence for a type 1 diabetes susceptibility locus (IDDM10) on human chromosome 10p11-q11. *Hum. Mol. Genet.* 6:1011-6
245. Reichstetter S, Krellner PH, Meenzen CM, Kalden JR, Wassmuth R (1994) Comparative analysis of sequence variability in the upstream regulatory region of the HLA-DQB1 gene. *Immunogenetics* 39:207-12
246. Reith W, Siegrist CA, Durand B, Barras E, Mach B (1994) Function of major histocompatibility complex class II promoters requires cooperative binding between factors RFX and NF-Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:554-8
247. Reith W, Steimle V, Durand B, Kobr M, Mach B (1995) Regulation of MHC class II gene expression. *Immunobiology* 193:248-53
248. Repaske R, Steele PE, O'Neill RR, Rabson AB, Martin MA (1985) Nucleotide sequence of a full-length human endogenous retroviral segment. *J. Virol.* 54:764-72
249. Richter W, Mertens T, Schoel B, Muir P, Ritzkowsky A, Scherbaum WA, Boehm BO (1994) Sequence homology of the diabetes-associated autoantigen glutamate decarboxylase with coxsackie B4-2C protein and heat shock protein 60 mediates no molecular mimicry of autoantibodies. *J. Exp. Med.* 180:721-6

250. Ridgway WM, Fathman CG (1998) The association of MHC with autoimmune diseases: understanding the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 86:3-10
251. Ringold GM (1985) Steroid hormone regulation of gene expression. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25:529-66
252. Roep BO (1996) T-cell responses to autoantigens in IDDM. The search for the Holy Grail. *Diabetes* 45:1147-56
253. Roep BO, Kallan AA, Duinkerken G, Arden SD, Hutton JC, Bruining GJ, de Vries RR (1995) T-cell reactivity to beta-cell membrane antigens associated with beta-cell destruction in IDDM. *Diabetes* 44:278-83
254. Roll U, Christie MR, Fuchtenbusch M, Payton MA, Hawkes CJ, Ziegler AG (1996) Perinatal autoimmunity in offspring of diabetic parents. The German Multicenter BABY-DIAB study: detection of humoral immune responses to islet antigens in early childhood. *Diabetes* 45:967-73
255. Romagnani S (1994) Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu. Rev. Immunol.* 12:227-57
256. Romagnani S (1995) Biology of human TH1 and TH2 cells. *J. Clin. Immunol.* 15:121-9
257. Rous P (1911) A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separatable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 13:397-411
258. Rowe RE, Wapelhorst B, Bell GI, Risch N, Spielman RS, Concannon P (1995) Linkage and association between insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) susceptibility and markers near the glucokinase gene on chromosome 7. *Nat. Genet.* 10:240-2
259. Sachs L. (1997) *Angewandte Statistik*. Springer Verlag,
260. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-4
261. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
262. Sanjeevi CB, Hook P, Landin-Olsson M, Kockum I, Dahlquist G, Lybrand TP, Lernmark A (1996) DR4 subtypes and their molecular properties in a population-based study of Swedish childhood diabetes. *Tissue Antigens* 47:275-83
263. Sassaman DM, Dombroski BA, Moran JV, Kimberland ML, Naas TP, DeBerardinis RJ, Gabriel A, Swergold GD, Kazazian HH, Jr. (1997) Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat. Genet.* 16:37-43
264. Schulte AM, Lai S, Kurtz A, Czubyko F, Riegel AT, Wellstein A (1996) Human trophoblast and choriocarcinoma expression of the growth factor pleiotrophin

- attributable to germ-line insertion of an endogenous retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:14759-64
265. Schwartz RH (1989) Acquisition of immunologic self-tolerance. *Cell* 57:1073-81
266. Seifarth W, Baust C, Murr A, Skladny H, Krieg-Schneider F, Blusch J, Werner T, Hehlmann R, Leib-Mösch C (1998) Proviral structure, chromosomal location, and expression of HERV-K-T47D, a novel human endogenous retrovirus derived from T47D particles. *J. Virol.* 72:8384-91
267. Seissler J, Amann J, Mauch L, Haubruck H, Wolfahrt S, Bieg S, Richter W, Holl R, Heinze E, Northemann W, . (1993) Prevalence of autoantibodies to the 65- and 67-kD isoforms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest* 92:1394-9
268. Sham PC, Curtis D (1995) An extended transmission/disequilibrium test (TDT) for multi-allele marker loci. *Ann. Hum. Genet.* 59:323-36
269. Shewey LM, Beaty JS, Andersen LC, Nepom GT (1992) Differential expression of related HLA class II DQ beta genes caused by nucleotide variation in transcriptional regulatory elements. *J. Immunol.* 148:1265-73
270. Singal DP, Blajchman MA (1973) Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. *Diabetes* 22:429-32
271. Singer MF (1982) SINES and LINES: highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes. *Cell* 28:433-4
272. Sinha S, Maity SN, Lu J, de Crombrughe B (1995) Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:1624-8
273. Smit AF, Riggs AD (1995) MIRs are classic, tRNA-derived SINES that amplified before the mammalian radiation. *Nucleic Acids Res.* 23:98-102
274. Song SU, Gerasimova T, Kurkulos M, Boeke JD, Corces VG (1994a) An env-like protein encoded by a *Drosophila* retroelement: evidence that gypsy is an infectious retrovirus. *Genes Dev.* 8:2046-57
275. Song Z, Krishna S, Thanos D, Strominger JL, Ono SJ (1994b) A novel cysteine-rich sequence-specific DNA-binding protein interacts with the conserved X-box motif of the human major histocompatibility complex class II genes via a repeated Cys-His domain and functions as a transcriptional repressor. *J. Exp. Med.* 180:1763-74
276. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ (1993) Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am. J. Hum. Genet.* 52:506-16

277. Steimle V, Otten LA, Zufferey M, Mach B (1993) Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* 75:135-46
278. Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Grospierre B, Mach B (1994) Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265:106-9
279. Steinman L (1996) A few autoreactive cells in an autoimmune infiltrate control a vast population of nonspecific cells: a tale of smart bombs and the infantry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:2253-6
280. Stene LC, Hongve D, Magnus P, Ronningen KS, Joner G (2002) Acidic drinking water and risk of childhood-onset type 1 diabetes. *Diabetes Care* 25:1534-8
281. Stewart MA, Warnock M, Wheeler A, Wilkie N, Mullins JI, Onions DE, Neil JC (1986) Nucleotide sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence for the recombinational origin of subgroup B viruses. *J. Virol.* 58:825-34
282. Stoye JP, Coffin JM (1987) The four classes of endogenous murine leukemia virus: structural relationships and potential for recombination. *J. Virol.* 61:2659-69
283. Strazzullo M, Parisi T, Di Cristofano A, Rocchi M, La Mantia G (1998) Characterization and genomic mapping of chimeric ERV9 endogenous retroviruses-host gene transcripts. *Gene* 206:77-83
284. Sugawara M, Scholl T, Mahanta SK, Ponath PD, Strominger JL (1995) Cooperativity between the J and S elements of class II major histocompatibility complex genes as enhancers in normal and class II-negative patient and mutant B cell lines. *J. Exp. Med.* 182:175-84
285. Swergold GD (1990) Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Mol. Cell Biol.* 10:6718-29
286. Szopa TM, Dronfield DM, Ward T, Taylor KW (1989) In vivo infection of mice with Coxsackie B4 virus induces long-term functional changes in pancreatic islets with minimal alteration in blood glucose. *Diabet. Med.* 6:314-9
287. Szopa TM, Titchener PA, Portwood ND, Taylor KW (1993) Diabetes mellitus due to viruses--some recent developments. *Diabetologia* 36:687-95
288. Szopa TM, Ward T, Dronfield DM, Portwood ND, Taylor KW (1990) Coxsackie B4 viruses with the potential to damage beta cells of the islets are present in clinical isolates. *Diabetologia* 33:325-8
289. Takahara T, Ohsumi T, Kuromitsu J, Shibata K, Sasaki N, Okazaki Y, Shibata H, Sato S, Yoshiki A, Kusakabe M, Muramatsu M, Ueki M, Okuda K, Hayashizaki Y (1996) Dysfunction of the Orleans reeler gene arising from exon skipping due to transposition of a full-length copy of an active L1 sequence into the skipped exon. *Hum. Mol. Genet.* 5:989-93

290. Talal N, Garry RF, Schur PH, Alexander S, Dauphinee MJ, Livas IH, Ballester A, Takei M, Dang H (1990) A conserved idotype and antibodies to retroviral proteins in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest* 85:1866-71
291. Teich N (1984) Taxonomy of retroviruses. In: Weiss R, Teich N, Varmus H, Coffin J (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp 25-208
292. Temin H (1992) Origin and general nature of retroviruses. In: Levy J.A. (ed) Plenum Press, New York, pp 1-18
293. Temin HM (1964) Nature of the provirus of Rous sarcoma. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 17:557-70
294. Temin HM (1980) Origin of retroviruses from cellular moveable genetic elements. *Cell* 21:599-600
295. Temin HM (1993) A proposal for a new approach to a preventive vaccine against human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:4419-20
296. Temin HM, Mizutani S (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226:1211-3
297. Thomson G, Robinson WP, Kuhner MK, Joe S, MacDonald MJ, Gottschall JL, Barbosa J, Rich SS, Bertrams J, Baur MP, . (1988) Genetic heterogeneity, modes of inheritance, and risk estimates for a joint study of Caucasians with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am. J. Hum. Genet.* 43:799-816
298. Thorsby E, Ronningen KS (1993) Particular HLA-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36:371-7
299. Tian J, Olcott AP, Hanssen LR, Zekzer D, Middleton B, Kaufman DL (1998) Infectious Th1 and Th2 autoimmunity in diabetes-prone mice. *Immunol. Rev.* 164:119-27
300. Ting CN, Rosenberg MP, Snow CM, Samuelson LC, Meisler MH (1992) Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev.* 6:1457-65
301. Ting JP, Painter A, Zeleznik L, MacDonald G, Moore TM, Brown A, Schwartz BD (1994) YB-1 DNA-binding protein represses interferon gamma activation of class II major histocompatibility complex genes. *J. Exp. Med.* 179:1605-11
302. Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, Chao N, Fronck Z, Jacob CO, McDermott M, Sinha AA, Timmerman L, Steinman L, . (1988) A molecular basis for MHC class II--associated autoimmunity. *Science* 240:1003-9
303. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO (1987) HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 329:599-604

304. Todd JA, Farrall M (1996) Panning for gold: genome-wide scanning for linkage in type 1 diabetes. *Hum. Mol. Genet.* 5:1443-8
305. Togun RA, Resetkova E, Kawai K, Enomoto T, Volpe R (1997) Activation of CD8+ T lymphocytes in insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 82:243-9
306. Tönjes R, Munk K, Doenecke D (1989) Conserved organization of an avian histone gene cluster with inverted duplications of H3 and H4 genes. *J. Mol. Evol.* 28:200-11
307. Tönjes RR, Boller K, Limbach C, Lugert R, Kurth R (1997a) Characterization of human endogenous retrovirus type K virus-like particles generated from recombinant baculoviruses. *Virology* 233:280-91
308. Tönjes RR, Czauderna F, Kurth R (1999) Genome-wide screening, cloning, chromosomal assignment, and expression of full-length human endogenous retrovirus type K. *J. Virol.* 73:9187-95
309. Tönjes RR, Limbach C, Löwer R, Kurth R (1997b) Expression of human endogenous retrovirus type K envelope glycoprotein in insect and mammalian cells. *J. Virol.* 71:2747-56
310. Tönjes RR, Löwer R, Boller K, Denner J, Hasenmaier B, Kirsch H, König H, Korbmayer C, Limbach C, Lugert R, Phelps RC, Scherer J, Thelen K, Löwer J, Kurth R (1996) HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 13 Suppl 1:S261-S267
311. Tönjes RR, Xanthopoulos KG, Darnell JEJ, Paul D (1992) Transcriptional control in hepatocytes of normal and c14CoS albino deletion mice. *EMBO J.* 11:127-33
312. Trauger RJ, Talbott R, Wilson SH, Karpel RL, Elder JH (1990) A single-stranded nucleic acid binding sequence common to the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and murine recombinant virus gp70. *J. Biol. Chem.* 265:3674-8
313. Trembleau S, Penna G, Bosi E, Mortara A, Gately MK, Adorini L (1995) Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. *J. Exp. Med.* 181:817-21
314. Trembleau S, Penna G, Gregori S, Gately MK, Adorini L (1997) Deviation of pancreas-infiltrating cells to Th2 by interleukin-12 antagonist administration inhibits autoimmune diabetes. *Eur. J. Immunol.* 27:2330-9
315. Tuomilehto J, Podar T, Tuomilehto-Wolf E, Virtala E (1995) Evidence for importance of gender and birth cohort for risk of IDDM in offspring of IDDM parents. *Diabetologia* 38:975-82
316. Tuomilehto J, Rewers M, Reunanen A, Lounamaa P, Lounamaa R, Tuomilehto-Wolf E, Akerblom HK (1991) Increasing trend in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in childhood in Finland. Analysis of age, calendar time and birth cohort effects during 1965 to 1984. *Diabetologia* 34:282-7

317. Ullu E, Tschudi C (1984) Alu sequences are processed 7SL RNA genes. *Nature* 312:171-2
318. Undlien DE, Lie BA, Thorsby E (2001) HLA complex genes in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. Which genes are involved? *Trends. Genet.* 17:93-100
319. Urnovitz HB, Murphy WH (1996) Human endogenous retroviruses: nature, occurrence, and clinical implications in human disease [see comments]. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:72-99
320. Vaarala O, Hyoty H, Akerblom HK (1999) Environmental factors in the aetiology of childhood diabetes. *Diabetes Nutr. Metab* 12:75-85
321. van Der AB, Schuit F, Lyaruu I, Falorni A, Svanholm S, Vandewalle CL, Gorus FK (1995) Genetic susceptibility for insulin-dependent diabetes mellitus in Caucasians revisited: the importance of diabetes registries in disclosing interactions between HLA-DQ- and insulin gene-linked risk. *Belgian Diabetes Registry. J. Clin. Endocrinol. Metab* 80:2567-73
322. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS (1996b) Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45:926-33
323. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS (1996a) Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45:926-33
324. Verge CF, Vardi P, Babu S, Bao F, Erlich HA, Bugawan T, Tiosano D, Yu L, Eisenbarth GS, Fain PR (1998) Evidence for oligogenic inheritance of type 1 diabetes in a large Bedouin Arab family. *J. Clin. Invest* 102:1569-75
325. Virtanen SM, Laara E, Hypponen E, Reijonen H, Rasanen L, Aro A, Knip M, Ilonen J, Akerblom HK (2000) Cow's milk consumption, HLA-DQB1 genotype, and type 1 diabetes: a nested case-control study of siblings of children with diabetes. *Childhood diabetes in Finland study group. Diabetes* 49:912-7
326. Vogetseder W, Dumfahrt A, Mayersbach P, Schonitzer D, Dierich MP (1993) Antibodies in human sera recognizing a recombinant outer membrane protein encoded by the envelope gene of the human endogenous retrovirus K. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9:687-94
327. von Boehmer H, Kisielow P (1990) Self-nonsel self discrimination by T cells. *Science* 248:1369-73
328. Warram JH, Krolewski AS, Gottlieb MS, Kahn CR (1984) Differences in risk of insulin-dependent diabetes in offspring of diabetic mothers and diabetic fathers. *N. Engl. J. Med.* 311:149-52
329. Weets I, Van Autreve J, Van der Auwera BJ, Schuit FC, Du Caju MV, Decochez K, De Leeuw IH, Keymeulen B, Mathieu C, Rottiers R, Dorchy H, Quartier E, Gorus FK (2001) Male-to-female excess in diabetes diagnosed in early adulthood is

- not specific for the immune-mediated form nor is it HLA-DQ restricted: possible relation to increased body mass index. *Diabetologia* 44:40-7
330. Weiner AM (2000) Do all SINEs lead to LINEs? *Nat. Genet.* 24:332-3
331. Weiner AM, Deininger PL, Efstratiadis A (1986) Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Annu. Rev. Biochem.* 55:631-61
332. Weir B.S., Cockerham C.C. (1979) Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. *Heredity* 42:105-11
333. Weiss RA (1984) Origins of contemporary RNA tumor virus research. In: Weiss R, Teich N, Varmus H, Coffin J (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp 1-24
334. WHO Study Group Diabetes Mellitus (1985) WHO Technical Report 727:
335. Wilkinson DA, Mager DL, Leong J.C (1994) Human endogenous retroviruses. In: Levy JA (ed), pp 465-535
336. Wolffe AP (1994) Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *Bioessays* 16:245-51
337. Wucherpfennig KW, Strominger JL (1995) Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80:695-705
338. Yamada M, Zurbriggen A, Oldstone MB, Fujinami RS (1991) Common immunologic determinant between human immunodeficiency virus type 1 gp41 and astrocytes. *J. Virol.* 65:1370-6
339. Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL (1979) Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N. Engl. J. Med.* 300:1173-9
340. Zeleznik L, Azizkhan JC, Ting JP (1991) Affinity-purified CCAAT-box-binding protein (YEBP) functionally regulates expression of a human class II major histocompatibility complex gene and the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88:1873-7
341. Zenke M, Grundstrom T, Matthes H, Wintzerith M, Schatz C, Wildeman A, Chambon P (1986) Multiple sequence motifs are involved in SV40 enhancer function. *EMBO J.* 5:387-97
342. Zhou H, Glimcher LH (1995) Human MHC class II gene transcription directed by the carboxyl terminus of CIITA, one of the defective genes in type II MHC combined immune deficiency. *Immunity.* 2:545-53
343. Zinkernagel RM, Cooper S, Chambers J, Lazzarini RA, Hengartner H, Arnheiter H (1990) Virus-induced autoantibody response to a transgenic viral antigen. *Nature* 345:68-71

Lebenslauf

Name

Katrin Krach geb. Bieda

geboren am 11. Juni 1971 in Bremen

Schulbildung

Grundschule in Ganderkesee	1977-1981
Orientierungsstufe Ganderkesee	1981-1983
Gymnasium Ganderkesee	1983-1990
Allgemeine Hochschulreife Gymnasium Ganderkesee	05/1990

Ausbildung zur Biologielaborantin

Umweltschutz Nord GmbH&Co in Ganderkesee	01/1991 - 06/1993
--	-------------------

Studium

Beginn des Studiums der Biologie (Diplom) an der Technischen Universität Darmstadt	10/1993
Erwerb des Vordiploms	09/1995
Studienschwerpunkte im Hauptstudium: Mikrobiologie, Zoologie, Immunologie und Umweltrecht	
Diplomarbeit am Paul-Ehrlich-Institut in Langen unter der Leitung von Prof. Dr. Nixdorff (TU Darmstadt) und Dr. Boller Thema: "Monoklonale Antikörper gegen das humane endogene Retrovirus HTDV/HERV-K"Erwerb des Vordiploms	01/1999 - 06/1999
Studienabschluß: Diplom-Biologe, Gesamtnote: gut	07/1999

Promotion

Promotion am Paul-Ehrlich-Institut in Langen in Zusammenarbeit mit der Molekularendokrinologie des Universitätsklinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt unter der Leitung von Prof. Dr. Starzinski-Powitz (Universität Frankfurt) und PD Dr. Tönjes Thema: "Charakterisierung der solitären retroviralen Promotoren <i>DQ-LTR3</i> und <i>DQ-LTR13</i> im Kontext der Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus"	seit 01/2000
--	--------------