

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Professor Dr. med. Alexander Storch

Sektion Neuroimmunologie

Leiter: Professor Dr. med. Uwe Klaus Zettl

Analyse alternativer Spleißvarianten als potentielle Biomarker bei Multipler Sklerose



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von:

Annelen Rüge
aus Rostock
geboren am 8. Oktober 1992 in Eutin

Rostock, 2020

Gutachter:

1. Gutachter:

Prof. Dr. U. Zettl

Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Dr. M. Kipp

Institut für Anatomie, Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter:

PD Dr. C. Warnke

Klinik und Poliklinik für Neurologie, Uniklinik Köln

Jahr der Einreichung: 2020

Jahr der Verteidigung: 2021

Für meine Großeltern Brigitta und Edmund Bartelsen

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 6 |
| 1.1. Multiple Sklerose | 6 |
| 1.1.1. Epidemiologie..... | 6 |
| 1.1.2. Ätiologie und Pathophysiologie..... | 7 |
| 1.1.3. Diagnostik, klinischer Verlauf und Prognose..... | 9 |
| 1.1.4. Therapie..... | 12 |
| 1.2. Molekulare Biomarker | 15 |
| 1.3. Genexpressionsanalysen | 16 |
| 1.3.1. Quantitative PCR..... | 16 |
| 1.3.2. Transkriptomanalysen..... | 19 |
| 1.3.3. Techniken zur Proteinanalytik..... | 20 |
| 1.4. Alternatives Spleißen | 22 |
| 1.4.1. Typen des alternativen Spleißens..... | 22 |
| 1.4.2. Alternative Spleißereignisse im Zusammenhang mit Erkrankungen..... | 25 |
| 2. Fragestellungen | 27 |
| 3. Material und Methoden | 29 |
| 3.1. Literaturrecherche | 29 |
| 3.1.1. Studiendesign..... | 29 |
| 3.1.2. Suchstrategie und Kriterien der Literatúrauswahl..... | 30 |
| 3.1.3. Qualitative Untersuchung der eingeschlossenen Artikel..... | 32 |
| 3.2. Spleißvarianten-Analyse in Transkriptomdaten | 35 |
| 3.2.1. Microarraydatensatz von MS-Patienten der Rostocker Kohorte..... | 35 |
| 3.2.2. Microarraydatensätze von gesunden Kontrollen..... | 39 |
| 3.2.3. Statistische Evaluation..... | 41 |
| 3.2.4. Visualisierung alternativer Spleißereignisse..... | 43 |
| 4. Ergebnisse | 44 |
| 4.1. Aktueller Stand der Literatur zum alternativen Spleißen bei MS | 44 |
| 4.2. Differentiell alternativ gespleißte Gentranskripte bei Patienten mit MS | 51 |
| 4.2.1. Bisher untersuchte alternative Spleißereignisse bei Patienten mit MS..... | 51 |
| 4.2.2. Alternative Spleißereignisse im Kontext der MS-Therapie..... | 56 |
| 4.3. Validierung potentieller MS-assoziiertes Spleißereignisse | 58 |
| 5. Diskussion | 68 |
| 5.1. Genetische Risikovarianten und alternatives Spleißen | 68 |
| 5.2. Kriterien der Literaturrecherche | 70 |
| 5.3. Potentielle Bedeutung von Spleißisoformen in der MS-Diagnostik | 72 |
| 5.4. Spleißisoformen als Biomarker für Therapiemonitoring und Prognose | 75 |

| | |
|--|------------|
| 5.5. Bedeutung von ASE bei <i>non-coding</i> RNA-Molekülen..... | 77 |
| 5.6. Überprüfung von alternativen Spleißereignissen in Transkriptomdaten..... | 79 |
| 5.7. Ausblick..... | 81 |
| 6. Zusammenfassung..... | 83 |
| 7. Literaturverzeichnis..... | 85 |
| 8. Anhang..... | 103 |
| 8.1. Abkürzungsverzeichnis..... | 103 |
| 8.2. Tabellenverzeichnis..... | 106 |
| 8.3. Abbildungsverzeichnis..... | 107 |
| 8.4. Supplementäre Tabellen..... | 108 |
| 8.5. Thesen..... | 119 |
| 8.6. Eidesstattliche Erklärung..... | 122 |
| 8.7. Danksagung..... | 123 |
| 8.8. Curriculum Vitae..... | 125 |

1. Einleitung

1.1. Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündlich verlaufende neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Sie ist durch demyelinisierende Prozesse mit abnehmender Nervenleitgeschwindigkeit und einen Verlust von Axonen und Synapsen gekennzeichnet [1, 2]. Durch individuelle Läsionsmuster entsteht ein differenzielles Krankheitsbild mit motorischen und sensorischen Ausfällen. Die Ätiologie der Erkrankung ist bis heute ungeklärt, aber es werden sowohl Umweltfaktoren als auch eine genetische Prädisposition diskutiert, die die Entstehung und den Verlauf der MS möglicherweise beeinflussen können (Kap. 1.1.2.). Ziel dieser Arbeit war die systematische Zusammenfassung bisher untersuchter alternativer Spleißereignisse (ASE), die im Zusammenhang mit MS stehen, und deren Überprüfung in Transkriptomdaten.

1.1.1. Epidemiologie

Die MS ist die häufigste Ursache einer nicht-traumatischen körperlichen Behinderung im jungen Erwachsenenalter. Nach Schätzungen sind weltweit über 2,3 Millionen Menschen von der Erkrankung betroffen [3]. Das Erkrankungsalter liegt in der Regel zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr [4]. Selten ist ein Erkrankungsbeginn vor dem 10. und nach dem 60. Lebensjahr. Frauen erkranken in Abhängigkeit von der geografischen Lage etwa doppelt bis dreimal so häufig wie Männer [4]. Die Prävalenz der MS ist abhängig von der geografischen Lage und schwankt zwischen 1 und 309 pro 100.000 Einwohner [5]. Am niedrigsten ist die Krankheitshäufigkeit in der Nähe des Äquators, zunehmend in Richtung beider Pole [6]. Die höchste Prävalenz für MS liegt in Nordeuropa und Nordamerika vor [7]. Insgesamt tritt die Erkrankung gehäuft in Regionen mit gemäßigttem Klima und einer guten wirtschaftlichen Entwicklung auf. Bei den gesetzlichen Krankenkassen in Deutschland sind derzeit über 200.000 MS-Erkrankte registriert [8, 9]. Durch Hochrechnung anhand aller

gesetzlich Versicherten ergibt sich daraus eine Prävalenz von 289 MS-Erkrankten pro 100.000 Einwohner. Allerdings wurden hierbei nicht die privat versicherten Personen in Deutschland berücksichtigt [8].

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass die Prävalenz in den letzten Jahrzehnten, vor allem bei der MS mit schubförmigem Verlauf (Kap. 1.1.3.), in Deutschland zugenommen hat [10]. Dies lässt sich eventuell auf den Einfluss von Umweltfaktoren (Kap. 1.1.2.) und verbesserte diagnostische Methoden und damit frühzeitigeren Diagnosen zurückführen.

1.1.2. Ätiologie und Pathophysiologie

Die Ätiologie der MS ist weitgehend ungeklärt. Es werden allerdings unterschiedliche Hypothesen zur Entstehung der MS diskutiert. Es wird angenommen, dass eine Kombination aus genetischen Komponenten und verschiedenen Umweltfaktoren wie Infektionen, Rauchen und Vitamin-D-Mangel mit einem erhöhten individuellen Risiko für MS assoziiert sind [11-13].

Bei der Infektionshypothese wird angenommen, dass Infektionen ursächlich für die Entstehung der MS sind. Vor allem eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) wird mit MS assoziiert [11, 13]. EBV gehört zu der Gruppe der humanen Herpesviren und mit zunehmendem Alter haben die meisten Menschen eine Infektion mit dem Virus durchlebt. In großen Studien waren jedoch bei allen untersuchten MS-Patienten anti-EBV-Antikörper nachweisbar [14]. Auch eine Infektion mit dem humanen Herpesvirus 6A wurde mit der Entstehung von MS assoziiert [15]. Bei der Hygienehypothese wird grundsätzlich angenommen, dass eine verminderte Exposition von infektiösen Erregern, Mikroorganismen und Parasiten im Kindes- und Jugendalter zu einer verminderten Entwicklung des Immunsystems führt und somit zur Entstehung von autoimmunen Prozessen beiträgt [11, 16].

Verschiedene Lebensstil- und Umweltfaktoren wie Rauchen, niedrige Vitamin-D-Werte im Serum oder Fettleibigkeit können das Risiko, an MS zu erkranken, erhöhen bzw. den Verlauf der Erkrankung beeinflussen [12]. Zigarettenrauch erhöht das Risiko für MS auf das bis zu Zweifache im Vergleich zu

Nichtrauchern [17]. Der Konsum von Zigaretten ist nicht nur mit einem erhöhten Risiko für MS assoziiert, sondern wirkt sich auch negativ auf den Verlauf der Erkrankung aus [18, 19]. Vitamin-D wird den fettlöslichen Vitaminen zugeordnet und kann vom menschlichen Körper durch Sonneneinstrahlung auf der Haut synthetisiert werden oder durch Nahrungsmittel, beispielsweise Fisch, aufgenommen werden. Hohe Vitamin-D-Werte im Serum stehen mit einem niedrigeren Risiko, an MS zu erkranken, im Zusammenhang und korrelieren ebenfalls mit einem milderem Krankheitsverlauf [12, 20].

Zahlreiche Familien- und Migrationsstudien haben belegt, dass der MS eine genetische Suszeptibilität zugrunde liegt. Bei einem erkrankten monozygoten Zwilling ist die Erkrankungswahrscheinlichkeit für den anderen Zwilling ungefähr 20% [21]. Im Vergleich dazu liegt die Konkordanzrate dizygoter Zwillinge bei ungefähr 5% und das Risiko für MS in der Allgemeinbevölkerung bei 0,15% [22]. Bestimmte Suszeptibilitätsgene belegen zudem den genetischen Zusammenhang bei MS. Hierzu zählen vor allem die Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (engl. *major histocompatibility complex*, MHC). So ist die Erkrankungswahrscheinlichkeit, bei Vorhandensein des MHC-DRB1*15:01 Allels etwa dreimal so hoch wie bei Personen, bei denen dieses Allel nicht vorliegt [23]. Eine neue genomweite Assoziationsstudie (GWAS) konnte über 200 genetische Loci identifizieren, die mit dem Risiko, an MS zu erkranken, assoziiert sind [24, 25]. Jeder dieser Loci umfasst eine Vielzahl sogenannter Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. *single-nucleotide polymorphism*, SNP). Über 90% dieser SNPs sind in intergenischen oder intronischen Bereichen der jeweiligen Gene lokalisiert. Durch ihre Lokalisation hat der Austausch einzelner Basenpaare keinen Einfluss auf die Proteinsequenz, aber er kann die Transkription und die Prozessierung von Ribonukleinsäuren (engl. *ribonucleic acid*, RNA) beeinflussen [26].

Auch die Pathophysiologie der MS ist noch nicht ausreichend verstanden. Grundsätzlich führen chronisch-entzündliche Prozesse im Gehirn oder auch im Rückenmark zu einem Verlust der Myelinscheiden und einem Untergang von Axonen und Synapsen [2]. Die dabei entstehenden Läsionen lassen sich mittels Magnetresonanztomographie (MRT) bildlich darstellen (Kap. 1.1.3.). In Biopsien dieser Läsionen variiert die Dichte an Oligodendrozyten in Abhängigkeit zur

Aktivität der Demyelinisierung [27]. Ein Zusammenhang zwischen Entzündung und der axonalen Schädigung lässt sich bei Läsionen in allen Stadien herstellen [28].

Nach heutigem Stand geht man davon aus, dass immunologische Prozesse bei der Entstehung der MS eine zentrale Rolle spielen. Vermutlich werden bereits deutlich vor Manifestation erster Symptome autoreaktive T-Zellen durch antigen-präsentierende Zellen außerhalb des ZNS aktiviert [29]. Während der akuten Phase der Entzündung führt eine Einwanderung von Immunzellen, unter anderem auch B-Zellen, aus dem Blut in das ZNS zu einer lokalen Entzündungsreaktion und Ödembildung [29]. Die Bluthirnschranke (BHS) wird durchlässiger. Durch eine erhöhte Produktion verschiedener Zytokine (z.B. Interleukin 6 und Tumornekrosefaktor alpha) von B-Zellen (CD20+-Zellen) wird die Entzündungsreaktion im ZNS aufrecht gehalten. In die entzündlichen Läsionen wandern dann vor allem T-Zellen und Makrophagen ein, wobei von den T-Zellpopulationen die zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8+-Zellen) stärker vertreten sind als T-Helferzellen (CD3+CD4+-Zellen) [30]. Vermutlich führt eine Reaktivierung und gleichzeitig fehlende Hemmung von autoreaktiven T-Zellen dazu, dass sie sich gegen Bestandteile des ZNS richten. Anders als Jahrzehnte lang angenommen wurde, sind Proteine der Myelinscheiden von Axonen, wie das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), eher Zielstrukturen anderer neurodegenerativer Erkrankungen [31, 32].

1.1.3. Diagnostik, klinischer Verlauf und Prognose

Die Diagnosestellung der MS gestaltet sich durch die Heterogenität der Symptome aufgrund unterschiedlicher Lokalisation der Läsionen äußerst schwierig. Es gibt kein MS-spezifisches Symptom und dennoch lassen sich einige typische Erstsymptome bei einer Vielzahl von MS-Patienten nachweisen. Hierzu zählen Paresen, Sensibilitäts- und Visusstörungen [33].

Die MS lässt sich in die Verlaufsformen schubförmig remittierende MS (engl. *relapsing-remitting multiple sclerosis*, RRMS), primär und sekundär progrediente MS (engl. *primary progressive multiple sclerosis*, PPMS; *secondary progressive multiple sclerosis*, SPMS) und das typische

Anfangsstadium, welches man als klinisch isoliertes Syndrom (*clinically isolated syndrome*, CIS) bezeichnet, einteilen [34] (Abb. 1). Die RRMS ist mit bis zu 90% der MS-Patienten die häufigste Verlaufsform, die PPMS betrifft in etwa 10-15% der Patienten [35]. Zu Beginn verläuft die Erkrankung bei den meisten Patienten schubförmig, entweder mit vollständiger Rückbildung der Symptome oder verbleibendem neurologischen Defizit. Nach einer Krankheitsdauer von ungefähr zwanzig Jahren geht die RRMS bei circa 60% der Fälle in eine chronisch progrediente Verlaufsform über [36]. Ein CIS ist ein einmalig aufgetretenes erstes Schubereignis, welches sich durch individuelle Symptome klinisch diagnostizieren und als nachweisbare Läsion im MRT darstellen lässt. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein CIS mit nachgewiesenen Hirnläsionen innerhalb von 10 Jahren in eine klinisch gesicherte MS übergeht, liegt bei 60-80% [37].

Die Diagnosekriterien der MS unterliegen einem stetigen Wandel und wurden zuletzt 2017 überarbeitet [38]. Vor allem die MRT-Untersuchung hat für die Diagnosestellung in den letzten Jahren stark an Bedeutung zugenommen [39]. Zur Diagnostik der schubförmigen Verlaufsform zählt unter anderem die Registrierung von Schüben. Ein akuter Schub wird definiert durch das Auftreten neuartiger oder reaktiver Symptome für mehr als 24 Stunden, wobei der vorangegangene Schub mindestens 30 Tage her sein muss [1]. Für die Diagnosesicherung müssen die Läsionen im MRT beziehungsweise die klinisch manifesten Ereignisse räumlich und zeitlich voneinander getrennt auftreten [39]. „Räumlich“ bedeutet dabei in unterschiedlichen Bereichen des ZNS und „zeitlich“ das Auftreten mehrerer Ereignisse zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Zusätzlich können bei über 90% der MS-Patienten labordiagnostisch mittels isoelektrische Fokussierung oligoklonale Banden (OKB) des Immunglobulins G (IgG) im Liquor nachgewiesen werden, die im Serum nicht zu erkennen sind [40]. Die Liquordiagnostik dient einerseits dem Ausschluss differentialdiagnostischer Ursachen und andererseits dem laborchemischen Nachweis einer Entzündungsreaktion [41]. Zudem können evozierte Potenziale wie visuell, somatosensibel und motorisch evozierte Potenziale zur Darstellung der neuronalen Aktivität auf einen bestimmten Reiz abgeleitet werden. Durch die immunmedierten Schäden der Nerven bzw. Nervenbahnen und somit

verminderte neuronale Reizweiterleitung können diese bei MS-Patienten im Vergleich zu Gesunden verändert sein [42].

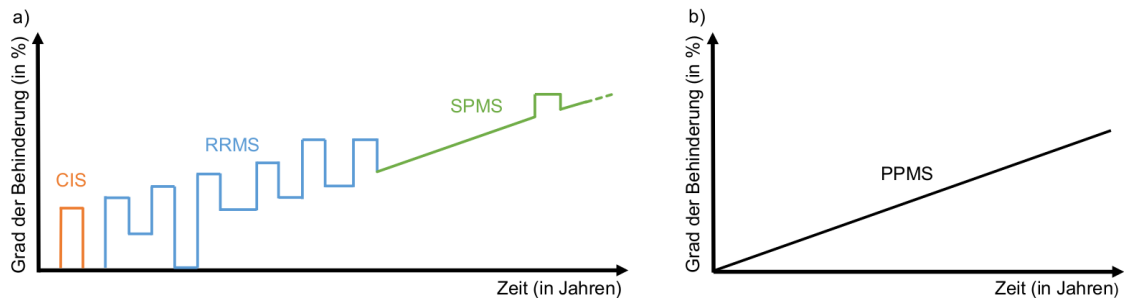


Abb. 1: Verlaufsformen der Multiplen Sklerose.

Die Abbildung zeigt den zunehmenden Grad der Behinderung über die Dauer der Erkrankung für die unterschiedlichen MS-Verlaufsformen [34]. a) Zeigt in blau die schubförmig verlaufende MS (engl. *relapsing-remitting multiple sclerosis*, RRMS) mit teilweise vollständiger Remission der einzelnen Schübe. In orange ist das klinisch isolierte Syndrom (engl. *clinically isolated syndrome*, CIS) dargestellt, das als einmalig aufgetretenes Schubereignis definiert ist. Die in grün dargestellte sekundär progrediente MS (SPMS) ist durch einen chronisch progredienten Verlauf mit eventuell vereinzelt auftretenden Schüben gekennzeichnet. Die b) primär progrediente MS (PPMS) verläuft von Krankheitsbeginn an ohne Schübe chronisch progredient.

Durch den chronischen Verlauf der MS nimmt das Ausmaß der Behinderung mit der Anzahl der Schübe und der Dauer der Erkrankung stetig zu. Der Grad der Behinderung kann anhand der *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) klinisch bestimmt werden. Diese Skala umfasst unter anderem die Funktionssysteme Motorik, Kleinhirn, Hirnstamm, Sensibilität, Blasen- und Mastdarm-Funktion, Visus und Kognition [43]. Durch die Bewertung der einzelnen Funktionssysteme ergibt sich ein Gesamtpunktwert, der von null bis zehn reicht, wobei null neurologisch unauffällig bedeutet und zehn der Tod durch MS. Die Aktivität der RRMS wird entweder klinisch, durch das Auftreten von Schüben, oder radiologisch, durch neue T2- oder kontrastmittelaufnehmende Läsionen im MRT, innerhalb des Bewertungszeitraums (meist ein Jahr) beurteilt [34]. Bei Schüben oder neuen Läsionen im Bewertungszeitraum wird die RRMS als klinisch aktiv eingestuft

und kann eine Änderung der pharmakologischen Therapie zur Folge haben (Kap. 1.1.4) [34]. Die individuelle Prognose ist bei MS-Patienten schwer vorherzusagen und abhängig von verschiedenen Faktoren [44, 45]. Ein monosymptomatischer Beginn ist im Vergleich zu einem polysymptomatischen Beginn mit einer günstigeren Prognose assoziiert [1].

1.1.4. Therapie

Das Ziel der MS-Therapie ist die Beeinflussung des Krankheitsverlaufs, die Verbesserung der Symptome und die Behandlung des akuten Schubes. Eine kurative Therapie der MS steht derzeit nicht zur Verfügung. Die Behandlung in Deutschland erfolgt nach einem Therapieschema, welches durch die Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) und dem Krankheitsbezogenen Kompetenznetz Multiple Sklerose (KKNMS) im Juli 2018 aktualisiert und ergänzt wurde [46]. Die Leitlinie zur Diagnose und Therapie der MS von August 2014 befindet sich aktuell (Stand März 2020) in Überarbeitung. Die Auswahl der zugelassenen beziehungsweise empfohlenen Medikamente ist abhängig von der jeweiligen Verlaufsform der Patienten (Abb. 2). Grundsätzlich ist ein frühzeitiger Beginn der Therapie für den Verlauf der Erkrankung entscheidend.

Zur Behandlung des akuten Schubes wird in Deutschland hochdosiert Methylprednisolon (500-1000 mg pro Tag) für drei bis fünf Tage intravenös verabreicht. Bestehen die Symptome weiterhin nach Beendigung der Therapie, so wird eine Eskalation mit ultrahochdosiertem Methylprednisolon (2 g pro Tag) durchgeführt. Bleibt auch dieser Versuch erfolglos, ist die Plasmapherese oder die Immunadsorption Mittel der Wahl [46]. Methylprednisolon gehört zu den Glukokortikosteroiden (GKS) und hemmt unter anderem die Aktivierung von T-Zellen und verringert die Einwanderung von Immunzellen aus dem Blut in das ZNS [47].

| | CIS | RRMS | | SPMS | PPMS | |
|-----------------------|--|-------------------------|---|---|--|---|
| Verlaufsbeeinflussung | <ul style="list-style-type: none"> - Glatirameracetat - Interferon-β 1a (i.m.) - Interferon-β 1a (s.c.) - Interferon-β 1b (s.c.) | (Hoch-) aktiver Verlauf | 1. Wahl: <ul style="list-style-type: none"> - Alemtuzumab - Cladribin - Fingolimod - Natalizumab - Ocrelizumab | 2. Wahl: <ul style="list-style-type: none"> - Mitoxantron | mit aufgesetzten Schüben: <ul style="list-style-type: none"> - Interferon-β 1a (s.c.) - Interferon-β 1b (s.c.) - Mitoxantron - Siponimod ohne aufgesetzte Schübe: <ul style="list-style-type: none"> - Mitoxantron - Siponimod* | <ul style="list-style-type: none"> - Ocrelizumab |
| | | Milder Verlauf | <ul style="list-style-type: none"> - Dimethylfumarat - Glatirameracetat - Interferon-β 1a (i.m.) - Interferon-β 1a (s.c.) - Interferon-β 1b (s.c.) - Pegyliertes Interferon-β 1a (s.c.) - Teriflunomid | | | |
| Schubtherapie | 1. Wahl: Hochdosis Methylprednisolon (i.v.) | | | | | |
| | 2. Wahl: Plasmapherese | | | | | |

Abb. 2: Therapieschema zur Behandlung verschiedener MS-Verlaufsformen.

Die Abbildung zeigt das Therapieschema der verschiedenen MS-Verlaufsformen adaptiert nach DGN/KKNMS [46]. Die Leitlinie gibt Empfehlungen heraus für die Therapie des klinisch isolierten Syndroms (engl. *clinically isolated syndrome*, CIS), die schubförmig verlaufende MS (engl. *relapsing-remitting multiple sclerosis*, RRMS) und die sekundär progrediente Verlaufsform (SPMS). Bei der Behandlung der RRMS wird ein milder Verlauf von einem akuten oder hochakuten Verlauf unterschieden. Bei der Behandlung der SPMS wird unterschieden, ob es sich um einen Krankheitsverlauf mit oder ohne aufgesetzte Schübe handelt. Siponimod wurde in dem vorliegendem Therapieschema ergänzt, da es im Januar 2020 für die Behandlung der SPMS in der EU zugelassen wurde.

*: mit Läsionen im MRT, i.m.: intramuskulär, i.v.: intravenös, s.c.: subkutan.

Zusätzlich zur Schubtherapie wird nach dem Therapieschema der DGN/KKNMS zur Sekundärprophylaxe eine immunmodulatorische Therapie mit einem verlaufsmodulierenden Medikament (*disease-modifying drugs*, DMD) zur Beeinflussung des Krankheitsverlaufs empfohlen [46]. Innerhalb der letzten 20 Jahre wurden mehr als 10 neue DMD zur Behandlung der MS zugelassen [48]. Die Hauptwirkmechanismen der DMD sind Immunmodulation (z.B. Glatirameracetat, Interferon-β), Beeinflussung der Zirkulation von Immunzellen (z.B. Natalizumab, Fingolimod) und Depletion von Immunzellen (z.B. Alemtuzumab, Ocrelizumab) [49]. Interferon-β (IFN-β) zählt zu den körpereigenen Zytokinen und hat unter anderem antivirale Eigenschaften.

Rekombinante IFN- β -Präparate werden zur Therapie des CIS, der milden RRMS und der SPMS mit aufgesetzten Schüben seit über 20 Jahren eingesetzt. Die erste Wahl zur Therapie der milden RRMS stellen immer noch die verschiedenen IFN- β -Präparate dar. Durch die Therapie kann die Schubrate verringert und das Auftreten neuer Gadolinium-aufnehmender Läsionen im MRT reduziert werden [50]. Als Weiteres sei für die Therapie der aktiven RRMS-Verlaufsform Fingolimod genannt. Fingolimod ist ein Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-Modulator (S1P-Rezeptor-Modulator), der 2011 in Deutschland zur Behandlung der aktiven RRMS zugelassen wurde [51]. Fingolimod bindet an den S1P-Rezeptor von Lymphozyten und verhindert so die Auswanderung von Lymphozyten aus den Lymphknoten in das Blut, sodass weniger autoreaktive Zellen die BHS passieren können [52]. Die Schubrate bei Patienten mit aktiver RRMS kann durch eine Therapie mit Fingolimod um bis zu 69% gesenkt werden [53]. Natalizumab und Fingolimod sind beides Medikamente, die bei der aktiven RRMS eingesetzt werden. Ocrelizumab, ein monoklonaler Antikörper der sich gegen CD20-positive Zellen richtet, ist seit Januar 2018 in Europa als intravenöse Infusionstherapie bei PPMS zugelassen [54]. Zu weiteren Informationen zu den weiteren Therapien sei an dieser Stelle auf den Übersichtsartikel von Giovannoni verwiesen [49].

Ergänzend zur immunmodulierenden Therapie mit DMD werden den MS-Patienten zum Erhalt der Lebensqualität und zur Sicherung der Teilhabe am sozialen und beruflichen Leben sowohl medikamentöse als auch nicht-medikamentöse symptomorientierte Therapien empfohlen [6]. Zur individuellen Therapie der Symptome stehen verschiedene Medikamente, beispielsweise Baclofen bei Spastiken oder Anticholinergika bei Blasenfunktionsstörungen, zur Verfügung [55]. Physiotherapie zur Verbesserung der Mobilität und Ergotherapie sowie eine medizinische Rehabilitation werden zusätzlich oder anstelle einer medikamentösen Symptomtherapie empfohlen [6, 55]. Bewältigungsstrategien (*Coping-Strategien*) sollen die Patienten im Umgang mit der Erkrankung stärken und die individuellen Ressourcen bewusst machen [56]. Zusätzlich sollte den MS-Patienten sozialmedizinische Unterstützung wie Berufsberatung angeboten werden.

1.2. Molekulare Biomarker

Biomarker sind objektiv messbare Parameter, die zum Nachweis biologischer Prozesse, zur Diagnostik von Pathologien oder zur Kontrolle von pharmakologischen Behandlungen dienen [57]. Die Anforderungen an einen geeigneten Biomarker sind eine hohe Sensitivität und eine hohe Spezifität. Zudem sollte die Messung von Biomarkern reproduzierbar und kostengünstig sein sowie ein geringes gesundheitliches Risiko für den Patienten mit sich bringen. Als Materialquelle für die Bestimmung von molekularen Biomarkern bei MS können die meisten Körperflüssigkeiten wie Blut, Liquor, Speichel und Urin verwendet werden. Aber auch Gewebeproben zum Beispiel aus dem ZNS können genutzt werden [58]. Im Rahmen von MS sind bisher vor allem Blut- und Liquor-Biomarker erforscht worden [59]. Unter anderem wird die Analyse von Proteinen, Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA), RNA und Stoffwechselmetaboliten als mögliche molekulare Biomarker bei MS in Betracht gezogen.

Im Folgenden ist eine Auswahl der besonders relevanten Biomarker für den klinischen Praxisalltag bei MS aufgeführt. Zur Unterstützung der Diagnosestellung der MS hat sich der Nachweis von OKB als molekularer Biomarker etabliert. Hierbei ergibt sich in der isoelektrischen Fokussierung von Serum- und Liquorproben ein patientenspezifisches Bandenmuster welches eine abnorme intrathekale Produktion von IgG aufzeigt [40]. Aquaporin 4-Antikörper im Serum sind spezifisch für die Neuromyelitis Optica (NMO) und daher bedeutsam für die Differentialdiagnostik der MS [41]. Der Nachweis von Antikörpern im Serum hat nicht nur eine Bedeutung für die Differentialdiagnostik, sondern auch für das Therapiemonitoring. Unter der Therapie mit nahezu allen DMD bei positivem Aquaporin 4-Antikörperstatus kann es zu einer deutlichen Verschlechterung der NMO kommen [60]. Bei circa 35% der MS-Patienten kommt es unter der Therapie von IFN- β zur Bildung neutralisierender Antikörper (*neutralizing antibodies*, NAb) [61]. NAb reduzieren die Wirksamkeit von IFN- β sowie anderer verlaufsbeeinflussender Medikamente und daher ist der Nachweis von NAb ein Indikator für den Therapiemisserfolg. *Neurofilament light chain* (NFL) ist ein Protein, dass im Serum und Liquor von MS-Patienten deutlich erhöht ist gegenüber gesunden Kontrollen und als

Biomarker für die axonale Schädigung dienen kann [62, 63]. Während eines Schubes können sowohl im Serum als auch im Liquor erhöhte NFL-Level gemessen werden [64].

Der bisherige Schwerpunkt der Biomarker-Forschung bei MS lag bei den Antikörpern, jedoch gelangen Moleküle wie RNA und DNA durch die fortschreitende Entwicklung der Genom- und Genexpressionsanalysen immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses. Die mit der DNA und RNA verbundenen physiologischen Prozesse wie alternatives Spleißen, bieten einen Ansatzpunkt für die zukünftige Forschung.

1.3. Genexpressionsanalysen

Methoden zur Analyse der Genexpression stellen einen großen und wichtigen Bestandteil der aktuellen molekularbiologischen Forschung dar. Durch die rasch fortschreitende Entwicklung neuer Technologien und Analysesoftware kam es vor allem in den letzten 10 bis 20 Jahren zu einem enormen Wissenszuwachs in der molekularbiologischen und genetischen Forschung. Im Humangenomprojekt gelang es im April 2003, die DNA-Sequenz des gesamten menschlichen Genoms vollständig zu entschlüsseln [65]. Diese Sequenzierung bildet die Grundlage für viele der aktuell verwendeten Technologien wie Polymerase-Kettenreaktion-Assays (engl. polymerase chain reaction, PCR) und Microarrays. Die Genexpression durchläuft grundlegend drei Schritte: Transkription, Prozessierung und Translation.

1.3.1. Quantitative PCR

Die PCR dient grundsätzlich der Vervielfältigung von bestimmten DNA-Abschnitten beziehungsweise von RNA-Abschnitten, wenn diese durch eine reverse Transkriptase in komplementäre DNA (*complementary* DNA, cDNA) umgeschrieben wurden. Ein PCR-Zyklus besteht aus den Schritten Denaturierung, Anlagerung und Elongation, die zu ganz bestimmten Temperaturen und mit einer thermostabilen DNA-Polymerase durchgeführt werden müssen. Insgesamt werden diese Schritte dann in bis zu 50 Zyklen

wiederholt [66]. Zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte ist die Verwendung von spezifischen Oligonukleotid-Primern notwendig, die der Polymerase jeweils ein freies 3'-Hydroxyende (OH-Ende) zur Verfügung stellen. Am Ende der Amplifikation erfolgt der Nachweis der PCR-Produkte bei der klassischen PCR zum Beispiel durch Agarose-Gelelektrophorese [67]. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes trennen sich die amplifizierten Stränge nach ihrer Größe und es entsteht ein typisches Bandenmuster.

Die quantitative PCR ist eine Sonderform der PCR-Methode. Im Gegensatz zur klassischen PCR kann bei dieser Methode die amplifizierte DNA oder cDNA nach jedem Zyklus, also in „Echtzeit“, quantifiziert werden [68]. Es stehen hierbei viele verschiedene Verfahren zur Verfügung [69]. Eine häufig verwendete ist die TaqMan®-Methode mit einer sogenannten Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer-Sonde (FRET-Sonde), die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Die FRET-Sonde besteht aus einem Reporter und einem Quencher. Reporter und Quencher müssen in einem Abstand von 6 bis 10 nm voneinander entfernt sein, damit die Sonde kein Fluoreszenzsignal abgibt. Bei der Anlagerung der Primer lagert sich auch die Sonde komplementär an einen DNA-Strang an. Bei der Elongation baut die DNA-Polymerase die FRET-Sonde ab und Quencher und Reporter entfernen sich voneinander. Durch den fehlenden Energietransfer des Quenchers gibt der Reporter ein fluoreszierendes Signal ab, das von einem Detektor des PCR-Geräts gemessen werden kann (Abb. 3). Dieser Ablauf wird genau wie bei der Standard-PCR bis zu 50 mal wiederholt. Da die fluoreszierenden Reporter akkumulieren, kann die Menge des vervielfältigten DNA-Abschnitts im Vergleich zur klassischen PCR nach jedem Zyklus quantifiziert werden [69].

Grundsätzlich muss bei der PCR die zu amplifizierende Gensequenz bekannt sein, da spezifische Primer benötigt werden. Bei Genen aus großen Genfamilien ist das Design der Primer teilweise schwierig, da die Gensequenzen sich möglicherweise sehr ähnlich sind und sichergestellt sein muss, dass auch wirklich ein Abschnitt des gewünschten Gens vervielfältigt wird. Die PCR-Methode ist weniger für die Quantifizierung vieler verschiedener Gene geeignet, da die Anschaffung der spezifischen Primer sehr kostenaufwendig und der Pipettieraufwand im Labor sehr hoch ist.

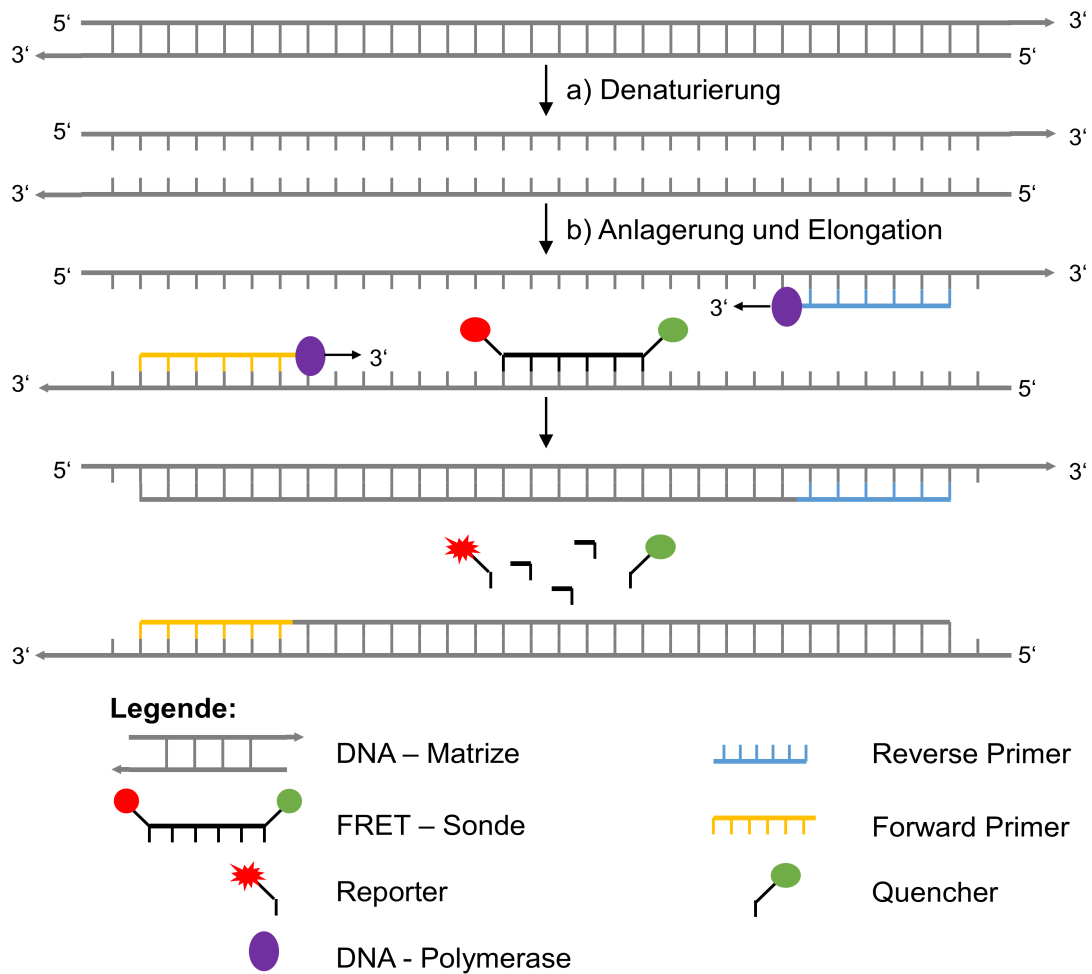


Abb. 3: Quantitative Echtzeit-PCR nach TaqMan®.

Die Abbildung zeigt einen Zyklus der PCR-Analyse mit den Schritten Denaturierung, Anlagerung und Elongation. Bei der TaqMan-Methode erfolgt der quantitative Nachweis der vervielfältigten DNA-Abschnitte durch eine Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer-Sonde (FRET-Sonde) [68]. Im Anschluss an die Denaturierung lagern sich die Primer am jeweils komplementären DNA-Strang an. Auch die FRET-Sonde besteht aus einem zur Ziel-DNA komplementären Oligonukleotid und lagert sich an. Die DNA-Polymerase synthetisiert kontinuierlich in 5'-3'-Richtung einen komplementären DNA-Strang und baut dabei die FRET-Sonde ab. Der Reporter gibt ein fluoreszierendes Signal durch den Abbau der Sonde ab. Dieser Vorgang wird in jedem PCR-Zyklus wiederholt und die entstehenden fluoreszierenden Reporter akkumulieren. Das Fluoreszenzsignal kann durch einen Detektor erfasst und quantifiziert werden.

1.3.2. Transkriptomanalysen

Als Transkriptom wird die Gesamtmenge an RNA-Molekülen bezeichnet, die zum Zeitpunkt einer Messung in einer Zelle vorliegt. Zur Messung des Transkriptoms verwendet man unter anderem Microarrays. Heutige Generationen von Microarrays bestehen aus mehreren Millionen Sonden. Jede Sonde besteht aus Oligonukleotiden mit einer spezifischen Nukleinsäuresequenz, an der in cDNA umgeschriebene RNA-Moleküle hybridisiert werden können [71]. Man unterscheidet grundsätzlich 1- und 2-Farben-Microarrays. Bei letzteren wird die cDNA von zwei verschiedenen Proben, zum Beispiel Blutproben von einem Patienten und einer Kontrollperson, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und auf das Microarray aufgetragen. Die in dieser vorliegenden Doktorarbeit verwendeten Daten (Kap. 3.2.1.) beruhen auf Microarrays der Firma Affymetrix [70, 71]. Es handelt sich hierbei um 1-Farben-Microarrays, bei denen die fragmentierte cDNA einer Probe mit nur einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wird. Bei der Herstellung von Microarrays werden im Wesentlichen zwei Methoden unterschieden. Bei der einen Methode werden die Oligonukleotidsonden im Vorfeld auf einer Platte synthetisiert und dann mit einem Roboter auf das Microarray aufgetragen (engl. *Spotting*). Bei Affymetrix Microarrays werden hingegen die Sonden photolithographisch direkt auf dem Microarray synthetisiert. Jedes Oligonukleotid der Affymetrix Microarrays hat eine Länge von 25 Basen.

Der Begriff *Next-Generation Sequencing* (NGS) umfasst Methoden zur DNA-Sequenzierung, die auf der ursprünglichen Sanger-Methode aufbauen [72]. Sie dienen der Sequenzierung und quantitativen Bestimmung von genomischer DNA oder RNA in Form von cDNA [73]. Die DNA- oder cDNA-Moleküle werden vor der Sequenzierung fragmentiert, da nach heutigem technischen Stand die möglichst fehlerfreie Sequenzierung längerer Oligonukleotide nicht möglich ist. Typischerweise erfolgt ein NGS-Experiment mit ungefähr 50 Millionen *Reads*, also 50 Millionen Sequenzierungen, und einer *Read Length* von 50-150 Basen pro Sequenz. Zur Auswertung der dabei entstehenden großen Datenmengen ist ein komplexes bioinformatisches *Mapping* gegen das Referenzgenom notwendig. Bei der Verwendung von cDNA ist die Anzahl der *Reads* in der Auswertung ein Maß für die Genexpression. NGS-Methoden sind komplex und

hochdynamisch und es existieren nach heutigem Stand noch wenige Standards. So werden zum Beispiel verschiedene Protokolle und verschiedene bioinformatische Methoden für die Auswertung verwendet. Im Vergleich zur Microarrayanalyse kann eine RNA-Sequenzierung mittels NGS zusätzlich zum Genexpressionslevel auch Informationen über exonische SNPs liefern.

1.3.3. Techniken zur Proteinanalytik

Auch auf Proteinebene können Analysen der Genexpression durchgeführt werden. Grundlegend unterscheidet man bei den Techniken zur Analyse einzelner Proteine den Nachweis mit spektrometrischen oder antikörperbasierten Methoden. Mit spektrometrischen Methoden können einzelne Proteine anhand ihrer spezifischen Masse und Ladung nachgewiesen werden [74]. Die Immunfärbung (engl. *immunostaining*) umfasst eine Reihe von Techniken wie Immunhistochemie, Durchflusszytometrie, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) und Immunblot-Verfahren [75]. Bei diesen Methoden können durch Verwendung spezifischer Antikörper einzelne Proteine nachgewiesen werden. An die spezifischen Antikörper sind typischerweise entweder Enzyme, zum Beispiel Peroxidasen, Fluoreszenzfarbstoffe, auch Fluorochrome genannt, oder radioaktive Moleküle gekoppelt (Abb. 4). Durch Bindung eines enzymgekoppelten Antikörpers an das Zielprotein kann ein hinzugegebenes Substrat umgesetzt werden und es kommt so zu einem Farbumschlag. Antikörper, die mit Fluorochromen gekoppelt sind, können, wenn sie an das Zielprotein gebunden haben, durch Licht angeregt werden. Die Fluoreszenzen können anschließend mittels klassischer Fluoreszenzmikroskopie oder konfokaler Mikroskopie detektiert werden. Mit der Immunhistochemie können einzelne Proteine in verschiedenen Geweben identifiziert werden [75]. Mit der Durchflusszytometrie werden spezifische Proteine gemessen, die an der Oberfläche verschiedener Zellen exprimiert werden [76]. Mit ELISA oder Immunblot können einzelne Proteine in Flüssigkeiten wie Blut oder Serum nachgewiesen werden.

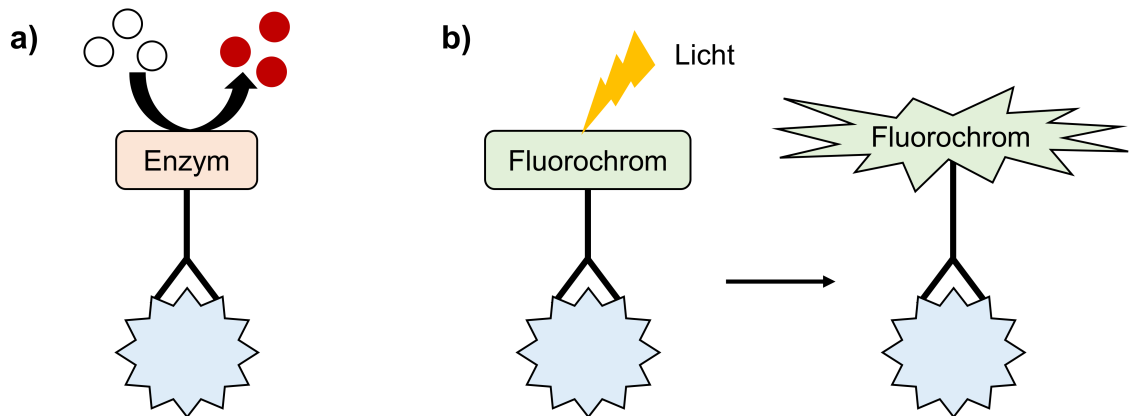


Abb. 4: Enzymgekoppelte und Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper.

In a) ist ein enzymgekoppelter Antikörper zum Nachweis von einzelnen Proteinen schematisch dargestellt. Der enzymgekoppelte Antikörper hat an das Zielprotein (blau) gebunden. Das zugegebene Substrat (schwarze Kreise) wird durch das Enzym (z.B. Peroxidase) enzymatisch umgesetzt. Durch die enzymatische Umsetzung des Substrats kommt es zu einem Farbumschlag (rote Kreise). Der Teil b) der Abbildung stellt schematisch einen Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoff, einem sogenannten Fluorochrom (grüne Box), dar. Nach Bindung des gekoppelten Antikörpers an das Zielprotein (blau) können die Fluorochrome durch Lichteinwirkung angeregt werden (durch gezackte Umrandung des Fluorochroms dargestellt).

1.4. Alternatives Spleißen

Bei der Transkription im Zellkern wird DNA mit Hilfe der RNA-Polymerase II in *precursor* mRNA (pre-mRNA) umgeschrieben. Die pre-mRNA besteht aus sogenannten Exons und Introns. Die RNA-Prozessierung ist ein komplexer Vorgang, der simultan zur Transkription, also kotranskriptional, stattfindet. Aus den pre-mRNA-Molekülen werden dabei die Introns herausgetrennt und gleichzeitig die Exons durch zweifache Umesterung zusammengefügt [77]. Hierfür sind Spleißosomen erforderlich, große RNA-Proteinkomplexe, die sich aus kleinen nukleären Ribonukleoproteinen, Spleißfaktoren und der pre-mRNA zusammensetzen [78]. Für die Initiation des Spleißvorgangs haben vor allem die *small nuclear ribonucleic acids*, die sich im Zellkern eukaryotischer Zellen befinden, eine große Bedeutung. Neben dem Spleißen werden am 5'-Ende der pre-mRNA eine Kappe, bestehend aus einem Guanosinmonophosphatrest und ein- bis dreifacher Methylierung, und am 3'-Ende eine Kette aus Adenosinmonophosphaten angefügt. Endprodukt ist dann die mRNA, die für die Translation aus dem Zellkern transportiert wird. Im Zytoplasma der Zelle wird die mRNA mit Hilfe von Ribosomen und Transfer-RNAs anhand einer Basentriplettkodierung in Aminosäuresequenzen übersetzt [79].

1.4.1. Typen des alternativen Spleißens

Durch unterschiedliche Kombination der Exons und alternativen Spleißstellen besteht die Möglichkeit, dass ein ursprüngliches pre-mRNA-Molekül in verschiedenen Prozessierungsvorgängen zu unterschiedlichen Spleißvarianten führen kann [77, 78]. Man unterscheidet die Endprodukte in unterschiedliche Typen des alternativen Spleißens (Abb. 5). Ein Exon kann übersprungen werden (engl. *exon skipping*), ein Intron kann im mRNA-Molekül beibehalten werden, Exons können wechselseitig ausgeschlossen werden und 5'- oder 3'-Spleißstellen können verändert sein, sodass im Vergleich zur konstitutiven Spleißvariante verkürzte oder verlängerte Exons entstehen. Zusätzlich zu den verschiedenen ASE wird die Diversität der Genprodukte durch alternative Transkriptionsstarts und -enden erhöht.

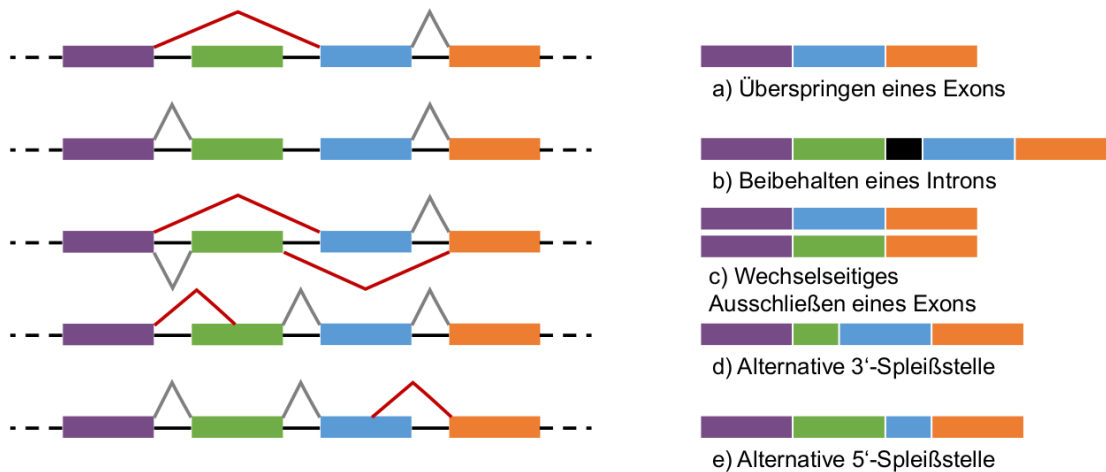


Abb. 5: Typen von alternativen Spleißereignissen.

Die Boxen in blau, grün, orange und violett stehen für vier verschiedene Exons in 5'-3'-Richtung eines exemplarisch dargestellten Gens. Die schwarze Linie zwischen den Boxen stellt die intronischen Sequenzen dar. Die Spleißvorgänge sind jeweils durch die gewinkelten Linien abgebildet. Die roten Linien stehen für alternative Spleißvorgänge. Auf der rechten Seite der Abbildung sind die korrespondierenden alternativen Spleißereignisse gezeigt.

Das Spleißosom erkennt auf der pre-mRNA bestimmte Spleißstellen am 5'- und am 3'-Ende der Introns (Abb. 6). Bei diesen sogenannten Konsensussequenzen handelt es sich am 5'-Ende von Introns um einen Donor mit einer Guanin-Uracil-Sequenz und am 3'-Ende des Introns um einen Akzeptor mit einer Adenosin-Guanin-Sequenz [80]. Cis-regulatorische Elemente wie die 5'- und 3'-Spleißstellen, die *branchpoint* Sequenz (BPS) und der Polypyrimidintrakt (PPT) sind wichtige Erkennungssequenzen für das alternative Spleißen. BPS ist ein Adenosin-Molekül im Intron, dessen OH-Gruppe mit dem 5'-Ende des Introns reagiert und somit zu einer Art Lasso-Struktur des Introns führt [77]. PPT ist eine intronische Erkennungssequenz zwischen der BPS und der 3'-Spleißstelle und dient bei der Zusammensetzung des Spleißosoms zur Identifikation der 3'-Spleißstelle.

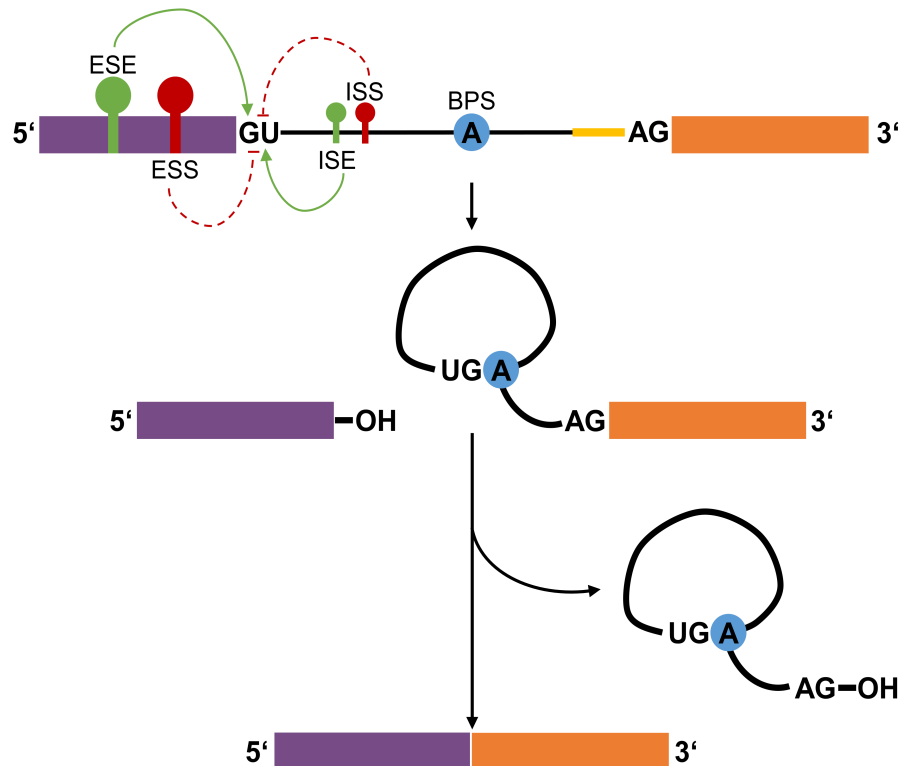


Abb. 6: Schematische Darstellung des Spleißvorgangs.

Die Abbildung zeigt eine vereinfachte Darstellung des Spleißvorgangs eines pre-mRNA-Moleküls mit zwei Exons (violette und orange Box) und einem Intron (schwarze Linie) in 5'-3'-Richtung. Die cis-regulatorischen Elemente sind wichtige Erkennungssequenzen für das alternative Spleißen wie die 5'- (Guanin-Uracil-Sequenz, GU) und 3'-Spleißstelle (Adenosin-Guanin-Sequenz, AG), die *branchpoint* Sequenz (BPS, blauer Kreis) und der Polypyrimidintrakt (PPT, gelbe Linie im Intron) [80]. Sowohl intronische als auch exonische *Splicing Enhancer* (grün) und *Splicing Silencer* (rot) sind in der Abbildung dargestellt. Die hemmende Wirkung der *Splicing Silencer* auf die 5'-Spleißstelle ist exemplarisch mit der rot-gestrichelten Linie dargestellt. Die steigernde Wirkung der *Splicing Enhancer* auf die 5'-Spleißstelle ist mit grünen Pfeilen dargestellt. Bei der ersten Umesterung bindet das Guanin der 5'-Spleißstelle an das Adenosin der BPS. Durch erneute Umesterung werden die beiden Exons zusammengefügt und das Intron wird als eine Art Lassostruktur abgetrennt.

ESE: exonischer *Splicing Enhancer*, ESS: exonischer *Splicing Silencer*, ISE: intronischer *Splicing Enhancer*, ISS: intronischer *Splicing Silencer*, -OH: Hydroxygruppe.

Splicing Silencer und *Splicing Enhancer* sind Sequenzen der pre-mRNA, die von Untereinheiten beziehungsweise Kofaktoren des Spleißosoms gebunden werden und die 5'- und 3'-Spleißstellen beeinflussen können. Diese circa 4-20 Basen-langen Erkennungssequenzen können sowohl intronisch als auch exonisch liegen. Trans-acting Faktoren wie Serin- und Arginin-reiche Proteine bzw. *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNP) haben durch Bindung an diese Sequenzen eine steigernde bzw. hemmende Wirkung auf das alternative Spleißen. Individuelle genetische Varianten in regulatorischen Bereichen der pre-mRNA können zu einem veränderten Spleißmuster führen [81-83]. Dies lässt sich in Zellkulturen mit *splicing reporter* Minigenassays untersuchen [84].

1.4.2. Alternative Spleißereignisse im Zusammenhang mit Erkrankungen

Das alternative Spleißen ist ein komplexer Vorgang, bei dem es an unterschiedlichen Stellen des Prozesses zu individuellen Abweichungen kommen kann. Die Identifikation der Spleißstellen muss äußerst genau erfolgen und ein SNP in einer dieser Stellen kann zu verschiedenen Proteinisoformen oder möglicherweise einem *Nonsense-mediated mRNA Decay* führen [85]. Es wurden bereits einige genetische Varianten, die das Spleißen bestimmter Gene beeinflussen, bei Erkrankungen gut untersucht. Im Folgenden seien einige Beispiele im Kontext verschiedener Erkrankungen genannt.

In der Tumorforschung konnte gezeigt werden, dass alternative Spleißvarianten sowohl bei der Entstehung von Tumoren als auch beim Therapieansprechen eine Rolle spielen [86]. Beispielsweise ist für das E-Cadherin-Gen, welches wichtig für den Zell-Zell-Kontakt in Blutgefäßen ist, eine alternative Spleißvariante identifiziert worden. Die Variante mit einer alternativen 3'-Spleißstelle ist mit der Entstehung von Brustkrebs assoziiert [87].

Für das Dystrophin-Gen sind zwei Spleißenden-Mutationen in den Exons 16 und 45 identifiziert worden, die möglicherweise im Zusammenhang mit der Muskeldystrophie Duchenne stehen [88]. Bei den spinalen Muskelatrophien ist bei 90% der Patienten eine Mutation oder Deletion der SMN-Gene nachweisbar, wodurch es zu einer verminderten Expression der Gesamtlängen Proteinisoform kommt [89].

Erste therapeutische Ansätze zeigen, dass das alternative Spleißmuster beeinflusst werden kann. Antisense-Oligonukleotide sind synthetisch hergestellte kurzkettige Nukleinsäurestränge (üblicherweise 15-30 Basen), die an komplementäre RNA-Sequenzen binden. Neuere Studien mit Antisense-Oligonukleotiden zur Behandlung von monogenischen neuromuskulären Erkrankungen zum Beispiel Muskeldystrophie Duchenne oder spinalen Muskelatrophien zeigten bereits, dass die Beeinflussung des alternativen Spleißens durch die Therapie mit Antisense-Oligonukleotiden möglich ist [90].

Auch im Bezug auf MS existieren bereits eine Reihe von Studien, bei denen der Zusammenhang von ASE und MS untersucht wurde (Kap. 4.1.). Die bislang einzige Übersichtsarbeit zu dem Thema ist aus dem Jahre 2010 [91]. Diese bezieht sich aber nicht nur auf ASE bei MS, sondern auch auf ASE bei anderen neurologischen Erkrankungen. Daher bezieht sich die vorliegende systematische Arbeit gezielt auf den aktuellen Literaturstand der bisher bekannten MS-assoziierten alternativen Spleißereignisse. Ferner werden die bisher beschriebenen ASE in Transkriptomdaten von MS-Patienten einer Rostocker Kohorte und gesunden Kontrollen reevaluiert.

2. Fragestellungen

Die MS ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS multifaktorieller Genese, deren genetische Komponente zwar weit erforscht aber trotzdem nicht hinreichend verstanden ist. Ziel dieser Studie war es, durch eine systematische Literaturrecherche bereits zu MS untersuchte alternative Spleißereignisse zu detektieren und diese ASE in Transkriptomdaten von MS-Patienten einer Rostocker Kohorte und Gesunden zu validieren. Um einen möglichst breit gefächerten Überblick der bisher in der Literatur erforschten alternativen Spleißvarianten bei MS zu erhalten, wurden folgende Fragen untersucht:

- In wie vielen Studien wurde die Expression alternativer Spleißvarianten bei MS-Patienten untersucht?
- Welche Studiendesigns wurden in den einzelnen Arbeiten verwendet?
- Wurden signifikante Unterschiede in der Expression von Spleißisoformen im Gruppenvergleich (z.B. MS-Patienten verglichen mit Kontrollen) beschrieben?
- In welchem Probenmaterial wurde die Expression der alternativen Spleißvarianten verglichen?
- Mit welchen Methoden wurden die Expressionslevel untersucht?
- In wie vielen Studien wurden sogenannte Minigenassays für die Analysen verwendet?
- Welche alternativ gespleißten Gene sind bei MS bisher untersucht worden und wie einheitlich ist die Studienlage zu diesen Genen?
- Welche alternativen Spleißstypen konnten für diese Gene nachgewiesen werden?
- Was ist über die Auswirkungen des alternativen Spleißens dieser Gene bekannt und welche biologischen Prozesse sind davon betroffen?

Im Rahmen der biostatistischen Überprüfung der bisher untersuchten alternativen Spleißereignisse in Transkriptomdaten von MS-Patienten der Rostocker Kohorte und gesunden Kontrollen wurden folgende Fragen analysiert:

- Durch welche *probe sets* sind die in der Literatur untersuchten ASE auf Affymetrix Microarrays erfasst?
- Lassen sich die in der Literatur ermittelten ASE in einer bioinformatischen Auswertung von Transkriptomdaten zu MS-Patienten der Rostocker Kohorte und Gesunden validieren?
- Lassen sich die mit MS assoziierten ASE nur in bestimmten Zellpopulationen (B-Zellen, T-Zellen, Monozyten, NK-Zellen) des Blutes oder konsistent in Lymphozyten und Monozyten validieren?

3. Material und Methoden

3.1. Literaturrecherche

3.1.1. Studiendesign

Die vorliegende systematische Übersichtsarbeit bietet eine aktuelle Literaturübersicht zu bisher untersuchten alternativen Spleißereignissen in Studien, in denen Probenmaterial von MS-Patienten verwendet wurde. Im Vergleich zu narrativen *Reviews*, die ebenfalls einen breiten Literaturüberblick zu einem wissenschaftlichen Thema bieten, erfolgte die Literatursuche dieser systematischen Übersichtsarbeit nach vorheriger Festlegung von Ein- und Ausschlusskriterien. Für systematische Übersichtsarbeiten existiert im Vergleich zu narrativen *Reviews* eine Richtlinie mit objektiven Kriterien für die Literatursuche und die deskriptive Analyse der in den einzelnen Studien untersuchten Daten. Für die folgende systematische Übersichtsarbeit wurden die *Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses* (PRISMA), die von internationalen Forschungsgruppen erstellt wurden, berücksichtigt [92]. Die nach vorheriger Festlegung von Kriterien relevanten Informationen der einzelnen Arbeiten wurden extrahiert. Die Charakteristika der einzelnen Studien wurden unter anderem tabellarisch erfasst. Zur Reevaluation der bisher zu MS beschriebenen ASE wurde eine anschließende Analyse mit Transkriptomdaten von MS-Patienten einer Rostocker Kohorte und gesunden Kontrollen durchgeführt. Einen Überblick über den Ablauf der Arbeit gibt die Abb. 7.

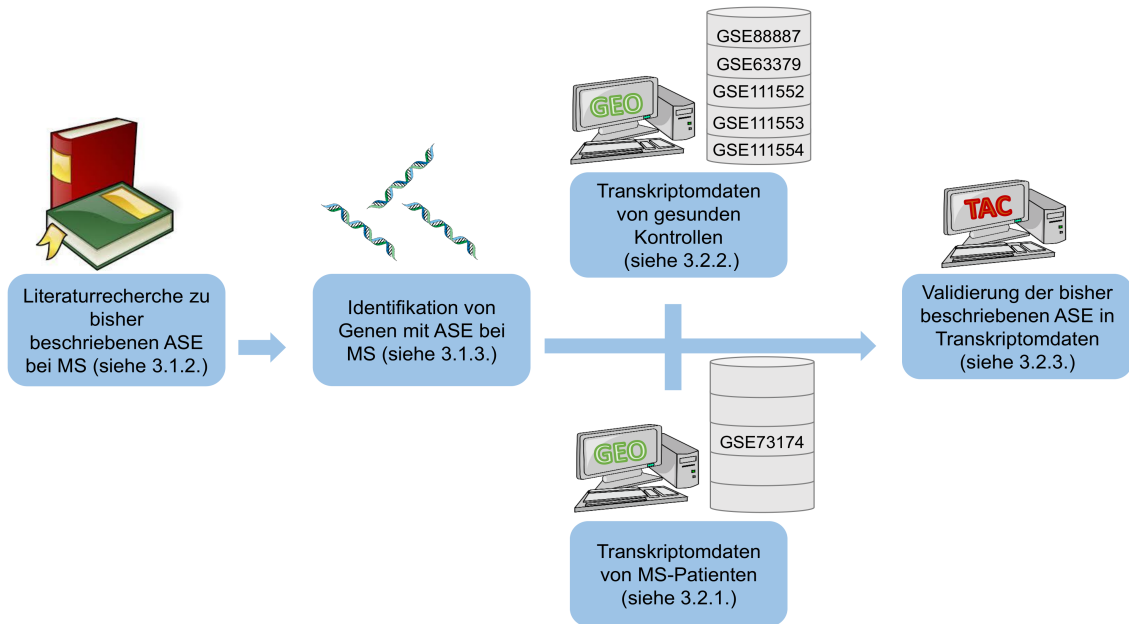


Abb. 7: Studiendesign der vorliegenden Übersichtsarbeit.

In den blauen Boxen sind die einzelnen Schritte der vorliegenden Übersichtsarbeit dargestellt. In den Klammern sind die jeweiligen Unterkapitel angegeben, in denen die einzelnen Schritte näher beschrieben sind.

ASE: alternatives Spleißereignis, GSE: Gene Expression Omnibus Seriennummer, MS: Multiple Sklerose, TAC: Transcriptome Analysis Console.

3.1.2. Suchstrategie und Kriterien der Literatursuche

Zur Identifikation von Literatur für die Erstellung der systematischen Übersichtsarbeit zu bereits untersuchten alternativen Spleißereignissen bei MS wurde die Literaturdatenbank PubMed unter den Suchbegriffen „*splicing*“ und „*multiple sclerosis*“ durchsucht. Es wurden alle Artikel mit einbezogen, die bis einschließlich dem 20. März 2019 veröffentlicht wurden. Für das Datum der Veröffentlichung gab es keine weiteren Einschränkungen. Um weitere potentiell relevant erscheinende Artikel für die systematische Übersichtsarbeit zu identifizieren, wurden die Referenzlisten, der über die PubMed-Datenbanksuche ermittelten Artikel, durchgesehen. Die berücksichtigte PRISMA-Richtlinie für systematische *Reviews* und Metaanalysen beinhaltet ein vierschrittiges Flussdiagramm für die Literatursuche und eine Checkliste mit 27 Punkten (Suppl. 1) [92]. Bei der Literatursuche wurden, anlehnend an die PRISMA-

Richtlinie, die vier Arbeitsschritte „Suche“, „Sichtung“, „Eignung“ und „Eingeschlossen“ durchgeführt. Während der Sichtung wurden die Abstracts aller Artikel gelesen. Artikel, deren Volltexte nicht in Englisch verfügbar waren, wurden in diesem Arbeitsschritt ausgeschlossen. Alle in englischer Sprache verfügbaren Volltexte wurden heruntergeladen und im *Portable Document Format* (PDF) abgespeichert. Bei Artikeln, deren Volltexte nicht über den Universitätszugang frei verfügbar waren, wurden die Autoren per E-Mail kontaktiert. Die Volltexte wurden anschließend anhand der eigenen in der Tab. 1 aufgeführten Kriterien beurteilt.

Tab. 1: Einschlusskriterien für die systematische Literatursauswahl.

| Einschlusskriterien | |
|----------------------------|---|
| 1. | Originalarbeit mit Verwendung von Forschungsmethoden und -materialien und Darstellung der Ergebnisse |
| 2. | experimentelle Messung der Expressionslevel von mindestens zwei verschiedenen humanen protein-kodierenden Isoformen |
| 3. | Untersuchung in Probenmaterial von MS-Patienten |

In der Tabelle sind die Einschlusskriterien aufgeführt, die für die Auswahl der Literatur dieser systematischen Übersichtsarbeit bestimmt wurden. Die in englischer Sprache verfügbaren Volltexte wurden anhand der eigens festgelegten Kriterien beurteilt. Um in die qualitative Auswertung eingeschlossen zu werden, mussten die einzelnen Studien alle drei Kriterien erfüllen.

Im Rahmen der Eignung für die systematische Übersichtsarbeit mussten alle Kriterien von den einzelnen Studien erfüllt werden. Artikel, bei denen die jeweiligen Autoren keine experimentell ermittelten Forschungsinhalte publiziert haben, zum Beispiel *Reviews*, wurden ausgeschlossen. Im nächsten Schritt wurden alle Artikel ausgeschlossen, deren Autoren nicht mindestens zwei verschiedene humane protein-kodierende Isoformen eines exprimierten Gens auf RNA- oder Proteinebene gemessen haben. Es wurden keine Einschränkungen betreffend des untersuchten Probenmaterials, den untersuchten Zellen bzw. Zelltypen oder den verwendeten Methoden gemacht. Im letzten Schritt der Eignung wurde bei allen verbliebenen Artikeln überprüft, ob Probenmaterial, zum Beispiel Blut von MS-Patienten, untersucht wurde. Hierbei wurden keine Einschränkungen bezüglich der Größe der MS-Kohorte,

der MS-Verlaufsform, der Krankheitsdauer oder dem Schweregrad der Erkrankung anhand des EDSS gemacht. Auch die Art und Dauer der therapeutischen Behandlung stellte kein Ausschlusskriterium dar. Bei allen MS-Patienten erfolgte die Diagnosestellung anhand der zu dem jeweiligen Zeitpunkt geltenden Diagnosekriterien. Anhand der festgelegten Kriterien und orientierend an den Arbeitsschritten des PRISMA-Flussdiagramms, wurden die als relevant identifizierten Artikel in die nachfolgende qualitative Untersuchung eingeschlossen.

3.1.3. Qualitative Untersuchung der eingeschlossenen Artikel

Die nach der Eignungsphase eingeschlossenen Artikel wurden zur qualitativen Untersuchung anhand verschiedener Kriterien tabellarisch zusammengefasst. Für die Tabelle wurden für jeden einzelnen Artikel die offiziellen Gensymbole der untersuchten Gene nach der Datenbank der HUGO *Gene Nomenclature Committee* (HGNC) ermittelt (Suppl. 2). Die Bestimmung der entsprechenden HGNC-Gensymbole aus der *GeneCards*-Datenbank für jedes einzelne in den Studien untersuchte Gen erfolgte zur Vereinheitlichung, da je nach Erstbeschreiber und Kontext Alias-Namen für die Gene existieren, zum Beispiel CD45 für PTPRC. In der *GeneCards*-Datenbank werden aus unterschiedlichen Quellen Informationen zu menschlichen Genen, wie die genomische Lokalisation und die molekulare Funktion, zusammengefasst [93]. Eine letzte Überprüfung der HGNC-Gensymbole anhand der *GeneCards*-Datenbank erfolgte am 31. März 2019 (Version 4.9).

Die Informationen über die in den einzelnen Studien verwendeten Messmethoden zur Detektion von ASE, zum Beispiel PCR oder ELISA, wurden extrahiert und in der Tabelle zusammengetragen. Die Zusammenfassung der in den einzelnen Studien verwendeten Probenmaterialien zur Detektion von ASE, wie Blutzellen oder Hirngewebe, erfolgte ebenfalls in der Tabelle. Für jede MS-Kohorte, deren Probenmaterialien untersucht wurden, wurde die in den Artikeln angegebene aktuelle Therapie herausgesucht und in der Tabelle aufgelistet.

Die in den gescreenten Arbeiten verwendeten Studiendesigns waren sehr heterogen, sodass eine Extraktion der in den einzelnen Arbeiten betrachteten

Vergleiche erfolgte. Die Studiendesigns wurden entsprechend kategorisiert, zum Beispiel der Vergleich von MS-Patienten und Gesunden als „Fall-Kontroll-Studie“ oder der Vergleich von verschiedenen Genotypen als „Genotyp“, und die Informationen wurden in der Tabelle hinterlegt. Anschließend erfolgte für jedes Studiendesign die Überprüfung, ob die Untersuchung signifikante Unterschiede im Gruppenvergleich ergab oder nicht, und die Information wurde ebenfalls in der Tabelle erfasst. Für die Detektion von ASE wurden in einigen Studien *splicing reporter* Minigenassays verwendet. Bei dieser Analysemethode wird das zu untersuchende Exon mit angrenzenden intronischen Sequenzen amplifiziert und in einen Expressionsvektor kloniert [84]. Durch zielgerichtete Mutagenese, eine PCR-basierte Methode zur Mutation einzelner spezifischer Nukleotide, werden genetische Varianten erzeugt [94]. Anschließend kann die genotypabhängige Rate der Exon-Inklusion oder -Exklusion nach transienter Transfektion von Zelllinien beispielsweise mit PCR quantifiziert werden. Die Information über die Verwendung eines *splicing reporter* Minigens für die Untersuchung von ASE wurde für jede Studie extrahiert und in der Tabelle angegeben.

Zusätzlich zu der Übersicht über die einzelnen Literaturstellen wurde eine weitere Tabelle mit Informationen zu den bisher beschriebenen ASE erstellt. Zur Vereinheitlichung wurden für die Gene zu denen ASE in der Literatur beschrieben worden sind die HGNC-Gensymbole aus der *GeneCards*-Datenbank in der Tabelle verwendet. Eine Einschränkung Literatúrauswahl im Hinblick auf die untersuchten Moleküle (z.B. Proteine oder RNA-Moleküle) erfolgte nicht. Daher wurden Informationen zu den bisher beschriebenen Genen mit ASE bei MS sowohl auf Protein- als auch auf Transkriptebene ermittelt und in der Tabelle zusammengetragen. Um die genauen alternativen Spleißstypen der in den einzelnen Studien untersuchten ASE zu identifizieren, waren verschiedene Datenbanken notwendig. In der UniProt-Datenbank sind Informationen zu humanen Proteinen und deren Isoformen hinterlegt [95]. Die Extraktion der UniProt-Identifikationsnummer und der Anzahl der hinterlegten Proteinisoformen aus der UniProt-Datenbank (UniProt release 2018_03) erfolgte für jedes der beschriebenen Gene und wurde in der Tabelle erfasst. Um Informationen zu den bisher beschriebenen Genen mit ASE bei MS auf Transkriptebene zu sammeln, wurde der Ensembl *Genome Browser* (Ensembl

96) verwendet. In dieser Datenbank sind unter anderem Informationen über die verschiedenen Transkriptisoformen eines jeweiligen Gens und deren Lokalisation im menschlichen Genom hinterlegt [96]. Die den bisher untersuchten Genen entsprechenden Ensembl-Identifikationsnummern und die Anzahl der in der Ensembl-Datenbank hinterlegten Transkripte wurden extrahiert und in der Tabelle dokumentiert.

Im *University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser* sind diverse Informationen zu verschiedenen sequenzierten Referenzgenomen wie etwa das *Human Dec. 2013 (GRCh 38/hg38) Assembly* hinterlegt [97]. Im *UCSC Genome Browser* ist es unter anderem möglich, die genaue Lokalisation von Transkriptisoformen anzeigen zu lassen. Für die in der Literatur untersuchten Proteinisoformen wurden die entsprechenden Aminosäuresequenzen der Isoformen aus der UniProt-Datenbank entnommen und im Referenzgenom des *UCSC Genome Browser*s lokalisiert. Durch einen Vergleich der Aminosäuresequenzen wurden dann Rückschlüsse auf die alternativen Spleißtypen gezogen. In der Literatur bestimmte RNA-Isoformen wurden mit den Sequenzen der bei Ensembl hinterlegten Transkriptisoformen verglichen. Anhand der Ensembl-Identifikationsnummern konnten die RNA-Isoformen dann im humanen Referenzgenom mit Hilfe des *UCSC Genome Browser*s lokalisiert werden. Dadurch konnten Rückschlüsse auf den alternativen Spleißtyp gezogen werden. Das *Amplikon* von in der Literatur beschriebenen Oligonukleotid-Primern zum Nachweis von ASE konnte im humanen Referenzgenom des *UCSC Genome Browser*s anhand der Funktion „*In-silico* PCR“ identifiziert werden. Durch die Lokalisation des *Amplikons* konnte dann auf den alternativen Spleißtyp rückgeschlossen werden. Die jeweiligen alternativen Spleißtypen der untersuchten ASE, beispielsweise *Exon skipping*, wurden anschließend in der Tabelle protokolliert.

3.2. Spleißvarianten-Analyse in Transkriptomdaten

3.2.1. Microarraydatensatz von MS-Patienten der Rostocker Kohorte

Die Identifikation der in der Literatur bereits untersuchten alternativen Spleißereignisse diente als Ausgangspunkt für die Reevaluation und Visualisierung der differentiellen Expression von alternativen Spleißvarianten bei MS-Patienten der Rostocker Kohorte und gesunden Kontrollen auf Transkriptebene. Hierfür wurde ein bereits erhobener Microarraydatensatz der Arbeitsgruppe Neuroimmunologie (Leiter: Prof. Dr. med. Uwe K. Zettl) der Universitätsmedizin Rostock verwendet. Dieser ist in der GEO-Datenbank öffentlich hinterlegt (SuperSeries-Zugangsnummer GSE73174). Der in dieser Arbeit verwendete Datensatz besteht aus 150 *GeneChip Human Transcriptome Arrays* (HTA) 2.0 der Firma Affymetrix. Jedes dieser Microarrays besteht aus etwa sechs Millionen unterschiedlichen Sonden (engl. *probes*). Die Sonden bestehen jeweils aus Oligonukleotidsequenzen mit einer Länge von 25 Basen, die so gewählt sind, dass die entsprechende Basenfolge einmalig im Genom vorliegt [70]. Bei der Bestimmung der Expressionslevel auf Genebene (engl. *gene-level*) werden die Signalintensitäten der 6 Millionen Sonden zusammengefasst, in dem die Signalwerte aller zu einem bestimmten Gen passenden Sonden verrechnet werden (engl. *transcript cluster*). Für die Analyse der Expressionslevel auf Exonebene (engl. *exon-level*) werden pro Gen je 10 Sonden innerhalb eines bestimmten Exonfragments (*probe selection region*, PSR) und je 4 Sonden für die Verbindung zwischen zwei Exons (*junction*, JUC) verwendet (Abb. 8). Alle Sonden, die zu einem Exon (PSR) bzw. zu Exongrenzen (JUC) passen, werden für die Analyse auf Exonebene gebündelt und die Signalwerte verrechnet (Kap. 3.2.3.).

Die Blutproben für den Microarraydatensatz der Arbeitsgruppe Neuroimmunologie stammen von insgesamt 11 RRMS-Patienten mit westeuropäischer Abstammung (Tab. 2). Bei allen Patienten erfolgte die Diagnosestellung anhand der revidierten McDonald-Kriterien von 2010 [102]. Die Rostocker Kohorte von MS-Patienten umfasste 7 weibliche und 4 männliche Patienten. Das Alter der Patienten variierte zwischen 26 und 46 Jahren, mit einem Durchschnittsalter von 37,5 Jahren. Die durchschnittliche

Erkrankungsdauer der Patienten lag bei 7,8 Jahren. Der EDSS-Wert der einzelnen Patienten zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme variierte zwischen 1,5 und 5,5 (Durchschnitt bei 3,4). Vor Beginn der Fingolimod-Therapie erhielten alle Patienten entweder IFN- β -Präparate (n=7) oder Glatirameracetat (n=4). Vier der 11 Patienten erhielten innerhalb von 30 Tagen vor Beginn der ersten Fingolimodgabe eine Behandlung mit Methylprednisolon.

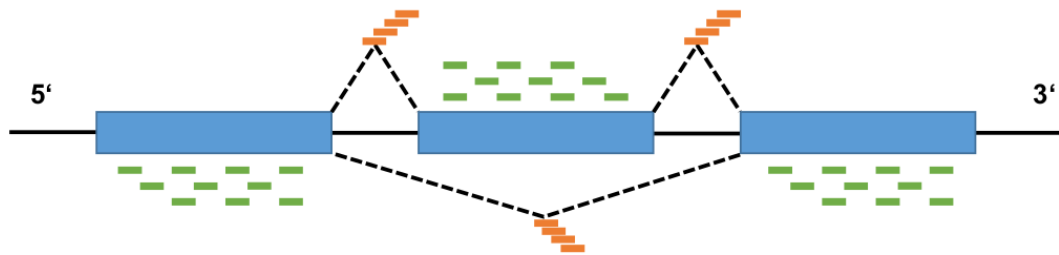


Abb. 8: Sondenposition der HTA 2.0 Microarrays.

Schematische Darstellung eines Genausschnitts mit Exons (blaue Boxen) und Introns (schwarze, durchgezogene Linien). Für die Analyse auf Ebene des Exonlevels liegen die Sonden (grüne und orange Balken) des HTA 2.0 Microarrays innerhalb eines Exons (grüne Balken) oder über Exongrenzen (orange Balken). Die Microarrays sind so designt, dass typischerweise 10 Sonden innerhalb eines Exons (*probe selection regions*, PSR) und 4 Sonden über den Exongrenzen (*junctions*, JUC) liegen.

Das Forschungsvorhaben wurde durch die Ethikkommission der Universität Rostock genehmigt (A 2011 125). Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die Leitlinie der Guten klinischen Praxis und den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki. Von jedem MS-Patienten wurden jeweils 20 ml Blut in Ethylendiamintetraessigsäure-Röhrchen (EDTA-Röhrchen) zu drei verschiedenen Zeitpunkten entnommen: vor Beginn der Fingolimod-Therapie, sowie 24 Stunden und 3 Monate nach Beginn der Therapie. Die Therapie der Patienten erfolgte entsprechend der Zulassungskriterien und den Leitlinien der DGN mit 0,5 mg Fingolimod oral einmal täglich [46]. Es wurden aus jeder Blutprobe fünf unterschiedliche Zellpopulationen mit Hilfe von *magnetic activated cell sorting* (Miltenyi Biotec) isoliert: CD4⁺-Zellen, CD8⁺-Zellen, CD14⁺-Zellen, CD19⁺-Zellen und CD56⁺-Zellen.

Tab. 2: Klinisch-demografische Merkmale der MS-Patienten.

| Patient | Alter | Geschlecht | GKS | Erkrankungsdauer | Typ | EDSS |
|---------------------|------------|-------------|-----------------|------------------|------|------|
| MS_01 | 43 Jahre | weiblich | nicht erhalten | 237 Monate | RRMS | 4,0 |
| MS_02 | 26 Jahre | weiblich | nicht erhalten | 41 Monate | RRMS | 1,5 |
| MS_03 | 29 Jahre | weiblich | nicht erhalten | 55 Monate | RRMS | 2,5 |
| MS_04 | 43 Jahre | weiblich | nicht erhalten | 9 Monate | RRMS | 4,0 |
| MS_05 | 45 Jahre | weiblich | erhalten (1d) | 140 Monate | RRMS | 3,0 |
| MS_06 | 33 Jahre | weiblich | erhalten (9d) | 18 Monate | RRMS | 2,5 |
| MS_07 | 33 Jahre | männlich | nicht erhalten | 45 Monate | RRMS | 3,0 |
| MS_08 | 46 Jahre | männlich | nicht erhalten | 182 Monate | RRMS | 3,5 |
| MS_09 | 37 Jahre | männlich | erhalten (20d) | 106 Monate | RRMS | 5,5 |
| MS_10 | 31 Jahre | männlich | erhalten (2d) | 88 Monate | RRMS | 3,5 |
| MS_11 | 46 Jahre | weiblich | nicht erhalten | 104 Monate | RRMS | 4,0 |
| Durchschnitt | 37,5 Jahre | (♀:♂) = 7:4 | (ja:nein) = 4:7 | 93,2 Monate | | 3,4 |

Die Blutproben von insgesamt 11 RRMS-Patienten westeuropäischer Abstammung wurden für dem HTA 2.0 Microarray Datensatz (GSE73174) verwendet. In der Tabelle sind Informationen zum Alter, Geschlecht, der Erkrankungsdauer in Monaten und dem MS-Verlaufstyp der Patienten hinterlegt. In der Spalte GKS (Glukokortikosteroide) sind Informationen über die Methylprednisoloneinnahme innerhalb von 30 Tagen vor Therapiebeginn mit Fingolimod hinterlegt und in den nachfolgenden Klammern ist die Anzahl der Tage (d) angegeben. Die jeweiligen EDSS-Werte wurden zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestimmt.

EDSS: *Expanded Disability Status Scale*, RRMS: *relapsing-remitting multiple sclerosis*.

Zunächst wurde die Gesamt-RNA der einzelnen Proben mit Hilfe des *mirVana miRNA Isolation Kit* (Thermo Fisher Scientific) isoliert. Für wenige Proben (n=5) war die isolierte RNA von nicht ausreichender Qualität, sodass nicht alle Zellreihen weiter verwendet wurden. Für die Analyse von CD8+-Zellen wurden nicht die Proben von Patient 02 verwendet, für CD4+-, CD14+- und CD19+-Zellen nicht die Proben von Patient 10 und für CD56+-Zellen nicht die Proben von Patient 11. Insgesamt wurden daher für jede Zellpopulation die entsprechenden Probenreihen von 10 der 11 MS-Patienten analysiert (Tab. 3).

Tab. 3: Untersuchte Zellpopulationen bei MS-Patienten.

| Patient | CD4+ | CD8+ | CD14+ | CD19+ | CD56+ |
|---------|------|------|-------|-------|-------|
| MS_01 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| MS_02 | ✓ | x | ✓ | ✓ | ✓ |
| MS_03 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| MS_04 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| MS_05 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| MS_06 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| MS_07 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| MS_08 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| MS_09 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| MS_10 | x | ✓ | x | x | ✓ |
| MS_11 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | x |

Die Tabelle gibt an, welche RNA-Probenreihen für die Analyse mit HTA 2.0 Microarrays aus dem Blut von MS-Patienten verwendet wurden (✓). Nicht verwendete Probenreihen sind mit einem Kreuz (x) versehen. Insgesamt fanden für jede Zellpopulation Probenreihen von 10 der 11 MS-Patienten Eingang in die Transkriptomanalyse.

Bei der reversen Transkription in cDNA wurde nach einem standardisiertem Protokoll vorgegangen [101]. Die resultierende cDNA wurde in cRNA umgeschrieben, die wiederum für eine erneute cDNA-Synthese verwendet wurde. Die so entstandene einzelsträngige *sense strand* cDNA wurde anschließend fragmentiert und mit Biotin markiert. Die Hybridisierung auf Affymetrix HTA 2.0 Microarrays erfolgte für 16 Stunden bei 45 °C. Anschließend wurden die Genchips gewaschen und mit dem speziellen an Streptavidin konjugierten Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin markiert. Die Microarrays wurden dann zur Messung der Fluoreszenzsignale im GeneChip Scanner 3000 7G der Firma Affymetrix gescannt. Mit der Affymetrix *GeneChip Command Console* (AGCC) wurden die Signale der HTA 2.0 Microarrays als Rohdaten in CEL-Dateien prozessiert.

Aufgrund von Voranalysen durch unsere Arbeitsgruppe wurden für die Exonlevelanalyse im Rahmen dieser Doktorarbeit nur die Daten der Microarrays zu den Proben vor Beginn der Fingolimod-Therapie und 24 Stunden nach der ersten Fingolimodgabe verwendet, um den Effekt der Therapie auf die Expressionslevel von Exons auszuschließen. Somit wurden insgesamt 100

Microarrays für die statistische Auswertung von ASE verwendet (5 Zellpopulationen, je 10 Patienten, je 2 Zeitpunkte).

3.2.2. Microarraydatensätze von gesunden Kontrollen

Um die in der Literatur beschriebenen MS assoziierten alternativen Spleißereignisse in einer Fall-Kontroll-Studie zu reevaluieren, wurde die GEO-Datenbank nach HTA 2.0 Microarraydatensätzen durchsucht, die sich als Kontrolle eignen. In der GEO-Datenbank werden Genexpressionsdaten, die von verschiedenen Arbeitsgruppen erhoben wurden, archiviert [103]. Am 9. Juli 2018 lagen in der GEO-Datenbank für HTA 2.0 Microarrays auf Ebene des Genlevels 267 Datensätze (GPL17586) und auf Ebene des Exonlevels 46 Datensätze (GPL17585) vor. Für die Auswahl geeigneter externer Datensätze wurden folgende Kriterien festgelegt:

- humane Zellen
- unstimulierte Zellen
- Blutzellen von gesunden Probanden
- mehr als 10 erwachsene Probanden

Da es keinen Datensatz mit der gleichen Auswahl an Zellpopulationen wie bei der MS-Kohorte gab, war das Kriterium für die Kontrolldatensätze die Verwendung von Blutzellen. Die anhand der Kriterien ausgewählten Datensätze dienten als Kontrollgruppen-Datensätze für die statistische Auswertung der in der Literatur beschriebenen alternativen Spleißvarianten bei MS. Insgesamt entsprachen 5 Datensätze den genannten Kriterien (Tab. 4). Der Datensatz mit der GEO-Seriennummer GSE63379 umfasst isolierte PBMC aus Blutproben von 32 gesunden Probanden. Die Datensätze mit den GEO-Seriennummern GSE111552, GSE111553 und GSE111554 wurden von einer brasilianischen Arbeitsgruppe zusammenfassend mit der Superseriennummer GSE111555 in der GEO-Datenbank hinterlegt. Für den Datensatz GSE111552 wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten Blutproben von 16 gesunden Probanden entnommen und PBMC isoliert. Für die Datensätze GSE111553 und

GSE111554 wurde ebenfalls zu zwei verschiedenen Zeitpunkten Vollblut von 22 (GSE111553) bzw. 20 (GSE111554) gesunden Probanden entnommen und analysiert. Im Folgenden werden die beiden Datensätze GSE111553 und GSE111554 als ein Kontrolldatensatz GSE111553/4 mit insgesamt 84 HTA 2.0 Microarrays zusammengefasst. Für den Datensatz GSE88887 wurde Vollblut von 60 gesunden Kontrollen entnommen. Somit ergaben sich insgesamt 4 Kontrolldatensätze mit einer Summe von 208 HTA 2.0 Microarrays. Die entsprechenden CEL-Dateien wurden heruntergeladen.

Tab. 4: HTA 2.0 Datensätze zu Kontrollgruppen.

| Datensatz | GEO-Seriennummer | Blutprobe | Land | Anzahl gesunder Probanden | Anzahl der Microarrays |
|------------------|-------------------------|------------------|-------------|----------------------------------|-------------------------------|
| 1 | GSE63379 | PBMC | USA | 32 | 32 |
| 2 | GSE111552 | PBMC | Brasilien | 16 | 32 |
| 3a | GSE111553 | Vollblut | Brasilien | 22 | 44 |
| 3b | GSE111554 | Vollblut | Brasilien | 20 | 40 |
| 4 | GSE88887 | Vollblut | USA | 60 | 60 |

Die fünf in der GEO-Datenbank hinterlegten Datensätze entsprachen den Auswahlkriterien und wurden als Kontrollgruppen-Datensätze für die statistische Auswertung verwendet. Für die Datensätze GSE111552, GSE111553 und GSE111554 wurden an zwei verschiedenen Zeitpunkten Blutproben von gesunden Probanden entnommen, sodass insgesamt 32 HTA 2.0 Microarrays zu isolierten PBMC (GSE111552) und 84 HTA 2.0 Microarrays (GSE111553, GSE111554) zu Vollblutproben zur Verfügung standen. Die Datensätze können anhand der GEO-Seriennummer in der GEO-Datenbank eingesehen werden [103].

GEO: *Gene Expression Omnibus*, HTA: *Human Transcriptome Array*,
 PBMC: *peripheral blood mononuclear cell*.

3.2.3. Statistische Evaluation

Für die statistische Auswertung wurden zum einen die Daten der 100 HTA 2.0 Microarrays zur MS-Kohorte verwendet (Kap. 3.2.1.). Zum anderen wurden aus der GEO-Datenbank insgesamt 4 Datensätze zu gesunden Kontrollgruppen mit einer Summe von 208 HTA 2.0 Microarrays für die Analyse hinzugezogen (Kap. 3.2.2., Tab. 4). Die Daten zu jeder der 5 verschiedenen Zellpopulationen (CD4+, CD8+, CD14+, CD19+, CD56+) der MS-Gruppe (je 20 Microarrays), wurden jeweils mit den Transkriptomdaten der 4 Kontrollgruppen verglichen. Insgesamt wurden somit 20 Vergleiche in der Analyse durchgeführt.

Die Rohdaten (308 CEL-Dateien) wurden zunächst unter Verwendung der *Transcriptome Analysis Console* (TAC) 4.0.1 Software prozessiert. Durch den Algorithmus *Signal Space Transformation-Robust Multi-chip Analysis* (SST-RMA) zur Normalisierung der Daten mit der TAC 4.0.1 Software wurden die Daten auf ein vergleichbares Niveau gebracht, sodass experimentelle Schwankungen der Expressionslevel, zum Beispiel durch Pipettierungenauigkeiten im Labor, herausgerechnet wurden [99, 100]. Dabei wurden die Standardeinstellungen der Software verwendet.

Auf Genebene wurden Sondensätze (engl. *probe sets*) für 44.699 proteinkodierende und 22.829 nicht-kodierende Transkripte, also insgesamt 67.528 *probe sets*, ausgewertet. Auf Exonebene wurden 339.146 JUC *probe sets*, 573.909 PSR *probe sets* und 1.530 *probe sets* für interne Kontrollen, also zusammengefasst 914.585 *probe sets*, ausgewertet. Für die Analyse des alternativen Spleißens wurden die PSR/JUC-Daten der MS-Patienten (unterteilt in die 5 Zellpopulationen) mit den 4 Kontrollgruppen verglichen (insgesamt 20 Vergleiche).

Für alle Microarrays wurden mit Hilfe der TAC 4.0.1 Software verschiedene Qualitätskontrollen durchgeführt. Für die sogenannte Hybridisierungskontrolle werden verschiedene spezifische RNA-Sequenzen (engl. *spike-in*) aus dem GeneChip WT PLUS-Reagenzienkit (Affymetrix) verwendet [101]. Diese biotinylierten RNA-Moleküle sind abgeleitet von Genen aus dem Biotin-Stoffwechselweg von *Escherichia coli* Bakterien (BioB, BioC, BioD) und der Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1. Die gemessenen Expressionsignale

sollten für BioB, BioC, BioD und Cre ansteigen, um den unterschiedlichen Konzentrationen der *spike-in* RNA-Moleküle zu entsprechen. Die *Pos vs. Neg AUC Threshold* ist eine weitere Qualitätskontrolle für die Trennschärfe der gemessenen positiven (Exon-) und negativen (Intron-) Kontrollsonden [101]. Durch die Berechnung der *area under the receiver operating characteristic curve* (AU-ROC) der Kontrollsonden eines Arrays wird deren Trennschärfe beschrieben. AU-ROC-Werte von 1 spiegeln eine perfekte Trennung wider. Der Standardschwellenwert der TAC 4.0.1 Software für eine ausreichend gute Trennung der Kontrollsonden liegt bei 0,7.

Für die Analyse von alternativen Spleißvarianten wurden der *Splicing Index* und der EventPointer-Algorithmus verwendet. In der TAC 4.0.1 Software wird eine leicht modifizierte Version des EventPointer-Algorithmus verwendet [104]. Die Signalintensitäten von Exons (PSR) und Exon-Exon-Grenzen (JUC) wurden dabei anhand der Genexpressionslevel vorab normalisiert, sodass generelle Expressionsunterschiede zwischen den untersuchten Zellpopulationen von MS-Patienten (CD4+, CD8+, CD14+, CD19+, CD56+) und Gesunden (PBMC, Vollblut) die Analyse von ASE nicht beeinträchtigen. Anschließend wurde die TAC-Ergebnistabelle in der Softwareumgebung R Version 3.4.1 eingelesen, um die Gene, die, sich durch die systematische Literaturrecherche ergaben (Kap. 3.1.), zu filtern. Ein konkretes ASE wurde als verifiziert angesehen, wenn die entsprechenden PSR/JUC *probe sets* konsistent in allen 4 Vergleichen (je ein MS-Subdatensatz gegen die 4 Kontroll-Datensätze) einen EventPointer p-Wert $< 0,0001$ aufwiesen.

3.2.4. Visualisierung alternativer Spleißereignisse

Für ausgewählte Gene mit MS-assoziierten ASE wurde eine kombinierte Darstellung von Informationen aus dem *UCSC Genome Browser* und der TAC 4.0.1 Software erstellt. Zur Visualisierung spezifischer Gene wurde in der TAC Software der Vergleich von CD4+-Zellen von MS-Patienten und Vollblut von gesunden Kontrollen (GSE111553/4) verwendet. Exemplarisch wurden die Gene IL7R und NFAT5 zur visuellen Darstellung ausgewählt. Für die Visualisierung von Exonexpressionsleveln bietet die TAC Software verschiedene Darstellungsmöglichkeiten. Es wurde die Darstellungsform *Structure View*, bei der alle Exons (PSR), Introns und Exon-Exon-Grenzen (JUC) gleich groß dargestellt werden, gewählt.

Die Spanne für den *Splicing Index* wurde für die visuell dargestellten Gene begrenzt. Im *Structure View* der TAC Software werden die *Splicing Index*-Werte für alle PSR und JUC der ausgewählten Gene durch farbige Boxen visuell dargestellt. Für die farbliche Darstellung des *Splicing Index* wurde grün für erhöhte Level bei MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen und rot für reduzierte Level festgelegt. Die Darstellung wurde als PNG-Datei abgespeichert.

Zur Extraktion der entsprechenden Ensembl-Informationen wurden die in der TAC Software angegebenen genomischen Positionen der ausgewählten Gene im *UCSC Genome Browser* im *Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly* eingegeben. Die als PDF abgespeicherte Grafik wurde mithilfe der Bildbearbeitungssoftware GIMP (Version 2.10.6) als PNG-Datei exportiert. Mithilfe von Microsoft PowerPoint 2013 wurden die PNG-Dateien mit den Ensembl-Informationen und der Darstellung der *Splicing Index*-Werte zusammengeführt und abschließend bearbeitet.

4. Ergebnisse

4.1. Aktueller Stand der Literatur zum alternativen Spleißen bei MS

Die Literaturrecherche zum Thema alternative Spleißvarianten bei MS mit den Suchbegriffen „*splicing*“ und „*multiple sclerosis*“ in der elektronischen Datenbank PubMed ergab insgesamt 120 Artikel. Bei der Durchsicht der Referenzlisten dieser 120 Artikel wurden 40 weitere Artikel in die systematische Übersichtsarbeit mit aufgenommen, sodass insgesamt 160 Artikel gesichtet wurden (Suppl. 3). Die 160 Artikel wurden orientierend an den PRISMA-Kriterien und anhand eigener Kriterien beurteilt (Abb. 9). Bei der Sichtung wurden 3 Artikel ausgeschlossen, da deren Volltexte nicht in Englisch zur Verfügung standen. Lediglich das *Abstract* dieser 3 Arbeiten war in Englisch verfügbar. Bei ungefähr 10% der restlichen 157 Artikel Artikel waren die Volltexte nicht über den Universitätszugang frei verfügbar, sodass die Autoren per E-Mail kontaktiert werden mussten. Es konnten letztlich alle Artikel als PDF gespeichert werden. Die 157 Artikel wurden anhand der selbst festgelegten Kriterien einzeln ausgewertet (Kap. 3.1.2.). Das erste Kriterium war, dass es sich bei den Artikeln um Originalarbeiten handeln musste. Insgesamt waren 32 der 157 Artikel keine Originalarbeiten, sondern beispielsweise *Reviews*. Für die 125 Originalarbeiten wurde überprüft, ob mindestens zwei verschiedene humane protein-kodierende Isoformen untersucht wurden. Von den 125 Artikeln erfüllten 47 Artikel dieses Kriterium nicht und sie wurden somit ausgeschlossen. Für die verbliebenen 78 Artikel wurde anschließend überprüft, ob Probenmaterialien von MS-Patienten untersucht wurden. Bei 42 der 78 Studien wurde kein Probenmaterial von MS-Patienten untersucht, sodass diese Artikel ausgeschlossen wurden. Insgesamt wurden somit 121 Artikel in dem Arbeitsschritt Eignung ausgeschlossen. Folglich wurden 36 Artikel in die qualitative Darstellung eingeschlossen [105-140]. Die ersten Artikel wurden im Jahr 2000 veröffentlicht [139, 140]. Die Dynamik des Themas wird verdeutlicht durch die zunehmende Anzahl der Publikationen: Während bis 2009 insgesamt 13 Artikel publiziert wurden, waren es von 2010 bis 2019 fast doppelt so viele (n=23).

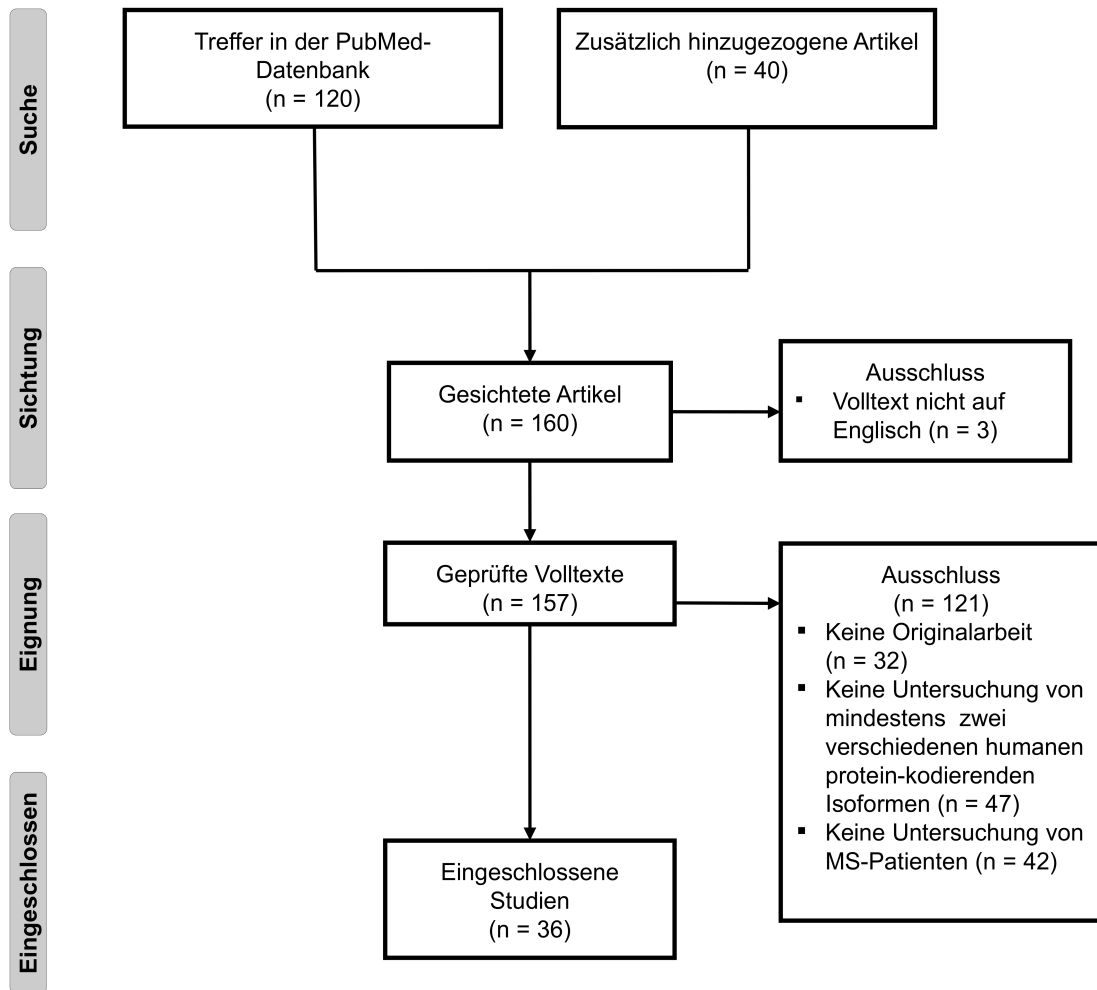


Abb. 9: Schematische Darstellung der Literaturrecherche.

Das Flussdiagramm zur Literaturrecherche wurde gemäß der PRISMA-Vorgabe erstellt [92]. Die Treffer in der PubMed-Datenbank wurden durch die Suchbegriffe „*splicing*“ und „*multiple sclerosis*“ identifiziert. Die grauen Boxen am linken Rand zeigen die 4 verschiedenen Schritte „Suche“, „Sichtung“, „Eignung“ und „Eingeschlossen“ der Literatursuche für diese systematische Übersichtsarbeit. Die weißen durch Pfeile verbundenen Boxen in der Mitte geben die Anzahl der Artikel wieder, die in den einzelnen Schritten begutachtet wurden. Die weißen Boxen auf der rechten Seite stellen die ausgeschlossenen Artikel dar. In den Boxen sind die Begründungen für den Ausschluss der Artikel aufgelistet. Von den insgesamt 160 gesichteten Artikeln wurden nach Abschluss der Literatursuche 36 Studien in die qualitative Betrachtung mit einbezogen [105-140].

Um einen Überblick über bisher bekannte oder untersuchte alternative Spleißereignisse bei MS zu erhalten, wurden verschiedene Informationen, wie das jeweilige Studiendesign, das verwendete Probenmaterial und die verwendeten Messmethoden, aus den 36 Studien extrahiert und in einer Tabelle zusammengefasst (Tab. 3). In nahezu allen (n=34) der insgesamt 36 Studien wurden 1-3 verschiedene Gene auf ASE analysiert. Dagegen detektierten Tian *et al.* insgesamt 92 Gene mit veränderten Exonleveln in einem Microarraydatensatz von MS-Patienten und Kontrollen [123]. Das NFAT5-Gen war das einzige der 92 von Tian *et al.* identifizierten Gene, welches auch in einer weiteren der 28 Studien auf alternative Spleißvarianten untersucht wurde [116]. In der neuesten Studie von Cardamone *et al.* wurden ebenfalls mehrere Gene detektiert [105]: In einer RNA-Sequenzierungsanalyse identifizierten sie 957 alternativ gespleißte Gene mit insgesamt 1.114 ASE.

In den eingeschlossenen Studien wurden die ASE im Hinblick auf die Pathogenese der MS oder als Biomarker für die Diagnosestellung bzw. das Ansprechen von Therapien bei MS analysiert. Der Vergleich von MS-Patienten mit Kontrollen war insgesamt das am häufigsten verwendete Studiendesign (n=31 von 36). Die veränderten Expressionslevel spezifischer Spleißisoformen wurden dementsprechend in Studien mit diesem Studiendesign als potentielle krankheitsspezifische Biomarker diskutiert. Die Größe der MS-Kohorte in den einzelnen Fall-Kontrollstudien variierte von 5 bis zu über 1000 MS-Patienten [132, 120]. In mehreren Studien (n=20) wurden ASE in Abhängigkeit von bestimmten Genotypen identifiziert. Es wurde untersucht, ob bestimmte Allele mit veränderten Expressionsleveln von mRNA- bzw. Proteinisoformen korrelieren. In allen Studien mit dem Studiendesign Behandelt-Unbehandelt (n=7) wurde der Effekt der IFN- β -Therapie auf das Expressionslevel von Genisoformen in Blutzellen analysiert. In 2 dieser Studien wurden für Analysen zusätzlich Blutproben von MS-Patienten verwendet, die mit immunmodulierenden Medikamenten behandelt wurden [121, 130]. Die Arbeitsgruppen Gilli *et al.* und López-Gómez *et al.* analysierten den Langzeiteffekt der IFN- β -Therapie in Blutzellen von MS-Patienten, in dem die Expressionslevel von ausgewählten mRNA-Isoformen vor Beginn und 2 Jahre nach Beginn der Therapie verglichen wurden [128, 112]. Die Arbeitsgruppen von insgesamt 3 Studien verglichen die Expression verschiedener Spleißisoformen

bei MS-Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen [129, 140, 136]. McKay *et al.* bestimmte das Verhältnis von der löslichen zur Gesamtlängenvariante des IL7R mRNA-Transkripts in Blutzellen von Patienten mit PPMS und RRMS [129]. In zwei Studien der Arbeitsgruppe Sharief *et al.* wurden die Proteinlevel der kurzen und langen CFLAR-Variante in Blutzellen von Patienten mit RRMS und SPMS untersucht [140, 136]. Dabei wurde eine signifikant höhere Expression der kurzen Isoform des CFLAR-Gens in B-Zellen aus dem Blut von RRMS-Patienten gemessen als bei Patienten mit SPMS oder Kontrollen mit nicht-entzündlichen Erkrankungen [136]. In einer weiteren Studie dieser Arbeitsgruppe wurde die Expression der verschiedenen CFLAR-Isoformen zwischen klinisch-aktiven und klinisch-stabilen RRMS-Patienten verglichen [138]. In mehreren Studien (n=10) wurden mRNA- bzw. Proteinisoformen in spezifischen Zelltypen (z.B. B-Zellen, Monozyten, T-Zellen) oder Geweben (z.B. Hirngewebe) verglichen. In insgesamt 16 Studien wurde die Expression bestimmter Isoformen in spezifischen Immunzellen (z.B. B-Zellen, T-Zellen, Monozyten) bestimmt. Die einzige Studie, die am ehesten einen prognostischen ASE-basierten Biomarker aufzeigte, ist die von der Arbeitsgruppe Gilli *et al.* [128]: In dieser konnte beobachtet werden, dass MS-Patienten mit einer niedrigen Expression der langen transmembranären IFNAR2-Isoform (IFNAR2c) ein signifikant höheres Risiko haben, NAb unter IFN- β -Therapie zu entwickeln.

Zur Bestimmung von ASE wurden in 75% (n=27) der insgesamt 36 Studien PCR-basierte Verfahren zur Analyse von Spleißisoformen verwendet. Cardamone *et al.* verwendeten zusätzlich eine RNA-Sequenzierungsmethode mit Hilfe der Illumina NextSeq 500 Plattform, um ASE zu identifizieren, die von MALAT1 moduliert werden [105]. MALAT1 ist eine nicht-kodierende RNA, welche durch Interaktion mit Spleißfaktoren das alternative pre-mRNA Spleißen reguliert und im Vergleich zu Kontrollen bei MS-Patienten höher exprimiert ist [141]. Tian *et al.* war die einzige Arbeitsgruppe, die Affymetrix GeneChip® Exon 1.0 ST Arrays verwendete, um signifikante Unterschiede im alternativen Spleißmuster zwischen MS-Patienten ohne immunmodulierende Therapie und gesunden Kontrollen zu untersuchen [123]. Insgesamt detektierten sie in einer Fall-Kontrollstudie von 20 RRMS-Patienten und 20 gesunden Kontrollen 92 Gene mit einer signifikant differentiellen Expression von Transkriptisoformen.

Von den 957 Genen, die durch Cardamone *et al.* identifiziert wurden, und den 92 durch Tian *et al.* analysierten Genen, wurden nur die Gene DDX39B, IFNAR2 und NFAT5 in mindestens einer anderen der eingeschlossenen Studien detektiert. Insgesamt wurden in 5 Studien Transkriptomdaten erhoben. Um den Einfluss regulatorischer Elemente auf das alternative Spleißen zu untersuchen, wurden in 6 Studien *splicing reporter* Minigenassays verwendet.

Blutzellen von MS-Patienten wurden in 32 Studien untersucht und waren damit das am häufigsten verwendete Probenmaterial. In 75% dieser Studien (n=24) wurden in den Blutzellen mRNA-Isoformen zum Beispiel mittels PCR oder Microarrays untersucht. In 19 dieser 32 Studien wurden die Expressionslevel von Proteinisoformen zum Beispiel mittels ELISA, Durchflusszytometrie oder Immunblot-Verfahren bestimmt. Vor dem Hintergrund, dass MS eine chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS ist, wurden insgesamt 5 Studien identifiziert, in denen post-mortem Hirngewebe oder Liquorzellen von MS-Patienten für die Analysen verwendet wurden. Die Arbeitsgruppe Boyle *et al.* untersuchte beispielsweise die subzelluläre Lokalisation von Proteinisoformen des MOG-Gens mittels konfokaler Mikroskopie und PCR-basierter Analyse [131]. Die Expressionslevel der RNA-Transkriptvarianten wurden in post-mortem Hirngewebe und Geweben weiterer Organe verglichen. Alle untersuchten Transkriptisoformen des MOG-Gens konnten dabei in Hirngewebe von MS-Patienten detektiert werden [131]. Die 15 der insgesamt 36 Studien, in denen ASE in Zelllinien untersucht wurden, verwendeten humane Zelllinien wie HeLa, Jurkat oder HEK293 für die Analysen.

Tab. 5: Studien zur Expression alternativer Spleißvarianten bei MS.

| Autor, Jahr [Referenz] | Gene | Studiendesign | Probenmaterial | Methoden | Therapie | Zelltypspezifisch | Minigene |
|--|--|--|-----------------------------------|--|-------------|-------------------|----------|
| Cardamone <i>et al.</i> , 2019 [105] | EMC4 IFNAR2 IL7R SP140 957 genes | Fall-Kontroll (*) Genotyp (*) | Blutzellen Zelllinien | PCR RNA-Sequenzierung | - | x | ✓ |
| Sambucci <i>et al.</i> , 2018 [106] | FOXP3 | Fall-Kontroll (*) Zellen und Gewebe (*) | Blutzellen | Durchflusszytometrie Immunblot PCR | n.a. | ✓ | x |
| Sestito <i>et al.</i> , 2018 [107] | TGM2 | Fall-Kontroll (*) | Blutzellen | PCR | - | x | x |
| Smets <i>et al.</i> , 2018 [108] | CD40 CD86 | Zellen und Gewebe (*) Genotyp (*) | Blutzellen Serum | Durchflusszytometrie ELISA PCR | - | ✓ | x |
| Cardamone <i>et al.</i> , 2017 [109] | GSDMB | Fall-Kontroll (*) Genotyp (*) | Blutzellen Zelllinien | PCR | - | x | x |
| Galarza-Muñoz <i>et al.</i> , 2017 [110] | DDX39B IL7R | Genotyp (*) | Blutzellen Zelllinien | ELISA PCR | n.a. | ✓ | ✓ |
| De Rossi <i>et al.</i> , 2016 [111] | BIN1 | Zellen und Gewebe (*) | Hirngewebe Zelllinien | Immunfärbung Immunfluoreszenz Immunblot PCR | n.a. | x | x |
| López-Gómez <i>et al.</i> , 2016 [112] | TNFRSF10B TNFRSF10D TNFSF10 | Fall-Kontroll (*) Zellen und Gewebe (*) Krankheitsaktivität (*) Behandelt-Unbehandelt (*) | Blutzellen Zelllinien | PCR | IFN-β | ✓ | x |
| De Rosa <i>et al.</i> , 2015 [113] | FOXP3 | Fall-Kontroll (*) | Blutzellen | Immunblot PCR | - | ✓ | x |
| Field <i>et al.</i> , 2015 [114] | CD40 | Fall-Kontroll (*) Zellen und Gewebe (*) Genotyp (*) | Blutzellen | Durchflusszytometrie PCR RNA-Sequenzierung | - | ✓ | x |
| Matesanz <i>et al.</i> , 2015 [115] | SP140 | Fall-Kontroll (-) Genotyp (*) | Blutzellen Zelllinien | Immunblot PCR RNA-Sequenzierung | n.a. | x | ✓ |
| Paraboschi <i>et al.</i> , 2015 [116] | NFAT5 | Fall-Kontroll (*) Genotyp (*) | Blutzellen | PCR | - | x | x |
| Spurlock <i>et al.</i> , 2015 [117] | CSF1R MBP NFATC1 | Fall-Kontroll (*) | Blutzellen Zelllinien | PCR RNA-Sequenzierung | GA | x | x |
| Carbone <i>et al.</i> , 2014 [118] | FOXP3 | Fall-Kontroll (*) | Blutzellen | Immunblot | - | ✓ | x |
| Paraboschi <i>et al.</i> , 2014 [119] | PRKCA | Fall-Kontroll (*) Zellen und Gewebe (*) Genotyp (*) | Blutzellen Zelllinien | Immunfluoreszenz Immunblot PCR | - | ✓ | ✓ |
| McKay <i>et al.</i> , 2013 [120] | IL7R | Fall-Kontroll (-) Zellen und Gewebe (-) Genotyp (*) Behandelt-Unbehandelt (-) | Blutzellen | PCR | IFN-β | ✓ | x |
| Ottoboni <i>et al.</i> , 2013 [121] | TNFRSF1A | Fall-Kontroll (-) Genotyp (*) Behandelt-Unbehandelt (*) | Blutzellen Zelllinien Serum | Durchflusszytometrie ELISA PCR | IFN-β GA | ✓ | x |
| Gregory <i>et al.</i> , 2012 [122] | TNFRSF1A | Fall-Kontroll (-) Zellen und Gewebe (*) Genotyp (*) | Blutzellen Zelllinien Serum | ELISA Immunfluoreszenz PCR | n.a. | ✓ | ✓ |
| Tian <i>et al.</i> , 2011 [123] | 92 genes | Fall-Kontroll (*) | Blutzellen | Microarray | - | x | x |

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite. Legende siehe Seite 51.

| | | | | | | | |
|-------------------------------------|-------------|---|---|---|----------------|---|---|
| Hoe <i>et al.</i> , 2010 [124] | IL7R | Fall-Kontroll (-) Genotyp (*) | Blutzellen Serum | Durchflusszytometrie ELISA PCR | n.a. | ✓ | x |
| Jensen <i>et al.</i> , 2010 [125] | MOG | Genotyp (*) | Hirngewebe | PCR | n.a. | x | x |
| Rane <i>et al.</i> , 2010 [126] | IL7 IL7R | Fall-Kontroll(*) Genotyp (*) | Blutzellen | PCR | n.a. | x | x |
| Uzawa <i>et al.</i> , 2010 [127] | PTPRC | Fall-Kontroll (*) | Blutzellen | Durchflusszytometrie | IFN-β | x | x |
| Gilli <i>et al.</i> , 2008 [128] | IFNAR2 | Fall-Kontroll (*) Behandelt-Unbehandelt (*) | Blutzellen | PCR | IFN-β | x | x |
| McKay <i>et al.</i> , 2008 [129] | IL7R | Fall-Kontroll (*) Genotyp (*) MS Verlaufsformen (*) | Blutzellen | Durchflusszytometrie Single Base Extension | - | ✓ | x |
| Palacios <i>et al.</i> , 2008 [130] | CTLA4 | Fall-Kontroll (-) Genotyp (*) Behandelt-Unbehandelt (*) | Blutzellen Serum | ELISA PCR | IFN-β IMSUP | x | x |
| Boyle <i>et al.</i> , 2007 [131] | MOG | Fall-Kontroll (-) Zellen und Gewebe (*) | Hirngewebe Andere Gewebe Zelllinien | Immunfluoreszenz Immunblot PCR | n.a. | x | x |
| Gregory <i>et al.</i> , 2007 [132] | IL7R | Genotyp (*) | Blutzellen Zelllinien | PCR | n.a. | x | ✓ |
| Astier <i>et al.</i> , 2006 [133] | CD46 | Fall-Kontroll (*) Behandelt-Unbehandelt (-) | Blutzellen | PCR | IFN-β | ✓ | x |
| Booth <i>et al.</i> , 2005 [134] | IL7R | Fall-Kontroll (-) Genotyp (-) | Blutzellen | Single Base Extension | IFN-β | x | x |
| Jacobsen <i>et al.</i> , 2002 [135] | PTPRC | Fall-Kontroll (-) Genotyp (*) | Blutzellen Zelllinien | Durchflusszytometrie | n.a. | x | x |
| Seidi <i>et al.</i> , 2002 [136] | CFLAR | Fall-Kontroll (*) MS-Verlaufsformen (*) Behandelt-Unbehandelt (-) | Blutzellen | Immunblot | IFN-β | ✓ | x |
| Johnston <i>et al.</i> , 2001 [137] | ADORA1 | Fall-Kontroll (*) | Hirngewebe Zelllinien | PCR | n.a. | x | x |
| Semra <i>et al.</i> , 2001 [138] | CFLAR | Fall-Kontroll (*) Krankheitsaktivität (*) | Blutzellen | Immunblot | - | ✓ | x |
| Jacobsen <i>et al.</i> , 2000 [139] | PTPRC | Fall-Kontroll (*) Genotyp (*) | Blutzellen Zelllinien | Durchflusszytometrie PCR | n.a. | x | x |
| Sharief <i>et al.</i> , 2000 [140] | CFLAR | Fall-Kontroll (*) Zellen und Gewebe (*) MS-Verlaufsformen (-) | Blutzellen Liquorzellen | Immunblot | - | x | x |

Legende siehe nächste Seite.

Die 36 anhand der systematischen Literaturrecherche identifizierten Studien und deren Merkmale sind in dieser Tabelle aufgelistet. Die Artikel sind in der Tabelle absteigend nach dem Datum der Veröffentlichung sortiert. Die HGNC-Gensymbole, für jedes der in den Studien untersuchten Gene, wurden aus der *GeneCards*-Datenbank entnommen (Suppl. 2) [93]. Für den Artikel von Tian *et al.* und die neueste Studie von Cardamone *et al.* wurde die Anzahl der untersuchten Gene in der Tabelle hinterlegt [123, 105]. Die verschiedenen Gruppenvergleiche sind in der Spalte Studiendesign angegeben. Signifikante Unterschiede in den Gruppenvergleichen sind durch einen Stern (*) und nicht signifikante Unterschiede sind durch einen Strich (-) gekennzeichnet. Die in den einzelnen Studien verabreichten Therapien wurden ebenfalls angegeben. Teilweise war in den Studien nicht angegeben (n.a.), ob die untersuchten Patienten mit immunmodulierenden Medikamenten therapiert wurden oder nicht (-). Die Verwendung eines *splicing reporter* Minigens und die Untersuchung spezifischer Zelltypen ist jeweils mit einem Haken (✓) oder, bei Nichtzutreffen, mit einem Kreuz (x) markiert. Das IL7R-Gen ist das am häufigsten untersuchte Gen in den 36 ausgewählten Studien. Die am häufigsten verwendete Methode zur Detektion von alternativen Spleißvarianten ist PCR (n=27).

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*, GA: Glatirameracetat, HGNC: HUGO *Gene Nomenclature Committee*, IFN-β: Interferon-β, IMSUP: Immunsuppressiva, PCR: Polymerase-Kettenreaktion-Assays (*polymerase chain reaction*).

4.2. Differentiell alternativ gespleißte Gentranskripte bei Patienten mit MS

4.2.1. Bisher untersuchte alternative Spleißereignisse bei Patienten mit MS

In den 36 eingeschlossenen Artikeln wurden ASE in insgesamt 27 verschiedenen humanen protein-kodierenden Genen untersucht. Informationen zu den 27 untersuchten Genen sowie die untersuchten Typen von ASE (z.B. Exon *skipping*) wurden aus den Artikeln extrahiert und tabellarisch zusammengefasst (Tab. 6). Insgesamt wurden 9 dieser 27 Gene von mehreren Arbeitsgruppen untersucht und 18 Gene von nur jeweils einer Arbeitsgruppe.

Die meisten der in den Studien untersuchten Gene gehören zu den Zytokinrezeptoren, wie IL7R (Interleukin 7 Rezeptor), TNFRSF1A (Rezeptor für Tumornekrosefaktor 1A), CSF1R (koloniestimulierender Faktor-1-Rezeptor) und

IFNAR2 (Interferonrezeptor alpha/beta 2). Zwei Arbeitsgruppen untersuchten mit MS assoziierte Spleißisoformen im TNFRSF1A-Genlocus und deren funktionelle Auswirkungen [121, 122]. Das mit MS assoziierte Risikoallel G des SNP rs1800693 erhöht das Exon 6 *skipping*. Die Transkriptvariante mit fehlendem Exon 6 führt zu einem Verlust der transmembranären und zytoplasmatischen Domäne und somit zu einer vermehrten Expression einer löslichen Form des Rezeptors [121]. CSF1R ist ein Rezeptor, der durch die Bindung von Zytokin CSF1 einen Signalweg zur Differenzierung von Monozyten und Makrophagen reguliert. Spurlock *et al.* zeigten niedrigere Transkriptlevel für CSF1R Exon 1-11 in Blutzellen von MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen [117].

Eine andere Gruppe von Genen, die untersucht wurde, waren humane proteinkodierende Gene, die die Gentranskription beeinflussen, beispielsweise SP140, NFAT5 und FOXP3. In regulatorischen T-Zellen von MS-Patienten fanden Matarese *et al.* niedrigere Expressionslevel der 44- und 47-kDa FOXP3-Isoformen verglichen mit regulatorischen T-Zellen von gesunden Kontrollen [118, 113]. Diese beiden Isoformen resultieren durch ein alternatives Spleißen des Exons 3 (*skipping* oder Inklusion). Zusätzlich konnten sie eine Verbindung zwischen der Glykolyse und dem alternativen Spleißen von FOXP3 pre-mRNA durch das Enzym alpha-Enolase herstellen [113]. NFAT5 moduliert die Genexpression in Immunzellen bei osmotischem Stress und induziert die Entwicklung von spezifischen T-Helferzellen (Th17) [142]. Paraboschi *et al.* untersuchten das alternative Spleißmuster des NFAT5-Gens und konnten für eine Isoform mit einem *skipping* des Exons 2 signifikant höhere Expressionslevel bei MS-Patienten, verglichen mit Kontrollen, feststellen [116]. Die Arbeitsgruppe zeigte für das Spleißen des Exons 2 signifikante Unterschiede für verschiedene Genotypen des im intronischen Spleißenhancer (ISE) gelegenen SNP rs12599391. Der SP140 Genlocus wurde in GWAS assoziiert mit der Suszeptibilität von MS [23]. Matesanz *et al.* zeigten, dass das T-Allel des SNP rs28445040 das Exon 7 *skipping* im SP140 Transkript begünstigt [115].

Das am häufigsten untersuchte Gen in den 36 Artikeln im Bezug auf das alternative Spleißen bei MS ist das IL7R-Gen (IL7R-Gen). IL7R ist unter

anderem an der Ausreifung von T-Zellen beteiligt und kann als membrangebundener oder löslicher Rezeptor vorliegen [143]. Das Transkript für die transmembranäre Domäne liegt im Exon 6, wodurch ein Fehlen des Exons 6 zu einer löslichen Form des Rezeptors führt [126]. Der SNP rs6897932 im IL7R-Gen ist mit dem alternativen Spleißen des Exons 6 assoziiert [124]. Die Untersuchungen von Gregory *et al.* in vier unabhängigen Verwandtschaftsorientierten- und Fall-Kontrollstudien konnten das C-Allel des SNP rs6897932 im Exon 6 als signifikanten Risikofaktor für die Erkrankung an MS assoziieren [132]. Der kausale Nachweis, dass dieser SNP das Spleißen von Exon 6 beeinflusst, erfolgte durch Klonierung verschiedener Allel-Varianten (C- und T-Allel) des SNP rs6897932 in *splicing reporter* Minigene. Die Arbeitsgruppe Gregory *et al.* konnte ein zweifach häufigeres Exon 6 *skipping* für das MS-assoziierte C-Allel im Vergleich zum T-Allel nachweisen [132]. In einer weiteren Studie untersuchte die gleiche Arbeitsgruppe den Einfluss von cis-regulatorischen Elementen und trans-*acting* Faktoren auf das alternative Spleißen von IL7R in *splicing reporter* Minigenen [110]. In diesem Experiment führte eine Unterdrückung der Helikase DDX39B zu einem signifikant häufigeren Exon 6 *skipping* und folglich zu einer erhöhten Sekretion der löslichen IL7R-Proteinisoform. Die Arbeitsgruppe von Hoe *et al.* untersuchte als einzige der 36 Studien die IL7R-Spleißvarianten auf Proteinebene in Serumproben von MS-Patienten und Kontrollen [124]. Sie detektierten ein signifikant niedrigeres Level des löslichen Rezeptors für Träger des T-Allels des SNP rs6897932 mittels ELISA. Allerdings konnten sie keinen signifikanten Unterschied in der Expression zwischen MS-Patienten und gesunden Kontrollen feststellen.

MOG wird als Autoantigen bei MS diskutiert [31] und ASE dieses Gens wurden in 2 der insgesamt 36 eingeschlossenen Studien untersucht [131, 125]. Jensen *et al.* untersuchte in Hirngewebe das relative Expressionslevel von verschiedenen Transkriptisoformen des MOG-Gens für unterschiedliche Haplotypgruppen [125]. Dabei wurde ein signifikanter Expressionsunterschied für Transkriptisoformen, die durch verschiedene Spleißakzeptorstellen im Exon 10 resultieren, gezeigt. Im Gegensatz zu der genotypabhängigen Expression von alternativen Spleißvarianten, untersuchten Boyle *et al.* die Isoformen des MOG-Gens im Bezug auf deren zelluläre Lokalisation und intrazellulären

Transport [131]. Es wurden 6 verschiedene Isoformen des MOG-Gens in humanem post-mortem Hirngewebe detektiert und mit Hilfe eines eukaryotischen Expressionsvektors untersucht. Drei dieser 6 Isoformen waren charakterisiert durch ein Exon 8 *skipping* und wurden vorwiegend intrazellulär exprimiert. Hingegen wurden die beiden Gesamtlängenisoformenten vermehrt membranär exprimiert. Eine weitere Isoform mit der Expression eines alternativen letzten Exons (16.3 kDa, NM_206814) war mit einer fehlenden transmembranären Domäne assoziiert und wurde vermehrt sezerniert [131]. Alle 6 Isoformen konnten in der weißen Substanz der post-mortem Hirngewebe von Patienten mit MS detektiert werden, allerdings wurden keine signifikanten Unterschiede in der Expression im Vergleich zu den gesunden Kontrollen festgestellt.

Bei dem zytotoxischen T-Lymphozyten-assoziierten Protein 4 (CTLA4), welches an der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird und eine überschießende Immunreaktion durch Hemmung der T-Zellproliferation verhindert, führt alternatives Spleißen unter anderem zu einer löslichen und einer membrangebundenen Form des Proteins [130]. Jedoch konnten in der Genexpressionsanalyse von Palacios *et al.* mittels Echtzeit-PCR im Blut von 51 MS-Patienten und 52 gesunden Kontrollen keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der Expressionslevel der beiden mRNA-Isoformen festgestellt werden.

Tab. 6: Gene für die alternative Spleißvarianten bei MS untersucht wurden.

| Gensymbol | UniProt ID | Anzahl der UniProt Protein-isoformen | Ensembl ID | Anzahl der Ensembl Transkripte | ASE | Referenzen |
|-----------|------------|--------------------------------------|-----------------|--------------------------------|---|---|
| ADORA1 | P30542 | 2 | ENSG00000163485 | 9 | alternatives erstes Exon | Johnston <i>et al.</i> , 2001 [137] |
| BIN1 | O00499 | 11 | ENSG00000136717 | 14 | Exon 7 skipping Exon 11 skipping Exon 13-17 skipping | De Rossi <i>et al.</i> , 2016 [111] |
| CD40 | P25942 | 2 | ENSG00000101017 | 7 | Exon 5 skipping Exon 6 skipping Exon 5-6 skipping | Field <i>et al.</i> , 2015 [114]; Smets <i>et al.</i> , 2018 [108] |
| CD46 | P15529 | 16 | ENSG00000117335 | 19 | Exon 13 skipping | Astier <i>et al.</i> , 2006 [133] |
| CD86 | P42081 | 6 | ENSG00000114013 | 9 | alternatives erstes Exon Exon 6 skipping | Smets <i>et al.</i> , 2018 [108] |
| CFLAR | O15519 | 15 | ENSG00000003402 | 25 | alternatives letztes Exon | Sharief, 2000 [140]; Semra <i>et al.</i> , 2001 [138]; Seidi <i>et al.</i> , 2002 [136] |
| CSF1R | P07333 | 2 | ENSG00000182578 | 9 | alternatives erstes Exon | Spurlock <i>et al.</i> , 2015 [117] |
| CTLA4 | P16410 | 5 | ENSG00000163599 | 7 | Exon 3 skipping | Palacios <i>et al.</i> , 2008 [130] |
| DDX39B | Q13838 | 2 | ENSG00000198563 | 21 | Exon 2 Spleißakzeptorvariante | Galarza-Muñoz <i>et al.</i> , 2017 [110] |
| EMC4 | Q5J8M3 | 3 | ENSG00000128463 | 13 | Exon 4 skipping | Cardamone <i>et al.</i> , 2019 [105] |
| FOXP3 | Q9BZS1 | 4 | ENSG00000049768 | 6 | Exon 3 skipping | Carbone <i>et al.</i> , 2014 [118]; De Rosa <i>et al.</i> , 2015 [113]; Sambucci <i>et al.</i> , 2018 [106] |
| GSDMB | Q8TAX9 | 6 | ENSG00000073605 | 15 | Exon 6 skipping Exon 6 Spleißakzeptorvariante Exon 5-8 skipping | Cardamone <i>et al.</i> , 2017 [109] |
| IFNAR2 | P48551 | 3 | ENSG00000159110 | 10 | Exon 8 skipping Exon 9 Spleißakzeptorvariante | Gilli <i>et al.</i> , 2008 [128]; Cardamone <i>et al.</i> , 2019 [105] |
| IL7 | P13232 | 3 | ENSG00000104432 | 11 | Exon 4 skipping Exon 3-4 skipping Exon 3-5 skipping Exon 4-5 skipping | Rane <i>et al.</i> , 2010 [126] |
| IL7R | P16871 | 4 | ENSG00000168685 | 10 | Exon 6 skipping Exon 5-6 skipping | Booth <i>et al.</i> , 2005 [134]; Gregory <i>et al.</i> , 2007 [132]; McKay <i>et al.</i> , 2008 [129]; Hoe <i>et al.</i> , 2010 [124]; Rane <i>et al.</i> , 2010 [126]; McKay <i>et al.</i> , 2013 [120]; Galarza-Muñoz <i>et al.</i> , 2017 [110]; Cardamone <i>et al.</i> , 2019 [105] |
| MBP | P02686 | 6 | ENSG00000197971 | 48 | alternatives erstes Exon | Spurlock <i>et al.</i> , 2015 [117] |
| MOG | Q16653 | 13 | ENSG00000204655 | 19 | alternatives letztes Exon Exon 7 skipping Exon 8 skipping Exon 10 Spleißakzeptorvariante | Boyle <i>et al.</i> , 2007 [131]; Jensen <i>et al.</i> , 2010 [125] |
| NFAT5 | O94916 | 5 | ENSG00000102908 | 12 | Exon 2 skipping Exon 4 skipping | Paraboschi <i>et al.</i> , 2015 [116] |
| NFATC1 | O95644 | 10 | ENSG00000131196 | 18 | alternatives letztes Exon | Spurlock <i>et al.</i> , 2015 [117] |
| PRKCA | P17252 | 1 | ENSG00000154229 | 5 | alternatives letztes Exon Exon 4 skipping Exon 4 Spleißdonorvariante | Paraboschi <i>et al.</i> , 2014 [119] |
| PTPRC | P08575 | 8 | ENSG00000081237 | 17 | Exon 4 skipping Exon 5 skipping Exon 6 skipping Exon 4-6 skipping | Jacobsen <i>et al.</i> , 2000 [139]; Jacobsen <i>et al.</i> , 2002 [135]; Uzawa <i>et al.</i> , 2010 [127] |
| SP140 | Q13342 | 6 | ENSG00000079263 | 14 | Exon 6 Spleißdonorvariante Exon 7 skipping | Matesanz <i>et al.</i> , 2015 [115]; Cardamone <i>et al.</i> , 2019 [105] |
| TGM2 | P21980 | 3 | ENSG00000198959 | 6 | alternatives letztes Exon | Sestito <i>et al.</i> , 2018 [107] |
| TNFRSF1A | P19438 | 5 | ENSG00000067182 | 16 | Exon 6 skipping | Gregory <i>et al.</i> , 2012 [122]; Ottoboni <i>et al.</i> , 2013 [121] |
| TNFRSF10B | O14763 | 3 | ENSG00000120889 | 8 | Intron 5 Retention | López-Gómez <i>et al.</i> , 2016 [112] |
| TNFRSF10D | Q9UBN6 | 1 | ENSG00000173530 | 1 | Exon 3 skipping | López-Gómez <i>et al.</i> , 2016 [112] |
| TNFSF10 | P50591 | 2 | ENSG00000121858 | 6 | Exon 3 skipping Exon 2-3 skipping | López-Gómez <i>et al.</i> , 2016 [112] |

Legende siehe nächste Seite.

Aus der Literaturrecherche ergaben sich 27 humane protein-kodierende Gene mit alternativen Spleißereignissen, die im Kontext der MS analysiert wurden. Den offiziellen Gensymbolen wurden aus der UniProt-Datenbank und aus der Ensembl-Datenbank die jeweilige Identifikationsnummer (ID) und die Anzahl der Proteinsequenz- bzw. mRNA-Isoformen zugeordnet. Als Referenzen sind die jeweiligen Artikel angegeben. Die in den Studien untersuchten alternativen Spleißstypen wie Exon *skipping* sind für jedes Gen aufgelistet.

Das *skipping* von Exons war das in den Studien am häufigsten untersuchte ASE (n=34). Für einige Gene (n=9) wurden ASE mit dem *skipping* mehrerer benachbarter Exons beschrieben. Für die meisten Gene wurde dagegen das *skipping* eines einzelnen Exons analysiert (n=25). RNA-Isoformen mit alternativem ersten bzw. letzten Exon entstehen durch alternative Initiationsstellen der Transkription bzw. alternative Polyadenylierungssignale. Transkriptisofornen mit einem alternativen ersten Exon (n=4) oder einem alternativen letzten Exon (n=5) wurden für insgesamt 9 Gene beschrieben. Bei insgesamt 6 Genen wurden ASE mit einem alternativen Spleißakzeptor (alternative 3'-Spleißstelle, n=4) bzw. einem alternativen Spleißdonor (alternative 5'-Spleißstelle, n=2) detektiert. Das Beibehalten eines Introns wurde lediglich in einer Studie für das TNFRSF10B-Gen analysiert [112].

4.2.2. Alternative Spleißereignisse im Kontext der MS-Therapie

Da einige krankheitsmodulierende Medikamente (DMD) bei MS (Kap. 1.1.4.) vorwiegend an Zelloberflächenrezeptoren wirken, ist es naheliegend, dass individuelle Unterschiede im Expressionsmuster dieser Rezeptoren oder intrazellulärer Signalmoleküle möglicherweise den Erfolg der Therapie beeinflussen können.

Rekombinant hergestellte IFN- β -Moleküle binden an einen Interferonrezeptor, der aus einer α - und einer β -Kette besteht und von den Genen IFNAR1 (für die α -Kette) und IFNAR2 (für die β -Kette) kodiert wird. Vom IFNAR2-Gen werden durch alternatives Spleißen drei verschiedene Isoformen kodiert, die zu einem löslichen Rezeptor und einem Rezeptor mit kurzer bzw. langer

Transmembrandomäne führen [128]. Alternative Spleißvarianten des IFNAR2-Gens sind mit einem veränderten Ansprechen des Rezeptors sowohl auf endogenes als auch auf rekombinantes IFN- β assoziiert. Gilli *et al.* konnte signifikant erhöhte Expressionslevel für die lösliche Rezeptorvariante mit fehlendem Exon 8 in PBMC von MS-Patienten im ersten Therapiejahr mit IFN- β feststellen [128]. Zusätzlich konnte diese Arbeitsgruppe eine Herabregulation der mRNA-Isoformen mit transmembranären Domänen bei langzeitbehandelten MS-Patienten mit negativem NAb-Status gegen IFN- β nachweisen.

Die Arbeitsgruppe Palacios *et al.* verglich die Expressionslevel der löslichen und langen mRNA-Isoform von CTLA4 in PBMC von MS-Patienten mit immunsuppressiver Therapie, mit IFN- β -Therapie und von MS-Patienten ohne Therapie mit DMD [130]. In der Patientengruppe mit immunsuppressiver Therapie wurde eine signifikant verringertes Verhältnis von der löslichen mRNA-Isoform zur langen mRNA-Isoform von CTLA4 detektiert. Für unbehandelte Patienten oder Patienten mit IFN- β -Therapie konnten keine signifikanten Unterschiede in den Expressionsleveln und dem Verhältnis von löslicher zu langer mRNA-Isoform von CTLA4 nachgewiesen werden.

Studien, in denen Isoformen verschiedener Tumornekrosefaktorrezeptoren (TNFR) untersucht wurden, konnten veränderte Expressionslevel bei behandelten MS-Patienten detektieren [121, 112]. Die Arbeitsgruppe López-Gómez *et al.* untersuchte den Langzeiteffekt der IFN- β -Therapie auf die Expression von TNFRSF10-Isoformen in Blutzellen von MS-Patienten [112]. In Monozyten (CD14+) detektierte diese Arbeitsgruppe ein signifikant niedrigeres Expressionslevel der mRNA-Isoform von TNFRSF10 mit herausgespleißtem Intron 5 bei Patienten, die ein Jahr lang mit einer systemischen IFN- β -Therapie behandelt wurden. Die Arbeitsgruppe Ottoboni *et al.* untersuchte die Expressionslevel der löslichen und langen Proteinisoformen von TNFRSF1A in Serumproben von MS-Patienten mit Glatirameracetat- bzw. IFN- β -Therapie und MS-Patienten ohne Therapie mit DMD. Dabei konnten bei Patienten, die mit Glatirameracetat therapiert wurden im Vergleich zu MS-Patienten ohne DMD-Therapie reduzierte Expressionslevel der löslichen TNFRSF1A-Proteinisoform, als Translationsprodukt der Transkriptvariante mit fehlendem Exon 6, detektiert werden [121].

4.3. Validierung potentieller MS-assoziierter Spleißereignisse

Für die auf Transkriptomdaten basierende Reevaluation von bisher in der Literatur beschriebenen ASE bei MS-Patienten der Rostocker Kohorte im Vergleich zu gesunden Kontrollen wurden HTA 2.0 Microarraydatensätze der Arbeitsgruppe Neuroimmunologie der Universitätsmedizin Rostock zu verschiedenen Blutzellpopulationen von MS-Patienten verwendet. Zusätzlich wurden externe HTA 2.0 Microarraydatensätze zu Blutzellen von gesunden Kontrollen hinzugezogen. Anhand der in Kap. 3.2.2. genannten Kriterien für die Auswahl der Kontroll-Datensätze wurden insgesamt vier geeignete HTA 2.0 Microarraydatensätze aus der GEO-Datenbank [103] für die Überprüfung ausgewählt. Für die Analyse der bisher in der Literatur beschriebenen ASE in insgesamt 27 humanen protein-kodierenden Genen mit Hilfe der TAC 4.0.1 Software wurden insgesamt 308 HTA 2.0 Microarrays ausgewertet. Für die Auswertung im Sinne einer Fall-Kontroll-Studie wurden die Daten zu den 5 verschiedenen Zellpopulationen (CD4+, CD8+, CD14+, CD19+, CD56+) der MS-Patienten mit den Daten der 4 Kontrollgruppen (GSE63379, GSE88887, GSE111552, GSE111553/4) verglichen. Insgesamt resultierten daraus 20 Vergleiche.

Die Qualitätskontrollen wurden gemäß der Empfehlung des Herstellers für die 308 verwendeten HTA 2.0 Microarrays mit Hilfe der TAC 4.0.1 Software durchgeführt (Abb. 10). Für alle 308 HTA 2.0 Microarrays konnte dabei eine konsistente Erhöhung der logarithmischen Signalintensitäten für die *spike-in* RNA-Moleküle BioB, BioC, BioD und Cre aus dem GeneChip WT PLUS-Reagenzienkit (Affymetrix) detektiert werden, sodass alle Microarrays das Qualitätskriterium *Hybridization Controls Threshold* erfüllten. Die Trennschärfe der gemessenen positiven (Exon-) und negativen (Intron-) Kontrollsonden wird durch die Berechnung der AU-ROC (Kap. 3.2.3.) der Kontrollsonden eines Arrays berechnet. AU-ROC-Werte von 1 spiegeln eine perfekte Trennung der Kontrollsonden wider und der Schwellenwert der TAC 4.0.1 Software für eine ausreichend gute Trennung der Kontrollsonden liegt bei 0,7. Die Trennschärfen lagen für alle 308 verwendeten HTA 2.0 Microarrays über 0,88. Damit erfüllten alle Microarrays das Qualitätskriterium *Pos vs. Neg AUC Threshold*.

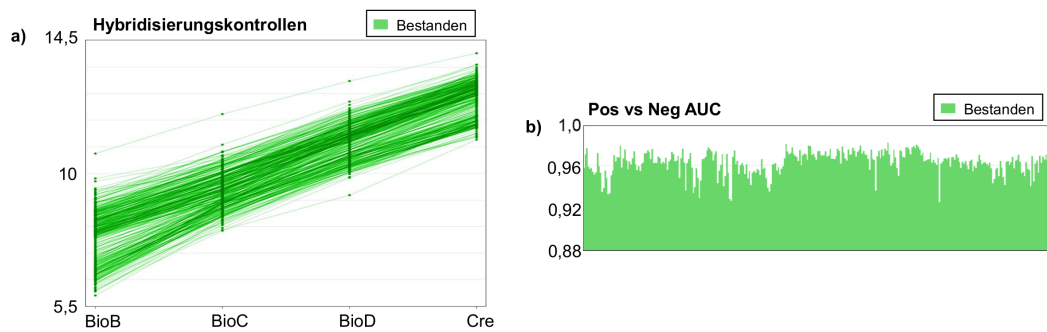


Abb. 10: Qualitätskontrolle der verwendeten HTA 2.0 Microarrays.

Im Teil a) sind die logarithmischen Werte der Signalintensitäten (y-Achse) der vier *spike-in* RNA-Sequenzen (BioB, BioC, BioD und CRE) in aufsteigender Konzentration für die insgesamt 308 HTA 2.0 Microarrays dargestellt. Alle 308 Microarrays erfüllten die Hybridisierungskontrolle. Im Teil b) der Abbildung ist die *Pos vs Neg AUC* für die Microarrays (x-Achse) dargestellt. Die Trennschärfe der gemessenen positiven (Exon-) und negativen (Intron-) Kontrollsonden wird durch die Berechnung der *area under the receiver operating characteristic curve* (AU-ROC, y-Achse) der Kontrollsonden eines Arrays berechnet. Die Trennschärfen der 308 verwendeten HTA 2.0 Microarrays lagen stets über 0,88 und erfüllten damit die *Pos vs Neg AUC* Qualitätskontrolle.

HTA: *Human Transcriptome Array*.

Für die meisten (n=20) der insgesamt 27 in der systematischen Literaturrecherche identifizierten Gene existiert genau ein *Genlevel-transcript cluster* (TC) Sondensatz (engl. *probe set*) auf den HTA 2.0 Microarrays (Suppl. 4). Für 4 Gene (SP140, CSF1R, CTLA4 und TNFSF10) sind jeweils 2 *probe sets* annotiert. Für das TNFRSF10B-Gen wurden insgesamt 4 *probe sets* pro HTA 2.0 Microarray ausgewertet. Auf den Microarrays sind 9 *probe sets* für das DDX39B-Gen annotiert. Für das MOG-Gen existieren insgesamt 13 *probe sets* auf jedem Genchip. Mit Hilfe der TAC 4.0.1 Software wurden die logarithmischen Mittelwerte der Signalintensitäten der *probe sets* für die 5 Blutzellpopulationen (CD4+, CD8+, CD14+, CD19+, CD56+) bestimmt. Die logarithmischen Mittelwerte, berechnet aus jeweils 20 Microarrays, variierten zwischen 4,92 für das sehr niedrig exprimierte MOG-Gen (TC06000322.hg.1) in CD56+-Zellen und 17,57 für das sehr hoch exprimierte PTPRC-Gen (TC01001640.hg.1) in CD56+-Zellen (Tab. 7).

Tab. 7: Genexpressionsanalyse der 27 bisher in der Literatur untersuchten Gene.

| Gensymbol | probe set ID | CD4+ | | CD8+ | | CD14+ | | CD19+ | | CD56+ | |
|-----------|--------------------------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|
| | | M (log2) | SD | M (log2) | SD | M (log2) | SD | M (log2) | SD | M (log2) | SD |
| ADORA1 | TC01001683.hg.1 | 5,52 | 0,22 | 5,36 | 0,14 | 5,32 | 0,13 | 5,31 | 0,24 | 5,22 | 0,27 |
| BIN1 | TC02002276.hg.1 | 8,16 | 0,26 | 8,39 | 0,17 | 6,81 | 0,10 | 8,08 | 0,35 | 8,06 | 0,39 |
| CD40 | TC20000365.hg.1 | 6,07 | 0,18 | 5,87 | 0,15 | 6,34 | 0,54 | 10,16 | 0,60 | 5,99 | 0,24 |
| CD46 | TC01001741.hg.1 | 11,03 | 0,33 | 11,20 | 0,26 | 12,36 | 0,28 | 10,60 | 0,21 | 10,94 | 0,35 |
| CD86 | TC03000626.hg.1 | 6,44 | 1,11 | 5,05 | 0,23 | 12,32 | 0,26 | 8,82 | 0,41 | 7,03 | 1,70 |
| CFLAR | TC02001174.hg.1 | 9,64 | 0,44 | 10,37 | 0,38 | 10,93 | 0,24 | 9,25 | 0,27 | 10,80 | 0,32 |
| CSF1R | TC05001932.hg.1 | 6,58 | 0,94 | 5,96 | 0,14 | 11,19 | 0,37 | 6,05 | 0,21 | 6,85 | 1,14 |
| | TC05003302.hg.1 | 6,46 | 0,43 | 6,10 | 0,27 | 9,13 | 0,25 | 6,18 | 0,28 | 6,49 | 0,71 |
| CTLA4 | TC02001201.hg.1 | 7,87 | 0,77 | 6,06 | 0,48 | 5,22 | 0,14 | 5,25 | 0,26 | 5,27 | 0,18 |
| | TC02003774.hg.1 | 8,41 | 0,78 | 6,56 | 0,54 | 5,73 | 0,21 | 5,71 | 0,34 | 5,82 | 0,27 |
| DDX39B | TC06003338.hg.1 | 5,45 | 0,28 | 5,26 | 0,16 | 5,15 | 0,13 | 5,29 | 0,25 | 5,19 | 0,31 |
| | TC06004114.hg.1 | 11,19 | 0,44 | 11,49 | 0,17 | 11,13 | 0,31 | 11,32 | 0,37 | 11,58 | 0,41 |
| | TC6_apd_hap1000079.hg.1 | 12,23 | 0,47 | 12,44 | 0,18 | 12,09 | 0,31 | 12,33 | 0,4 | 12,72 | 0,38 |
| | TC6_cox_hap2000252.hg.1 | 10,80 | 0,42 | 11,16 | 0,17 | 10,81 | 0,29 | 10,88 | 0,33 | 11,22 | 0,4 |
| | TC6_dbb_hap3000231.hg.1 | 10,89 | 0,4 | 11,25 | 0,16 | 10,90 | 0,28 | 10,98 | 0,33 | 11,35 | 0,39 |
| | TC6_mann_hap4000202.hg.1 | 10,89 | 0,4 | 11,24 | 0,16 | 10,89 | 0,28 | 10,99 | 0,33 | 11,34 | 0,39 |
| | TC6_mcf_hap5000216.hg.1 | 10,90 | 0,4 | 11,25 | 0,16 | 10,89 | 0,28 | 10,99 | 0,33 | 11,35 | 0,39 |
| | TC6_qbl_hap6000230.hg.1 | 10,90 | 0,41 | 11,28 | 0,17 | 10,92 | 0,29 | 11,01 | 0,33 | 11,33 | 0,40 |
| | TC6_ssto_hap7000204.hg.1 | 10,83 | 0,43 | 11,15 | 0,16 | 10,79 | 0,30 | 10,98 | 0,36 | 11,26 | 0,41 |
| EMC4 | TC15000233.hg.1 | 9,22 | 0,44 | 9,89 | 0,31 | 10,06 | 0,30 | 9,48 | 0,54 | 9,73 | 0,51 |
| FOXP3 | TC0X001031.hg.1 | 6,78 | 0,41 | 5,78 | 0,13 | 5,59 | 0,11 | 5,63 | 0,23 | 5,59 | 0,27 |
| GSDMB | TC17002851.hg.1 | 7,88 | 0,51 | 9,17 | 0,77 | 6,19 | 0,19 | 7,85 | 0,73 | 7,46 | 0,50 |
| IFNAR2 | TC21001060.hg.1 | 9,69 | 0,37 | 10,07 | 0,23 | 10,42 | 0,27 | 9,26 | 0,30 | 10,30 | 0,43 |
| IL7 | TC08001350.hg.1 | 5,38 | 0,16 | 5,22 | 0,22 | 5,20 | 0,15 | 7,24 | 0,31 | 5,17 | 0,22 |
| IL7R | TC05000159.hg.1 | 17,10 | 0,22 | 16,82 | 0,27 | 6,05 | 0,44 | 6,78 | 0,48 | 14,33 | 1,26 |
| MBP | TC18000585.hg.1 | 6,35 | 0,09 | 6,63 | 0,19 | 6,42 | 0,20 | 6,03 | 0,12 | 6,95 | 0,25 |
| MOG | TC06000322.hg.1 | 5,13 | 0,21 | 5,04 | 0,13 | 4,93 | 0,14 | 5,05 | 0,20 | 4,92 | 0,25 |
| | TC06002363.hg.1 | 5,51 | 0,23 | 5,30 | 0,29 | 5,35 | 0,25 | 5,31 | 0,26 | 5,17 | 0,31 |
| | TC06002367.hg.1 | 6,74 | 0,60 | 6,23 | 0,38 | 6,41 | 0,33 | 6,50 | 0,69 | 6,12 | 0,70 |
| | TC06002374.hg.1 | 5,37 | 0,26 | 5,06 | 0,14 | 5,00 | 0,18 | 5,11 | 0,27 | 5,05 | 0,37 |
| | TC6_apd_hap1000015.hg.1 | 5,23 | 0,21 | 5,12 | 0,15 | 5,03 | 0,13 | 5,14 | 0,22 | 5,01 | 0,27 |
| | TC6_cox_hap2000019.hg.1 | 5,48 | 0,27 | 5,33 | 0,19 | 5,21 | 0,18 | 5,34 | 0,29 | 5,22 | 0,35 |
| | TC6_dbb_hap3000015.hg.1 | 5,19 | 0,21 | 5,07 | 0,15 | 4,98 | 0,13 | 5,09 | 0,21 | 4,97 | 0,26 |
| | TC6_mann_hap4000016.hg.1 | 5,18 | 0,21 | 5,07 | 0,14 | 4,99 | 0,12 | 5,09 | 0,21 | 4,96 | 0,26 |
| | TC6_mcf_hap5000014.hg.1 | 5,21 | 0,29 | 5,11 | 0,15 | 5,03 | 0,14 | 5,12 | 0,24 | 4,99 | 0,28 |
| | TC6_qbl_hap6000014.hg.1 | 5,38 | 0,24 | 5,21 | 0,17 | 5,15 | 0,15 | 5,24 | 0,25 | 5,12 | 0,30 |
| | TC6_ssto_hap7000015.hg.1 | 5,23 | 0,21 | 5,12 | 0,15 | 5,03 | 0,13 | 5,14 | 0,22 | 5,01 | 0,27 |
| | TC06002364.hg.1 | 5,65 | 0,42 | 5,36 | 0,39 | 5,23 | 0,38 | 5,43 | 0,43 | 5,22 | 0,40 |
| | TC06002365.hg.1 | 6,08 | 0,70 | 5,44 | 0,33 | 5,22 | 0,33 | 5,40 | 0,64 | 5,28 | 0,71 |

Fortsetzung der Tabelle und Legende siehe nächste Seite.

| | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| NFAT5 | TC16000570.hg.1 | 9,90 | 0,40 | 10,59 | 0,25 | 9,79 | 0,26 | 10,42 | 0,29 | 11,12 | 0,39 |
| NFATC1 | TC18000263.hg.1 | 6,74 | 0,17 | 6,53 | 0,17 | 6,28 | 0,17 | 7,40 | 0,36 | 6,35 | 0,19 |
| PRKCA | TC17000783.hg.1 | 10,36 | 0,44 | 9,74 | 0,49 | 7,60 | 0,50 | 5,63 | 0,30 | 8,03 | 0,48 |
| PTPRC | TC01001640.hg.1 | 17,02 | 0,24 | 17,49 | 0,15 | 17,39 | 0,14 | 16,85 | 0,31 | 17,57 | 0,21 |
| SP140 | TC02003877.hg.1 | 11,27 | 0,47 | 11,92 | 0,48 | 8,07 | 1,00 | 15,12 | 0,38 | 11,44 | 0,97 |
| | TC02005009.hg.1 | 9,86 | 0,35 | 10,41 | 0,32 | 7,83 | 0,55 | 13,08 | 0,29 | 10,06 | 0,63 |
| TGM2 | TC20000833.hg.1 | 5,47 | 0,12 | 5,41 | 0,08 | 5,55 | 0,42 | 5,49 | 0,15 | 5,41 | 0,19 |
| TNFRSF1A | TC12001135.hg.1 | 8,29 | 0,55 | 9,20 | 0,29 | 11,15 | 0,28 | 6,37 | 0,29 | 10,14 | 0,60 |
| TNFRSF10B | TC08001048.hg.1 | 6,92 | 0,35 | 7,14 | 0,30 | 5,95 | 0,29 | 6,67 | 0,21 | 7,48 | 0,42 |
| | TC08001049.hg.1 | 7,16 | 0,31 | 6,96 | 0,19 | 9,49 | 0,23 | 7,26 | 0,24 | 6,59 | 0,61 |
| | TC08002256.hg.1 | 6,77 | 0,30 | 7,06 | 0,33 | 5,94 | 0,28 | 6,63 | 0,22 | 7,47 | 0,38 |
| | TC08002257.hg.1 | 7,63 | 0,49 | 7,36 | 0,22 | 10,83 | 0,32 | 7,80 | 0,42 | 6,87 | 0,87 |
| TNFRSF10D | TC08001051.hg.1 | 7,24 | 0,32 | 6,48 | 0,33 | 7,91 | 0,40 | 6,16 | 0,15 | 5,88 | 0,40 |
| TNFSF10 | TC03002006.hg.1 | 11,20 | 0,65 | 9,76 | 0,80 | 13,50 | 0,34 | 9,23 | 0,53 | 10,59 | 1,06 |
| | TC03003211.hg.1 | 13,25 | 1,00 | 11,67 | 1,09 | 16,06 | 0,60 | 11,03 | 1,05 | 12,92 | 1,46 |

In der Tabelle sind die logarithmischen Mittelwerte (M (log₂)) und die Standardabweichungen (SD) der Signalintensitäten für die einzelnen *transcript cluster probe sets* der 27 in der Literatur identifizierten Gene angegeben. Verglichen wurden die Genexpressionslevel in 5 Blutzellpopulationen (CD4+, CD8+, CD14+, CD19+, CD56+). Die Identifikationsnummern (ID) der *probe sets* sind für die 27 Gene in der Tabelle hinterlegt. Die M (log₂)-Werte sind aufsteigend farblich markiert: hellgelb <6, gelb 6-8, orange 8-10, hellrot 10-12, dunkelrot >12.

In den 36 durch die systematische Literaturrecherche identifizierten Artikeln wurden verschiedene ASE für insgesamt 27 humane protein-kodierende Gene untersucht. Die Ergebnisse der Reevaluation mit Hilfe der TAC 4.0.1 Software wurden tabellarisch aufbereitet (Tab. 8). Die Validierung eines Gens wurde für die jeweilige Blutzellpopulation als erfolgreich gewertet, wenn das entsprechende ASE mit statistischer Signifikanz (Eventpointer $p < 0,0001$) im Vergleich zu allen gesunden Kontrollgruppen nachgewiesen werden konnte. Für 7 der insgesamt 27 betrachteten Gene wurden konsistent in allen 20 Vergleichen signifikante Unterschiede im Expressionsverhältnis der aus einem ASE resultierenden Transkriptvarianten nachgewiesen. Von den insgesamt 27 Genen konnte für 19 Gene für mindestens eine der insgesamt 5 verschiedenen Blutzellpopulationen das zuvor beschriebene ASE bestätigt werden. Für 8 der 27 Gene konnte zu keiner Blutzellpopulation ein konsistenter signifikanter Unterschied im Spleißmuster zwischen MS-Patienten und gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Für Transkriptisoformen der Gene CTLA4 und IL7R

wurden in T-Helferzellen (CD4+) und zytotoxischen T-Zellen (CD8+) signifikant differentielle Expressionslevel ermittelt. Transkriptisoformen des CD86-Gens wurden hingegen nur in B-Zellen (CD19+) konsistent mit einer signifikant differentiellen Expression in allen vier Fall-Kontroll-Vergleichen nachgewiesen. Die Transkriptisoform des NFATC1-Gens mit einem alternativen letzten Exon zeigte eine signifikant differentielle Expression in B-Zellen (CD19+) und T-Zellen (CD4+ und CD8+). Für Transkriptisoformen des PRKCA-Gens wurden nur in NK-Zellen (CD56+) signifikant differentielle Expressionslevel gemessen.

Tab. 8: Microarray-basierte Validierung der in der Literatur genannten alternativen Spleißereignisse.

| Gensymbol | ASE | Microarray-basierte Evaluation | | | | |
|---------------|--|--------------------------------|------|-------|-------|-------|
| | | CD4+ | CD8+ | CD14+ | CD19+ | CD56+ |
| ADORA1 | alternatives erstes Exon | x | x | x | x | x |
| BIN1 | Exon 7 <i>skipping</i> Exon 11 <i>skipping</i> Exon 13-17 <i>skipping</i> | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| CD40 | Exon 5 <i>skipping</i> Exon 6 <i>skipping</i> Exon 5-6 <i>skipping</i> | ✓ | x | ✓ | ✓ | x |
| CD46 | Exon 13 <i>skipping</i> | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| CD86 | alternatives erstes Exon Exon 6 <i>skipping</i> | x | x | x | ✓ | x |
| CFLAR | alternatives letztes Exon | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| CSF1R | alternatives erstes Exon | ✓ | x | ✓ | ✓ | ✓ |
| CTLA4 | Exon 3 <i>skipping</i> | ✓ | ✓ | x | x | x |
| DDX39B | Exon 2 Spleißakzeptorvariante | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| EMC4 | Exon 4 <i>skipping</i> | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| FOXP3 | Exon 3 <i>skipping</i> | x | x | x | x | x |
| GSDMB | Exon 6 <i>skipping</i> Exon 6 Spleißakzeptorvariante Exon 5-8 <i>skipping</i> | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| IFNAR2 | Exon 8 <i>skipping</i> Exon 9 Spleißakzeptorvariante | x | x | x | x | x |
| IL7 | Exon 4 <i>skipping</i> Exon 3-4 <i>skipping</i> Exon 3-5 <i>skipping</i> Exon 4-5 <i>skipping</i> | x | x | x | x | x |

Fortsetzung der Tabelle und Legende siehe nächste Seite.

| | | | | | | |
|------------------|---|---|---|---|---|---|
| IL7R | Exon 6 <i>skipping</i> Exon 5-6 <i>skipping</i> | ✓ | ✓ | x | x | x |
| MBP | alternatives erstes Exon | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| MOG | alternatives letztes Exon Exon 7 <i>skipping</i> Exon 8 <i>skipping</i> Exon 10 Spleißakzeptorvariante | x | x | x | x | x |
| NFAT5 | Exon 2 <i>skipping</i> Exon 4 <i>skipping</i> | ✓ | x | x | ✓ | ✓ |
| NFATC1 | alternatives letztes Exon | ✓ | ✓ | x | ✓ | x |
| PRKCA | alternatives letztes Exon Exon 4 <i>skipping</i> Exon 4 Spleißdonorvariante | x | x | x | x | ✓ |
| PTPRC | Exon 4 <i>skipping</i> Exon 5 <i>skipping</i> Exon 6 <i>skipping</i> Exon 4-6 <i>skipping</i> | x | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| SP140 | Exon 6 Spleißdonorvariante Exon 7 <i>skipping</i> | ✓ | ✓ | x | ✓ | ✓ |
| TGM2 | alternatives letztes Exon | x | x | x | x | x |
| TNFRSF1A | Exon 6 <i>skipping</i> | x | ✓ | x | ✓ | ✓ |
| TNFRSF10B | Intron 5 Retention | x | x | x | x | x |
| TNFRSF10D | Exon 3 <i>skipping</i> | x | x | x | x | x |
| TNFSF10 | Exon 3 <i>skipping</i> Exon 2-3 <i>skipping</i> | ✓ | ✓ | x | ✓ | ✓ |

Dargestellt sind die Ergebnisse der Validierung der 27 in der Literatur genannten Gene in HTA 2.0 Microarraydatensätzen. Die HGNC-Gensymbole für jedes der in den Studien untersuchten Gene wurden der *GeneCards*-Datenbank entnommen [93]. Den offiziellen Gensymbolen wurde aus der UniProt-Datenbank bzw. der Ensembl-Datenbank die jeweilige UniProt- bzw. Ensembl-Identifikationsnummer (ID) zugeordnet [95, 96]. Die in den Studien untersuchten alternativen Spleißtypen wie Exon *skipping* sind für jedes Gen aufgelistet. Die HTA 2.0 Datensätze der 5 Blutzellpopulationen (CD4+, CD8+, CD14+, CD19+, CD56+) von MS-Patienten und der Blutzellen von 4 gesunden Kontrollgruppen (Tab. 4, Seite 40) wurden verglichen, sodass insgesamt 20 Vergleiche durchgeführt wurden. Die konsistente Bestätigung eines MS-assoziierten ASE in der statistischen Analyse (Eventpointer p-Wert <0,0001) wurde mit einem Haken (✓) angegeben. Für 8 der 27 Gene konnten keine signifikanten Unterschiede im Expressionslevel der Transkriptvarianten detektiert werden (x). ASE: alternatives Spleißereignis, HGNC: HUGO *Gene Nomenclature Committee*, HTA: *Human Transcriptome Array*.

Beispielhaft sei im Folgenden die Auswertung der Exonlevel von zwei der insgesamt 27 untersuchten Gene durch eine integrative Betrachtung visuell dargestellt (Abb. 11 und 12). In insgesamt 8 Studien wurde für das IL7R-Gen ein *Exon 6 skipping* untersucht (Kap. 4.2.). Das *skipping* des Exons 6 im IL7R-Gen ist durch alternatives Spleißen möglich. Es wurde in der Literatur gezeigt, dass ein exonischer *Splicing Silencer* (ESS) durch den mit MS-assoziierten SNP rs6897932 beeinflusst wird [132]. Unter Verwendung der TAC 4.0.1 Software wurden für das IL7R-Gen insgesamt 25 *probe sets* für Exonfragmente (PSR) und 13 *probe sets* für Exon-Exon-Grenzen (JUC) ausgewertet. Mit Hilfe der TAC 4.0.1 Software wurden für das IL7R-Gen (TC05000159.hg.1) die höchsten mRNA Level in T-Zellen (CD4+ und CD8+) detektiert (Tab. 8). Im UCSC *Genome Browser* GRCh37/hg19 Feb. 2009 *Assembly* sind für das IL7R-Gen (Ensembl-ID: ENSG00000168685) insgesamt 7 protein-kodierende und 3 nicht-protein-kodierende RNA-Transkriptvarianten aus der Ensembl-Datenbank annotiert [96, 97]. Für die HTA 2.0 Datenvisualisierung wurden die Expressionslevel in CD4+-Zellen aus dem Blut von RRMS-Patienten (n=20 HTA 2.0 Microarrays) und Vollblutproben von gesunden Kontrollen (GSE111555, n=84 HTA 2.0 Microarrays) verglichen (Abb. 11). In diesem Vergleich war das ASE für die Inklusion von Exon 6 bzw. das *Exon 6 skipping* im IL7R-Gen hochsignifikant (Eventpointer p-Wert = $5,2 \times 10^{-7}$). Für das Exon 6 (PSR05001803.hg.1) konnte ein deutlich häufigeres *Exon 6 skipping* (*Splicing Index* -1,91) in den CD4+-Zellen von MS-Patienten im Vergleich zu den Proben von gesunden Kontrollen nachgewiesen werden.

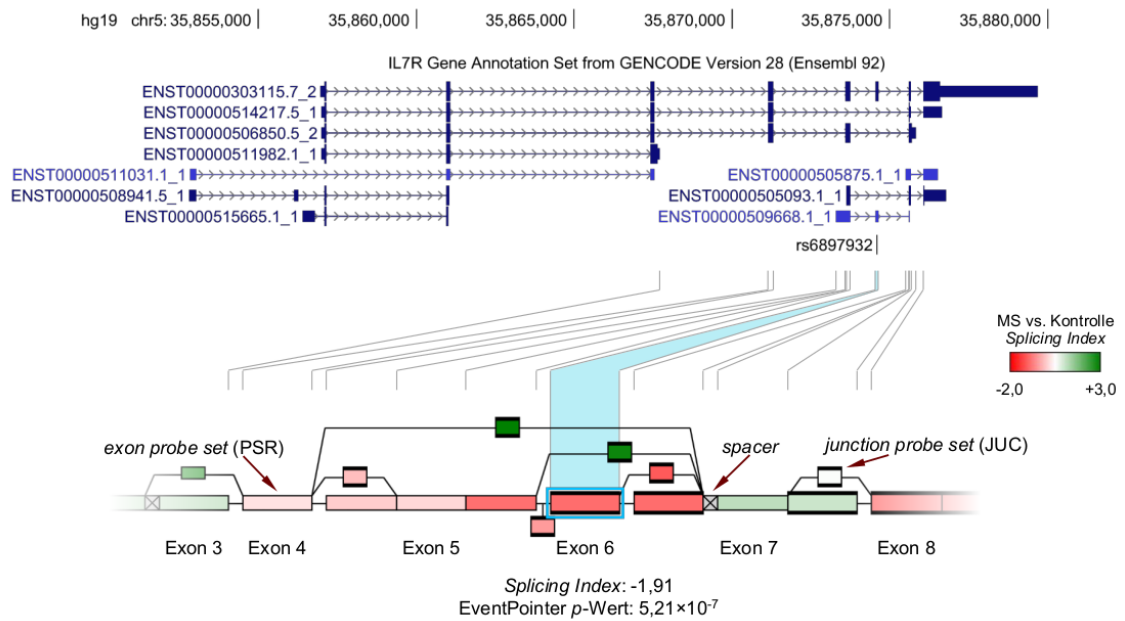


Abb. 11: Exonlevelanalyse des IL7R-Gens bei MS-Patienten und Gesunden.

Die im UCSC *Genome Browser* annotierten protein-kodierenden ($n=7$, dunkelblau) und nicht-protein-kodierenden ($n=3$, hellblau) RNA-Transkriptvarianten entsprechend der Ensembl-Datenbank sind im oberen Teil der Abbildung dargestellt [96, 97]. Exons sind anhand der Balken dargestellt, Introns in Form von Pfeilen, die die Leserichtung der Transkription anzeigen. Es wurde in der Literatur gezeigt, dass ein exonischer *Splicing Silencer* (ESS) durch den mit MS-assoziierten SNP rs6897932 beeinflusst wird [132]. Im unteren Teil der Abbildung ist die HTA 2.0 Datenvisualisierung anhand der TAC 4.0.1 Software dargestellt. In diesem Teil der Abbildung ist der Vergleich der Expressionslevel in CD4+-Zellen aus Blut von RRMS-Patienten ($n=20$ Microarrays) und Vollblutproben von gesunden Kontrollen (GSE111555, $n=84$ HTA 2.0 Microarrays) gezeigt. Der *Splicing Index* für das Exon 6 (PSR05001803.hg.1) liegt bei -1,91 und ist in der TAC *Structure View* mit der hellblauen Farbmarkierung hervorgehoben. Die grüne Farbe der beiden Exon 6 überspringenden *junctions* gibt einen erhöhten *Splicing Index* bei MS-Patienten an. Die dicker umrandeten Balken zeigen *exon probe sets* (PSR) bzw. *junction probe sets* (JUC) zu nominell statistisch signifikanten (Eventpointer p -Wert $<0,05$) alternativen Spleißereignissen.

HTA: *Human Transcriptome Array*, SNP: *single-nucleotide polymorphism*, TAC: *Transcriptome Analysis Console*.

In einem der insgesamt 36 eingeschlossenen Artikel der systematischen Literaturrecherche wurde ein häufigeres Fehlen der Exons 2 und 4 des NFAT5-Gens durch alternatives Spleißen der pre-mRNA bei MS-Patienten beschrieben (Kap. 4.2.) [116]. Die Arbeitsgruppe von Paraboschi *et al.* zeigte außerdem, dass ein ISE durch den SNP rs12599391 im Intron 2 beeinflusst wird [116]. Unter Verwendung der TAC 4.0.1 Software wurden für das NFAT5-Gen insgesamt 28 *probe sets* für Exonfragmente (PSR) und 23 *probe sets* für Exon-Exon-Grenzen (JUC) ausgewertet. Für 17 der 20 Vergleiche der Datensätze zu MS-Patienten und gesunden Kontrollen wurden signifikant bei MS niedrigere Expressionslevel (EventPointer p-Wert <0,0001) von NFAT5-Transkripten mit Exon 2 detektiert. Im UCSC *Genome Browser* GRCh37/hg19 Feb. 2009 *Assembly* sind für das NFAT5-Gen (Ensembl-ID: ENSG00000168685) 10 protein-kodierende und 2 nicht-protein-kodierende RNA-Transkriptvarianten aus der Ensembl-Datenbank annotiert [96, 97]. Für die HTA 2.0 Datenvisualisierung anhand der TAC Software wurden die Expressionslevel in isolierten CD4+-Zellen aus Blutproben von RRMS-Patienten (n=20 HTA 2.0 Microarrays) und Vollblutproben von gesunden Kontrollen (GSE111555, n=84 HTA 2.0 Microarrays) verglichen (Abb. 12). Für das Exon 2 (PSR16008222.hg.1) des NFAT5-Gens konnte mit Hilfe der TAC Software ein häufigeres Exon 2 *skipping* (*Splicing Index* -2,29) in CD4+-Zellen von MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden.

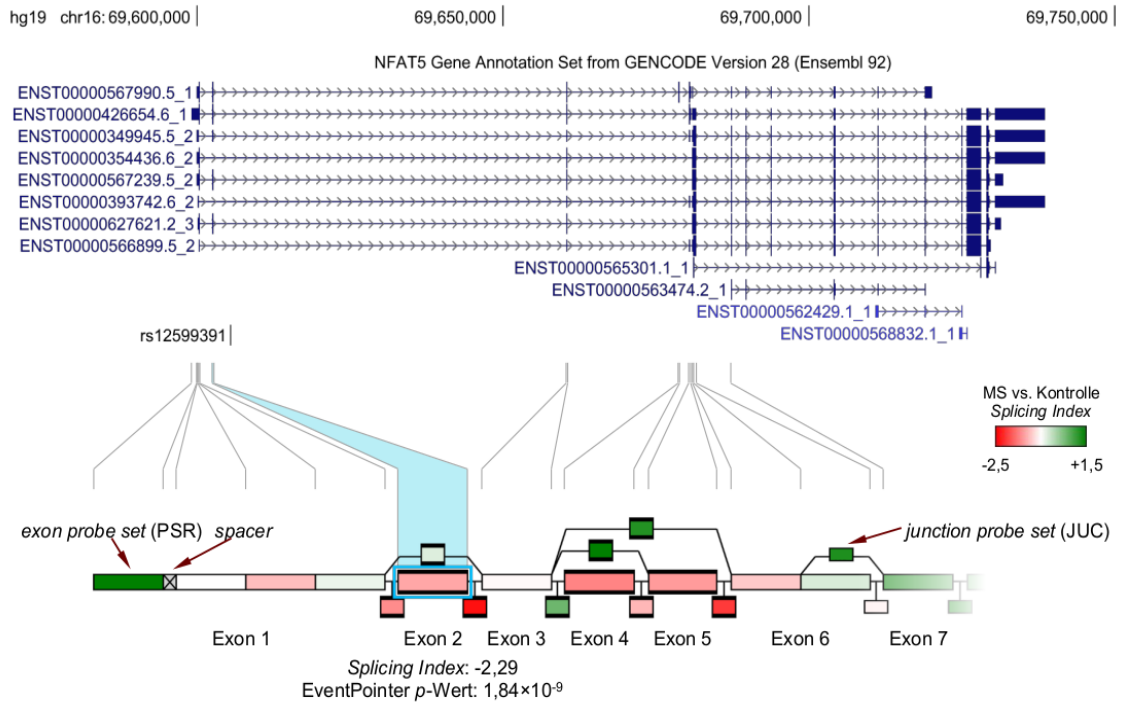


Abb. 12: Exonlevelanalyse des NFAT5-Gens bei MS-Patienten und Gesunden.

Die im UCSC *Genome Browser* annotierten protein-kodierenden (n=10, dunkelblau) und nicht-protein-kodierenden (n=2, hellblau) RNA-Transkriptvarianten entsprechend der Ensembl-Datenbank sind im oberen Teil der Abbildung dargestellt [96, 97]. Die Exons sind anhand der Balken dargestellt und die Pfeile stehen für die Introns und geben die Leserichtung der Transkription an. Ein *skipping* der Exons 2, 4 und 5 ist durch alternatives Spleißen möglich. Es wurde in der Literatur gezeigt, dass ein intronischer *Splicing Enhancer* (ISE) durch den SNP rs12599391 beeinflusst wird [116]. Im unteren Teil der Abbildung ist die HTA 2.0 Datenvisualisierung anhand der TAC 4.0.1 Software dargestellt. Exemplarisch dafür zeigt diese Abbildung den Vergleich von CD4+-Zellen aus Blut von RRMS-Patienten (n=20 Microarrays) zu Vollblut von gesunden Kontrollen (GSE111555, n=84 Microarrays). Der *Splicing Index* für das Exon 2 (PSR16008222.hg.1) liegt bei -2,29 und ist mit der hellblauen Farbmarkierung hervorgehoben. Die dicker umrandeten Balken zeigen *exon probe sets* (PSR) bzw. *junction probe sets* (JUC) zu statistisch signifikanten ($p < 0,05$) alternativen Spleißereignissen.

HTA: *Human Transcriptome Array*, SNP: *single-nucleotide polymorphism*, TAC: *Transcriptome Analysis Console*.

5. Diskussion

Um die Bedeutung von alternativen Spleißereignissen (ASE) in der Pathogenese der Multiplen Sklerose (MS) zu ergründen und um potentiell für MS spezifische molekulare Biomarker zu identifizieren, wurde in dieser Arbeit eine systematische Literaturrecherche in der PubMed-Datenbank durchgeführt. Insgesamt wurden für die Übersichtsarbeit 160 Artikel in Anlehnung an die Vorgaben der *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) [92] analysiert. Im Ergebnis wurden 36 Studien mit insgesamt 27 untersuchten humanen protein-kodierenden Genen zu diesem Thema als relevant identifiziert. Die bisher in der Literatur untersuchten Transkriptisoformen bei MS wurden anschließend in HTA 2.0 Microarraydaten von RRMS-Patienten der Rostocker Kohorte und gesunden Kontrollen überprüft. Für 7 der 27 Gene konnte in allen 20 durchgeführten Vergleichen konsistent eine differentielle Expression der Transkriptisoformen bei MS-Patienten festgestellt werden.

5.1. Genetische Risikovarianten und alternatives Spleißen

Obwohl vor allem in den letzten 12 Jahren eine Vielzahl genetischer Regionen mit dem Risiko, an MS zu erkranken, assoziiert werden konnten [24, 25], sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bisher nahezu unverstanden. In der letzten GWAS-Studie von 2019 wurden insgesamt 233 SNPs in einer großen Kohorte von 47.429 MS-Patienten und 68.374 Kontrollen mit der Suszeptibilität für MS assoziiert [25]. Im menschlichen Genom werden über 95% der protein-kodierenden pre-mRNA-Moleküle physiologisch während der mRNA-Prozessierung alternativ gespleißt [78]. Ein SNP, der in einer kritischen Position für das alternative Spleißen lokalisiert ist, könnte somit zu Allel-spezifischen ASE führen.

Der Einfluss von SNPs auf das alternative Spleißen von humanen protein-kodierenden Genen wird zunehmend untersucht. In einem Großteil (n=20 von 36) der in dieser systematischen Übersichtsarbeit mit einbezogenen Studien wurden ASE in Abhängigkeit von bestimmten Genotypen analysiert. Die

Arbeitsgruppe Park *et al.* untersuchte insbesondere die Assoziation genetischer Varianten im TNFRSF1A-Gen bei Patienten mit MS (n=79) bzw. NMO (n=99) und gesunden Kontrollen (n=237) [144]. Es ließen sich hierbei allerdings bei MS-Patienten keine signifikanten Unterschiede in der Genotypverteilung im Vergleich zu den Kontrollen feststellen. Die Arbeitsgruppe Morrison *et al.* untersuchte unter anderem den Einfluss von 31 SNPs in potentiellen Spleißstellen auf das alternative Spleißen von humanen protein-kodierenden Genen [145]. Zwei Risikovarianten (rs11078928, rs2014886) wurden dabei mit ASE des GSDMB- bzw. TSFM-Gens assoziiert.

Für verschiedene Erkrankungen mit genetischer Komponente oder autoimmuner Genese konnte bereits ein Zusammenhang zu differentiell exprimierten alternativen Spleißvarianten hergestellt werden [85, 91]. Bei Patienten mit Muskeldystrophie Duchenne oder spinaler Muskelatrophie stehen bestimmte Transkriptisoformen mit der Krankheitsentstehung im Zusammenhang [88, 89]. Erste Therapieansätze mit Antisense-Oligonukleotiden zeigten bereits, dass die Beeinflussung des alternativen Spleißens positive Effekte auf den Krankheitsverlauf der beiden Erkrankungen hat [90]. Der Nachweis MS-spezifischer ASE könnte auch neue Perspektiven zur Optimierung der MS-Diagnostik und -Therapie eröffnen. Die systematische Literaturrecherche mit insgesamt 36 eingeschlossenen Artikeln zum alternativen Spleißen bei MS macht deutlich, dass das Thema zunehmend im Fokus der molekularen MS-Forschung steht. Bevor näher auf die Bedeutung von ASE als potentielle Biomarker in der MS-Diagnostik oder für das Monitoring von Therapien eingegangen wird, soll im nachfolgenden Unterkapitel zunächst die methodische Herangehensweise der vorliegenden Arbeit diskutiert werden.

5.2. Kriterien der Literaturrecherche

Die Identifikation von mit MS assoziierten genetischen Varianten [25] und die Assoziation von ASE mit anderen Erkrankungen [85] legen nahe, dass ASE auch bei MS eine bedeutende Rolle als potentielle Biomarker für die Diagnosestellung oder das Monitoring von Therapien spielen könnten. Die Auswahl der Literatur für diese systematische Übersichtsarbeit erfolgte in der PubMed-Datenbank in Anlehnung an die PRISMA-Vorgaben [92] und anhand eigener objektiver Kriterien (Kap. 3.1.2.), um gezielt Literatur mit Untersuchungen von ASE bei MS zu identifizieren.

Die Untersuchung von humanen protein-kodierenden Isoformen wurde unter anderem als Auswahlkriterium festgelegt. Damit wurden Arbeiten, in denen Transkriptisoformen in Tiermodellen, unter anderem mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE), untersucht wurden, nicht eingeschlossen. Die Induktion der EAE als Korrelat zu MS in Mäusen oder Ratten ist ein in der MS-Forschung etabliertes Tiermodell [146, 147]. In einer Studie von Tham *et al.* wurden die Expressionslevel von Transkriptisoformen des VEGFA-Gens im Rückenmark von Ratten mit EAE bestimmt [148]. Für drei alternativ gespleißte mRNA-Isoformen wurden dabei signifikant niedrigere Expressionslevel bei EAE im Vergleich zu Kontrollen detektiert. Die Untersuchungen von ASE in Tiermodellen mit EAE lassen sich allerdings nur bedingt auf die Erkenntnisse zum menschlichen Transkriptom übertragen. Die Gene von Mäusen sind im Genom zum Teil sehr viel anders annotiert als die entsprechenden humanen Gene. So entspricht die Exon-Intron-Struktur von Genen der Maus in der Regel nicht der entsprechenden humanen Exon-Intron-Struktur, sodass auch unterschiedliche ASE resultieren [149]. Weitere Studien sind daher notwendig, um die Erkenntnisse zur Bedeutung des alternativen Spleißens bei EAE auf den Menschen übertragen zu können.

Um einen möglichst vollständigen Überblick über den aktuellen Stand der Literatur zu ASE bei MS zu erhalten, stellte weder die Auswahl der verwendeten Labormethoden noch das verwendete humane Probenmaterial ein Ausschlusskriterium für die Studien dar. Die Entnahme von Blutzellen ist weniger invasiv für den Patienten als die Gewinnung von Liquor mittels

Lumbalpunktion und mit weniger Aufwand und Kosten für das medizinische Personal verbunden. Hierdurch lässt sich erklären, dass in 32 der 36 (Kap. 4.1., Tab. 5) eingeschlossenen Studien Blutzellen für die Bestimmung von ASE bei MS untersucht wurden. Da der Entzündungsprozess bei MS jedoch im ZNS stattfindet, ist eine Korrelation der Inflammation und Neurodegeneration mit MS-spezifischen ASE in ZNS-Gewebe oder Liquor denkbar. Im Liquor befindet sich jedoch nur ein geringer Anteil an Zellen. Die geringe Zellzahl im Liquor und die höhere Invasivität der Liquorpunktion im Vergleich zur Blutentnahme könnten eine Erklärung dafür sein, dass Liquor sich bisher nicht als Probenmaterial für die Analyse von ASE etabliert hat. Durch die rasche Entwicklung und ständige Verbesserung von Analysemethoden in den letzten Jahren ist jedoch inzwischen ein sensitiver Nachweis selbst von kleinsten RNA- oder Proteinmengen möglich. Zu diesen neuesten Methoden zählen die digitale PCR für mRNA und die Simoa®-Technologie für Proteine [150, 151]. Erhöhte Level von NFL im Liquor von MS-Patienten werden als molekularer Biomarker für einen progressiveren Krankheitsverlauf diskutiert [58, 152]. In einer Studie von 2019 wurde die Korrelation zwischen NFL-Leveln im Blut, die mithilfe der Simoa®-Methode gemessen wurden, und dem klinischen Verlauf der Patienten (z.B. Schubrate, Läsionen im MRT) gezeigt [62]. Durch den technischen Fortschritt der Analysemethoden könnten in weiteren Studien nicht nur neue MS-spezifische ASE im Liquor identifiziert werden, sondern auch Korrelationen von molekularen Biomarkern im Blut und im Liquor hergestellt werden.

In den 36 als relevant identifizierten Studien zu ASE bei MS wurden verschiedene RNA- und Proteinisoformen gemessen, die durch alternatives Spleißen oder die Verwendung alternativer Transkriptionsstarts und -enden entstehen. Auch bezüglich der in den Studien untersuchten Moleküle wurden keine Einschränkungen gemacht. Somit wurden Studien mit eingeschlossen, in denen Proteinisoformen, z.B. mittels ELISA, bestimmt wurden. Mit den bisherigen Methoden zur Bestimmung von differentiell exprimierten Proteinisoformen können nur wenige Proteine quantifiziert werden und es ist somit aktuell nicht möglich, anders als bei der Quantifizierung des Transkriptoms mit Microarrays und NGS, das gesamte Proteom zu quantifizieren [74]. Das Erforschen von kausalen Zusammenhängen zwischen bestimmten genetischen Varianten und deren Auswirkung auf das alternative

Spleißen kann mühsam sein. Deshalb wurden neue Analysemethoden entwickelt, mit denen große Mengen an RNA-Molekülen gleichzeitig ausgewertet werden können [153]. In weitergehenden Untersuchungen konnten auch neuere Analysemethoden basierend auf der Massenspektrometrie zur Auswertung von Proteomsignaturen hinzugezogen werden, um die Auswirkungen von alternativen Spleißvarianten auf die Level der Proteinisoformen besser zu charakterisieren [154, 155].

Die systematische Literaturrecherche ergab insgesamt 20 Studien in denen ASE in Abhängigkeit von bestimmten Genotypen untersucht wurden (Kap. 4.1., Tab. 5). Die Validierung in Transkriptomdaten von RRMS-Patienten und gesunden Kontrollen wurde hingegen unabhängig vom Genotyp für die einzelnen Gene durchgeführt (Kap. 4.3.). In weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe Neuroimmunologie ist ein bioinformatisches *mapping* von MS-assoziierten SNPs und ASE geplant. Dabei sollen auch die Transkriptomdaten von MS-Patienten und gesunden Kontrollen zur Identifikation von bisher unbekanntem Allel-spezifischen ASE genutzt werden.

5.3. Potentielle Bedeutung von Spleißisoformen in der MS-Diagnostik

Durch eine autoimmune Reaktion kommt es bei MS zu einer Entzündungsreaktion im ZNS, die mit einer Schädigung der Axone einhergeht [1, 156]. Dadurch lässt sich erklären, dass die meisten der in dieser systematischen Übersichtsarbeit erfassten Artikel Gene untersuchten, deren Genprodukte an inflammatorischen Prozessen oder am Aufbau der Myelinscheiden beteiligt sind. Myelinscheiden bestehen zu 70% aus Lipiden und zu 30% aus Proteinen. Der Proteinanteil wird unter anderem von den Genen MOG, MBP und PLP kodiert. MOG wird als potentielles Autoantigen bei MS diskutiert und kann in unterschiedlichen Isoformen vorliegen, die durch alternatives Spleißen entstehen. In zwei der in dieser systematischen Übersichtsarbeit eingeschlossenen Studien wurden ASE mit verschiedenen MOG-Proteinisoformen in humanem post-mortalem Hirngewebe assoziiert [131, 125]. Da MOG-Spleißvarianten als potentielle Biomarker bei MS denkbar sind,

können weiterführende Studien mit Untersuchungen in Probenmaterialien wie Blut oder Liquor von MS-Patienten potentielle Biomarker zur Diagnosestellung oder für das Therapiemonitoring bei MS identifizieren. Der Fokus einiger Forscher liegt bisher auf der Identifikation von SNPs mit Assoziation zu MS und dem Einfluss von SNPs auf das alternative Spleißen in humanen protein-kodierenden Genen liegt [24, 157]. Weitere Studien sind notwendig, um die Mechanismen und Varianten des alternativen Spleißens speziell bei MS näher zu beleuchten.

Von den 27 in den 36 eingeschlossenen Studien untersuchten Genen wurden 18 Gene bisher in nur einer Studie untersucht. Das derzeit am häufigsten untersuchte Gen ist der Interleukin 7 Rezeptor (IL7R), der unter anderem eine Rolle für die Proliferation und Differenzierung von humanen T-Zellen spielt [158]. Das Exon 6 des IL7R-Gens kodiert die Transmembrandomäne des Rezeptors und ein *skipping* dieses Exons führt zu einem Verlust dieser Domäne und folglich zu einer löslichen Form des Rezeptors. Das MS-Risikoallel C des SNP rs6897932 im Exon 6 wurde von Gregory *et al.* mit einem erhöhten Exon 6 *skipping* assoziiert [132]. Weitere GWAS mit Kohorten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und primär biliärer Cholangitis konnten den SNP rs6897932 ebenfalls mit der jeweiligen Erkrankung assoziieren [159, 160]. Nicht nur für das IL7R-Gen, sondern auch für weitere der bei MS untersuchten Gene, konnten in GWAS zu anderen Erkrankungen Assoziationen hergestellt werden. So zeigten genetische Varianten des GSDMB-Gens eine Assoziation mit der Suszeptibilität für rheumatoide Arthritis und Colitis ulcerosa [161, 162]. Darüber hinaus wurden genetische Varianten in den Genen SP140 und TNFRSF1A als Risikofaktoren für Morbus Crohn und Morbus Bechterew (Synonym: Spondylitis ankylosans) in Betracht gezogen [163, 164]. All diese Erkrankungen werden genau wie die MS zu den immunvermittelten Erkrankungen gezählt. Dies legt die Vermutung nahe, dass bestimmte genetische Merkmale und daraus resultierende ASE gehäuft bei autoimmunen Erkrankungen auftreten. Zukünftige Studien können möglicherweise die kausalen Risikovarianten für solche Erkrankungen identifizieren und die biologische Konsequenz dieser spezifischen Varianten, zum Beispiel ASE, aufklären. Durch die Identifikation von Risikoallelen, die die Suszeptibilität von MS durch ein individuell verändertes alternatives Spleißmuster erhöhen, kann die personalisierte

Medizin im Hinblick auf MS potentiell vorangetrieben werden [165]. Es sind jedoch weitere Studien erforderlich, um das Verständnis zum Auftreten von ASE sowie deren Einfluss auf den Verlauf, die Krankheitsaktivität und die Wirkung immunmodulatorischer Behandlungen bei MS zu erweitern.

Die Variation von regulatorischen Spleißelementen in Abhängigkeit vom Genotyp spielt eine entscheidende Rolle für die individuellen Unterschiede im alternativen Spleißmuster und kann potentiell das Auftreten und den Verlauf von Erkrankungen beeinflussen. Verschiedene bioinformatische Ansätze wurden bereits entwickelt, um den Einfluss solcher regulatorischen Elemente vorherzusagen [82, 166, 167]. *Splicing reporter* Minigenassays können verwendet werden, um die Auswirkungen genetischer Polymorphismen und Kofaktoren auf die Spleißmaschinerie in Zellkulturen zu bestimmen [84]. Die Arbeitsgruppe von Cardamone *et al.* klonierte beispielsweise das Exon 6 des IL7R-Gens und das Exon 7 des SP140-Gens mit verschiedenen SNP-Allelen und den jeweiligen angrenzenden intronischen Sequenzen in Expressionsvektoren von *splicing reporter* Minigenen [105]. Sie verwendeten außerdem Vektoren für die Überexpression von MALAT1, einer langen nicht-kodierenden RNA (engl. *long non-coding* RNA, lncRNA), für die ein Einfluss auf das alternative pre-mRNA Spleißen beschrieben wurde [141]. Die Expressionsvektoren wurden in eine humane Zelllinie (HEK293) transfiziert. Die anschließende PCR-Analyse zeigte, dass eine Überexpression von MALAT1 unabhängig vom Genotyp das *skipping* des Exons 6 der IL7R-mRNA und das *skipping* des Exons 7 der SP140-mRNA signifikant erhöhte [105]. Die aktuelle Forschung zu ASE bei MS steht noch am Anfang, um durch die Analyse von Varianten in regulatorischen Spleißelementen, die das alternative Spleißmuster beeinflussen, und den daraus resultierenden Transkriptisoformen neue pathomechanistische Erkenntnisse zu gewinnen.

Die systematische Literaturrecherche ergab, dass in nur 3 der insgesamt 36 Studien ASE von MS-Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen verglichen wurden [129, 140, 136]. In allen drei Studien wurden RRMS-Patienten mit Patienten mit einer anderen MS-Verlaufsform, wie PPMS oder SPMS, und gesunden Kontrollen verglichen. McKay *et al.* bestimmte beispielsweise das Verhältnis von der löslichen zur Gesamtlängenvariante des

IL7R mRNA-Transkripts in Blutzellen von Patienten mit PPMS und RRMS [129]. Die lösliche mRNA-Isoform vom IL7R zeigte eine signifikant erhöhte Expression in Blutzellen von PPMS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen aber keinen signifikanten Unterschied zwischen PPMS- und RRMS-Patienten. In einer Studie von Koch *et al.* wurde die differentielle Genexpression in Microarraydaten zu Blutzellen von jeweils 12 Patienten mit PPMS und RRMS untersucht [168]. Insgesamt konnte für 84 Gene eine signifikant unterschiedliche Genexpression zwischen den beiden MS-Verlaufsformen detektiert werden und für 19 dieser 84 Gene wurde in der bisherigen Literatur eine differentielle Genexpression bei MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen beschrieben. Es werden weitere Untersuchungen notwendig sein, um den Einfluss von ASE auf die individuelle Genexpression bei verschiedenen MS-Verlaufsformen näher zu beleuchten.

5.4. Spleißisoformen als Biomarker für Therapiemonitoring und Prognose

In der MS-Forschung spielt die Identifikation geeigneter Biomarker nicht nur für die Diagnostik, sondern auch als Indikator für den zukünftigen Krankheitsverlauf und den Therapieerfolg eine Rolle [169, 170]. In 7 der insgesamt 36 in dieser systematischen Übersichtsarbeit eingeschlossenen Studien wurden die Expressionslevel von ASE MS-Patienten mit und ohne verlaufsmulierende Therapie bestimmt (Kap. 4.2.2.). Individuell veränderte Expressionsniveaus von alternativ gespleißten mRNA-Isoformen sind daher nicht nur für die Diagnostik der MS von Interesse, sondern auch für das Monitoring therapeutischer Interventionen bei MS.

Da einige DMD den Krankheitsverlauf durch Interaktion mit verschiedenen Oberflächenrezeptoren modulieren, ist es naheliegend, dass eine individuelle Expression dieser Rezeptoren das Ansprechen auf diese Therapien beeinflussen kann. Es wurde gezeigt, dass die Expressionslevel von löslichem TNFRSF1A in Serumproben von MS-Patienten unter Therapie mit Glatirameracetat im Vergleich zu MS-Patienten ohne immunmodulierende Therapie signifikant verringert sind [121]. Gilli *et al.* zeigten, dass

Veränderungen im Expressionslevel von IFNAR2-Transkriptisoformen in PBMC von MS-Patienten ein Indikator für die biologische Reaktion auf die IFN- β -Therapie sind [128]. Die Arbeitsgruppe McKay *et al.* bestimmte das Verhältnis von membrangebundener zu löslicher IL7R Isoform in mit IFN- β stimulierten myeloiden Zellen aus dem Blut von MS-Patienten und gesunden Kontrollen abhängig vom Genotyp [120]. Es wurde hierbei eine signifikant Genotyp-abhängige Expression der löslichen Rezeptorisoform für zwei genetische Varianten nachgewiesen. In einer Studie von Bedri *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Expressionslevel des löslichen IL7R in Abhängigkeit von der immunmodulatorischen Therapie unterschiedlich hoch sind bei Patienten mit aktiver RRMS [171]. Für homozygote Träger des C-Allels vom SNP rs6897932 konnte eine erhöhte Expression der löslichen IL7R Isoform nachgewiesen werden. In Plasmaproben von RRMS-Patienten beobachteten sie unter Natalizumab-Therapie geringere Konzentrationen des löslichen IL7R-Proteins, während die anschließende Umstellung auf eine Fingolimod-Therapie zu erhöhten Konzentrationen führte [171].

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Funktion der löslichen Interleukinrezeptoren noch nicht eindeutig geklärt ist, aber dass eine antagonistische Wirkung zu membranständigen Rezeptoren denkbar ist [172]. Es wird vermutet, dass der lösliche IL7R mit dem membranständigen Rezeptor konkurriert und dadurch zu einer erhöhten Bioaktivität von IL7 und damit autoimmune Geschehen begünstigt [173]. In den bisherigen Studien, in denen der Einfluss von DMD auf die differentielle Expression von verschiedenen Spleißisoformen bei MS untersucht wurde, wurde der Einfluss bei der Behandlung mit IFN- β untersucht. Für neuere DMD wie Cladribin, welches zu einer erhöhten Expression von Kinasen bei MS-Patienten führt, existieren bisher keine Studien, in denen der Einfluss neuerer DMD auf die Expression von Spleißisoformen bei MS-Patienten untersucht wurde. Zukünftige Studien, in denen ASE bei MS-Patienten für verschiedene DMDs untersucht werden, können sowohl den Einfluss von ASE auf die Expression differentiell exprimierter Spleißisoformen als auch den Einfluss von alternativen Spleißisoformen auf das Ansprechen von Therapien bei MS-Patienten weiter aufklären.

5.5. Bedeutung von ASE bei *non-coding* RNA-Molekülen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf protein-kodierenden Isoformen. Ein festgelegtes Kriterium für die Auswahl der Literatur war die Untersuchung von mindestens zwei verschiedenen humanen protein-kodierenden Isoformen. Nicht-protein-kodierende RNA-Moleküle tragen jedoch ebenfalls zur Komplexität des humanen Transkriptoms bei, obwohl ihre Regulation und Prozessierung während des alternativen Spleißens und ihre Funktion bisher nicht ausreichend erforscht wurden.

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Introns nach dem Spleißen abgebaut werden und demnach keine direkte Funktion erfüllen. Allerdings zeigten Studien der letzten Jahre, dass intronische Sequenzen nach dem Spleißvorgang zu zahlreichen nicht-kodierenden RNA-Sequenzen weiterverarbeitet werden [174, 175]. Einige intronische Regionen werden zum Beispiel zu zirkulären RNA-Abschnitten, langen nicht-kodierenden RNA-Molekülen oder verschiedenen Typen von kleinen RNA-Molekülen prozessiert. Die Funktion dieser aus nicht-kodierenden Bereichen entstehenden Produkte ist weitgehend unklar. Ein Phänomen, welches möglicherweise das alternative Spleißen beeinflusst, ist das *backsplicing* unreifer RNA-Moleküle [176]. Beim *backsplicing* werden Exons während des Spleißens mit Hilfe der Spleißosomen zwischen der 5'Spleißstelle und der 3'Spleißstelle miteinander verbunden, sodass zirkuläre RNA-Moleküle entstehen. Eine veränderte Regulation dieser zirkulären RNA-Moleküle wurde in Blutzellen von MS-Patienten untersucht. Cardamone *et al.* konnten in PBMC von RRMS-Patienten im Vergleich zu Kontrollen ein signifikant höheres Expressionslevel von zirkulären RNA-Molekülen, die aus den Exons 4 und 5 des GSDMB-Transkripts bestehen, feststellen [109]. Darüber hinaus untersuchte die Arbeitsgruppe von Iparraguirre *et al.* in einer Microarrayanalyse Vollblutproben und konnte 406 zirkuläre RNA-Moleküle mit differentieller Expression bei MS-Patienten detektieren [174]. Zirkuläre RNA-Moleküle sind aufgrund ihrer schleifenförmigen Struktur relativ stabil gegenüber dem Abbau durch RNasen. Durch ihre Stabilität eignet sich der Nachweis von zirkulärer RNA potentiell sehr gut als molekularer Biomarker. Der Nachweis einiger zirkulärer RNA-Moleküle konnte bereits mit neurologischen Erkrankungen, wie Alzheimer oder Parkinson, assoziiert werden [177]. Validierungsexperimente

sind notwendig, um zirkuläre RNA-Moleküle als spezifische und sensitive Biomarker bei MS identifizieren zu können.

Ein weiteres Beispiel für nicht-kodierende RNA sind retrovirale Transkripte. Segmente von humanen endogenen Retroviren (HERV) wurden ungefähr vor 30 Millionen Jahren in das menschliche Genom integriert [178]. Der intakte HERV Provirus besteht aus zwei DNA-Wiederholungseinheiten (engl. *long terminal repeat*), welche die viralen Gene *gag*, *pol*, *pro* und *env* flankieren [179]. Die humanen endogenen Retroviren werden in verschiedene Familien unterteilt und für einige dieser Untergruppen wurden alternative Spleißvarianten für das *envelope* Gen detektiert: Christensen *et al.* untersuchte alternative Spleißvarianten der HERV-H Untergruppe in RNA aus Blutzellen von MS-Patienten und Kontrollen [180]. Bei 40% der MS-Patienten wurden dabei zwei unterschiedlich lange HERV-H *envelope* Isoformen (850 und 950 Basenpaare) nachgewiesen, welche nur in 10% der Kontrollen gemeinsam auftraten. Seit Jahren wird ein Zusammenhang zwischen retroviralen Sequenzen und MS diskutiert [181], aber die Funktion dieser Transkripte ist bisher nicht ausreichend verstanden. Weitere Untersuchungen sind daher notwendig, um sowohl die Funktion der retroviralen Transkripte im menschlichen Genom, als auch die Auswirkungen von alternativen Spleißvarianten dieser Transkripte näher zu beleuchten.

5.6. Überprüfung von alternativen Spleißereignissen in Transkriptomdaten

Für die Untersuchung von ASE in Transkriptomdaten stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Eine Genexpressionsanalyse mit HTA 2.0 Microarrays und Illumina 2000 RNA-seq zeigte, dass beide Methoden verlässlich ASE nachweisen können aber das moderne Microarrays aktuell der RNA-Sequenzierung bei der Analyse von Exons und Exon-Exon-Grenzen überlegen sind [182]. Verschiedene bioinformatische Softwaremethoden bieten die Möglichkeit ASE zu identifizieren und visualisieren. In älteren Versionen der TAC Software wurde der AltAnalyze-Algorithmus verwendet [183]. In der neueren TAC 4.0.1 Software wurde der EventPointer-Algorithmus zur Identifikation von ASE integriert [104]. Die Eventpointer Software bietet den Vorteil, dass die Art des ASE (z.B. Exon *skipping*) identifiziert wird, Exons und Exon-Exon-Grenzen analysiert werden und die Laufzeit reduziert ist. Durch die stetige Entwicklung bioinformatischer Algorithmen können ASE mithilfe von verschiedenen Softwaremethoden immer präziser ausgewertet werden.

Die Expression der bisher in der Literatur untersuchten ASE wurde in HTA 2.0 Microarraydatensätzen von MS-Patienten der Rostocker Kohorte und gesunden Kontrollen analysiert. Der Datensatz von MS-Patienten wurde von anderen Doktoranden und Doktorandinnen der Arbeitsgruppe Neuroimmunologie (Leiter: Prof. Dr. med. Uwe K. Zettl) der Universitätsmedizin bereits vielfach publiziert, jedoch wurden bisher die Expressionslevel von Genen untersucht und nicht die Expressionslevel einzelner Exons [98-101]. In der vorliegenden Microarray-basierten Validierung konnten für 19 der insgesamt 27 in der Literatur untersuchten Gene die entsprechenden ASE mit statistischer Signifikanz bestätigt werden (Kap. 4.3.). Die Transkriptomdatensätze zu MS-Patienten der Rostocker Kohorte und gesunden Kontrollen wurden jedoch von verschiedenen Laboren erhoben, sodass unterschiedliche Laborschritte bei der Verwendung der HTA 2.0 Microarrays nicht ausgeschlossen werden können. Zudem existierten bei den gesunden Kontrollen keine Transkriptomdaten für die einzelnen Immunzellpopulationen (CD4+, CD8+, CD14+, CD19+ und CD56+). Systematische Expressionsunterschiede durch die Verwendung unterschiedlicher Protokolle und Blutproben (PBMC, Vollblut) werden bei der

Analyse auf ASE durch eine Datennormalisierung in der TAC 4.0.1 Software weitgehend ausgeglichen. Weitere Analysen von gleichen Blutzellpopulationen von MS-Patienten und gesunden Kontrollen, die in dem gleichen Labor durchgeführt werden, könnten dennoch einen exakteren Aufschluss über differentielle Spleißsignaturen in verschiedenen Blutzellpopulationen liefern.

Eine immunitypspezifische Untersuchung von ASE durch RNA-Sequenzierung und Validierung in Microarraydaten zeigte, dass in B-Zellen (CD19+) und T-Helferzellen (CD4+) 60% der Gene mit alternativ gespleißten Isoformen exprimiert werden [184]. Bei der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analyse mit Transkriptomdaten von MS-Patienten und gesunden Kontrollen konnten für verschiedene Blutzellpopulationen Unterschiede in der Genexpression und beim alternativen Spleißen gezeigt werden (Kap. 4.3.). Zur Spezifizierung, der durch alternatives Spleißen entstehenden Heterogenität zwischen individuellen Zellen, können neue Transkriptom-Analysemethoden, wie *single-cell RNA-Sequencing*, eingesetzt werden [185].

Während mit bisherigen Technologien zur RNA-Sequenzierung *Reads* von bis zu 300 Basenpaaren durchgeführt werden konnten, ermöglichen neueste Methoden *Reads* von mehreren 1.000 Basenpaaren [186]. Bei der Sequenzierung basierend auf kurzen RNA-Sequenzen können Informationen zur Kombination von verschiedenen Exon-Übergängen in einzelnen Transkripten fehlen. Mit Hilfe der neueren Methoden zur RNA-Sequenzierung können diese Informationen vervollständigt werden. Bei der Sequenzierung längerer RNA-Sequenzen kommt es im Vergleich zur Sequenzierung kürzerer RNA-Sequenzen zu einer erhöhten Fehlerrate, die durch bioinformatische Lösungen korrigiert werden muss [187]. Perspektivisch können neuere RNA-Sequenzierungsmethoden bisher unbekannte Informationen zu Exon-Übergängen in langen Transkriptisoformen bieten.

Die Microarraydatenanalyse zeigte, dass moderne Technologien und bioinformatische Algorithmen eine umfassende Detektion von ASE ermöglichen [104, 188]. Studien, in denen humane Transkriptomdaten untersucht wurden, ermöglichten die Identifizierung genetischer Varianten, die das alternative Spleißen beeinflussen [144, 189]. Es gibt jedoch noch einige Unklarheiten: So ist aufgrund der Allelvielfalt der MHC-Gene der Nachweis von kausal bei

Erkrankungen beteiligten genetischen Varianten im MHC-Genlocus grundsätzlich schwierig, allerdings konnten bereits einige MHC-Risikoallele für verschiedene autoimmune und infektiöse Erkrankungen beschrieben werden [190]. Aktuelle Untersuchungen ergaben ein signifikant häufigeres alternatives Spleißen von MHC-Transkripte im Vergleich zu allen anderen Genen [191]. Allerdings sind die Auswirkungen der RNA-Prozessierung krankheitsassoziierter MHC-Gene im Bezug auf die Diversität von Transkriptisoformen weitgehend unerforscht. Weiterführende Analysen von ASE in Abhängigkeit von MHC-Risikoallelen könnten bisher unbekannte Pathomechanismen aufdecken.

5.7. Ausblick

Zusammenfassend gibt diese systematische Übersichtsarbeit einen Überblick über bisher veröffentlichte Forschungsergebnisse zu Expressionsunterschieden von alternativ gespleißten Gen-Isoformen bei MS-Patienten. Insgesamt ergab die systematische Literaturrecherche, dass in den letzten zwei Jahrzehnten 36 Studien zu diesem Thema publiziert wurden, mit einer steigenden Tendenz in den letzten 10 Jahren. Die meisten Studien verwendeten PCR-basierte Analysemethoden, um die Expressionslevel ausgewählter Gene zu messen. Es wurden allerdings auch erste Versuche unternommen, um Transkriptomdaten basierend auf Microarrays und RNA-Sequenzierungsmethoden bezüglich MS-spezifischer alternativer Spleißvarianten auszuwerten. Die in der Literatur beschriebenen ASE für 27 Gene wurden in HTA 2.0 Microarraydatensätzen von MS-Patienten und gesunden Kontrollen überprüft.

Die vorliegende systematische Literaturrecherche und die Reevaluation von bisher in der Literatur beschriebenen ASE in Transkriptomdaten von MS-Patienten und Kontrollen bietet die Grundlage, um in weiteren Analysen tiefere Einblicke zu veränderten Spleißmechanismen bei MS zu erlangen. In einem weiteren Vorhaben der Arbeitsgruppe der Sektion Neuroimmunologie der Klinik und Poliklinik für Neurologie (Universitätsmedizin Rostock, Leitung: Prof. Zettl) sollen bisher unbekannte MS-assozierte ASE als potentielle Biomarker bei MS in Transkriptomdaten verschiedener Blutzellpopulationen von MS-Patienten und gesunden Kontrollen durch die integrative Anwendung moderner statistischer

und bioinformatischer Methoden identifiziert werden. Zusätzlich werden die am Spleißen beteiligten regulatorischen Sequenzen und RNA-bindende Proteine in Blutproben (PBMC sowie isolierte B-Zellen) von MS-Patienten und gesunden Kontrollen für die identifizierten ASE charakterisiert. Diese weiterführenden Untersuchungen werden aktuell durch die Landesgraduiertenförderung von Mecklenburg-Vorpommern und das FORUN-Programm der Universitätsmedizin Rostock gefördert.

Molekulare Biomarker werden sowohl in der MS-Diagnostik als auch für die Prognose und zur Vorhersage für den Therapieerfolg bzw. -misserfolg dringend benötigt. Die Detektion krankheitsspezifischer ASE eröffnet neue Möglichkeiten zur Identifikation spezifischer molekularer Biomarker bei komplexen Erkrankungen wie MS. Die Aufdeckung krankheitsspezifischer Spleißmuster aufgrund genetischer Risikovarianten kann aber auch Ansatzpunkte für neue Therapien bei MS aufzeigen. Diesbezüglich ist es erforderlich, dass die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der MS-assoziierten SNPs aufgeklärt werden. Durch Validierungen von ASE zum Beispiel mittels PCR können in Proben von MS-Patienten und gesunden Kontrollen potentielle molekulare Biomarker bei MS überprüft werden. Zusätzlich können in weiterführenden Studien die zelltypspezifischen Regulationsmechanismen des alternativen Spleißens bei MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen näher beleuchtet werden. Damit können Voraussetzungen geschaffen werden, um neue Einblicke in die Immunpathologie der MS zu gewinnen und dieses Wissen im klinischen Alltag in Bezug auf Biomarker für die Diagnose und Prognose von MS sowie für das therapeutische Monitoring anzuwenden. Erste Schritte zur Zusammenfassung und Validierung bisher in der Literatur beschriebener ASE sind in dieser Arbeit unternommen und im Juli 2019 in der Zeitschrift *Autoimmunity Reviews* publiziert worden [192].

6. Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die häufig im jungen Erwachsenenalter beginnt. Die Ätiologie ist bisher ungeklärt, wobei ein genetischer Zusammenhang sowie prädisponierende Umweltfaktoren und Lebensstile mit der Pathogenese vielfach aufgezeigt wurden.

Das alternative Spleißen ist ein physiologischer Prozess bei der Transkription von RNA, der nahezu alle humanen Gene betrifft und zur Diversität der Genprodukte beiträgt. Durch eine differentielle Expression spezifischer Transkript- bzw. Proteinisoformen bei komplexen Erkrankungen können potentielle molekulare Biomarker abgeleitet werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die bereits existierenden Arbeiten, mit Untersuchungen von alternativen Spleißereignissen (ASE) bei MS, systematisch zu analysieren und den Inhalt dieser Arbeiten zusammenzufassen. Zusätzlich wurden die in der Literatur bereits untersuchten ASE in Transkriptomdatensätzen von MS-Patienten einer Rostocker Kohorte und gesunden Kontrollen überprüft.

Die Durchführung der systematischen Literaturrecherche erfolgte mithilfe der PubMed-Datenbank und wurde durch weitere Arbeiten aus den Quellenangaben der identifizierten Artikel ergänzt. In die qualitative Auswertung wurden lediglich Originalarbeiten in englischer Sprache mit Bezug zu MS, deren Autoren die Level von mindestens zwei verschiedenen Isoformen humaner proteinkodierender Gene verglichen haben, einbezogen. Es erfolgte die Zusammenfassung und der Vergleich der Ergebnisse der als relevant identifizierten Studien anhand objektiver Kriterien. Anschließend wurden die in der Literatur beschriebenen ASE in einer Art Fall-Kontrollstudie in Transkriptomdatensätzen untersucht. Verglichen wurden dabei HTA 2.0 Microarraydatensätze verschiedener Blutzellpopulationen (CD4+, CD8+, CD14+, CD19+ und CD56+) von MS-Patienten und Blutproben (Vollblut, PBMC) von gesunden Kontrollen unter Verwendung des EventPointer-Algorithmus.

Die systematische Literaturrecherche ergab insgesamt 160 Studien zum Thema alternatives Spleißen bei MS. Von diesen 160 Artikeln wurden anhand der objektiven Auswahlkriterien 36 Artikel aus den letzten 2 Jahrzehnten in die systematische Auswertung eingeschlossen. In den meisten Studien wurden Blutproben untersucht (n=32) und am häufigsten wurden PCR-basierte Verfahren (n=27) für die Expressionslevelanalyse verwendet. Zwei der 36 Studien verwendeten bioinformatische Methoden zur Analyse von ASE in Transkriptomdaten auf der Basis von RNA-Sequenzierungsverfahren bzw. Microarrays. Insgesamt wurden in den 36 Artikeln ASE für 27 verschiedene Gene untersucht. Neun dieser 27 Gene wurden in mehr als einer Studie untersucht (CD40, CFLAR, FOXP3, IFNAR2, IL7R, MOG, PTPRC, SP140 und TNFRSF1A).

Die Reevaluation der bisher in der Literatur untersuchten ASE in Transkriptomdatensätzen von MS-Patienten und gesunden Kontrollen bestätigte ein differentielles alternatives Spleißen der entsprechenden pre-mRNA von 19 der 27 bisher untersuchten Gene. Die konsistent in allen 20 Vergleichen signifikant differentielle Expression von Transkriptisoformen, die aus einem ASE resultieren, zeigte sich für sieben der insgesamt 27 untersuchten Gene. Für die Transkriptisoformen einiger Gene (z.B. CTLA4, IL7R, NFATC1) konnte ein zelltypspezifisches alternatives Spleißen nachgewiesen werden.

Eine veränderte RNA-Prozessierung von Genen, die an verschiedenen immunologischen Prozessen beteiligt sind, wurde in Bezug auf MS bereits vielfach beschrieben. Die Analyse von Expressionsmustern auf Ebene der Exons wird durch die fortschreitende Entwicklung von Technologien zur Erhebung von Transkriptomdaten unterstützt. Insbesondere die Untersuchung von Genen, die in MS-assoziierten genetischen Regionen kodiert sind, kann wichtige Informationen für das Verständnis der Pathogenese der Krankheit liefern und zur Identifizierung neuer Biomarker für die Diagnosestellung oder das Monitoring von Therapien bei MS beitragen.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S et al. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Nov 8;4(1): 43. doi: 10.1038/s41572-018-0041-4.
- [2] Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2018 Jan 11;378(2): 169-180. doi: 10.1056/NEJMra1401483.
- [3] Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*. 2014 Sep 9;83(11): 1022-1024. doi: 10.1212/WNL.0000000000000768.
- [4] Goodin DS. The epidemiology of multiple sclerosis: insights to a causal cascade. *Handb Clin Neurol*. 2016;138: 173-206.
- [5] Flachenecker P, Zettl UK. Epidemiologie. In: Multiple Sklerose. Schmidt RM, Hoffmann FA, Faiss JH, Köhler W, Zettl UK. München: Urban & Fischer Verlag; 2017. p. 11-18.
- [6] Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2018 Apr 21;391(10130): 1622-1636. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30481-1.
- [7] Wade BJ. Spatial Analysis of Global Prevalence of Multiple Sclerosis Suggests Need for an Updated Prevalence Scale. *Mult Scler Int*. 2014; 2014: 124578. doi: 10.1155/2014/124578.
- [8] Petersen G, Wittmann R, Arndt V, Göppfarth D. Epidemiologie der Multiplen Sklerose in Deutschland. Regionale Unterschiede und Versorgungsstruktur in Abrechnungsdaten der gesetzlichen Krankenversicherung. *Nervenarzt*. 2014 Aug;85(8): 990-998.
- [9] Holstiege J, Steffen A, Goffrier B, Bätzing J. Epidemiologie der Multiplen Sklerose - eine populationsbasierte deutschlandweite Studie. *Der Versorgungsatlas*. 2017 Dec 7 [zitiert 2020 March 8]. Verfügbar auf: <https://www.versorgungsatlas.de/themen/alle-analysen-nach-datum-sortiert/?tab=6&uid=86&cHash=a6347645c1ead510efa6be4d23b092b5>
- [10] Höer A, Schiffhorst G, Zimmermann A, Fischaleck J, Gehrman L, Ahrens H et al. Multiple sclerosis in Germany: data analysis of administrative prevalence and healthcare delivery in the statutory health system. *BMC Health Serv Res*. 2014 Sep 10;14: 381. doi: 10.1186/1472-6963-14-381.

- [11] Ascherio A, Munger KL. Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. *Semin Neurol*. 2016 Apr;36(2): 103-114. doi: 10.1055/s-0036-1579693.
- [12] Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2017 Jan;13(1): 25-36.
- [13] Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JP, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol*. 2015 Mar;14(3): 263-273.
- [14] Pakpoor J, Disanto G, Gerber JE, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G et al. The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: a meta-analysis. *Mult Scler*. 2013 Feb;19(2): 162-166.
- [15] Pormohammad A, Azimi T, Falah F, Faghihloo E. Relationship of human herpes virus 6 and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *J Cell Physiol*. 2018 Apr;233(4): 2850-2862. doi: 10.1002/jcp.26000.
- [16] Conradi S, Malzahn U, Schröter F, Paul F, Quill S, Spruth E et al. Environmental factors in early childhood are associated with multiple sclerosis: a case-control study. *BMC Neurol*. 2011 Oct 6;11: 123.
- [17] Hedström AK. Smoking and its interaction with genetics in MS etiology. *Mult Scler*. 2019 Feb;25(2): 180-186. doi: 10.1177/1352458518801727.
- [18] Briggs FB, Gunzler DD, Ontaneda D, Marrie RA. Smokers with MS have greater decrements in quality of life and disability than non-smokers. *Mult Scler*. 2017 Nov;23(13): 1772-1781. doi: 10.1177/1352458516685169.
- [19] Paz-Ballesteros WC, Monterrubio-Flores EA, de Jesús Flores-Rivera J, Corona-Vázquez T, Hernández-Girón C. Cigarette Smoking, Alcohol Consumption and Overweight in Multiple Sclerosis: Disability Progression. *Arch Med Res*. 2017 Jan;48(1): 113-120.
- [20] Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Mult Scler Relat Disord*. 2017 May;14: 35-45.
- [21] Westerlind H, Ramanujam R, Uvehag D, Kuja-Halkola R, Boman M, Bottai M et al. Modest familial risks for multiple sclerosis: a registry-based study of the population of Sweden. *Brain*. 2014 Mar;137(Pt 3): 770-778.

- [22] O'Gorman C, Lin R, Stankovich J, Broadley SA. Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. *Neuroepidemiology*. 2013;40(1): 1-12.
- [23] Patsopoulos NA. Genetics of Multiple Sclerosis: An Overview and New Directions. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018 Jul 2;8(7): a028951. doi: 10.1101/cshperspect.a028951.
- [24] International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. A systems biology approach uncovers cell-specific gene regulatory effects of genetic associations in multiple sclerosis. *Nat Commun*. 2019 May 20;10(1): 2236. doi: 10.1038/s41467-019-09773-y.
- [25] International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science*. 2019 Sep 27;365(6460): eaav7188. doi: 10.1126/science.aav7188.
- [26] James T, Lindén M, Morikawa H, Fernandes SJ, Ruhrmann S, Huss M et al. Impact of genetic risk loci for multiple sclerosis on expression of proximal genes in patients. *Hum Mol Genet*. 2018 Mar 1;27(5): 912-928. doi: 10.1093/hmg/ddy001.
- [27] Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain*. 1999 Dec;122(Pt 12): 2279-2295.
- [28] Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. 2009 May;132(Pt 5): 1175-1189.
- [29] Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2015 Sep 15;15(9): 545-558.
- [30] Lassmann H. Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2013 Oct 15;333(1-2): 1-4.
- [31] Reindl M, Waters P. Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in neurological disease. *Nat Rev Neurol*. 2019 Feb;15(2): 89-102. doi: 10.1038/s41582-018-0112-x.
- [32] Cobo-Calvo Á, d'Indy H, Ruiz A, Collongues N, Kremer L, Durand-Dubief F et al. Frequency of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody in multiple sclerosis: A multicenter cross-sectional study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2019 Dec 13;7(2). pii: e649. doi: 10.1212/NXI.0000000000000649.

- [33] Stuke K, Flachenecker P, Zettl UK, Elias WG, Freidel M, Haas J et al. Symptomatology of MS: results from the German MS Registry. *J Neurol.* 2009 Nov;256(11): 1932-1935.
- [34] Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology.* 2014 Jul 15;83(3): 278-286.
- [35] Flachenecker P, Zettl UK. Krankheitsverlauf und Prognose. In: *Multiple Sklerose.* Schmidt RM, Hoffmann FA, Faiss JH, Köhler W, Zettl UK. München: Urban & Fischer Verlag; 2017. p. 63-72.
- [36] Tremlett H, Yinshan Zhao, Devonshire V. Natural history of secondary-progressive multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008 Apr;14(3): 314-324.
- [37] Marcus JF, Waubant EL. Updates on Clinically Isolated Syndrome and Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis. *Neurohospitalist.* 2013 Apr;3(2): 65-80.
- [38] Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018 Feb;17(2): 162-173. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.
- [39] Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O, De Stefano N, Evangelou N, Kappos L et al. MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *Lancet Neurol.* 2016 Mar;15(3): 292-303.
- [40] Deisenhammer F, Zetterberg H, Fitzner B, Zettl UK. The Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2019 Apr 12;10: 726. doi: 10.3389/fimmu.2019.00726.
- [41] Zettl UK, Stüve O, Patejdl R. Immune-mediated CNS diseases: a review on nosological classification and clinical features. *Autoimmun Rev.* 2012 Jan;11(3): 167-173. doi: 10.1016/j.autrev.2011.05.008.
- [42] Hardmeier M, Leocani L, Fuhr P. A new role for evoked potentials in MS? Repurposing evoked potentials as biomarkers for clinical trials in MS. *Mult Scler.* 2017 Sep;23(10): 1309-1319.
- [43] Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* 1983 Nov;33(11): 1444-1452.
- [44] Rotstein D, Montalban X. Reaching an evidence-based prognosis for personalized treatment of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2019 May;15(5): 287-300. doi: 10.1038/s41582-019-0170-8.

- [45] Tintore M, Rovira À, Río J, Otero-Romero S, Arrambide G, Tur C et al. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain*. 2015 Jul;138(Pt 7): 1863-1874. doi: 10.1093/brain/awv105.
- [46] KKNMS. Qualitätshandbuch MS/NMOSD - Empfehlungen zur Therapie der Multiplen Sklerose/Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen für Ärzte. Krankheitsbezogenes Kompetenznetz Multiple Sklerose e. V. 2020 Jan [zitiert 2020 March 9]. Verfügbar auf: <https://www.kompetenznetz-multiplesklerose.de/fachinformationen/qualitaetshandbuch/>
- [47] Sloka JS, Stefanelli M. The mechanism of action of methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2005 Aug;11(4): 425-432.
- [48] Tintore M, Vidal-Jordana A, Sastre-Garriga J. Treatment of multiple sclerosis - success from bench to bedside. *Nat Rev Neurol*. 2019 Jan;15(1): 53-58. doi: 10.1038/s41582-018-0082-z.
- [49] Giovannoni G. Disease-modifying treatments for early and advanced multiple sclerosis: a new treatment paradigm. *Curr Opin Neurol*. 2018 Jun;31(3): 233-243. doi: 10.1097/WCO.0000000000000561.
- [50] Zettl UK, Hecker M, Aktas O, Wagner T, Rommer PS. Interferon β -1a and β -1b for patients with multiple sclerosis: updates to current knowledge. *Expert Rev Clin Immunol*. 2018 Feb;14(2): 137-153. doi: 10.1080/1744666X.2018.1426462.
- [51] Pelletier D, Hafler DA. Fingolimod for multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012 Jan 26;366(4): 339-347.
- [52] Jeffery DR, Rammohan KW, Hawker K, Fox E. Fingolimod: a review of its mode of action in the context of its efficacy and safety profile in relapsing forms of multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother*. 2016;16(1): 31-44. doi: 10.1586/14737175.2016.1123094.
- [53] Derfuss T, Ontaneda D, Nicholas J, Meng X, Hawker K. Relapse rates in patients with multiple sclerosis treated with fingolimod: Subgroup analyses of pooled data from three phase 3 trials. *Mult Scler Relat Disord*. 2016 Jul;8: 124-130. doi: 10.1016/j.msard.2016.05.015.
- [54] Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G et al. ORATORIO Clinical Investigators. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017 Jan 19;376(3): 209-220.

- [55] Sailer M, Lindquist S, Sickert A, Lamprecht J. Multiple Sclerosis: Neurorehabilitation and Symptomatic Treatment. *Rehabilitation (Stuttg)*. 2019 Oct;58(5): 339-350. doi: 10.1055/a-0755-1398.
- [56] Rommer PS, Sühnel A, König N, Zettl UK. Coping with multiple sclerosis-the role of social support. *Acta Neurol Scand*. 2017 Jul;136(1): 11-16.
- [57] Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Mar;69(3): 89-95.
- [58] Paul A, Comabella M, Gandhi R. Biomarkers in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019 Mar 1;9(3): a029058. doi: 10.1101/cshperspect.a029058.
- [59] Fitzner B, Hecker M, Zettl UK. Molecular biomarkers in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Autoimmun Rev*. 2015 Oct;14(10): 903-913.
- [60] Palace J, Leite MI, Nairne A, Vincent A. Interferon Beta treatment in neuromyelitis optica: increase in relapses and aquaporin 4 antibody titers. *Arch Neurol*. 2010 Aug;67(8): 1016-1017.
- [61] Bertolotto A, Capobianco M, Amato MP, Capello E, Capra R, Centonze D et al. Guidelines on the clinical use for the detection of neutralizing antibodies (NAbs) to IFN beta in multiple sclerosis therapy: report from the Italian Multiple Sclerosis Study group. *Neurol Sci*. 2014 Feb;35(2): 307-316. doi: 10.1007/s10072-013-1616-1.
- [62] Kuhle J, Kropshofer H, Haering DA, Kundu U, Meinert R, Barro C et al. Blood neurofilament light chain as a biomarker of MS disease activity and treatment response. *Neurology*. 2019 Mar 5;92(10): e1007-e1015. doi: 10.1212/WNL.0000000000007032.
- [63] Disanto G, Barro C, Benkert P, Naegelin Y, Schädelin S, Giardiello A et al. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2017 Jun;81(6): 857-870. doi: 10.1002/ana.24954.
- [64] Gaetani L, Blennow K, Calabresi P, Di Filippo M, Parnetti L, Zetterberg H. Neurofilament light chain as a biomarker in neurological disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019 Aug;90(8):870-881. doi: 10.1136/jnnp-2018-320106.
- [65] Green ED, Watson JD, Collins FS. Human Genome Project: Twenty-five years of big biology. *Nature*. 2015 Oct 1;526(7571): 29-31.

- [66] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988 Jan 29;239(4839): 487-491.
- [67] Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012 Apr 20;(62): 3923. doi: 10.3791/3923.
- [68] Wagner EM. Monitoring gene expression: quantitative real-time rt-PCR. *Methods Mol Biol*. 2013;1027: 19-45. doi: 10.1007/978-1-60327-369-5_2.
- [69] Ruijter JM, Lorenz P, Tuomi JM, Hecker M, van den Hoff MJ. Fluorescent-increase kinetics of different fluorescent reporters used for qPCR depend on monitoring chemistry, targeted sequence, type of DNA input and PCR efficiency. *Mikrochim Acta*. 2014;181(13-14): 1689-1696.
- [70] Xu W, Seok J, Mindrinos MN, Schweitzer AC, Jiang H, Wilhelmy J et al.; Inflammation and Host Response to Injury Large-Scale Collaborative Research Program. Human transcriptome array for high-throughput clinical studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 1;108(9): 3707-3712. doi: 10.1073/pnas.1019753108.
- [71] Gonzalo R, Sánchez A. Introduction to microarrays technology and data analysis. In: Jaumot J, Bedia C, Tauler R, editors. *Data analysis for omic sciences: methods and applications*. Amsterdam: Elsevier; 2018. p. 37-69.
- [72] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12): 5463-5467.
- [73] Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016 May 17;17(6): 333-351.
- [74] Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci*. 2017 Feb;55(2): 182-196. doi: 10.1093/chromsci/bmw167.
- [75] Janardhan KS, Jensen H, Clayton NP, Herbert RA. Immunohistochemistry in Investigative and Toxicologic Pathology. *Toxicol Pathol*. 2018 Jul;46(5): 488-510. doi: 10.1177/0192623318776907.
- [76] Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017 Mar;37(2): 163-176. doi: 10.3109/07388551.2015.1128876.

- [77] Kornblihtt AR, Schor IE, Alló M, Dujardin G, Petrillo E, Muñoz MJ. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 Mar;14(3): 153-165.
- [78] Lee Y, Rio DC. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu Rev Biochem.* 2015;84: 291-323. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034316.
- [79] Reyes A, Huber W. Alternative start and termination sites of transcription drive most transcript isoform differences across human tissues. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jan 25;46(2): 582-592.
- [80] Herzelt L, Ottoz DSM, Alpert T, Neugebauer KM. Splicing and transcription touch base: co-transcriptional spliceosome assembly and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Oct;18(10): 637-650. doi: 10.1038/nrm.2017.63.
- [81] Manning KS, Cooper TA. The roles of RNA processing in translating genotype to phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Feb;18(2): 102-114. doi: 10.1038/nrm.2016.139.
- [82] Abramowicz A, Gos M. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J Appl Genet.* 2019 May;60(2): 231. doi: 10.1007/s13353-019-00493-z.
- [83] Pineda JMB, Bradley RK. Most human introns are recognized via multiple and tissue-specific branchpoints. *Genes Dev.* 2018 Apr 1;32(7-8): 577-591. doi: 10.1101/gad.312058.118.
- [84] Gaildrat P, Killian A, Martins A, Tournier I, Frébourg T, Tosi M. Use of splicing reporter minigene assay to evaluate the effect on splicing of unclassified genetic variants. *Methods Mol Biol.* 2010;653: 249-257. doi: 10.1007/978-1-60761-759-4_15.
- [85] Scotti MM, Swanson MS. RNA mis-splicing in disease. *Nat Rev Genet.* 2016 Jan;17(1): 19-32.
- [86] Siegfried Z, Karni R. The role of alternative splicing in cancer drug resistance. *Curr Opin Genet Dev.* 2017 Oct 25;48: 16-21.
- [87] Matos ML, Lapyckyj L, Rosso M, Besso MJ, Mencucci MV, Briggiler CI et al. Identification of a Novel Human E-Cadherin Splice Variant and Assessment of Its Effects Upon EMT-Related Events. *J Cell Physiol.* 2017 Jun;232(6): 1368-1386.
- [88] Fletcher S, Meloni PL, Johnsen RD, Wong BL, Muntoni F, Wilton SD. Antisense suppression of donor splice site mutations in the dystrophin gene transcript. *Mol Genet Genomic Med.* 2013 Sep;1(3): 162-173.
- [89] Singh RN, Singh NN. Mechanism of Splicing Regulation of Spinal Muscular Atrophy Genes. *Adv Neurobiol.* 2018;20: 31-61. doi: 10.1007/978-3-319-89689-2_2.

- [90] Levin AA. Treating Disease at the RNA Level with Oligonucleotides. *N Engl J Med*. 2019 Jan 3;380(1): 57-70. doi: 10.1056/NEJMra1705346.
- [91] Evsyukova I, Somarelli JA, Gregory SG, Garcia-Blanco MA. Alternative splicing in multiple sclerosis and other autoimmune diseases. *RNA Biol*. 2010 Jul-Aug;7(4): 462-473.
- [92] Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JP et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *PLoS Med*. 2009 Jul 21;6(7): e1000100. doi: 10.1371/journal.pmed.1000100.
- [93] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2016 Jun 20;54: 1.30.1-1.30.33. doi: 10.1002/cpbi.5.
- [94] Bachman J. Site-directed mutagenesis. *Methods Enzymol*. 2013;529: 241-248. doi: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00019-7.
- [95] UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1): D506-D515. doi: 10.1093/nar/gky1049.
- [96] Cunningham F, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Amode MR, Armean IM et al. Ensembl 2019. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1): D745-D751. doi: 10.1093/nar/gky1113.
- [97] Haeussler M, Zweig AS, Tyner C, Speir ML, Rosenbloom KR, Raney BJ et al. The UCSC Genome Browser database: 2019 update. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1): D853-D858. doi: 10.1093/nar/gky1095.
- [98] Angerer IC, Hecker M, Koczan D, Roch L, Friess J, Rüge A et al. Transcriptome profiling of peripheral blood immune cell populations in multiple sclerosis patients before and during treatment with a sphingosine-1-phosphate receptor modulator. *CNS Neurosci Ther*. 2018 Mar;24(3): 193-201.
- [99] Roch L, Hecker M, Friess J, Angerer IC, Koczan D, Fitzner B et al. High-Resolution Expression Profiling of Peripheral Blood CD8+ Cells in Patients with Multiple Sclerosis Displays Fingolimod-Induced Immune Cell Redistribution. *Mol Neurobiol*. 2017 Sep;54(7): 5511-5525.
- [100] Friess J, Hecker M, Roch L, Koczan D, Fitzner B, Angerer IC et al. Fingolimod alters the transcriptome profile of circulating CD4+ cells in multiple sclerosis. *Sci Rep*. 2017 Feb 3;7: 42087. doi: 10.1038/srep42087.

- [101] Koczan D, Fitzner B, Zettl UK, Hecker M. Microarray data of transcriptome shifts in blood cell subsets during S1P receptor modulator therapy. *Sci Data*. 2018 Jul 24;5: 180145. doi: 10.1038/sdata.2018.145.
- [102] Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011 Feb;69(2): 292-302. doi: 10.1002/ana.22366.
- [103] Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(Database issue): D991-D995. doi: 10.1093/nar/gks1193.
- [104] Romero JP, Muniategui A, De Miguel FJ, Aramburu A, Montuenga L, Pio R et al. EventPointer: an effective identification of alternative splicing events using junction arrays. *BMC Genomics*. 2016 Jun 17;17: 467. doi: 10.1186/s12864-016-2816-x.
- [105] Cardamone G, Paraboschi EM, Soldà G, Cantoni C, Supino D, Piccio L et al. Not only cancer: the long non-coding RNA MALAT1 affects the repertoire of alternatively spliced transcripts and circular RNAs in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2019 May 1;28(9): 1414-1428. doi: 10.1093/hmg/ddy438.
- [106] Sambucci M, Gargano F, De Rosa V, De Bardi M, Picozza M, Placido R et al. FoxP3 isoforms and PD-1 expression by T regulatory cells in multiple sclerosis. *Sci Rep*. 2018 Feb 27;8(1): 3674. doi: 10.1038/s41598-018-21861-5.
- [107] Sestito C, Brevé JJP, Killestein J, Teunissen CE, Wilhelmus MMM, Drukarch B et al. Differential Expression of Tissue Transglutaminase Splice Variants in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Primary Progressive Multiple Sclerosis Patients. *Med Sci (Basel)*. 2018 Nov 27;6(4): E108. doi: 10.3390/medsci6040108.
- [108] Smets I, Fiddes B, Garcia-Perez JE, He D, Mallants K, Liao W et al. Multiple sclerosis risk variants alter expression of co-stimulatory genes in B cells. *Brain*. 2018 Mar 1;141(3): 786-796. doi: 10.1093/brain/awx372.
- [109] Cardamone G, Paraboschi EM, Rimoldi V, Duga S, Soldà G, Asselta R. The Characterization of GSDMB Splicing and Backsplicing Profiles Identifies Novel Isoforms and a Circular RNA That Are Dysregulated in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 7;18(3): E576. doi: 10.3390/ijms18030576.

- [110] Galarza-Muñoz G, Briggs FBS, Evsyukova I, Schott-Lerner G, Kennedy EM, Nyanhete T et al. Human Epistatic Interaction Controls IL7R Splicing and Increases Multiple Sclerosis Risk. *Cell*. 2017 Mar 23;169(1): 72-84. doi: 10.1016/j.cell.2017.03.007.
- [111] De Rossi P, Buggia-Prévot V, Clayton BL, Vasquez JB, van Sanford C, Andrew RJ et al. Predominant expression of Alzheimer's disease-associated BIN1 in mature oligodendrocytes and localization to white matter tracts. *Mol Neurodegener*. 2016 Aug 3;11(1): 59. doi: 10.1186/s13024-016-0124-1.
- [112] López-Gómez C, Oliver-Martos B, Pinto-Medel MJ, Suardiaz M, Reyes-Garrido V, Urbaneja P et al. TRAIL and TRAIL receptors splice variants during long-term interferon β treatment of patients with multiple sclerosis: evaluation as biomarkers for therapeutic response. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016 Feb;87(2): 130-137. doi: 10.1136/jnnp-2014-309932.
- [113] De Rosa V, Galgani M, Porcellini A, Colamatteo A, Santopaolo M, Zuchegna C et al. Glycolysis controls the induction of human regulatory T cells by modulating the expression of FOXP3 exon 2 splicing variants. *Nat Immunol*. 2015 Nov;16(11): 1174-1184.
- [114] Field J, Shahijanjan F, Schibeci S; Australia and New Zealand MS Genetics Consortium (ANZgene), Johnson L, Gresle M et al. The MS Risk Allele of CD40 Is Associated with Reduced Cell-Membrane Bound Expression in Antigen Presenting Cells: Implications for Gene Function. *PLoS One*. 2015 Jun 11;10(6): e0127080. doi: 10.1371/journal.pone.0127080.
- [115] Matesanz F, Potenciano V, Fedetz M, Ramos-Mozo P, Abad-Grau Mdel M, Karky M et al. A functional variant that affects exon-skipping and protein expression of SP140 as genetic mechanism predisposing to multiple sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2015 Oct 1;24(19): 5619-5627.
- [116] Paraboschi EM, Cardamone G, Rimoldi V, Gemmati D, Spreafico M, Duga S et al. Meta-Analysis of Multiple Sclerosis Microarray Data Reveals Dysregulation in RNA Splicing Regulatory Genes. *Int J Mol Sci*. 2015 Sep 30;16(10): 23463-23481.
- [117] Spurlock CF 3rd, Tossberg JT, Guo Y, Sriram S, Crooke PS 3rd, Aune TM. Defective structural RNA processing in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Genome Biol*. 2015 Mar 25;16: 58. doi: 10.1186/s13059-015-0629-x.
- [118] Carbone F, De Rosa V, Carrieri PB, Montella S, Bruzzese D, Porcellini A et al. Regulatory T cell proliferative potential is impaired in human autoimmune disease. *Nat Med*. 2014 Jan;20(1): 69-74.

- [119] Paraboschi EM, Rimoldi V, Soldà G, Tabaglio T, Dall'Osso C, Saba E et al. Functional variations modulating PRKCA expression and alternative splicing predispose to multiple sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2014 Dec 20;23(25): 6746-6761.
- [120] McKay FC, Hoe E, Parnell G, Gatt P, Schibeci SD, Stewart GJ et al. IL7R α expression and upregulation by IFN β in dendritic cell subsets is haplotype-dependent. *PLoS One.* 2013 Oct 16;8(10): e77508. doi: 10.1371/journal.pone.0077508.
- [121] Ottoboni L, Frohlich IY, Lee M, Healy BC, Keenan BT, Xia Z et al. Clinical relevance and functional consequences of the TNFRSF1A multiple sclerosis locus. *Neurology.* 2013 Nov 26;81(22): 1891-1899.
- [122] Gregory AP, Dendrou CA, Attfield KE, Haghikia A, Xifara DK, Butter F et al. TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis. *Nature.* 2012 Aug 23;488(7412): 508-511.
- [123] Tian Y, Apperson ML, Ander BP, Liu D, Stomova BS, Jickling GC et al. Differences in exon expression and alternatively spliced genes in blood of multiple sclerosis compared to healthy control subjects. *J Neuroimmunol.* 2011 Jan;230(1-2): 124-129.
- [124] Hoe E, McKay FC, Schibeci SD, Gandhi K, Heard RN, Stewart GJ et al. Functionally significant differences in expression of disease-associated IL-7 receptor alpha haplotypes in CD4 T cells and dendritic cells. *J Immunol.* 2010 Mar 1;184(5): 2512-2517.
- [125] Jensen CJ, Stankovich J, Butzkueven H, Oldfield BJ, Rubio JP. Common variation in the MOG gene influences transcript splicing in humans. *J Neuroimmunol.* 2010 Dec 15;229(1-2): 225-231.
- [126] Rane L, Vudattu N, Bourcier K, Granier E, Hillert J, Seyfert V et al. Alternative splicing of interleukin-7 (IL-7) and interleukin-7 receptor alpha (IL-7R α) in peripheral blood from patients with multiple sclerosis (MS). *J Neuroimmunol.* 2010 May;222(1-2): 82-86.
- [127] Uzawa A, Mori M, Hayakawa S, Masuda S, Nomura F, Kuwabara S. Expression of chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *BMC Neurol.* 2010 Nov 11;10: 113. doi: 10.1186/1471-2377-10-113.
- [128] Gilli F, Valentino P, Caldano M, Granieri L, Capobianco M, Malucchi S et al. Expression and regulation of IFN α /beta receptor in IFN β -treated patients with multiple sclerosis. *Neurology.* 2008 Dec 9;71(24): 1940-1947. doi: 10.1212/01.wnl.0000327340.50284.8d.

- [129] McKay FC, Swain LI, Schibeci SD, Rubio JP, Kilpatrick TJ, Heard RN et al. Haplotypes of the interleukin 7 receptor alpha gene are correlated with altered expression in whole blood cells in multiple sclerosis. *Genes Immun.* 2008 Jan;9(1): 1-6.
- [130] Palacios R, Comas D, Elorza J, Villoslada P. Genomic regulation of CTLA4 and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2008 Oct 15;203(1): 108-115.
- [131] Boyle LH, Traherne JA, Plotnek G, Ward R, Trowsdale J. Splice variation in the cytoplasmic domains of myelin oligodendrocyte glycoprotein affects its cellular localisation and transport. *J Neurochem.* 2007 Sep;102(6): 1853-1862.
- [132] Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A et al.; Multiple Sclerosis Genetics Group. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2007 Sep;39(9): 1083-1091.
- [133] Astier AL, Meiffren G, Freeman S, Hafler DA. Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2006 Dec;116(12): 3252-3257.
- [134] Booth DR, Arthur AT, Teutsch SM, Bye C, Rubio J, Armati PJ et al. Gene expression and genotyping studies implicate the interleukin 7 receptor in the pathogenesis of primary progressive multiple sclerosis. *J Mol Med (Berl).* 2005 Oct;83(10): 822-830.
- [135] Jacobsen M, Hoffmann S, Cepok S, Stei S, Ziegler A, Sommer N et al. A novel mutation in PTPRC interferes with splicing and alters the structure of the human CD45 molecule. *Immunogenetics.* 2002 Jun;54(3): 158-163.
- [136] Seidi OA, Sharief MK. The expression of apoptosis-regulatory proteins in B lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2002 Sep;130(1-2): 202-210.
- [137] Johnston JB, Silva C, Gonzalez G, Holden J, Warren KG, Metz LM et al. Diminished adenosine A1 receptor expression on macrophages in brain and blood of patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2001 May;49(5): 650-658.
- [138] Semra YK, Seidi OA, Sharief MK. Overexpression of the apoptosis inhibitor FLIP in T cells correlates with disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2001 Feb 15;113(2): 268-274.
- [139] Jacobsen M, Schweer D, Ziegler A, Gaber R, Schock S, Schwinzer R et al. A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2000 Dec;26(4): 495-499.

- [140] Sharief MK. Increased cellular expression of the caspase inhibitor FLIP in intrathecal lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2000 Nov 1;111(1-2): 203-209.
- [141] Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell.* 2010 Sep 24;39(6): 925-938. doi: 10.1016/j.molcel.2010.08.011.
- [142] Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakana H, Yosef N, Linker RA et al. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature.* 2013 Apr 25;496(7446): 518-522. doi: 10.1038/nature11868.
- [143] Majdinasab N, Hosseini Behbahani M, Galehdari H, Mohaghegh M. Association of interleukin 7 receptor gene polymorphism rs6897932 with multiple sclerosis patients in Khuzestan. *Iran J Neurol.* 2014 Jul 4;13(3): 168-171.
- [144] Park TJ, Kim HJ, Kim JH, Bae JS, Cheong HS, Park BL et al. Associations of CD6, TNFRSF1A and IRF8 polymorphisms with risk of inflammatory demyelinating diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2013 Aug;39(5): 519-530. doi: 10.1111/j.1365-2990.2012.01304.x.
- [145] Morrison FS, Locke JM, Wood AR, Tuke M, Pasko D, Murray A et al. The splice site variant rs11078928 may be associated with a genotype-dependent alteration in expression of GSDMB transcripts. *BMC Genomics.* 2013 Sep 17;14: 627. doi: 10.1186/1471-2164-14-627.
- [146] Bjelobaba I, Begovic-Kupresanin V, Pekovic S, Lavrnja I. Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res.* 2018 Jun;96(6): 1021-1042. doi: 10.1002/jnr.24224.
- [147] Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. *Prog Neurobiol.* 2010 Nov;92(3): 386-404. doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.06.005.
- [148] Tham E, Gielen AW, Khademi M, Martin C, Piehl F. Decreased expression of VEGF-A in rat experimental autoimmune encephalomyelitis and in cerebrospinal fluid mononuclear cells from patients with multiple sclerosis. *Scand J Immunol.* 2006 Dec;64(6): 609-622.
- [149] Hernández F, Merchán-Rubira J, Vallés-Saiz L, Rodríguez-Matellán A, Avila J. Differences Between Human and Murine Tau at the N-terminal End. *Front Aging Neurosci.* 2020 Jan 28;12: 11. doi: 10.3389/fnagi.2020.00011.

- [150] Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel)*. 2018 Apr 20;18(4): 1271. doi: 10.3390/s18041271.
- [151] Cohen L, Walt DR. Single-Molecule Arrays for Protein and Nucleic Acid Analysis. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2017 Jun 12;10(1): 345-363.
- [152] Bhan A, Jacobsen C, Myhr KM, Dalen I, Lode K, Farbu E. Neurofilaments and 10-year follow-up in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2018 Sep;24(10): 1301-1307. doi: 10.1177/1352458518782005.
- [153] Park E, Pan Z, Zhang Z, Lin L, Xing Y. The Expanding Landscape of Alternative Splicing Variation in Human Populations. *Am J Hum Genet*. 2018 Jan 4;102(1): 11-26. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.11.002.
- [154] Cookson MR. Proteomics: techniques and applications in neuroscience. *J Neurochem*. 2019 Nov;151(4): 394-396. doi: 10.1111/jnc.14867.
- [155] Wu J. Targeting the right protein isoform: Mass spectrometry-based proteomic characterization of alternative splice variants. In: Lee MS, Ji QC, editors. *Protein analysis using mass spectrometry: Accelerating protein biotherapeutics from lab to patient*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2017. p. 55-65.
- [156] Lassmann H. Pathogenic Mechanisms Associated With Different Clinical Courses of Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2019 Jan 10;9: 3116. doi: 10.3389/fimmu.2018.03116.
- [157] Tavares R, Wajnberg G, Scherer NM, Pauletti BA, Cassoli JS, Ferreira CG et al. Unveiling alternative splice diversity from human oligodendrocyte proteome data. *J Proteomics*. 2017 Jan 16;151: 293-301. doi: 10.1016/j.jprot.2016.05.023.
- [158] Nguyen V, Mendelsohn A, Larrick JW. Interleukin-7 and Immunosenescence. *J Immunol Res*. 2017;2017: 4807853. doi: 10.1155/2017/4807853.
- [159] Kawashima M, Hitomi Y, Aiba Y, Nishida N, Kojima K, Kawai Y et al. Genome-wide association studies identify PRKCB as a novel genetic susceptibility locus for primary biliary cholangitis in the Japanese population. *Hum Mol Genet*. 2017 Feb 1;26(3): 650-659.
- [160] Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2007 Jul;39(7): 857-864.

- [161] Eyre S, Bowes J, Diogo D, Lee A, Barton A, Martin P, et al. High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2012 Dec;44(12): 1336-1340. doi: 10.1038/ng.2462.
- [162] McGovern DP, Gardet A, Törkvist L, Goyette P, Essers J, Taylor KD et al. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010 Apr;42(4): 332-337. doi: 10.1038/ng.549.
- [163] Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010 Dec;42(12): 1118-1125. doi: 10.1038/ng.717.
- [164] International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS), Cortes A, Hadler J, Pointon JP, Robinson PC, Karaderi T et al. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat Genet.* 2013 Jul;45(7): 730-738. doi: 10.1038/ng.2667.
- [165] Wai H, Douglas AGL, Baralle D. RNA splicing analysis in genomic medicine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019 Mar;108: 61-71. doi: 10.1016/j.biocel.2018.12.009.
- [166] Grodecká L, Buratti E, Freiburger T. Mutations of Pre-mRNA Splicing Regulatory Elements: Are Predictions Moving Forward to Clinical Diagnostics? *Int J Mol Sci.* 2017 Jul 31;18(8): 1668. doi: 10.3390/ijms18081668.
- [167] Ohno K, Takeda JI, Masuda A. Rules and tools to predict the splicing effects of exonic and intronic mutations. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2018 Jan;9: e1451. doi: 10.1002/wrna.1451.
- [168] Koch MW, Illytskyy Y, Golubov A, Metz LM, Yong VW, Kovalchuk O. Global transcriptome profiling of mild relapsing-remitting versus primary progressive multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2018 Apr;25(4): 651-658. doi: 10.1111/ene.13565.
- [169] Yamanaka M, Anada Y, Igarashi Y, Kihara A. A splicing isoform of LPP1, LPP1a, exhibits high phosphatase activity toward FTY720 phosphate. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Oct 31;375(4): 675-679. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.165.
- [170] Rotstein D, Montalban X. Reaching an evidence-based prognosis for personalized treatment of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2019 May;15(5): 287-300. doi: 10.1038/s41582-019-0170-8.
- [171] Bedri SK, Fink K, Manouchehrinia A, Lundström W, Kockum I, Olsson T et al. Multiple sclerosis treatment effects on plasma cytokine receptor levels. *Clin Immunol.* 2018 Feb;187: 15-25.

- [172] Pranzatelli MR. Advances in Biomarker-Guided Therapy for Pediatric- and Adult-Onset Neuroinflammatory Disorders: Targeting Chemokines/Cytokines. *Front Immunol.* 2018 Apr 4;9: 557. doi: 10.3389/fimmu.2018.00557.
- [173] Lundström W, Highfill S, Walsh ST, Beq S, Morse E, Kockum I et al. Soluble IL7R α potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 May 7;110(19): E1761-E1770. doi: 10.1073/pnas.1222303110.
- [174] Iparraguirre L, Muñoz-Culla M, Prada-Luengo I, Castillo-Triviño T, Olascoaga J, Otaegui D. Circular RNA profiling reveals that circular RNAs from ANXA2 can be used as new biomarkers for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2017 Sep 15;26(18): 3564-3572.
- [175] Yang L. Splicing noncoding RNAs from the inside out. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2015 Nov-Dec;6(6): 651-660.
- [176] Lasda E, Parker R. Circular RNAs: diversity of form and function. *RNA.* 2014 Dec;20(12): 1829-1842.
- [177] Li TR, Jia YJ, Wang Q, Shao XQ, Lv RJ. Circular RNA: a new star in neurological diseases. *Int J Neurosci.* 2017 Aug;127(8): 726-734.
- [178] Mager DL, Freeman JD. HERV-H endogenous retroviruses: presence in the New World branch but amplification in the Old World primate lineage. *Virology.* 1995 Nov 10;213(2): 395-404.
- [179] Grandi N, Tramontano E. HERV Envelope Proteins: Physiological Role and Pathogenic Potential in Cancer and Autoimmunity. *Front Microbiol.* 2018 Mar 14;9: 462. doi: 10.3389/fmicb.2018.00462.
- [180] Christensen T, Sørensen PD, Hansen HJ, Møller-Larsen A. Antibodies against a human endogenous retrovirus and the preponderance of env splice variants in multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2003 Feb;9(1): 6-15.
- [181] Arneth B. Up-to-date knowledge about the association between multiple sclerosis and the reactivation of human endogenous retrovirus infections. *J Neurol.* 2018 Aug;265(8): 1733-1739.
- [182] Nazarov PV, Muller A, Kaoma T, Nicot N, Maximo C, Birembaut P et al. RNA sequencing and transcriptome arrays analyses show opposing results for alternative splicing in patient derived samples. *BMC Genomics.* 2017 Jun 6;18(1): 443. doi: 10.1186/s12864-017-3819-y.
- [183] Emig D, Salomonis N, Baumbach J, Lengauer T, Conklin BR, Albrecht M. AltAnalyze and DomainGraph: analyzing and visualizing exon expression data. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jul;38(Web Server issue): W755-W762. doi: 10.1093/nar/gkq405.

- [184] Ergun A, Doran G, Costello JC, Paik HH, Collins JJ, Mathis D et al. ImmGen Consortium. Differential splicing across immune system lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Aug 27;110(35): 14324-14329. doi: 10.1073/pnas.1311839110.
- [185] Shalek AK, Satija R, Adiconis X, Gertner RS, Gaublomme JT, Raychowdhury R et al. Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature*. 2013 Jun 13;498(7453): 236-240. doi: 10.1038/nature12172.
- [186] van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, Thermes C. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends Genet*. 2018 Sep;34(9): 666-681. doi: 10.1016/j.tig.2018.05.008.
- [187] Lima L, Marchet C, Caboche S, Da Silva C, Istace B, Aury JM et al. Comparative assessment of long-read error correction software applied to Nanopore RNA-sequencing data. *Brief Bioinform*. 2019 Jun 24. pii: bbz058. doi: 10.1093/bib/bbz058.
- [188] Romero JP, Ortiz-Estévez M, Muniategui A, Carrancio S, de Miguel FJ, Carazo F et al. Comparison of RNA-seq and microarray platforms for splice event detection using a cross-platform algorithm. *BMC Genomics*. 2018 Sep 25;19(1): 703. doi: 10.1186/s12864-018-5082-2.
- [189] Zhang X, Joehanes R, Chen BH, Huan T, Ying S, Munson PJ et al. Identification of common genetic variants controlling transcript isoform variation in human whole blood. *Nat Genet*. 2015 Apr;47(4): 345-352. doi: 10.1038/ng.3220.
- [190] Matzaraki V, Kumar V, Wijmenga C, Zhernakova A. The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome Biol*. 2017 Apr 27;18(1): 76. doi: 10.1186/s13059-017-1207-1.
- [191] Vandiedonck C, Taylor MS, Lockstone HE, Plant K, Taylor JM, Durrant C et al. Pervasive haplotypic variation in the spliceo-transcriptome of the human major histocompatibility complex. *Genome Res*. 2011 Jul;21(7): 1042-1054. doi: 10.1101/gr.116681.110.
- [192] Hecker M, Rüge A, Putscher E, Boxberger N, Rommer PS, Fitzner B et al. Aberrant expression of alternative splicing variants in multiple sclerosis - A systematic review. *Autoimmun Rev*. 2019 Jul;18(7): 721-732. doi: 10.1016/j.autrev.2019.05.010.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---|
| Abb. | Abbildung |
| AGCC | <i>Affymetrix GeneChip Command Console</i> |
| ASE | alternatives Spleißereignis |
| AU-ROC | <i>area under the receiver operating characteristic curve</i> |
| BHS | Blut-Hirn-Schranke |
| BPS | <i>branchpoint</i> Sequenz |
| °C | Grad Celsius |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| cDNA | <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> |
| CIS | <i>clinically isolated syndrome</i> |
| DGN | Deutsche Gesellschaft für Neurologie |
| DMD | <i>disease-modifying drugs</i> |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| EAE | experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |
| EDSS | <i>Expanded Disability Status Scale</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| engl. | englisch |
| ESE | exonischer <i>Splicing Enhancer</i> |
| ESS | exonischer <i>Splicing Silencer</i> |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer |
| GA | Glatirameracetat |
| GEO | <i>Gene Expression Omnibus</i> |
| GKS | Glukokortikosteroide |
| GWAS | genomweite Assoziationsstudie |
| HERV | humaner endogener Retrovirus |
| HGNC | <i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i> |

| | |
|----------|---|
| hnRNP | <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i> |
| HTA | <i>Human Transcriptome Array</i> |
| ID | Identifikationsnummer |
| IFN-β | beta-Interferon |
| IgG | Immunglobulin G |
| IMSUP | Immunsuppressiva |
| ISE | intronischer <i>Splicing Enhancer</i> |
| ISS | intronischer <i>Splicing Silencer</i> |
| JUC | <i>junction</i> |
| KKNMS | Krankheitsbezogenes Kompetenznetz Multiple Sklerose |
| lncRNA | <i>long non-coding RNA</i> |
| M | Mittelwert |
| MHC | <i>major histocompatibility complex</i> |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MS | Multiple Sklerose |
| NAb | neutralisierende Antikörper |
| n.a. | nicht angegeben |
| NFL | <i>neurofilament light chain</i> |
| NGS | <i>next-generation sequencing</i> |
| NMO | Neuromyelitis optica |
| OH- | Hydroxy- |
| OKB | oligoklonale Banden |
| PBMC | <i>peripheral blood mononuclear cell</i> |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| PDF | <i>Portable Document Format</i> |
| PPMS | primär progrediente Multiple Sklerose |
| PPT | Polypyrimidintrakt |
| pre-mRNA | <i>precursor messenger ribonucleic acid</i> |
| PRISMA | <i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses</i> |

| | |
|---------|---|
| PSR | <i>probe selection region</i> |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> |
| RRMS | <i>relapsing-remitting multiple sclerosis</i> |
| S1P | Sphingosin-1-Phosphat |
| SD | Standardabweichung |
| SNP | <i>single-nucleotide polymorphism</i> |
| SPMS | sekundär progrediente Multiple Sklerose |
| SST-RMA | <i>Signal Space Transformation-Robust Multi-chip Analysis</i> |
| Suppl. | Supplementäre Tabellen |
| Tab. | Tabelle |
| TAC | <i>Transcriptome Analysis Console</i> |
| Th17 | spezifische T-Helferzellen |
| TNFR | Tumornekrosefaktorrezeptor |
| UCSC | <i>University of California, Santa Cruz</i> |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

8.2. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tab. 1: Einschlusskriterien für die systematische Literatursauswahl..... | 31 |
| Tab. 2: Klinisch-demografische Merkmale der MS-Patienten..... | 37 |
| Tab. 3: Untersuchung Zellpopulationen bei MS-Patienten..... | 38 |
| Tab. 4: HTA 2.0 Datensätze zu Kontrollgruppen..... | 40 |
| Tab. 5: Studien zur Expression alternativer Spleißvarianten bei MS..... | 49 |
| Tab. 6: Gene für die alternative Spleißvarianten bei MS untersucht wurden..... | 55 |
| Tab. 7: Genexpressionsanalyse der 27 bisher in der Literatur untersuchten Gene..... | 60 |
| Tab. 8: Microarray-basierte Validierung der in der Literatur genannten alternativen Spleißereignisse..... | 62 |

8.3. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Verlaufsformen der Multiplen Sklerose..... | 11 |
| Abb. 2: Therapieschema zur Behandlung verschiedener MS-Verlaufsformen..... | 13 |
| Abb. 3: Quantitative Echtzeit-PCR nach TaqMan®..... | 18 |
| Abb. 4: Enzymgekoppelte und Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper..... | 21 |
| Abb. 5: Typen von alternativen Spleißereignissen..... | 23 |
| Abb. 6: Schematische Darstellung des Spleißvorgangs..... | 24 |
| Abb. 7: Studiendesign der vorliegenden Übersichtsarbeit..... | 30 |
| Abb. 8: Sondenposition der HTA 2.0 Microarrays..... | 36 |
| Abb. 9: Schematische Darstellung der Literaturrecherche..... | 45 |
| Abb. 10: Qualitätskontrolle der verwendeten HTA 2.0 Microarrays..... | 59 |
| Abb. 11: Exonlevelanalyse des IL7R-Gens bei MS-Patienten und Gesunden..... | 65 |
| Abb. 12: Exonlevelanalyse des NFAT5-Gens bei MS-Patienten und Gesunden..... | 67 |

8.4. Supplementäre Tabellen

Suppl. 1: PRISMA-Checkliste für die systematische Literatursuche.

| Publikationsabschnitt | # | Zusammenfassung | Erwähnt auf Seite # |
|--|----|--|---------------------|
| TITEL | | | |
| Titel | 1 | Identifikation als Bericht einer systematischen Übersicht, Meta-Analyse oder beidem. | 721 |
| ZUSAMMENFASSUNG | | | |
| Strukturierte Zusammenfassung | 2 | Strukturierte Zusammenfassung mit den Stichworten (sofern geeignet): Hintergrund; Ziele; Datenquellen; Auswahlkriterien der Studien, Teilnehmer und Interventionen; Bewertung der Studie und Methoden der Synthese; Ergebnisse; Einschränkungen; Schlussfolgerungen und Implikation der wichtigsten Ergebnisse; Registrierungsnummer der systematischen Übersicht. | 721 |
| EINLEITUNG | | | |
| Hintergrund und Rationale | 3 | Wissenschaftlicher Hintergrund und Begründung der Studie. | 721-722 |
| Ziele | 4 | Präzise Angabe der Fragestellungen mit Bezug auf Teilnehmer, Interventionen, Vergleiche, Zielkriterien und Studiendesign (engl.: <i>participants, interventions, comparisons, outcomes, and study design</i> ; PICOS). | 722 |
| METHODEN | | | |
| Protokoll und Registrierung | 5 | Existiert ein Studienprotokoll für die Übersichtsarbeit? Wenn ja, wo kann es gefunden bzw. wie kann es bezogen werden (z.B. Webseite); wenn verfügbar: Informationen zur Registrierung einschließlich Angabe der Registrierungsnummer. | n. b. |
| Auswahlkriterien | 6 | Merkmale der Studien (z.B. PICOS, Dauer der Nachbeobachtung) und der Berichte (z.B. Zeitraum der Studien, Sprache, Publikationsstatus), die als Auswahlkriterien verwendet wurden, mit Begründung. | 722 |
| Informationsquellen | 7 | Beschreibung aller Informationsquellen (z.B. Datenbanken mit Zeitpunkten der Berichterstattung, Kontakt mit Autoren von Studien, um zusätzliche Studien zu identifizieren), die bei der Suche verwendet wurden einschließlich des letzten Suchdatums. | 722 |
| Suche | 8 | Beschreibung der vollständigen elektronischen Suchstrategie für mindestens eine Datenbank, einschließlich gewählter Limitierungen, so dass die Suche repliziert werden könnte. | 722 |
| Auswahl der Studien | 9 | Beschreibung des Auswahlprozesses von Studien (das heißt Vorauswahl, Eignung, Einschluss in die systematische Übersicht und, falls zutreffend, in die Meta-Analyse). | 722 |
| Prozess der Datengewinnung | 10 | Beschreibung der Methode der Datenextraktion aus Berichten (z.B. Erhebungsbogen, unabhängig, doppelt) und alle Prozesse, um Daten von Untersuchern zu erhalten und zu bestätigen. | 722-723 |
| Datendetails | 11 | Aufzählung und Definition aller Variablen, nach denen gesucht wurde (z.B. PICOS, Finanzierungsquellen) sowie Annahmen und durchgeführte Vereinfachungen. | 722-723 |
| Risiko der Verzerrung in den einzelnen Studien | 12 | Methoden zur Beurteilung des Risikos von Verzerrungen der einzelnen Studien (einschließlich der Angabe, ob dieses auf der Studienebene oder für das Zielkriterium durchgeführt wurde) und wie diese Information bei der Datensynthese berücksichtigt wurde. | n. b. |
| Effektschätzer | 13 | Wichtigste Effektschätzer (z.B. relatives Risiko, Mittelwertdifferenz). | n. b. |

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite. Legende siehe Seite 110.

| Publikationsabschnitt | # | Zusammenfassung | Erwähnt auf Seite # |
|---|----|--|---------------------|
| Synthese der Ergebnisse | 14 | Beschreibung der Methoden zum Umgang mit den Daten und der Kombination der Ergebnisse der Studien; falls diese berechnet wurden, einschließlich Maßzahlen zur Homogenität der Ergebnisse (z.B. I ²) für jede Meta-Analyse. | n. b. |
| Risiko von Verzerrungen über Studien hinweg | 15 | Beschreibung der Beurteilung des Risikos von Verzerrungen, die die kumulative Evidenz beeinflussen könnten (z.B. Publikationsverzerrung, selektives Berichten innerhalb von Studien). | n. b. |
| Zusätzliche Analysen | 16 | Methoden für zusätzliche Analysen (z.B. Sensitivitätsanalysen, Subgruppenanalysen, Meta-Regression) mit Beschreibung, welche vorab spezifiziert waren. | 722-724 |
| ERGEBNISSE | | | |
| Auswahl der Studien | 17 | Anzahl der Studien, die in die Vorauswahl aufgenommen, auf Eignung geprüft und in die Übersicht eingeschlossen wurden, mit Begründung für Ausschluss in jeder Stufe, idealerweise unter Verwendung eines Flussdiagramms. | 724 |
| Studienmerkmale | 18 | Für jede Studie Darstellung der Merkmale, nach denen Daten extrahiert wurden (z.B. Fallzahl, PICOS, Nachbeobachtungszeitraum), Literaturstelle der Studie. | 724-726 |
| Risiko der Verzerrung innerhalb der Studien | 19 | Daten zum Risiko von Verzerrungen innerhalb jeder Studie und, falls verfügbar, eine Beurteilung der Güte der Zielkriterien (siehe Item 12). | n. b. |
| Ergebnisse der einzelnen Studien | 20 | Für jede Studie Darstellung aller Endpunkte (Wirksamkeit und Nebenwirkungen): (a) einfache zusammenfassende Daten für jede Interventionsgruppe, (b) Effektschätzer und Konfidenzintervalle, idealerweise mit <i>Forest Plot</i> . | 726-728 |
| Ergebnissynthese | 21 | Darstellung der Meta-Analyse, einschließlich Konfidenzintervalle und Heterogenitätsmaße. | n. b. |
| Risiko von Verzerrungen über Studien hinweg | 22 | Darstellung der Ergebnisse zur Beurteilung des Risikos von Verzerrungen über alle Studien hinweg (siehe Item 15). | n. b. |
| Zusätzliche Analysen | 23 | Präsentation der Ergebnisse der zusätzlichen Analysen, falls durchgeführt (z.B. Sensitivitäts- oder Subgruppenanalysen, Meta-Regression [siehe Item 16]). | 728 |
| DISKUSSION | | | |
| Zusammenfassung der Evidenz | 24 | Zusammenfassung der Hauptergebnisse einschließlich der Stärke der Evidenz für jedes Hauptzielkriterium; Relevanz für Zielgruppen (z.B. Gesundheitsdienstleister, Anwender, politische Entscheidungsträger). | 730 |
| Einschränkungen | 25 | Diskutiere Einschränkungen der Studie auf Studienebene und auf Ebene der Zielkriterien (z.B. Risiko von Verzerrungen) sowie auf Ebene der Übersicht (z.B. unvollständiges Auffinden der identifizierten Forschung, Verzerrung des Berichts). | 728-730 |
| Schlussfolgerung | 26 | Interpretation der Ergebnisse unter Berücksichtigung des Stands der Forschung und Schlussfolgerungen für weitere Forschung. | 730 |
| FINANZIELLE UNTERSTÜTZUNG | | | |
| Finanzielle Unterstützung | 27 | Quellen der finanziellen Unterstützung sowie andere Unterstützung (z.B. zur Verfügung stellen von Daten); Funktion der Geldgeber für die systematische Übersicht. | 730 |

Legende siehe nächste Seite.

In der Tabelle ist die anhand der Vorgaben der *Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) erstellte Checkliste mit insgesamt 27 Punkten für das Verfassen einer systematischen Übersichtsarbeit dargestellt [92]. Die Seitenangaben beziehen sich auf die bereits im *Journal Autoimmunity Reviews* publizierte systematische Übersichtsarbeit [192].

Suppl. 2: Beschreibung der Gensymbole.

| HGNC Gensymbol | Beschreibung |
|-----------------------|---|
| ADORA1 | <i>Adenosine A1 Receptor</i> |
| BIN1 | <i>Bridging Integrator 1</i> |
| CD40 | <i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 5</i> |
| CD46 | <i>Trophoblast Leukocyte Common Antigen</i> |
| CD86 | <i>B-Lymphocyte Activation Antigen B7-2</i> |
| CFLAR | <i>Caspase 8 and Fas Associated Via Death Domain-like apoptosis regulator</i> |
| CSF1R | <i>Colony Stimulating Factor 1 Receptor</i> |
| CTLA4 | <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i> |
| DDX39B | <i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Polypeptide 39B</i> |
| EMC4 | <i>Endoplasmic Reticulum Membrane Protein Complex Subunit 4</i> |
| FOXP3 | <i>Forkhead-Box-Protein P3</i> |
| GSDMB | <i>Gasdermin B</i> |
| IFNAR2 | <i>Interferon Alpha And Beta Receptor Subunit 2</i> |
| IL7 | <i>Interleukin 7</i> |
| IL7R | <i>Interleukin 7 Receptor</i> |
| MALAT1 | <i>Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1</i> |
| MBP | <i>Myelin Basic Protein</i> |
| MOG | <i>Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein</i> |
| NFAT5 | <i>Nuclear Factor Of Activated T Cells 5</i> |
| NFATC1 | <i>Nuclear Factor Of Activated T Cells 1</i> |
| PLP | <i>Proteolipid Protein</i> |
| PRKCA | <i>Protein Kinase C Alpha</i> |
| PTPRC | <i>Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C</i> |
| SMN | <i>Survival of Motor Neuron</i> |
| SP140 | <i>SP140 Nuclear Body Protein</i> |
| TGM2 | <i>Transglutaminase 2</i> |
| TNFRSF1A | <i>Tumor Necrosis Factor Superfamily Member 1A</i> |
| TNFRSF10B | <i>Tumor Necrosis Factor Superfamily Member 10B</i> |
| TNFRSF10D | <i>Tumor Necrosis Factor Superfamily Member 10D</i> |
| TNFSF10 | <i>Tumor Necrosis Factor Superfamily Member 10</i> |
| TFSM | <i>Ts Translation Elongation Factor, Mitochondrial</i> |
| VEGFA | <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i> |

In der Tabelle sind die Beschreibungen der in dieser systematischen Übersichtsarbeit verwendeten Gensymbole aufgelistet. Die HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) Gensymbole wurden aus der GeneCards-Datenbank entnommen [93].

Suppl. 3: PubMed-Ergebnisse der systematischen Literaturrecherche und Sekundärliteratur zum Thema ASE bei MS.

| Original | English | MS | ASE | PubMed-ID | Erstautor | Jahr |
|-------------------|---------|----|-----|-----------|-----------------|------|
| PubMed-Ergebnisse | | | | | | |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 30566690 | Cardamone G | 2019 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 30486475 | Sestito C | 2018 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 28272342 | Cardamone G | 2017 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 28340352 | Galarza-Munoz G | 2017 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 27488240 | De Rossi P | 2016 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 26437396 | Paraboschi EM | 2015 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 26152201 | Matesanz F | 2015 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 25885816 | Spurlock CF 3rd | 2015 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 26414764 | De Rosa V | 2015 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 25080502 | Paraboschi EM | 2014 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 24317118 | Carbone F | 2014 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 24147013 | McKay FC | 2013 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 22801493 | Gregory AP | 2012 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 20920832 | Tian Y | 2011 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 20226540 | Rane L | 2010 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 20097866 | Hoe E | 2010 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 20800907 | Jensen CJ | 2010 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 18691768 | Palacios R | 2008 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 18971450 | Gilli F | 2008 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 17573820 | Boyle LH | 2007 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 17660817 | Gregory SG | 2007 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 12073144 | Jacobsen M | 2002 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 12225903 | Seidi OA | 2002 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 11357956 | Johnston JB | 2001 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 11101853 | Jacobsen M | 2000 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 30040082 | Koczan D | 2018 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 30562364 | Sriram S | 2018 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 28651352 | Iparraguirre L | 2017 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 28212793 | Paraboschi EM | 2017 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 28582853 | Taheri M | 2017 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 27812788 | Uleri E | 2016 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 25422737 | Majdinasab N | 2014 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 24166352 | Ibayyan L | 2014 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 23980635 | Hanssen KT | 2014 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 22994200 | Park TJ | 2013 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 22319148 | Cagliani R | 2012 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 20187771 | Hoe E | 2010 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 17999208 | Szolnoki Z | 2007 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 17092260 | Fedetz M | 2006 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 17083617 | Tham E | 2006 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 12617261 | Christensen T | 2003 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 12864992 | Gomez-Lira M | 2003 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 12507781 | Kantarci OH | 2003 |

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite. Legende siehe Seite 115.

| | | | | | | |
|---|---|---|---|----------|------------------|------|
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 12028593 | Miterski B | 2002 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 10962541 | Tranquil LR | 2000 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 9189041 | Capello E | 1997 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 7507225 | Martin R | 1994 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 7689584 | Voskuhl RR | 1993 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 29522154 | Perez Y | 2018 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 30102396 | Karaky M | 2018 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 30418605 | Payer LM | 2018 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 27222040 | Tavares R | 2017 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 27149841 | Moyon S | 2016 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 24435747 | Bullard DC | 2014 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 24890719 | da Glória VG | 2014 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 24044605 | Morrison FS | 2013 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 23151878 | Evsyukova I | 2013 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 23672192 | Uleri E | 2013 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 22848007 | Johansson EM | 2012 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 21628452 | Vandiedonck C | 2012 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 21462202 | Carboni N | 2011 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 21283821 | Ni Choileain S | 2011 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 20703214 | Hakobyan S | 2010 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 20856809 | Stridh P | 2010 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 20371120 | Hu X | 2010 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 19915720 | Gillett A | 2009 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 18835559 | Wang E | 2008 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 17917586 | Reyes-Irisarri E | 2007 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 17046071 | Kruse N | 2007 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 16903876 | Delarasse C | 2006 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 14630980 | Boxall S | 2004 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 12745437 | Giorelli M | 2002 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 12203392 | Yool D | 2002 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 11306584 | Lynch KW | 2001 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 10613824 | Klein L | 2000 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 8892093 | Pribyl TM | 1996 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 8765335 | Pribyl TM | 1996 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 9216987 | Grima B | 1994 |
| ✓ | ✓ | n | n | 28051079 | Warner SC | 2017 |
| ✓ | ✓ | n | n | 28394350 | Pala M | 2017 |
| ✓ | ✓ | n | n | 28392472 | Brureau A | 2017 |
| ✓ | ✓ | n | n | 27375925 | Douglas JN | 2016 |
| ✓ | ✓ | n | n | 27630207 | Goudarzi S | 2016 |
| ✓ | ✓ | n | n | 24885425 | Bäckdahl L | 2014 |
| ✓ | ✓ | n | n | 25205808 | Mueller M | 2014 |
| ✓ | ✓ | n | n | 25181038 | Abramowski P | 2014 |
| ✓ | ✓ | n | n | 19228956 | Xu J | 2009 |
| ✓ | ✓ | n | n | 19300513 | Shiryaev SA | 2009 |
| ✓ | ✓ | n | n | 18564058 | Zago P | 2009 |
| ✓ | ✓ | n | n | 15273320 | Ryder SP | 2004 |
| ✓ | ✓ | n | n | 9882319 | Blond JL | 1999 |

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite. Legende siehe Seite 115.

| | | | | | | |
|----------------------------|---|---|---|----------|-----------------------|------|
| ✓ | ✓ | n | n | 9886365 | Lin X | 1999 |
| ✓ | ✓ | n | n | 8787215 | Sypecka J | 1996 |
| n | ✓ | n | n | 29593697 | Grandi N | 2018 |
| n | ✓ | n | n | 30396776 | Janssens R | 2018 |
| n | ✓ | n | n | 30550956 | Arnaiz E | 2018 |
| n | ✓ | n | n | 28203606 | Moyon S | 2017 |
| n | ✓ | n | n | 28875859 | Androutsou ME | 2017 |
| n | ✓ | n | n | 29526637 | Consuegra-Fernández M | 2017 |
| n | ✓ | n | n | 27415968 | Svetoni F | 2016 |
| n | ✓ | n | n | 25381328 | Rong J | 2014 |
| n | ✓ | n | n | 24852507 | Sawcer S | 2014 |
| n | ✓ | n | n | 23247072 | Beckenstein U | 2013 |
| n | ✓ | n | n | 22626445 | Sánchez-Pla A | 2012 |
| n | ✓ | n | n | 20639696 | Evsyukova I | 2010 |
| n | ✓ | n | n | 20441432 | Mechelli R | 2010 |
| n | ✓ | n | n | 19519451 | Harauz G | 2009 |
| n | ✓ | n | n | 19260029 | Villoslada P | 2009 |
| n | ✓ | n | n | 18317406 | Cho K | 2008 |
| n | ✓ | n | n | 18971447 | Sorensen PS | 2008 |
| n | ✓ | n | n | 12885274 | Micheau O | 2003 |
| n | ✓ | n | n | 12571424 | Wittig BM | 2003 |
| n | ✓ | n | n | 11862398 | Tchilian EZ | 2002 |
| n | ✓ | n | n | 11548742 | Vorechovsky I | 2001 |
| n | ✓ | n | n | 11323691 | Penninger JM | 2001 |
| n | ✓ | n | n | 11710992 | Giorelli M | 2001 |
| n | ✓ | n | n | 2457442 | Brady RO | 1988 |
| n | n | n | n | 26935090 | Ohya S | 2016 |
| n | n | n | n | 17199106 | Zwolińska K | 2006 |
| n | n | n | n | 16119093 | Chekhonin VP | 2003 |
| Zusätzliche Artikel | | | | | | |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 29361022 | Smets I | 2018 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 29487369 | Sambucci M | 2018 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 25736057 | López-Gómez C | 2015 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 26068105 | Field J | 2015 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 24174586 | Ottoboni L | 2013 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 21067621 | Uzawa A | 2010 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 17928869 | McKay FC | 2008 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 17099776 | Astier AL | 2006 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 16075257 | Booth DR | 2005 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 11164911 | Semra YK | 2001 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 11063839 | Sharief MK | 2000 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 27613121 | Órpez-Zafra T | 2016 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 22744673 | Dyment DA | 2012 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 21354972 | Couturier N | 2011 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 19155502 | Maier LM | 2009 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 19740340 | Karabon L | 2009 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 17660530 | Hafler DA | 2007 |

Fortsetzung der Tabelle und Legende siehe nächste Seite.

| | | | | | | |
|---|---|---|---|----------|--------------------|------|
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 17660816 | Lundmark F | 2007 |
| ✓ | ✓ | ✓ | n | 10408973 | Ligers A | 1999 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 19936255 | Grigoryev YA | 2009 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 18595775 | Gu M | 2008 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 17402967 | Allamargot C | 2007 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 16288477 | Wang E | 2006 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 15732009 | Bonnevie-Nielsen V | 2005 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 15333587 | Boxall S | 2004 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 11917126 | Wu JI | 2002 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 11052810 | Korte A | 2000 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 10594010 | Lynch KW | 2000 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 10831323 | Oaks MK | 2000 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 10556814 | Magistrelli G | 1999 |
| ✓ | ✓ | n | ✓ | 7504278 | Pribyl TM | 1993 |
| ✓ | ✓ | n | n | 16538473 | Ward V | 2006 |
| n | ✓ | n | n | 27126046 | Yang IL | 2016 |
| n | ✓ | n | n | 17726481 | Wang GS | 2007 |
| n | ✓ | n | n | 17400297 | Comabella M | 2007 |
| n | ✓ | n | n | 16423560 | Tchilian EZ | 2006 |
| n | ✓ | n | n | 16088318 | Pawlak E | 2005 |
| n | ✓ | n | n | 15573128 | Lynch KW | 2004 |
| n | ✓ | n | n | 15122293 | Garcia-Blanco MA | 2004 |
| n | ✓ | n | n | 11602343 | Goldstrohm AC | 2001 |

In der Tabelle sind die 160 gesichteten Artikel und die Auswahlkriterien für die Erstellung der vorliegenden systematischen Übersichtsarbeit aufgeführt. In den dunkelgrauen Spalten auf der linken Seite sind die Auswahlkriterien für jeden Artikel aufgeführt. Für den Einschluss eines Artikels in die qualitative Auswertung mussten alle vier Kriterien zutreffen (✓). Nicht zutreffende Kriterien wurden mit einem n markiert. In der Spalte MS (Multiple Sklerose) wurde angegeben, ob Probenmaterialien von MS-Patienten in den einzelnen Studien untersucht wurden. Die Spalte ASE (alternatives Spleißereignis) entspricht dem Auswahlkriterium experimentelle Messung der Expressionslevel von mindestens zwei verschiedenen humanen protein-kodierenden Isoformen. Die PubMed-Identifikationsnummer (ID), sowie das Jahr der Publikation, wurde für jeden Artikel in der Tabelle hinterlegt. Der Abschnitt PubMed-Ergebnisse umfasst die 120 Studien, die unter den Suchbegriffen „*splicing*“ und „*multiple sclerosis*“ bis einschließlich dem 20. März 2019 in der PubMed-Datenbank identifiziert wurden. Bei der Durchsicht der Referenzlisten dieser 120 Artikel wurden 40 weitere Artikel in die systematische Übersichtsarbeit mit aufgenommen und unter dem Abschnitt zusätzliche Artikel in der Tabelle aufgeführt. Die Artikel sind absteigend der zutreffenden Auswahlkriterien sortiert.

Suppl. 4: Microarray-Sondensätze der in der Literatur beschriebenen Gene.

| Gensymbol | probe set ID | PSR/JUC |
|-----------|---|--|
| ADORA1 | TC01001683.hg.1 | JUC01014011.hg.1, JUC01014007.hg.1, JUC01014004.hg.1, JUC01014002.hg.1, PSR01026145.hg.1, PSR01026144.hg.1, PSR01026143.hg.1, PSR01026142.hg.1, PSR01026140.hg.1 |
| BIN1 | TC02002276.hg.1 | PSR02036545.hg.1, JUC02018933.hg.1, JUC02018945.hg.1, JUC02018952.hg.1, PSR02036560.hg.1, JUC02018927.hg.1, JUC02018944.hg.1, JUC02018953.hg.1, JUC02018934.hg.1, JUC02018949.hg.1, PSR02036546.hg.1, PSR02036552.hg.1, PSR02036554.hg.1, JUC02018925.hg.1, JUC02018931.hg.1, JUC02018932.hg.1, JUC02018935.hg.1, JUC02018936.hg.1, JUC02018940.hg.1, JUC02018941.hg.1, JUC02018947.hg.1, JUC02018950.hg.1, PSR02036550.hg.1, JUC02018928.hg.1 |
| CD40 | TC20000365.hg.1 | JUC20002886.hg.1, JUC20002888.hg.1, JUC20002894.hg.1, JUC20002887.hg.1, JUC20002899.hg.1, JUC20002891.hg.1, PSR20005321.hg.1, PSR20005325.hg.1 |
| CD46 | TC01001741.hg.1 | PSR01027306.hg.1, JUC01014686.hg.1, JUC01014693.hg.1, JUC01014696.hg.1, JUC01014699.hg.1 |
| CD86 | TC03000626.hg.1 | PSR03011311.hg.1, JUC03005645.hg.1, JUC03005648.hg.1, JUC03005650.hg.1, JUC03005644.hg.1, JUC03005649.hg.1, JUC03005652.hg.1, PSR03011309.hg.1, JUC03005646.hg.1, PSR03011306.hg.1, PSR03011319.hg.1, JUC03005655.hg.1 |
| CFLAR | TC02001174.hg.1 | JUC02009513.hg.1, PSR02017816.hg.1, JUC02009508.hg.1, PSR02017849.hg.1, PSR02017850.hg.1, PSR02017851.hg.1, PSR02017817.hg.1, PSR02017818.hg.1, JUC02009509.hg.1, PSR02017853.hg.1, PSR02017839.hg.1, PSR02017840.hg.1, PSR02017841.hg.1, PSR02017842.hg.1, PSR02017846.hg.1, PSR02017847.hg.1, PSR02017848.hg.1, PSR02017852.hg.1 |
| CSF1R | TC05001932.hg.1 TC05003302.hg.1 | PSR05026702.hg.1, PSR05026703.hg.1, PSR05026704.hg.1, JUC05013565.hg.1, JUC05013582.hg.1, JUC05013584.hg.1, PSR05026690.hg.1, JUC05013568.hg.1, PSR05026707.hg.1 |
| CTLA4 | TC02001201.hg.1 TC02003774.hg.1 | JUC02009886.hg.1, JUC02009885.hg.1, PSR02018473.hg.1, JUC02009880.hg.1, JUC02009881.hg.1, JUC02009882.hg.1, JUC02009884.hg.1 |
| DDX39B | TC06003338.hg.1 TC06004114.hg.1 TC6_apd_hap1000079.hg.1 TC6_cox_hap2000252.hg.1 TC6_dbb_hap3000231.hg.1 TC6_mann_hap4000202.hg.1 TC6_mcf_hap5000216.hg.1 TC6_qbl_hap6000230.hg.1 TC6_ssto_hap7000204.hg.1 | JUC06021554.hg.1, JUC06021559.hg.1, JUC06021571.hg.1, JUC06021581.hg.1, JUC06021566.hg.1, JUC06021575.hg.1, JUC06021579.hg.1, JUC06021556.hg.1, PSR06017448.hg.1, JUC06021572.hg.1, PSR06017444.hg.1, PSR06017445.hg.1, JUC6_mann_hap4001538.hg.1, JUC6_mann_hap4001543.hg.1, JUC6_mann_hap4001547.hg.1, JUC6_mann_hap4001559.hg.1, JUC6_mann_hap4001536.hg.1, JUC6_mann_hap4001551.hg.1, JUC6_mann_hap4001555.hg.1, JUC6_mann_hap4001540.hg.1, JUC6_mann_hap4001545.hg.1, PSR6_mann_hap4002315.hg.1, PSR6_mann_hap4002318.hg.1, JUC6_cox_hap2002065.hg.1, JUC6_cox_hap2002070.hg.1, JUC6_cox_hap2002074.hg.1, JUC6_cox_hap2002086.hg.1, JUC6_cox_hap2002063.hg.1, JUC6_cox_hap2002078.hg.1, JUC6_cox_hap2002082.hg.1, JUC6_cox_hap2002067.hg.1, JUC6_cox_hap2002072.hg.1, PSR6_cox_hap2002787.hg.1, PSR6_cox_hap2002790.hg.1, JUC6_dbb_hap3001921.hg.1, JUC6_dbb_hap3001926.hg.1, JUC6_dbb_hap3001930.hg.1, JUC6_dbb_hap3001942.hg.1, JUC6_dbb_hap3001919.hg.1, JUC6_dbb_hap3001934.hg.1, JUC6_dbb_hap3001938.hg.1, JUC6_dbb_hap3001923.hg.1, JUC6_dbb_hap3001928.hg.1, PSR6_dbb_hap3002700.hg.1, PSR6_dbb_hap3002703.hg.1, JUC6_mcf_hap5001873.hg.1, JUC6_mcf_hap5001878.hg.1, JUC6_mcf_hap5001882.hg.1, JUC6_mcf_hap5001894.hg.1, JUC6_mcf_hap5001871.hg.1, JUC6_mcf_hap5001886.hg.1, JUC6_mcf_hap5001890.hg.1, JUC6_mcf_hap5001875.hg.1, JUC6_mcf_hap5001880.hg.1, PSR6_mcf_hap5002457.hg.1, PSR6_mcf_hap5002460.hg.1, JUC6_qbl_hap6002042.hg.1, JUC6_qbl_hap6002047.hg.1, JUC6_qbl_hap6002051.hg.1, JUC6_qbl_hap6002063.hg.1, JUC6_qbl_hap6002040.hg.1, JUC6_qbl_hap6002055.hg.1, JUC6_qbl_hap6002059.hg.1, JUC6_qbl_hap6002044.hg.1, JUC6_qbl_hap6002049.hg.1, PSR6_qbl_hap6002768.hg.1, PSR6_qbl_hap6002771.hg.1, JUC6_ssto_hap7001796.hg.1, JUC6_ssto_hap7001804.hg.1, JUC6_ssto_hap7001806.hg.1, JUC6_ssto_hap7001817.hg.1, JUC6_ssto_hap7001794.hg.1, JUC6_ssto_hap7001809.hg.1, JUC6_ssto_hap7001813.hg.1, JUC6_ssto_hap7001799.hg.1, JUC6_ssto_hap7001805.hg.1, PSR6_ssto_hap7002456.hg.1, PSR6_ssto_hap7002459.hg.1 |
| EMC4 | TC15000233.hg.1 | PSR15001490.hg.1, JUC15000634.hg.1, JUC15000633.hg.1, JUC15000635.hg.1, JUC15000639.hg.1, JUC15000640.hg.1, JUC15000641.hg.1 |
| FOXP3 | TC0X001031.hg.1 | PSR0X013900.hg.1, JUC0X006956.hg.1, JUC0X006960.hg.1, JUC0X006961.hg.1 |
| GSDMB | TC17002851.hg.1 | JUC17018316.hg.1, JUC17018319.hg.1, JUC17018320.hg.1, JUC17018324.hg.1, JUC17018328.hg.1, JUC17018329.hg.1, JUC17018332.hg.1, JUC17018322.hg.1, JUC17018330.hg.1, JUC17018331.hg.1, PSR17019206.hg.1, PSR17019211.hg.1, JUC17018333.hg.1, PSR17019203.hg.1, PSR17019204.hg.1, PSR17019209.hg.1, JUC17018321.hg.1 |

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite. Legende siehe Seite 118.

| | | |
|---------------|---|--|
| IFNAR2 | TC21001060.hg.1 | PSR21000861.hg.1, PSR21000862.hg.1, PSR21000866.hg.1, JUC21005103.hg.1, JUC21005114.hg.1, JUC21005117.hg.1, JUC21005108.hg.1, JUC21005107.hg.1, PSR21000871.hg.1, PSR21000868.hg.1, PSR21000867.hg.1, PSR21000860.hg.1 |
| IL7 | TC08001350.hg.1 | JUC08008894.hg.1, JUC08008896.hg.1, JUC08008898.hg.1, JUC08008900.hg.1, JUC08008901.hg.1, JUC08008907.hg.1, JUC08008908.hg.1, JUC08008909.hg.1, JUC08008902.hg.1, PSR08017373.hg.1, PSR08017374.hg.1, PSR08017375.hg.1, PSR08017376.hg.1, JUC08008911.hg.1 |
| IL7R | TC05000159.hg.1 | PSR05001803.hg.1, JUC05000999.hg.1, JUC05001002.hg.1, JUC05001003.hg.1, JUC05001006.hg.1, JUC05001008.hg.1, PSR05001802.hg.1, PSR05001801.hg.1 |
| MBP | TC18000585.hg.1 | JUC18004088.hg.1, JUC18004093.hg.1, JUC18004095.hg.1, PSR18006159.hg.1, JUC18004099.hg.1, JUC18004106.hg.1, PSR18006161.hg.1, JUC18004105.hg.1, PSR18006188.hg.1, PSR18006189.hg.1, PSR18006191.hg.1, PSR18006194.hg.1, JUC18004087.hg.1, JUC18004090.hg.1, JUC18004096.hg.1, PSR18006163.hg.1 |
| MOG | TC06000322.hg.1 TC06002363.hg.1 TC06002364.hg.1 TC06002365.hg.1 TC06002367.hg.1 TC06002374.hg.1 TC6_apd_hap1000015.hg.1 TC6_cox_hap2000019.hg.1 TC6_dbb_hap3000015.hg.1 TC6_mann_hap4000016.hg.1 TC6_mcf_hap5000014.hg.1 TC6_qbl_hap6000014.hg.1 TC6_ssto_hap7000015.hg.1 | JUC06001137.hg.1, JUC06001139.hg.1, JUC06001141.hg.1, JUC06001142.hg.1, JUC06001145.hg.1, JUC06001147.hg.1, JUC06001130.hg.1, PSR06002530.hg.1, PSR06002529.hg.1, JUC06001150.hg.1, PSR06002519.hg.1, PSR06002521.hg.1, PSR06002523.hg.1, PSR06002524.hg.1, PSR06002525.hg.1, PSR06002527.hg.1, PSR06002528.hg.1, JUC06001151.hg.1, JUC6_apd_hap1000029.hg.1, JUC6_apd_hap1000034.hg.1, JUC6_apd_hap1000028.hg.1, JUC6_apd_hap1000039.hg.1, JUC6_apd_hap1000041.hg.1, JUC6_apd_hap1000037.hg.1, JUC6_apd_hap1000045.hg.1, JUC6_apd_hap1000027.hg.1, PSR6_apd_hap1000096.hg.1, PSR6_apd_hap1000090.hg.1, PSR6_apd_hap1000091.hg.1, PSR6_apd_hap1000093.hg.1, PSR6_apd_hap1000094.hg.1, PSR6_apd_hap1000095.hg.1, JUC6_apd_hap1000046.hg.1, JUC6_cox_hap2000042.hg.1, JUC6_cox_hap2000047.hg.1, JUC6_cox_hap2000041.hg.1, JUC6_cox_hap2000052.hg.1, JUC6_cox_hap2000054.hg.1, JUC6_cox_hap2000050.hg.1, JUC6_cox_hap2000040.hg.1, PSR6_cox_hap2000118.hg.1, PSR6_cox_hap2000109.hg.1, PSR6_cox_hap2000110.hg.1, PSR6_cox_hap2000112.hg.1, PSR6_cox_hap2000113.hg.1, PSR6_cox_hap2000114.hg.1, PSR6_cox_hap2000115.hg.1, JUC6_cox_hap2000058.hg.1, JUC6_cox_hap2000059.hg.1, JUC6_dbb_hap3000033.hg.1, JUC6_dbb_hap3000038.hg.1, JUC6_dbb_hap3000032.hg.1, JUC6_dbb_hap3000043.hg.1, JUC6_dbb_hap3000045.hg.1, JUC6_dbb_hap3000041.hg.1, JUC6_dbb_hap3000049.hg.1, JUC6_dbb_hap3000031.hg.1, PSR6_dbb_hap3000103.hg.1, PSR6_dbb_hap3000097.hg.1, PSR6_dbb_hap3000098.hg.1, PSR6_dbb_hap3000100.hg.1, PSR6_dbb_hap3000101.hg.1, PSR6_dbb_hap3000102.hg.1, JUC6_dbb_hap3000050.hg.1, JUC6_mann_hap4000034.hg.1, JUC6_mann_hap4000039.hg.1, JUC6_mann_hap4000033.hg.1, JUC6_mann_hap4000044.hg.1, JUC6_mann_hap4000046.hg.1, JUC6_mann_hap4000042.hg.1, JUC6_mann_hap4000050.hg.1, JUC6_mann_hap4000032.hg.1, PSR6_mann_hap4000105.hg.1, PSR6_mann_hap4000099.hg.1, PSR6_mann_hap4000100.hg.1, PSR6_mann_hap4000102.hg.1, PSR6_mann_hap4000103.hg.1, PSR6_mann_hap4000104.hg.1, JUC6_mann_hap4000051.hg.1, JUC6_mcf_hap5000032.hg.1, JUC6_mcf_hap5000037.hg.1, JUC6_mcf_hap5000031.hg.1, JUC6_mcf_hap5000042.hg.1, JUC6_mcf_hap5000044.hg.1, JUC6_mcf_hap5000040.hg.1, JUC6_mcf_hap5000048.hg.1, PSR6_mcf_hap5000100.hg.1, PSR6_mcf_hap5000103.hg.1, PSR6_mcf_hap5000094.hg.1, PSR6_mcf_hap5000095.hg.1, PSR6_mcf_hap5000097.hg.1, PSR6_mcf_hap5000098.hg.1, PSR6_mcf_hap5000099.hg.1, JUC6_mcf_hap5000049.hg.1, JUC6_qbl_hap6000032.hg.1, JUC6_qbl_hap6000037.hg.1, JUC6_qbl_hap6000031.hg.1, JUC6_qbl_hap6000042.hg.1, JUC6_qbl_hap6000044.hg.1, JUC6_qbl_hap6000040.hg.1, JUC6_qbl_hap6000048.hg.1, PSR6_qbl_hap6000097.hg.1, PSR6_qbl_hap6000098.hg.1, PSR6_qbl_hap6000091.hg.1, PSR6_qbl_hap6000092.hg.1, PSR6_qbl_hap6000094.hg.1, PSR6_qbl_hap6000095.hg.1, PSR6_qbl_hap6000096.hg.1, JUC6_qbl_hap6000049.hg.1, JUC6_ssto_hap7000035.hg.1, JUC6_ssto_hap7000040.hg.1, JUC6_ssto_hap7000034.hg.1, JUC6_ssto_hap7000045.hg.1, JUC6_ssto_hap7000047.hg.1, JUC6_ssto_hap7000043.hg.1, JUC6_ssto_hap7000051.hg.1, JUC6_ssto_hap7000033.hg.1, PSR6_ssto_hap7000101.hg.1, PSR6_ssto_hap7000095.hg.1, PSR6_ssto_hap7000096.hg.1, PSR6_ssto_hap7000098.hg.1, PSR6_ssto_hap7000099.hg.1, PSR6_ssto_hap7000100.hg.1, JUC6_ssto_hap7000052.hg.1 |
| NFAT5 | TC16000570.hg.1 | PSR16008225.hg.1, JUC16004601.hg.1, JUC16004605.hg.1, JUC16004611.hg.1, PSR16008222.hg.1, JUC16004600.hg.1, JUC16004607.hg.1, JUC16004620.hg.1, JUC16004599.hg.1 |
| NFATC1 | TC18000263.hg.1 | PSR18003107.hg.1, PSR18003108.hg.1, JUC18002086.hg.1, JUC18002087.hg.1, JUC18002088.hg.1, JUC18002092.hg.1, JUC18002094.hg.1, PSR18003112.hg.1, PSR18003114.hg.1, PSR18003113.hg.1, PSR18003106.hg.1 |
| PRKCA | TC17000783.hg.1 | PSR17010222.hg.1, PSR17010225.hg.1, PSR17010227.hg.1, PSR17010228.hg.1, JUC17005657.hg.1, JUC17005665.hg.1, PSR17010208.hg.1, JUC17005653.hg.1, JUC17005659.hg.1, JUC17005667.hg.1, JUC17005655.hg.1, JUC17005666.hg.1 |

Fortsetzung der Tabelle und Legende siehe nächste Seite.

| | | |
|------------------|--|--|
| PTPRC | TC01001640.hg.1 | PSR01025430.hg.1, JUC01013564.hg.1, JUC01013570.hg.1, JUC01013575.hg.1, JUC01013583.hg.1, PSR01025427.hg.1, PSR01025428.hg.1, PSR01025425.hg.1, PSR01025426.hg.1, JUC01013553.hg.1, JUC01013574.hg.1, JUC01013577.hg.1, JUC01013561.hg.1 |
| SP140 | TC02003877.hg.1 TC02005009.hg.1 | JUC02032042.hg.1, JUC02032057.hg.1, PSR02021458.hg.1, JUC02032071.hg.1, JUC02032045.hg.1, JUC02032058.hg.1, PSR02021456.hg.1 |
| TGM2 | TC20000833.hg.1 | PSR20011450.hg.1, JUC20005926.hg.1, JUC20005928.hg.1, JUC20005934.hg.1, PSR20011451.hg.1, PSR20011452.hg.1, PSR20011453.hg.1, PSR20011459.hg.1, PSR20011460.hg.1, PSR20011461.hg.1, PSR20011465.hg.1, PSR20011467.hg.1 |
| TNFRSF1A | TC12001135.hg.1 | PSR12014859.hg.1, JUC12008200.hg.1, JUC12008205.hg.1, JUC12008209.hg.1 |
| TNFRSF10B | TC08001048.hg.1 TC08001049.hg.1 TC08002256.hg.1 TC08002257.hg.1 | PSR08013349.hg.1, JUC08006924.hg.1 |
| TNFRSF10D | TC08001051.hg.1 | JUC08006932.hg.1, JUC08006929.hg.1, PSR08013375.hg.1 |
| TNFSF10 | TC03002006.hg.1 TC03003211.hg.1 | PSR03035844.hg.1, JUC03017709.hg.1, JUC03017708.hg.1, JUC03017711.hg.1, PSR03035843.hg.1, JUC03017706.hg.1, JUC03017707.hg.1 |

In der Tabelle sind für alle 27 Gene der systematischen Literaturrecherche die Sondensätze (engl. *probe sets*) der HTA 2.0 Microarrays für das Genlevel-*transcript cluster* (TC) mit der entsprechenden Identifikationsnummer (ID) angegeben. Zusätzlich sind in der Tabelle die für die Analyse der Expressionslevel analysierten Sondenidentifikationsnummern für Exonfragmente (*probe selection region*, PSR) und für die Verbindung zwischen zwei Exons (*junction*, JUC) aufgeführt.

HTA: *Human Transcriptome Array*

8.5. Thesen

1. Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die mit einer Entmarkung von Nervenzellen einhergeht. Die Erkrankung beginnt meist im jungen Erwachsenenalter und Frauen sind etwa dreimal häufiger betroffen als Männer.
2. Die Ätiopathogenese der Erkrankung ist bisher nicht geklärt, wobei genetische Varianten und verschiedene Umweltfaktoren sowie Lebensstile als Risikofaktoren für die Entstehung der MS beschrieben wurden. In der aktuell größten genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) wurden insgesamt 233 Einzelnukleotidpolymorphismen (engl. *single-nucleotide polymorphisms*, SNPs) mit dem Risiko, an MS zu erkranken, in Verbindung gebracht.
3. Das alternative Spleißen ist ein physiologischer Prozess, der während der Transkription von *precursor messenger RNA* (pre-mRNA) erfolgt und zur Diversität der Genprodukte beiträgt. Individuelle genetische Varianten können zu unterschiedlichen alternativen Spleißereignissen (ASE) beitragen. Für einige Erkrankungen wie der Muskeldystrophie Duchenne konnte bereits ein Zusammenhang von ASE auf die Krankheitsentstehung gezeigt werden.
4. Ziel dieser Studie war es, durch eine systematische Literaturrecherche bereits zu MS untersuchte alternative Spleißisoformen zu identifizieren und deren differentielle Expression in Transkriptomdaten von MS-Patienten der Rostocker Kohorte und gesunden Kontrollen zu validieren.
5. In der elektronischen Datenbank PubMed wurden mit den Suchbegriffen „splicing“ und „multiple sclerosis“ bis zum 20.03.2019 publizierte Arbeiten identifiziert. Weitere Arbeiten aus den Quellenangaben der identifizierten Artikel wurden ergänzt. Als Grundlage für die systematische Literaturrecherche dienten die Vorgaben der *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA), die von internationalen Forschungsgruppen erstellt wurden, und eigens festgelegte Auswahlkriterien.

6. Für die Reevaluation der in der Literatur untersuchten ASE wurden Transkriptomdaten von MS-Patienten einer Rostocker Kohorte und gesunden Kontrollen, aus der Datenbank *Genome Expression Omnibus*, in einer Art Fall-Kontrollstudie untersucht. Verglichen wurden dabei HTA 2.0 Microarraydatensätze von 5 verschiedenen Blutzellpopulationen (CD4+-, CD8+-, CD14+-, CD19+- und CD56+-Zellen) aus Blutproben von MS-Patienten mit vier gesunden Kontrollgruppen (Vollblutproben bzw. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) unter Verwendung des EventPointer-Algorithmus.
7. Die systematische Literaturrecherche ergab insgesamt 160 Artikel zum Thema alternatives Spleißen bei MS. Anhand der objektiven Auswahlkriterien wurden 36 Artikel, die alle in den letzten 2 Jahrzehnten publiziert wurden, als relevant identifiziert. Am häufigsten wurden in den 36 Studien Blutproben von MS-Patienten untersucht (n=32) und am häufigsten wurden PCR-basierte Verfahren für die Expressionsanalyse verwendet (n=27). In zwei der 36 Studien wurden ASE in Transkriptomdaten auf der Basis von RNA-Sequenzierungsverfahren bzw. Microarrays analysiert.
8. Zum Thema alternatives Spleißen bei MS wurden in den 36 recherchierten Artikeln Isoformen von insgesamt 27 verschiedenen Genen detektiert. Die meisten Gene (n=18) wurden bisher in nur einer Studie analysiert. Die in den Studien untersuchten Gene kodieren unter anderem für Zytokinrezeptoren, wie IL7R (Interleukin 7 Rezeptor), TNFRSF1A (Rezeptor für Tumornekrosefaktor 1A), CSF1R (koloniestimulierender Faktor-1-Rezeptor) und IFNAR2 (Interferonrezeptor alpha/beta 2), und sind in immunologische Prozesse eingebunden.
9. Das IL7R-Gen war das in der Literatur zu MS am häufigsten analysierte Gen. Das MS-Risikoallel des SNP rs6897932 im Exon 6 des IL7R-Gens führt durch ein erhöhtes Exon 6 *skipping* zu einer vermehrten Expression des löslichen IL7R. Die Validierung in Transkriptomdaten zeigte ebenfalls ein signifikant häufigeres Exon 6 *skipping* in CD4+ und CD8+ T-Zellen von MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

10. In der Reevaluation der bisher in der Literatur untersuchten ASE in Transkriptomdatensätzen von MS-Patienten der Rostocker Kohorte und gesunden Kontrollen konnte ein differentielles alternatives Spleißen der entsprechenden pre-mRNA von 19 der 27 bisher untersuchten Gene mit der *Transcriptome Analysis Console* (TAC) Software auf dem Signifikanzniveau von $\alpha=0,0001$ bestätigt werden. Für Transkriptisoformen des zytotoxischen T-Lymphozyten-assoziierten Protein 4 (CTLA4) wurden in CD4+- und CD8+-Zellen signifikant differentielle Expressionslevel bei MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen detektiert.
11. Zusammenfassend sind ASE bei MS bisher noch relativ wenig erforscht, aber die Anzahl der zu diesem Thema publizierten Artikel nimmt in den letzten Jahren zu. In weiterführenden Untersuchungen können bioinformatische Methoden zur Identifizierung von bisher unbekanntem MS-spezifischen ASE in Transkriptomdaten genutzt werden.
12. Zukünftige Untersuchungen von Genen, die in MS-assoziierten genetischen Regionen kodiert sind, können wichtige Informationen für das Verständnis der Pathogenese der Krankheit oder für das Ansprechen auf verschiedene Therapien liefern und zur Identifikation von neuen Biomarkern beitragen.

8.6. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Annelen Rüge, die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Wörtliche oder inhaltliche Zitate anderer Werke sind durch Angabe der Quellen kenntlich gemacht. Ich versichere, dass diese Arbeit weder in dieser noch in ähnlicher Form an einer anderen Fakultät oder Hochschule eingereicht wurde.

Annelen Rüge

8.7. Danksagung

Ich danke hiermit allen, die mit ihrer Hilfe und Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Uwe K. Zettl aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock für die Bereitstellung des Themas und die hervorragende Betreuung der Dissertation danken.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Michael Hecker für die herausragende Betreuung und die zahlreichen Treffen, bei denen er mir unter anderem die komplexen Analysemethoden der Genexpression näher brachte und ihn dabei nie die Geduld verließ. Zudem war er für mich bei allen Fragen jederzeit als Ansprechpartner verfügbar, hatte immer ein offenes Ohr bei Sorgen und Problemen und hat mich durch seine konstruktive Kritik stets motiviert, die Arbeit voranzutreiben.

Ich danke Herrn Dr. rer. nat. Dirk Koczan für die Durchführung der Mikrochipanalysen und die Bereitstellung der Daten am Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Rostock.

Ich danke Elena Putscher und Nina Boxberger aus der Sektion für Neuroimmunologie der Klinik und Poliklinik der Neurologie der Universitätsmedizin Rostock für die exzellente Zusammenarbeit und Prof. Dr. med. Paulus S. Rommer für die kritischen Anmerkungen zum bereits publizierten systematischen Review. Ines C. Angerer, Luisa Roch und Jörg Friess danke ich für die initiale Prozessierung der Rohdaten der Mikrochipanalysen. Ebenfalls möchte ich Dr. rer. nat. Brit Fitzner aus der Sektion für Neuroimmunologie der Klinik und Poliklinik der Neurologie der Universitätsmedizin Rostock für die Durchführung der verschiedenen Arbeitsschritte im Labor danken. Ich danke Ina Schröder aus der Sektion für Neuroimmunologie der Klinik und Poliklinik der Neurologie der Universitätsmedizin Rostock für die Patientenbetreuung und die Erhebung der klinischen Daten.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Großeltern für die unermüdliche Unterstützung, diese Arbeit fertigzustellen. Ich danke meinem Bruder Finn N. Rüge für Hilfestellung bei der Arbeit mit LibreOffice Calc und der Formatierung meiner Dissertationsschrift. Abschließend danke ich Fabiana Puglia sowohl für die moralische Unterstützung als auch für Tipps bei der Erstellung von Grafiken und für das Korrekturlesen.

8.8. Curriculum Vitae

Annellen Rüge

| | |
|---------------------|----------------------------------|
| Adresse | Friedlandstraße 4 23701 Eutin |
| Geburtsdatum | 8. Oktober 1992 |
| Geburtsort | Eutin |

Bildungsweg

| | |
|--------------------------------|---|
| 10/2013 bis 04/2019 | Studium der Humanmedizin, Universitätsmedizin Rostock, Abschluss: 2. Ärztliche Prüfung |
| 04/2013 bis 09/2013 | Ausbildung zur Rettungssanitäterin, Sanitätsschule Nord, Hutzfeld |
| 2009 bis 2012 | Berufliche Schule des Kreises Ostholstein, Eutin, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife |
| 2003 bis 2009 | Carl-Maria-von-Weber-Gymnasium, Eutin |

Medizinisch-praktische Tätigkeiten

| | |
|--------------------------------|---|
| 05/2019 bis 04/2020 | Praktisches Jahr |
| 1. Tertial | Innere Medizin Universitätsmedizin Rostock |
| 2. Tertial | Unfallchirurgie Klinikum Südstadt Rostock Allgemein- und Viszeralchirurgie Kantonsspital Luzern, Schweiz |
| 3. Tertial | Anästhesie Rotes Kreuz Krankenhaus Bremen |
| 10/2018 bis 01/2019 | Pflegehelferin in der Anästhesie Universitätsmedizin Rostock |
| 07/2012 bis 03/2013 | Freiwilliges Soziales Jahr in der SANA-Klinik Ostholstein, Eutin |

Wissenschaftliche Arbeit

seit 03/2016 **Promotion** zum Thema alternative Spleißvarianten als potentielle Biomarker bei multipler Sklerose“ an der Klinik und Poliklinik für Neurologie (Sektion Neuroimmunologie), Universitätsmedizin Rostock

Publikationen

05/2019 Hecker M, Rüge A, Putscher E, Boxberger N, Rommer PS, Fitzner B, Zettl UK. *Aberrant expression of alternative splicing events in multiple sclerosis - A systematic review*. Autoimmun Rev. 2019 Jul;18(7): 721-732. doi: 10.1016/j.autrev.2019.05.010.

03/2018 Angerer IC, Hecker M, Koczan D, Roch L, Friess J, Rüge A, Fitzner B, Boxberger N, Schröder I, Flechtner K, Thiesen HJ, Winkelmann A, Meister S, Zettl UK. *Transcriptome profiling of peripheral blood immune cell populations in multiple sclerosis patients before and during treatment with a sphingosine-1-phosphate receptor modulator*. CNS Neurosci Ther. 2018 Mar;24(3): 193-201.

Posterbeiträge

10/2018 Hecker M, Rüge A, Boxberger N, Fitzner B, Koczan D, Schröder I, Thiesen HJ, Zettl UK. *Reanalysis of alternatively spliced transcripts as potential blood biomarkers in multiple sclerosis*. 91. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 30. Oktober - 03. November 2018, Berlin, Deutschland.

10/2018 Hecker M, Rüge A, Boxberger N, Fitzner B, Koczan D, Schröder I, Thiesen HJ, Zettl UK. *Alternative splicing in multiple sclerosis: a systematic review of the literature and validation in transcriptome data*. 34th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS), 10. - 12. Oktober 2018, Berlin, Deutschland.

04/2018

Hecker M, Rüge A, Boxberger N, Fitzner B, Koczan D, Schröder I, Thiesen HJ, Zettl UK. *Differential expression of alternative splicing variants in individuals with relapsing-remitting multiple sclerosis*. 70th American Academy of Neurology (AAN) 2018 Annual Meeting, 21. - 27. April 2018, Los Angeles, Kalifornien, USA.

01/2018

Hecker M, Rüge A, Boxberger N, Fitzner B, Koczan D, Schröder I, Thiesen HJ, Zettl UK. *Reanalysis of alternative RNA splicing variants as potential blood biomarkers in MS*. MS Research Day 2018, 25. - 26. Januar 2018, Berlin, Deutschland.