

Aus dem Institut für Experimentelle Dermatologie
der Universität zu Lübeck

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Enno Schmidt

**Einfluss unterschiedlicher Diäten auf das Auftreten von
antinukleären Antikörpern bei Mäusen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Phillip Kouki
aus Dortmund

Lübeck 2020

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Ralf Ludwig

2. Berichtstatter/Berichtstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Horst Pagel

Tag der mündlichen Prüfung: 02.11.2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 02.11.2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Antikörper.....	2
1.1.2 Antinukleäre Antikörper.....	4
1.2 ANA assoziierte Autoimmunerkrankungen	5
1.2.1 Kollagenosen	6
1.2.1.1 Systemischer Lupus erythematodes	7
1.3 Molekulargenetik von Mäusen	10
1.3.1 Aufbau des Genoms von Säugetieren	10
1.3.2 ANA und Lupus bei Mäusen - Übertragbarkeit auf den Menschen	13
1.3.3 New Zealand mixed-, CAST/iJ-, MRL/MpJ-, BXD2-Mäuse	13
1.3.4 Induktion und Inhibition von Genen durch Umwelteinflüsse	15
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	18
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Versuchstiere.....	19
2.2 Haltungsdiäten und deren Inhaltsstoffe	19
2.3 Auflistung verwendeter Stoffe und Chemikalien	20
2.4 Mischverhältnisse der verwendeten Stoffe und Chemikalien.....	21
2.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien	22
2.6 Tierversuche	22
2.7 Herkunft der Versuchsmäuse	22
2.8 Unterbringung und Haltung.....	23
2.9 Einteilung der Diätgruppen	24
2.10 Probengewinnung und Tötung der Versuchstiere.....	24

2.11	Versuchsaufbau indirekter Immunfluoreszenztest	25
2.12	Statistische Analysen.....	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Auftreten von ANA im Serum im Gesamtkollektiv zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten.....	29
3.2	Zeitliche Unterschiede im Auftreten von ANA im Serum der AIL-Mäuse ..	31
3.2.1	Einfluss der Diät auf die Prävalenz der ANA in AIL- Mäusen	31
3.2.2	Quantitatives Auftreten von ANA im Serum der AIL-Mäuse zum Zeitpunkt 6 Monate.....	34
3.3	Gewichtsspezifische Unterschiede im Auftreten von ANA im Serum der AIL-Mäuse	36
3.3.1	Gewichtsentwicklung im zeitlichen Verlauf bei den einzelnen Diätgruppen	36
3.3.2	Gewicht und ANA im Serum zu den Zeitpunkten 2, 4 und 6 Monate	39
3.3.3	Prädiktiver Wert des Gewichtes auf die Entwicklung von ANA im Serum im Verlauf	41
3.3.3.1	Gewicht bei 2 Monaten.....	41
3.3.3.2	Gewicht bei 4 Monaten.....	42
3.3.4	Quantitatives Auftreten von ANA im Serum zum Zeitpunkt 6 Monate	42
3.4	Geschlechtsspezifische Unterschiede im Auftreten von ANA im Serum der AIL-Mäuse	44
3.4.1	ANA im Serum der AIL-Mäuse nach 2, 4 und 6 Monaten	44
3.4.2	Quantitatives Auftreten von ANA im Serum zum Zeitpunkt 6 Monate	46
4	Diskussion	48
4.1.	Indirekter Immunfluoreszenztest und Anstieg von ANA im Serum im zeitlichen Verlauf	48

4.2	Diät Unterschiede bei 2, 4 und 6 Monaten.....	49
4.2.1	Auftreten von ANA im Serum nach 2, 4 und 6 Monaten.....	49
4.2.2	Quantitatives Auftreten von ANA im Serum der AIL-Mäuse zum Zeitpunkt 6 Monate.....	50
4.3	Gewichtsspezifische Unterschiede im Auftreten von ANA im Serum der AIL-Mäuse	51
4.3.1	Gewichtsentwicklung im zeitlichen Verlauf bei den einzelnen Diätgruppen	52
4.3.2	Gewicht und ANA im Serum zum Zeitpunkt 2, 4 und 6 Monate	52
4.3.3	Prädiktiver Wert des Gewichtes auf die Entwicklung von ANA im Serum im zeitlichen Verlauf	53
4.3.4	Quantitatives Auftreten von ANA im Serum zum Zeitpunkt 6 Monate	54
4.4	Geschlechtsspezifische Unterschiede im Auftreten von ANA im Serum der AIL-Mäuse	55
4.4.1	ANA im Serum der AIL-Mäuse nach 2, 4 und 6 Monaten	55
4.4.2	Quantitatives Auftreten von ANA im Serum zum Zeitpunkt 6 Monate	56
4.5	Klinische Relevanz und Ausblick	57
5	Zusammenfassung.....	60
6	Literaturverzeichnis.....	62
7	Abbildungsverzeichnis	74
8	Tabellenverzeichnis.....	76
9	Anhänge	77
10.	Danksagung.....	78
11.	Lebenslauf	79

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AIL	autoimmunity-prone intercross line
AK	Antikörper
ANA	antinukleäre/r Antikörper
Anti-dsDNA-AK	Antikörper gegen doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ARD	autoimmune rheumatic disease/s
AS	Aminosäure
AT	Autoimmunthyreoditis
Auto-AK	Autoantikörper
B-Lymphozyten	Bone-marrow-Lymphozyten
BP	Basenpaare
CALR	kalorienreduzierte Diät
CONT	Kontroll Diät
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment cristallsable
g	Gramm
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
GTH	Gemeinsame Tierhaltung
GTP	Guanosintriphosphat
HT	Hashimoto Thyreoiditis
Ig	Immunglobulin/e
IIF-Test	indirekter Immunfluoreszenztest
IL	Interleukin
MRL	Murphy Roths Large
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MTX	Metotrexat
NK-Zellen	Natural-Killer-Zellen
NZB/W	New Zealand black/white

NZM	New Zealand mixed
PAS-Färbung	periodic acid-Schiff-Färbung
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline + Tween 20
Prä-mRNA	prä-messenger RNA
RNA	Ribonukleinsäure
s.	siehe
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
T-Lymphozyten	Thymus-Lymphozyten
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
tRNA	transfer RNA
UE	Untereinheit/en
WD	western Diät

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Zum Schutz gegen schädigende, äußere Einflüsse hat der menschliche Körper im Laufe seiner entwicklungsgeschichtlichen Entstehung diverse Abwehrmechanismen entwickelt, die im Allgemeinen mit dem Überbegriff „Immunsystem“ beschrieben werden. Dieses besteht aus zwei Komponenten, dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem (Murphy et al., 2009a; Schütt und Bröker, 2009). Vor allem pathogene Mikroorganismen, denen es gelingt, die mechanischen epithelialen Schutzbarrieren zu überwinden, und in den Körper einzudringen, lösen eine Immunantwort, also eine Reaktion des Immunsystems auf den eindringenden Organismus, aus. In kürzester Zeit reagiert das angeborene Immunsystem, indem phagozytierende Zellen mit Hilfe unspezifischer Rezeptoren die Antigenstruktur des eindringenden Mikroorganismus erkennen und diesen anschließend zerstören können (Murphy et al., 2009a; Schütt und Bröker, 2009). Dadurch ist eine weitere Ausbreitung des Pathogens zunächst verlangsamt (Murphy et al., 2009a; Schütt und Bröker, 2009). Allerdings ist das angeborene Immunsystem nicht in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln, das heißt, es ist, mit wenigen Ausnahmen (O’Leary et al., 2006), nicht fähig, Gedächtniszellen zu entwickeln, die die Antigenstruktur des pathogenen Mikroorganismus dauerhaft tragen, um bei einer erneuten Invasion desgleichen Pathogens noch schneller und effektiver agieren zu können (Murphy et al., 2009a; Schütt und Bröker, 2009). Die Immunantwort des erworbenen Immunsystems erfolgt zeitlich verzögert, da dessen Zellen erst durch Interleukin (IL) vermittelte Chemotaxis an den Ort der Infektion gelockt werden müssen (Murphy et al., 2009a; Schütt und Bröker, 2009). Im Allgemeinen umfasst sie zwei Zelltypen, die Thymus-Lymphozyten (T-Lymphozyten) und die Bone-marrow-Lymphozyten (B-Lymphozyten) (Murphy et al., 2009a; Schütt und Bröker, 2009). Die T-Lymphozyten teilen sich weiter auf in die T-Helfer-Zellen, deren Aufgabe es ist, weitere Immunzellen zu rekrutieren, die zytotoxischen T-Zellen und die Natural-Killer-Zellen (NK-Zellen), die das Pathogen direkt angreifen, die regulatorischen T-Zellen, die zur Regulation der Intensität der

Immunantwort dienen, und die T-Gedächtniszellen, die anders als beim angeborenen Immunsystem dazu in der Lage sind, Informationen über das eindringende Agens zu speichern und bei einem eventuellen erneuten Kontakt mit diesem Mikroorganismus eine raschere Immunreaktion einleiten können (Murphy et al., 2009a; Schütt und Bröker, 2009). Eine Sonderstellung nehmen die B-Lymphozyten ein, die sich zu Plasmazellen weiterentwickeln können. Diese besitzen die Fähigkeit, Antikörper zu bilden und zu sezernieren (Murphy et al., 2009a; Schütt und Bröker, 2009). Es erfolgt eine direkte Reaktion mit dem eindringenden Pathogen, und sie markieren die Pathogene entweder für eine anschließende Phagozytose, oder sie aktivieren das Komplementsystem auf dem klassischen Weg, wodurch das Pathogen durch Lyse zerstört wird (Murphy et al., 2009a; Schütt und Bröker, 2009).

1.1.1 Antikörper

Die von den B-Lymphozyten (Plasmazellen) gebildeten und sezernierten Antikörper (AK) sind Proteine, die unter dem Oberbegriff Immunglobuline (Ig) zusammengeführt werden (Gulbins und Lang, 2004; Murphy et al., 2009b; Riede und Schaefer, 2001; Schütt und Bröker, 2009). Grundsätzlich erfüllen sie zwei Aufgaben: die Bindung der Antigenstrukturen von in den Organismus eingedrungenen Pathogenen und die daraus resultierende gemeinsame Zerstörung der Erreger mit Hilfe anderer Immunzellen (Gulbins und Lang, 2004; Murphy et al., 2009b; Riede und Schaefer, 2001; Schütt und Bröker, 2009). Es existieren fünf Klassen von Ig: IgG, IgM, IgD, IgE und IgA (Gulbins und Lang, 2004; Murphy et al., 2009b; Riede und Schaefer, 2001; Schütt und Bröker, 2009). Im strukturellen Aufbau ähneln alle fünf Klassen der AK dem Buchstaben „Y“. Sie bestehen aus etwa drei gleich großen Abschnitten, die über ein bewegliches Gerüst locker miteinander verbunden sind (Gulbins und Lang, 2004; Murphy et al., 2009b; Riede und Schaefer, 2001; Schütt und Bröker, 2009). Die beiden Schenkel der V-Region an der Spitze des AK bilden das Fragment antigen binding (Fab) und variieren unter den einzelnen Klassen (Gulbins und Lang, 2004; Murphy et al., 2009b; Riede und Schaefer, 2001). Das Fab setzt sich aus je zwei leichten (VL = variabel/light und CL = constant/light) und zwei schweren (VH = variabel/heavy und CH = constant/heavy) Ketten zusammen (Gulbins und Lang, 2004; Murphy et

al., 2009b; Riede und Schaefer, 2001; Schütt und Bröker, 2009). Die beiden endständigen Domänen sind für die Bindung des jeweiligen Antigens (Ag) verantwortlich und können je nach AK variieren. An den schweren Ketten sind sie über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden (Gulbins und Lang, 2004; Murphy et al., 2009b; Riede und Schaefer, 2001; Schütt und Bröker, 2009). Über die Hinge-Region ist das obere Fab mit dem darunter liegenden Fragment cristallisable (Fc) ebenfalls kovalent durch Disulfidbrücken gebunden (Gulbins und Lang, 2004; Murphy et al., 2009b; Riede und Schaefer, 2001; Schütt und Bröker, 2009). Das Fc dient zur Bindung an die phagozytierenden Immunzellen. Es setzt sich anders als die Domänen des Fab aus vier schweren Ketten (CH = constant/heavy) zusammen (Gulbins und Lang, 2004; Murphy et al., 2009b; Riede und Schaefer, 2001; Schütt und Bröker, 2009).

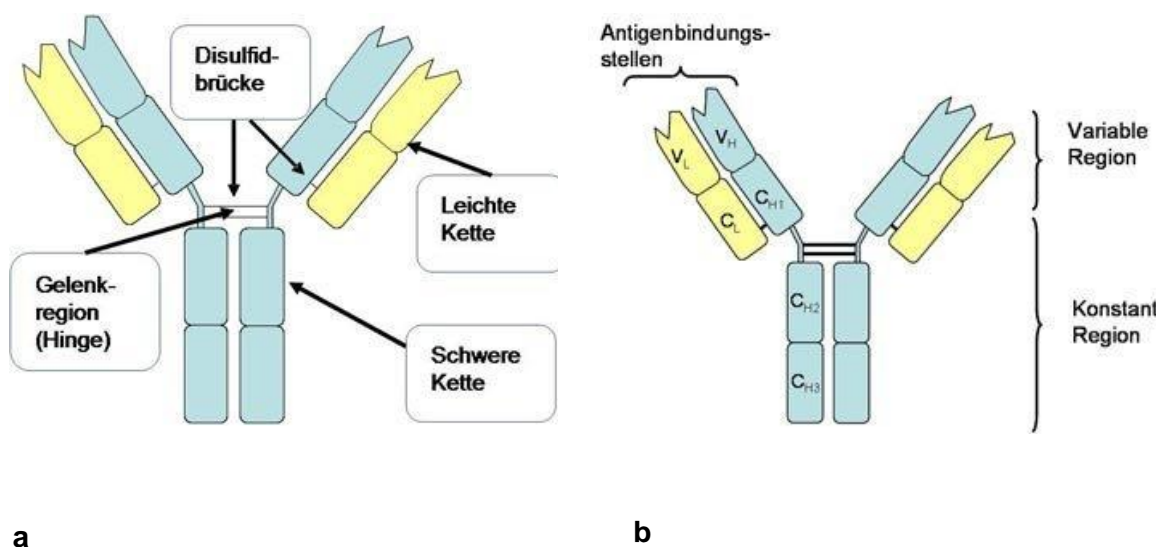


Abbildung 1a-b: IgG Antikörperstruktur: das Heterotetramer ist achsensymmetrisch aus je zwei leichten und zwei schweren Ig-Ketten aufgebaut. Diese bestehen aus einer variablen und einer konstanten Region. Zwischen der ersten und zweiten konstanten Region der schweren Kette befindet sich eine Gelenkregion (Hinge), welche das so genannte Fab (Fragment antigen binding) und das Fc (Fragment cristallsable) über Disulfidbrücken verbindet. Hypervariable Domänen der leichten und schweren Kette bilden gemeinsam die Antigenbindungsstellen, von denen der AK zwei identische besitzt. (Schütt und Bröker, 2009a) (Quelle: <https://www.antikoerper-online.de/resources/16/1208/antikoerper/>).

1.1.2 Antinukleäre Antikörper

Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, dienen AK der Immunabwehr und somit dem Schutz eines Organismus vor Pathogenen der Umwelt (Gulbins und Lang, 2004; Murphy et al., 2009b; Riede und Schaefer, 2001; Schütt und Bröker, 2009). Die AK durchlaufen während ihrer Entwicklung einen Reifungsprozess, welcher an unterschiedlichen Stellen durch diverse Einflüsse gestört werden kann (Riede und Schaefer, 2001). Während dieser Reifung kann es passieren, dass die Ausbildung einer Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Strukturen gestört wird und zur Ausbildung von Autoantikörpern (Auto-AK) führt (Murphy et al., 2009c; Riede und Schaefer, 2001). Bereits Paul Ehrlich erkannte, dass Auto-AK körpereigene Strukturen als Fremd anerkennen und sogar im Rahmen einer Immunantwort schädigen können (Murphy et al., 2009c; Riede und Schaefer, 2001). Er nannte diesen Vorgang „horror autotoxicus“ (Riede und Schaefer, 2001). Gleiches gilt für antinukleäre Antikörper (ANA) (Murphy et al., 2009c; Riede und Schaefer, 2001). Die Entstehung von ANA beginnt mit der B-Lymphozyten-Reifung im Knochenmark (Murphy et al., 2009c; Riede und Schaefer, 2001). Hierbei reifen B-Vorläuferzellen heran, die auf ihrer Zelloberfläche s(=surface)IgM exprimieren (Murphy et al., 2009c). Dieser auf der Zelloberfläche gebundene AK dient als frühes Testverfahren, um eine Autoreaktivität der heranreifenden B-Zellen zu detektieren. Da dieser Vorgang bereits im Knochenmark erfolgt, wird er als zentrale Toleranz bezeichnet (Murphy et al., 2009c). Trifft die unreife B-Zelle auf ein stark quervernetzendes Ag (hohes autoreaktives Potential der unreifen B-Zelle) wird die weitere Zellreifung angehalten und die Apoptose eingeleitet (Murphy et al., 2009c). Dieses Verfahren der klonalen Deletion ist allerdings nicht die einzige Möglichkeit des Organismus gegen autoreaktive unreife B-Zellen vorzugehen. Die noch unreife B-Zelle kann mit Hilfe einer Genumlagerung den autoreaktiven Rezeptor gegen einen Rezeptor ohne autoreaktives Potential tauschen und somit der klonalen Deletion entgehen. Dieser als Rezeptor Editing bezeichnete Prozess endet selbstständig, sobald ein Rezeptor ohne autoreaktives Potential entstanden ist (Murphy et al., 2009c). Bei einem Zusammentreffen mit einem weniger stark quervernetzenden Autoantigen mit entsprechend weniger Bindungsstellen für die IgM-Rezeptoren der unreifen B-Lymphozyten, kann die B-Lymphozyt in den Zustand der Anergie eintreten. Das bedeutet, dass diese Zellen

nicht auf Ag reagieren und auch nicht durch antigenspezifische T-Zellen aktiviert werden können, sondern dauerhaft in einem inaktivierten Zustand verbleiben (Murphy et al., 2009c). Eine weitere Möglichkeit ist die immunologische Ignoranz der autoreaktiven unreifen B-Lymphozyten. Hierbei ist die Affinität zwischen Ag und AK so gering, dass nahezu keine Immunreaktion stattfindet (Murphy et al., 2009c). Zudem ist das Zusammentreffen dieser B-Vorläuferzellen mit dem entsprechenden Ag eher unwahrscheinlich, da diese Ag nicht fähig sind, in primäre lymphatische Organe, wie das Knochenmark, zu migrieren. Werden jedoch zu viele autoreaktive B-Lymphozyten bereits in der Entwicklungsphase vernichtet, besteht die Gefahr, dass die Vielfalt der Immunzellen zu gering ist, um adäquat gegen Pathogene vorzugehen (Murphy et al., 2009c). Bei der Schaffung dieser Balance ist es möglich, dass einige autoreaktive unreife B-Lymphozyten zu adulten B-Lymphozyten heranreifen und eine der vielen Autoimmunerkrankungen verursachen können (Murphy et al., 2009c). Proliferieren reife B-Lymphozyten mit entsprechendem autoaggressiven Potential weiter zu Plasmazellen, ist es ihnen möglich, AK zu sezernieren, die körpereigene Strukturen binden und eliminieren (Murphy et al., 2009c; Riede und Schaefer, 2001). Im Fall der Kollagenosen sind diese AK gegen Proteine, die im Zellkern von Bindegewebszellen gelegen sind, gerichtet. IgG-, IgM- und IgA-AK bilden die häufigsten AK bei dem systemischen Lupus erythematodes (SLE) und der progressiven systemischen Sklerose (Gonzalez und Rothfield, 1966). Der Nachweis über das Vorhandensein von Auto-AK im menschlichen Organismus erfolgt über die Testung des Blutserums mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz (IIF-Test) (s. Methoden).

1.2 ANA assoziierte Autoimmunerkrankungen

Autoimmunerkrankungen umfassen einen großen Bereich autoaggressiver Erkrankungen, bei denen sowohl humorale als auch zelluläre Immunverbände körpereigene Zellbestandteile angreifen und schädigen (Riede und Schaefer, 2001). Die genaue Ätiopathogenese ist derzeit noch nicht abschließend geklärt, jedoch werden zwei Theorien diskutiert:

1. Klon-Eliminierungshypothese

Diese Theorie besagt, dass während der frühkindlichen T-Zell-Reifung im Thymus T-Zell-Klone, die mit Autoantigenen in Kontakt getreten sind, im Regelfall eliminiert werden. Somit dürften im adulten Organismus keine autoaggressiven Zellen vorhanden sein, die körpereigene Strukturen angreifen. Tatsächlich entgeht eine gewisse Menge an T-Zell-Klonen dieser Aussortierung, jedoch sind sie in einer so geringen Konzentration im Organismus vertreten, dass sie keinen manifesten Krankheitsausbruch einer Autoimmunerkrankung auslösen können. Daher bezieht sich der Erklärungsansatz dieser Theorie auf die Hypothese, dass der Ausbruch einer Autoimmunerkrankung auf eine somatische Zellmutation zurückzuführen sei (Riede und Schaefer, 2001).

2. Suppression autoreaktiver Lymphozyten

Gegenstand dieser Theorie ist die Annahme, dass Lymphozytenstammzellen mit dem Potential zur Autoaggressivität vorhanden sind, diese jedoch durch T-Suppressorzellen im Rahmen der zentralen Toleranz unterdrückt werden. Andere Beobachtungen sprechen dafür, dass T-Helfer-Zellen die Synthese von Autoantikörpern durch B-Zellen fördern (Riede und Schaefer, 2001).

1.2.1 Kollagenosen

Der Begriff der Kollagenosen wurde durch den US-amerikanischen Pathologen Paul Klemperer in den 1940er Jahren geprägt. Er umfasst eine Reihe von Krankheitsbildern, die chronisch rezidivierend verlaufen, zu generalisierten Bindegewebsveränderungen führen und mit einer fibrinoiden Kollagennekrose einhergehen (Amberger et al., 2012). Sie sind gekennzeichnet durch eine disseminierte Entzündungsreaktion in Form einer Immunkomplexbildung gegen körpereigene Zellbestandteile und zählen somit zu den Autoaggressionskrankheiten (Riede und Schaefer, 2001). Das klinische und serologische Bild der jeweiligen Kollagenoseformen kann im Einzelnen variieren und weist spezielle krankheitscharakteristische Veränderungen auf (Amberger et al., 2012). Dazu zählen ein Multiorganbefall, sowie ein sehr variabler Krankheitsverlauf (Kavanaugh et al., 2000).

Serologisch imponieren ANA, die bei einer Erkrankung aus diesem Formenkreis sehr typisch sind (Riede und Schaefer, 2001). Die exakte Ätiologie ist bislang nicht abschließend geklärt (Riede und Schaefer, 2001). Kyogoku et al. fanden jedoch bei der Genotypisierung von 525 weißen US-Amerikanern mit SLE heraus, dass bei einer signifikant höheren Anzahl an Patienten als in der Kontrollgruppe ein Polymorphismus im PTPN22 R620W Allel zu finden ist (Kyogoku et al., 2004), sodass eine genetische Assoziation nachgewiesen wurde.

1.2.1.1 Systemischer Lupus erythematodes

Ätiopathogenese: Der SLE ist eine seltene Autoimmunerkrankung mit einer Prävalenz von circa 20-50/100.000 Einwohnern und betrifft vornehmlich das weibliche Geschlecht (Amberger et al., 2012; Kleinert et al., 2010; www.rheuma-liga.de). Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 20. und 50. Lebensjahr (Amberger et al., 2012; www.rheuma-liga.de). Im Rahmen dieser Erkrankung kommt es zu Zell- und Gewebeschäden unterschiedlicher Organe durch Immunkomplexbildung (Amberger et al., 2012; Strickland et al., 2013). ANA vom Typ der AK gegen doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (Anti-ds-DNA-AK) nehmen beim SLE eine Schlüsselrolle ein (Amberger et al., 2012; Kleinert et al., 2010; Riede und Schaefer, 2001; Strickland et al., 2013; www.rheuma-liga.de).

Symptome: Bei der Vielzahl von Symptomen kann man zwischen Allgemeinsymptomen und krankheitsspezifischen Symptomen unterscheiden (Amberger et al., 2012; Jacob et al., 2011). Im Allgemeinen klagen die Patienten über sehr unspezifische Symptome wie eine generelle Abgeschlagenheit, Müdigkeit, Kältegefühl, Gewichtsverlust und Fieber (Amberger et al., 2012; Kleinert et al., 2010; www.rheuma-liga.de). Sehr charakteristisch und krankheitsspezifisch für den SLE ist das Schmetterlingserythem der Wangenhaut und der Haut des Nasenrückens, häufig auch in Verbindung mit einer Überempfindlichkeitsreaktion der Haut bei Sonnenexposition (Amberger et al., 2012). Die Lupusnephritis tritt bei mehr als 40% der Patienten mit SLE auf und ist ein wichtiger Prognosefaktor für die Morbidität und Mortalität (Amberger et al., 2012). Durch DNA/anti-ds-DNA-AK-Komplexe entstandene Schäden an den Glomeruli können Funktionsstörungen der glomerulären Filtrationsleistung, wie eine asymptomatische Proteinurie,

glomeruläre Hämaturie, akutes nephritisches Syndrom, nephrotisches Syndrom bis hin zur chronischen Niereninsuffizienz mit renoparenchymatöser Hypertonie auftreten (Amberger et al., 2012; www.rheuma-liga.de). Eine Immunkomplex-Glomerulonephritis ist Ausdruck dieser sich in VI Klassen aufteilende Nierenfunktionsstörung. Zudem kann häufig eine Polyarthritits ohne erosive Veränderungen der Gelenke beobachtet werden (Amberger et al., 2012). Am Herzen tritt häufiger eine Entzündung der Koronargefäße im Sinne einer Koronaritis auf, die mit einem erhöhten Risiko einer im Verlauf auftretenden koronaren Herzkrankheit mit gesteigertem kardiovaskulärem Risiko einhergeht (Amberger et al., 2012; Kleinert et al., 2010). Endokarditis, Myokarditis, Perikarditis bzw. Pleuritis sind ebenfalls Manifestationen einer Herzbeteiligung bei SLE (Amberger et al., 2012; Kleinert et al., 2010). Eine Beteiligung des Nervensystems ist ebenso möglich und kann sich durch depressive Verstimmungen und eine Minderung der Vigilanz, aber auch durch Symptome einer Hirnischämie, eines Krampfleidens oder dem Bild einer Multiplen Sklerose (MS) manifestieren (Amberger et al., 2012).

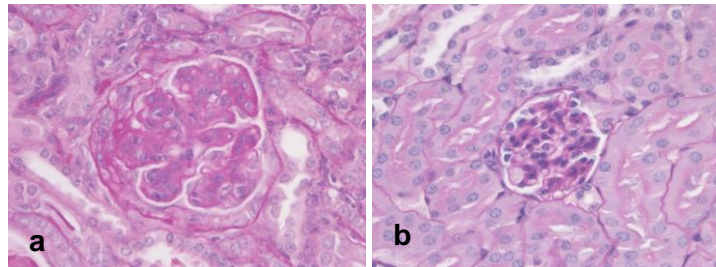


Abbildung 2a-b: a: Immunkomplexglomerulonephritis bei einer Maus (PAS-(periodic acid-Schiff) Färbung / x 400)
b: Glomerulus einer gesunden Maus (PAS- Färbung/ x 400)

Diagnostik: Einen ersten Hinweis auf das Vorliegen eines SLE können allgemeine laborchemische Veränderungen, wie eine beschleunigte Blutsenkungsgeschwindigkeit oder Veränderungen des Blutbildes im Sinne einer Leuko- oder Thrombozytopenie liefern (Amberger et al., 2012; www.rheuma-liga.de). Das Auftreten von Anti-dsDNA-AK im Serum ist ein für den SLE typischer Befund (Amberger et al., 2012; Kleinert et al., 2010; www.rheuma-liga.de). Komplementverbrauch und zirkulierende Immunkomplexe geben Aufschluss über die Krankheitsaktivität. Die Diagnose gilt als gesichert wenn fünf der zwanzig SLE-Diagnose-Kriterien des American College of Rheumatology positiv sind (Amberger et al., 2012; www.rheumatology.org).

SLE-Diagnose-Kriterien (Aringer et al., 2019):

1. Schmetterlingserythem
2. Diskoider Lupus erythematodes
3. ANA
4. Anti-dsDNA-AK oder anti-SM-AK
5. Fieber
6. Leukozytopenie
7. Thrombozytopenie
8. Autoimmunhämolyse
9. Delir
10. Psychose
11. Krampfanfälle
12. Haarausfall
13. Orale Ulzerationen
14. Pleuraerguss
15. Akute Perikarditis
16. Gelenkbeteiligung
17. Proteinurie > 0,5g/ 24h
18. Lupus nephritis Grad II-V
19. Antiphospholipid AK
20. Geringes C3 und/ oder C4 im Serum



Abbildung 3a-b: Schmetterlingserythem bei SLE (Quelle: Springer Medizin | Internist 2019; 60(2):193–201©)

Therapie: Die Therapie des SLE richtet sich nach Ausmaß und Beteiligung der jeweiligen Organsysteme. Bei Reaktion auf ultraviolettes Licht empfiehlt sich eine

strikte Karenz mit Lichtschutzmaßnahmen größer 60 (Amberger et al., 2012; www.rheuma-liga.de; www.rheumatology.org). Bei leichten Verlaufsformen ohne Organbeteiligung ist der Einsatz von nichtsteroidalen Antirheumatika in Kombination mit einem Chloroquin-Derivat die Therapie der Wahl (Amberger et al., 2012; www.rheuma-liga.de; www.rheumatology.org). Schwere Verlaufsformen mit Organbeteiligung erfordern den Einsatz von hochdosierten Glukokortikoid-Stoßtherapien oder weiterer immunsupprimierender Substanzen, wie Azathioprin und Metotrexat (MTX) (Amberger et al., 2012; www.rheuma-liga.de; www.rheumatology.org). Der monoklonale AK Belimumab ist ein bei schweren Krankheitsverläufen die Standardtherapie zusätzlich unterstützendes Biologikum. Die Lupusnephritis bedarf einer intravenösen Induktionstherapie mit Glukokortikoiden und Cyclophosphamid (Amberger et al., 2012; www.rheuma-liga.de; www.rheumatology.org).

1.3 Molekulargenetik von Mäusen

Im folgenden Abschnitt soll beleuchtet werden, warum sich Mäuse besonders gut als Versuchstiere für die Bestrebungen unserer Arbeit eignen. Dazu wird ein grundsätzlicher Überblick über die Molekulargenetik, das Thema „knock out“ und die Induktion und Inhibition von Genen durch Umwelteinflüsse geschaffen.

1.3.1 Aufbau des Genoms von Säugetieren

Das Genom, die Erbinformation eines jeden Lebewesens, ist bei eukaryoten Organismen, wie Menschen und Mäusen, zum größten Teil im Zellkern einer Zelle gelegen. Die Grundbausteine bilden die vier stickstoffhaltigen Basen Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin, die sich in unterschiedlicher Reihenfolge, jeweils gebunden an ein Zuckermolekül, der Desoxyribose, die mit einem Phosphat-Molekül verbunden ist, zusammenschließen. Dieser Komplex wird als Nukleotid bezeichnet und verbindet sich mit anderen Nukleotiden, sodass ein langkettiges Molekül entsteht.

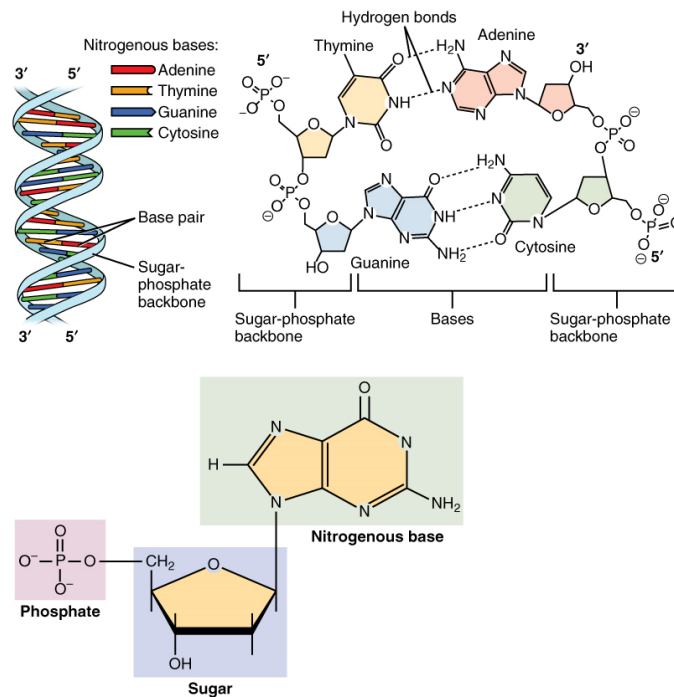


Abbildung 4: DNA-Aufbau (Quelle: www.lecturio.de©)

Eine Sequenz aus drei Basen, ein sogenanntes Basentriplett, kodiert für eine der insgesamt 20 proteinogenen Aminosäuren (AS). Eine zweite Kette mit einer komplementären Basenfolge verläuft parallel in entgegengesetzter Richtung. Die sich gegenüberstehenden Basenstränge verbinden sich zu einem einzelnen Basenstrang, wobei sich immer ein Adenin mit einem Thymin und ein Cytosin mit einem Guanin paart. Diese doppelsträngige Verbindung wird Desoxyribonukleinsäure (DNA) genannt und windet sich um die eigene Längsachse, sodass eine helikale Struktur entsteht, die Alpha-Helix. Mit Hilfe von Stütz- und Bindungsproteinen ist eine weitere Faltung zu Chromatin möglich. In der Metaphase der Mitose wird die maximale Kondensation des DNA-Moleküls erreicht, es entsteht die im Lichtmikroskop erkennbare Chromosomen-Struktur. In jedem Zellkern finden sich 46 Autosomen und zwei das Geschlecht bestimmende Gonosomen: XX für das weibliche Geschlecht und XY für das männliche Geschlecht. Um ein Gen für ein neu zu synthetisierendes Protein ablesen zu können, muss an der für dieses Protein kodierenden Stelle die Faltung wieder aufgehoben werden. Diese Reaktion wird durch die DNA-abhängige-Ribonukleinsäure (RNA)-Polymerase katalysiert und teilt sich in drei aufeinanderfolgende Reaktionsschritte: die Initiation, die Elongation und die Termination. Die Promotor-Region stellt den Anfang des zu codierenden Abschnittes des

Matritzenstranges dar. Den Schluss des abzulesenden Genabschnittes bildet die Terminator-Region. Am Ende dieser drei Reaktionsschritte steht ein Transkript der DNA, die prä-messenger(m)RNA. Die Ribonukleinsäuren ähneln der DNA, allerdings weisen sie wesentliche Unterschiede auf, wie beispielsweise, dass anstelle der in der DNA verwendeten Base Thymin die Base Uracil verwendet wird. Um den Zellkern zu verlassen, um zu den Ribosomen zur weiteren Proteinsynthese zu gelangen, muss die prä-mRNA zunächst in eine biologisch aktive Form, die mRNA, überführt werden. Dieser als Splicing bezeichnete Vorgang entfernt die nicht für ein Protein kodierenden Intron-Sequenzen aus der prä-mRNA, sodass am Ende nur die kodierenden Exon-Sequenzen übrig bleiben. Die so entstandene mRNA kann nun über nukleäre Poren zu den im Zytoplasma gelegenen Ribosomen gelangen. Dort erfolgt mit Hilfe der transfer (t)RNA die als Translation bezeichnete Verknüpfung der proteinogenen AS zu einer Polypeptidkette. Die tRNA besteht immer aus einem Basentriplet, das für eine spezifische AS der 20 proteinogenen AS kodiert, die an die tRNA gebunden sind. Solange kein aktiver Translationsvorgang abläuft, sind die Ribosomen als zwei voneinander getrennte Untereinheiten (UE) im Zytoplasma gelöst. Sie teilen sich in eine kleine 40S UE und eine große 60S UE auf. Zunächst bindet die kleine 40S UE an der Erkennungssequenz der mRNA. Daraufhin bindet die mit der AS beladene tRNA am Startcodon der mRNA und komplettiert den Initiationskomplex. Nun folgt die große 60S UE und gelangt ebenfalls an den Initiationskomplex. In einem nächsten Schritt gelangt eine weitere AS beladene tRNA an den mRNA-Ribosomen-Komplex und bindet daran. Dort erfolgt die Verknüpfung der beiden AS durch die Peptidyltransferase. Nach Ablauf dieser Reaktion rückt das Ribosom auf der mRNA um eine Stelle weiter, sodass sich die erste tRNA wieder von dem mRNA-Ribosomen-Komplex lösen kann und eine Bindungsstelle für eine neue tRNA vorhanden ist. Dieser Prozess setzt sich solange fort, bis ein Stoppcodon auf dem mRNA-Strang erreicht wird. Anstelle einer weiteren tRNA gelangt nun der Release-Faktor an den mRNA-Ribosomen-Komplex und bewirkt die Trennung der ribosomalen UE von der mRNA mit der daraus resultierenden Freisetzung des neu synthetisierten Proteins. Ein mRNA-Strang kann gleichzeitig von mehreren Ribosomen abgelesen werden, die dann Polysomen genannt werden. Reguliert wird die gesamte Proteinbiosynthese durch mehrere unterschiedliche Induktions- und Inhibitionsfaktoren (Sadava et al., 2011a; 2011b).

1.3.2 ANA und Lupus bei Mäusen - Übertragbarkeit auf den Menschen

Aufgrund der Tatsachen, dass sowohl das menschliche als auch das Genom von Mäusen aus circa 2,5-3 Billionen Basenpaaren (BP) besteht und beide Genome mit über 99% übereinstimmen, sind Erforschungen an Maus-modellen besonders geeignet, um Rückschlüsse auf das menschliche Genom zu ziehen (Rosenthal und Brown, 2007; Mural et al., 2002). Die Fähigkeit, ein Gen der Maus selektiert auszuschalten („knock out“), bietet zudem die Möglichkeit, die Bedeutung eines Gens für das gesamte Individuum beurteilen zu können (Howie und Helyer, 1968; Talal, 1970). Die Zucht spezieller knock-out-Mäuse, die spontan einen SLE entwickeln, dient unter anderem zur weiteren Erforschung der Auswirkungen von Umwelteinflüssen auf Faktoren wie Inzidenz, Prävalenz, Morbidität und Mortalität gemessen an ANA im Serum. Mit einer Generationszeit von 2-3 Monaten sind Auswirkungen auf Folgegenerationen schneller als beim Menschen nachzuvollziehen (Rosenthal und Brown, 2007). Somit kann in kurzer Zeit eine repräsentative Population an knock-out-Mäusen gezüchtet werden. Auch der geringe Aufwand an Haltung, Fütterung und die einfache Zucht ermöglichen es nicht nur individuelle Veränderungen zu beobachten, sondern eben auch große Populationen zu züchten (Rosenthal und Brown, 2007). Ein Vorteil, große Populationen in die Untersuchungen mit einschließen zu können, bietet zudem die Möglichkeit, die Auswirkungen einer Einflussnahme auf z.B. SLE valide aufzuzeigen. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse finden aufgrund der oben genannten Kriterien eine gewisse Gültigkeit auch beim Menschen und dienen als Grundlage für weiterführende Untersuchungen.

1.3.3 New Zealand mixed-, CAST/iJ-, MRL/MpJ-, BXD2-Mäuse

Die Arbeitsgruppe um Bielschowsky, Howie und Helyer in Dunedin, Neuseeland züchteten diverse Inzuchtmausstämme (NZB, NZM, NZC, NZO, NZW, NZY und weitere) (Holmes und Burnet, 1963). Dabei fanden sie heraus, dass die New Zealand black/white (NZB/W) Mäuse spontan Symptome eines SLE, wie eine hämolytische Anämie mit Autoantikörperproduktion (Holmes und Burnet, 1963; Howie und Helyer, 1968; Lambert und Dixson, 1967; Talal, 1970) und einer Nierenerkrankung, die der menschlichen Lupusnephropathie gleicht, entwickelten

(Dubois et al., 1966; Holmes und Burnet, 1963; Howie und Helyer, 1968; Lambert und Dixson, 1967). Es zeigte sich in der F1-Generation der Mäuse eine vollständige Penetranz der autoimmunen Symptome (Dubois et al., 1966; Gilliam et al., 1966; Howie und Helyer, 1968; Lambert und Dixson, 1967; Talal, 1970). Weiterführende immunhistochemische Untersuchungen des Nierengewebes der NZB/W-Mäuse ergaben, dass Immunkomplexe, bestehend aus ANA und Komplementfaktoren, eng mit der Entwicklung der Nephropathie verbunden waren (Lambert und Dixson, 1967). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Serumkonzentration von ANA mit dem Schweregrad der Nephropathie vergesellschaftet ist (Lambert und Dixson, 1967). Die dermoepidermalen Junktionszone der Haut von NZB/W ist ein Bereich, in dem sich Ig anreichern, die mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen dargestellt werden können. Diese bilden ein Fluoreszenzband, welches vergleichbar ist mit dem von SLE-Patienten (Gilliam et al., 1966). Ein solcher Nachweis von Ig in der Haut korreliert zudem mit Immunkomplexen im Nierengewebe der NZB/W (Gilliam et al., 1966). Burnet und Holmes fanden zudem heraus, dass das Geschlecht der Mäuse einen großen Einfluss auf die Morbidität und Mortalität hat. Folglich hatten weibliche Tiere einen deutlich schnelleren und schwereren Verlauf der Nephropathie, sodass bereits 98% vor Erreichen des ersten Lebensjahres verstarben (Burnett und Holmes, 1965; Lambert und Dixson, 1967). New Zealand mixed (NZM) Mäuse sind eine Kreuzung aus NZB und NZW.

Die MRL/MpJ-Mäuse sind ein Inzuchtstamm, die eine Genmutation im Fas-Gen haben, welches für die Apoptosesteuerung von Zellen verantwortlich ist (De Lema et al., 2001). Als Folge daraus ist es autoreaktiven Lymphozyten möglich der Auslese im Thymus zu entgehen (De Lema et al., 2001). Hieraus entwickelt sich ein autoreaktives Potential mit zirkulierenden Immunkomplexen, welches zu Symptomen eines SLE, wie z.B. proliferativen Glomerulonephritiden, Proteinurie und zellulärer Infiltration führt (De Lema et al., 2001; www.jax.org). Die Lebenszeit für weibliche Mäuse beträgt etwa 73 Wochen für männliche Mäuse etwa 93 Wochen (www.jax.org). Zudem zeigen die MRL/MpJ-Mäuse eine deutlich schnellere Wundheilung als andere Inzuchtmausstämme (Clark et al., 1998; Kench et al., 1998; Masinde et al., 2001; www.jax.org).

Auch bei den BXD2-Mäusen handelt es sich um einen Inzuchtstamm (www.jax.org). Mutationen der Chromosomen 2 und 4 führen zu einem erhöhten autoimmunen Potenzial (Mountz et al., 2005). Ausgewachsene Mäuse entwickeln Symptome eines SLE und einer rheumatoiden Arthritis. Des Weiteren treten Glomerulonephritiden, zirkulierende Immunkomplexe, Proteinurie, Splenomegalie, erhöhte Serumtiter für Rheumafaktoren und Anti-DNA-AK, sowie spontan erosive Arthritis auf (Hsu et al., 2008; Mountz et al., 2005).

Im Fall der CAST/iJ-Mäuse handelt es sich um einen Inzuchtstamm, der durch Inzucht in Thailand von gefangenen Wildmäusen etabliert wurde (www.jax.org). Dieser Stamm zeichnet eine Immunität gegen diverse Flaviviren aus, wie z.B. die Erreger des Dengue- und Gelb-Fiebers, sowie einiger Enzephalitis-Formen (www.jax.org). CAST/iJ Mäuse haben keine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Autoimmunerkrankungen (www.jax.org).

1.3.4 Induktion und Inhibition von Genen durch Umwelteinflüsse

Im Gegensatz zur DNA-Replikation, die in der Regel immer nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip abläuft, unterliegt die Genexpression eukaryotischer Organismen einer Regulierung. Das bedeutet, dass für die Aufrechterhaltung der spezifischen Aufgaben und das Überleben jeder einzelnen Zelle, bestimmte Proteine in einer bestimmten Menge zu einem bestimmten Zeitpunkt synthetisiert werden müssen. Um diese individuellen Aufgaben bewältigen zu können, bedarf es einer Reihe von regulierenden Mechanismen, die die Proteinbiosynthese verändern können. Eine solche Einflussnahme kann vor, während und nach der Transkription und Translation erfolgen. Somit ergibt sich eine Vielzahl an Möglichkeiten die Expression eines Gens zu beschleunigen, zu verlangsamen und sogar vollständig zu stoppen.

Zur Herstellung eines Transkriptionsproduktes bedarf es einer Reihe an Proteinen, die unter dem Begriff Transkriptionsfaktoren zusammengefasst werden. Erst wenn der vollständige Transkriptionskomplex an einer sogenannten TATA-Box der Promotorregion gebunden ist, leitet er den Ablesevorgang am 5'-Ende des Matrizenstranges der DNA ein, ohne den die RNA-Polymerase II keine Kopie erstellen kann. Je nach Gewebe variieren die Transkriptionsfaktoren, sodass in

den jeweiligen Zellen nur bestimmte Gene reproduziert werden. Daraus ergibt sich eine Differenzierung von Zellen in den unterschiedlichen Geweben.

Der Vorgang der Transkription kann durch auf der DNA gelegene Enhancer-Sequenzen beschleunigt und durch Silencer-Sequenzen gedrosselt werden. Diese Sequenzen haben einen gewissen Abstand zur eigentlichen Promotorregion. Sie binden im Falle von Enhancer-Sequenzen Aktivatorproteine, die den Transkriptionskomplex bedeutend in seiner Aktivität beschleunigen können. Die Silencer-Sequenzen erfüllen einen gegenteiligen Effekt und drosseln die Aktivität des Transkriptionskomplexes über entsprechende Repressorproteine.

Neben diesem Regulationsmechanismus existieren noch weitaus mehr Proteine, die die Genexpression regulieren und koordinieren. Exemplarisch sei das Strukturmotiv „Helix-Loop-Helix-Motiv“ erwähnt, das zur Regulation von Genen des Immunsystems beiträgt.

Das sogenannte DNA-Rearrangement ermöglicht ein inaktives Gen durch Umlagerung auf dem Chromosom in ein aktives Gen umzuwandeln. An seiner ursprünglichen Stelle wird die Transkription des Gens durch Repressorproteine gehemmt. Beim Vorgang des DNA-Rearrangements wird zunächst eine DNA-Kopie des inaktiven Gens erstellt. In einem nächsten Schritt wird die bisherige DNA-Sequenz am neuen Genlokus enzymatisch entfernt. Jetzt kann die DNA-Kopie des zuvor inaktiven Gens an diesem Genlokus eingefügt und anschließend transkribiert werden. Dieser Prozess ist ein wichtiger Bestandteil bei der Synthese von Proteinen mit hoher phänotypischer Variabilität und ist ebenfalls bedeutend bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen.

Auch nach Abschluss der Transkription ist es möglich das entstandene Transkript zu verändern und somit die Proteinsynthese zu regulieren. Das alternative Spleißen ist ein solcher Mechanismus, bei dem die prä-mRNA als Transkript eines einzelnen Gens durch Herausschneiden gewählter Intron- und Exonsequenzen in ihrer Varianz verändert werden kann. Daraus folgt, dass aus einer prä-mRNA unterschiedliche mRNA-Stränge entstehen können, die ein Protein kodieren, das sich dadurch jedoch in gewissen Eigenschaften unterscheidet. Dies fördert die Variabilität des Transkriptionsprodukts und somit die Spezialisierungsmöglichkeiten von Zellen eines Gewebeverbundes.

Auch die Translation kann beeinflusst werden, indem hier unterschiedliche Mechanismen an verschiedenen Stellen des Translationszyklus eingreifen. Ein solcher Mechanismus greift z.B. an der Cap-Gruppe der mRNA ein. Die Cap-Gruppe ist eine am Beginn der mRNA gelegene Region, die aus einem modifiziertem Guanosintriphosphat (GTP) besteht. Ist an dieser Stelle ein unmodifiziertes GTP gelegen, wird die mRNA nicht in die gewünschte Aminosäuresequenz umgesetzt.

Posttranslational kann eine Regulation über den Abbau von synthetisierten Proteinen erfolgen. So kann beispielsweise die Aktivitätsdauer eines Enzyms reguliert werden. Um diesen Abbau zu initiieren lagert sich das Enzym Ubiquitin an das abzubauen Protein an. Der daraus entstandene Protein-Ubiquitin-Komplex ermöglicht nun die Bindung an ein Proteasom, dass das gebundene Protein wieder in die einzelnen AS zerlegt. Zuvor wird jedoch das Ubiquitin vom Zielprotein abgespalten und wieder freigesetzt (Sadava et al., 2011c).

Alle eben beschriebenen Vorgänge können durch Einflüsse der Umwelt auf das jeweilige Individuum positiv oder negativ beeinträchtigt werden. (Sonnen-) Strahlung, Temperatur, Ernährung und Noxen in Form von Gasen, Aerosolen oder Medikamenten sind nur eine kleine Auswahl der Einflussfaktoren, die auf das Genom wirken können. Nicht nur die isolierte sondern auch die kombinierte Betrachtung mehrerer dieser Faktoren sind Gegenstand der aktuellen Forschung auf den Gebieten der Humangenetik, der Onkologie und der Immunologie.

Gegenstand unserer Arbeit ist es, den Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Ernährungsregimen als variablen Umweltfaktor und dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen am Beispiel der Kollagenosen am Mausmodel genauer zu beleuchten. Hierzu haben wir ein Kollektiv von AIL (autoimmunity-prone intercross line)-Mäusen (n=935) über einen Zeitraum von 6 Monaten beobachtet. Ebenso haben wir die unterschiedlichen Gewichtsentwicklungen durch die jeweiligen Ernährungsregime im Verhältnis zu dem Auftreten von SLE an diesem Kollektiv betrachtet. Unterschiede in der Geschlechterverteilung sind ebenfalls Teil dieser Arbeit.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

In den vergangenen Jahrzehnten konnte ein deutlicher Anstieg der Inzidenz von Autoimmunerkrankungen in den westlichen Industrieländern verzeichnet werden. Darunter fallen unter anderem die rheumatoide Arthritis, der SLE, die MS, Diabetes mellitus Typ 1, die Autoimmunthyreoditis (AT) und besonders die Hashimoto Thyreoiditis (HT). Eine Veränderung von Umwelteinflüssen wird als Ursache diskutiert. Auffällig ist, dass es im selben Zeitraum ebenfalls zu einem starken Anstieg von übergewichtigen Menschen in der beobachteten Population kam (Versini et al., 2014).

Aus diesem Grund war es Ziel unserer Arbeit einen Zusammenhang zwischen der Ernährung, dem Gewicht und dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen am Beispiel von SLE darzulegen. Hierzu führten wir die Untersuchungen an einem AIL-Mauskollektiv (n=935) durch. Das AIL-Mauskollektiv teilten wir in drei Diätgruppen mit unterschiedlichen Ernährungsregimen und daraus folgend, unterschiedlichen Gewichtsentwicklungen.

1. Hochkalorische Western Diät (WD)
2. Normale Tierhaltungsnahrung (CONT)
3. 60% der normalen Tierhaltungsnahrung (CALR)

Zum Nachweis des vermehrten Auftreten von SLE nutzten wir den IIF-Test auf Hep-2-Zellen, um ANA im Serum der untersuchten AIL-Mäuse aufzuzeigen (Mariz et al., 2010).

Ferner untersuchten wir noch geschlechtsspezifische Unterschiede im Auftreten von ANA im Serum des beobachteten AIL-Mauskollektivs.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Tabelle 1: Generationen der Versuchstiere (AIL)

Generation	Gesamt	WD	CALR	CONT	Herkunft
G 18	315	123	48	144	Eigene Zucht
G 19	294	99	103	92	Eigene Zucht
G 20	326	114	102	110	Eigene Zucht

2.2 Haltungsdiäten und deren Inhaltsstoffe

HF with cholesterol and butter fat, ssniff Spezialdiäten GmbH

Tabelle 2: WD Inhaltsstoffe

Inhaltsstoffe:	
<i>Rohprotein</i>	16,6 %
<i>Rohfett</i>	21,0 %
<i>Rohfaser</i>	5,0 %
<i>Rohasche</i>	3,4 %
<i>Stärke</i>	9,8 %
<i>Zucker</i>	31,0 %
Zusatzstoffe:	
<i>Vitamin A (IU/ IE)</i>	4000/ kg
<i>Vitamin D3 (IU/ IE)</i>	1000/ kg
<i>Vitamin E (mg)</i>	75/ kg
<i>Vitamin K3 (mg)</i>	4/ kg
<i>Vitamin C (mg)</i>	--
<i>Kupfer (mg)</i>	11/ kg

Haltungsdiät – Ratten/ Mäuse, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG

Tabelle 3: CONT/CALR Inhaltsstoffe

<i>Inhaltsstoffe:</i>	
<i>Rohprotein</i>	<i>19,0 %</i>
<i>Rohfett</i>	<i>4,0 %</i>
<i>Rohfaser</i>	<i>6,0 %</i>
<i>Rohasche</i>	<i>7,5 %</i>
<i>Zusatzstoffe:</i>	
<i>Vitamin A (IU/ IE)</i>	<i>15000/ kg</i>
<i>Vitamin D3 (IU/ IE)</i>	<i>600/ kg</i>
<i>Eisen – (II) – Sulfat Monohydrat</i>	<i>165 mg/ kg</i>
<i>Kalzium – Jodat</i>	<i>1,5 mg/ kg</i>
<i>Co – (II) – Carbonat Monohydrat</i>	<i>0,3 mg/ kg</i>
<i>Cu – (II) – Sulfat Pentahydrat</i>	<i>13 mg/ kg</i>
<i>Mn – (II) – Sulfat Pentahydrat</i>	<i>75mg/ kg</i>
<i>Zinkoxid</i>	<i>70mg/ kg</i>
<i>Natriumselenit</i>	<i>0,5mg/ kg</i>

2.3 Auflistung verwendeter Stoffe und Chemikalien

- *Serum der AIL-Mäuse – Gewonnen nach 2 Monaten*
- *Serum der AIL-Mäuse – Gewonnen nach 4 Monaten*
- *Serum der AIL-Mäuse – Gewonnen nach 6 Monaten*
- *0,5 % PBST – Puffer*
- *PBS – Puffer*
- *Tween 20*
- *Aqua dest*
- *Polyclonal Rabbit Anti – Mouse Immunglobulin FITC, Dako®*
- *Kohlenstoffdioxid*

2.4 Mischverhältnisse der verwendeten Stoffe und Chemikalien

Verdünnung der Seren:

2 Monats – Seren:

1 µl BS + 99 µl 0,5 % PBST → Verdünnung 1:100

4 Monats – Seren:

1 µl BS + 99 µl 0,5 % PBST → Verdünnung 1:100

6 Monats – Seren:

1 µl Serum + 99 µl 0,5 % PBST → Verdünnung 1:100

6 Monats – Seren:

1 µl Serum 1:100 + 99 µl 0,5% PBST → Verdünnung 1:1000

6 Monats – Seren:

1 µl Serum 1:1000 + 99 µl 0,5% PBST → Verdünnung 1:10.000

PBS – Puffer pH 7,2:

NaCl 45 g

Dinatriumhydrogencarbonat 8,7 g

Natriumdihydrogencarbonat 0,9 g

Aqua dest 5000 ml

Mit Orthophensäure auf pH 7,2 einstellen

⇒ *PBS – Puffer pH 7,2*

PBST – Puffer:

PBS – Puffer pH 7,2 5 l

Tween 20 2,5 ml

⇒ *PBST – Puffer*

2.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Firma
SafeSeal Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt®
80 well Microtube rack	Eppendorf®
Manuelle Mikroliterpipetten	Eppendorf®
Transferpipetten	Sarstedt®
Spülgefäß mit Objektträgerereinsatz	Roth®
Vortex Genie 2	Scientific industries®
KS 250 basic Orbital Shaker	IKA Labortechnik®
Objektträger	Euroimmun®
Fluoreszenzmikroskop	EUROStar®
Biofuge fresco	Heraeus®
Mischgefäß	Roth®
Magnetrührer	Stuart CB 163
Waage	OHAUS PRECISION Standard®
Stechlanzetten	Braun 1 Solufix ®
Feindosierspritzen	Braun Injekt ® F
Spritzen	Braun Injekt ® Solo
Kanülen	Braun Sterican ®
IIF – Testsystem	Euroimmun ®

2.6 Tierversuche

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Versuchsaufbau handelt es sich um ein Tierversuchsmodell an Mäusen.

Die Tierversuche wurden von der zuständigen Regierungsbehörde (Ministerium für Energie, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Gebiete, Aktenzeichen 27–2 / 13) genehmigt und von speziell geschultem Personal durchgeführt.

2.7 Herkunft der Versuchsmäuse

Die verwendeten Mäuse stammen vom, in der Gemeinsamen Tierhaltung (GTH) der Universität zu Lübeck gezüchteten, Auszuchtstamm AIL. Dazu wurden die Mausstämmen MRL/MpJ, NZM2410/J, BxD2/TyJ und Cast/iJ über 20 Generationen mit mindestens 50 Brutpaaren pro Generation gekreuzt. Die aus dieser Zucht entstandenen AIL-Mäuse wurden nach 3-4 Wochen ohne Geschlechtertrennung in

separaten Käfigen untergebracht. Die Zuordnung zu den jeweiligen Diäten erfolgte zufällig. Für die Charakteristika der einzelnen Mausreihen siehe Abschnitt 1.3.3. Die jeweiligen genetischen Merkmale sind in den rekombinanten hybriden Stämmen der AIL-Mäuse vereint, die in die Untersuchung eingeschlossen wurden. Für die Versuche meiner Promotion verwendete ich Tiere der 18.-20. Generation.

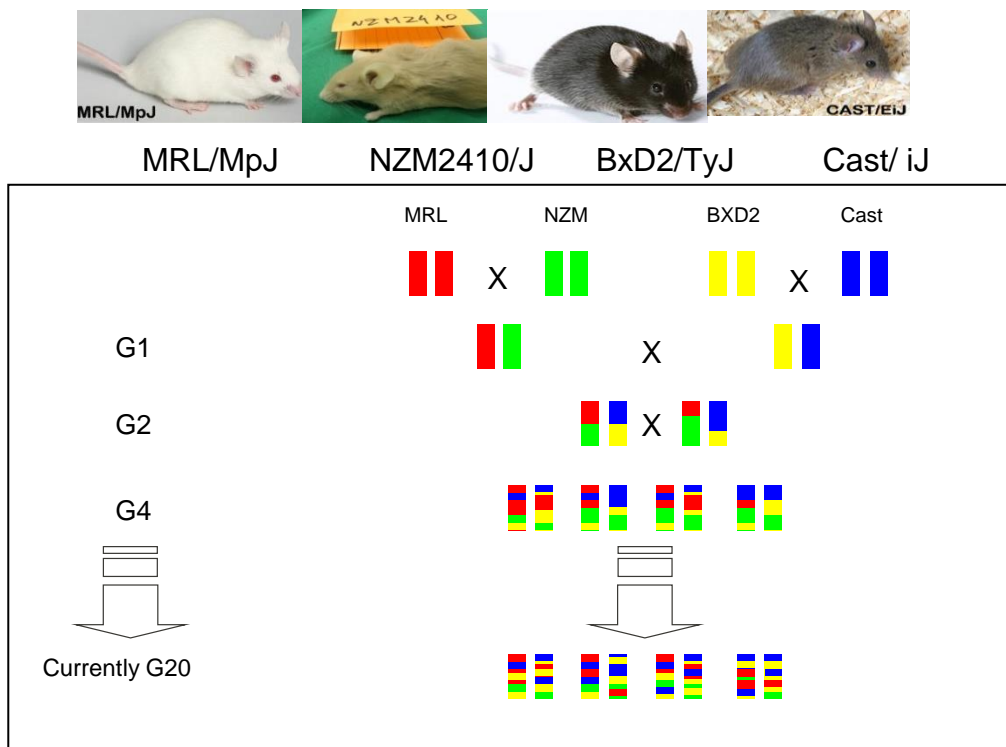


Abbildung 5: Kreuzungsschema der AIL-Mäuse

2.8 Unterbringung und Haltung

Alle sich im Versuch befindlichen AIL-Mäuse waren in der GTH der Universität zu Lübeck untergebracht. Dort wurden sie in Makrolon Käfigen Typ III mit jeweils 820 cm² Grundfläche gehalten. Die Böden der Käfige waren mit feinen Holzspänen ausgelegt. Reinigung der Käfige, Erneuerung des Bodenbelags und Auffüllen des Trinkwassers ad libitum wurde in regelmäßigen Abständen durch die Tierpfleger der GTH durchgeführt. Die Raumtemperatur wurde konstant bei 23°C gehalten, die Luftfeuchtigkeit betrug 48% und alle Tiere wurden unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen im 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus in der GTH der Universität zu Lübeck gehalten. Diese Bedingungen waren zu jeder Zeit für alle AIL-Mäuse gleich.

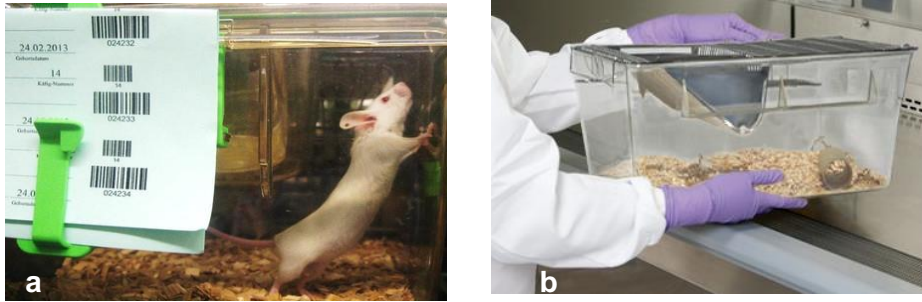


Abbildung 6a-b: Käfige und Tierhaltung (Quelle: GTH Lübeck & www.plexx.eu)

2.9 Einteilung der Diätgruppen

Die in den Versuch eingeschlossenen AIL-Mäuse wurden in drei Gruppen eingeteilt. Die Tiere der Gruppe 1, die als CONT (n=250) dienten, wurden mit Altromin 1324 Halterungsdiät – Ratten/ Mäuse gefüttert (#1320, Altromin Spezialfutter GmbH, Lage, Germany). Die Tiere der Gruppe 2 CALR (n=349) erhielten eine, im Vergleich zu Gruppe 1, mengenmäßig reduzierte Diät, die 60% der Kontrollfuttermenge an #1320, Altromin Halterungsdiät – Ratten/Mäuse entsprach. Diese reduzierte Futtermenge wurde täglich abgewogen und auf die Käfige verteilt. Die der Gruppe 3 zugeordneten AIL-Mäuse bekamen WD (n=336) (S0587-E020, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany). Überdies wurden alle drei Gruppen während der gesamten Versuchszeit unter denselben Umweltbedingungen gehalten (s. Unterbringung und Haltung).

2.10 Probengewinnung und Tötung der Versuchstiere

Nach zwei und vier Monaten wurde allen AIL-Mäusen in den Eingriffsräumen der GTH der Universität zu Lübeck Blut aus der Vena facialis abgenommen. Durch Zentrifugation wurde das Serum von den zellulären Blutbestandteilen getrennt und abpipettiert. Nach Ablauf der sechsmonatigen Versuchslaufzeit wurden die AIL-Mäuse gewogen und anschließend durch eine Kohlenstoffdioxidintoxikation getötet. Daraufhin erfolgte eine finale Blutentnahme durch Herzpunktion. Auch aus dieser Blutprobe wurde mittels Zentrifugation das Serum gewonnen.

Alle Seren wurden in SafeSeal Reagiergefäße 1,5 ml gefüllt und bei - 20°C gelagert.

2.11 Versuchsaufbau indirekter Immunfluoreszenztest

Für die quantitative Darstellung der ANA in den Seren der AIL-Mäuse mithilfe eines indirekten Immunfluoreszenztests (IIF-Test) wurden Testsysteme der Firma „Euroimmun“ verwendet.

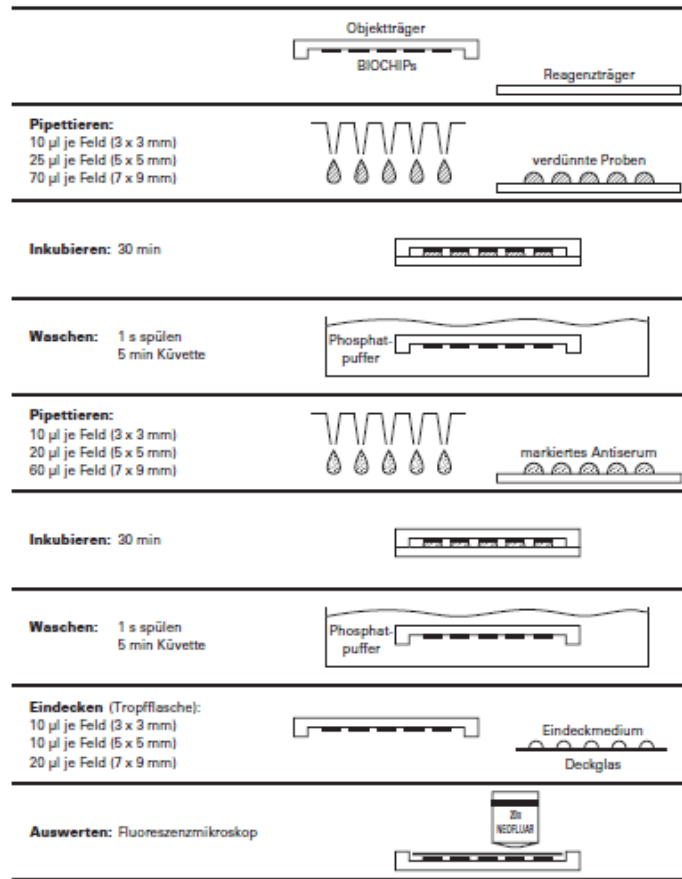
- IIF-Test, dessen Objektträger mit je 5 BIOCHIPs bestückt waren, die mit Mosaik Hep-2-Zellen und Leber-Zellen (Affe) beschichtet waren
- IIF-Test, dessen Objektträger mit je 5 BIOCHIPs bestückt waren, die mit Hep-2-Zellen beschichtet waren
- IIF-Test, dessen Objektträger mit je 5 BIOCHIPs bestückt waren, die mit Hep-20-10-Zellen beschichtet waren (www.euroimmun.de; <https://dgrh.de/Start/DGRh/Presse/Daten-und-Fakten/Rheuma-in-Zahlen.html>).

Je Testdurchlauf wurden 50 Seren der AIL-Mäuse getestet. Nachdem die zu testenden Seren auf eine Temperatur von + 4°C erwärmt worden waren, wurden diese in einem Verhältnis von 1:100 mit PBST-Pufferlösung verdünnt. Dazu pipettierten wir 99 µl PBST in jeweils ein SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml und pipettierten 1 µl des entsprechenden Serums hinzu. Die komplette Durchmischung der Verdünnungen erfolgte mithilfe eines Vortex-Rüttlers. Von dieser Verdünnung trugen wir 25 µl auf jedes der 50 Felder der Testplatte auf. Im Anschluss legten wir die mit Zellen beschichteten Objektträger auf die Testplatte und ließen diese 30 Minuten inkubieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Objektträger in ein Spülgefäß mit Objektträgerersatz eingespannt und 5 Minuten mit einer PBST – Pufferlösung gewaschen. Während dieser Zeit reinigten wir die Testplatte mit destilliertem Wasser von den Resten der verdünnten Seren. Danach stellten wir eine 1:100 Verdünnung des Polyclonal Rabbit Anti – Mouse Immunglobulin FITC mit einer PBST-Pufferlösung her. Von dem verdünnten AK trugen wir ebenfalls 25 µl auf jedes der 50 Felder der Testplatte auf. Nachdem die Objektträger 5 Minuten gewaschen und anschließend abgetrocknet worden waren, wurden diese auf die

mit verdünntem AK beimpfte Testplatte aufgelegt und wieder 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger erneut 5 Minuten mit PBST-Pufferlösung gewaschen. Im letzten Schritt pipettierten wir ein Glycerin-PBS-Gemisch im Verhältnis 1:1 auf die jeweiligen Deckgläser und fügten diese mit den getrockneten Objektträgern zusammen. Zur Auswertung der angefertigten IIF-Tests analysierten wir diese unter einem Fluoreszenzmikroskop. Eine exakte Bestimmung der Fluoreszenzmuster war für diese Arbeit irrelevant. Im Falle einer positiven Testung, fluoreszierten die angefärbten Hep-2-Zellen der Testplatten in der mikroskopischen Begutachtung grün (s. Abb. 8a). Bei einer negativen Testung zeigte sich bei der mikroskopischen Begutachtung kein grün fluoreszierendes Muster (s. Abb. 8b). Alle nach 6 Monaten gewonnenen Seren in der Verdünnung 1:100, die im IIF-Test positiv erschienen, wurden im Verhältnis 1:1000 verdünnt und nach dem beschriebenen Schema getestet. Die in der 1:1000 Verdünnung positiv erschienenen Seren wurden dann 1:10000 verdünnt und auch entsprechend des Schemas getestet. Während des gesamten Versuchs wurden die Seren permanent durch Eis gekühlt, um die Temperatur konstant zu halten.



Indirekter Immunfluoreszenztest, durchgeführt mit der TITERPLANE®-Technik



TITERPLANE®-Technik

- 11 -

Abbildung 7: Anfertigung eines indirekten Immunfluoreszenztests (Quelle: EUROIMMUN AG)

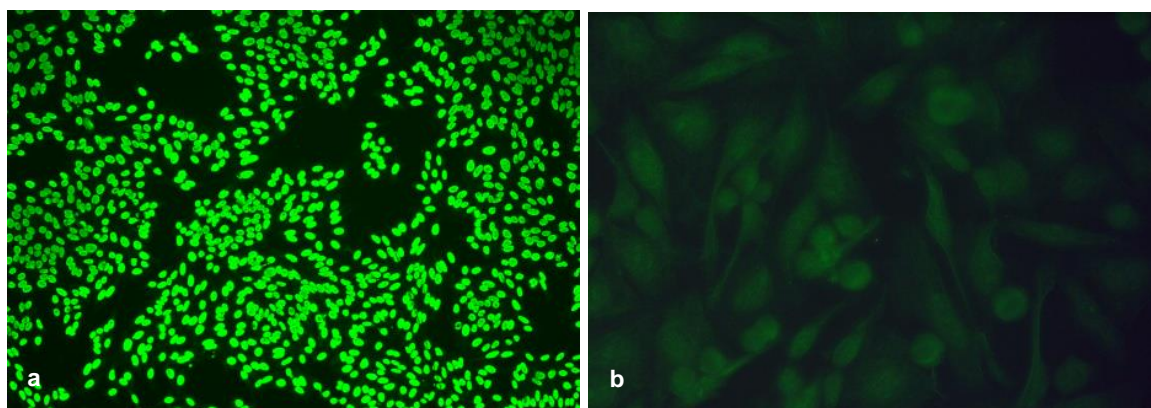


Abbildung 8a-b: a) positiver indirekter Immunfluoreszenztest auf Hep-20-Zellen; b) negativer indirekter Immunfluoreszenztest auf Hep-20-Zellen

2.12 Statistische Analysen

Auf eine Fallzahlplanung wurde verzichtet, da es sich um eine explorative Studie handelte. Ein wichtiger primärer Endpunkt der Studie war, es zu untersuchen, welchen Einfluss Gene und Ernährung auf komplexe Phänotypen, wie ANA, in der Maus haben. Die hohe Fallzahl war für die genetische Assoziationsstudie notwendig. Primärer Endpunkt meiner Untersuchung war die Prävalenz der ANA zum Zeitpunkt 6 Monate.

Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels des Statistikprogrammes SPSS (Version 15.0). Es lagen sowohl nominalskalierte als auch metrische Variablen vor. Tests auf Normalverteilung wurden vor der statistischen Analyse durchgeführt. Die Signifikanzprüfung bei dichotomen, unverbundenen Merkmalen erfolgte mittels des Chi-Quadrat-Test. Bei unverbundenen, nicht normalverteilten Variablen wurde zum Vergleich von 2 unabhängigen Stichproben der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, der Vergleich von mehr als 2 unabhängigen Stichproben erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test mit Post-Hoc-Test.

3 Ergebnisse

Es wurden drei AIL-Mauskollektive in das Experiment einbezogen (G18-20). Diese drei Kollektive wurden zu einem Gesamtkollektiv zusammengeführt, mit einer Gesamtzahl von $n=935$.

Aufgrund fehlender Seren und unvollständiger Datenblätter kam es zum Fehlen einzelner Daten, welches nicht zum generellen Ausschluss des jeweiligen Versuchstieres führte, um die maximal mögliche Kollektivgröße nicht zu verringern. Dieses erklärt die mitunter differierenden Fallzahlen in den einzelnen Berechnungen. Auf das Fehlen einzelner Daten wird an den entsprechenden Stellen hingewiesen.

3.1 Auftreten von ANA im Serum im Gesamtkollektiv zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten

Die Messung von ANA in den Seren aller AIL-Mäuse erfolgte in der Verdünnung 1:100 zu den Untersuchungszeitpunkten 2, 4 und 6 Monate.

Nach 2 Monaten ließen sich unabhängig von der Diät bei 5,7% aller AIL-Mäuse ($n=53$ von 935) ANA nachweisen. Bei 16,5% aller AIL-Mäuse ($n=154$ von 935) konnten nach 4 Monaten ANA im Serum festgestellt werden. Nach 6 Monaten zeigte sich bei 32,2% ($n=301$ von 935) aller Versuchstiere ANA im Serum. Eine Übersicht über die Ergebnisse zeigt Abb. 9.

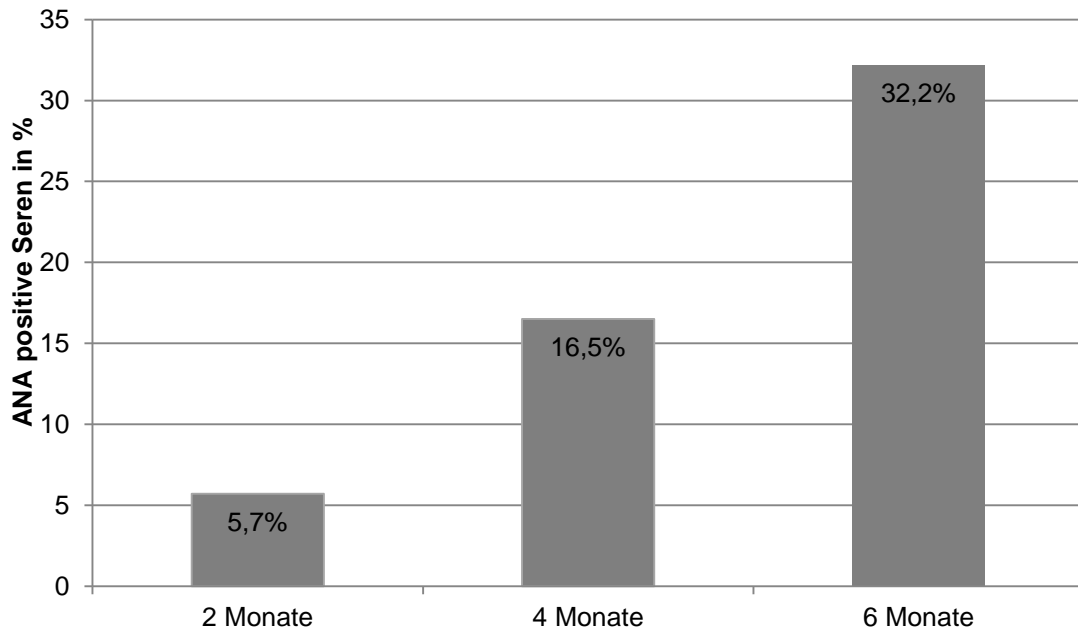


Abbildung 9: Entwicklung der ANA bei AIL-Mäusen im zeitlichen Verlauf. AIL-Mäusen (n=935) wurde im Alter von 2, 4 und 6 Monaten Blut zur Bestimmung der ANA entnommen. ANA wurden in einer 1:100 Verdünnung mittels IIF-Test auf Hep-Zellen bestimmt. Die Angaben der positiven ANA erfolgt in Prozent (%) und die Darstellung der Daten als Säulendiagramm. Im Beobachtungszeitraum stieg die Prävalenz der ANA kontinuierlich an.

Zum Messzeitpunkt 6 Monate erfolgte bei AIL-Mäusen mit positivem ANA-Nachweis in der Verdünnung 1:100 (n=301) eine ANA-Titer-Bestimmung in den Verdünnungen 1:1000 und 1:10.000.

Ein ANA-Nachweis in der Verdünnung 1:1000 gelang bei 45,2% dieser AIL-Mäuse (n=136 von 301). Davon waren 19,1% (n= 26 von 136) auch in der Verdünnung 1:10000 ANA-positiv. Eine Übersicht über die Ergebnisse zeigt Abb. 10.

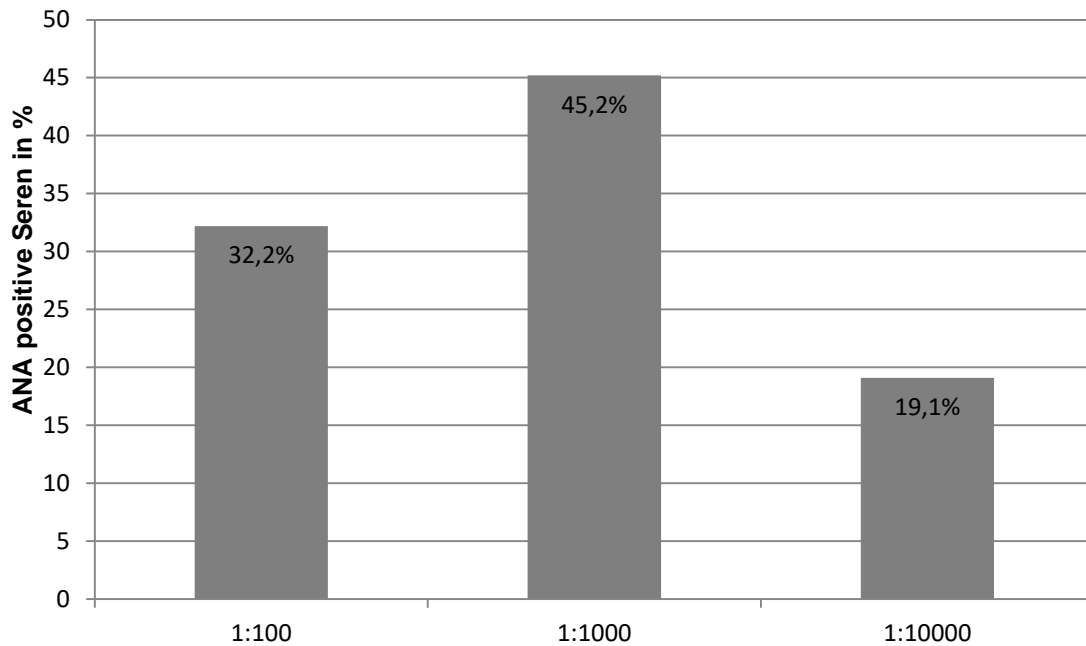


Abbildung 10: Entwicklung des ANA-Titers bei AIL-Mäusen zum Zeitpunkt 6 Monate. AIL-Mäusen (n=935) wurde im Alter von 6 Monaten Blut zur Bestimmung der ANA entnommen. ANA wurden in einer 1:100, 1:1000 und 1:10.000 Verdünnung mittels IIF-Test auf Hep-Zellen bestimmt. Die Angaben der positiven ANA erfolgt in Prozent (%) und die Darstellung der Daten als Säulendiagramm. Im Beobachtungszeitraum stieg der ANA-Titer zunächst an und fiel im Verlauf unter den Ausgangswert.

3.2 Zeitliche Unterschiede im Auftreten von ANA im Serum der AIL-Mäuse

Es wurde untersucht, ob sich die drei Diätgruppen CONT, CALR und WD hinsichtlich des Auftretens von ANA zu den Untersuchungszeitpunkten 2, 4 und 6 Monate unterscheiden.

3.2.1 Einfluss der Diät auf die Prävalenz der ANA in AIL-Mäusen

Nach 2 Monaten weisen 1,7% (n=6 von 349 Tieren) der nach der CALR gefütterten AIL-Mäuse ANA im Serum auf. Unter den Diätgruppen stellten sie die Gruppe mit den wenigsten ANA-positiven Seren zu diesem Zeitpunkt dar. Die AIL-Mäuse der Gruppe WD hatten mit 8,9% (n=30 von 336 Tieren) den höchsten Anteil ANA-positiven Seren innerhalb der Diätgruppen. Die CONT lag mit einem ANA-Nachweis in 6,8% (n=17 von 250 Tieren) etwas niedriger als die Gruppe der WD.

Die Unterschiede zwischen den Diätgruppen CALR und WD waren mit $p < 0,001$ statistisch signifikant, ebenso die Unterschiede zwischen der CALR und der

CONT mit $p=0,001$. Zwischen AIL-Mäusen der WD und der CONT ließen sich hinsichtlich des Auftretens von ANA nach 2 Monaten keine signifikanten Unterschiede darstellen ($p=0,348$). Eine Übersicht über die Ergebnisse zeigt Abb. 11a.

Nach 4 Monaten wiesen 5,4 % ($n=19$ von 349 Tieren) der nach der CALR gefütterten AIL-Mäuse ANA im Serum auf. Sie stellten damit die Diätgruppe mit dem geringsten Anteil ANA-positiver Seren zu diesem Zeitpunkt dar.

Die Gruppe mit dem höchsten Anteil ANA-positiver Seren stellten die AIL-Mäuse der WD mit 25,3 % ($n=85$ von 336 Tieren) dar. Die CONT lag mit einem ANA-Nachweis in 20,0 % ($n=50$ von 250 Tieren) etwas niedriger als die Gruppe der WD.

Die Unterschiede zwischen den Diätgruppen CALR und WD sowie zwischen der Gruppe CALR und der CONT waren mit jeweils $p<0,001$ statistisch signifikant. Zwischen AIL-Mäusen der WD und der CONT ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede darstellen ($p=0,132$). Eine Übersicht über die Ergebnisse zeigt Abb. 11b.

Nach 6 Monaten ließen sich bei 19,8% ($n=69$ von 349 Tieren) der CALR AIL-Mäuse ANA im Serum nachweisen. Diese Gruppe wies den geringsten Anteil ANA-positiver Seren zu diesem Zeitpunkt auf. Der höchste Anteil ANA-positiver Seren fand sich in der Gruppe WD mit 44,4% ($n=149$ von 336 Tieren). In CONT ließen sich nach 6 Monaten in 33,2% ($n=83$ von 250 Tieren) ANA im Serum nachweisen.

Die Unterschiede zwischen den Diätgruppen CALR und WD, CALR und CONT sowie zwischen WD und CONT waren mit jeweils $p<0,001$ statistisch signifikant. Eine Übersicht über die Ergebnisse zeigt Abb. 11c.

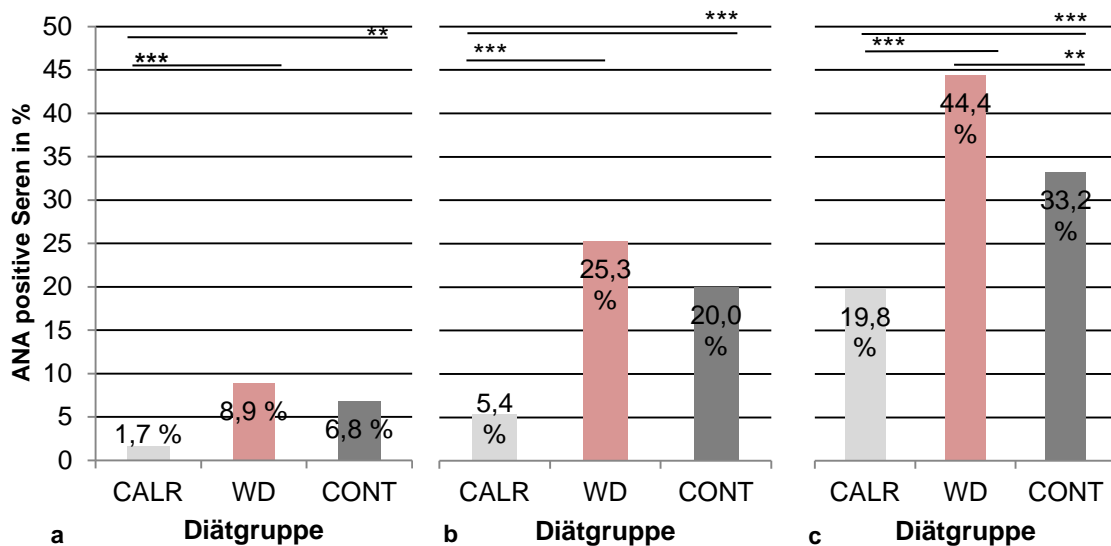


Abbildung 11a-c: ANA positive Seren nach **a)** 2 Monaten, **b)** 4 Monaten und **c)** 6 Monaten bei den drei Diätgruppen der AIL-Mäuse (n=935). ANA wurden in einer 1:100 Verdünnung mittels IIF-Test auf Hep-Zellen bestimmt. Die Angaben der positiven ANA erfolgt in Prozent (%) und die Darstellung der Daten als Säulendiagramm. Die meisten ANA konnten zu allen Messzeitpunkten in den Seren der WD-Gruppe ermittelt werden, die wenigsten ANA in der CALR-Gruppe. Die CONT-Gruppe liegt deutlich höher als die CALR-Gruppe, jedoch insgesamt noch niedriger als die WD-Gruppe. **a)** CONT vs. WD: $p=0,348$; CONT vs. CALR: $p=0,001$, CALR vs. WD: $p<0,001$. Dargestellt mit $***p<0,001$, $**p<0,01$. **b)** CONT vs. WD: $p=0,132$; CONT vs. CALR: $p<0,001$, CALR vs. WD: $p<0,001$. Dargestellt mit $***p<0,001$. **c)** CONT vs. WD: $p=0,006$; CONT vs. CALR: $p<0,001$, CALR vs. WD: $p<0,001$. Dargestellt mit $***p<0,001$, $**p<0,01$. Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test.

Zusammenfassend stellte die Gruppe der nach CALR gefütterter AIL-Mäuse zu allen Untersuchungszeitpunkten die Gruppe mit dem niedrigsten Anteil ANA-positiver Seren dar, während die Gruppe WD die Gruppe mit dem höchsten Anteil ANA-positiver Seren ausmachte.

Eine graphische Zusammenfassung der Ergebnisse dieses Abschnittes ist in Abb. 12 dargestellt. Graphisch ist zudem ersichtlich, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen im zeitlichen Verlauf zunahm.

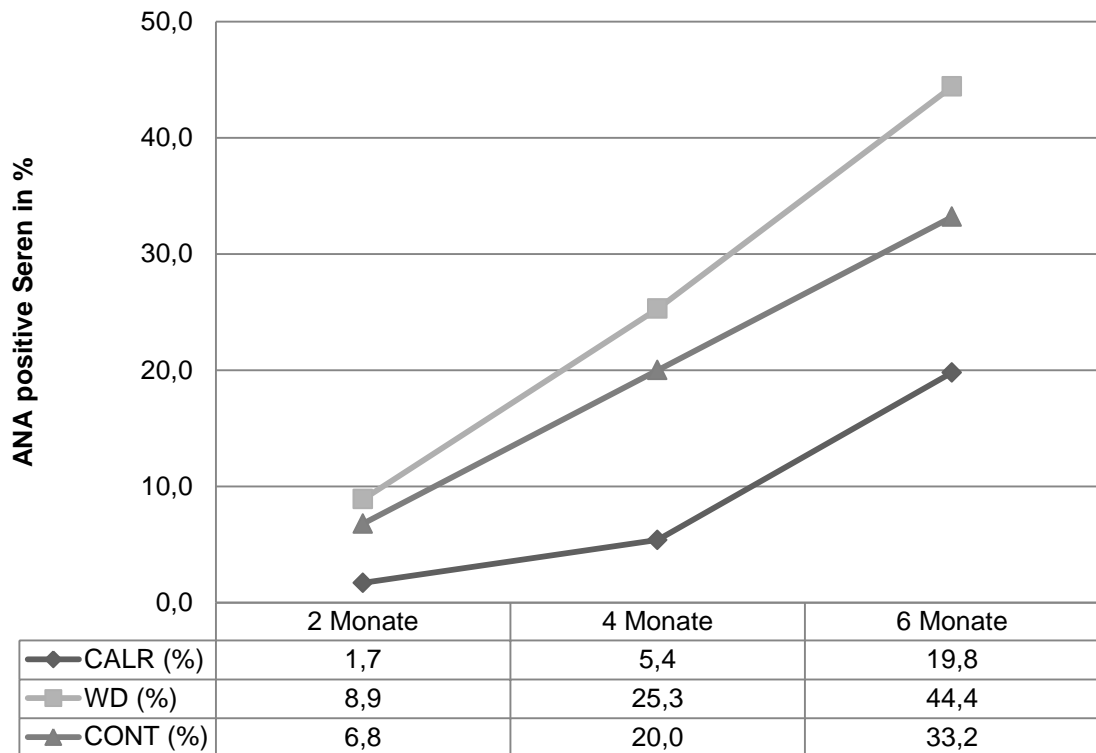


Abbildung 12: ANA-positive Seren bei den drei Diätgruppen im zeitlichen Verlauf (n=935). Gegenüberstellung der in der 1:100 Verdünnung ANA-positiv gemessenen Seren der jeweiligen Diät, während des gesamten Beobachtungszeitraumes. Die Angaben der positiven ANA erfolgt in Prozent (%) und die Darstellung der Daten als Liniendiagramm. Es zeigte sich in der chronologischen Abfolge eine stetige Zunahme der ANA im Serum bei allen drei Diäten, mit einem Maximum bei WD und einem Minimum bei CALR; CONT bewegt sich zwischen den beiden anderen Diäten. In den jeweiligen Diätgruppen stieg die Prävalenz fortwährend an.

3.2.2 Quantitatives Auftreten von ANA im Serum der AIL-Mäuse zum Zeitpunkt 6 Monate

Bei AIL-Mäusen, die zum Zeitpunkt 6 Monate in der Verdünnung 1:100 ANA-positiv waren (n=301), erfolgte eine weitere Verdünnung der Seren.

Die Titrierung der Seren der AIL-Mäuse auf eine Verdünnung von 1:1000 zeigte, dass 30,4% (n=21 von 69 Tieren) der Tiere der CALR Gruppe positive Ergebnisse im IIF-Test auf ANA vorwiesen. In der WD Gruppe waren 49,0% (n=73 von 149 Tieren) der Seren ANA-positiv. Die meisten ANA-positiven Seren waren in der CONT Gruppe mit 50,6 % (n=42 von 83 Tieren) zu messen.

Die Unterschiede zwischen den Diätgruppen CALR und WD, CALR und CONT waren mit jeweils $p < 0,01$ statistisch signifikant. Zwischen den Diätgruppen WD

und CONT konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Eine Übersicht über die Ergebnisse zeigt Abb. 13.

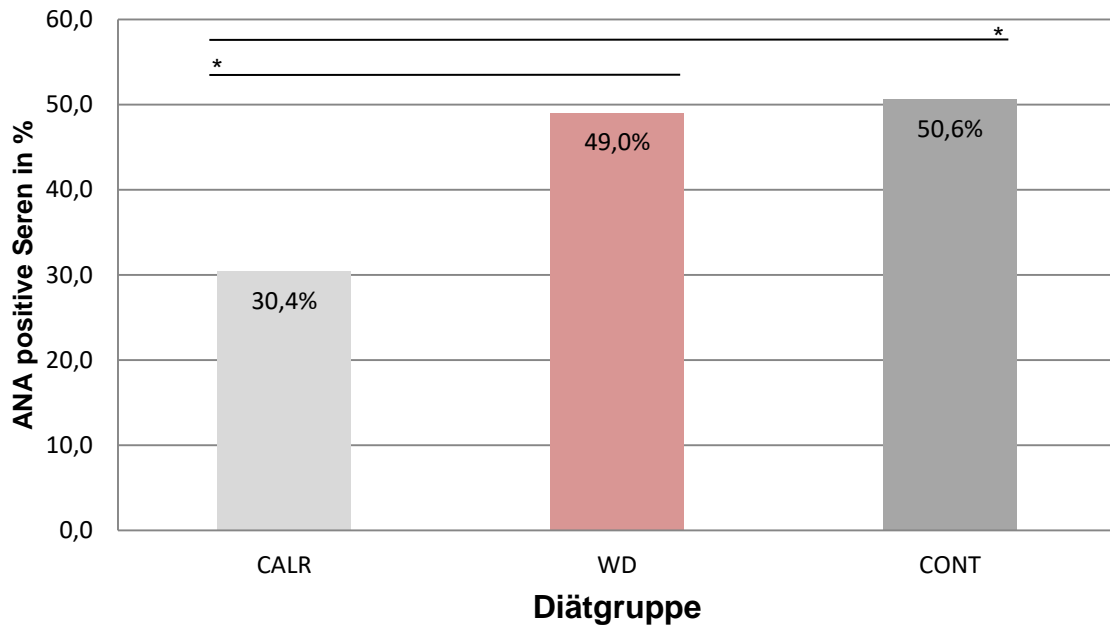


Abbildung 13: Titrierung der in der 1:100 Verdünnung ANA-positiv getesteten Seren bei AIL-Mäusen zum Zeitpunkt 6 Monate in den drei Diätgruppen (n=301). ANA wurden in einer 1:1000 Verdünnung mittels IIF-Test auf Hep-Zellen bestimmt. Die Angaben der positiven ANA erfolgt in Prozent (%) und die Darstellung der Daten als Säulendiagramm. Im Beobachtungszeitraum stieg der ANA-Titer in allen drei Diätgruppen kontinuierlich an. CONT vs. WD: $p=0,814$; CONT vs. CALR: $p=0,012$, CALR vs. WD: $p=0,010$. Dargestellt mit $*p<0,05$. Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test.

Im Anschluss erfolgte die Titrierung der Seren auf eine Verdünnung von 1:10.000. Hier zeigte sich, dass 19,1% der Tiere der CALR Gruppe (n=4 von 21 Tieren), 19,2% der WD Gruppe (n=14 von 73 Tieren) und 19,1% der CONT Gruppe (n=8 von 42 Tieren) positive ANA vorwiesen. Die Unterschiede zwischen allen drei Diätgruppen waren statistisch nicht signifikant. Eine Übersicht über die Ergebnisse zeigt Abb. 14.

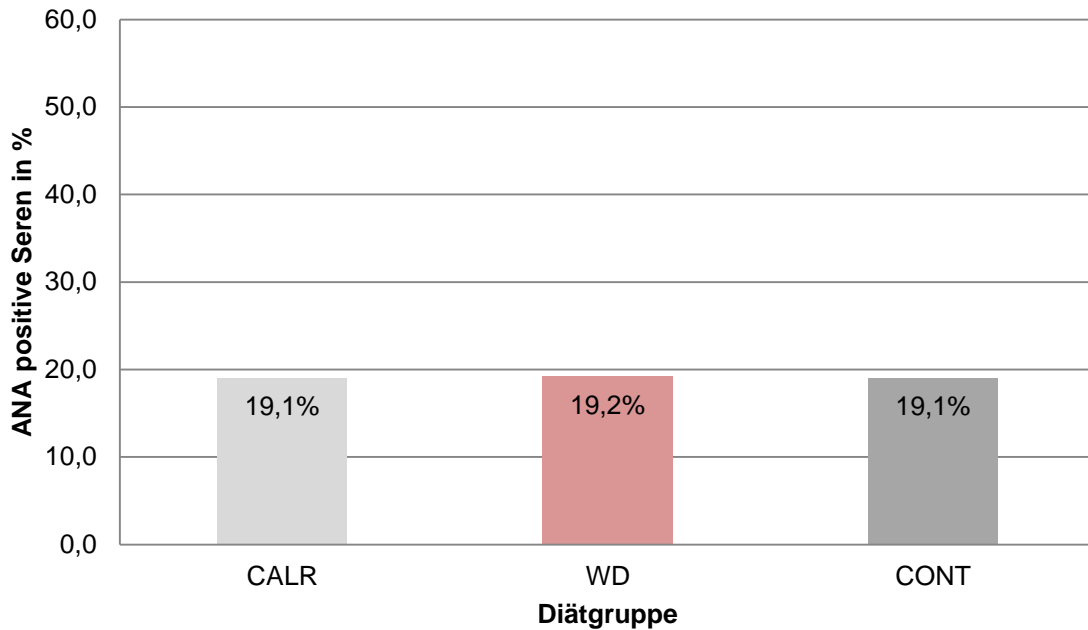


Abbildung 14: Titrierung der in der 1:1000 Verdünnung ANA-positiv getesteten Seren bei AIL-Mäusen zum Zeitpunkt 6 Monate in den drei Diätgruppen (n=136). ANA wurden in einer 1:10.000 Verdünnung mittels IIF-Test auf Hep-Zellen bestimmt. Die Angaben der positiven ANA erfolgt in Prozent (%) und die Darstellung der Daten als Säulendiagramm. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Diätgruppen. CONT vs. WD: $p=0,986$; CONT vs. CALR: $p=1,000$, CALR vs. WD: $p=0,989$. Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test.

3.3 Gewichtsspezifische Unterschiede im Auftreten von ANA im Serum der AIL-Mäuse

Die Berechnungen dieses Abschnittes erfolgten nur anhand der AIL-Mäuse, bei denen ein gültiges Gewicht zu allen drei Messzeitpunkten (2, 4 und 6 Monate) dokumentiert wurde (n=853, fehlende Werte n=82).

3.3.1 Gewichtsentwicklung im zeitlichen Verlauf bei den einzelnen Diätgruppen

Es wurde die Entwicklung des Gewichts bei den einzelnen Diätgruppen zu den Zeitpunkten 2, 4 und 6 Monate untersucht. Tabelle 5 zeigt die zugrunde liegenden Daten dieses Abschnitts.

Tabelle 5: Fälle je Zeitpunkt je Diät

Diät	AIL-Mäuse	2 Monate	4 Monate	6 Monate	Gewicht Zeitpunkt 2+4+6 Monate
CALR	349	337	331	324	319
WD	336	329	325	319	315
CONT	250	232	225	230	219
Gesamt	935	898	881	873	853

In allen drei Diätgruppen kam es von Monat 2 bis Monat 6 zu einer Zunahme des Gewichtes. Am stärksten war diese Gewichtszunahme bei den AIL-Mäusen der WD (Differenz Median 2. zu 6. Monat: 11,1g), geringer bei der Gruppe der CONT (Differenz Median 2. zu 6. Monat: 5,8 g). Die geringste Gewichtszunahme zeigte sich in der CALR (Differenz Median 2. zu 6. Monat: 4,2 g).

Das mediane Gewicht der AIL-Mäuse der WD war zu allen Messzeitpunkten am höchsten, das mediane Gewicht der AIL-Mäuse der CALR am niedrigsten. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren jeweils statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Abb. 15a-c und Tabelle 6 zeigen die Ergebnisse für den Gewichtsverlauf bei den unterschiedlichen Diätgruppen zu den Messzeitpunkten 2, 4 und 6 Monate.

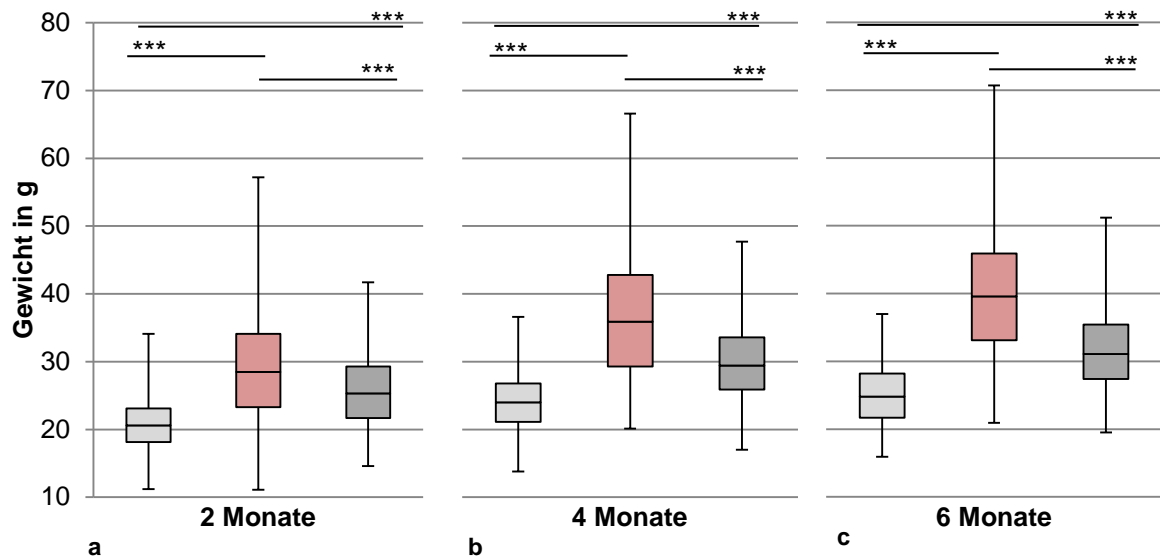


Abbildung 15a-c: Gewicht nach **a)** 2 Monaten, **b)** 4 Monaten und **c)** 6 Monaten bei den drei Diätgruppen der AIL-Mäuse (n=853); **■** CALR **■** WD **■** CONT Hierzu wurden die Tiere im Alter von **a)** 2 Monaten, **b)** 4 Monaten und **c)** 6 Monaten gewogen. Die Gewichtsangaben erfolgen in Gramm (g), die Darstellung der Daten als Box-Whisker-Plot. Während der gesamten Betrachtung waren sowohl Maximalgewicht und Mediangewicht zu allen drei Messzeitpunkten **a, b, c** in der Diätgruppe WD am höchsten. Die Diätgruppe CALR zeigte zu allen drei Messzeitpunkten **a, b, c** das Minimalgewicht und das niedrigste Mediangewicht. Dazwischen befanden sich die Messergebnisse für die Diätgruppe CONT. **a)** CONT vs. WD: $p < 0,001$; CONT vs. CALR: $p < 0,001$, CALR vs. WD: $p < 0,001$. **b)** 4 Monate: CONT vs. WD: $p < 0,001$; CONT vs. CALR: $p < 0,001$, CALR vs. WD: $p < 0,001$. **c)** 6 Monate: CONT vs. WD: $p < 0,001$; CONT vs. CALR: $p < 0,001$, CALR vs. WD: $p < 0,001$. Dargestellt mit $***p < 0,001$. Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Bonferroni Post-Hoc-Test.

Tabelle 6: Gewicht bei den drei Diätgruppen je Untersuchungszeitpunkt

		CALR n=319	CONT n=219	WD n=315
Gewicht in g 2 Monate	Mittelwert \pm Standardabweichung	21,0 \pm 3,8	25,9 \pm 5,5	29,5 \pm 8,0
	Median	20,6	25,3	28,5
	Minimum	11,2	14,6	11,1
	Maximum	34,1	41,7	57,2
Gewicht in g 4 Monate	Mittelwert \pm Standardabweichung	24,1 \pm 4,1	30,2 \pm 6,1	36,7 \pm 9,2
	Median	24,0	29,4	35,9
	Minimum	13,8	17,0	20,1
	Maximum	36,6	47,7	66,6
Gewicht in g 6 Monate	Mittelwert \pm Standardabweichung	25,1 \pm 4,3	31,9 \pm 6,3	40,0 \pm 9,9
	Median	24,8	31,1	39,6
	Minimum	15,9	19,5	20,9
	Maximum	37,0	51,2	70,7

Insgesamt zeigte sich, dass die AIL-Mäuse, die mit der WD gefüttert worden sind im zeitlichen Verlauf die stärkste Gewichtszunahme aufwiesen. Am geringsten fiel die Gewichtsentwicklung bei den nach der CALR gefütterten AIL-Mäusen aus. Die nach der CONT gefütterten Tiere befanden sich zwischen den beiden anderen Diätgruppen. Ebenso folgten die Gewichtsmaxima und das mediane Gewicht dieser Verteilung.

3.3.2 Gewicht und ANA im Serum zu den Zeitpunkten 2, 4 und 6 Monate

Es wurde untersucht, ob das Gewicht der AIL-Mäuse zu den Zeitpunkten 2, 4 und 6 Monate einen Einfluss auf die Entwicklung von ANA zu den jeweiligen Zeitpunkten hatte.

Nach 2 Monaten wiesen ANA-positive AIL-Mäuse (n=52) ein medianes Gewicht von 27,7g auf, während das mediane Gewicht ANA-negativer AIL-Mäuse (n=801) bei 23,6 g lag. Die AIL-Mäuse, die nach 4 Monaten ANA-positiv waren (n=149), hatten nach 4 Monaten ein medianes Gewicht von 32,1 g, ANA-negative AIL-Mäuse (n=704), hatten zu diesem Zeitpunkt ein medianes Gewicht von 27,7 g. Nach 6 Monaten ANA-positive AIL-Mäuse (n=292) wiesen zu diesem Zeitpunkt ein medianes Gewicht von 32,8 g auf, während das mediane Gewicht ANA-negativer AIL-Mäuse (n=561) bei 29,0 g lag.

Zusammenfassend zeigten ANA-positive AIL-Mäuse im Vergleich zu ANA-negativen AIL-Mäusen immer ein höheres medianes Gewicht zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt. Die Gruppenunterschiede waren zu allen drei Untersuchungszeitpunkten jeweils auf einem Niveau von $p < 0,001$ statistisch signifikant. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 16a-c.

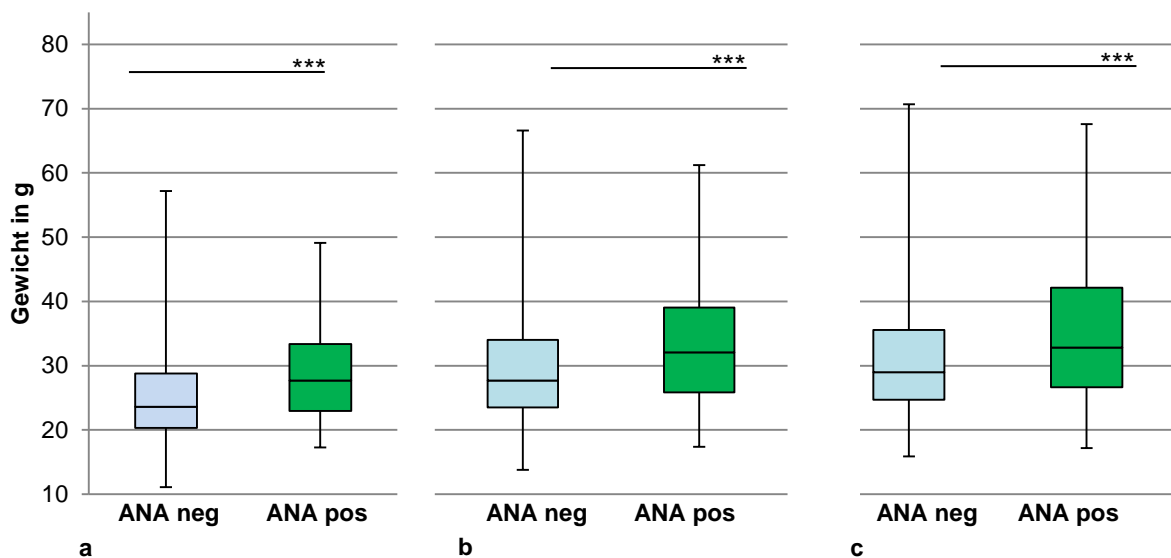


Abbildung 16a-c: Gewicht und Inzidenz von ANA im Gesamtkollektiv zu den Zeitpunkten **a)** 2 Monate, **b)** 4 Monate und **c)** 6 Monate bei den drei Diätgruppen der AIL-Mäuse (n=853). Das Gesamtkollektiv wurde in zwei Gruppen geteilt, ANA positiv und ANA negativ. Im Anschluss wurde das bereits ermittelte Gewicht der Tiere im Alter von **a)** 2 Monaten, **b)** 4 Monaten und **c)** 6 Monaten, entsprechend der Gruppenaufteilung aufgezeigt. Die Gewichtsangaben erfolgen in Gramm (g), die Darstellung der Daten als Box-Whisker-Plot. Zu allen drei Messpunkten war das Mediengewicht der ANA positiv gemessenen Tieren am höchsten, das Maximalgewicht zeigten zu allen drei Messzeitpunkten die ANA negativen Tieren. **a)** 2 Monate: $p < 0,001$, **b)** 4 Monate: $p < 0,001$, **c)** 6 Monate: $p < 0,001$. Dargestellt mit $***p < 0,001$. Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

3.3.3 Prädiktiver Wert des Gewichtes auf die Entwicklung von ANA im Serum im Verlauf

Es wurde untersucht, ob das Gewicht zum Zeitpunkt von 2 Monaten bzw. 4 Monaten einen Einfluss auf die Entwicklung von ANA im Serum im weiteren Verlauf hat.

3.3.3.1 Gewicht bei 2 Monaten

Das mediane 2 Monatsgewicht der zum Zeitpunkt 4 Monate ANA-positiven AIL-Mäuse (n=149) lag bei 25,6 g, während dieses bei zum Zeitpunkt 4 Monate ANA-negativen AIL-Mäuse (n=704) bei 23,6 g lag. Das mediane 2-Monatsgewicht der zum Zeitpunkt 6 Monate ANA-positiven AIL-Mäuse (n=292) lag bei 25,0 g, während dieses bei zum Zeitpunkt 6 Monate ANA-negativen AIL-Mäuse (n=561) bei 23,3 g lag.

Die Unterschiede waren mit $p < 0,001$ jeweils signifikant. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 17a-b.

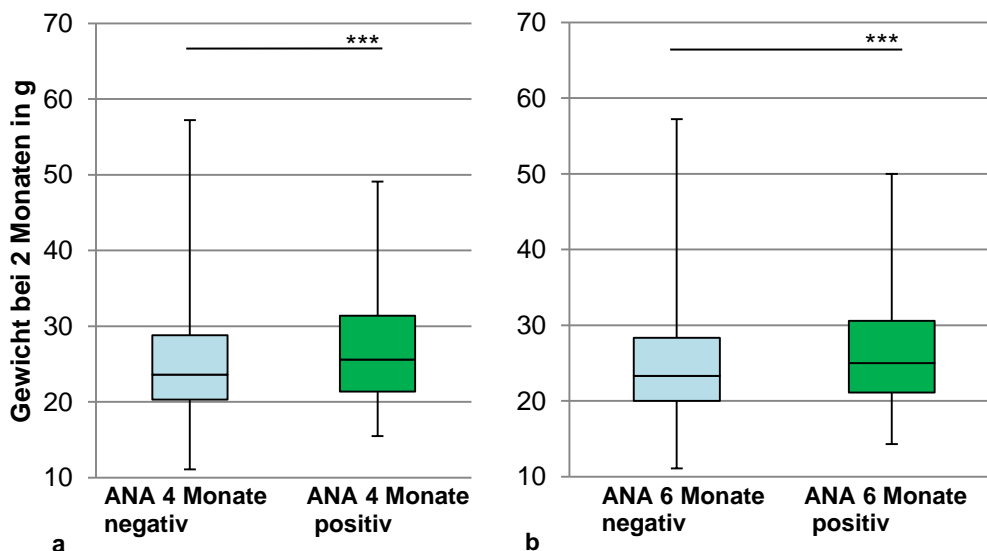


Abbildung 17a-b: Gewicht zum Zeitpunkt 2 Monate bei ANA positiven und ANA negativen AIL-Mäusen zum Zeitpunkt **a)** 4 Monate und **b)** 6 Monate (n= 853). Es wurden zwei Gruppen aus den zum Zeitpunkt **a)** 4 Monate und **b)** 6 Monate ANA positiv und ANA negativ gemessenen Tieren gebildet. Im Anschluss wurde das Körpergewicht in Gramm (g) zum Zeitpunkt 2 Monate der Tiere der jeweiligen Gruppe betrachtet und gegenübergestellt. Die Darstellung der Daten erfolgte als Box-Whisker-Plot. Hierbei zeigt sich, dass sowohl zum Zeitpunkt **a)** 4 Monate, als auch zum Zeitpunkt **b)** 6 Monate, das Mediengewicht bei den ANA positiven Tieren am höchsten ist. Das Maximalgewicht hingegen ist zum Zeitpunkt **a)** 4 Monate und **b)** 6 Monate bei den ANA negativ gemessenen Tieren zu verzeichnen. **a)** ANA 4 Monate: $p < 0,001$, **b)** ANA 6 Monate: $p < 0,001$. Dargestellt mit $***p < 0,001$. Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

3.3.3.2 Gewicht bei 4 Monaten

Das mediane 4-Monatsgewicht der zum Zeitpunkt 6 Monate ANA-positiven AIL-Mäuse (n=292) lag bei 30,7 g, während dieses bei zum Zeitpunkt 4 Monate ANA-negativen AIL-Mäuse (n=561) bei 27,5 g lag. Die Gruppenunterschiede waren mit $p < 0,001$ signifikant (Abb. 18).

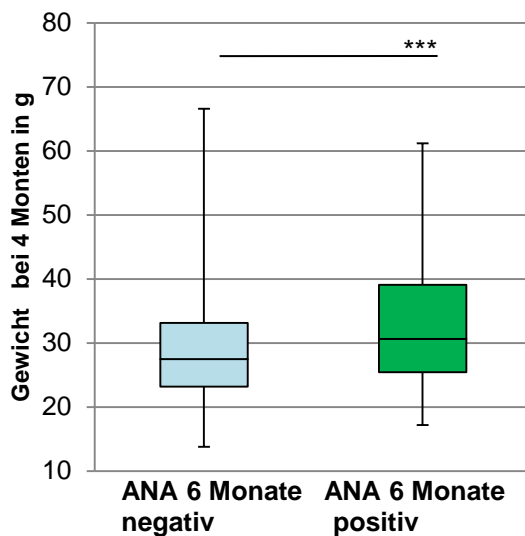


Abbildung 18: Gewicht zum Zeitpunkt 4 Monate bei ANA positiven und ANA negativen AIL-Mäusen zum Zeitpunkt 6 Monate (n= 853). Es wurden zwei Gruppen aus den zum Zeitpunkt 6 Monate ANA positiv und ANA negativ gemessenen Tieren gebildet. Im Anschluss wurde das Körpergewicht in Gramm (g) zum Zeitpunkt 4 Monate der Tiere der jeweiligen Gruppe betrachtet und gegenübergestellt. Die Darstellung der Daten erfolgte als Box-Whisker-Plot. Hierbei zeigt sich, dass zum Zeitpunkt 6 Monate das Mediangewicht bei den ANA positiven Tieren am höchsten ist. Das Maximalgewicht hingegen ist zum Zeitpunkt 6 Monate bei den ANA negativ gemessenen Tieren zu verzeichnen. $p < 0,001$. Dargestellt mit $***p < 0,001$. Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

3.3.4 Quantitatives Auftreten von ANA im Serum zum Zeitpunkt 6 Monate

Es wurde untersucht, ob das Gewicht zum Zeitpunkt 2, 4 und 6 Monate Auswirkung auf den ANA-Titer in den Verdünnungen 1:1000 und 1:10.000 zum Zeitpunkt 6 Monate hatte.

Von den 301 AIL-Mäusen des Gesamtkollektives, die zum Zeitpunkt 6 Monate einen positiven 1:100 ANA-Titer aufwiesen, lagen bei 292 AIL-Mäusen gültige Daten zu der Gewichtsentwicklung zu den Zeiträumen 2, 4 und 6 Monate vor

(fehlende Angaben n=9). Bei 44,9 % dieser AIL-Mäuse (n=131 von 292) konnte zum Zeitpunkt 6 Monate ein 1:1000 ANA-Titer gemessen werden. Im zeitlichen Verlauf ließ sich ebenfalls ablesen, dass AIL-Mäuse die zum Zeitpunkt 6 Monate einen negativen ANA-Nachweis in der 1:10.000 Verdünnung hatten, zu allen drei Messpunkten (2, 4 und 6 Monate) ein niedrigeres medianes und auch ein niedrigeres Maximalgewicht aufwiesen als die ANA-positiven AIL-Mäuse. Die Ergebnisse zeigt die Abb. 19a-c.

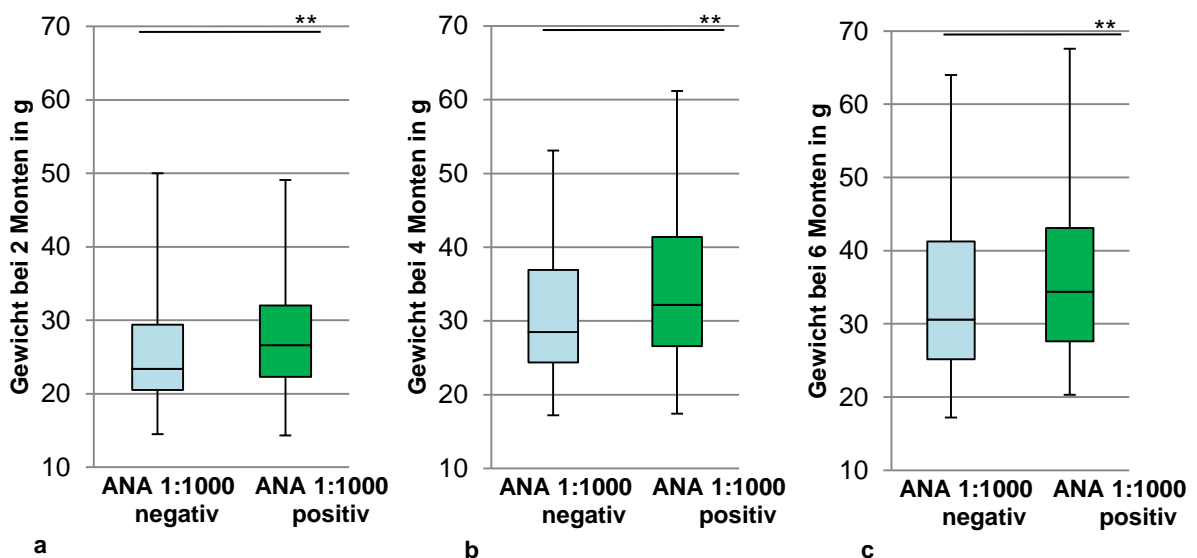


Abbildung 19a-c: Gewicht zum Zeitpunkt **a)** 2 Monate, **b)** 4 Monate und **c)** 6 Monate bei ANA positiven und ANA negativen AIL-Mäusen in der Verdünnung 1:1000 (n=292). Es wurden zwei Gruppen aus den zum Zeitpunkt **a)** 2 Monate, **b)** 4 Monate und **c)** 6 Monate ANA positiv und ANA negativ gemessenen Tieren gebildet. Im Anschluss wurde das Körpergewicht in Gramm (g) der Tiere zum jeweiligen Zeitpunkt mit dem der jeweiligen Gruppe gegenübergestellt. Die Darstellung der Daten erfolgte als Box-Whisker-Plot. Hierbei zeigt sich, dass zum Zeitpunkt **a)** 2 Monate, **b)** 4 Monate und **c)** 6 Monate, das Mediangewicht bei den ANA positiven Tieren am höchsten ist. Das Maximalgewicht ist zum Zeitpunkt **b)** 4 Monate und **c)** 6 Monate bei den ANA positiv gemessenen Tieren zu verzeichnen, nur zum Zeitpunkt **a)** 2 Monate ist es bei den ANA negativ gemessenen Tieren zu verzeichnen. Gewicht **a)** 2 Monate: $p=0,002$; **b)** 4 Monate: $p=0,003$, **c)** 6 Monate: $p=0,007$. Dargestellt mit $**p<0,01$. Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

Ein Titer von 1:10.000 bei 6 Monaten war in 19,1% (n=25 von 131) nachweisbar. Im Anschluss wurde untersucht, wie der Gewichtsverlauf der bei Monat 6 positiv und negativ auf ANA im Serum gemessenen AIL-Mäuse, in der 1:10.000 Verdünnung war. Hier bildet sich ab, dass zu allen drei Messzeitpunkten die ANA-negativen AIL-Mäuse sowohl höheres Median-, als auch höheres Maximalgewicht aufwiesen. Abbildung 20a-c bildet die Ergebnisse ab.

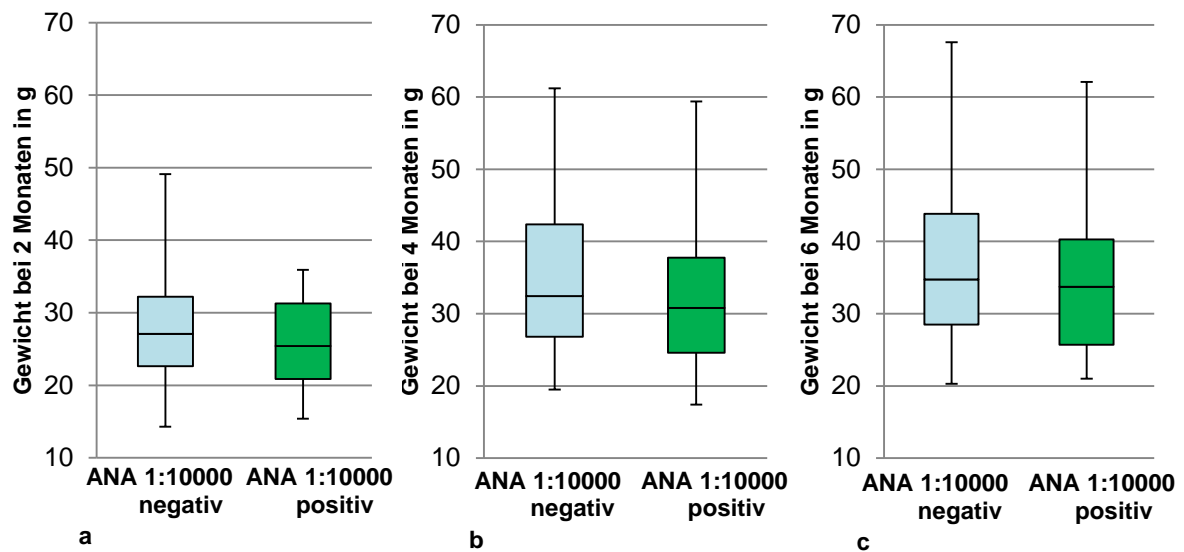


Abbildung 20a-c: Gewicht zum Zeitpunkt **a)** 2 Monate, **b)** 4 Monate und **c)** 6 Monate bei ANA positiven und ANA negativen AIL-Mäusen in der Verdünnung 1:10.000 (n=131). Es wurden zwei Gruppen aus den zum Zeitpunkt **a)** 2 Monate, **b)** 4 Monate und **c)** 6 Monate ANA positiv und ANA negativ gemessenen Tieren gebildet. Im Anschluss wurde das Körpergewicht in Gramm (g) der Tiere zum jeweiligen Zeitpunkt mit dem der jeweiligen Gruppe gegenübergestellt. Die Darstellung der Daten erfolgte als Box-Whisker-Plot. Hierbei zeigt sich, dass zum Zeitpunkt **a)** 2 Monate, **b)** 4 Monate und **c)** 6 Monate, dass das Mediengewicht und das Maximalgewicht bei den ANA negativen Tieren am höchsten ist. Gewicht **a)** 2 Monate: p= 0,144, **b)** 4 Monate: p=0,260, **c)** 6 Monate: p=293. Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

3.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede im Auftreten von ANA im Serum der AIL-Mäuse

Aus diversen vorherigen Untersuchungen zum Thema Kollagenosen und Autoimmunität ist hinreichend bekannt, dass das weibliche Geschlecht eine höhere Prädisposition für das Auftreten von autoimmune rheumatic diseases (ARD) hat (Sekigawa et al., 2004; Whitacre, 2001). Unser AIL-Mauskollektiv (n = 935) beinhaltet 42,4% männliche Tiere (n = 396) und 57,6% weibliche Tiere (n = 539).

3.4.1 ANA im Serum der AIL-Mäuse nach 2, 4 und 6 Monaten

Das Gesamtkollektiv (n=935) wurde entsprechend der Geschlechter in zwei Gruppen geteilt, weiblich (n=539) und männlich (n=396). In der Verdünnung 1:100

wurde das Auftreten von ANA im Serum zum Zeitpunkt 2, 4 und 6 Monate für das jeweilige Geschlecht gemessen.

Nach zwei Monaten entwickelten 5,3% (n=21 von 396 Tieren) der männlichen und 5,9% (n=32 von 539 Tieren) der weiblichen AIL-Mäuse ANA im Serum, dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant.

Nach vier Monaten zeigten 13,1% (n=52 von 396 Tieren) der männlichen und 18,9% (n=102 von 539 Tieren) der weiblichen AIL-Mäuse für ANA positive IIF-Tests. Diese Unterschiede waren statistisch signifikant.

Nach sechs Monaten konnten bei 25,8% (n=102 von 396 Tieren) der männlichen und bei 36,9% (n=199 von 539 Tieren) der weiblichen Tiere ANA im Serum gemessen werden. Diese Ergebnisse waren statistisch signifikant. In der Gesamtschau war zu beobachten, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen im zeitlichen Verlauf zunahmen.

Abb. 21a-c und 22 stellen diese Ergebnisse graphisch dar.

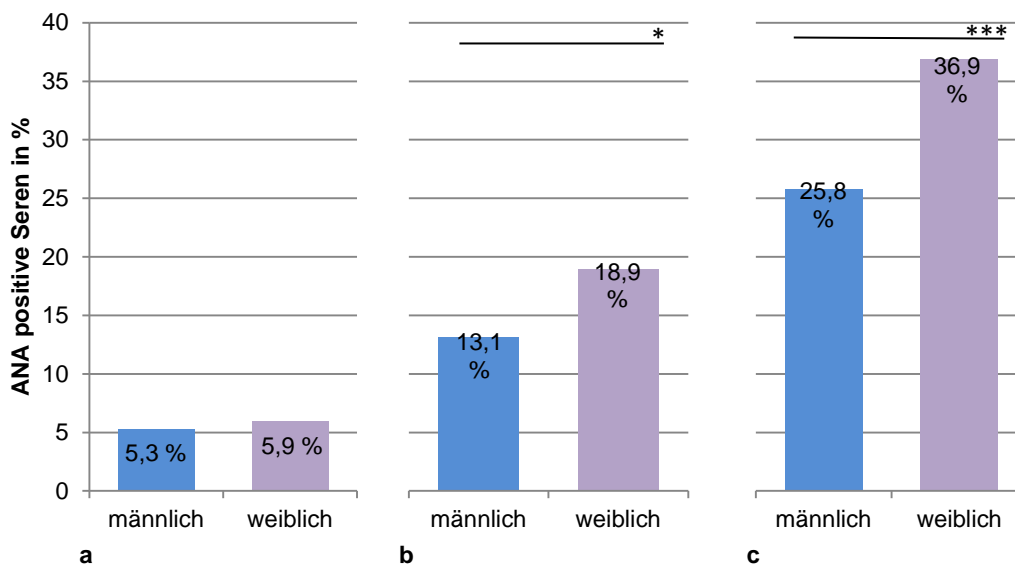


Abbildung 21a-c: Geschlechtsspezifische Unterschiede im Auftreten von ANA im Serum der AIL-Mäuse zum Zeitpunkt **a)** 2 Monate, **b)** 4 Monate und **c)** 6 Monate (n=935). ANA wurden in einer 1:100 Verdünnung mittels IIF-Test auf Hep-Zellen bestimmt. Die Angaben der positiven ANA erfolgt in Prozent (%) und die Darstellung der Daten als Säulendiagramm. Im gesamten Beobachtungszeitraum zeigte sich ein stärkerer Anstieg der Prävalenz der ANA im Serum zugunsten des weiblichen Geschlechts. **a)** 2 Monate: $p=0,679$, **b)** 4 Monate: $p=0,018$, **c)** 6 Monate: $p<0,001$. Dargestellt mit $***p<0,001$, $*p<0,05$. Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test.

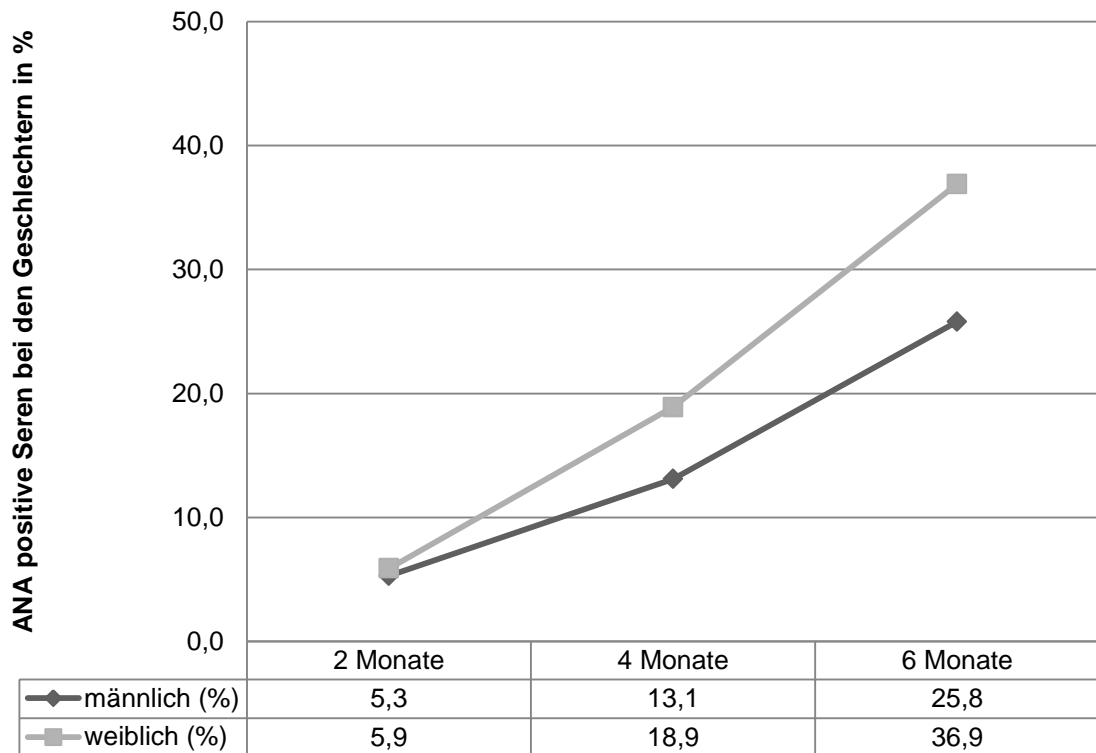


Abbildung 22: Geschlechtsspezifische Unterschiede im Auftreten von ANA im Serum der AIL-Mäuse im zeitlichen Verlauf (n=935). Gegenüberstellung der in der 1:100 Verdünnung ANA-positiv gemessenen Seren des jeweiligen Geschlechts, während des gesamten Beobachtungszeitraumes. Die Angaben der positiven ANA erfolgt in Prozent (%) und die Darstellung der Daten als Liniendiagramm. Es zeigte sich in der chronologischen Abfolge eine stetige Zunahme der ANA im Serum bei beiden Geschlechtern. Das weibliche Geschlecht zeigt im gesamten Beobachtungszeitraum das höchste Maximalgewicht. Bei beiden Geschlechtern stieg die Prävalenz fortwährend an.

3.4.2 Quantitatives Auftreten von ANA im Serum zum Zeitpunkt 6 Monate

Alle AIL-Mäuse die zum Zeitpunkt 6 Monate in der 1:100 Verdünnung positiv auf ANA im Serum getestet worden sind (n=301), wurden entsprechend dem Geschlecht in zwei Gruppen aufgeteilt. 34% männliche Tiere (n= 102) und 66% weibliche Tiere (n= 199). Die Seren dieser AIL-Mäuse wurden anschließend in die Verdünnung 1:1000 überführt und mit Hilfe des IIF-Tests auf ANA getestet.

Dabei konnten bei 45,1% (n=46 von 102 Tieren) der männlichen Seren positive ANA-Nachweise erfolgen und bei 45,2% (n=90 von 199 Tieren) der weiblichen Seren. Die Unterschiede zeigten keine statistische Signifikanz. Im Anschluss wurden die in der 1:1000 positiv auf ANA getesteten Seren in die Verdünnung 1:10.000 überführt. Ein positiver ANA-Nachweis gelang bei 17,4% (n=8 von 46

Tieren) der männlichen und bei 20,0% (n=18 von 90 Tieren) der weiblichen Tiere. Eine graphische Übersicht der Ergebnisse bietet Abb. 23a-b.

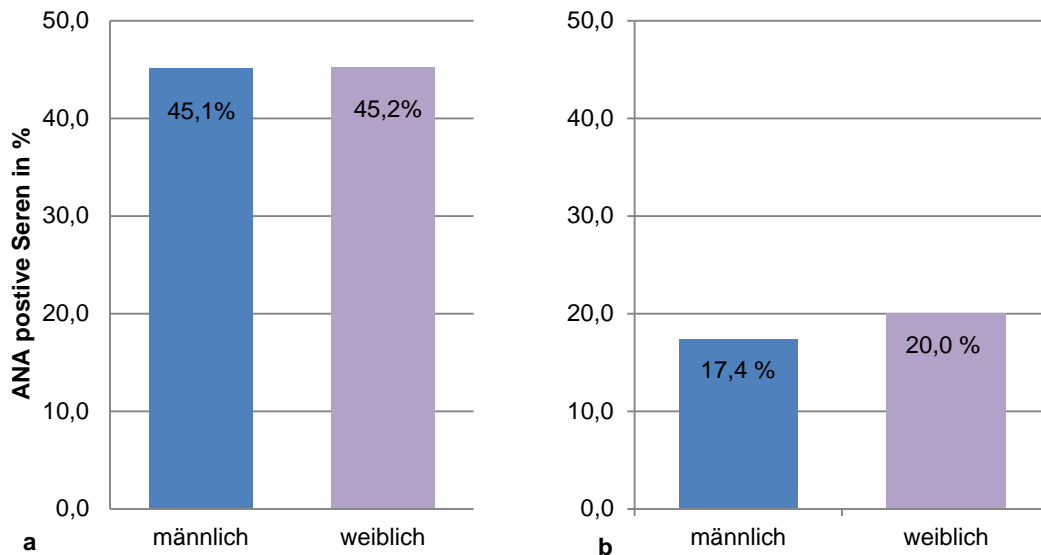


Abbildung 23a-b: Titrierung der, in der Verdünnung 1:100 ANA-positiv getesteten Seren der AIL-Mäuse bei den beiden Geschlechtern am Endpunkt. In der Verdünnung 1:100 positiv auf ANA getestete Seren wurden auf **a)** 1:1000 (n=301) und **b)** 1:10.000 (n=136) titriert und die ANA mittels IIF-Test auf Hep-Zellen bestimmt. Die Angaben der positiven ANA erfolgt in Prozent (%) und die Darstellung der Daten als Säulendiagramm. Sowohl in **a)** als auch in **b)** zeigt sich keine signifikanter Unterschied im ANA-Titer der beiden Geschlechter. **a)** p= 0,983, **b)** p=0,714. Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels Chi-Quadrat-Tests.

4 Diskussion

4.1. Indirekter Immunfluoreszenztest und Anstieg von ANA im Serum im zeitlichen Verlauf

Das gewählte Testverfahren des IIF-Test ist sehr sensitiv zur Diagnosesicherung einer Erkrankung aus dem Formenkreis der ARD, speziell für SLE liegt er bei 95-100% (Agmon-Levin, 2013; Kavanaugh et al., 2000). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass er nicht als Screeningtest geeignet ist, sondern bei zuvor erfolgter Diagnostik hilft, eine Verdachtsdiagnose zu sichern. Als Screeningtest eingesetzt kann es zu falsch positiven Ergebnissen je nach Alter und Geschlecht kommen (Kavanaugh et al., 2000). Auch Mierau und Genth beschrieben, dass „der Immunfluoreszenztest auf Hep-2-Zellen auch heute noch der Standardtest der ersten Stufe in der Antikörper-Diagnostik“ von ARD ist (Mierau und Genth, 2002). Da die in unserer Untersuchung verwendeten AIL-Mäuse bereits aufgrund ihrer Zucht eine genetische Prädisposition für ARD zeigten, ist eine Erkrankung aus dem ARD-Formenkreis sehr wahrscheinlich (Howie und Helyer, 1968; www.jax.org). Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigten, dass die Anzahl der AIL-Mäuse, die positiv auf ANA im Serum getestet worden sind, im zeitlichen Versuchsverlauf stieg. Mit 2 Monaten waren zunächst 5,7% des Gesamtkollektivs ANA positiv, wohingegen nach 4 Monaten bereits 16,5 % und nach 6 Monaten 32,2% der untersuchten Tiere einen positiven ANA-Nachweis erbrachten. Diese Ergebnisse wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:100 gemessen. Kavanaugh et al. beschreiben, dass bei einer Verdünnung von 1:40, 20% gesunde Individuen einen positiven indirekten Immunfluoreszenztest zeigen, bei einer Verdünnung von 1:160 noch etwa 5% der gesunden Individuen (Kavanaugh et al., 2000). Je höher der Verdünnungstiter gewählt wird, umso sicherer wird es, wenn der IIF-Test positiv ausfällt, dass das Individuum an einer ARD leidet (Mariz et al., 2010). Aus diesem Grund erstellten wir Verdünnungen von 1:1000 und 1:10.000 bei den Seren zum Zeitpunkt 6 Monate. Hier zeigte sich, dass bei einer Verdünnung von 1:1000 noch 45,2% der zuvor in der 1:100 Verdünnung positiv getesteten Seren ein positives Ergebnis des IIF-Test zeigten. In der Verdünnung 1:10.000 zeigten noch 19,1% der in der 1:1000 Verdünnung positiv getesteten Seren einen positiven IIF-Test. Das zeigte deutlich, dass die in den Versuch eingeschlossenen,

positiv getesteten AIL-Mäuse an einer Erkrankung aus dem Formenkreis der ARD litten.

4.2 Diät-Unterschiede bei 2, 4 und 6 Monaten

Es ist bekannt, dass ARD durch äußere Einwirkungen, wie beispielsweise die Ernährung eines Individuums, beeinflusst werden können (Fernandes et al., 1973, 1976, 1978). Hierbei zeigt sich vornehmlich, dass eine Modulation der Ernährung sowohl den Zeitpunkt des Auftretens einer phänotypischen Manifestation einer ARD als auch den Schweregrad der Erkrankung positiv verändern kann (Fernandes et al., 1978). Auch die Letalität in Folge einer ARD ist durch diätetische Modulation, im Sinne einer Kalorienrestriktion, signifikant zu senken (Alexander et al, 1987; Fernandes et al., 1976).

4.2.1 Auftreten von ANA im Serum nach 2, 4 und 6 Monaten

Im Rahmen unserer Untersuchungen teilten wir das Gesamtkollektiv in drei Diätgruppen, CONT, WD und CALR. Im Anschluss wurde untersucht, ob sich die drei Diätgruppen hinsichtlich des Auftretens von ANA zu den Untersuchungszeitpunkten 2, 4 und 6 Monate unterschieden. Bereits nach zwei Monaten zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den drei Diätgruppen. CONT unterschied sich gegenüber der WD nur geringfügig (CONT 6,8% vs. WD 8,9%), verglich man jedoch die CONT mit der CALR, so zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Auftreten von ANA im Serum (CONT 6,8% vs. CALR 1,7%). Noch deutlicher war der Vergleich zwischen CALR und der WD (WD 8,9% vs. CALR 1,7%). Hier war das Signifikanzniveau noch höher. Somit ließ sich ableiten, dass ein kalorienreduziertes Ernährungsregime bereits früh Vorteile beim Auftreten von ARD gemessen an ANA im Serum aufweist. Ein ähnliches Verteilungsmuster zeigte sich ebenfalls nach 4 Monaten (CONT 20,0% vs. CALR 5,4% vs. WD 25,3%). Zum Messzeitpunkt 6 Monate hingegen war ein deutlicher Anstieg der ANA im Serum für die kalorienreduzierte Subgruppe erkennbar. Der Unterschied zu den beiden anderen Diätgruppen war weiterhin signifikant (CONT 33,2% vs. CALR 19,8% vs. WD 44,4%). Diese Zunahme der ANA im Serum der CALR in Abb. 11a-c, zeigte allerdings dass sich zwar eine kalorienreduzierte Ernährung

protektiv auf das Auftreten von ANA im Serum ausübte, jedoch eine dauerhafte vollständige Suppression nicht möglich war (Safai-Kutti et al., 1980). Nicht nur gemessen an ANA zeigte sich ein Einfluss eines kalorienreduzierten Ernährungsregimes auf die Entwicklung immunmodulierender Faktoren mit zum Teil autoimmuner Komponente, wie Fernandes et al. und Safai-Kutti et al. am Beispiel von IgG, IgA, Immunkomplexen und Komplementfaktoren aufzeigten (Fernandes et al., 1973, 1978; Safai-Kutti et al., 1980). Die auf das Lebensalter bezogene frühe Kalorienreduktion war nicht nur wichtig für die Modulation des Immunsystems, sondern hat auch Auswirkung auf das allgemeine Überleben von AIL-Mäusen (Safai-Kutti et al., 1980). Jedoch wirkte sich auch eine erst im Lebensverlauf begonnene Kalorienrestriktion positiv auf das Immunsystem aus (Weindruch et al., 1979). Alexander et al. stellten in ihrem Mausmodell heraus, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie Omega-3-Fettsäuren, einen reduzierenden Einfluss auf den Ausbruch von ARD hatten, im Gegensatz zu gesättigten Fettsäuren (Alexander et al., 1987). Lopez et al. zeigten, dass der Krankheitsverlauf bei SLE durch eine Überexpression der Gene, welche für Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und IL-10 kodieren, zu einer deutlich höheren autoreaktiven Aktivität führten (Lopez et al., 2010). Daraus resultierte eine erhöhte Bildung von zirkulierenden Immunkomplexen (Lopez et al., 2010). Adam et al. hingegen erkannten, dass sich neben dem positiven Effekt mehrfach ungesättigter Fettsäuren auch eine vegetarische Ernährung positiv auf ARD, gemessen an CRP, LTB₄ und TNF- α , auswirkt (Adam et al., 2003). Somit ließ sich die genetische Prädisposition positiv beeinflussen. Das Gesamtniveau der kalorienreduzierten Diätgruppe blieb jedoch stets unter dem der anderen beiden Diätgruppen (Abb. 11a-c). Somit konnten wir deutlich zeigen, dass eine kalorienreduzierte Ernährung positiv auf den frühzeitigen Ausbruch einer ARD wirkt und im Lebensverlauf ebenfalls einen gewissen protektiven Einfluss zeigt.

4.2.2 Quantitatives Auftreten von ANA im Serum der AIL-Mäuse zum Zeitpunkt 6 Monate

Die Titration aller in der 1:100 Verdünnung positiv gemessenen Seren auf 1:1000 ergab ein fast identisches Ergebnis für CONT und WD (CONT 50,6% vs. WD 49,0%). Lediglich bei den AIL-Mäusen, denen CALR dargeboten wurde, fielen die

IIF-Tests deutlich seltener positiv aus (30,4%). Im Anschluss wurden alle in der 1:1000 positiv gemessenen Seren wiederum in die Verdünnung 1:10.000 überführt. Hierbei zeigte sich, dass sich alle drei Diätgruppen nahezu gleichen (CONT 19,1% vs. CALR 19,1% vs. WD 19,2%). Sowohl Egner et al., als auch Kavanaugh et al. beschrieben, dass eine Verdünnung von 1:40 eine hohe Rate an falsch positiven Ergebnissen aufweist und erst ab einem Titer von 1:160 eine genauere Trennung zwischen falsch positiven Ergebnissen und tatsächlich erkrankten Individuen möglich sei (Egner, 2000; Kavanaugh et al., 2000). Daher wählten wir zunächst die Verdünnung 1:100 als allgemeines Screeningverfahren. Alle in dieser Verdünnung positiv getesteten Seren wurden anschließend, wie oben beschrieben, weiter verdünnt, da Mariz et al. in ihrer Arbeit darlegten, dass je höher der Titer sei, desto höher auch die Sicherheit sei, dass kein falsch positives Ergebnis gemessen werde (Mariz et al., 2010). Die in der Verdünnung 1:1000 gewonnenen Daten bildeten, unter Ausschluss der möglichen falsch positiven Screeningtest Ergebnisse, den positiven Effekt einer kalorienreduzierten Ernährung auf das Auftreten von ARD ab. Zwar war der Unterschied nicht mehr so deutlich wie in der 1:100 Verdünnung, jedoch weiterhin signifikant. Kritisch bleibt die 1:10.000 Verdünnung zu betrachten, da diese vermutlich zu hoch gewählt wurde, um verwertbare Aussagen daraus schließen zu können. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach Ausschluss falsch positiv getesteter Seren, die CALR einen positiven Effekt auf das Auftreten von ARD gemessen an ANA im Serum hat.

4.3 Gewichtsspezifische Unterschiede im Auftreten von ANA im Serum der AIL-Mäuse

Im Rahmen der Blutentnahme zu den Zeitpunkten 2, 4 und 6 Monate erfolgte die Bestimmung des Körpergewichts der jeweiligen AIL-Maus. Es fiel dabei auf, dass das Körpergewicht der Versuchsmäuse sich entsprechend den drei Diätgruppen CONT, WD und CALR unterschied. Zu allen drei Messpunkten zeigte die Diätgruppe CALR das geringste mediane Gewicht (exemplarisch nach 6 Monaten 24,8g) und die Diätgruppe WD das höchste mediane Gewicht (exemplarisch nach 6 Monaten 39,6g). (Abb. 15a-c). Die Messwerte der Diätgruppe CONT befanden

sich zwischen den beiden anderen Diätgruppen (exemplarisch nach 6 Monaten 31,1g).

4.3.1 Gewichtsentwicklung im zeitlichen Verlauf bei den einzelnen Diätgruppen

Die Daten zum Gewicht der Versuchsmäuse waren für alle drei Diätgruppen unvollständig, allerdings fehlten insgesamt weniger als 10% der Daten, sodass dennoch ein das Gesamtkollektiv repräsentierendes Ergebnis erzielt werden konnte. Insgesamt gestaltete sich die Diätgruppenaufteilung inhomogen. Im gesamten Versuchszeitraum zeigten alle drei Diätgruppen vom initialen Messzeitpunkt 2 Monate zum finalen Messzeitpunkt 6 Monate eine Zunahme des Körpergewichts. Sowohl die stärkste Gewichtszunahme als auch das höchste Endgewicht zeigte die Diätgruppen WD (Abb. 15a-c). Toller-Kawahisa et al. und Sampey et al. konnten ebenfalls zeigen, dass ein hochkalorisches Ernährungsregime zu einer starken Gewichtszunahme führt (Sampey et al., 2011; Toller-Kawahisa et al., 2015). Im Gegensatz dazu zeigte die Subgruppe CALR die geringste Gewichtszunahme und das niedrigste Endgewicht. Die Messwerte des Körpergewichts der Subgruppe CONT befanden sich zwischen den beiden anderen Subgruppen. Versini et al. stellten in ihrer Arbeit heraus, dass nicht alle Erkrankungen aus dem Formenkreis der ARD durch ein hohes Körpergewicht begünstigt werden (Versini et al., 2014). Daher ist nicht klar zu sagen, ob ein höheres Gewicht allein Erkrankungen aus dem Formenkreis der ARD begünstigt.

4.3.2 Gewicht und ANA im Serum zum Zeitpunkt 2, 4 und 6 Monate

In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass AIL-Mäuse, die in der Verdünnung des Serums 1:100 einen ANA positiven IIF-Test aufwiesen, durchgehend ein höheres medianes Körpergewicht zeigten als das übrige Kollektiv. Dieses Resultat ließ sich zu allen drei Messzeitpunkten signifikant ablesen (Abb. 16a-c). Daraus lässt sich folgern, dass ein hohes Körpergewicht das Auftreten von Erkrankungen aus dem Formenkreis der ARD gemessen an ANA begünstigt. Auch Toller-Kawahisa et al. konnten in ihrer Studie eine Korrelation zwischen dem Auftreten von ANA und

dem Körpergewicht aufzeigen (Toller-Kawahisa et al., 2015). Jedoch nicht nur gemessen an ANA ließ sich der entzündliche Prozess der ARD darstellen, sondern auch an allgemeinen Entzündungsmarkern, wie das CRP und IL-6 (Oesner et al., 2005). In der Arbeit von Rizk et al. wurde gezeigt, dass nicht nur das Gewicht gemessen am Body-Mass-Index einen krankheitsfördernden Einfluss allein hat, sondern auch das Alter, die Dauer der Erkrankung und eine im Verlauf gesteigerte Einnahme von Steroiden einen negativen Einfluss auf ARD hat (Rizk et al., 2012).

4.3.3 Prädiktiver Wert des Gewichtes auf die Entwicklung von ANA im Serum im zeitlichen Verlauf

Dass ein erhöhtes Körpergewicht mit dem Auftreten von ANA im Serum vergesellschaftet war, konnten wir im vorherigen Unterpunkt darlegen. An dieser Stelle haben wir untersucht, ob ein höheres Körpergewicht zum Messzeitpunkt 2 Monate einen Prognosefaktor für das Auftreten von ANA im Serum nach 4 bzw. 6 Monaten war. Die Seren der AIL-Mäuse, die zum Messzeitpunkt 4 Monate positive ANA aufwiesen, zeigten bereits zum Messzeitpunkt 2 Monate ein signifikant höheres medianes Körpergewicht als die ANA negativen AIL-Mäuse. Toller-Kawahisa et al. stellten in ihrer Untersuchung am Mausmodell heraus, dass eine Zunahme des Körpergewichts im Verlauf eine Erhöhung der ANA im Serum verursache (Toller-Kawahisa et al., 2015). Eine klare Aussage über den Vorhersagewert eines zu Beginn der Untersuchung aufgezeichneten Körpergewichts fand sich jedoch nicht. Auch die zum Messzeitpunkt 6 Monate ANA positiv gemessenen Seren zeigten zum Messzeitpunkt 2 Monate ein signifikant höheres Körpergewicht als die ANA negativ gemessenen AIL-Maus Seren. Die Tiere, deren Seren zum Messzeitpunkt 6 Monate positiv gemessenen wurden, zeigten ebenfalls zum Messzeitpunkt 4 Monate ein signifikant höheres medianes Körpergewicht als die Seren der ANA negativ gemessenen Tiere. Daraus lässt sich ableiten, dass eine frühzeitige Erhöhung des Körpergewichts einen Voraussagewert für das spätere Auftreten von ANA im Serum und somit auch für Erkrankungen aus dem Formenkreis der ARD ist. Wo allerdings der exakte Punkt ist, ab dem es ein krankheitsförderndes Körpergewicht ist und bis zu welchem

Körpergewicht kein erhöhtes Risiko für das zukünftige Auftreten von ANA im Serum von AIL-Mäusen herrscht, kann diese Arbeit nicht beantworten.

4.3.4 Quantitatives Auftreten von ANA im Serum zum Zeitpunkt 6 Monate

Die Beobachtung des Körpergewichts zu den jeweiligen Messzeitpunkten 2, 4 und 6 Monaten zeigte in allen drei Messreihen, dass ein geringeres Körpergewicht mit einem geringen ANA-Titer in der Verdünnung 1:1000 und ein erhöhtes Körpergewicht mit im Vergleich höheren ANA-Titern vergesellschaftet war. Fernandes et al. haben in ihrer Arbeit am Mausmodell dargelegt, dass eine hochkalorische, fettreiche Ernährung zu einer Zunahme des Körpergewichts führte und die Zunahme des Körpergewichts somit zu einer Erhöhung des ANA-Titers im Serum (Fernandes et al., 1973). Bardana et al. haben vergleichbare Ergebnisse durch Untersuchungen an Makaken erhalten (Bardana et al., 1982). Toller-Kawahisa et al. beschrieben ebenfalls den Zusammenhang zwischen einer durch hochkalorische Ernährung herbeigeführte Gewichtszunahme und der daraus resultierenden vermehrten Produktion von ANA im Serum (Toller-Kawahisa, 2015). Auch diese Tatsache untermauert nicht nur den Einfluss des Körpergewichts auf den grundsätzlichen Krankheitsausbruch einer Erkrankung aus dem Formenkreis der ARD sondern auch auf die Intensität. Die Intensität ließ sich auch an anderen Markern, wie zum Beispiel der Entzündungsaktivität im Serum oder einzelner Organe bzw. Organsysteme in der histopathologischen Untersuchung darlegen (Fernandes et al., 1973; Oesner et al., 2005; Rizk et al., 2012; Safai-Kutti et al., 1980; Sampey et al., 2011). In der Verdünnung 1:10.000 zeigte sich ein gegenteiliges Bild. Hier führte ein niedriges Körpergewicht zu höheren medianen und maximalen ANA-Titern im Serum. Zu erklären wäre dieses Messergebnis lediglich mit einem im Versuch aufgetretenen Messfehler, da alle übrigen erhobenen Ergebnisse eindeutig den Zusammenhang zwischen einem erhöhten Körpergewicht und dem Auftreten bzw. mit einem intensivierten Krankheitsverlauf von ARD beschreiben. Diverse am Mausmodell durchgeführte Studien belegten ebenfalls den Zusammenhang zwischen einem erhöhten Körpergewicht und dem Auftreten von ARD (Fernandes et al., 1973; Toller-Kawahisa et al., 2015).

4.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede im Auftreten von ANA im Serum der AIL-Mäuse

Geschlechtsspezifische Unterschiede bei Erkrankungen aus dem Formenkreis der ARD konnten bereits in vielen Untersuchungen dargelegt werden (Sekigawa et al., 2004; Whitacre, 2001). Es besteht ein Verhältnis von 9:1 zugunsten des weiblichen Geschlechts beim Auftreten von SLE (Soto et al., 2004; Whitacre, 2001). Dieses ist unter anderem auf die Tatsache zurückzuführen, dass das weibliche Geschlecht im Gegensatz zum männlichen Geschlecht eine gesteigerte Immunreaktivität aufweist (Fairweather et al., 2008; Terres et al., 1968; Zandman-Goddard et al., 2007).

4.4.1 ANA im Serum der AIL-Mäuse nach 2, 4 und 6 Monaten

In unserer Untersuchung konnten wir ebenfalls zeigen, dass die weiblichen AIL-Mäuse ein gehäuftes Auftreten von ARD aufwiesen, gemessen an den ANA im Serum. Zum Messzeitpunkt 2 Monate war das Geschlechterverhältnis zuvor noch nahezu gleich (Abb. 21a), bereits nach 4 Monaten zeigte sich jedoch ein signifikanter Geschlechterunterschied zugunsten des weiblichen Geschlechts (Abb. 21b). Zum Messzeitpunkt 6 Monate war der Geschlechterunterschied noch eindeutiger (Abb. 21c). Zandman-Goddard et al. und Soto et al. beschrieben ebenfalls, dass weibliche Individuen in jüngerem Alter als männliche an ARD erkranken, hingegen bei männlichen Individuen ein fulminanterer Verlauf zu verzeichnen war (Soto et al., 2004; Zandman-Goddard et al., 2007). Hierzu werden mehrere Ursachen diskutiert. Wasef et al. vermuteten einen Zusammenhang mit einer Hyperprolaktinämie, einem gesteigerten Östrogenstoffwechsel und mit der Ausschüttung von Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) (Wasef, 2004). Selmi et al. beschrieben, dass weibliche Individuen, die an einer Erkrankung aus dem Formenkreis der ARD leiden, mit einem der beiden X-Chromosome eine deutlich höhere Anzahl an Leukozyten generieren, als männliche Individuen mit dem Y-Chromosom (Selmi, 2008). Specker et al. zeigten, dass männliche, an SLE erkrankte Individuen, häufiger einen schwereren Organbefall mit daraus resultierender gesteigerter Mortalität aufwiesen, als

weibliche an SLE erkrankte Individuen (Specker et al., 1994). Cunningham et al. beschrieben, dass der Östrogen-Rezeptor ER-alpha einen protektiven Effekt bei SLE hat und als mögliches Ziel für zukünftige Therapien geeignet sei (Cunningham und Gilkeson, 2011). Insgesamt scheint es sich hier um eine multifaktorielle Einflussnahme des weiblichen Hormonhaushaltes zu handeln. All diese Faktoren bieten auch zugleich Ansatzpunkte für gerichtete Therapien. Roubinian et al. und Lucas et al. behandelten weibliche NZB/NZW F1 Mäuse mit 5- α -Dihydrotestosteron und konnten damit das Überleben verlängern und die Bildung von Immunkomplexen reduzieren (Lucas et al., 1985; Roubinian et al., 1979a). Roubinian et al. und Jeffries et al. untersuchten ebenfalls am Mausmodell, wie die Modulation von Sexualhormonen Einfluss auf den Krankheitsverlauf des SLE nehmen. Dabei fanden sie heraus, dass männliche Sexualhormone protektiv und weibliche Sexualhormone krankheitsfördernd wirken (Jeffries und Sawalha, 2011; Roubinian et al., 1977).

4.4.2 Quantitatives Auftreten von ANA im Serum zum Zeitpunkt 6 Monate

Malleson et al. fanden heraus, dass im Serum von allen in ihrer Studie untersuchten Kindern bereits bei niedrigen Verdünnungen positive IIFII-Tests für ANA auffielen, egal ob sie an einer Erkrankung aus dem Formenkreis der ARD erkrankt waren oder nicht (Malleson et al., 1997). Ebenfalls unabhängig von dem Vorliegen einer ARD wiesen mehr weibliche Probanden ANA-positive IIFII-Tests auf als männliche Probanden (Malleson et al., 1997). Weiterhin zeigte sich, dass eine niedrige Verdünnung eine niedrige Sensitivität und einen schlechten prädiktiven Vorhersagewert bedeuteten (Malleson et al., 1997). Ab einer Verdünnung von 1:160 stieg die Sensitivität auf 98% bei weiterhin schlechterem prädiktiven Vorhersagewert (Malleson et al., 1997). In unserer Untersuchung kristallisierte sich in der Verdünnung 1:1000 und 1:10.000 kein klarer Unterschied zwischen den Geschlechtern heraus. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass zum Untersuchungszeitpunkt keine Ergebnisse bezüglich der Entzündungsaktivität z.B. gemessen an der histologischen Untersuchung des Nierenparenchyms auf Glomerulonephritis, der positiv gemessenen AIL-Mäuse vorlagen. Unter Zuhilfenahme dieser Ergebnisse ließe sich im Verlauf eine verbindlichere Aussage über den Zusammenhang des ANA-Titers und der Entzündungsaktivität zwischen

weiblichen und männlichen Individuen treffen. In der Verdünnung 1:10.000 konnten wir einen nicht signifikanten Unterschied im Auftreten von ANA im Serum zwischen weiblichen und männlichen Tieren feststellen, mit einem etwas höheren Wert zugunsten der weiblichen Tiere. Craig et al. kamen in ihrer Arbeit zu vergleichbaren Ergebnissen bezüglich des Geschlechterunterschieds des ANA-Titers, jedoch zeigte sich, dass mit zunehmendem Alter die ANA-Konzentration bei weiblichen Individuen signifikant stieg (Craig et al., 1999). Eben diese Aussage konnten wir durch unsere Untersuchungen bestätigen. Dass jedoch eine Verdünnung über die in anderen Studien häufig gewählte Verdünnung von 1:320 hinaus eine höhere Genauigkeit bzw. Differenzierbarkeit bedeutet, konnten wir nicht bestätigen (Egner, 2000; Kavanaugh et al., 2000; Malleson et al., 1997).

4.5 Klinische Relevanz und Ausblick

In Deutschland leiden etwa 10 Millionen Menschen an klinisch manifesten, behandlungsbedürftigen, chronischen Erkrankungen des Stütz- und Bindegewebeapparates (<https://dgrh.de/Start/DGRh/Presse/Daten-und-Fakten/Rheuma-in-Zahlen.html>).

1,5 Millionen Menschen leiden unter entzündlich-rheumatischen Erkrankungen, wie z.B. dem SLE (<https://dgrh.de/Start/DGRh/Presse/Daten-und-Fakten/Rheuma-in-Zahlen.html>). Amerikanischen Daten zufolge wird das Lebenszeitrisiko an einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung zu erkranken für Frauen auf 8% und für Männer auf 5% geschätzt (Crowson et al., 2010; <https://dgrh.de/Start/DGRh/Presse/Daten-und-Fakten/Rheuma-in-Zahlen.html>).

All diese Daten zeigen, dass Erkrankungen aus dem rheumatoiden Formenkreis einen hohen Stellenwert im klinischen Alltag eines Arztes haben. Die Ätiologie der einzelnen Erkrankungen, die unter dem Sammelbegriff ARD zusammengefasst werden, ist bislang nicht abschließend geklärt (Agmon-Levin et al., 2013; Amberger et al., 2012; Riede und Schaefer, 2001). Da es sich um eine multifaktorielle Genese handelt, ist es überaus schwierig, Rückschlüsse auf die exakte Ätiologie zu ziehen (Amberger et al., 2012; Melchers, 2011).

Daher finden sich auch unterschiedliche Behandlungsansätze, wobei sich eine multimodale antiinflammatorische und immunsupprimierende Therapie, bestehend

aus Glukokortikoiden, Azathioprin, Cyclophosphamid und MTX, etabliert hat (Amberger et al., 2012).

Eine Weiterentwicklung dieser Therapien bietet der monoklonale Antikörper Belimumab, der bei schweren, therapierefraktären Verläufen eingesetzt wird (Amberger et al., 2012; <https://de.gsk.com/>). Dieser bindet am BLyS-Protein von B-Lymphozyten und verkürzt die physiologische Lebenszeit dieser Lymphozyten (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/benlysta>). Folglich sinkt dadurch unter anderem die Produktion von ANA durch die pathologischen B-Lymphozyten (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/benlysta>). Ferner sind weitere, alternative Therapieansätze Gegenstand aktueller Forschungsbestrebungen. Ebenso auch der Einfluss von Sexualhormonen auf den Krankheitsverlauf, da weibliche Individuen bekanntlich ein höheres Lebenszeitrisko haben an ARD zu erkranken (Crownsen et al., 2010; <https://dgrh.de/Start/DGRh/Presse/Daten-und-Fakten/Rheuma-in-Zahlen.html>).

In mehreren Untersuchungen konnte der Einfluss von Sexualhormonen auf den Ausbruch und den Krankheitsverlauf von ARD dargestellt werden (Lucas et al., 1985; Roubinian et al., 1979a, 1979b, 1977). Durch die Heterogenität des Hormonhaushaltes zwischen den Geschlechtern ergibt sich ein weiterer Therapieansatz. Dabei konnte man im Mausmodell zeigen, dass die Behandlung mit 5 α -Dihydrotestosteron und Testosteron, positiv auf Ausbruch und Krankheitsverlauf bei ARD wirkt (Lucas et al., 1985; Roubinian et al., 1979b). Hingegen zeigt eine Therapie mit Estradiol-17- β einen schwereren Krankheitsverlauf und eine erhöhte Sterblichkeit (Roubinian et al., 1979b). Diese Erkenntnisse bieten Potential für eine zukünftige zielgerichtete Therapie.

Ein weiterer Ansatzpunkt für eine „targeted therapy“ von ARD ist die Epigenetik (Robertson; 2005). Vornehmlich durch Methylierungsprozesse des Pyrimidinringes der DNA und/oder der Histone wird die Proteinbiosynthese in z.B. Lymphozyten gefördert oder gehemmt (Jeffries und Sawalha, 2011; Robertson, 2005). Somit lässt sich Einfluss auf die Bildung von ANA nehmen. Unter anderem können eine Veränderung der Ernährung oder auch bestimmte Retroviridae die Methylierung der DNA beeinflussen (Jeffries und Sawalha, 2011). Die retrovirale epigenetische Modulation ist eine eventuelle Möglichkeit zukünftig gezielt Einfluss auf den Krankheitsverlauf von ARD zu nehmen.

In unserer Arbeit beleuchten wir den Einfluss des Umweltfaktors Ernährung auf das Auftreten von ARD. Hieraus lässt sich wie oben gezeigt ableiten, dass sich eine Modulation der Ernährung positiv auf den Krankheitsausbruch und den Krankheitsverlauf zeigen kann. Hervorzuheben ist, dass das Resultat dieser Ergebnisse für jeden Patienten, der an einer ARD leidet, zur Verfügung steht und für das Gesundheitssystem keine Kosten verursacht. Somit ist dies ein zumindest supportiver Therapieansatz zu den bereits etablierten immunsupprimierenden und antiinflammatorischen Therapien und hat das Potential das Outcome der Patienten langfristig zu verbessern.

5 Zusammenfassung

Diverse Umweltfaktoren beeinflussen das Auftreten von Erkrankungen aus dem Formenkreis der autoimmunen rheumatischen Erkrankungen (ARD). In den letzten Jahrzehnten konnte ein starker Anstieg der Inzidenz von ARD in den westlichen Industrieländern verzeichnet werden (Versini et al., 2014). Zudem fiel im gleichen Zeitraum ein ebenso starker Anstieg an deutlich übergewichtigen Individuen in der beobachteten Population auf (Versini et al., 2014). Am Mausmodell untersuchten wir an n=935 Individuen den Zusammenhang zwischen dem Anstieg des Körpergewichts und dem Auftreten von ARD am Beispiel der Kollagenose systemischer Lupus erythematodes (SLE). Hierzu testeten wir die Seren der in den Versuch eingeschlossenen autoimmunitätsprädisponierten Inter-Cross-Line (AIL)-Mäuse mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztests (IIF-Test) auf Hep-2-Zellen auf antinukleäre Antikörper (ANA). Dafür teilten wir das Mauskollektiv in drei Diätgruppen mit drei unterschiedlichen Ernährungsregimen. Eine Kontrollgruppe mit normaler Tierhaltungsnahrung (CONT), eine 60 % kalorienreduzierte Tierhaltungsnahrung (CALR) und eine hochkalorische Western-Diät (WD).

Es zeigte sich zu allen drei Untersuchungszeitpunkten, nach 2, 4 und 6 Monaten, dass das allgemeine Auftreten von ARD gemessen an ANA bei den AIL-Mäusen, die mit WD gefüttert worden sind, am höchsten war. CALR zeigte die niedrigste Auftretensrate von ANA im Serum im untersuchten Zeitraum (Abb. 11a-c). Ebenso wiesen die mit WD gefütterten AIL-Mäuse im Beobachtungszeitraum 2, 4 und 6 Monate das höchste mediane und absolute Körpergewicht auf. Das niedrigste mediane und absolute Körpergewicht konnte bei den mit CALR gefütterten Tieren festgestellt werden (Abb. 15a-c). Geschlechtsspezifische Unterschiede zu Lasten des weiblichen Geschlechts zeigten sich besonders nach 6 Monaten mit einem hohen Signifikanzniveau (Abb. 21a-c).

Zusammenfassend zeigte sich, dass das weibliche Geschlecht auch in unserer Untersuchung eine Prädisposition für das Auftreten von ARD aufweist. Als Kernaussage konnten wir die Hypothese von Mierau und Genth mit unserer Arbeit belegen, da wir zeigen konnten, dass eine kalorienreduzierte Ernährung mit daraus resultierendem geringerem Körpergewicht, einen protektiven Einfluss auf

die Inzidenz und die Schwere von Erkrankungen aus dem Formenkreis der ARD gemessen an SLE bedeutet (Mierau und Genth, 2002).

Somit ergeben sich durch unsere Arbeit weitere Ansätze in der Prävention und Therapie von ARD.

6 Literaturverzeichnis

1. Adam O, Beringer C, Kless T, Lemmen C, Adam A, Wiseman M, Adam P, Klimmek R, Forth W: Anti-inflammatory effects of low arachidonic acid diet and fish oil in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international* 23, 27-26 (2003)
2. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, Bossuyt X, Musset L, Cervera R, Plaza-Lopez A, Dias C, Sousa MJ, Radice A, Eriksson C, Hultgren O, Viander M, Khamashta M, Regenass S, Coelho Andrade LE, Wiik A, Tincani A, Rönnelid J, Bloch DB, Fritzler MJ, Chan EKL, Garcia-De La Torre I, Konstantinov KN, Lahita R, Wilson M, Vainio O, Fabien N, Sinico RA, Meroni P, Shoenfeld Y: International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Annals of rheumatic diseases* 73, 17-23 (2013)
3. Alexander NJ, Smythe NL, Jokinen MP: The type of dietary fat affects the severity of autoimmune disease in NZB/NZW mice. *The american journal of pathology* 127, 106-121 (1987)
4. Amberger C, Brunner J, Harten P: Rheumatologie-Systemischer Lupus erythematodes (SLE). In: Herold G, Erdmann E, Gross R, Krone W, Schicha H, Aliani S, Amberger C, Baierlein S, Wistop A, Baumgartner H, Borgerg H, Bösch D, Brockmann JG, Brunner J, Bühler G, Canbay A, Cerma A, Deixler E, Deuss U, Doss, MO, Drexler H, Erren T, Groß JV, Faber L, Fenk R, Fetscher S, Gärtner J, Junk E, Schneider G, Gawaz M, Gerhardt U, Göbel H, Hallek M, Fischer J, Königs S, Platten M, Scheffler M, Harten P, Hauer B, Hebe J, Heidemann J, Heintges T, Höchsmann B, Hoffmann B, Hollstein G, Huber R, Janssen A, Kaemmerer H, Kindler J, Knitrup S, Krebs P, Lehmann K, Li J, Magdorf K, Mellinghoff A, Mellwig KP, Michels G, Mödder G, Montemurro M, Neidert M, Oette K, Oette M, Ollenschläger G, Opitz D, Predel HG, Randerath W, Riebschläger S,

- Heinemann FM, Ross M, Röth A, Sauer W, Schicho AJ, Schmidt HK, Schmidt-Walczych J, Schönfeld N, Schwickrath J, Spitz J, Switkowski R, Weiler S, Zoller H (Hrsg.): Innere Medizin. 2013, 671-676, Herold, Köln, 2012
5. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, Smolen JS, Wofsy D, Boumpas DT, Kamen DL, Jayn D, Cervera R, Costedoat-Chalumeau N, Diamond B, Gladman DD, Hahn B, Hiepe F, Jacobsen S, Khanna D, Lerstrøm K, Massarotti E, McCune J, Ruiz-Irastorza G, Sanchez-Guerrero J, Schneider M, Urowitz M, Bertsias G, Hoyer BF, Leuchten N, Tani C, Tedeschi SK, Touma Z, Schmajuk G, Anic B, Assan F, Chan TM, Clarke AE, Crow MK, Czirják L, Doria A, Graninger W, Halda-Kiss B, Hasni S, Izmirly PM, Jung M, Gábor Kumánovics G, Mariette X, Padjen I, Pego-Reigosa JM, Romero-Diaz J, Rúa-Figueroa Fernández I, Seror R, Stummvoll GH, Tanaka Y, Tektonidou MG, Vasconcelos C, Vital EM, Wallace DJ, Yavuz S, Meroni PL, Fritzler MJ, Naden R, Dörner T, Johnson SR: 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatology* 71, 1400-1412 (2019)
 6. Bacman S, Perez Leiros C, Sterin-Borda L, Hubscher O, Arana R, Bordaal E: Autoantibodies against lacrimal gland M3 muscarinic acetylcholine receptors in patients with primary Sjögren's syndrome. *Investigative ophthalmology and visual science* 39, 151-159 (1998)
 7. Bardana EJ jr., Malinow MR, Houghton DC, McNulty WP, Wuepper KD, Parker F, Pirofsky B: Diet-induced systemic lupus erythematosus (SLE) in primates. *American journal of kidney diseases* 1, 345-352 (1982)
 8. Burnett FM, Holmes C: The natural history of the NZB/NZW F1 hybrid mouse: a laboratory model of systemic lupus erythematosus. *Australasian annals of medicine* 14, 185-191 (1965)

9. Clark LD, Clark RK, Heber-Katz E: A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. *Clinical immunology and immunopathology* 88, 35-45 (1998)
10. Craig WY, Ledue TB, Johnson AM, Ritchie RF: The distribution of antinuclear antibody titers in "normal" children and adults. *The journal of rheumatology* 26, 914-919 (1999)
11. Crownson CS, Matteson EL, Myasoedova E, Michet CJ, Ernste FC, Warrington KJ, Davis III, JM, Hunder GG, Thorneau TM, Gabriel SE: The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis and rheumatology* 63, 633-639 (2010)
12. Cunningham M, Gilkeson G: Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. *Clinical reviews in allergy and immunology* 40, 66-73 (2011)
13. Dalakas MC, Hohlfield R: Polymyositis and dermatomyositis. *The lancet* 362, 971-982 (2003)
14. De Lema GP, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F, Schlöndorff D: Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *Journal of the American society of nephrology* 12, 1369-1382 (2001)
15. Dubois EL, Horowitz RE, Demopoulos HB, Teplitz R: NZB/NZW mice as a model of systemic lupus erythematosus. *Jama* 195, 285-289 (1966)
16. Egner W: The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *Journal of clinical pathology* 53, 424-432 (2000)

17. Fairweather DL, Frisancho-Kiss S, Rose NR: Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective. *The American Journal of Pathology* 173, 600-609 (2008)
18. Fernandes G, Yunis EJ, Good RA: Influence of diet on survival of mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 1279-1283 (1976)
19. Fernandes G, Yunis EJ, Jose DG, Good RA: Dietary influence on antinuclear antibodies and cell-mediated immunity in NZB mice. *International Archives of Allergy and Immunology* 44, 770-782 (1973)
20. Fernandes G, Yunis EJ, Friend P, Good RA: Influence of dietary restriction on immunologic function and renal disease in (NZB x NZW) F1 mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 1500-1504 (1978)
21. Fox RI: Sjogren's syndrome. *The Lancet* 366, 321-331 (2005)
22. Gilliam JN, Hurd ER, Ziff M: Subepidermal deposition of immunoglobulin in NZB/NZW F1 hybrid mice. *The Journal of Immunology* 114, 133-137 (1975)
23. Gonzalez EN, Rothfield NF: Immunoglobulin class and pattern of nuclear fluorescence in systemic lupus erythematosus. *New England Journal of Medicine* 274, 1333-1338 (1966)
24. Gulbins E, Lang KS: Immunsystem. In: Schmidt RF, Lang F, Thews G (Hrsg.): *Physiologie des Menschen*. 29. Aufl., 539-550, Springer, Heidelberg, 2004
25. Holmes MC, Burnet FM.: The natural history of autoimmune disease in NZB Mice: a comparison with the pattern of human autoimmune manifestation. *Annals of Internal Medicine* 59, 265-276 (1963)

26. Howie JB, Helyer BJ: The immunology and pathology of NZB mice. *Advances in immunology* 9, 215-216 (1968)
27. Hsu HC, Yang P, Wang J, Wu Q, Myers R, Chen J, Yi J, Guentert T, Tousson A, Stanus AL, Le TL, Lorenz RG, Xu H, Kolls JK, Carter RH, Chaplin DD, Williams RW, Mountz JD: Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nature immunologie* 9, 166-175 (2008)
28. <https://dgrh.de/Start/DGRh/Presse/Daten-und-Fakten/Rheuma-in-Zahlen.html> (Tag des Zugriffs: 02.03.2018)
29. http://immunologie-labor.com/service_files/fach_kollagenose.pdf (Tag des Zugriffs: 02.03.2018)
30. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/benlysta> (Tag des Zugriffs: 02.03.2018)
31. <https://de.gsk.com/> (Tag des Zugriffs: 02.03.2018)
32. Jacob N, Guo S, Mathian A, Koss MN, Gindea S, Putterman C, Jacob CO, Stohl W: B Cell and BAFF Dependence of IFN- α -Exaggerated Disease in Systemic Lupus Erythematosus-Prone NZM 2328 Mice. *The Journal of immunology* 186, 4984-4993 (2011)
33. Jeffries MA, Sawalha AH: Epigenetics in systemic lupus erythematosus: leading the way for specific therapeutic agents. *International journal of clinical rheumatology* 6, 423-438 (2011)
34. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA: Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Archives of pathology and laboratory medicine* 124, 77-81 (2000)

35. Kench JA, Russell DM, Fadok VA, Young SK, Worthen GS, Jones-Carson J, Henson JE, Henson PM, Nemazee D: Aberrant wound healing and TGF- β production in the autoimmune-prone MRL/+ mouse. *Clinical immunology* 92, 300-310 (1999)
36. Kleinert S, Feuchtenberger M, Tony HP: Systemischer Lupus erythematoses. *Der Internist* 51, 1013-1028 (2010)
37. Kyogoku C, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VEH, Chang M, Ramos P, Baechler EC, Batliwalla FM, Novitzke J, Williams AH, Gillett C, Rodine P, Graham RR, Ardlie KG, Gaffney PM, Moser KL, Petri M, Begovich AB, Gregersen PK, Langefeld CD, Behrens TW.: Genetic Association of the R620W Polymorphism of Protein TyrosinePhosphatase PTPN22 with Human SLE. *American journal of human genetics* 75, 504-507 (2004)
38. Lambert PH, Dixon FJ: Pathogenesis of the glomerulonephritis of NZB/W mice. *Journal of experimental medicine* 127, 507-522 (1967)
39. Lopez P, Guterrez C, Suarez A: IL-10 and TNF α Genotypes in SLE. *Journal of biomedicine and biotechnology* 2010, 1-11 (2010)
40. Lucas JA, Ahmed SA, Casey ML, MacDonald PC: Prevention of autoantibody formation and prolonged survival in new zealand black/new zealand white F1 mice fed dehydroisoandrosterone. *The journal of clinical investigation* 75, 2091-2093 (1985)
41. Malleson PN, Sailer M, Mackinnon MJ: Usefulness of antinuclear antibody testing to screen for rheumatic diseases. *Archives of diseases in childhood* 77, 299-304 (1997)
42. Mariz HA, Sato EA, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LEC: Pattern on the antinuclear antibody-Hep-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and

- patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis and rheumatology* 63, 191-200 (2010)
43. Masinde GL, Li X, Gu W, Davidson H, Mohan S, Baylink DJ: Identification of Wound Healing/Regeneration Quantitative Trait Loci (QTL) at Multiple Time Points that Explain Seventy Percent of Variance in (MRL/MpJ and SJL/J) Mice F2 Population. *Genome research* 11, 2027-2033 (2001)
44. Melchers I: Genetik bei Kollagenosen. *Zeitschrift für Rheumatologie* 70, 192-197 (2011)
45. Mierau R, Genth E: Neue Aspekte der Autoantikörper-Diagnostik bei Kollagenosen. *Zeitschrift für Rheumatologie* 61,0355-366 (2002)
46. Mountz JD, Yang P, Wu Q, Zhou J, Tousson A, Fitzgerald A, Allen J, Wang X, Cartner S, Grizzle WE, Yi N, Lu L, Williams RW und Hsu HC: Genetic segregation of spontaneous erosive arthritis and generalized autoimmune disease in the BXD2 recombinant inbred strain of mice. *Scandinavian journal of immunology* 61, 128-138 (2005)
47. Mural RJ, Adams MD, Myers EW, Smith HO, Gabor Miklos GL, Wides R, Halpern A, Li PW, Sutton GG, Nadeau J, Salzberg SL, Holt RA, Kodira CD, Lu F, Chen L, Deng Z, Evangelista CC, Gan W, Heiman TJ, Li J, Li Z, Merkulov GV; Milshina NV, Naik AK, Qi R, Shue BC, Wang A, Wang J, Wang X, Yan X, Ye J, Yooseph S, Zhao Q, Zheng L, Zhu SC, Biddick K, Bolanos R, Delcher AL, Dew IM, Fasulo D, Flanigan MJ, Huson DH, Kravitz SA, Miller JR, Mobarry CM, Reinert K, Remington KA, Zhang Q, Zheng XH, Nusskern DR, Lai Z, Lei Y, Zhong W, Yao A, Guan P, Ji RR, Gu Z, Wang ZY, Zhong F, Xiao C, Chiang CC, Yandell M, Wortman JR, Amanatides PG, Hladun SL, Pratts EC, Johnson JE, Dodson KL, Woodford KJ, Evans CA, Gropman B, Rusch DB, Venter E, Wang M, Smith TJ, Houck JT, Tompkins DE, Haynes C, Jacob D, Chin SH, Allen DR, Dahlke CE, Sanders R, Li K, Liu X, Levitsky AA, Majoros WH, Chen Q, Xia AC, Lopez JR, Donnelly MT, Newman MH, Glodek A, Kraft CL, Nodell M, Ali F, An HJ, Baldwin-Pitts D,

Beeson KY, Cai S, Carnes M, Carver A, Caulk PM, Center A, Chen YH, Cheng ML, Coyne MD, Crowder M, Danaher S, Davenport LB, Desilets R, Dietz SM, Doup L, Dullaghan P, Ferriera S, Fosler CR, Gire HC, Gluecksmann A, Gocayne JD, Gray J, Hart B, Haynes J, Hoover J, Howland T, Ibegwam C, Jalali M, Johns D, Kline L, Ma DS, MacCawley S, Magoon A, Mann F, May D, McIntosh TC, Mehta S, Moy L, Moy MC, Murphy BJ, Murphy SD, Nelson KA, Nuri Z, Parker KA, Prudhomme AC, Puri VN, Qureshi H, Raley JC, Reardon MS, Regier MA, Rogers YHC, Romblad DL, Schutz J, Scott JL, Scott R, Sitter CD, Smallwood M, Sprague AC, Stewart E, Strong RV, Suh E, Sylvester K, Thomas R, Tint NN, Tsonis C, Wang G, Wang G, Williams MS, Williams SM, Windsor SM, Wolfe K, Wu MM, Zaveri J, Chaturvedi K, Gabrielian AE, Ke Z, Sun J, Subramanian G, Venter JC: A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome. *Science* 296, 1661-1671 (2002)

48. Murphy K, Travers P, Walport M: Einführung in die Immunologie und die angeborene Immunität-Grundbegriffe der Immunologie, Grundlagen der angeborenen und der erworbenen Immunität. In: Murphy K, Travers P, Walport M (Hrsg.): *Janeway Immunologie*. 7. Aufl., 5-37, Spektrum, Heidelberg 2009a
49. Murphy K, Travers P, Walport M: Die Erkennung von Antigenen-Antigenerkennung durch B-Zell- und T-Zell-Rezeptoren, Die Struktur eines typischen Antikörpermoleküls. In: Murphy K, Travers P, Walport M (Hrsg.): *Janeway Immunologie*. 7. Aufl., 140-150, Spektrum, Heidelberg 2009b
50. Murphy K, Travers P, Walport M: Autoimmunität und Transplantation. In: Murphy K, Travers P, Walport M (Hrsg.): *Janeway Immunologie*. 7. Aufl., 751-802, Spektrum, Heidelberg 2009c
51. Oesner A, Chung CP, Asanuma Y, Avalos I, Stein CM: Obesity is an independent contributor to functional capacity and inflammation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatology* 52, 3651-3659 (2005)

52. O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH.: T cell- and B cell-independent adaptive immunity. *Nature immunology*. *Nature immunology* 7, 507-516 (2006)
53. Riede US, Schaefer HE (Hrsg.): *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 4. Aufl., 9-200, Thieme, Stuttgart, 2001
54. Rizk A, Gheita TA, Nassef S, Abdallah A: The impact of obesity in systemic lupus erythematosus on disease parameters, quality of life, functional capacity and the risk of atherosclerosis. *International journal of rheumatic diseases* 15, 261-267 (2012)
55. Robertson KD: DNA methylation and human disease. *Nature reviews genetics* 6, 597-610 (2005)
56. Rosenthal N, Brown S: The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nature cellbiology* 9, 993-999 (2007)
57. Roubinian JR, Talal N, Greenspan JS, Goodman JR, Siiteri PK: Delayed androgen treatment prolongs survival in murine lupus. *The journal of clinical investigation* 63, 902-911 (1979a)
58. Roubinian JR, Papoian R, Talal, N: Androgenic hormones modulate autoantibody responses and improve survival in murine lupus. *The journal of clinical investigation* 59, 1066-1070 (1977)
59. Roubinian J, Talal N, Siiteri PK, Sadakian JA: Sex hormone modulation of autoimmunity in NZB/NZW mice. *Arthritis and rheumatology* 22, 1161-1169 (1979b)
60. Sadava D, Hillis DM, Heller HC, Berenbaum MR: *Zellzyklus und Zellteilung*. In: Sadava D, Hillis DM, Heller HC, Berenbaum MR (Hrsg.): *Purves Biologie*. 9. Aufl., 274-301, Spektrum, Heidelberg, 2011a

61. Sadava D, Hillis DM, Heller HC, Berenbaum MR: DNA und ihre Funktion bei der Vererbung. In: Sadava D, Hillis DM, Heller HC, Berenbaum MR (Hrsg.): Purves Biologie. 9. Aufl., 346-372, Spektrum, Heidelberg, 2011b
62. Sadava D, Hillis DM, Heller HC, Berenbaum MR: Gene und Vererbung. In: Sadava D, Hillis DM, Heller HC, Berenbaum MR (Hrsg.): Purves Biologie. 9. Aufl., 454-468, Spektrum, Heidelberg, 2011c
63. Satoh M, Chan EKL, Ho LA, Rose KM, Parks CG, Cohn RD, Jusko TA, Walker NJ, Germolec DR, Whitt IZ, Crockett PW, Pauley BA, Chan JYF, Ross SJ, Birnbaum LS, Zeldin DC, Miller FW: Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the united states. *Arthritis and rheumatology* 64, 2319-2327 (2012)
64. Safai-Kutti S, Fernandes G, Wang Y, Safai B, Good RA, Day NK: Reduction of circulating immune complexes by calorie restriction in (NZB x NZW) F1 mice. *Clinical immunology and immunopathology* 15, 293-300 (1980)
65. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Makowski L: Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity* 19, 1109-1117 (2011)
66. Schütt C, Bröker B: Was gehört zum Immunsystem? In: Schütt C, Bröker B (Hrsg.): *Grundwissen Immunologie*. 2. Aufl., 2-21, Spektrum, Heidelberg, 2009
67. Sekigawa I, Naito T, Hira K, Mitsuishi K, Ogasawara H, Hashimoto H, Ogawa H: Possible mechanisms of gender bias in SLE: a new hypothesis involving a comparison of SLE with atopy. *Sage journals* 13, 219-222 (2004)

68. Selmi C: The X in sex: how autoimmune diseases revolve around sex chromosomes. *Best practice and research clinical rheumatology* 22, 913-922 (2008)
69. Soto ME, Vallejo M, Guillén F, Simón Ja, Arena E, Reyes PA: Gender impact in systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental Rheumatology* 22, 713-721 (2004)
70. Specker C, Becker A, Lakomek HJ, Bach D, Grabensee B: Systemic lupus erythematosus in men-a different prognosis? *Zeitschrift für Rheumatologie* 53, 339-345 (1994)
71. Strickland FM, Hewagama A, Wu A, Sawalha AH, Delaney C, Hoeltzel MF, Yung R, Johnson K, Mickelson B, Richardson BC: Diet influences expression of autoimmune-associated genes and disease severity by epigenetic mechanism in a transgenic mouse model of lupus. *Arthritis and Rheumatology* 65, 1872-1881 (2013)
72. Talal N: Immunologic and viral factors in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatology* 19, 887-894 (1970)
73. Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, Moroi Y, Fritzler MJ, Peebles C: Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatology* 23, 617-625 (1980)
74. Terres C, Morrison SL, Habicht GS: A quantitative difference in the immune response between male and female mice. *Experimental biology and medicine* 127, 664-667 (1968)
75. Toller-Kawahisa JE, Canicoba NC, Venancio VP, Kawahisa R, Antunes LM, Cunha T, Marzocchi-Machado CM: Systemic lupus erythematosus onset in lupus-prone B6.MRL/lpr mice is influenced by weight gain and is preceded by an increase in neutrophil oxidative burst activity. *Free radical biology and medicine* 86, 362-373 (2015)

76. Versini M, Jeandel PY, Rosenthal E, Shoenfeld Y: Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander. *Autoimmunity reviews* 13, 981-1000 (2014)
77. Wasef SZY: Gender differences in systemic lupus erythematosus. *Gender medicine* 1, 12-17 (2004)
78. Weindruch RH, Kristie JA, Cheney KE, Walford RL: Influence of controlled dietary restriction on immunologic function and aging. *Federation proceedings* 38, 2007-2016 (1979)
79. Whitacre CC: Sex differences in autoimmune disease. *Nature immunology* 2, 777-780 (2001)
80. www.euroimmun.de (Tag des Zugriffs: 04.06.2017)
81. www.jax.org (Tag des Zugriffs: 15.03.2018)
82. www.rheuma-liga.de (Tag des Zugriffs: 02.03.2018)
83. www.rheumatology.org (Tag des Zugriffs: 15.03.2018)
84. Zandman-Goddard G, Peeva E, Shoenfeld Y: Gender and autoimmunity. *Autoimmunity reviews* 6, 366- 372 (2007)

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1a-b: IgG Antikörper _____	3
Abbildung 2a-b: a: Immunkomplexglomerulonephritis bei einer Maus b: Glomerulus einer gesunden Maus _____	7
Abbildung 3a-b: Schmetterlingserythem bei SLE _____	8
Abbildung 4: DNA-Aufbau _____	9
Abbildung 5: Kreuzungsschema der AIL-Mäuse _____	20
Abbildung 6a-b: Käfige und Tierhaltung _____	24
Abbildung 7: Anfertigung eines indirekten Immunfluoreszenztests _____	23
Abbildung 8a-b: positiver und negativer indirekter Immunfluoreszenztest auf Hep-20-Zellen _____	27
Abbildung 9: Entwicklung der ANA bei AIL-Mäusen im zeitlichen Verlauf _____	30
Abbildung 10: Entwicklung des ANA-Titers bei AIL-Mäusen zum Zeitpunkt 6 Monate _____	31
Abbildung 11a-c: ANA positive Seren nach a) 2 Monaten, b) 4 Monaten und c) 6 Monaten bei den drei Diätgruppen der AIL-Mäuse _____	33
Abbildung 12: ANA-positive Seren bei den drei Diätgruppen im zeitlichen Verlauf _____	29
Abbildung 13: Titrierung der in der 1:100 Verdünnung ANA-positiv getesteten Seren bei AIL-Mäusen zum Zeitpunkt 6 Monate in den drei Diätgruppen _____	30
Abbildung 14: Titrierung der in der 1:1000 Verdünnung ANA-positiv getesteten Seren bei AIL-Mäusen zum Zeitpunkt 6 Monate in den drei Diätgruppen _____	30
Abbildung 15a-c: Gewicht nach a) 2 Monaten, b) 4 Monaten und c) 6 Monaten bei den drei Diätgruppen der AIL-Mäuse _____	352

Abbildung 16a-c: Gewicht und Inzidenz von ANA im Gesamtkollektiv zu den Zeitpunkten a) 2 Monate, b) 4 Monate und c) 6 Monate bei den drei Diätgruppen der AIL-Mäuse _____ 36

Abbildung 17a-b: Gewicht zum Zeitpunkt 2 Monate bei ANA positiven und ANA negativen AIL-Mäusen zum Zeitpunkt a) 4 Monate und b) 6 Monate _____ 38

Abbildung 18: Gewicht zum Zeitpunkt 4 Monate bei ANA positiven und ANA negativen AIL-Mäusen zum Zeitpunkt 6 Monate _____ 40

Abbildung 19a-c: Gewicht zum Zeitpunkt a) 2 Monate, b) 4 Monate und c) 6 Monate bei ANA positiven und ANA negativen AIL-Mäusen in der Verdünnung 1:1000 _____ 41

Abbildung 20a-c: Gewicht zum Zeitpunkt a) 2 Monate, b) 4 Monate und c) 6 Monate bei ANA positiven und ANA negativen AIL-Mäusen in der Verdünnung 1:10000 _____ 42

Abbildung 21a-c: Geschlechtsspezifische Unterschiede im Auftreten von ANA im Serum der AIL-Mäuse zum Zeitpunkt a) 2 Monate, b) 4 Monate und c) 6 Monate _____ 438

Abbildung 22: Geschlechtsspezifische Unterschiede im Auftreten von ANA im Serum der AIL-Mäuse im zeitlichen Verlauf _____ 44

Abbildung 23a-b: Titrierung der, in der Verdünnung 1:100 ANA-positiv getesteten Seren der AIL-Mäuse bei den beiden Geschlechtern am Endpunkt. 40

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Generationen der Versuchstiere (AIL)

Tabelle 2: WD Inhaltsstoffe

Tabelle 3: CONT/CALR Inhaltsstoffe

Tabelle 4: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Fälle je Zeitpunkt je Diät

Tabelle 6: Gewicht bei den drei Diätgruppen je Untersuchungszeitpunkt

9 Anhänge

Publikationen:

Gene-diet interactions associated with complex trait variation in an advanced intercross outbred mouse line, R. Ludwig, P. Kouki et al., Nature Communications volume 10, Article number: 4097 (2019).

10. Danksagung

Zuerst möchte ich mich besonders herzlich bei Prof. Dr. med. Ralf Ludwig für die Bereitstellung des Themas, die Ermöglichung dieser spannenden Arbeit und die überaus tolle Begleitung während Ihrer Entstehung bedanken. Ein großer Dank gilt auch Dr. med. Hiroshi Koga und Dr. med. Artem Vorobyev für ihre Hilfsbereitschaft gerade in der Entstehungsphase der Arbeit. Außerdem möchte ich mich bei Heiko Körber-Ahrens für die überaus gute Zusammenarbeit während der Datenerhebung und Versuchsphase bedanken.

Ein großer Dank gilt dem gesamten Team des LIED-Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie, die mich bei den praktischen Teilen der Arbeit immer wieder tatkräftig unterstützt haben.

Meiner geliebten Ehefrau, Dr. med. Mara-Julia Kouki, möchte ich besonders herzlich danken, nicht nur für die tatkräftige Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit, sondern auch für Ihre guten Ratschläge, die Motivation und besonders für Ihre Geduld.

Meinen Freunden, insbesondere Dr. rer. nat. Sabrina Reinehr, danke ich ganz herzlich für Ihre Motivation und ihr gutes Auge beim Lesen der Arbeit.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meiner gesamten Familie, für ihre fortwährende Unterstützung und Motivation, nicht nur während dieser Arbeit.

11. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Phillip Kouki
Geburtsdatum: 11. Mai 1986
Geburtsort: Dortmund
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet



Beruflicher Werdegang

12/2016 – heute Assistenzarzt der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, St.-Johannes-Hospital, Dortmund

Dissertation

02/2014 – 02/2020 Medizinischer Doktorand in der AG „Model Systems“ des Institutes für experimentelle Dermatologie der Universität zu Lübeck

Publikationen und Posterbeiträge:

Gene-diet interactions associated with complex trait variation in an advanced intercross outbred mouse line, R. Ludwig, P. Kouki et al., Nature Communications volume 10, Article number: 4097 (2019).

Medizinische Ausbildung:

2006 – 2008 Freiwilliges soziales Jahr im Dortmunder Rettungsdienst unter der Leitung des Malteser Hilfsdienst e.V.

2008 – 2010 Haupt- und ehrenamtliches Mitglied des Malteser Hilfsdienst e.V. in den Bereichen Krankentransport, Rettungsdienst und Katastrophenschutz

2009 Ausbildung zum Breitenausbilder im Malteser Hilfsdienst e.V.

07.2009 – 10.2009 Ausbildung zum Rettungsassistenten an der ResQuality Rettungsdienstschule in Essen

2010 Dozent im Rettungsdienst an der Malteser Diözesanschule in Dortmund

10.2010 – 11.2016 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck

1. Staatsexamen 09/2012

2. Staatsexamen 11/2016, Approbation zum Arzt/
Humanmediziner

Schulische Ausbildung

2003 – 2006 Gesamtschule Brünninghausen mit Abschluss der
allgemeinen Hochschulreife

Dortmund, 02. November 2020