

**Aus Poliklinik und Funktionsbereich für Rheumatologie der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schneider

**Bedeutung von IgG-Autoantikörpern gegen  $\alpha$ S1-Casein bei  
entzündlich rheumatischen Erkrankungen**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

Nicola Dallmann; geborene Spliethoff

(2018)

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

gez.:

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. N. Klöcker

Erstgutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Schneider

Zweitgutachter: Herr PD Dr. med. H.-J. Laws

## Zusammenfassung

Die Ätiopathogenese entzündlich rheumatischer Systemerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (RA), dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) oder den Vaskulitiden ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Es wird ein multifaktorielles Geschehen angenommen. Eine Hypothese geht davon aus, dass es bereits im Säuglingsalter zu Fehlentwicklungen des Immunsystems kommt. Zu den ersten exogen zugeführten Proteinen und damit potentiellen Antigenen zählen Caseine der Muttermilch. Sie bilden einen wichtigen und essentiellen Bestandteil der Muttermilch und besitzen nicht nur nutritive sondern auch immunmodulatorische Eigenschaften. In dieser Arbeit wurde der mögliche Einfluss von  $\alpha$ S1-Casein (CSN1S1)-IgG Antikörpern (AK) auf die Entwicklung von entzündlich rheumatischen Systemerkrankungen untersucht. Die IgG-Antikörperkonzentration gegen CSN1S1 in Seren von 130 Probanden mit rheumatischen Erkrankungen und 86 gesunden Probanden wurde verglichen. Die Messung erfolgte mit einem speziell modifizierten Auto-Display Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Als mögliche Einflussfaktoren auf die Antikörperkonzentration wurden der Stillstatus, das eigene praktizierte Stillverhalten, das Geschlecht, die Erkrankung sowie die Raucheranamnese evaluiert. Für die statistischen Analysen wurden gemischt-lineare Modelle und Interaktionsanalysen durchgeführt.

Es zeigte sich, dass männliche Teilnehmer, die als Säugling gestillt worden sind, im Vergleich zu gestillten weiblichen Teilnehmerinnen geringere CSN1S1-IgG-Konzentrationen aufweisen. Hingegen wurden keine Assoziationen der CSN1S1-IgG-Konzentration zu den erfassten entzündlich-rheumatischen Erkrankungen oder den anderen Einflussfaktoren detektiert.

## Summary

The etiopathogenesis of inflammatory rheumatic diseases like rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus or vasculitides has not been completely elucidated, and is likely multifactorial. One hypothesis consists in a flawed immune system development during infancy. Caseins are amongst the earliest proteins and thereby potential antigens administered to the newborn in the course of nursing. They are an essential component of breast milk and possess nutritional and immunomodulatory properties. In this thesis, the potential role of  $\alpha$ S1-Casein (CSN1S1)-IgG antibodies on the development of inflammatory rheumatic diseases was examined.

The IgG concentration of antibodies against CSN1S1 in serums of 130 subjects with rheumatic diseases and 86 healthy controls was compared. The measurement was performed with a specially modified Auto-Display Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). As potential influencing factors breastfeeding status, own practised breastfeeding, gender, rheumatic disease status, and smoking habit were evaluated. For the statistical analysis, mixed-linear models and interaction analyses were performed.

It was demonstrated that male participants, who were breastfed as an infant, showed lower CSN1S1-IgG-concentration in comparison to female participants. This result remained significant after being adjusted for the other influencing factors. No further associations, especially to rheumatic diseases, were noted.

## **Abkürzungen**

<b>ACE</b> .....	Angiotensin Converting Enzyme
<b>ACR</b> .....	American College of Rheumatology
<b>AK</b> .....	Antikörper
<b>BPH</b> .....	Benigne Prostata Hyperplasie
<b>CSN1S1</b> .....	$\alpha$ S1-Casein
<b>EDTA</b> .....	Ethylendiamintetraacetat
<b>ELISA</b> .....	Enzyme-linked immunosorbent Assay
<b>E. coli</b> .....	Escherichia coli
<b>FCS</b> .....	Fetal calf serum
<b>ERK1/2</b> .....	Extracellular-signal Regulated Kinase
<b>G</b> .....	Gravitationskraft
<b>HK</b> .....	Hauptkultur
<b>HLA</b> .....	Human leukocyte antigen
<b>HRP</b> .....	Horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
<b>IPTG</b> .....	Isopropylthiogalactosid
<b>kDa</b> .....	Kilo-Dalton
<b>LB-Medium</b> .....	Lysogeny-Broth Medium
<b>LPS</b> .....	Lipopolysaccharid
<b>M</b> .....	Mean, Mittelwert
<b>OD</b> .....	Optische Dichte
<b>OmpT</b> .....	Outer Membrane Protein T
<b>PBS</b> .....	Phosphate buffered saline
<b>PMN</b> .....	Polymorphonuclear
<b>RA</b> .....	Rheumatoide Arthritis
<b>RF</b> .....	Rheuma-Faktor
<b>rpm</b> .....	Revolutions per minute
<b>SLE</b> .....	Systemischer Lupus Erythematodes
<b>SP</b> .....	Signalpeptid
<b>TMB</b> .....	3,3', 5,5'-Tetramethylbenzid-Lösung
<b>ÜNK</b> .....	Übernachtkultur

## **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 4.1: Schematische Darstellung des Surface-Display-ELISA.....	17
Abb. 4.2: Schematische Darstellung des Autodisplay .....	18
Abb. 4.3: Struktur eines Autotransporterstrukturgens im Autodisplay-Verfahren .....	18
Abb. 4.4: Ergebnis des ELISAs bei Präabsorption mit SH3 und Ro bei Induktion: 4h bei 30° in LB.....	23
Abb. 4.5: Differenzwerte des ELISAs bei Präabsorption mit SH3 und Ro bei Induktion: über Nacht bei 30° in LB.....	24
Abb. 4.6: Differenzwerte des ELISAs bei Präabsorption mit SH3 und Ro bei Induktion: über Nacht bei 30° in PBS .....	24
Abb. 5.1: Differenzwerte der Kontrollgruppe mit Standardabweichungen .....	28
Abb. 5.2: Differenzwerte der Patienten mit Standardabweichungen .....	29
Abb. 5.3: Studienpopulation: Übersicht über die Anzahl der weiblichen und männlichen Studienteilnehmern unter Berücksichtigung der Erkrankungen (RA, SLE und Vaskulitis) .....	30
Abb. 5.4: Kontrollseren unter Berücksichtigung des Stillstatus: Übersicht über die Anzahl der Kontrollseren unter Berücksichtigung des Geschlechts sowie des Stillstatus.....	31
Abb. 8.1: Patienten-Fragebogen .....	58

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Übersicht der verwendeten Chemikalien .....	13
Tabelle 4.2: Übersicht der verwendeten Geräte .....	14
Tabelle 4.3: Übersicht der Veränderungen am Protokoll von K. Petermann ....	26
Tabelle 5.1: Demographische Daten .....	29
Tabelle 5.2: Geschlechterverteilung in den Erkrankungsgruppen .....	30
Tabelle 5.3: Regressionsmodell unter Berücksichtigung des Stillstatus, Alter und Geschlecht .....	32
Tabelle 5.4: Regressionsmodell unter Berücksichtigung des aktiven Stillverhaltens und des Alters .....	32
Tabelle 5.5: Regressionsanalyse aller Teilnehmer/innen unter Berücksichtigung einer Interaktion zwischen dem aktiven und dem passiven Stillstatus .....	33
Tabelle 5.6: Regressionsmodell aller Teilnehmer/innen unter Berücksichtigung des Geschlechts und des passiven Stillstatus (Interaktion) .....	33
Tabelle 5.7: Regressionsmodell aller Teilnehmer/innen unter Differenzierung des passiven Stillstatus, des Alters und der unterschiedlichen Erkrankungsgruppen (Interaktion) .....	34
Tabelle 5.8: Regressionsmodell aller Teilnehmer/innen unter Differenzierung des passiven Stillstatus, des Alters und des Rauchstatus .....	35
Tabelle 5.9: Regressionsmodell aller Teilnehmer/innen unter Differenzierung des passiven Stillstatus, des Alters und des Rauchens (Interaktion) .....	36
Tabelle 5.10: Regressionsmodell aller Teilnehmer/innen unter Differenzierung des Alters, des Rauchens, des passiven Stillstatus und des Geschlechts (Interaktion) .....	37
Tabelle 8.1: Übersicht ICD-10-Codes der eingeschlossenen Erkrankungen ...	53

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary.....	II
Abkürzungen .....	III
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	V
Inhaltsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung .....	1
1.1 Hypothese zum Zusammenhang entzündlich-rheumatischer Systemerkrankungen und Milch .....	1
1.2 Rheumatoide Arthritis .....	2
1.3 Systemischer Lupus Erythematoses.....	3
1.4 Vaskulitiden .....	4
2 Casein.....	5
2.1 Eigenschaften von Casein .....	5
2.2 Casein als möglicher Einflussfaktor entzündlich rheumatischer Systemerkrankungen.....	7
3 Ziele der Arbeit.....	9
4 Material und Methoden .....	10
4.1 Material.....	10
4.1.1 Verwendete Bakterienstämme.....	10
4.1.2 Modifikation mittels Plasmiden.....	11
4.1.3 Verwendete Medien.....	11
4.1.4 Puffer .....	12
4.1.5 Lösungen für das ELISA-Protokoll.....	12
4.1.6 Chemikalien und Geräte .....	13
4.1.7 Humane Seren.....	15

4.2	CSN1S1-IgG-Messung .....	16
4.2.1	ELISA-basierte Antikörper-Nachweisverfahren .....	16
4.2.2	Das ELISA-Protokoll zur Bestimmung der CSN1S1-AK .....	19
4.2.3	Präabsorption humaner Seren mit <i>E. coli</i> Zellen.....	20
4.2.4	Bestimmung der optischen Dichte .....	22
4.2.5	Modifizierte Induktionsbedingungen .....	22
4.2.6	Ermittlung der Differenzwerte und statistische Auswertung .....	27
5	Ergebnisse .....	28
5.1	Übersicht.....	28
5.2	Demographische Daten .....	29
5.3	Regressionsmodelle .....	31
5.3.1	Regressionsmodelle aller Studienteilnehmer/innen ohne den Faktor „Rauchen“ .....	31
5.3.2	Regressionsmodelle aller Studienteilnehmer/innen mit dem Faktor „Rauchen“ .....	34
6	Diskussion.....	38
6.1	Ausblick .....	40
6.2	Schlussfolgerungen .....	42
7	Literaturverzeichnis .....	44
8	Anhang.....	53
8.1	Patienten-Fragebogen .....	54
9	Danksagung.....	59

# 1 Einleitung

## 1.1 Hypothese zum Zusammenhang entzündlich-rheumatischer Systemerkrankungen und Milch

Entzündlich-rheumatische Systemerkrankungen zählen zu den Autoimmunerkrankungen. Die Ätiologie und Pathogenese der einzelnen Erkrankungen ist bis dato nicht komplett verstanden. Zu den entzündlich-rheumatischen Systemerkrankungen zählen insgesamt über 300 einzelne Erkrankungen. Eine Hypothese zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen ist ein fehlgeleitetes Immunsystem. Dieser Prozess könnte möglicherweise bereits im Säuglingsalter beginnen. Milch enthält die ersten exogenen Proteine, denen gegenüber ein Säugling exponiert wird. Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Milch und Autoimmunerkrankungen ergeben sich z.B. für die häufigste entzündlich-rheumatische Erkrankung, die rheumatoide Arthritis (RA) (Schneider et al., 2011).

Der Konsum von Milch und den enthaltenen Proteinen steht schon lange im Verdacht, Symptome einer RA zu verschlimmern (Beri et al., 1988; Buchanan et al., 1991; Panush, 1990; Parke and Hughes, 1981; Schrandt et al., 1997; van de Laar and van der Korst, 1992). Sowohl Nahrungsmittelallergien als auch direkte immunmodulatorische Effekte werden hierfür verantwortlich gemacht (Buchanan et al., 1991; Hvatum et al., 2006; Panush, 1990; Perez-Maceda et al., 1991). Abgesehen von bovinen Milch-Produkten wird die RA auch durch Stillen oder Muttermilch beeinflusst. Stillen reduziert beispielsweise das Risiko, an einer RA zu erkranken und reduziert die Schwere der Erkrankung bei den Müttern (Brun et al., 1995; Karlson et al., 2004). Bei gestillten Kindern wird in Abhängigkeit des Beginns und der Dauer des Stillens das Risiko, an einer RA zu erkranken, modifiziert (Colebatch and Edwards, 2011; Edwards, 2010; Jacobsson et al., 2003; Liao et al., 2009; Mason et al., 1995; Pikwer et al., 2009; Rosenberg, 1996). Caseine sind ein Hauptbestandteil der Milch vieler Säugetiere (Jenness and Holt, 1987; Rijnkels, 2002). Unter den Caseinen kommt möglicherweise  $\alpha$ S1-Casein (CSN1S1) eine besondere Bedeutung zu, da es multiple immunmodulatorische Eigenschaft hat (Vordenbäumen et al., 2011; Vordenbäumen et al., 2013; Vordenbäumen et al., 2016).

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob eine IgG-Antikörperbildung gegen humanes CSN1S1 in Abhängigkeit des „gestillt worden-Seins“ und des Vorliegens einer Autoimmunerkrankung besteht.

Im Folgenden werden die betrachteten Autoimmunerkrankungen und die Eigenschaften von CSN1S1 näher beleuchtet.

## **1.2 Rheumatoide Arthritis**

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist gekennzeichnet durch eine Entzündungsreaktion der Synovialis und anschließender Destruktion von Knorpel und Knochen in den betroffenen Gelenken. Die Erkrankung ist meist durch einen schubweisen, progredienten Verlauf gekennzeichnet. Fakultativ können auch extraartikuläre Manifestationen wie z.B. eine Vaskulitis auftreten. Eine ausbleibende Behandlung kann zu Funktionseinschränkungen der betroffenen Gelenke und damit verbundener Schmerzchronifizierung führen. Nicht selten resultieren funktionelle Einschränkungen und der Verlust der persönlichen Lebensqualität (Schneider et al., 2011).

Die Prävalenz der RA liegt zwischen 0,5 und 1%. Frauen sind doppelt so häufig betroffen wie Männer (Schneider et al., 2011). Die Inzidenz der Frauen wird zwischen 34 und 83/100.000 pro Jahr angenommen (Schneider et al., 2011). Die Ätiologie der RA ist weitgehend unbekannt. Humorale und zelluläre immunologische Mechanismen scheinen eine zentrale Rolle in der Pathogenese einzunehmen (Aguzzi, 2008). Des Weiteren ist eine multifaktorielle Genese wahrscheinlich. Zu den Haupteinflussgrößen zählen die genetische Disposition sowie verschiedene Umweltfaktoren, z.B. Rauchen (Gorman, 2006; Karlson et al., 1999). Rauchen als Risikofaktor ist nicht nur für die RA, sondern auch für viele andere entzündlich rheumatischen Systemerkrankungen von Bedeutung. So scheint Zigarettenrauchen generell Einfluss auf die Ausbildung von Antikörpern (AK) zu nehmen. Eine allgemein verminderte Immunglobulin-Konzentration in humanem Serum resultiert potentiell aus einem lang bestehenden Rauchverhalten (Ferson et al., 1979). Dagegen ist eine erhöhte Autoantikörper-Konzentration wie z.B. von Rheumafaktor (RF) im Serum von Raucher/innen nachweisbar (Manfredsdottir

et al., 2006; Mathews et al., 1973). Durch noch unbekannte Triggermechanismen (möglicherweise durch virale oder bakterielle Antigene) wird bei genetisch prädisponierten Personen eine Autoimmunreaktion hervorgerufen, die mit Inflammation und Infiltration der Synovialis einhergeht. Derzeit ist die Pathogenese der RA noch nicht eindeutig verstanden, vermutlich liegt jedoch kein einzelnes „Rheuma-assoziiertes-Antigen“ als ursächlicher Auslöser vor. Wahrscheinlicher handelt es sich um vielfältige, gelenkspezifische Antigene, wie Kollagen Typ II oder unspezifische citrullinierte Antigene (Snir et al., 2010). Ebenso werden humanes Knorpel-Glykoprotein 39 sowie Heavy-Chain-bindendes-Protein als Antigene diskutiert (Aguzzi, 2008; Snir et al., 2010).

Möglicherweise ist die Aktivierung des angeborenen Immunsystems der erste Schritt in der Auslösung einer RA.

### **1.3 Systemischer Lupus Erythematoses**

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine systemische Autoimmunerkrankung, die charakterisiert ist durch die Bildung von Autoantikörpern und potentiell Multiorganbefall. Im Vordergrund stehen häufig variable Exantheme der Haut, eine Glomerulonephritis, Arthritiden und Blutbildveränderungen. Die Erscheinungsform kann dabei individuell sehr variabel sein. Die Prävalenz des SLE wird in einem Bereich von 20-150/100.000 Personen angenommenen (Pons-Estel et al., 2010). Die Ätiologie ist weitgehend unbekannt. Eine multifaktorielle Genese scheint sehr wahrscheinlich (Anaya et al., 2006; Zhan et al., 2016). Als Einflussfaktoren sind genetische, wie z.B. das gehäufte Vorkommen von HLA-Antigen DR2 und DR3 (Barcellos et al., 2009) sowie hormonelle Einflüsse, beispielsweise die früheintretende Menarche (< 10 Jahre) oder der Gebrauch von östrogenhaltigen Kontrazeptiva für ein erhöhtes Erkrankungsrisiko bekannt (Costenbader et al., 2007). Ebenso stehen Umweltfaktoren wie UV-Exposition, Kieselerde-Staub (Cooper et al., 1998) oder in Einzelfällen der Gebrauch von Medikamenten (z.B. Procainamid und D-Penicillamin) im Verdacht die Entstehung des SLE zu begünstigen.

Zur Pathogenese des SLE tragen die reduzierte Anzahl und Aktivität der regulatorischen T-Zellen sowie die defekte Elimination der autoreaktiven B- und

T-Zellen bei. Es kommt zur Ausbildung von SLE-typischen Autoantikörpern. Dazu zählen die Anti-dsDNA-AK und Anti-Histon-AK. Die Doppelstrang-DNA sowie die Histone sind Bestandteile der Nukleosomen und werden während der Apoptose frei gesetzt. Da eine erhöhte Apoptoseneigung besteht, könnten die Nukleosomenbestandteile als Autoantigenquelle dienen (Aguzzi, 2008). Schließlich folgt eine Immunreaktion mit Komplementaktivierung, die für die Aufrechterhaltung der entzündlichen Schädigung des Gefäßbindegewebes verantwortlich scheint.

## **1.4 Vaskulitiden**

Unter Vaskulitiden fasst man verschiedene eigenständige Erkrankungen zusammen, die sich durch eine entzündliche Veränderung der Blutgefäße (Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venen und Venolen) auszeichnen. Die auslösenden Faktoren, die zu einer Vaskulitis führen, sind derzeit noch nicht eindeutig geklärt. Es ist wahrscheinlich, dass immunpathologische Mechanismen zur Entstehung der Vaskulitis beitragen können (Aguzzi, 2008). Des Weiteren wird eine mögliche genetische Disposition vermutet (Watts et al., 2015). Sekundäre Vaskulitiden können sich im Rahmen von anderen Autoimmunerkrankungen oder Allgemeinerkrankungen wie z.B. RA, Virusinfektionen, Tumoren, Intoxikationen u.a. manifestieren. Primäre Vaskulitiden werden nach der Chapel Hill Consensus Conference 2012 eingeteilt, die sich an der Größe der betroffenen Gefäße (Jennette et al., 2013) orientiert. Für die gesamte Gruppe der Vaskulitiden geht man von einer Prävalenz von ca. 200/1.000.000 aus. Die Inzidenz liegt bei ca. 50/1.000.000 jährlich (Reinhold-Keller et al., 2000). Aufgrund der Seltenheit dieser Erkrankungen wurden in der vorliegenden Arbeit Patienten mit verschiedenen Vaskulitiden gemeinsam betrachtet.

## 2 Casein

### 2.1 Eigenschaften von Casein

Caseine sind die Hauptproteine der Milch vieler Säugetierspezies (Jenness and Holt, 1987). In humaner Milch werden ca. 30% der Protein-Fraktion durch Casein gebildet (Goldfarb, 1999). Humanes Casein lässt sich in vier Subgruppen differenzieren. Dazu zählen:  $\alpha$ 1-Casein (CSN1S1),  $\alpha$ 2-,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein (Mercier and Vilotte, 1993). In humanem Casein werden dabei Calcium-sensitive  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2- sowie  $\beta$ -Caseine von Calcium-insensitiven  $\kappa$ -Caseinen unterschieden (Ginger and Grigor, 1999; Rijnkels, 2002).

Über Calciumphosphatbrücken werden Caseine zu Mizellen aggregiert (Belitz et al., 2008). Es zeigte sich ebenso, dass Caseine als Aminosäure-Quelle für gestillte Säuglinge fungieren (Anderson et al., 2006). Einer der ersten Schritte in der Verdauung und Regulation der extrauterinen Nahrungsverwertung ist die Reaktion von Darm- und Pankreas-Hormonen auf den Kontakt mit gefütterten Milchproteinen bzw. Caseinen aus der Muttermilch oder Säuglingsnahrung (Aynsley-Green, 1989). Zu den Hormonen zählen beispielsweise Peptidasen wie Trypsin, Endopeptidasen wie Kathepsin D und Chymotrypsin. Zusätzlich existieren Proteasen wie Elastasen (Holton et al., 2014). Ihnen wird die Förderung intestinaler Resorption von Spurenelementen und Calcium zugeschrieben (Donida et al., 2009; Lönnerdal, 1997). Ein Teil der zugeführten Milchproteine wird durch die vorhandenen Proteasen zersetzt und anschließend als Spaltprodukt intestinal resorbiert. Dagegen kann ein weiterer Teil der Milchproteine unverändert aufgenommen werden (Britton and Kastin, 1991).

Es existieren weitere Eigenschaften von Casein. Neben der Entdeckung einer opioiden Aktivität in humanem Casein (Brantl, 1984) konnte eine mögliche Inhibition vom Angiotensin Converting Enzym (ACE) durch Caseinderivate belegt werden (FitzGerald and Meisel, 2000). Diese sogenannten Casokinine lassen sich in  $\alpha$ 1-,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein sowie in  $\alpha$ -Laktalbumin nachweisen. Ihnen wird ein potentiell positiver Einfluss bei der Reduktion von Hypertension zugeschrieben (FitzGerald and Meisel, 2000).

Neben der Funktion die Versorgung des Neugeborenen mit Phosphat, Calcium und Aminosäuren zu gewährleisten, können durch biologische Spaltung Peptide

freigesetzt werden, die der Initiierung des Immunsystems dienen (Ferranti et al., 2004; Migliore-Samour and Jolles, 1988).

Für CSN1S1 konnte ebenfalls belegt werden, dass es in menschlichen Monozyten vorkommt (Vordenbäumen et al., 2011). Diese im Blut zirkulierenden Zellen des Immunsystems sind Vorläuferzellen von Makrophagen und von einem Teil der dendritischen Zellen. Außerdem kann CSN1S1 die Expression des proinflammatorischen Zytokin GM-CSF stimulieren (Vordenbäumen et al., 2011). Neben der Modulation der Leukozytenadhäsion (Aihara et al., 2009) ergaben sich zusätzliche Eigenschaften. Dazu zählt die, über den PMN *casein receptor* vermittelte Chemotaxis (van Epps et al., 1977) genauso wie die mögliche Inhibition des Zellwachstums (Pocoví et al., 2009). Ferner wurde die Modulation der angeborenen Immunantwort intestinaler Zellen gezeigt (Jorgensen et al., 2010). Weiterhin konnte eine Verminderung entzündlicher Abläufe unter der Anwesenheit von Casein experimentell nachgewiesen werden (Hatori et al., 2008). Vordenbäumen et al. zeigten, dass CSN1S1 die Morphologie von Monozyten in Abhängigkeit der Konzentration und Wirkungszeit beeinflussen und verändern kann. Ebenso wurde die potentielle Hochregulation von CD14 Zellen durch CSN1S1 belegt. Als limitierender bzw. hemmender Faktor gilt hier die Anwesenheit von ERK1/2 (Extracellular-signal Regulated Kinase) (Vordenbäumen et al., 2013). Kürzlich wurde zudem demonstriert, dass die Funktionen von CSN1S1 abhängig vom Phosphorylierungsstatus des Proteins über TLR4 vermittelt werden (Vordenbäumen et al., 2016).

Beispielsweise ist ein Hexapeptid des  $\beta$ -Caseins in der Lage, die Makrophagen-Aktivität zu stimulieren (Parker et al., 1984).

Experimentell konnte gezeigt werden, dass die gesamte humane Caseinfraktion die Anheftung von *Streptokokkus pneumoniae* sowie *Haemophilus influenzae* an Epithelzellen des menschlichen Respirationstraktes verhindern kann. Somit weist die Caseinfraktion in vitro einen antimikrobiellen Effekt auf. Dafür wurde Casein experimentell mit der jeweiligen Bakteriensuspension vermischt.  $\kappa$ -Casein, welches die stärkste glykolysierte Caseinfraktion darstellt, scheint bei der Inhibierung von *Streptokokkus pneumoniae* genauso effektiv wirksam wie die gesamte Caseinfraktion zu sein (Aniansson et al., 1990).

Des Weiteren sind die  $\kappa$ -Caseine in der Lage, bei Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  die  $\alpha$ -Caseine zu stabilisieren (Malpress and Seid-Akhavan, 1966).

Zunächst konnte die Synthese von Casein nur in der weiblichen Brustdrüse bzw. der Milch nachgewiesen werden. Schließlich gelang der Nachweis in Prostatagewebe. Eine Erhöhung wurde bei 90% der an Benigen Prostatahyperplasie (BPH) erkrankten Männer detektiert. Dagegen zeigte sich in malignem Prostatagewebe ein erhöhtes CSN1S1 in 10% der Proben, wohingegen in gesundem Gewebe kein CSN1S1 nachgewiesen werden konnte. (Xu et al., 2006). Auch konnte in Synovialisgewebe von RA- und Arthrosepatienten eine Überexpression von CSN1S1-mRNA nachgewiesen werden (Galligan et al., 2007; Karlsson et al., 2010).

## **2.2 Casein als möglicher Einflussfaktor entzündlich rheumatischer Systemerkrankungen**

Sowohl die oben beschriebenen entzündungshemmenden Effekte als auch der CSN1S1-AK-Nachweis in malignem Prostatagewebe (siehe Abschnitt 2.1) lässt auf eine immunologische Bedeutung des Caseins schließen. Insbesondere der Nachweis erhöhter CSN1S1-AK bei RA (Petermann, 2010) lässt die Überlegung zu, ob sich diese auch bei anderen rheumatisch entzündlichen Systemerkrankungen nachweisen lässt.

Der Nachweis von Casein in der Synovialis, wurde bislang in verschiedenen Arbeiten gezeigt (Galligan et al., 2007; Karlsson et al., 2010).

Casein zählt zu einem der ersten Fremdproteine, mit dem ein Säugling über die Nahrungsaufnahme in Form von Muttermilch exponiert wird. Es wäre möglich, dass es zu einem ersten Schritt in der Initiierung und Entwicklung des Immunsystems beiträgt (siehe Abschnitt 2). Daher wäre es denkbar, dass es eine Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen spielen kann.

Ebenso ist es möglich, dass die vermehrte Bildung von Casein in der laktierenden Mamma zu immunologischen Effekten bzw. Antikörperbildung führen könnte.

In einer früheren Arbeit ermittelte unsere Arbeitsgruppe einen Unterschied der IgG-CSN1S1-Autoantikörper bei gesunden Probanden in Abhängigkeit davon,

ob die Person als Säugling gestillt wurde oder nicht (Petermann, 2010). In dieser Arbeit sollen die Befunde verifiziert werden. Des Weiteren soll ermittelt werden, ob darüber hinaus ein Zusammenhang zu anderen Autoimmunerkrankungen besteht.

### **3 Ziele der Arbeit**

In dieser Dissertation sollen folgenden Fragestellungen beantwortet werden:

- Gibt es einen Unterschied der IgG-CSN1S1-Autoantikörperbildung in Abhängigkeit davon,
  - ob die Person als Säugling gestillt worden ist?
  - ob die Person gesund ist oder unter einer Autoimmunerkrankung leidet?
  - ob die Person selbst ein Kind gestillt hat?
  - ob die Patienten geraucht haben?
  - welches Geschlecht vorliegt?

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

Im folgenden Abschnitt finden sich Informationen zu den verwendeten Materialien und Chemikalien, die bei der Durchführung des Autodisplay-ELISA benötigt werden. Ebenso werden in diesem Kapitel die verwendeten Seren näher definiert.

#### 4.1.1 Verwendete Bakterienstämme

*E. coli* UT5600 (Maurer et al., 1997)

Da sich bereits der *E. coli* Stamm UT5600(DE3) in der Arbeit von Petermann 2010 für das Autodisplay System bewährt hat, wurde auch diesmal die Oberflächenexpression in diesem Stamm durchgeführt. Für den Stamm UT5600(DE3) ist folgender Genotyp beschrieben:

F<sup>-</sup> ara-14, leuB6, secA6, lacY1, proC14,tsx-67,Δ(ompT-fepC)266, entA403, trpE38,rfbD1, rpsL109(StrR), xyl-5, mtl-1, thi-1, λ(DE3) (Jose and Handel, 2003).

##### 4.1.1.1 Bakterienanzucht

Die Bakterien wurden aus der Stammsammlung mit einer sterilen Impföse auf die Platten gebracht und ein Verdünnungsausstrich gefertigt. Für die plasmidhaltigen Stämme wurden Platten verwendet, welche die jeweiligen Selektionsmarker enthielten. Für *E. coli* mit dem Plasmid pET-RAA wurde Carbenicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml, für *E. coli* mit dem Plasmid pKP009 Kanamycin in einer Endkonzentration von 30 µg/ml verwendet. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. ÜNK wurden in 20 ml LB-Medium in 100ml Kolben angesetzt. Sie wurden mit 1 µl/10ml einer Glycerinkultur inokuliert. Die ÜNK wurden bei 37 °C und 200 rpm in einem Thermoschüttler der Marke Sartorius geschüttelt.

Die Hauptkulturen (HK) wurden in 40 ml LB-Medium in 100 ml Kolben angesetzt. Sie wurden mit 1/100 ihres Volumens (400µl) mit der ÜNK inokuliert. Zusätzlich wurden die Kulturen mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. Allen HK wurden EDTA in einer Endkonzentration von 10 µM und 10 mM

Mercaptoethanol zugesetzt. Sie wurden bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 wachsen lassen.

#### **4.1.1.2 Stammhaltung**

Um die Bakterienstämme für eine Zeit von bis zu 10 Wochen zu halten, wurden Glycerinkulturen angefertigt. Dafür wurden die Bakterien in einer ÜNK angezogen (siehe Abschnitt 4.1.1.1). 1ml der entstandenen Zellsuspension wurde in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß eine Minute bei 13.200 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und in 1 ml Glycerol-20% resuspendiert. Die entstandenen Glycerinkulturen wurden bei -20 °C im Tiefkühlschrank gelagert.

#### **4.1.2 Modifikation mittels Plasmiden**

Plasmide werden als natürlich, extrachromosomal vorkommende DNA-Elemente bezeichnet (Antranikian, 2006). Ein Gen, das eine Antibiotikaresistenz enthält, lässt die Selektion von plasmidtragenden Bakterienzellen zu, indem es das Wachstum in Anwesenheit eines Antibiotikums im Nährmedium berechtigt. Folglich wird die Vermehrung der Bakterien ohne Plasmid verhindert (Dersch, 2008). Plasmide können ebenso als Vektoren fungieren und erwünschte Eigenschaften in ein Bakterium bringen. Daher zählen sie zu beliebten Werkzeugen in der Mikrobiologie (Thieman and Palladino, 2007). In dieser Arbeit fanden die gleichen Plasmide Verwendung wie von K. Petermann beschrieben (Petermann, 2010):

Plasmid: pET-SH3

Eigenschaften: Kodiert für das Autotransporter-Fusionsprotein mit einem PEYFK-Epitop als Passagier, T7 Promotor (Jose and Handel, 2003).

Plasmid: pET-RAA

Eigenschaften: Kodiert für das Autotransporter-Fusionsprotein mit CSN1S1 als Passagier, T7 Promotor (Petermann, 2010).

Plasmid: pKP009

Eigenschaften: Kodiert für das Autotransporter-Fusionsprotein mit 60 kDa Ro/SS-A als Passagier, T7 Promotor (Petermann, 2010).

#### **4.1.3 Verwendete Medien**

Als Medium wurde zur Zellanzucht Lysogeny Broth (LB) verwendet. Dasselbe Medium diente auch zur Herstellung von Agarplatten. Für die Selektion

plasmidhaltiger Stämme wurden folgende Antibiotika eingesetzt: Carbenicillin (50µl/ml) bzw. Kanamycin (30µl/ml).

**Lysogeny Broth**            10 g Trypton  
                                      5 g Hefeextrakt  
                                      10 g NaCl  
                                      16 g Agar-Agar (nur zur Herstellung von Platten)

#### **4.1.4 Puffer**

**PBS 10x**                        80 g NaCl  
                                      2 g KCl  
                                      14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                                      2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                                      pH 7,4 einstellen  
                                      Reinstwasser ad 1000 ml

#### **4.1.5 Lösungen für das ELISA-Protokoll**

**PBS 1x**                        100 ml PBS 10x  
                                      900 ml Reinstwasser

Der pH-Wert der eingestellten Pufferlösung ist 7,4. Die Eigenschaft als Pufferlösung ermöglicht das Arbeiten bei diesem konstanten pH-Wert. Durch die verschiedenen Salze besitzt die Lösung den osmotischen Druck des menschlichen Organismus (isotonische Salzlösung).

Blockpuffer:                    PBS1x, 10%FCS

Waschlösung:                    PBS1x, 0,1% Tween 20

Ziege-Anti-Kaninchen-  
AK-Lösung:                    1:10000 verdünnt in PBS+10%FCS Ziege-Anti-  
                                      Kaninchen-AK gekoppelt mit Meerrettichperoxidase  
                                      (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

#### 4.1.6 Chemikalien und Geräte

Alle für die Versuche eingesetzten Chemikalien und Geräte sind in den Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2 aufgeführt. Bei der Berücksichtigung der benötigten Utensilien wurde das von K. Petermann entwickelte Protokoll zur Vorlage verwendet (Petermann, 2010).

**Tabelle 4.1: Übersicht der verwendeten Chemikalien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Carbenicillin	AppliChem, Darmstadt
EDTA-Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich, Deishofen
Essigsäure	Fisher Scientific, Schwerte
Ethanol	VWR, Prolabo, Fontenay sous Bois, FR
FCS	PAA, Pasching A
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
IPTG	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumsulfat	Fluka, Seelze
Methanol	VWR, Darmstadt
Mikroreaktionsgefäße (2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
2-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, CH
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	Fluka, Buchs, CH
2-Propanol	Sigma-Aldrich, Deishofen
Schwefelsäure	Fluka, Seelze
Tris Base	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe

Tabelle 4.2: Übersicht der verwendeten Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Autoklav</b>	VX-95	Systemec, Wettenberg
<b>BD Vacutainer</b>	SST™II Advance Plus Blood Collection Tubes	BD, Plymouth
<b>BD Vacutainer</b>	Einmal-Halter	BD, Plymouth
<b>Blood Collection Set</b>	Safety-Lok™	BD, Plymouth
<b>Bruchebereiter</b>	AF 100	Scotsman, Milan, IT
<b>Brutschrank</b>	B6	Heraeus, Hanau
<b>Falcon Tubes</b>	Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner, Pleidelsheim
<b>Halbmikroküvette</b>		Brandt, Wertheim
<b>Heizmagnetruhrer</b>	Standard unit	labworld online Staufen
<b>Inkubationsschüttler</b>	Ecotron	Infors, Einsbach
<b>Inkubationsschüttler</b>	Certomat	Sartorius, Göttingen
<b>Kühl-/ Gefrierkombination</b>	Premium NoFrost	Liebherr, Bierbach an der Riss
<b>Kühl-/ Gefrierkombination</b>	Comfort No Frost	Liebherr, Bierbach an der Riss
<b>Kühl-/ Gefrierkombination</b>	Profi line	Liebherr, Bierbach an der Riss
<b>Kühl-/ Gefrierkombination</b>	Vestfrost	Thermo Fisher, Dreieich
<b>Kühlzentrifuge</b>	Universal	Hettich, Tuttlingen
<b>Kühl- und Heiz-Thermo-Mixer</b>	MKR 23	HLC by Ditabis, Pforzheim
<b>Mehrkanalpipette</b>	Finnpipette (30-300 µl)	Thermo Fisher, Dreieich
<b>Mikroreaktionsgefäße</b>	2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
<b>Mikrotiterplatten</b>	Nunc MaxiSorp	Thermo Fisher, Dreieich
<b>Mikrotiterplattenreader</b>	Mithras	Berthold, Bad Wildbach
<b>Photometer</b>	BioMate 3	Thermo Spectronic
<b>Pipetten</b>	Pipetman, P2, P10, P20, P200, P1000, P5000)	Gilson, Middleton, WI, USA
<b>Pipettierhelfer</b>	Pipetboy acu	IBS-INTEGRA Biosciences, Zizers,

		Schweiz
<b>Pipettenspitzen</b>	200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
<b>Pipettenspitzen</b>	10 µl	Biozym, Hess. Oldendorf
<b>Pipettenspitzen</b>	Tip one, 1000 mycroL XL, Graduated Filter Tip	Star Lab, Hamburg
<b>Reinstwasseranlage</b>	Milli-Q Academic	Millipore Schwalbach
<b>Rotoren</b>	1617	Hettich, Tuttlingen
<b>Rotoren</b>	F45-24-11	Eppendorf, Hamburg
<b>Spritzen</b>	20 mL	Terumo Syringe, Eschborn
<b>Spritzenvorsatzfilter, steril</b>	022 µl Porengröße	VWR, Prolabo, Fontenay sous Bois, FR
<b>Spülmaschine</b>	G7883	Miele, Gütersloh
<b>Thermoschüttler</b>	Vortemp 56	Labnet, Edison, NJ, USA
<b>Thermoschüttler</b>	Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
<b>Tischzentrifuge</b>	5415 D	Eppendorf, Hamburg
<b>Tubes Thermo Scientific</b>	Matrix 1.0mL 2D Screw tubes	Thermo Fisher, Dreieich
<b>Vortex-Mixer</b>	Vortex-Mixer 7-20-20	neoLab, Heidelberg
<b>Waage</b>	TE64, BP12000, BP3100	Sartorius, Göttingen
<b>Zentrifuge</b>	Heraeus Sepatech	Heraeus, Hanau

#### 4.1.7 Humane Seren

Für diese Arbeit wurden Blutproben von insgesamt 130 Patienten der Universitätsklinik Düsseldorf sowie 86 gesunden Teilnehmer rekrutiert. Die Einschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren eine der Diagnosen RA, SLE, Vaskulitis sowie die unterschriebene Einverständniserklärung, Volljährigkeit und der entsprechend ausgefüllte Fragebogen. Um Unsicherheiten auszuschließen bzw. potentiell verfälschte Ergebnisse zu verhindern, fanden nur die Patientenproben Verwendung, bei denen eine eindeutige positive oder negative schriftliche Antwort in Bezug auf den Stillstatus vorlag.

Die Auswahl erfolgte nach Auswertung eines entwickelten Fragebogens, der unter anderem auch Informationen über den Stillstatus der Patienten enthielt. Neben der Erfassung von allgemeinen personenbezogenen Daten, wie

Geschlecht, Körpergröße und Gewicht, wurde der Fragebogen auf Basis bereits vorhandener Arbeiten aufgebaut (Liao et al., 2009, Colebatch and Edwards, 2011; Brun et al., 1995; Simard et al., 2010). Dieser kann im Anhang, Abb. 8.1, eingesehen werden.

Innerhalb der drei Erkrankungsgruppen wurden unterschiedliche ICD-10- Codes berücksichtigt (siehe Tabelle 8.1). Die unterschiedlichen Subgruppen wurden in den Krankheitsbildern RA, SLE und Vaskulitis zusammengefasst.

Die Seren wurden zunächst in dem Rheumatologischen Labor der Universitätsklinik Düsseldorf bei -20 °C eingefroren. Zur Durchführung des Autodisplay-ELISA nach K. Petermann (Petermann, 2010) wurden die Seren in das Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie in Münster überführt, wo sie unter gleichen Bedingungen ebenfalls anonymisiert gelagert wurden.

Zur Erhebung der Seren bzw. der damit verbundenen Daten liegt ein Ethikvotum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit der Studiennummer 3723 vor. Alle Studienteilnehmer haben vor Studieneinschluss eine von der Ethikkommission der Universität Düsseldorf genehmigte Einverständniserklärung unterschrieben.

## **4.2 CSN1S1-IgG-Messung**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Protokolle beziehen sich auf die Dissertation: "Autodisplay von humanen Antigenen als Basis für die beschleunigte Entwicklung von ELISA" von K. Petermann 2010.

### **4.2.1 ELISA-basierte Antikörper-Nachweisverfahren**

Im folgenden Abschnitt wird die in dieser Arbeit verwendete Methode des ELISA-Verfahrens dargelegt.

#### **4.2.1.1 Surface-Display-ELISA**

Der Surface-Display-ELISA ist in Abb. 4.1 dargestellt und wird im Folgenden erläutert.

Die Mikrotiterplatte wurde mit *E. coli* BL21(DE3) pET-RAA Zellen (Petermann et al. 2010) über Nacht inkubiert (A). Das Plasmid befähigt *E. coli*, Casein an der Oberfläche zu exprimieren. Nach der Blockierung freier Bindungsstellen mit PBS + 10% FCS, konnten die präabsorbierten humanen Seren (primäres

Antiserum) aufgebracht werden (B). Es folgte die Zugabe des mit Meerrettichperoxidase gekoppelten sekundären AK (HRP) (C). Nach drei folgenden Waschschrritten mit PBS + 0,1% Tween 20 (PBST) wurde die Inkubation mit 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzid-Lösung (TMB) eingeleitet (D). Mittels H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde die Reaktion gestoppt. Es entstand eine Gelbfärbung (siehe Abb. 4.1). Die Reaktion wurde sofort bei 450nm im Plattenreader vermessen (Petermann, 2010).

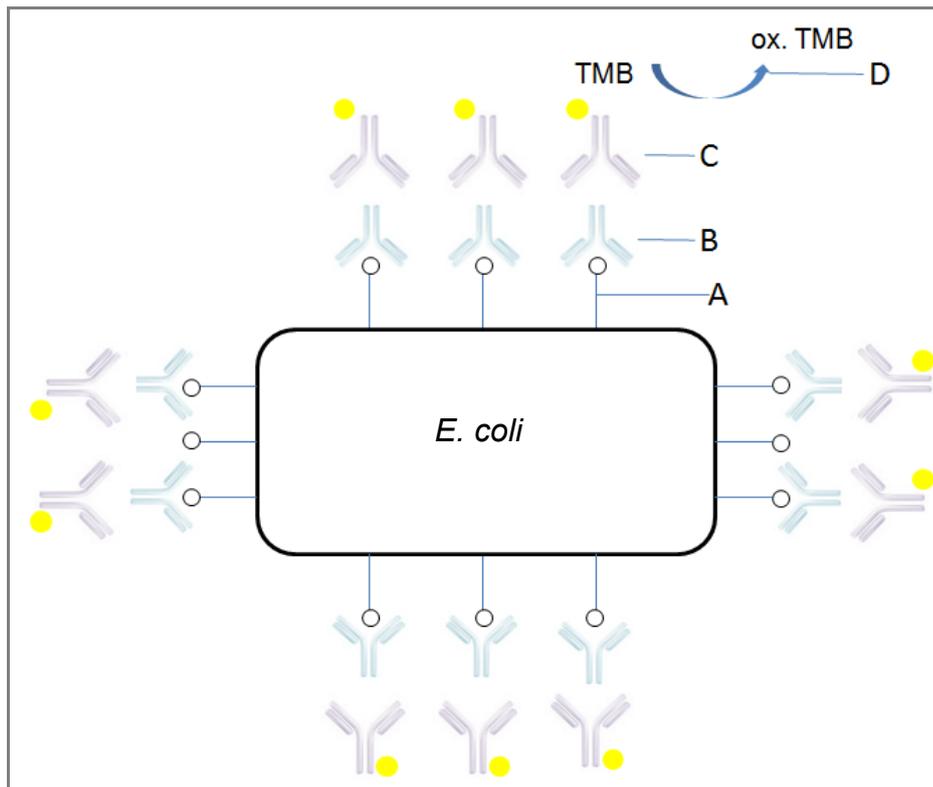
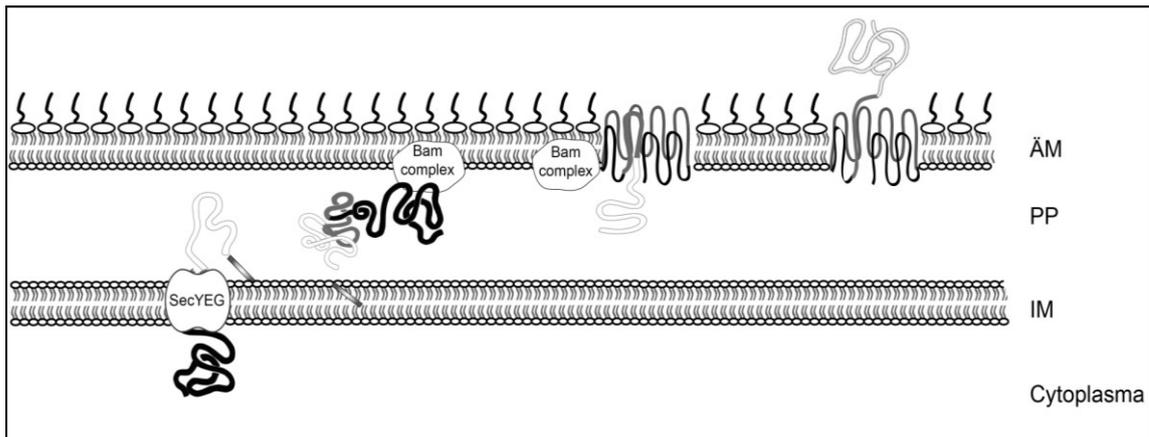


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des Surface-Display-ELISA nach K. Petermann (Petermann 2010)

#### 4.2.1.2 Autodisplay-System

Das Autodisplay-System basiert auf einem natürlichen Mechanismus gramnegativer Bakterien, die mittels sogenannter Autotransporter-Proteine auf die Zelloberfläche transportieren (Jose et al. 2007). Um ein Protein auf der Bakterienoberfläche präsentieren zu können, werden vier verschiedenen Domänen benötigt. Das Signalpeptid (SP), welches sich N-terminal befindet, dient zum Transport des Präkursors durch die innere Membran. Es schließt sich die Passagierdomäne an, die für das entsprechende Protein, in diesem Fall CSN1S1, kodiert ist. Die Verbindungsdomäne ("Linker") sowie die  $\beta$ -Fassdomäne werden auch als Autotransporter bezeichnet. Beide Domänen

ergeben den C-Terminus des Transporterproteins und sind für die Translokation über die äußere Membran verantwortlich. Dafür bildet die  $\beta$ -Fassdomäne in der äußeren Membran eine fassartige Tertiärstruktur aus (Gratz, 2010). Der *Linker* wird in diese aufgenommen und bildet eine haarnadelähnliche Struktur aus. Darüber kann der ungefaltete Passagier über die äußere Membran transportiert werden. Das Protein wird dann über die  $\beta$ -Fassdomäne an der Oberfläche präsentiert. (siehe Abb. 4.2).



**Abb. 4.2: Schematische Darstellung des Autodisplay**

Auf dem oben beschriebenen Mechanismus basierend, wurde das Autodisplay im Arbeitskreis von Prof. Jose entwickelt (Jose and Meyer, 2007; Maurer et al., 1997). Um eine bestmögliche Oberflächenexpression des gewünschten Proteins zu gewährleisten, kommt ein speziell konzipiertes Fusionsprotein zum Einsatz. Dieses besteht aus den bereits beschriebenen Sequenzen, jedoch aus unterschiedlicher Herkunft (siehe Abb. 4.3).



**Abb. 4.3: Struktur eines Autotransporterstrukturgens im Autodisplay-Verfahren nach Maurer et al. 1997**

Das N-terminale Signalpeptid entstammt dem Cholera toxin B (CtxB aus *Vibrio cholerae*). Der *Linker* und die  $\beta$ -Fassdomäne weisen ihren Ursprung in dem Protein AIDA-I (*Adhesin Involved in Diffuse Adherence*) aus enteropathogenem

*E. coli* 2787 (EPEC) auf (Benz and Schmidt, 1989; Maurer et al., 1997). Wird zwischen Signalpeptid und *Linker* ein heterologer Passagier gesetzt, können somit rekombinante Proteine auf der Oberfläche exprimiert werden.

Sowohl in dieser, als auch in der Arbeit von K. Petermann 2010, wurde der Bakterienstamm UT5600 (DE3) verwendet. Dabei handelt es sich um einen OmpT negativen Stamm. Das bedeutet, dass die natürliche Außenmembranprotease von *E. coli* nicht vorhanden ist. Daher werden die exprimierten Proteine nicht an einer definierten Sequenz abgeschnitten und in den Extrazellularraum entlassen.

#### **4.2.2 Das ELISA-Protokoll zur Bestimmung der CSN1S1-AK**

Bei dem verwendeten ELISA-Protokoll von K. Petermann wurden *E. coli* Zellen auf der Mikrotiterplatte fixiert, die in der Lage waren, das Zielprotein auf ihrer Zelloberfläche zu exprimieren. Dieser Vorgang ist in Abb. 4.2 dargestellt.

Für die Durchführung des ELISA wurde eine Übernachtskultur (ÜNK) erstellt. Dafür wurden 20 ml LB-Medium mit Antibiotikum (Carbenicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml für *E. coli* UT5600(DE3) pET-RAA bzw. 5 µl/10ml Kanamycin in einer Endkonzentration 30 µg/ml für *E. coli* UT5600(DE3) pKP009) sowie mit *E. coli* UT5600(DE3) pET-RAA oder *E. coli* UT5600(DE3) pKP009 in einem Verhältnis 1:10.000 inokuliert. Sie wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator angezogen (Petermann, 2010). Außerdem wird eine HK benötigt. Dabei handelt es sich um eine frisch angelegte Kultur. Sie besteht aus:

40 ml LB-Medium, Carbenicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml oder Kanamycin in einer Endkonzentration von 30 µg/ml, 10 µM EDTA, 10 mM Mercaptoethanol und wurde mit 1/100 ihres Volumens mit der ÜNK inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD von 0,5 im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde die entstandene Zellsuspension in 50 ml Falcons gefüllt und bei 4 °C und 5.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank gelagert. Abends wurde das Pellet mit 40 ml PBS suspendiert. Zusätzlich wurde der Suspension das entsprechende Antibiotikum in den zuvor

genannten Endkonzentrationen zugesetzt, sowie mit 10  $\mu$ M EDTA und 10 mM Mercaptoethanol versetzt. Zur Proteinexpression wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt. Die Induktion erfolgte bei 30 °C und 200 rpm über Nacht im Schüttelinkubator. Die anschließende Lagerung auf Eis verhinderte die weitere Proteinexpression. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut in 50 ml Falcons gefüllt und 10 Minuten bei 4 °C und 5.000 rpm zentrifugiert. Es schloss sich die zweimalige Waschung mit jeweils 5 ml PBS für je 5 Minuten an. Das entstandene Pellet wurde erneut bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Es folgte die Einstellung der OD von 0,5 mit Hilfe von PBS. Anschließend wurden 100  $\mu$ l der Zellsuspension mit einer Multikanalpipette in jedes Well der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde mit Parafilm und einem Deckel verschlossen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Morgens wurde die Zellsuspension abgegossen und ausgeklopft. Es folgte das Auftragen von 150  $\mu$ l PBS + 10% FCS in jedes Well. Die Mikrotiterplatte wurde erneut mit Parafilm und Deckel verschlossen und bei Raumtemperatur bzw. 22 °C für drei Stunden gelagert. Anschließend wurde der Blockpuffer abgeschüttet und 100  $\mu$ l der präabsorbierten humanen Seren (mit einer Verdünnung von 1:200) in die entsprechenden Wells pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde eine Stunde bei 22 °C inkubiert. Danach wurde sie dreimal mit jeweils 100  $\mu$ l PBST pro Well, für jeweils 5 Minuten gewaschen. Folgend wurden 100  $\mu$ l des sekundären AK (Ziege-Anti-Human-IgG, der mit Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, in einer Verdünnung von 1:10000 mit PBS+10% FCS) in jedes Well pipettiert und 45 Minuten bei 22 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit 100  $\mu$ l PBS + 0,1% Tween 20 (PBST) für 5 Minuten gewaschen. Den Waschsritten folgend, wurden 100  $\mu$ l 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzid-Lösung (TMB) in jedes Well pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 25 Minuten unter Lichtausschluss bei 22 °C. Anschließend wurden 100  $\mu$ l 2 M Schwefelsäure hinzu pipettiert um die Enzymreaktion abzustoppen. Die Mikrotiterplatte wurde sofort im Plattenreader der Firma Berthold (Mithras LB 940) bei 450 nm vermessen.

#### **4.2.3 Präabsorption humaner Seren mit *E. coli* Zellen**

*E. coli* zählen zu den gramnegativen Bakterien. Sie enthalten zusätzlich zu ihrer Zellwand eine, ihr aufgelagerte zweite Membran. Diese wird durch eine äußere

Schicht aus Lipopolysacchariden (LPS) und einer inneren Lage Phospholipiden gebildet. Sie wird auch als asymmetrische Lipiddoppelschicht bezeichnet (Schlegel, 1992). In humanen Seren können AK gegen das LPS der *E. coli* enthalten sein. Um eine Reaktion mit diesen AK zu vermeiden, wurden die Seren vor ihrer Verwendung mit *E. coli* UT5600(DE3) pKP009 präabsorbiert (Petermann, 2010).

Für die Präabsorption wurde eine ÜNK mit *E. coli* UT5600(DE3) pKP009 in 200 ml LB-Medium und Kanamycin in einer Endkonzentration von 30 µg/ml bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Am nächsten Morgen wurde die Kultur mit 1mM IPTG zur Proteinexpression für 1 Stunde bei 30 °C und 200 rpm induziert. Die Induktion wurde durch Lagerung auf Eis gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 4 °C und 5.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Proben zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen und jeweils für 5 Minuten bei 4 °C und 5.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf eine OD von 20 eingestellt. Dazu wurde eine Verdünnung von 1:100 mit PBS hergestellt. Als Referenz wurde PBS verwendet. Es wurden 990 µl PBS mit 10 µl der Zellsuspension gemischt und bei 578 nm im Photometer vermessen. Anschließend wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension in 2 ml Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf pipettiert und für eine Minute bei 13.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Hälfte der entstandenen Pellets wurde bis zum weiteren Gebrauch bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die anderen Pellets wurden mit je 145 µl PBS und 5 µl des entsprechenden humanen Serums resuspendiert. Das Serum-Zell-Gemisch wurde für 5 Stunden bei 37 °C und 800 rpm in einem Thermoschüttler der Firma Labnet (Vortemp) inkubiert. Es folgte der zweite Inkubationsschritt. Dafür wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße erneut eine Minute bei 13.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und mit den frischen Pellets aus dem Kühlschrank resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Inkubation bei 37 °C, 800 rpm für weitere 15 Stunden im bereits oben erwähnten Thermoschüttler.

Nach Beendigung des zweiten Präabsorptionsschrittes wurde das Serum-Zell-Gemisch erneut für eine Minute bei 13.200 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 850 µl PBS+10% FCS pipettiert und vorsichtig geschwenkt. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die verdünnten Seren bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

#### 4.2.4 Bestimmung der optischen Dichte

Für einige Versuchsdurchführungen ist es von Bedeutung die Zellzahl der verschiedenen Zellkulturen zu ermitteln (Petermann, 2010). Hierbei wird das indirekte Verfahren der Trübungsmessung eingesetzt. Die Trübung bzw. OD entsteht, wenn die im Wasser suspendierten Partikel einen unterschiedlichen Brechungsindex vorweisen, als das umgebende Medium. Die in der zu bestimmenden Zellkultur vorhanden Bakterien absorbieren und streuen Licht einer bestimmten Wellenlänge wie z.B. 578 nm (Steinbüchel, 2012). Die an der Grenze zwischen Wasser und Partikel einfallenden Lichtstrahlen ergeben eine Streuung, die als OD definiert wird. Die gemessenen Absorptionswerte erlauben Rückschlüsse auf die Zellzahl des vorhandenen Mediums (Schlegel, 1992).

Für die OD-Bestimmung der HK *E. coli* UT5600(DE3) pET-RAA- und *E. coli* UT5600(DE3) pKP009 wurde als Referenz 1000 µl LB-Medium in einer Halbmikroküvette verwendet. Von den jeweiligen Proben wurden ebenfalls 1000 µl in eine Küvette pipettiert und anschließend vermessen.

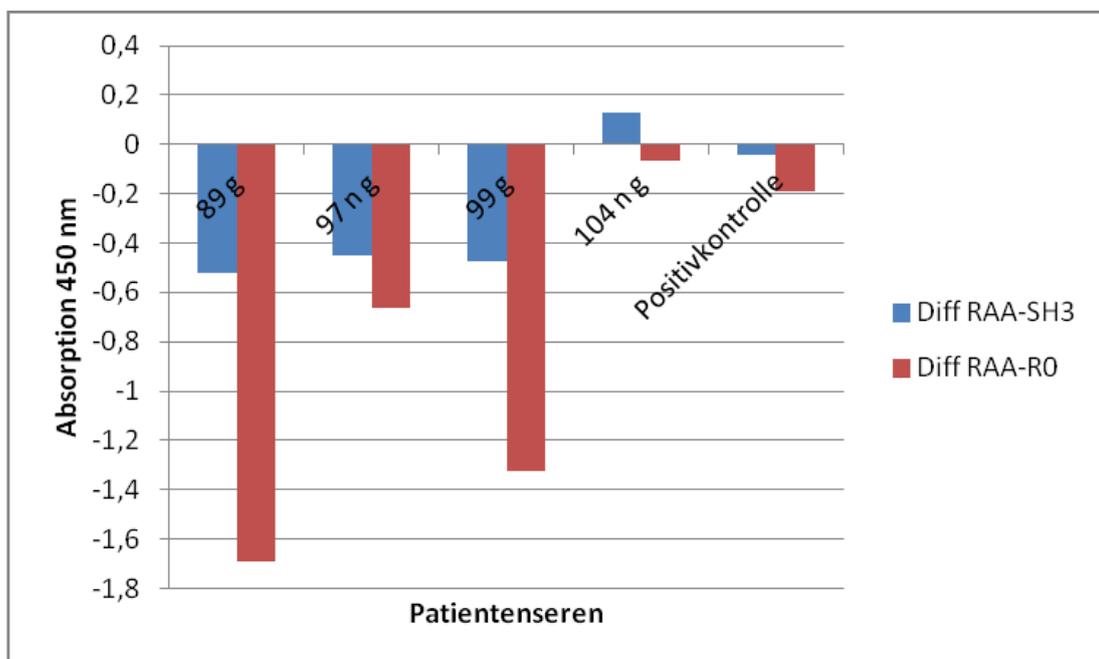
Für die OD-Einstellung von OD 0,2 zur Präabsorption der humanen Seren, wurde eine Verdünnung von 1:100 mit je 990 µl und 10 µl der Zellsuspension erstellt. Als Referenz wurde PBS verwendet. Hierbei wurde die entsprechende Zellsuspension so lange mit PBS verdünnt, bis die OD von 0,2 erreicht wurde.

Für die OD-Einstellung von OD 0,5 der *E. coli* UT5600(DE3) pET-RAA, *E. coli* UT5600(DE3) pKP009 und *E. coli* UT5600(DE3) pET SH3 HK zum *Coaten* der Mikrotiterplatte, wurde als Blank ebenfalls PBS verwendet. 1000 µl der entsprechenden Zellsuspension wurden in die jeweilige Küvette pipettiert. Die Zellkultur wurde mit PBS bis zum Erreichen der gewünschten OD mit PBS verdünnt.

#### 4.2.5 Modifizierte Induktionsbedingungen

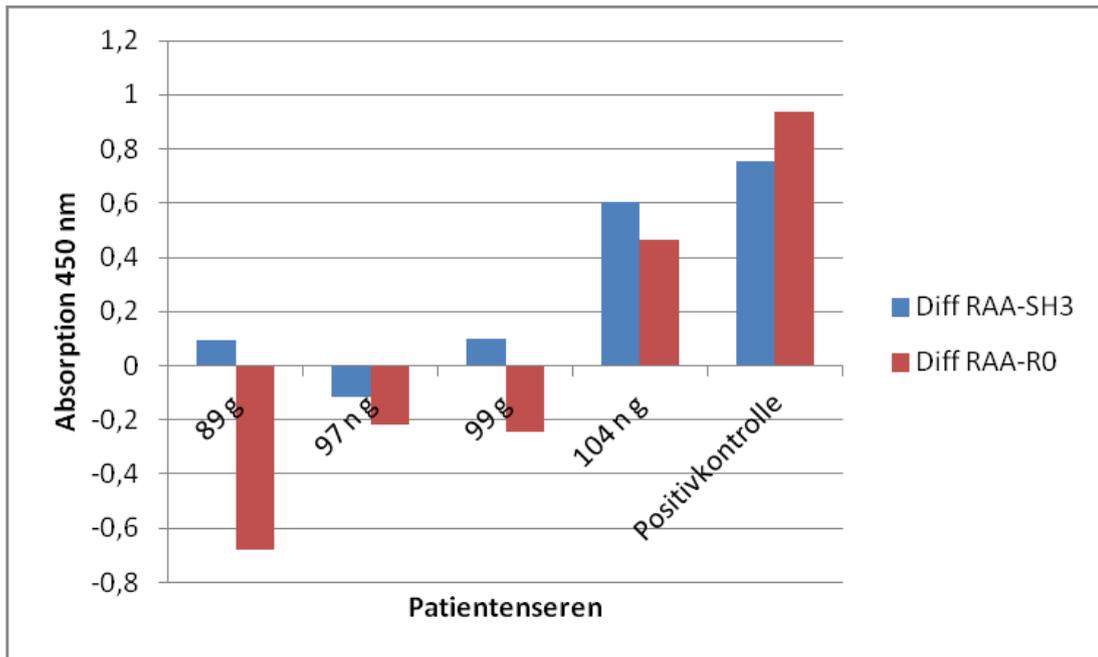
Bei der Durchführung der ersten ELISA nach dem Protokoll von K. Petermann fiel auf, dass die Negativkontrolle, die durch den Bakterienstamm *E. coli* UT5600(DE3) pET-SH3 gestellt wurde, positivere Werte erzielte, als der Bakterienstamm mit dem zu untersuchenden Protein *E. coli* UT5600(DE3) pET-RAA. Es resultierten negative Differenzwerte, die nicht weiter verwendet werden konnten. Als Grundlage zur Berechnung der Differenzwerte dienten die

Absorptionswerte von dem Konstrukt *E. coli* UT5600(DE3) pET-RAA und der Negativkontrolle *E. coli* UT5600(DE3) pKP009. Es galt daher, den bereits etablierten ELISA so zu modifizieren, dass mit dem Verfahren plausible Testergebnisse erreicht werden konnten. Als Variable konnten sowohl die Induktionszeit, die Temperatur sowie das zur Induktion verwendete Medium, in Betracht gezogen werden. Zunächst wurde die Induktionszeit geändert: Zum einen erfolgte die Induktion bei 30 °C, 200 rpm für 4 Stunden in LB-Medium. Als Probenmaterial sind Seren von jeweils zwei gestillten und zwei nicht gestillten Probanden sowie die Positivkontrolle aufgetragen worden. Dabei gilt zu beachten, dass die Maxisorp-Platte mit der Bakteriensuspension des Stammes *E. coli* UT5600(DE3) pET-SH3 sowie mit *E. coli* UT5600(DE3) pKP009 in der Konzentration von 1:100 *gecoatet* war. Diese Versuchsdurchführung erzielte negative Differenzwerte. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.4 zu sehen.



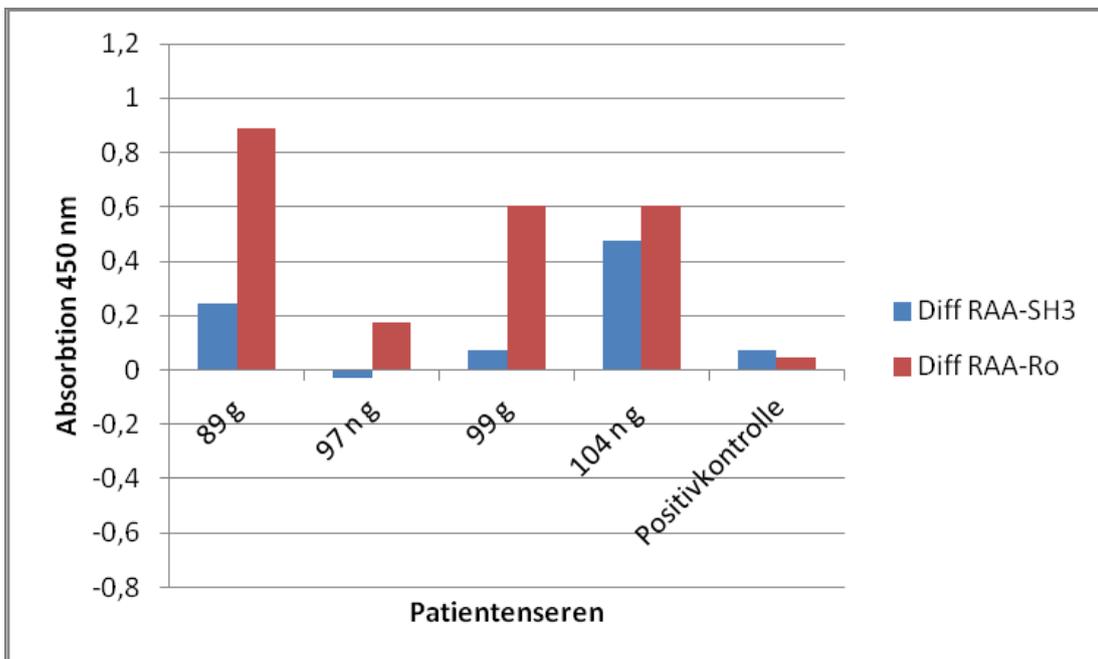
**Abb. 4.4:** Ergebnis des ELISAs bei Präabsorption mit SH3 und Ro bei Induktion: 4h bei 30° in LB

Daher wurden weitere Modifizierungen vorgenommen. So erfolgte die Induktion zum einen bei 30 °C und 200 rpm über Nacht in LB-Medium. Die veränderten Ergebnisse sind in Abb. 4.5 abgebildet.



**Abb. 4.5: Differenzwerte des ELISAs bei Präabsorption mit SH3 und Ro bei Induktion: über Nacht bei 30° in LB**

Schließlich wurde das zur Induktion benötigte Medium ausgetauscht. Anstelle von LB-Medium fand PBS Verwendung. Als orientierende Grundlage galt hier die Versuchsdurchführung von Raaf et al. (Raaf et al. 2013). Für die Versuchsdurchführungen wurde als Induktor 1 mM IPTG (10µl/10ml) beibehalten. Das entsprechende Ergebnis ist in Abb. 4.6 dargestellt.



**Abb. 4.6: Differenzwerte des ELISAs bei Präabsorption mit SH3 und Ro bei Induktion: über Nacht bei 30° in PBS**

Die Induktionsbedingungen zum *Coaten* der Maxisorp-Platten wurden wie folgt verändert:

Die ÜNK wurden wie im Protokoll von K. Petermann zur HK mit 10 µl/10ml Carbenicillin in der Endkonzentration 50 µg/ml für *E. coli* UT5600(DE3) pET-RAA und 5 µl/10ml Kanamycin in einer Endkonzentration von 30 µg/ml für *E. coli* UT5600(DE3) pKP009, 10 µl/10ml EDTA in einer Endkonzentration von 10 µM sowie 7 µl/10ml 10 mM Mercaptoethanol bis zu einer OD von 0,5 bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Anschließend wurden die Kulturen in 50 ml Falcons überführt und bei 4 °C und 5.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die entstandenen Pellets bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Folgend wurden die veränderten Bedingungen wirksam. Abends wurden die Pellets in ihrem ursprünglichen Volumen z.B. 20 ml PBS resuspendiert und in einen Kolben überführt. Es folgte die Zugabe von Carbenicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml für *E. coli* UT5600(DE3) pET-RAA und Kanamycin in einer Endkonzentration von 30 µg/ml für *E. coli* UT5600(DE3) pKP009, 10 µM EDTA, 10 mM Mercaptoethanol sowie 1 µM IPTG. Die Zellsuspensionen wurden dann bei 30 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Suspensionen in 50 ml Falcons gefüllt und erneut 10 Minuten bei 4 °C und 5.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets jeweils zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen. Die entstandenen Pellets wurden dann bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Alle anschließenden Schritte bezogen sich wieder exakt auf das etablierte Protokoll von K. Petermann. Die Pellets wurden mit PBS auf eine OD von 0,5 eingestellt. Als Blank fand dabei PBS Verwendung. Folgend konnten die Maxisorp-Platten mit den beiden Bakteriensuspensionen beschichtet werden. Alle Änderungen die im Protokoll von K. Petermann vorgenommen wurden, sind in der untenstehenden Tabelle 4.3 zusammen gefasst.

Tabelle 4.3: Übersicht der Veränderungen am Protokoll von K. Petermann

Kategorie	Protokoll K. Petermann	Modifiziertes Protokoll	Nutzen
Zur Induktion verwendetes Medium	LB-Medium	PBS +	Im Gegensatz zu LB-Medium diente PBS nicht als reiner Energielieferant zur <i>E. coli</i> -Vermehrung, sondern sollte vor allem ein konstantes Milieu zur Protein-Faltung schaffen.
		EDTA (10 µM)	Unterstützend findet die Zugabe von EDTA zur Chelatkomplexbildung statt. Damit werden Magnesium Ionen komplexiert, wodurch die äußere Membran durchlässiger wird.
		Mercaptoethanol (10 mM)	Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken und verhindert somit die Faltung von Proteinen im Periplasma.
		IPTG (1 mM)	IPTG wirkt als Induktor für die Expression des entsprechenden Proteins.
		Carbenicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml für <i>E. coli</i> UT5600(DE3) pET-RAA	Carbenicillin und Kanamycin werden entsprechend als Selektionsmedium eingesetzt.
		bzw. Kanamycin in einer Endkonzentration von 30 µg/ml für die <i>E. coli</i> UT5600(DE3) pKP009	

Induktionszeit	1h	> 12h	Die Verlängerung der Dauer, gibt dem Protein die benötigte Zeit zur Faltung.
Präabsorbtion	<i>E. coli</i> UT5600(DE3) pET-SH3	<i>E. coli</i> UT5600(DE3) pKP009	Absorption von möglichen 60kDa-Ro/SS-A-AK

#### 4.2.6 Ermittlung der Differenzwerte und statistische Auswertung

Jedes Serum wurde dreimal auf AK gegen 60 kDa Ro/SSA sowie dreimal auf AK gegen CSN1S1 untersucht. Aus den gemittelten Absorptionswerten werden die in dieser Arbeit verwendeten Differenzwerte berechnet. Dazu wird der Mittelwert der *E. coli* UT5600(DE3) pKP009-Absorptionswerten von den entsprechenden *E. coli* UT5600(DE3) pET-RAA-Absorptionswerten subtrahiert. Die sich daraus ergebenden Differenzwerte stellen die Antikörperreaktion gegen CSN1S1 dar. Die Ergebnisse werden durch eine multivariante Regressionsanalyse in der Programmiersprache „R“ (Version 3.3.2) dargestellt. Die Analysen wurden mit Unterstützung durch das Hiller Forschungszentrum Rheumatologie durchgeführt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Übersicht

Es wurde die Antikörperreaktion gegen CSN1S1 in jeder Blutprobe bestimmt und anschließend unter Berücksichtigung verschiedener Merkmale verglichen. Dabei wurden Männer und Frauen getrennt betrachtet, da Frauen neben dem „gestillt-worden-Sein“ zusätzlich noch potentiell aktiv stillen können oder gestillt haben. Das Ausmaß der Antikörperreaktion gegen CSN1S1 im Serum basiert auf den Differenzwerten der ermittelten Absorptionswerte von Konstrukt (*E. coli* UT5600(DE3) pET-RAA) und der Negativkontrolle (*E. coli* UT5600(DE3) pKP009) (siehe 4.2.6).

In den folgenden Grafiken, Abb. 5.1 und Abb. 5.2, sind alle ermittelten Differenzwerte in einem allgemeinen Überblick dargestellt.

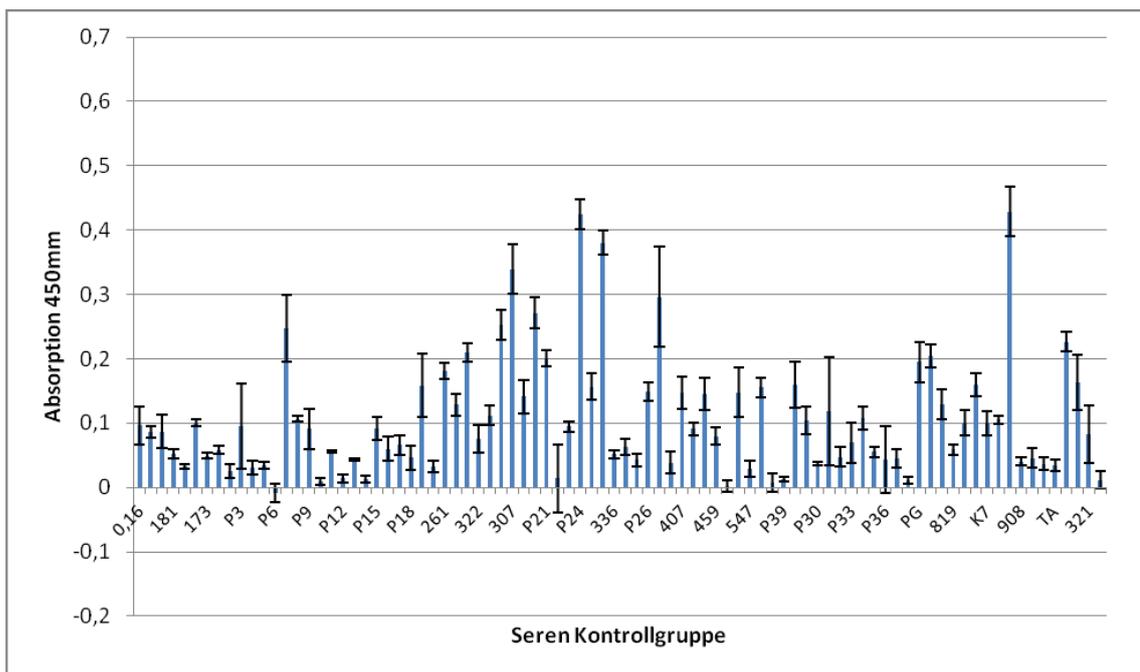
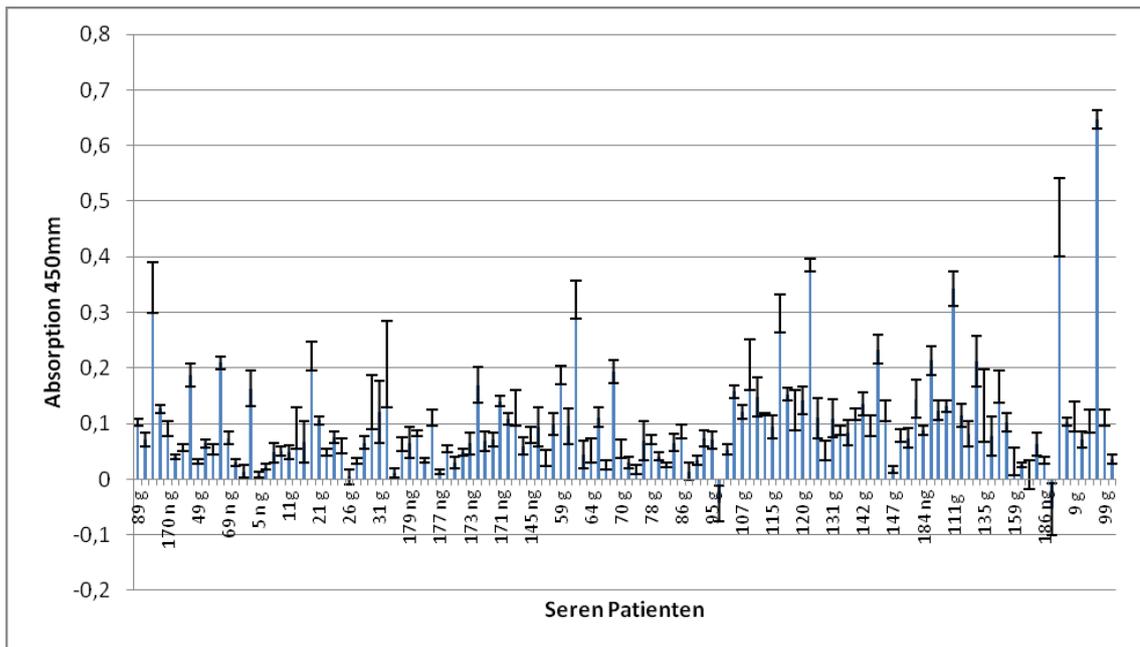


Abb. 5.1: Differenzwerte der Kontrollgruppe mit Standardabweichungen



**Abb. 5.2: Differenzwerte der Patienten mit Standardabweichungen**

## 5.2 Demographische Daten

Für die Durchführung des Protokolls standen insgesamt 130 Patientenseren sowie 86 Kontrollseren zur Verfügung. Weitere Details zu den demographischen Daten sind in den Tabelle 5.1-Tabelle 5.2 sowie Abb. 5.3-Abb. 5.4 dargestellt.

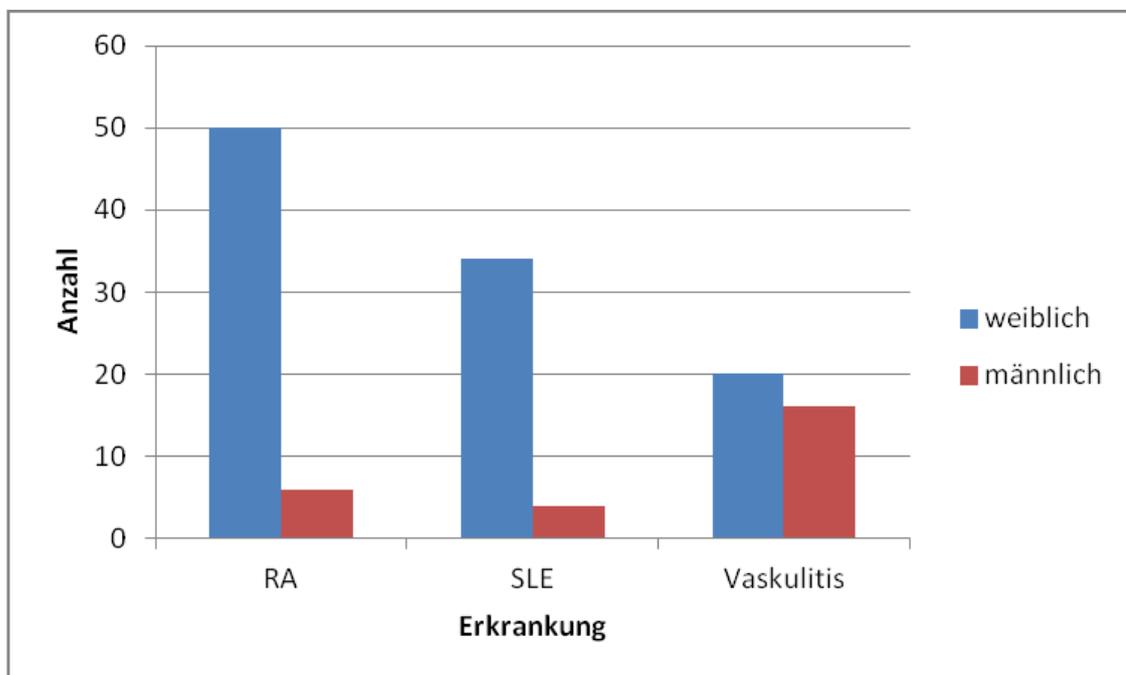
**Tabelle 5.1: Demographische Daten**

Gruppe	Anzahl absolut	Anzahl in %	Alter	Mittelwert (Median)	SD (IQR)	weiblich in %
<b>RA</b>	56	25,9	23,73-78,24	54,90 (54,07)	14,53 (19,32)	89,28%
<b>SLE</b>	38	17,6	21,97-72,16	38,76 (35,97)	13,15 (20,97)	89,47%
<b>Vaskulitis</b>	36	16,7	28,03-84,53	61,32 (62,46)	13,81 (19,57)	55,55%
<b>Kontrollgruppe</b>	86	39,8	21,10-83,79	46,59 (49,77)	15,52 (26,89)	73,25%

Die Geschlechterverteilung der einzelnen Erkrankungsgruppen ist in der folgenden Tabelle 5.2 aufgeführt.

**Tabelle 5.2: Geschlechterverteilung in den Erkrankungsgruppen**

Erkrankung	Patientinnen	Patienten
RA	50	6
SLE	34	4
Vaskulitis	20	16
<b><u>Gesamt</u></b>	<b><u>104</u></b>	<b><u>26</u></b>
<b>Kontrollgruppe</b>	<b>63</b>	<b>23</b>

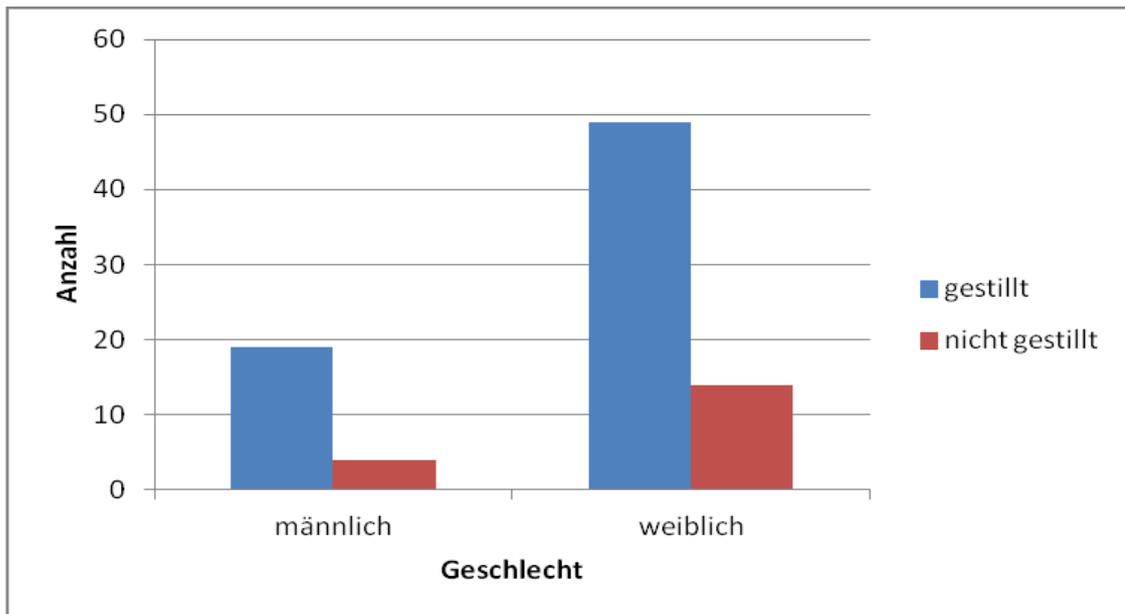


**Abb. 5.3: Studienpopulation: Übersicht über die Anzahl der weiblichen und männlichen Studienteilnehmern unter Berücksichtigung der Erkrankungen (RA, SLE und Vaskulitis)**

Das Alter der Patientinnen lag zum Erhebungszeitpunkt zwischen 23 und 84 Jahren. Dabei ergab sich ein Altersdurchschnitt von 51,19 Jahren.

Die Patienten wiesen einen Mittelwert von 55,05 Jahren auf. Sie waren zum Erhebungszeitpunkt zwischen 21 und 79 Jahre alt.

Die Abb. 5.4 zeigt die Anzahl der Kontrollseren unter Berücksichtigung des jeweiligen Stillstatus der weiblichen und männlichen Teilnehmer.



**Abb. 5.4: Kontrollseren unter Berücksichtigung des Stillstatus: Übersicht über die Anzahl der Kontrollseren unter Berücksichtigung des Geschlechts sowie des Stillstatus**

Zur Analyse einer Kontrollpopulation standen 63 weibliche und 23 männliche Seren zur Verfügung.

Die Teilnehmerinnen der Kontrollgruppe waren zum Erhebungszeitpunkt der Daten zwischen 21 und 77 Jahre alt und zeigten einen Mittelwert von 44,99. Die Kontrollteilnehmer waren 22-83 Jahre alt. Der Mittelwert des Alters lag bei 50,94 Jahren.

### 5.3 Regressionsmodelle

Die multivariaten Regressionsanalysen wurden mit der Programmiersprache „R“ ausgeführt. Dabei wurden die unterschiedlichen Geschlechter gemeinsam betrachtet. Als mögliche Einflussfaktoren auf die CSN1S1-Antikörperkonzentration werden das Geschlecht, das Alter, der passive Stillstaus („Gestillt-worden-Sein“), der Einflussfaktor Rauchen sowie in der weiblichen Teilnehmerpopulation das aktive Stillverhalten („Gestillt-Haben“) berücksichtigt.

#### 5.3.1 Regressionsmodelle aller Studienteilnehmer/innen ohne den Faktor „Rauchen“

Zunächst wird die Gesamtpopulation hinsichtlich der CSN1S1-Antikörperkonzentration in Bezug auf den Faktor „Gestillt-worden-Sein“ unter Adjustierung für Alter und Geschlecht betrachtet (Tabelle 5.3).

**Tabelle 5.3: Regressionsmodell unter Berücksichtigung des Stillstatus, Alter und Geschlecht**

Effect	Estimate	SD	P-Wert
Intercept	0,1130925	0,0237281	3.48e-06
Gestillt-worden-Sein	0,0110992	0,0148628	0,456
Alter	-0,0003200	0,0003944	0,418
Geschlecht	-0,0061112	0,0153527	0,691

Bei dieser Analyse werden keine signifikanten Ergebnisse ermittelt. Um den Einfluss von „Aktiv gestillt-Haben“ genauer zu untersuchen, wird zusätzlich eine Regressionsanalyse mit den Faktoren „Aktiv gestillt-Haben“ sowie „Alter“ durchgeführt (Tabelle 5.4).

**Tabelle 5.4: Regressionsmodell unter Berücksichtigung des aktiven Stillverhaltens und des Alters**

Effect	Estimate	SD	P-Wert
Intercept	0,1154917	0,0281968	7.85e-05
Aktiv gestillt-Haben	-0,0225218	0,0187167	0,231
Alter	0,0001433	0,0005850	0,807

Um auszuschließen, dass Interaktionen zwischen dem aktiven Stillverhalten und dem „Gestillt-worden-Sein“ bestehen, wurde anschließend eine Interaktionsanalyse durchgeführt (Tabelle 5.5).

**Tabelle 5.5: Regressionsanalyse aller Teilnehmer/innen unter Berücksichtigung einer Interaktion zwischen dem aktiven und dem passiven Stillstatus**

Effect	Estimate	SD	P-Wert
Intercept	0,0715454	0,0396580	0,0739
Gestillt worden-Sein	0,0482141	0,0309601	0,1222
Aktiv gestillt-Haben	0,0031467	0,0329189	0,9240
Alter	0,0003687	0,0006004	0,5404
Interaktion: Gestillt- worden-Sein/ gestillt-Haben	-0,0387341	0,0395368	0,3293

Anhand der Analyse kann keine Interaktion zwischen dem aktiven und passiven Stillen nachgewiesen werden. Daher wird das aktive Stillverhalten in den weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

Im nächsten Schritt wurden Interaktionen zwischen dem Geschlecht und dem „Gestillt-worden-Sein“ hinsichtlich der CSN1S1-Antikörperkonzentration untersucht (Tabelle 5.6).

**Tabelle 5.6: Regressionsmodell aller Teilnehmer/innen unter Berücksichtigung des Geschlechts und des passiven Stillstatus (Interaktion)**

Effect	Estimate	SD	P-Wert
Intercept	0.08417	0,01371	<0,00001
Gestillt- worden-Sein	0,02929	0,01604	0,06934
Geschlecht	0,07745	0,03529	0,02929
Interaktion: Geschlecht/ Gestillt- worden-Sein	-0,10381	0,03901	0,00838

Bei der Auswertung zeigt sich eine deutliche Interaktion zwischen den beiden Faktoren und es wird ein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die Höhe

des Differenzwerts ermittelt. Es zeigt sich, dass gestillte Männer signifikant geringere CSN1S1-AK entwickeln als Frauen.

In der folgenden Analyse (Tabelle 5.7) wird dieses Ergebnis gegen eine weitere Adjustierung für die verschiedenen Erkrankungsgruppen (RA, SLE, Vaskulitis), das Alter und das Geschlecht durchgeführt.

**Tabelle 5.7: Regressionsmodell aller Teilnehmer/innen unter Differenzierung des passiven Stillstatus, des Alters und der unterschiedlichen Erkrankungsgruppen (Interaktion)**

Effect	Estimate	SD	P-Wert
Intercept	0,1045192	0,0269407	0,00014
Gestillt-worden-Sein	0,0278764	0,0162147	0,08706
Geschlecht	0,0765374	0,0357399	0,03340
SLE	-0,0174358	0,0184967	0,34696
RA	0,0128236	0,0164981	0,43788
Vaskulitis	-0,0004104	0,0195700	0,98329
Alter	-0,0004003	0,0004382	0,362030
Interaktion: Gestillt-worden-Sein/ Geschlecht	-0,1002225	0,0394215	0,01174

Auch nach Adjustierung für Diagnosegruppe und Alter bleibt das Geschlecht ein signifikanter Einflussfaktor und es zeigt sich ein signifikanter Einfluss des Geschlechts hinsichtlich auf die CSN1S1-AK-Bildung in Abhängigkeit des Gestillt-Werdens.

### **5.3.2 Regressionsmodelle aller Studienteilnehmer/innen mit dem Faktor „Rauchen“**

In den weiteren Analysen wird das Merkmal „Rauchen“ zusätzlich in die Betrachtung mit einbezogen. Bei der folgenden Analyse (Tabelle 5.8) wird „Rauchen“ als Faktor bei der Betrachtung des Gesamtkollektivs integriert.

**Tabelle 5.8: Regressionsmodell aller Teilnehmer/innen unter Differenzierung des passiven Stillstatus, des Alters und des Rauchstatus**

Effect	Estimate	SD	P-Wert
Intercept	0,0936030	0,0343364	0,00738
Gestillt-worden-Sein	0,0184302	0,0207438	0,37608
Alter	-0,0002063	0,0005331	0,69949
Geschlecht	-0,0096885	0,0225880	0,66875
Früher geraucht	0,0236792	0,0202291	0,24412
Raucht derzeitig	0,0064006	0,0268498	0,81199

In dieser Analyse zeigt sich, dass die Konzentration der CSN1S1-AK der Personen, die geraucht haben oder derzeitig noch rauchen, nicht statistisch signifikant von den Werten der übrigen Studienteilnehmer abweicht.

Im folgenden Schritt wird die Interaktion zwischen passivem Stillen und Rauchen untersucht (Tabelle 5.9).

**Tabelle 5.9: Regressionsmodell aller Teilnehmer/innen unter Differenzierung des passiven Stillstatus, des Alters und des Rauchens (Interaktion)**

Effect	Estimate	SD	P-Wert
Intercept	0,0818850	0,0396379	0,0410
Alter	-0,0002894	0,0005294	0,5856
Nicht gestillt worden-Sein und nie geraucht	0,0073434	0,0392433	0,8519
gestillt worden-Sein und nie geraucht	0,0352927	0,0338922	0,2999
Nicht gestillt-worden-Sein und früher geraucht	0,0059568	0,0497413	0,9049
Gestillt worden-Sein und früher nicht geraucht	0,0617243	0,0364646	0,0931
Nicht gestillt worden-Sein und aktuell rauchen	0,0700374	0,0476199	0,1440
Gestillt worden-Sein und aktuell rauchen	NA	NA	NA

Die Ergebnisse dieser Regressionsanalyse lassen den Schluss zu, dass keine Interaktion zwischen dem Rauchen und dem passiven Stillen vorliegt.

In der folgenden Regressionsanalyse (Tabelle 5.10) wird untersucht, ob eine Adjustierung für das Rauchverhalten den beobachteten Einfluss des Geschlechts auf die CSN1S1-Antikörperkonzentration beeinflusst.

**Tabelle 5.10: Regressionsmodell aller Teilnehmer/innen unter Differenzierung des Alters, des Rauchens, des passiven Stillstatus und des Geschlechts (Interaktion)**

Effect	Estimate	SD	P-Wert
Intercept	6.416e-02	3.561e-02	0,0741
Früher geraucht	3.118e-02	1.929e-02	0,1087
Aktuell rauchen	3.173e-04	2.552e-02	0,9901
Alter	7.085e-05	5.110e-04	0,8900
Interaktion: Nicht gestillt worden-Sein / Frauen	-1.315e-03	2.646e-02	0,9605
Interaktion: Gestillt worden-Sein/ Frauen	3.882e-02	2.278e-02	0,0909
Interaktion: Nicht gestillt worden-Sein / Männer	2.295e-01	6.860e-02	0,0011
Interaktion: Gestillt worden-Sein / Männer	NA	NA	NA

Die Analyse zeigt, dass auch nach Adjustierung für das Rauchen Männer weniger CSN1S1-AK bilden als Frauen.

## 6 Diskussion

AK gegen das Muttermilchprotein CSN1S1 können sich als Reaktion auf die Exposition mit Muttermilch im Rahmen des Stillens entwickeln (Petermann, 2010). Zudem hat CSN1S1 proinflammatorische Eigenschaften und kann ektop exprimiert werden (Vordenbäumen et al., 2011). Wir untersuchten daher, ob sich die CSN1S1-IgG-Antikörperbildung bei verschiedenen Patientengruppen mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen unterscheidet.

Unsere Analysen zeigen, dass Männer, die als Säugling gestillt worden sind, eine geringere Tendenz zur CSN1S1-IgG-Bildung zeigen als Frauen. Die erfassten rheumatischen Erkrankungen hatten dagegen keinen Einfluss auf die CSN1S1-IgG-Konzentration.

Auffällig ist, dass die männlichen Teilnehmer insgesamt weniger CSN1S1-AK aufweisen, als die weiblichen Teilnehmerinnen. Unterschiedliche IgG-Gesamtkonzentrationen wurden in der aktuellen Studie nicht erfasst. Allerdings sind bei IgG-Gesamtkonzentrationen von erwachsenen Männern und Frauen mehrfach Unterschiede beschrieben worden (Cassidy et al., 1974; Giltay et al., 2000; Obiandu et al., 2013; Oertelt-Prigione, 2012), während andere gleiche Level fanden (Bhat et al., 1995). Wichtig ist zu beachten, dass alle diese Studien in unterschiedlichen ethnischen Populationen durchgeführt wurden. Die Ethnizität hat aber einen bekannten Einfluss auf die IgG-Konzentration und evtl. auch auf mögliche Geschlechtsunterschiede, wodurch eine direkte Vergleichbarkeit nicht gut möglich ist (Maddison et al., 1975). Es wird spekuliert, dass diese Unterschiede auf unterschiedliche Sexualhormone zurückzuführen sein könnten. Beispielsweise üben Östrogene sowohl bei Männern, als auch bei Frauen eine Erhöhung der Antikörperbildung (IgG und IgM) aus (Kanda and Tamaki, 1999). Dieser Effekt ist direkt sowie über einen verstärkten Effekt durch IL-10 von Monozyten möglich. Dagegen scheint eine verminderte IgG- und IgM-Bildung durch Testosteron und die damit verminderte Produktion von IL-6 durch Monozyten zu resultieren (Kanda et al., 1996).

Andere Autoren zeigten hingegen eine ähnliche Serumkonzentration von IgG, die IgA-Sekretion im Speichel und B-Zellen war im Blut von Männer sogar

erhöht (Gleeson et al., 2011). Anzumerken ist allerdings, dass es sich in dieser Studie um gesunde Sportler handelte.

In einer weiteren Studie zeigten Untersuchungen an französischen Kindern mit und ohne Diabetes keine Unterschiede in der IgG-Konzentration gegen bovines Serumalbumin (Levy-Marchal et al., 1995). Auch diese Studie ist nicht direkt vergleichbar, da es sich erstens um ein Kollektiv von Kindern handelt und zweitens kein Autoantikörper, sondern ein AK gegen ein Fremdmilchprotein gemessen wurde.

Bei heterogener Studienlage zeigen somit die meisten Studien eine leicht erhöhte Konzentration an Gesamt-IgG bei Frauen gegenüber Männern. Auffällig ist allerdings, dass wie für bovines Serumalbumin gezeigt, hieraus nicht notwendigerweise systematisch unterschiedliche spezifische Autoantikörperkonzentrationen resultieren (Levy-Marchal et al., 1995). Interessanterweise wurde in der aktuellen Studie genau dieser Effekt bei der CSN1S1-IgG-Konzentration festgestellt. Da das Milchprotein CSN1S1 eines der ersten Autoantigene ist, mit dem der neu geborene Organismus in Kontakt kommt und hier offensichtlich bereits geschlechtsspezifische Unterschiede entstehen, könnte die frühe Immunantwort auf CSN1S1 zukünftig betrachtet werden, um geschlechtsspezifische Unterschiede der Immunantwort zu einem frühen Zeitpunkt zu untersuchen. Dies könnte z.B. auch tierexperimentell erfolgen, da Caseine bei Säugern konserviert sind.

Die erzielten Ergebnisse weichen von den von K. Petermann ermittelten Werten in der Arbeit: „Autodisplay von humanen Antigenen als Basis für die beschleunigte Entwicklung von ELISA“ ab. Dort hatte sich gezeigt, dass gesunde Probandinnen eine deutlich erhöhte CSN1S1-IgG-Konzentration hatten, wenn sie als Säuglinge gestillt worden waren. Eine Ursache mag eine Modifikation des Testansatzes sein. Die Experimente wurden zwar zunächst mit der gleichen Methodik durchgeführt, damit konnte jedoch kein Nachweis von Casein auf der Oberfläche von *E. coli* erzielt werden. Aus diesem Grund wurde die Methodik von K. Petermann modifiziert, bis die Expression und Faltung von Casein auf der Oberfläche von *E. coli* über ELISA nachgewiesen werden konnte. Ob die abweichenden Resultate an der Oberflächenexpression oder an der Faltung von Casein liegt, konnte abschließend nicht geklärt werden. Eine

detaillierte Übersicht der vorgenommenen Veränderungen der Methodik ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

Weiterhin wurde die Arbeit von K. Petermann in einem anderen Labor durchgeführt. Auch wenn Variablen wie Raumtemperatur, verwendete Geräte und Lagerung der Proben gleich gehalten wurden, könnte dies einen Einfluss ausgeübt haben.

Ebenso gilt zu beachten, dass möglicherweise in beiden Arbeiten Seren unterschiedlicher Alterspopulationen vermessen wurden (siehe auch Abschnitt 4.1.7 und Abschnitt 5.2). Da in der Arbeit von K. Petermann keine Angaben zum Alter der Probanden gemacht wurden, ist ein aussagekräftiger Vergleich nicht möglich. Es ist nicht auszuschließen, dass die in der Arbeit von K. Petermann verwendeten Seren eher einen jüngeren Altersdurchschnitt aufwiesen. Dennoch zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen keinen sicheren Einfluss des Alters auf die Ergebnisse.

## **6.1 Ausblick**

Aus dieser Arbeit ergab sich ein signifikantes Ergebnis. Männer, die als Säugling gestillt worden sind, weisen eine signifikant geringere CSN1S1-IgG – Konzentration auf, als gestillte weibliche Teilnehmerinnen. Dieser Effekt bleibt auch nach Adjustierung gegen das Alter, die Diagnosegruppe und das Rauchverhalten stabil.

Die anfängliche Hypothese der möglichen unterschiedlichen AK-Konzentrationen gegen CSN1S1 bei gestillten bzw. ungestillten Patientinnen konnte nicht belegt werden. Die an dieser Studie teilnehmenden Probanden, die als Säugling gestillt worden sind, wiesen im Vergleich zu den nicht-gestillten Probanden keine differenten AK-Konzentrationen auf. Anscheinend hat der Kontakt mit CSN1S1 durch die Aufnahme der Muttermilch und die damit verbundene Entwicklung von AK für die einzelnen, in dieser Arbeit berücksichtigten entzündlichen rheumatischen Systemerkrankungen keine Bedeutung. Eine höhere Sicherheit dieser Aussage kann nun experimentell ermittelt werden, indem die vorliegenden Daten dazu dienen, eine Power-Kalkulation zur Fallzahlplanung vor weiteren Studien durchzuführen.

Auffällig ist, dass Frauen und Männer AK gegen CSN1S1 gebildet haben und diese bis in das Erwachsenenalter nachweisbar sind. Dabei könnte der Kontakt mit Muttermilch, also mit humanem CSN1S1 eine Rolle spielen, da über das Stillen des Säuglings der Kontakt zu CSN1S1 hergestellt wird. Erklärungsbedürftig scheint jedoch die AK-Bildung bei den Teilnehmerinnen und Teilnehmer die angegeben haben, als Säugling nicht gestillt worden zu sein. Entweder sie hatten dennoch Kontakt zu humanem Casein und die AK-Produktion konnte erfolgen oder ein weiteres Antigen regt zur AK-Bildung gegen CSN1S1 an.

2011 postulierte die Arbeitsgruppe um K. Petermann, dass CSN1S1 als Autoantigen fungiert (Petermann, 2010). Dieses wird dem jeweiligen Säugling durch die menschliche Muttermilch oral appliziert. CSN1S1 wird neben den biologischen Funktionen, wie beispielsweise der Anregung zur Verdauung und Regulation der extrauterinen Nahrungsverwertung und der Versorgung des Säuglings mit Aminosäuren (Anderson et al., 2006), zudem auch immunmodulatorische Effekte zugeschrieben (siehe auch Abschnitt 2). Da diese mit einer Verstärkung von inflammatorischen Prozessen einhergehen können (Vordenbäumen et al., 2011), war eine Hypothese, dass es Einfluss auf die Ausbildung rheumatischer Systemerkrankungen nehmen kann.

Die Entwicklung des erworbenen Immunsystems eines Neugeborenen erfolgt postpartum. In utero erhält es plazentagängige AK durch die Mutter. Es resultiert eine Differenzierung in ein angeborenes, eher unspezifisches sowie ein erworbenes Immunsystem. Das erworbene Immunsystem entwickelt sich durch die AK-Bildung gegen pathogene Antigene. Casein stellt eines der frühesten oral applizierten, jedoch nicht primär pathogenen Antigene dar, die für die Entwicklung des Immunsystems eine Rolle spielen könnten. Wie bereits in der Arbeit von K. Petermann konnte auch jetzt gezeigt werden, dass eine AK-Produktion gegen CSN1S1 erfolgt (Petermann, 2010) und bis in das Erwachsenenalter nachweisbar ist.

Des Weiteren bleibt die Frage nach dem möglichen Zusammenhang der frühen CSN1S1 Exposition und der damit verbundenen AK-Produktion sowie der Entstehung bzw. des Ausbleibens einer rheumatischen Erkrankung.

Die CSN1S1-AK-Konzentration scheint aufgrund der hier erhobenen Daten nicht zur Diagnose einer rheumatischen Erkrankung, zum Verlauf oder zur Einschätzung der entsprechenden Krankheitsaktivität geeignet zu sein.

## **6.2 Schlussfolgerungen**

In dieser Arbeit wurden Seren von Patienten mit einer entzündlich rheumatischen Systemerkrankung mittels eines Auto-Display basierten ELISA-Verfahrens auf den Nachweis von CSN1S1-IgG-Antikörpern im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv untersucht.

Die Analysen wurden unter Berücksichtigung der aufgeführten Erkrankungen durchgeführt. Es erfolgte die Differenzierung nach Geschlecht, Alter und dem eigenen „gestillt worden-Sein“. Die Patientenpopulation wurde außerdem hinsichtlich der Rauchanamnese analysiert. In der weiblichen Population fand zusätzlich das entsprechende Stillverhalten Berücksichtigung.

In den jeweiligen Analysen wurde demonstriert, dass männliche gestillte Teilnehmer eine signifikant geringere Tendenz zur Ausbildung von CSN1S1-IgG aufweisen als gestillte weibliche Teilnehmerinnen. Dieses Ergebnis zeigte sich ebenfalls nach Adjustierung für die Diagnosegruppe, das Alter sowie das Rauchverhalten. Daher resultieren einige Fragen, die in weiteren Studien untersucht werden könnten:

1. Existieren weitere Mechanismen zur CSN1S1-AK-Produktion außer der Tatsache, als Säugling gestillt worden zu sein oder selber einen Säugling gestillt zu haben?
2. Wie entwickelt sich die CSN1S1-AK-Konzentration zwischen aktuell stillenden und nicht stillenden Frauen, sowie bei den entsprechenden gestillten Säuglingen?
3. Weisen andere AK, beispielsweise gegen Lactoferrin oder weitere Milchproteine signifikante Ergebnisse in Bezug auf das Geschlecht, den Stillstatus, die möglichen entzündlich rheumatischen Systemerkrankungen und das potentielle Stillverhalten auf?
4. Besteht ein signifikanter Unterschied der AK-Konzentration gegen CSN1S1 unter Berücksichtigung der Rauchanamnese in der männlichen Patienten-Population unter Einbeziehung eines größeren Probandenkollektivs?

5. Lässt sich eine Korrelation zwischen der Höhe der CSN1S1-AK-Konzentration und der aktuellen Krankheitsaktivität aufweisen?
6. Wie entwickelt sich die CSN1S1-AK-Konzentration in den einzelnen Diagnosegruppen unter Berücksichtigung einer entsprechend vergrößerten Teilnehmergruppe?

## 7 Literaturverzeichnis

- Aguzzi, A., (2008). Pathologie: Mit über 200 Tabellen ; [mit dem Plus im Web]. Elsevier, Urban & Fischer, München u.a.
- Aihara, K., Ishii, H., Yoshida, M., (2009). Casein-derived tripeptide, Val-Pro-Pro (VPP), modulates monocyte adhesion to vascular endothelium. *J. Atheroscler. Thromb.* 16 (5), 594–603.
- Anaya, J.-M., Gomez, L., Castiblanco, J., (2006). Is there a common genetic basis for autoimmune diseases? *Clinical & developmental immunology* 13 (2-4), 185–195.
- Anderson, G.H., Aziz, A., Abou Samra, R., (2006). Physiology of food intake regulation: interaction with dietary components. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 58, 133-43; discussion 143-5.
- Aniansson, G., Andersson, B., Lindstedt, R., Svanborg, C., (1990). Anti-adhesive activity of human casein against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *Microb. Pathog.* 8 (5), 315–323.
- Antranikian, G. (Ed.), (2006). *Angewandte Mikrobiologie: Mit 69 Tabellen.* Springer, Berlin u.a.
- Aynsley-Green, A., (1989). The endocrinology of feeding in the newborn. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 3 (3), 837–868.
- Barcellos, L.F., May, S.L., Ramsay, P.P., Quach, H.L., Lane, J.A., Nititham, J., Noble, J.A., Taylor, K.E., Quach, D.L., Chung, S.A., Kelly, J.A., Moser, K.L., Behrens, T.W., Seldin, M.F., Thomson, G., Harley, J.B., Gaffney, P.M., Criswell, L.A., (2009). High-density SNP screening of the major histocompatibility complex in systemic lupus erythematosus demonstrates strong evidence for independent susceptibility regions. *PLoS Genet.* 5 (10), e1000696.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P., (2008). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie: Mit 634 Tabellen, 6., vollst. überarb. Aufl., [Nachdr.]* ed. Springer, Berlin, 1118 pp.
- Benz, I., Schmidt, M.A., (1989). Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity* 57 (5), 1506–1511.

- Beri, D., Malaviya, A.N., Shandilya, R., Singh, R.R., (1988). Effect of dietary restrictions on disease activity in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 47 (1), 69–72.
- Bhat, G.A., Mubarik, M., Bhat, M.Y., (1995). Serum immunoglobulin profile in normal Kashmiri adults. *Journal of postgraduate medicine* 41 (3), 66–69.
- Brantl, V., (1984) Novel opioid peptides derived from human beta-casein: human beta-casomorphins. *Eur. J. Pharmacol.* 106 (1), 213–214.
- Britton, J.R., Kastin, A.J., (1991). Biologically active polypeptides in milk. *Am. J. Med. Sci.* 301 (2), 124–132.
- Brun, J.G., Nilssen, S., Kvale, G., (1995). Breast feeding, other reproductive factors and rheumatoid arthritis. A prospective study. *British journal of rheumatology* 34 (6), 542–546.
- Buchanan, H.M., Preston, S.J., Brooks, P.M., Buchanan, W.W., (1991). Is diet important in rheumatoid arthritis? *British journal of rheumatology* 30 (2), 125–134.
- Cassidy, J.T., Nordby, G.L., Dodge, H.J., (1974). Biologic variation of human serum immunoglobulin concentrations: Sex-age specific effects. *Journal of Chronic Diseases* 27 (11-12), 507–516.
- Colebatch, A.N., Edwards, C.J., (2011). The influence of early life factors on the risk of developing rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental immunology* 163 (1), 11–16.
- Cooper, G.S., Dooley, M.A., Treadwell, E.L., St Clair, E.W., Parks, C.G., Gilkeson, G.S., (1998). Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 41 (10), 1714–1724.
- Costenbader, K.H., Feskanich, D., Stampfer, M.J., Karlson, E.W., (2007). Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum.* 56 (4), 1251–1262.
- Dersch, P., (2008). *Mikrobiologie: 43 Tabellen*. Thieme, Stuttgart u.a.
- DIMDI - ICD-10-GM Version (2016).  
<https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/icd/icd-10-gm/kode-suche/htmlgm2016/block-m05-m14.htm>. Accessed 29 May 2018 (2016).

- Donida, B.M., Mrak, E., Gravaghi, C., Villa, I., Cosentino, S., Zacchi, E., Perego, S., Rubinacci, A., Fiorilli, A., Tettamanti, G., Ferraretto, A., (2009). Casein phosphopeptides promote calcium uptake and modulate the differentiation pathway in human primary osteoblast-like cells. *Peptides* 30 (12), 2233–2241.
- Edwards, C.J., (2010). Can the events of early life influence the development of rheumatoid arthritis? *The Journal of rheumatology* 37 (1), 1–2.
- Ferranti, P., Traisci, M.V., Picariello, G., Nasi, A., Boschi, V., Siervo, M., Falconi, C., Chianese, L., Addeo, F., (2004). Casein proteolysis in human milk: tracing the pattern of casein breakdown and the formation of potential bioactive peptides. *The Journal of dairy research* 71 (1), 74–87.
- Ferson, M., Edwards, A., Lind, A., Milton, G.W., Hersey, P., (1979). Low natural killer-cell activity and immunoglobulin levels associated with smoking in human subjects. *Int. J. Cancer* 23 (5), 603–609.
- FitzGerald, R.J., Meisel, H., (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *Br. J. Nutr.* 84 Suppl 1, S33-7.
- Galligan, C.L., Baig, E., Bykerk, V., Keystone, E.C., Fish, E.N., (2007). Distinctive gene expression signatures in rheumatoid arthritis synovial tissue fibroblast cells: correlates with disease activity. *Genes and immunity* 8 (6), 480–491.
- Giltay, E.J., Fonk, J.C., Blomberg, B.M. von, Drexhage, H.A., Schalkwijk, C., Gooren, L.J., (2000). In vivo effects of sex steroids on lymphocyte responsiveness and immunoglobulin levels in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85 (4), 1648–1657.
- Ginger, M.R., Grigor, M.R., (1999). Comparative aspects of milk caseins. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 124 (2), 133–145.
- Gleeson, M., Bishop, N., Oliveira, M., McCauley, T., Tauler, P., (2011). Sex differences in immune variables and respiratory infection incidence in an athletic population. *Exercise immunology review* 17, 122–135.
- Goldfarb, M., (1999). Two-dimensional electrophoresis and computer imaging: quantitation of human milk casein. *Electrophoresis* 20 (4-5), 870–874.
- Gorman, J.D., (2006). Smoking and rheumatoid arthritis: another reason to just say no. *Arthritis Rheum.* 54 (1), 10–13.

- Gratz, A., (2010). Autodisplay der humanen Proteinkinase CK2 und Entwicklung eines Verfahrens zur Inhibitionstestung. Logos, Berlin, 164 S.
- Hatori, M., Ohki, K., Hirano, S., Yang, X.P., Kuboki, H., Abe, C., (2008). Effects of a casein hydrolysate prepared from *Aspergillus oryzae* protease on adjuvant arthritis in rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 72 (8), 1983–1991.
- Holton, T.A., Vijayakumar, V., Dallas, D.C., Guerrero, A., Borghese, R.A., Lebrilla, C.B., German, J.B., Barile, D., Underwood, M.A., Shields, D.C., Khaldi, N., (2014). Following the digestion of milk proteins from mother to baby. *Journal of proteome research* 13 (12), 5777–5783.
- Hvatum, M., Kanerud, L., Hallgren, R., Brandtzaeg, P., (2006). The gut-joint axis: cross reactive food antibodies in rheumatoid arthritis. *Gut* 55 (9), 1240–1247.
- Jacobsson, L.T.H., Jacobsson, M.E., Askling, J., Knowler, W.C., (2003). Perinatal characteristics and risk of rheumatoid arthritis. *BMJ (Clinical research ed.)* 326 (7398), 1068–1069.
- Jenness, R., Holt, C., (1987). Casein and lactose concentrations in milk of 31 species are negatively correlated. *Experientia* 43 (9), 1015–1018.
- Jennette, J.C., Falk, R.J., Bacon, P.A., Basu, N., Cid, M.C., Ferrario, F., Flores-Suarez, L.F., Gross, W.L., Guillevin, L., Hagen, E.C., Hoffman, G.S., Jayne, D.R., Kallenberg, C.G.M., Lamprecht, P., Langford, C.A., Luqmani, R.A., Mahr, A.D., Matteson, E.L., Merkel, P.A., Ozen, S., Pusey, C.D., Rasmussen, N., Rees, A.J., Scott, D.G.I., Specks, U., Stone, J.H., Takahashi, K., Watts, R.A., (2013): 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* 65 (1), 1–11.
- Jorgensen, A.L., Juul-Madsen, H.R., Stagsted, J., (2010). Colostrum and bioactive, colostrum peptides differentially modulate the innate immune response of intestinal epithelial cells. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 16 (1), 21–30.
- Jose, J., Handel, S., (2003). Monitoring the cellular surface display of recombinant proteins by cysteine labeling and flow cytometry. *Chembiochem* 4 (5), 396–405.

- Jose, J., Meyer, T.F., (2007). The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71 (4), 600–619.
- Kanda, N., Tamaki, K., (1999). Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *The Journal of allergy and clinical immunology* 103 (2 Pt 1), 282–288.
- Kanda, N., Tsuchida, T., Tamaki, K., (1996). Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. *Clinical and experimental immunology* 106 (2), 410–415.
- Karlson, E.W., Lee, I.M., Cook, N.R., Manson, J.E., Buring, J.E., Hennekens, C.H., (1999). A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals. *Arthritis Rheum.* 42 (5), 910–917.
- Karlson, E.W., Mandl, L.A., Hankinson, S.E., Grodstein, F., (2004). Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study. *Arthritis and rheumatism* 50 (11), 3458–3467.
- Karlsson, C., Dehne, T., Lindahl, A., Brittberg, M., Pruss, A., Sittering, M., Ringe, J., (2010). Genome-wide expression profiling reveals new candidate genes associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage* 18 (4), 581–592.
- Levy-Marchal, C., Karjalainen, J., Dubois, F., Karges, W., Czernichow, P., Dosch, H.M., (1995). Antibodies against bovine albumin and other diabetes markers in French children. *Diabetes care* 18 (8), 1089–1094.
- Liao, K.P., Alfredsson, L., Karlson, E.W., (2009). Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology* 21 (3), 279–283.
- Lönnerdal, B., (1997). Effects of milk and milk components on calcium, magnesium, and trace element absorption during infancy. *Physiol. Rev.* 77 (3), 643–669.
- Maddison, S.E., Stewart, C.C., Farshy, C.E., Reimer, C.B., (1975). The relationship of race, sex, and age to concentrations of serum immunoglobulins expressed in international units in healthy adults in the USA. *Bulletin of the World Health Organization* 52 (2), 179–185.

- Malpress, F.H., Seid-Akhavan, M., (1966). Studies on human alpha(s)- and kappa-casein fractions and human caseinoglycomacropeptide. *Biochem. J.* 101 (3), 764–773.
- Manfredsdottir, V.F., Vikingsdottir, T., Jonsson, T., Geirsson, A.J., Kjartansson, O., Heimisdottir, M., Sigurdardottir, S.L., Valdimarsson, H., Vikingsson, A., (2006). The effects of tobacco smoking and rheumatoid factor seropositivity on disease activity and joint damage in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 45 (6), 734–740.
- Mason, T., Rabinovich, C.E., Fredrickson, D.D., Amoroso, K., Reed, A.M., Stein, L.D., Kredich, D.W., (1995). Breast feeding and the development of juvenile rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 22 (6), 1166–1170.
- Mathews, J.D., Whittingham, S., Hooper, B.M., Mackay, I.R., Stenhouse, N.S., (1973). Association of autoantibodies with smoking, cardiovascular morbidity, and death in the Busselton population. *Lancet* 2 (7832), 754–758.
- Maurer, J., Jose, J., Meyer, T.F., (1997). Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179 (3), 794–804.
- Mercier, J.C., Vilotte, J.L., (1993). Structure and function of milk protein genes. *J. Dairy Sci.* 76 (10), 3079–3098.
- Migliore-Samour, D., Jolles, P., (1988). Casein, a prohormone with an immunomodulating role for the newborn? *Experientia* 44 (3), 188–193.
- Obiandu, C., Okerengwo, A.A., Dapper, D.V., (2013). Levels of serum immunoglobulins in apparently healthy children and adults in Port Harcourt, Nigeria. *Nigerian journal of physiological sciences : official publication of the Physiological Society of Nigeria* 28 (1), 23–27.
- Oertelt-Prigione, S., (2012). The influence of sex and gender on the immune response. *Special Issue on Gender, Sex Hormones, Pregnancy and Autoimmunity* 11 (6–7), A479-A485.
- Panush, R.S., (1990). Food induced ("allergic") arthritis: clinical and serologic studies. *The Journal of rheumatology* 17 (3), 291–294.
- Parke, A.L., Hughes, G.R., (1981). Rheumatoid arthritis and food: a case study. *British medical journal (Clinical research ed.)* 282 (6281), 2027–2029.

- Parker, F., Migliore-Samour, D., Floc'h, F., Zerial, A., Werner, G.H., Jollès, J., Casaretto, M., Zahn, H., Jollès, P., (1984). Immunostimulating hexapeptide from human casein: amino acid sequence, synthesis and biological properties. *Eur. J. Biochem.* 145 (3), 677–682.
- Perez-Maceda, B., Lopez-Bote, J.P., Langa, C., Bernabeu, C., (1991). Antibodies to dietary antigens in rheumatoid arthritis--possible molecular mimicry mechanism. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 203 (2-3), 153–165.
- Petermann, K., (2010). Autodisplay von humanen Antigenen als Basis für die beschleunigte Entwicklung von ELISA. Zugl.: Düsseldorf, Univ., Diss., 2010. mbv, Berlin.
- Pikwer, M., Bergstrom, U., Nilsson, J.-A., Jacobsson, L., Berglund, G., Turesson, C., (2009). Breast feeding, but not use of oral contraceptives, is associated with a reduced risk of rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 68 (4), 526–530.
- Pocoví, C., Conesa, C., Barbana, C., Pérez, M.D., Calvo, M., Sánchez, L., (2009). Comparison of the activity of human and bovine milk on two cell lines. *J. Dairy Res.* 76 (3), 308–316.
- Pons-Estel, G.J., Alarcón, G.S., Scofield, L., Reinlib, L., Cooper, G.S., (2010). Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin. Arthritis Rheum.* 39 (4), 257–268.
- Reinhold-Keller, E., Zeidler, A., Gutfleisch, J., Peter, H.H., Raspe, H.H., Gross, W.L., (2000). Giant cell arteritis is more prevalent in urban than in rural populations: results of an epidemiological study of primary systemic vasculitides in Germany. *Rheumatology (Oxford)* 39 (12), 1396–1402.
- Rijnkels, M., (2002). Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7 (3), 327–345.
- Rosenberg, A.M., (1996). Evaluation of associations between breast feeding and subsequent development of juvenile rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 23 (6), 1080–1082.
- Schlegel, H.G., (1992). *Allgemeine Mikrobiologie: 41 Tabellen*, 7th ed. Thieme, Stuttgart [u.a.], XIV, 634 S.

- Schneider, M., Lelgemann, M., Abholz, H.-H., Blumenroth, M., Flügge, C., Gerken, M., Jäniche, H., Kunz, R., Krüger, K., Mau, W., Specker, C., Zellner, M., (2011). Interdisziplinäre Leitlinie Management der frühen rheumatoiden Arthritis: [www.dgrh.de/leitlinien.html](http://www.dgrh.de/leitlinien.html), 3rd ed. SpringerMedizin, Berlin, Heidelberg, New York, NY, X, 155 S.
- Schrander, J.J., Marcelis, C., Vries, M.P. de, van Santen-Hoeufft, H.M., (1997). Does food intolerance play a role in juvenile chronic arthritis? *Rheumatology* 36 (8), 905–908.
- Snir, O., Widhe, M., Hermansson, M., Spee, C. von, Lindberg, J., Hensen, S., Lundberg, K., Engström, A., Venables, P.J.W., Toes, R.E.M., Holmdahl, R., Klareskog, L., Malmström, V., (2010). Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 62 (1), 44–52.
- Steinbüchel, A., (2012). *Mikrobiologisches Praktikum: Versuche und Theorie*, 2nd ed. Springer, Berlin [u.a.], XII, 457 S.
- Thieman, W.J., Palladino, M.A., (2007). *Biotechnologie*. Pearson Studium, München u.a.
- van de Laar, M.A., van der Korst, J.K., (1992). Food intolerance in rheumatoid arthritis. I. A double blind, controlled trial of the clinical effects of elimination of milk allergens and azo dyes. *Annals of the rheumatic diseases* 51 (3), 298–302.
- van Epps, D.E., Bankhurst, A.D., Williams, R.C., (1977). Casein-mediated neutrophil chemotaxis: a parallel between surface binding and chemotaxis. *Inflammation* 2 (2), 115–123.
- Vordenbäumen, S., Braukmann, A., Altendorfer, I., Bleck, E., Jose, J., Schneider, M., (2013). Human casein alpha s1 (CSN1S1) skews in vitro differentiation of monocytes towards macrophages. *BMC Immunol.* 14 (1), 46.
- Vordenbäumen, S., Braukmann, A., Petermann, K., Scharf, A., Bleck, E., Mikecz, A. von, Jose, J., Schneider, M., (2011). Casein  $\alpha$  s1 is expressed by human monocytes and upregulates the production of GM-CSF via p38 MAPK. *J. Immunol.* 186 (1), 592–601.

- Vordenbäumen, S., Saenger, T., Braukmann, A., Tahan, T., Bleck, E., Jose, J., Schneider, M., (2016). Human casein alpha s1 induces proinflammatory cytokine expression in monocytic cells by TLR4 signaling. *Molecular nutrition & food research* 60 (5), 1079–1089.
- Watts, R.A., Mahr, A., Mohammad, A.J., Gatenby, P., Basu, N., Flores-Suarez, L.F., (2015). Classification, epidemiology and clinical subgrouping of antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 30 Suppl 1, i14-22.
- Xu, K., Ling, M.-T., Wang, X., Wong, Y.-C., (2006). Evidence of a novel biomarker, alphas1-Casein, a milk protein, in benign prostate hyperplasia. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 9 (3), 293–297.
- Zhan, Y., Guo, Y., Lu, Q., (2016). Aberrant Epigenetic Regulation in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus and Its Implication in Precision Medicine. *Cytogenetic and genome research* 149 (3), 141–155.

## 8 Anhang

Tabelle 8.1: Übersicht ICD-10-Codes der eingeschlossenen Erkrankungen (DIMDI(2016))

Erkrankungsgruppe	ICD-10-Code	Bezeichnung	
<b>RA</b>	M05.20	Seropositive chronische Polyarthrit	
	M05.80	Sonstige seropositive chronische Polyarthrit mehrerer Lokalisationen	
	M05.9	Seropositive chronische Polyarthrit, nicht näher bezeichnet	
	M06.00	Seronegative chronische Polyarthrit mehrerer Lokalisationen	
	M06.1	Adulte Form der Still-Krankheit	
	M06.8	Sonstige näher bezeichnete chronische Polyarthrit	
	M06.9	Chronische Polyarthrit, nicht näher bezeichnet	
	<b>SLE</b>	M32.1	Systemischer Lupus erythematoses mit Beteiligung von Organen oder Organsystemen
		M32.9	Systemischer Lupus erythematoses, nicht näher bezeichnet
<b>Vaskulitis</b>	M30.0	Panarteriitis nodosa	
	M30.1	Panarteriitis mit Lungenbeteiligung	
	M30.8	Sonstige mit Panarteriitis nodosa verwandte Zustände	
	M31.3	Wegener-Granulomatose mit Polyangiitis, nekrotisierende Granulomatose der Atemwege	
	M31.4	Aortenbogen-Syndrom (Takayasu-Syndrom)	
	M31.5	Riesenzellarteriitis bei Polymyalgia rheumatica	
	M31.7	Mikroskopische Polyangiitis	
	M31.9	Nekrotisierende Vaskulopathie, nicht näher bezeichnet	

## 8.1 Patienten-Fragebogen

### Fragebogen: Bedeutung von Milch-Antikörpern bei entzündlich rheumatischen Erkrankungen

1. LFNE/ Barcode/Name

2. Geschlecht:

- weiblich  
 männlich

3. Ihr Körpergewicht: \_\_\_\_\_ kg

4. Ihre Körpergröße: \_\_\_\_\_ cm

5. Rauchen Sie?

- Täglich  
 Ja  
 Früher  
 Nie

Wenn ja:

\_\_\_\_\_ Päckchen pro Tag  
Seit \_\_\_\_\_ Jahren

Wenn früher, wann haben Sie aufgehört?

\_\_\_\_\_

6. Ist bei Ihnen eine rheumatische Erkrankung bekannt?

- Rheumatoide Arthritis  
 SLE (Systemischer Lupus erythematodes)  
 Vaskulitis  
 Keine

7. Wenn ja, in welchem Alter wurde die Diagnose gestellt? \_\_\_\_\_

8. Nehmen Sie regelmäßig Medikamente ein?

- Ja  
 Nein

9. Sind Sie selber gestillt worden?

- Ja  
 Nein  
 Weiß ich nicht

10. Wissen Sie, wie lange Sie gestillt wurden?

- Ja, 0-1 Monat  
 Ja, 2-3 Monate  
 Ja, 4-6 Monate  
 Ja, > 6 Monate  
 Nein

11. Wie viele Kinder haben Sie?

- Keine Kinder  
 1 Kind  
 2 Kinder  
 3 Kinder  
 > 3 Kinder

**Wenn Sie keine leiblichen Kinder haben, machen Sie bitte mit Frage 24 weiter.**

12. In welchem Jahr sind Ihre Kinder geboren?

1. Kind: \_\_\_\_\_  
2. Kind: \_\_\_\_\_  
3. Kind: \_\_\_\_\_  
4. Kind: \_\_\_\_\_  
Weitere Kinder: \_\_\_\_\_

13. Sind Ihre Kinder gesund?

- Ja  
 Nein

14. Wenn nein, unter welchen Erkrankungen leiden Ihre Kinder?

- Herzerkrankungen
- Bluthochdruck
- Diabetes
- Lungenerkrankungen
- Hauterkrankungen
- Rheumatische Erkrankungen
- Autoimmunerkrankungen
- Weiß ich nicht
- Andere Erkrankungen: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Wenn Sie männlich sind, machen Sie bitte mit Frage 26 weiter.**

15. Sind Sie zurzeit schwanger?

- Ja
- Nein
- Weiß ich nicht

**Wenn Sie nicht schwanger sind, machen Sie bitte mit Frage 20 weiter.**

16. In der wievielten Schwangerschaftswoche sind Sie?

\_\_\_\_\_ Schwangerschaftswoche

17. Ihre wievielte Schwangerschaft ist es?  
\_\_\_\_\_ Schwangerschaft

18. Verläuft Ihre Schwangerschaft bisher ohne Probleme?

- Ja
- Nein

19. Wenn Nein, welche Probleme sind aufgetreten?

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

20. Wie viele Schwangerschaften hatten Sie (vor der jetzt bestehenden)?

- Keine
- 1
- 2
- 3
- > 3

21. Gab es bei Ihren Schwangerschaften Probleme?

- Ja
- Nein

22. Wenn ja, welche:

Bei	Kind 1	Kind 2	Kind 3	Weitere Kinder
Frühgeburt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Zu geringes Geburtsgewicht	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nicht geplanter Kaiserschnitt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bluthochdruck in der Schwangerschaft	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Diabetes in der Schwangerschaft	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vorzeitige Wehentätigkeit	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fehlbildung des Kindes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Andere Probleme	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

23. Wie lange haben Sie Ihre Kinder gestillt?

- Kind 1:
- Gar nicht
  - 0-1 Monat
  - 2-3 Monate
  - 4-6 Monate
  - > 6 Monate
  - Ja habe ich, aber ich weiß nicht wie lange

Kind 2:

- Gar nicht
- 0-1 Monat
- 2-3 Monate
- 4-6 Monate
- > 6 Monate
- Ja habe ich, aber ich weiß nicht wie lange

Kind 3:

- Gar nicht
- 0-1 Monat
- 2-3 Monate
- 4-6 Monate
- > 6 Monate
- Ja habe ich, aber ich weiß nicht wie lange

Kind 4:

- Gar nicht
- 0-1 Monat
- 2-3 Monate
- 4-6 Monate
- > 6 Monate
- Ja habe ich, aber ich weiß nicht wie lange

Weitere Kinder: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

24. Haben Sie irgendwann mal die Pille eingenommen?

- Ja
- Nein

25. Wenn ja, wie lange insgesamt?

- 0-5 Jahre
- 6-10 Jahre
- 11-15 Jahre
- > 15 Jahre

26. Ist bei Ihnen eine Nahrungsmittelunverträglichkeit bekannt?

- Ja
- Nein

27. Wenn ja, gegen welche Nahrungsmittel?

- Laktose
- Milcheiweiß
- Milchprodukte
- Ei
- Weizen
- Gluten
- Nüsse
- 

Andere: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Vielen Dank, dass Sie an unserer Umfrage teilgenommen haben.

Bei Fragen wenden Sie sich bitte an

1. Nicola Spliethoff, Tel.: 0211-811-7817  
E-Mail: Nicola.Spliethoff@uni-duesseldorf.de  
oder
2. Dr. Stefan Vordenbäumen, Tel: 0211-811-7845,  
E-Mail: stefan.vordenbaeumen@med.uni-duesseldorf.de

**Informationen aus Kerndatenerfassung:**

1. Rauchanamnese:

- Täglich
- Ja
- Früher
- Nie

Wenn ja:

\_\_\_\_\_ Päckchen pro Tag  
Seit \_\_\_\_\_ Jahren

Wenn früher, wann haben Sie aufgehört?

\_\_\_\_\_

2. Bildungsabschluss:

- Abitur
- Mittlere Reife
- Fachhochschulreife
- Hauptschulabschluss
- Universitätsabschluss
- Abgeschlossene Berufsausbildung
- Keinen Schulabschluss

3. Rheumatische Erkrankung

- Keine
- Rheumatoide Arthritis
- Spondyloarthritis
- Morbus Bechterew
- Morbus Wegener
- Sonstige Vaskulitis
- SLE
- Myositis
- Sjögren-Syndrom
- Systemische Sklerose
- Andere Erkrankungen: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

4. Nebendiagnosen:

- Adipositas
- Anämie, normo-/mikro-/makrozytär,
- chron. Atemwegs-/Lungenerkrankungen
- Augenerkrankungen

- Depressionen/psychische Erkrankungen
- Fettstoffwechselstörungen
- chron. Schmerzsyndrom/Fibromyalgie
- Gallenwegserkrankungen
- Gastritis/Ulkusanamnese
- degenerative Gelenkerkrankungen
- Hypercholesterinämie/Fettstoffwechselstörungen
- art. Hypertonie
- chron. Lebererkrankungen
- Lungenerkrankungen
- Lymphom
- andere chron. Magen-/Darmerkrankungen
- Migräne
- maligne Neoplasie
- Neoplasie
- ausschließlich Lymphom
- chron. Nierenerkrankungen
- Osteoporose
- Osteoporose, manifest mit Fraktur
- Osteopenie
- Psoriasis
- Rheumaknoten
- Schilddrüsenerkrankungen
- Schlaganfall/Durchblutungsstörung des Gehirns
- Sjögren-Syndrom
- Tumorerkrankung
- periphere art. Verschlusskrankheit
- degenerative Wirbelsäulenverletzung/Bandscheibenvorfall
- Sonstige Erkrankungen: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Bei positiver Medikamentenanamnese:**

5. Cortisoneinnahme:

- Ja
- Nein

Name des Präparates: \_\_\_\_\_

Dosis: \_\_\_\_\_ (mg/Tag)

**Weitere Medikamenteneinnahme:**

	Morgens	Mittags	Abends
Gerinnungshemmer (z. B. Clopidogrel)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ASS®	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Marcumar®	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Osteoporose- Medikament( z.B. Pamidronat)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Blutdruck- und Herzmedikamente	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schmerzmittel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hormone	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pille	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cholesterin- senkende Medikamente (z. B. Statine)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Psychopharmaka	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Medikamente gegen Epilepsie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Magenschutz- Medikamente (z.B. Pantozol®)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hautmittel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Alternative Medikamente (Homöopathie, Vitamine)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Abb. 8.1: Patienten-Fragebogen**

## 9 Danksagung

Zunächst bedanke ich mich besonders bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Schneider, der mir durch die Zuteilung meines Themas sowohl sein Vertrauen als auch seine permanente Unterstützung zu Teil werden ließ. Ich konnte mich immer auf seine Unterstützung und konstruktive Kritik verlassen.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Jose, der mich während meiner praktischen Tätigkeiten in seinem Labor im Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie in Münster herzlich willkommen hieß.

Ebenso bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. med. Stefan Vordenbäumen, der mich als mein direkter Betreuer während der gesamten Zeit immer unterstützt hat und mir stets eine große Hilfe war.

Bei Ellen Bleck möchte ich mich besonders bedanken. Ohne ihre Hilfe und Einweisung in die korrekte und effiziente Laborarbeit wäre meine praktische Arbeit kaum möglich gewesen. Des Weiteren hatte sie immer ein offenes Ohr für alle fachlichen Probleme und stets einen guten Ratschlag parat.

Vielen Dank an Herrn Dr. Achim Braukmann, der mich in meine praktische Laborarbeit in Münster eingearbeitet hat und mich bei der Versuchsdurchführung tatkräftig unterstützte.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Bertan Bopp bedanken, der mir bereits in Münster eine große Unterstützung bei der Umsetzung meiner Versuche war und auf den ich mich bis heute verlassen kann.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Medizinstudium und damit die Durchführung dieser Promotion ermöglicht haben. Dabei motivierten sie mich stets und brachten mir ihr uneingeschränktes Vertrauen und Unterstützung entgegen.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinem Ehemann Simon, ohne dessen Unterstützung und Ermutigung, diese Arbeit wohl nicht erstellt worden wäre und keinen Abschluss gefunden hätte.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen Studienteilnehmerinnen und –teilnehmern, ohne die diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.