

Aus der Poliklinik und Funktionsbereich für Rheumatologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
k. Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. M. Schneider

**Einfluss nutritiver Methylendonatoren auf die CD40L-Methylierung
von T-Zellen und die Krankheitsaktivität bei Patientinnen mit
systemischem Lupus**

Dissertation

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

vorgelegt von

Alexander Sokolowski

2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Stefan Vordenbäumen

Zweitgutachter: PD. Dr. rer. nat. Rüdiger Sorg

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

1. Vordenbäumen S, Sokolowski A, Kutzner L, Rund KM, Düsing C, Chehab G, Richter JG, Brinks R, Schneider M, Schebb NH. Erythrocyte membrane polyunsaturated fatty acid profiles are associated with systemic inflammation and fish consumption in systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. *Lupus*. 2020 May;29(6):554-559. doi: 10.1177/0961203320912326. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32188303.
2. Vordenbäumen S, Rosenbaum A, Gebhard C, Raithel J, Sokolowski A, Düsing C, Chehab G, Richter JG, Brinks R, Rehli M, Schneider M. Associations of site-specific CD4⁺-T-cell hypomethylation within CD40-ligand promotor and enhancer regions with disease activity of women with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2021 Jan;30(1):45-51. doi: 10.1177/0961203320965690. Epub 2020 Oct 20. PMID: 33081589.
3. Vordenbäumen S, Sokolowski A, Rosenbaum A, Gebhard C, Raithel J, Düsing C, Chehab G, Richter JG, Brinks R, Rehli M, Schneider M. Methyl donor micronutrients, CD40-ligand methylation and disease activity in systemic lupus erythematosus: A cross-sectional association study. *Lupus*. 2021 Jul 02. PMID: 34284675.

Zusammenfassung Deutsch

Einfluss nutritiver Methylendonatoren auf die *CD40L*-Methylierung von T-Zellen und die Krankheitsaktivität bei Patientinnen mit systemischem Lupus erythematodes

Ziel der Arbeit:

Den Einfluss der Ernährung auf die Methylierung von CD40L in T-Zellen sowie auf die Krankheitsaktivität von Patientinnen mit systemischem Lupus erythematodes (SLE) darzustellen.

Hintergrund: Hypomethylierung des CD40L ist mit einer erhöhten Krankheitsaktivität bei SLE-Patientinnen assoziiert. Daher wurden mögliche Assoziationen von Methylendonatoren (u.a. Methionin, Cholin, Cystein) mit dem Methylierungsstatus von CD40L erforscht.

Methoden:

Patientinnen mit SLE aus der rheumatologischen Ambulanz der Universitätsklinik Düsseldorf erhielten einen vom Robert-Koch-Institut validierten Fragebogen zur standardisierten Erfassung der Ernährungsgewohnheiten. Neben Dokumentation der Krankheitsaktivität (u.a. SLEDAI) und von Organbeteiligungen wurden Vitamin B6 und Homocystein als Biomarker für Methylendonatoren der Ernährung bestimmt.

Die Methylierung des CD40L Promotors und von *Enhancer*-Regionen in T-Zellen wurde mittels Epityper durch Kooperationspartner in Regensburg bei 61 weiblichen SLE Patientinnen bestimmt. Folgende Hypothesen werden in der Arbeit überprüft:

1. Der anhand eines Fragebogens zur Häufigkeit der Nahrungsaufnahme ermittelte Verzehr ausgewählter Nährstoffe (Vit. D, Vit. B6 und Cholesterin) entspricht den Blutwerten der jeweiligen Nährstoffe
2. Die Krankheitsaktivität bei SLE Patienten ist von der Methylierung des CD40-Liganden in T-Zellen abhängig.
3. Die Methylierung der T-Zell-DNA des CD40-Liganden ist mit einer methylendonatorenreichen Ernährung, erfasst an einem Fragebogen und mittels im Blut ermittelten Biomarkern, assoziiert.

4. Die Krankheitsaktivität bei Patienten mit methylendonatorenreicher Ernährung ist geringer, als bei Patienten mit methylendonatorenarmer Ernährung.
5. Durch den Ernährungsfragebogen des Robert-Koch-Institutes lassen sich Nahrungsbestandteile identifizieren, welche eine Methylierung begünstigen.

Ergebnisse:

Es wurden 61 Frauen im Alter von 45.7 ± 12.0 Jahren mit einer durchschnittlichen Krankheitsdauer von $16,24 \pm 8,44$ Jahren eingeschlossen. Cholin (g/d) ist assoziiert zur mittleren CD40L-Methylierung ($\beta = 1,68$; $p = 0,04$). Cystein (g/d) als Substrat für Homocystein und das Antioxidans Glutathion ist assoziiert zur mittleren CD40L-Methylierung ($\beta = 4,34$; $p = 0,02$) und an CpG17 ($\beta = 2,38$; $p = 0,02$). Methionin (g/d) ist zur mittleren CD40L-Methylierung ($\beta = 9,49$; $p = 0,043$) und an CpG17 ($\beta = 4,98$; $p = 0,043$) assoziiert. Die Katalysatoren Vitamin B6 und B12 sind weder durch den ermittelten Gehalt durch den Fragebogen (VitB6: $p = 0,72$; VitB12: $p = 0,16$), noch durch den Gehalt im Blut (VitB6: $p = 0,86$) assoziiert zur CD40L-Methylierung.

Es bestätigt sich ferner, dass die Krankheitsaktivität mit Hypomethylierungen an CpG17 ($\beta = -32,57$; $p = 0,035$) und CpG22 ($\beta = -38,28$; $p = 0,004$) des CD40L bei Frauen mit SLE assoziiert ist (Vordenbaumen et al., 2021).

Die Nahrungsmittel (Portion/Tag) mit der stärksten signifikanten Assoziation zur mittleren Methylierung sind Fleisch ($\beta = 0,025$; $p = 0,038$), Eiscreme ($\beta = 0,063$; $p = 0,009$), für CpG22 Weißbrot ($\beta = 0,03$; $p = 0,036$) und für CpG17 gekochte Kartoffeln ($\beta = 0,062$; $p = 0,005$).

Generell stimmten die ermittelten Werte aus den Fragebögen und Messwerte im Blut für die Fettsäuren (PUFA: $p = 0,63$; MUFA: $p = 0,55$, SFA: $p = 0,075$), Vitamin B6 ($p = 0,55$), Vitamin D ($p = 0,58$) und Cholesterol ($p = 0,62$) nicht gut überein.

Schlussfolgerungen:

1. Der Konsum von Methionin, Cholin, Cystein ist bei Frauen mit SLE mit einer höheren Methylierungsrate von CD40L in T-Zellen assoziiert.
2. Hypomethylierungen an den Stellen CpG 17 und CpG 22 des CD40L sind bei Frauen mit SLE mit einer erhöhten Krankheitsaktivität assoziiert.

3. Nahrungsmittel mit den stärksten Assoziationen zu höherer Methylierungsrate sind Fleisch, Eiscreme, Weißbrot und gekochte Kartoffeln. Vitamin B6 und B12 zeigten keine Assoziationen zur CD40L T-Zell-Methylierung.
4. Fragebogen und Messwerte stimmen für ausgewählte Marker (Vit D, Vit B6, Cholesterol) nicht gut überein. Vorsicht ist bei der Verwendung von Abschätzungen der Ernährung aus Fragebögen geboten.

Zusammenfassung Englisch

Impact of nutritive methyl donors on T-cell *CD40L* methylation and disease activity in female patients with systemic lupus erythematosus

Objective:

To explore the impact of diet on T-cell CD40L methylation and disease activity in systemic lupus erythematosus (SLE).

Background: Hypomethylation of CD40L is associated with increased disease activity in SLE patients. Therefore, possible associations of methyl donors (including methionine, choline, cysteine) and the methylation status of CD40L were explored.

Methods:

Female SLE patients from the rheumatology outpatient clinic of University-Hospital Düsseldorf received a validated questionnaire to assess dietary habits. In addition to standardized routine measures to document disease activity (including SLEDAI) and organ involvement, vitamin B6 and homocysteine were determined as biomarkers to detect dietary methyl donors.

Methylation of the CD40L promoter and *enhancer* regions in T cells were determined using epityper by collaborators in Regensburg in a subset of 61 female SLE patients. The following hypotheses were addressed:

1. Nutritional consumption of selected nutrients (Vit. D, Vit. B6 and cholesterol) as determined by a food frequency questionnaire corresponds to blood levels of the respective nutrients.
2. SLE disease activity is associated to the methylation status of CD40L at distinct CpG sites within CD4 T-cells.
3. T-cell DNA methylation of CD40 ligand is associated with a high-methylation supplemented diet (measured by questionnaire and blood-derived biomarkers).
4. Disease activity in SLE-patients on a high-methylation supplemented diet is lower than in patients on a low-methylation diet.
5. According to the Robert Koch Institute dietary questionnaire, there are dietary components that promote methylation.

Results:

Sixty-one women at the age of 45.7 ± 12.0 years with a mean disease duration of 16.24 ± 8.44 years were included. Choline (g/d) is associated to mean CD40L methylation ($\beta = 1.68$; $p = 0.04$). Cysteine (g/d) as a substrate for homocysteine and the antioxidant glutathione is associated to mean CD40L methylation ($\beta = 4.34$; $p = 0.02$) and with CpG17 ($\beta = 2.38$; $p = 0.02$). Methionine (g/d) is associated with mean CD40L myelination ($\beta = 9.49$; $p = 0.043$) and at CpG17 ($\beta = 4.98$; $p = 0.043$). The catalyst-vitamins B6 and B12 are not associated with CD40L methylation either by the determined level by the questionnaire (VitB6: $p = 0.72$; VitB12: $p = 0.16$), or by the blood level (VitB6: $p = 0.86$).

It is further confirmed that disease activity is associated with hypomethylation at CpG17 ($\beta = -32.57$; $p = 0.035$) and CpG22 ($\beta = -38.28$; $p = 0.004$) of CD40L in women with SLE.

The foods (serving/day) with the strongest significant association to mean methylation consisted in meat ($\beta = 0.025$; $p = 0.038$), ice cream ($\beta = 0.063$; $p = 0.009$), in case of CpG22 white bread ($\beta = 0.03$; $p = 0.036$), and in case of CpG17 cooked potatoes ($\beta = 0.062$; $p = 0.005$).

In general, the determined values from the questionnaires and measured values in blood for fatty acids (PUFA: $p = 0.63$; MUFA: $p = 0.55$, SFA: $p = 0.075$), vitamin B6 ($p = 0.55$), vitamin D ($p = 0.58$) and cholesterol ($p = 0.62$) did not agree well.

Conclusions:

1. Consumption of methionine, choline, cysteine is associated with increased methylation of CD40L in T-cells in women with SLE.
2. Hypomethylation at CpG 17 and CpG 22 sites of CD40L in T-cells is associated with increased disease activity in women with SLE.
3. Foods with the strongest association with increase methylation at CD40L are meat, ice cream, white bread, and cooked potatoes. Vitamin B6 and B12 showed no association with CD40L T-cell methylation.
4. Questionnaire values and measured values (Blood) do not agree well for selected markers (Vit D, Vit B6, cholesterol).

Abkürzungsverzeichnis

ACLE.....	<i>Akuter kutaner Lupus erythematoses</i>
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ANA.....	<i>Antinukleäre Antikörper</i>
APC.....	<i>Antigen-präsentierende Zellen</i>
AWMF	<i>Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften</i>
BMI.....	<i>Body-Mass-Index</i>
CD40L.....	<i>Cluster of Differentiation-40-Ligand</i>
CRP.....	<i>C-reaktives Protein</i>
DEGS	<i>Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland</i>
DLE.....	<i>Diskoider lupus erythematoses</i>
DNMT.....	<i>DNA-Methyltransferasen</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FFQ.....	<i>Food Frequency Questionnaires</i>
GPL.....	<i>IgG Phospholipid Units</i>
GSH	<i>Glutathion</i>
GSSG.....	<i>oxidierte Form des GSH</i>
HAT.....	<i>Histonacetyltransferase</i>
HCQ	<i>Hydroxychloroquin</i>
HDAC.....	<i>Histondeacetylase</i>
HDL.....	<i>High-density lipoprotein</i>
HMT	<i>Histonmethyltransferasen</i>
HUFA	<i>Highly unsaturated fatty acids</i>
IRF1	<i>Interferon regulierender Faktor 1</i>
MAT1	<i>Methionin-Adenosyltransferase</i>
MHC II.....	<i>Haupthistokompatibilitätskomplex II</i>
MR	<i>Transmethylation micronutrient-restricted</i>
MS.....	<i>Transmethylation micronutrient-supplemented</i>
MTX	<i>Methotrexat</i>
MUFA.....	<i>Monounsaturated fatty acids</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids</i>
RKI	<i>Robert-Koch-Institut</i>
SAH.....	<i>S-Adenosylhomocystein</i>
SAM	<i>S-Adenosylmethionin</i>
SCLE.....	<i>Subakut-kutaner lupus erythematoses</i>
SFA.....	<i>Saturated fatty acids</i>
SLE	<i>Systemischer Lupus erythematoses</i>
SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
SSR.....	<i>Standardisierte Sterblichkeitsrate</i>
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Definition des Lupus erythematodes	1
1.2. Epidemiologie und Mortalität	1
1.3. Symptome und Diagnostik	2
1.4. Therapie	4
1.5. Ätiologie und Pathophysiologie	5
1.5.1. Umweltfaktoren	5
1.5.1.1. UV-Licht / Infektionen	5
1.5.1.2. Östrogene	6
1.5.1.3. Rauchen	6
1.5.1.4. Vitamin D	7
1.5.1.5. Ernährung	8
1.5.2. Genetische Prädisposition	10
1.5.3. Epigenetik und epigenetische Modifikationen	11
1.6. Methylierung und C1-Stoffwechsel	12
1.6.1. Vitamin B2, B6, B9 (Folat) und B12	15
1.6.2. Methionin	15
1.6.3. Cholin und Folat	16
1.6.4. GSH (Glutathion) / Cystein / Glycin	16
1.6.5. Fettsäuren	17
1.7. Acetylierung	18
1.8. CD40 Ligand in T-Lymphozyten bei SLE	19
1.9. Erfassung von Ernährungsgewohnheiten	20
1.10. Ziele der Arbeit	20
2. Material und Methoden	22
2.1. Studiendesign	22
2.2. Patientenauswahl	22
2.3. Datenmanagement	23
2.3.1. Anonymisierung, Pseudonymisierung und Verblindung	23
2.3.2. Datensatz und Variablen	24
2.4. Studienablauf	24
2.5. Score zur Erfassung der Krankheitsaktivität	25
2.6. Robert-Koch-Institut-Fragebogen/DEGS-Fragebogen zur Bestimmung der Ernährungsgewohnheiten	26
2.6.1. Aus dem Fragebogen ermittelte Variablen	27
2.6.2. Anpassung der Rohdaten des Fragebogens und die Berechnung des Nährstoffkonsums	30
2.7. Blutproben und ermittelte Parameter	33
2.7.1. Methylierung des CD40L in CD4+ T-Zellen	34
2.8. Referenzwerte – Empfohlene Tagesdosis	35
2.9. Statistische Auswertung	36
3. Ergebnisse	38
3.1. Patienten	38
3.2. Beantwortung der Fragestellungen	39
3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse	49
4. Diskussion	52
5. Literatur- und Quellenverzeichnis	59
6. Anhang	73
6.1. Anpassung der Fragebogenantworten zur Berechnung der jeweiligen Nährstoffwerte in „Menge in Einheit / Tag“, sowie zur Verrechnung mit den Nährstoffangaben aus Tabelle 2-2.	73

6.2. Bestimmung der Nährstoffaufnahme eines einzelnen Patienten anhand des Fragebogens _____	76
6.3. Quellenangabe zu den ermittelten Nährstoffangaben in Tabelle 2-2., sowie Angaben zu Dichtenumrechnungen zur Anpassung der Daten an die oben genannten Rechenschritte bzw. Tabellenumformungen _____	78
6.4. Identifikation der relevanten Fragen im RKI-Fragebogen zur Ermittlung von Methylierungsmarkern _____	81
6.5. Analyse einer möglichen Assoziation der Hauptlieferanten für Methionin, Cholin und Cystein mit der Methylierung an der CD40L-DNA (global, CpG17, CpG22) _____	83
6.6. Analysierte CD40L Promotor und <i>Enhancer</i> Regionen _____	86
7. Danksagung _____	

1. Einleitung

1.1. Definition des Lupus erythematodes

Der Systemische Lupus erythematodes (SLE) ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen. Charakteristischerweise können bei nahezu allen Patienten Autoantikörper gegen Zellkerne nachgewiesen werden. Prinzipiell kann jedes Organ potentiell von der Erkrankung befallen sein (Rahman and Isenberg, 2008). Häufige aber unspezifische Begleitsymptome sind Fieber, Myalgien, Arthralgien, Kopfschmerzen und der Verlust von Appetit und Gewicht, spezifischere Symptome sind z.B. verschiedene Formen des kutanen Lupus und verschiedene Organbeteiligungen wie z.B. Beschwerden durch eine Lupusnephritis, Jaccoud-Arthritis etc. (Cojocaru et al., 2011).

1.2. Epidemiologie und Mortalität

In Europa beträgt die Prävalenz 24-90 Fälle pro 100.000 Einwohner (Danchenko et al., 2006). Der Altersgipfel des Erkrankungsbeginns zeigt sich zwischen 20 bis 40 Jahren (D'Cruz et al., 2007). Insgesamt zeigt sich eine deutlich häufigere Manifestation des weiblichen Geschlechts, mit einem Verhältnis (♀: ♂) von 4:1 (Brinks et al., 2014) in Deutschland. Ein Verhältnis von über 9:1 zeigte sich in multikulturellen Wohngebieten wie zum Beispiel in Manhattan (USA). Ebenfalls findet sich hier eine deutlich erhöhte Prävalenz in der nicht-weißen Bevölkerung (Izmirly et al., 2017).

Im Verlauf der letzten Jahrzehnte hat die Mortalität durch bessere Therapie, sowie Verständnis der Erkrankung stetig abgenommen. In einer Metaanalyse aus dem Jahr 2012 (Mak et al., 2012) wird von einem „signifikantem Anstieg von 74,8% auf 94,8% in der 5-Jahres-, sowie von 63,2% auf 91,4% in der 10-Jahres-Überlebensrate“ berichtet ($p < 0,001$).

Die standardisierte Sterblichkeitsrate (SSR) gibt das Verhältnis von Toden in einer Kohorte im Vergleich zu den erwarteten Toden in gleich große Kohorte der Allgemeinbevölkerung an. In einer aus dem Jahr 2016 durchgeführten Metaanalyse (Lee et al., 2016) wurde eine aktuell generelle signifikant erhöhte

SSR von 2,6 für SLE-Patienten im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung aufgezeigt. Hierbei lassen sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede nachweisen. In einer ursachenspezifische Analyse zeigten Lee et al. unterschiedliche SSR bei verschiedenen Todesursachen von SLE-Patienten (Nierenerkrankungen: 4,689, Kardiovaskuläre Erkrankungen: 2,253, Herzerkrankungen: 2,285, Infektionen: 4,98). Insgesamt ergibt sich also eine deutlich erhöhte Mortalität bei SLE.

1.3. Symptome und Diagnostik

Der SLE zeichnet sich bei Erkrankungsbeginn sowie im Verlauf durch eine hohe Variabilität von Symptomen mit verschiedenen möglichen Organbeteiligungen ab. Einen guten Überblick diesbezüglich liefert das ACR/EULAR-Klassifikationssystem.

In einer gemeinsamen Initiative haben die Amerikanische rheumatologische Fachgesellschaft *American College of Rheumatology* (ACR) und die Europäische Fachgesellschaft *European League Against Rheumatism* (EULAR) kürzlich ein neues ACR/EULAR-Klassifikationssystem entwickelt (Aringer et al., 2019), (AWMF S2k-Leitlinie Lupus erythematoses):

Die Klassifikation kann erfolgen, wenn ein Summenscore von ≥ 10 Punkten erreicht wird. Voraussetzung für die Klassifikation ist ein positiver Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA Hep2-IFT $\geq 1:80$ oder oberhalb des Normwertes des jeweiligen Labors). Hierbei ist ein einmaliger Nachweis ausreichend.

Zusätzlich müssen folgende Kriterien beachtet werden:

- Ein Kriterium wird nicht gewertet, wenn eine andere, wahrscheinlichere Ursache zugrunde liegt (z.B. Infektion, Neoplasie, Medikamente oder eine andere Erkrankung).
- Ein Kriterium ist erfüllt, wenn es einmalig vorgekommen und dokumentiert ist.
- Kriterien müssen nicht gleichzeitig vorliegen.
- Es muss jedoch mindestens ein Kriterium aktuell vorhanden sein.

- Innerhalb jeder Domäne geht nur der höchste Score in den Gesamtscore ein.

Tabelle 1-1. Typ 1 und Typ 2 Manifestationen des Systemischen Lupus erythematoses
vgl.: AWMF S2k-Leitlinie Lupus erythematoses, (Aringer et al., 2019)

Klinische Domäne und Kriterien		Punkte
Konstitutionelle Symptome	Fieber	2
Haut	nicht vernarbende Alopezie	2
	orale Ulzera	2
	subakut-kutaner (SCLE) oder diskoider LE (DLE)	4
	akuter kutaner LE (ACLE)	6
Arthritis	Synovitis in ≥ 2 Gelenken oder Druckschmerz in ≥ 2 Gelenken + Morgensteifigkeit ≥ 30 min.	6
Neurologie	Delirium	2
	Psychose	3
	Krampfanfälle	5
Serositis	Pleura- oder Perikarderguss	5
	Akute Perikarditis	6
Hämatologie	Leukopenie	3
	Thrombopenie	4
	Autoimmunhämolyse	4
Nieren	Proteinurie $> 0,5$ g/24h	4
	Lupusnephritis (histologisch) Typ II, V	8
	Lupusnephritis (histologisch) Typ III, IV	10
Immunologische Domänen und Kriterien		
Antiphospholipid-Antikörper	Anticardiolipin-Antikörper: > 40 GPL oder Beta-2-Glykoprotein I : > 40 GPL oder Lupus-Antikoagulans: +	2
Komplement	C3 oder C4 vermindert	3
	C3 und C4 vermindert	4
Hochspezifische Auto-AK	anti-ds-DNA-AK oder anti-Sm-AK	6

Bei einem erreichten Score von 10 oder mehr Punkten bieten die EULAR/ACR-Kriterien eine Sensitivität von 98% sowie eine Spezifität von 97% zur Diagnosestellung eines SLE.

1.4. Therapie

Die Therapie des systemischen Lupus erythematoses orientiert sich grundsätzlich an der jeweiligen Organbeteiligung sowie der Schwere der Beteiligung unter Risiko-Nutzenabwägung (Fanouriakis et al., 2019). Im Folgenden werden die gebräuchlichsten Therapien kurz beschrieben.

Als Basistherapie ist Hydroxychloroquin (HCQ) wegen stabilisierender Eigenschaften auf den Krankheitsverlauf unter anderem bezüglich zu Endorganschäden empfohlen (Alarcón et al., 2007, Ponticelli and Moroni, 2017). Häufig werden zudem zur Symptomkontrolle Steroide eingesetzt, um aktivere Krankheitsphasen zu überbrücken (Basta et al., 2020). Ein Langzeitgebrauch führt jedoch durch Nebenwirkungen zu permanenten Schäden an verschiedenen Organsystemen (Zonana-Nacach et al., 2000). Ansonsten können Immunsuppressiva durch ihre immunmodulatorische Wirkung ein schnelleres Absetzen bzw. eine schnellere Reduktion der Glukokortikoidgabe erlauben. Bei Patienten mit schlechter Symptomkontrolle unter HCQ- und Glukokortikoidgabe wird häufig die Gabe von Methotrexat (MTX) und Azathioprin erwogen (Fanouriakis et al., 2019). Zudem können Calcineurininhibitoren und Tacrolimus zusätzlich in Erwägung gezogen werden (Parikh et al., 2020). Cyclophosphamid ist das Mittel der Wahl bei neuropsychiatrischen oder bei organgefährdender Ausprägung des SLE. (Ugarte-Gil et al., 2015). Das Profil der Nebenwirkungen der konventionellen Immunsuppressiva besteht aus der Ausprägung von Infektionen, Malignomen, der Teratogenität und Infertilität und letztendlich Organschäden und erhöhten Mortalität (Basta et al., 2020). Durch verbessertes Verständnis der Pathogenese des SLE werden aktuell auch biologische Wirkstoffe (*biologic agents*) entwickelt, welche spezifische an der Pathogenese beteiligte Signalkaskaden beeinflussen können. Durch B-Zell-Depletion konnten diesbezüglich Rituximab (Merrill et al., 2010) und Belimumab (Furie et al., 2011) als monoklonale Antikörper positive Auswirkungen in Bezug auf die Symptomlast und Krankheitsaktivität aufweisen (Strand et al., 2014). Sie werden bereits in der Klinik angewandt, andere Wirkstoffe werden aktuell noch entwickelt oder befinden sich in der Phase klinischer Studien.

1.5. Ätiologie und Pathophysiologie

Eine heterogene Ausprägung, sowie die oben beschriebenen epidemiologischen Unterschiede des SLE weisen auf eine multifaktorielle Genese der Erkrankung hin (Finzel et al., 2018): Beim SLE scheint eine genetische und epigenetische Prädisposition zu bestehen. Zudem können Umweltfaktoren (Gergianaki et al., 2019, Zandman-Goddard et al., 2012) und Hormone (Petri, 2008, McMurray and May, 2003) sowohl die Ausprägung, als auch die Genese der Krankheit selbst stark beeinflussen. Im Folgenden werden diese beiden Säulen näher betrachtet.

1.5.1. Umweltfaktoren

Im Jahr 1992 wurde in einer Lupus-Zwillingsstudie aufgewiesen, dass nicht nur genetische Faktoren, sondern auch Umweltfaktoren eine große Rolle in der Ausprägung und beim Auftreten der Erkrankung spielen: Monozygote Zwillinge waren viel häufiger gemeinsam von der Erkrankung betroffen als dizygoten Zwillinge (24% der Homozygoten vs. 2% der Dizygoten) (Deapen et al., 1992). Dennoch war in etwa nur ein Viertel der genetisch identischen Zwillinge gemeinsam von der Erkrankung betroffen. Im Umkehrschluss muss es daher andere Faktoren geben, welche die Genese des SLE beeinflussen. Im Folgenden werden mögliche Umweltfaktoren umschrieben.

1.5.1.1. UV-Licht / Infektionen

Hautmanifestationen bei SLE Patienten an durch Sonnenbestrahlung exponierten Körperarealen reichen von Erythemen wie dem bekannten Schmetterlingserythem bis hin zu makulösen und bullösen Läsionen (Zamansky, 1985). Auch verschiedene Infektionen führen zu vermehrter Apoptose, Nekrose oder *NETose* neutrophiler Granulozyten, wodurch eine Autoimmunreaktion ausgelöst oder verstärkt werden kann (Finzel et al., 2018).

Der Abbau der nekrotischen und apoptotischen Zellen durch Phagozytose, welche entweder durch die Einwirkung der UV-Strahlen oder durch Infektionen entstehen, ist bei ca. einem Drittel der SLE-Patienten sowohl *in vitro* (Herrmann et al., 1998), als auch *ex vivo* gestört (Baumann et al., 2002). Bei verzögertem Abbau werden im Endeffekt durch freiwerdende Nukleosomen der Zellen über

Toll-like-Rezeptor-2 zuerst Antigen-Präsentierende-Zellen (APC) und folglich auch autoreaktive T-Zellen aktiviert (Urbonaviciute et al., 2008).

Beim Prozess der *NETose* werden zur Abwehr bakterieller Infektionen Chromatin, sowie bakterizide Enzyme durch neutrophile Granulozyten freigesetzt. Hierdurch werden „*NETs*“ (Netze) gebildet, in welchen Bakterien festgehalten und abgetötet werden. Ebenso, wie bei dem verzögerten Abbau der Zellbestandteile, weisen SLE-Patienten eine verzögerte Abbauphase von *NETs* auf. Diese persistierenden *NETs* wurden in Nierenbiopsien in SLE-Patienten nachgewiesen und waren mit dem Auftreten einer Lupusnephritis assoziiert. (Hakkim et al., 2010). Hinzu kommt, dass der Prozess der *NETose* selbst auch in SLE-Patienten gesteigert ist (Mistry and Kaplan, 2017).

1.5.1.2. Östrogene

Ebenfalls sind Östrogene mit der Genese des SLE assoziiert. In einer Studie zu postmenopausaler Hormonersatztherapie zeigte sich nach einer Exposition von zwei oder mehr Jahren mittels Östrogen ein insgesamt 2,8-fach erhöhtes Manifestationsrisiko für SLE bei Frauen. Das Fehlen eines Progesterons erhöhte das Risiko sogar auf das 5,3-fache (Meier et al., 1998). Ebenfalls wurde die Wirkung von Östrogenpräparaten auf das Auftreten von Lupus-Schüben untersucht. Hier stellte sich eine signifikante Erhöhung von leichten- bis mittelschweren Schüben heraus. Schwere Schübe traten nicht signifikant häufiger auf (Buyon et al., 2005).

1.5.1.3. Rauchen

Zigarettenrauchen führt zu einer chronischen Inflammation im Körper (Elisia et al., 2020) und kann sogar autoimmune Prozesse auslösen (Ummarino, 2016, Willemze et al., 2011). So ergab sich bei Patientinnen, die mehr als ein Jahr lang täglich geraucht haben im Vergleich zur Kontrollgruppe an Nichtrauchern ein 1,55-fach höheres Risiko an SLE erkrankt zu sein. Auch im Vergleich von Ex-Raucherinnen zu Nichtrauchern zeigte sich eine 1,8-fach erhöhte Anzahl an SLE-Fällen. Männer, welche in Ihrer Lebenszeit mehr als 100 Zigaretten geraucht haben, hatten ebenfalls eine signifikant höhere SLE-Prävalenz ($p=0,026$), als die Vergleichsgruppe der Nichtraucher (Ekblom-Kullberg et al., 2013). Somit lässt sich eine Assoziation des erhöhten Auftretens von SLE bei Konsum von

Zigaretten vermuten. Zusätzlich scheint das Rauchen die Effektivität der Antimalaria-Medikamente negativ zu beeinflussen. (Rahman et al., 1998)

1.5.1.4. Vitamin D

Vitamin D spielt eine wichtige Rolle im Immunsystem, sodass ein Mangel in einer fehlgeleiteten Immunantwort resultieren kann (Hock, 2014). Die Vitamin D₃-Signalkaskade wird durch Stress aktiviert und erfordert ausreichende Kapazitäten an dem Vorgänger 25-Hydroxyvitamin D₃ für suffiziente Zell- und Immunfunktionen (Adams and Hewison, 2010, Peterlik and Cross, 2009). Bei Vitamin D₃-Mangel ist die Sekretion des antimikrobiellen Peptids Cathelicidin reduziert, was zu verstärkter Auto- und Xenophagie führt und als Resultat werden Phagozytose, Zytotoxizität, Antigen-Prozessierung und Antigen-Präsentation dysreguliert (Hock, 2014).

Zusätzlich besteht eine Assoziation von Polymorphismen des Vitamin-D-Rezeptors mit dem SLE-Erkrankungsrisiko (Mao and Huang, 2014). In Bezug auf SLE wurde die Assoziation der Krankheitsaktivität in einer longitudinalen Studie mit 276 Patienten, welche mehr als 4 ACR Kriterien erfüllten mit den Serumspiegeln an 25-hydroxyvitamin D₃ erforscht. Die Patienten wurden in drei verschiedene Gruppen, gemessen am Serumspiegel aufgeteilt und das Auftreten von SLE-Schüben dokumentiert. Nach einem *Follow-Up* von ca. 32,5 Monaten ergab sich sowohl die Krankheitsaktivität, als auch die Anzahl und Schwere an SLE-Schüben in den Vitamin D-Defizienten Gruppen als erhöht (Mok et al., 2018).

Vitamin D könnte auch eine der Ursachen sein, weshalb die Erkrankung in stärker pigmentierten Ethnizitäten eine erhöhte Prävalenz erreicht (Finzel et al., 2018). Durch stärkere Pigmentierung und die generelle Empfehlung beim SLE Sonnenbestrahlung zu vermeiden, könnte dies zu einem noch größeren Vitaminmangel führen als in beispielsweise der weißen Bevölkerung. (Finzel et al., 2018). In einer Metaanalyse wurde zuletzt die Wirkung einer Vitamin-D-Supplementierung bei SLE Patienten untersucht. Hierbei zeigte sich eine mögliche Verbesserung der Fatigue-Symptomatik bei SLE ($p=0,001$). Ein positiver Effekt auf die Krankheitsaktivität oder das Auftreten von anti-dsDNA konnte bislang jedoch leider nicht nachgewiesen werden (Zheng et al., 2019).

1.5.1.5. Ernährung

Zusammenfassend wird in einer aktuellen Meta-Analyse zu SLE und Ernährung berichtet, dass „eine balancierte Diät mit möglichst geringer Anzahl an Kalorien und Proteinen, aber mit hohen Anteilen von Ballaststoffen, PUFAs (*polyunsaturated fatty acids*), Vitaminen (A, B, C, D und E), Mineralstoffen und Polyphenolen“ empfohlen wird (Islam et al., 2020). Im Folgenden wird dies kurz zusammengefasst dargestellt.

Makronährstoffe

Kohlenhydrate, Fette und Aminosäuren gehören zu den Makronährstoffen. Kohlenhydrate dienen als natürlicher Energielieferant für den Körper. Es wird vermutet, dass ein Ungleichgewicht beim Konsum von Kohlenhydraten und ggf. eine Gewichtszunahme die klinische Manifestation diverser Autoimmunerkrankungen wie unter anderem auch SLE verstärken kann (Moura dos Santos Fde et al., 2013). Zudem konnte an der brasilianischen rheumatologischen Ambulanz der *Minas Gerais Federal University Medical School* demonstriert werden, dass ca. 35% der 18- bis 60-jährigen SLE Patientinnen übergewichtig (BMI: 25-29,9) und ca. 27% der Patientinnen fettleibig (BMI > 30) sind (Borges et al., 2012).

Bezüglich des Konsums von Proteinen konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der täglichen Proteinzufuhr eine Verschlechterung der Nierenfunktion bei SLE bremsen kann (Milovanov lu et al., 2009). Es stellte sich aber auch heraus, dass einzelne Aminosäuren sowohl positive, als auch negative Effekte bewirken können. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass N-Acetylcystein-Substitution die GSH-Level in Zellen erhöhen konnte und somit mTOR, einen der Faktoren, der zur T-Zell-Dysfunktion beiträgt (Bi et al., 2011), inhibieren konnte (Lai et al., 2012). Andererseits konnte ein verminderter Konsum von Phenylalanin und Tyrosin nephroprotektive Effekte in NZB/NZW Mäusen aufweisen. In der Kontrollgruppe zeigten alle Mäuse eine lupus-ähnliche Nephropathie. Die Gruppe mit Nährstoffrestriktion wies eine 1,4-fach größere Lebensspanne sowie die Abwesenheit einer Nephropathie auf (Dubois and Strain, 1973). Bezüglich des Proteinkonsums wird daher zusammenfassend ein

ausgewogener, moderater Proteinkonsum im Sinne eines mediterranen Ernährungsstils empfohlen (Islam et al., 2020).

Insbesondere ungesättigte Fettsäuren (PUFAs) mit hohem Anteil an Omega-3-Fettsäuren können die Anzahl an inflammatorischen Mediatoren bei SLE-Patienten reduzieren (Rodríguez Huerta et al., 2016).

Mikronährstoffe

Vitamin A Substitution verringerte sowohl Proteinurie als auch den Gehalt an anti-dsDNA im Blut (Kinoshita et al., 2010). Zudem konnte Vitamin A die Balance an menschlichen T-Helfer-Zellen (Th17) und Treg-Zellen beeinflussen (Handono et al., 2016). Bei bestimmten Bevölkerungsgruppen mit SLE konnte ein Vitamin B-Mangel nachgewiesen werden (Sun LD, 2007). In einer prospektiven Studie ergab sich eine inverse, signifikante Korrelation zwischen Vitamin-B6-Konsum und dem Risiko eines aktiven SLE (Minami et al., 2011). Ebenfalls war auch der Konsum von Vitamin C signifikant invers mit dem Risiko eines aktiven SLE assoziiert (Minami et al., 2003). Vitamin D wurde unter „Umweltfaktoren“ bereits beschrieben. Orale Substitution von Vitamin E zeigte bei SLE-Patienten eine Assoziation mit einer verminderten Antikörpersynthese (Maeshima et al., 2007). In einer weiteren Studie konnte nach Substitution mittels Vitamin E und *Nigella Sativa* (Echter Schwarzkümmel) ein signifikant erhöhter GSH-Gehalt, sowie signifikant erniedrigte Blutspiegel an IL-10, Malondialdehyd, NO und iNOS nachgewiesen und somit eine Erniedrigung des oxidativen und nitrosativen Stresses aufgezeigt werden (Esheba, 2015).

Polyphenole

Polyphenole sind sekundäre Metabolite aus Pflanzen und wirken den schädlichen Effekten von UV-Strahlung und oxidativem Stress entgegen. Ihnen wird ein signifikanter protektiver Effekt gegenüber dem Entwickeln und dem Progress verschiedener Erkrankungen wie Krebs, Diabetes, kardiovaskulären Erkrankungen und dem Altern zugeschrieben (Pandey and Rizvi, 2009). Auch bei SLE konnten positive Effekte demonstriert werden. Stoffe wie Curcumin (Handono et al., 2015, Wang et al., 2017a), natives Olivenöl (Aparicio-Soto et al., 2017) und Flavonoide (Han and Han, 2016, Kang et al., 2009) zeigten bei SLE-Patienten positive immunmodulatorische Effekte.

In dieser Arbeit soll der Fokus auf den Einfluss der Ernährung auf epigenetische Modifikationen und deren Auswirkung auf die Krankheitsaktivität gelegt werden. Diesbezüglich zeigt sich folgende Studie von besonderer Bedeutung: Die Autoren Strickland et al. zeigten in einer Versuchsreihe, dass Ernährung die Expression von autoimmun-assoziierten Genen und ebenfalls die Krankheitsaktivität über epigenetische Mechanismen in „transgenen Lupus-Maus-Modellen“ beeinflussen konnte (Strickland et al., 2013). Beim transgenen Lupus-Maus-Modell-Versuch wurden zwei Arten von Mäusen verwendet: Ein Doxyzyklin-induzierbarer ERK-Defekt (wurde bei Lupus-resistenten (C57BL/6), sowie bei Lupus-anfälligen Mäusen (C57BL/6 x SJL) gezüchtet. Diese Mäuse wurden mittels Doxyzyklin sowie einer „Standard-Ernährung“ für 18 Wochen gefüttert. Durch den fehlenden ERK-Signalweg wurde somit eine Demethylierung der DNA der Mäuse erwirkt. Danach wurde unterteilt zwischen methylendonatorenreicher (MS) und methylendonatorenarmer (MR) Ernährung. Die Krankheitsaktivität wurde anhand von anti-dsDNA-Leveln, Proteinurie und Hämaturie und mittels histologischer Beurteilung des Nierengewebes klassifiziert. Es zeigte sich, dass Lupus-anfällige Mäuse unter der methylendonatorenarmen Ernährung Hämaturie und Glomerulonephritis entwickelten, jedoch nicht unter der methylendonatorenreichen Ernährung. Ebenfalls entwickelte sich bei den „Lupus-resistenten“ Mäusen unter Deaktivierung des ERK-Signalwegs nur unter methylendonatorenarmer Ernährung eine Nierenerkrankung. Zudem kam es unter methylendonatorenarmer Ernährung zu einer Überexpression des *Cluster-of-Differentiation-40-Liganden* (CD40L) in weiblichen Mäusen, sowie zu einer Demethylierung des zweiten X-Chromosoms. In dieser Studie wurde also gezeigt, dass eine Ernährung, angereichert mit Methylendonatoren in Lupus-Maus-Modellen zu einer vermehrten Methylierung und somit eine Assoziation bezüglich der Epigenetik und Krankheitsaktivität aufweist.

1.5.2. Genetische Prädisposition

Die oben beschriebene Zwillingsstudie aus dem Jahr 1992 stellte dar, dass eineiige Zwillinge deutlich häufiger gemeinsam von SLE betroffen waren als

zweieiige Zwillinge (24% der Homozygoten vs. 2% der Dizygoten). Wie beschrieben, kann die Ausprägung von Umweltfaktoren abhängen, doch es zeigt sich auch eindeutig, dass es eine genetische, prädisponierende Komponente geben muss. Ist der eineiige Zwilling an SLE erkrankt, so hat der andere Zwilling ein Risiko von 50% ebenfalls an SLE zu erkranken (Deapen et al., 1992).

Insgesamt sind über 100 verschiedene Genareale gefunden, welche mit der Ausprägung von SLE assoziiert sind (Chen et al., 2017, Wang et al., 2021). In einer groß angelegten Analyse, in welcher genetische Daten von über 27.000 Individuen aus Europa, Afrika und Lateinamerika untersucht wurden, erwies sich, dass das Risiko der Entwicklung eines SLE direkt mit der Anzahl an vorhandenen Risikoallelen im Sinne einer Addition des Risikos steigt (Langeveld et al., 2017).

1.5.3. Epigenetik und epigenetische Modifikationen

In Zusammenschau der oben genannten Abhängigkeit der Erkrankung von Umweltfaktoren, sowie der genetischen Prädisposition könnte die Epigenetik als Mittelglied beider von Bedeutung sein. Epigenetische Modifikationen ermöglichen eine dynamische Regulierung diverser Prozesse in eukaryotischen Zellen, wodurch die Expression von Genen durch externe und interne Stimuli beeinflusst werden und der Organismus entsprechend auf Veränderungen reagieren kann (Navarro Quiroz et al., 2019). Unter epigenetischen Modifikationen versteht man Veränderungen, die zu einer unterschiedlichen DNA-Zugänglichkeit führen. Diese kann durch DNA-Methylierung (Li and Zhang, 2014), posttranslationale Modifikation von Histon-Proteinen (Kouzarides, 2007) oder nichtcodierende RNA-Interaktionen im Zellkern bewirkt werden (Mercer et al., 2009). Es gibt viele Hinweise dafür, dass die Epigenetik eine wichtige Rolle in der Ausprägung des SLE spielt. In der oben genannten Zwillingsstudie erkrankten lediglich 24% aller eineiigen Zwillinge gemeinsam an SLE, sodass Umweltfaktoren oder die epigenetische Modifikation einen erheblichen Anteil an der Genese haben müssen. Zudem ist eine ungleiche Geschlechterverteilung ebenfalls suspekt, insbesondere bei einem deutlich erhöhten Anteil an erkrankten Frauen. Hier wird die Hypothese aufgestellt, dass eine fehlende X-Chromosom-Inaktivierung durch fehlende Methylierung und somit eine Überexpression am

CD40L-Promotor ebenfalls ursächlich sein kann (Lu et al., 2007). Alternativ könnte sich eine weibliche Überexpression auch potentiell durch geschlechtsspezifische hormonelle Unterschiede, z.B. durch die Wirkung des Östrogens und/oder epigenetische Modifikationen erklären (Rider et al., 2001). Ebenfalls können Medikamente wie 5-Azacidin oder Procainamid als Inhibitoren der DNA-Methylierung bewirken, dass T-Zellen autoreaktiv werden und in Mausmodellen eine Lupus-ähnliche Erkrankung (*drug-induced lupus*) bewirken (Quddus et al., 1993). In einer Analyse der Methylierung in neutrophilen Granulozyten bei SLE Patienten stellten sich im Vergleich zur Kontrollkohorte insgesamt 293 anders methylierte CG-Sequenzen heraus. Diese Sequenzen erwiesen sich mehrheitlich mit 68% als hypomethyliert. Zudem zeigte sich eine Demethylierung an für die Expression von Interferonen beteiligten Genregionen (Coit et al., 2015). Außerdem ergab sich, dass eine Hypomethylierung bestimmter Regionen nicht nur als diagnostischer Biomarker für SLE dienen kann, sondern auch als ein prognostischer Marker in Bezug auf Lupus-Nephritis sein kann. Hier zeigte sich in Region 1 und Region 2 des IFI44L-Promoters eine signifikant geringere Methylierung bei Patienten mit Lupus-Nephritis als bei Patienten ohne die genannte Nephritis. Ebenfalls ergab sich zur Zeit der Remission eine erhöhte Methylierung an genannter Stelle als während aktiver Schübe (Zhao et al., 2016). Es ist zu erwähnen, dass auch andere, nicht durch Methylierung bedingte epigenetische Auffälligkeiten wie zum Beispiel eine globale Hypoacetylierung in CD4+ T-Zellen bei SLE Patienten nachgewiesen wurden (Javierre and Richardson, 2011).

1.6. Methylierung und C1-Stoffwechsel

Ein CpG-Dinukleotid besteht aus den beiden Nukleobasen Cytosin und Guanin, welche mittels Phosphodiesterbindung verbunden sind. CpG-Inseln sind kurze Regionen des Genoms mit einer hohen Frequenz von CpG-Dinukleotiden im Vergleich zum Gesamtgenom (Larsen et al., 1992). DNA-Methylierung an diesen CpG-Stellen ist einer der epigenetischen Mechanismen, welcher die Expression von Genen, die genomische Prägung und die X-Chromosom-Inaktivierung reguliert. Bei dem Prozess der Methylierung werden unter anderen

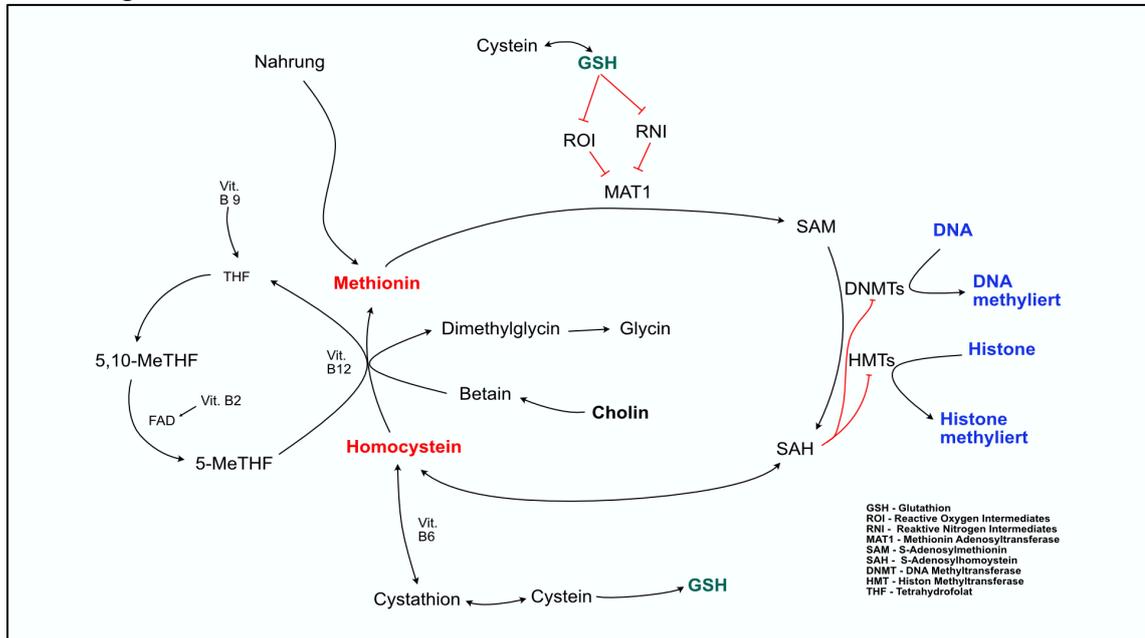
regulatorischen Proteinen die DNA-Methyltransferasen, Demethylasen, Histon-modifizierende Enzyme und Proteine zur Remodellierung des Chromatins benötigt (Rodríguez-Dorantes et al., 2004).

Wie oben beschrieben können Medikamente und Umweltfaktoren wie zum Beispiel UV-Licht oder virale Infektionen sowie Hormone einen Effekt auf epigenetische Regulationsmechanismen haben. Es wird vermutet, dass dies auf zwei Mechanismen beruht. Einerseits wird die Regulation der Proteine, welche für die Transkription verantwortlich sind (RNA Polymerase II, Co-Aktivatoren und Co-Repressoren), und andererseits werden Enzyme wie Methyltransferasen und Histon-modifizierende Proteine durch diese Faktoren beeinflusst (Navarro Quiroz et al., 2019). Unter den verschiedenen hypomethylierten Genen sind bei der Pathophysiologie des SLE unter anderem die Promotoren in CD4+ T-Zellen von IL-6 (Lal et al., 2009), IL-10 & IL-13 (Zhao et al., 2010), IL-17A (Rauen et al., 2011), CD40L (Lu et al., 2007) und CD70 (Zhang et al., 2013) relevant. Insgesamt resultiert diese Dysregulation in einem erhöhten Gewebsschaden durch Inflammation, einer erhöhten Produktion von Autoantikörpern und letztendlich in einer Steigerung der Krankheitsaktivität (Hedrich et al., 2017).

Im Folgenden wird auf den komplexen Prozess der DNA-Methylierung selbst eingegangen. Diese wird durch sogenannte DNA-Methyltransferasen (DNMT) durchgeführt. DNMT1 sorgt für den Erhalt der bestehenden Methylierung während der Zellreplikation, DNMT3a und 3b induzieren in der Regel eine *de-novo* Methylierung (Denis et al., 2011). Als Substrat der Methylierung wird S-Adenosylmethionin (SAM), ein universeller Methylgruppendonor, benötigt. Das SAM wird im sogenannten C1-Stoffwechsel produziert. Verschiedene Bestandteile der von uns aufgenommenen Nahrung werden direkt in den Kreislauf integriert. Daher ist der Gehalt an SAM direkt abhängig von der Verfügbarkeit des aufgenommenen Methionins (Mentch and Locasale, 2016). Im C1-Stoffwechsel werden Glucose, Vitamine und Aminosäuren verarbeitet um verschiedene metabolische Prozesse zu ermöglichen. Dies schließt den Nukleotidmetabolismus, den Redox-Status von Zellen, die Lipidbiosynthese sowie die Methylierung mit ein (Locasale, 2013). Wichtige Bestandteile des C1-

Stoffwechsels sind der Folat- und Methioninstoffwechsel. Insbesondere in dem Methioninstoffwechsel wird SAM generiert (siehe Abbildung 1).

Abbildung 1. C1-Stoffwechsel



SAM wird durch die Methionin-Adenosyltransferase (MAT1) aus Methionin synthetisiert. Durch DNMTs und HMTs (Histonmethyltransferasen) können nun sowohl DNA als auch Histone methyliert und somit epigenetisch modifiziert werden. Hierbei ist die Aktivität der DNMT direkt von der Substratkonzentration, also vom Gehalt an SAM abhängig. Nach erfolgreicher Methylierung entsteht S-Adenosylhomocystein (SAH). Eine vermehrte Ansammlung des SAH inhibiert die Aktivität von DNMT und HMT (Deguchi and Barchas, 1971). Daher wird angenommen, dass das Verhältnis von SAM/SAH eine wichtige Rolle für das Voranschreiten der Methylierung spielt (Locasale and Cantley, 2011). Der Zyklus schreitet also voran, solange die Produkte der jeweiligen Enzyme durch andere metabolische Wege verstoffwechselt werden. Geschieht dies nicht, kann es zu einer Akkumulation des SAH kommen und somit zu einer Hemmung der Methylierung durch DNMT und HMT (De La Haba and Cantoni, 1959). Hierbei kann Homocystein einerseits durch den Folatzyklus oder durch Cholin/Betain zu Methionin umgewandelt werden, andererseits aber auch über Vitamin B6 zu Cystathion und letztendlich zu Glutathion (GSH). In einer Studie, in der vorwiegend Afro-Amerikanische Frauen untersucht wurden, wiesen 15% der Lupus-Patientinnen erhöhte Serum-Homocystein Level auf. Bei diesen Patienten

zeigte sich ebenfalls ein erhöhtes Risiko für das Entwickeln einer Lupus-Nephritis (Timlin et al., 2019).

Im Folgenden werden die Einflüsse einzelner Bestandteile auf den C1-Stoffwechsel erläutert.

1.6.1. Vitamin B2, B6, B9 (Folat) und B12

Die Aufnahme von Vitaminen und Proteinen ist für einen funktionierenden C1-Stoffwechsel essentiell.

- Vitamin B2, B6, B9 (Folat) und B12 sind in nahezu allen biologischen Prozessen für eine erfolgreiche Remethylierung des Homocysteins zu Methionin und letztendlich für die Methylierung der DNA essentiell (Kim, 2005, Feil and Fraga, 2012).
- Nach Gabe von Folat zeigte sich den menschlichen Probanden beispielsweise das SAM erhöht und das Homocystein erniedrigt (Poirier et al., 2001).
- Umgekehrt konnte bei weiblichen Probandinnen demonstriert werden, dass ein erhöhter Gehalt an SAH und Homocystein insgesamt eine Assoziation mit einer Demethylierung in Lymphozyten aufweist (Yi et al., 2000).

1.6.2. Methionin

Wie man aus Abbildung 1 entnehmen kann, ist der intrazelluläre Gehalt an SAM vor allem vom Angebot des Methionins abhängig. Dieses wird nicht nur aus dem C1-Zyklus generiert, sondern auch durch die Nahrung aufgenommen (Niculescu and Zeisel, 2002). Es wurde nachgewiesen, dass ernährungsspezifische Variabilität der Methioninkonzentration bei Menschen groß genug ist, um Veränderungen in der DNA- und Histonmethylierung bewirken zu können (Mentch et al., 2015). Da die DNA-Methylierung bei SLE Patienten invers mit der Krankheitsaktivität korreliert (Corvetta et al., 1991), kann dies auf ein fehlerhaftes Ablaufen des C1-Zyklus beziehungsweise der Methyltransferaseaktivität hindeuten.

1.6.3. Cholin und Folat

Die Nährstoffe Cholin und Folat (Vit. B9) zeigten ebenfalls Auswirkungen auf den C1-Zyklus.

- Reduzierte Aufnahme von Cholin und Folat bei Frauen zwischen 20 und 30 Jahren war mit einer erniedrigten Methylierung der Leukozyten-DNA assoziiert. Bei Substitution erfolgte eine Remethylierung. Dieser Effekt war vor allem bei Frauen mit MTHFR-Mutationen zu beobachten, was suggeriert, dass die Folat und Cholin Substitution für die Aufrechterhaltung des C1-Stoffwechsels vor allem bei Individuen mit MTHFR Polymorphismen besonders wichtig ist (Shelnutt et al., 2004)
- Die Substitution von Folat geht mit einer generellen Erhöhung von Methylierung der DNA einher und Studien an Menschen belegen dies (Anderson et al., 2012).

1.6.4. GSH (Glutathion) / Cystein / Glycin

Ohne MAT1-Aktivität ist das Generieren von SAM nicht möglich. In Abbildung 1 ist gezeigt, dass GSH eine verstärkende Auswirkung auf die MAT1 ausübt, indem es oxidativen und nitrosativen Stress inhibiert (Avila et al., 1998).

Fehlendes GSH und ein erhöhter oxidativer Stress können also Ursache der Inhibition von DNMT1 sein (Perl, 2010), welche in SLE verringert exprimiert wird und eine verringerte enzymatische Aktivität aufweist (Richardson et al., 1990, Deng et al., 2001). In einigen Studien wurde eine Assoziation von Krankheitsaktivität und erhöhtem oxidativem Stress bei SLE nachgewiesen:

- Fatigue ist mit erhöhtem oxidativem Stress assoziiert. (Segal et al., 2012)
- N-Acetyl-Cystein Substitution bewirkt eine Verbesserung der Krankheitssymptome bei SLE. (Lai et al., 2012)
- Es bestehen positive Effekte einer N-Acetyl-Cystein Substitution auf zellulärer und genetischer Ebene sowie ein generell vermehrter oxidativer Stress bei SLE Patienten mit Assoziation zu Krankheitsaktivität und Endorganschaden. (Shah et al., 2014)

GSH wird aus Glutamat, Cystein und Glycin synthetisiert. Die Reaktion wird durch zwei zytosolische Enzyme katalysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die

Synthese durch die Gamma-Glutamylcystein-Synthase, die Cystein-Konzentration und eine GSH Feedback-Inhibition reguliert wird (Huang et al., 1993). In Studien an Tieren und Menschen wurde nachgewiesen, dass eine adäquate Ernährung essentiell für die Erhaltung der GSH-Synthese ist (Wu et al., 2004). Enterale oder parenterale Cystein, Methionin, N-Acetylcystein (Lai et al., 2012) und L-2-Oxothiazolidin-4-Carboxylat-Substitution (Shah et al., 2014) fördert die GSH Synthese. Durch freie Radikale, reaktiven Sauerstoff und Stickstoff wird GSH nicht-enzymatisch zu GSSG (oxidierte Form des GSH) oxidiert. Das GSH:GSSG Verhältnis wird dabei als Indikator für den zellulären Redox-Status genutzt und ist unter normalen Bedingungen >10 (Wu et al., 2004). Die GSH Produktion im Körper benötigt rund 65% des gesamten Cystein im menschlichen Körper. Gleichzeitig ist Cystein der limitierende Faktor bei der Synthese (Lyons et al., 2000).

1.6.5. Fettsäuren

Zudem scheinen auch Fettsäuren eine wichtige Rolle bezüglich der Methylierung zu spielen. So konnte an Wistar-Ratten gezeigt werden, dass eine Diät aus Folatsubstitution mit gleichzeitiger Deprivation von Vitamin B12 zu einem Mangel von Docosahexaensäure, einer mehrfach ungesättigten Fettsäure, führte, welche zu den Omega-3-Fettsäuren zugehörig ist. Insgesamt war dies mit einer Hypomethylierung des Genoms der Versuchstiere assoziiert. Durch Omega-3-Fettsäuren Substitution, jedoch keiner Substitution von Vitamin B12, konnte der Hypomethylierung dennoch entgegengewirkt und eine normale Methylierung erreicht werden (Kulkarni et al., 2011).

In Bezug auf SLE konnte in einer Studie bei 46% der SLE Patienten eine Dyslipidämie gezeigt werden (19% in der gesunden Kohorte). Die SLE Gruppe hatte erhöhtes Cystein und erniedrigte HDL-Werte. Lediglich das Homocystein war jedoch signifikant mit der Dyslipidämie assoziiert, Cystein nicht. Ein Anstieg des Homocysteins von $1\mu\text{mol/l}$ im Blut verdoppelte die Chancen einer Dyslipidämie (Ortiz et al., 2013). Zusammenfassend sagen die Quellen also zwei Dinge aus:

1. Omega-3-Fettsäuremangel war mit einer Hypomethylierung assoziiert.

2. SLE-Patienten weisen eine erhöhte Häufigkeit an Dyslipidämie auf, dabei ist ein vermehrtes Aufkommen an Homocystein mit der Dyslipidämie assoziiert.

1.7. Acetylierung

Methylierung ist nicht der einzige Weg epigenetischer Modifikationen. Daher wird an dieser Stelle, wenn auch nicht Fokus dieser Arbeit, auf die Acetylierung eingegangen, welche bei SLE Patienten ebenfalls beeinträchtigt ist. Bei der Acetylierung wird eine Acetylgruppe an eine chemische Struktur gebunden (Cheung et al., 2000). Histone sind eine Gruppe von Proteinen, die Bestandteil des Chromatins sind. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Replikation und Transkription der DNA sowie bei der Expression von Genen durch Änderung der Struktur des Chromatins durch Histonoktamere, welche aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 bestehen (Bannister and Kouzarides, 2011). Es konnte demonstriert werden, dass die Acetylierung am Lysin der Histone durch Histonacetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC) reguliert wird (Drazic et al., 2016). Durch Acetylierung von Histonen wird die Struktur des Chromatins in eukaryotischen Zellen gelockert und somit die Transkription verschiedener Gene ermöglicht (Wang et al., 2017b). Durch ein gestörtes Gleichgewicht von HAT und HDAC kann es somit zur Begünstigung verschiedener Erkrankungen wie zum Beispiel Autoimmunerkrankungen, Diabetes, neurodegenerativen Erkrankungen, kardialer Hypertrophie und Krebs kommen (Parthun, 2007). Ebenfalls kann die Histonacetylierung selbst als Bindestelle für Coaktivatoren der Transkription fungieren (Cheung et al., 2000). Bei SLE wurde diesbezüglich die Rolle des Interferon-regulierenden-Faktors-1 (IRF1) untersucht. Bei Überexpression des IRF1 zeigte sich eine Assoziation zur Hyperacetylierung des Histons H4 in SLE-Monozyten. Ebenfalls interagierte das IRF1 direkt mit Chromatinstruktur-verändernden Proteinen an dessen Zielgenen (Leung et al., 2015). Generell zeigte sich in einer genomweiten Analyse eine globale Erhöhung der Acetylierung von H4 in Monozyten von SLE-Patienten (Zhang et al., 2010).

1.8. CD40 Ligand in T-Lymphozyten bei SLE

T-Lymphozyten dienen als Bestandteil der weißen Blutzellen der Immunabwehr. Zusammen mit den B-Lymphozyten stellen sie gemeinsam die adaptive Immunantwort dar. Die Antikörperproduktion durch B-Zellen beruht auf einer Aktivierung durch T-Zellen. Die normale Immunaktivierung über T-Zellen besteht aus zwei Schritten. Der erste Schritt beinhaltet das Binden des T-Zell-Rezeptors an Antigene durch Präsentation über den Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II) (Rhode et al., 1996). Der zweite Schritt besteht aus der Bindung von Rezeptor-Ligand Paaren wie zum Beispiel CD40L von T-Zellen an CD40 von B-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und anderen Zellen (Taams et al., 1999, Lanzavecchia, 1998). Diese Bindung bewirkt eine B-Zell-Aktivierung und wird unter anderem auch als Costimulation bezeichnet (Baumgarth, 2000).

Diese Arbeit fokussiert sich auf den CD40-Liganden. Der CD40-Ligand wird auf aktivierten T-Zellen exprimiert (Armitage et al., 1992). Er wird genetisch auf dem X-Chromosom codiert (Xq24) (Banchereau et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass der CD40L an diversen Effekten einschließlich der B-Zell-Proliferation (Saeland et al., 1993), dem Antikörperklassenwechsel (Lederman et al., 1994) und der B-Zell-Antwort auf Zytokine (Barrett et al., 1991) beteiligt ist. Bei weiblichen SLE Patienten haben Studien gezeigt, dass eine Hypomethylierung der CD40L-Promotorregion in CD4+ T-Zellen mit einer folgenden Überexpression des CD40L (Lu et al., 2007) und konsekutiver Erhöhung der Autoantikörper-Produktion einhergeht (Zhou et al., 2009). Zudem erhärtet sich der Verdacht auf eine Mitbeteiligung des X-Chromosoms an der Genese der Erkrankung, nachdem demonstriert werden konnte, dass Männer mit Klinefelter-Syndrom (47,XXY) ein ungefähr gleich hohes Erkrankungsrisiko zeigten wie Frauen (46, XX) und ein insgesamt 14-fach höheres Risiko im Vergleich zu Männern mit normaler Chromosomenverteilung (46,XY) (Scofield et al., 2008). Weitere Studien offenbarten ebenfalls eine Assoziation zwischen X-Chromosom-Polysomie und dem Erkrankungsrisiko (Slæe et al., 2014).

1.9. Erfassung von Ernährungsgewohnheiten

Die Erfassung der Ernährungsgewohnheiten der Teilnehmer dieser Studie erfolgt mittels validiertem Ernährungsfragebogen (Haftenberger et al., 2010). Eine Meta-Analyse konnte zeigen, dass die Erfassung von Nährstoffen mittels Fragebogen (FFQs) als eine verlässliche Methode gilt, insbesondere, wenn der FFQ besonders viele verschiedene Nahrungsmittel und einen Zeitraum von unter 12 Monaten abfragt (Cui et al., 2021). Beide Aspekte treffen bei dem verwendeten FFQ zu, da dieser den Nahrungskonsum der letzten vier Wochen sowie mit über 50 Fragen mit zusätzlichen Subfragen einen großen Teil der gängigen Nahrung einschließt. Dennoch gibt es bezüglich FFQs keine einheitliche Meinung. Es besteht die Debatte, ob Fragebögen nach eigenen gedächtnisbasierten Angaben auf Grund von Ungenauigkeit, falscher Portionseinschätzungen und häufig nicht-falsifizierbarer Ernährungsangaben generell valide sein können (Archer et al., 2018).

1.10. Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Ernährungsgewohnheiten weiblicher Patienten mit SLE mittels validierten Fragebogens des Robert-Koch-Instituts zu bestimmen und die dadurch aufgenommenen Methylendonatoren zu schätzen. Daraufhin soll der Zusammenhang der Aufnahme von Methylendonatoren einerseits mit der Methylierung des CD40L-Promotors und *Enhancer*-Regionen in T-Zellen und andererseits mit der Krankheitsaktivität bei Patientinnen mit systemischem Lupus erythematodes erforscht werden. Unter anderem ist dies auch interessant, da der CD40L Zielstruktur in mehreren klinischen Studien des SLE ist (Karnell et al., 2019).

Folgende Fragestellungen werden in dieser Arbeit bearbeitet:

1. Korrelieren die im Fragebogen ermittelten Schätzungen mit den Blutmesswerten (Vit. D, Vit. B6, Cholesterol)?
2. Ist die Krankheitsaktivität (SLEDAI) abhängig von der Methylierung des CD40-Liganden?

3. Ist die Methylierung der T-Zell-DNA des CD40-Liganden mit einer methylendonatorenreichen Ernährung, gemessen an dem Fragebogen und mittels im Blut ermittelten Biomarkern, assoziiert?
4. Gibt es eine direkte Assoziation der erhobenen Nährstoffdaten und insbesondere bezüglich der Methylendonatoren mit der Krankheitsaktivität?
5. Gibt es Nahrung, welche die DNA-Methylierung signifikant begünstigt?

2. Material und Methoden

2.1. Studiendesign

Die in dieser Arbeit untersuchten Daten wurden von weiblichen Patienten mit SLE aus der rheumatologischen Ambulanz der Universitätsklinik Düsseldorf erhoben. Zwei Ethikvoten wurden zur Beantragung der Studie bei der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität eingereicht. Das Votum mit dem Titel „Entwicklung und Validierung der High Resolution Melting Curve-Analyse zur Detektion epigenetischer Modifikation bei systemischem Lupus erythematodes“ unter der internen Studiennummer 5211 wurde am 07.09.2015 genehmigt und die Erlaubnis der Modifikation der Patientenerklärung und Einwilligungserklärung sowie die zusätzliche Isolation von B-Lymphozyten und deren Funktion am 27.07.2016 erteilt. Das zweite Votum mit dem Titel „Prospektive epidemiologische Studie zur Fatigue bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes“ unter der internen Studiennummer 5466R wurde am 20.04.2016 genehmigt. Neben standardisierten Routinemaßnahmen zur Dokumentation der Krankheitsaktivität und der Organbeteiligung (siehe Kapitel 2.7) wurden Vitamin B6 und Homocystein als Biomarker zur Erfassung der Methylendonatoren der Ernährung ausgewählt (Dominguez-Salas et al., 2014). Zudem wurde zur Erfassung der Ernährungsgewohnheiten in den letzten vier Wochen der Patienten ein vom Robert-Koch-Institut validierter Fragebogen (Gosswald et al., 2012, Haftenberger et al., 2010) verwendet.

Die Methylierung des CD40L Promotors und von *Enhancer*-Regionen in T-Zellen mittels EpiTyper durch einen Kooperationspartner in Regensburg (University-Hospital-Regensburg, 2021, RCI, 2021) bei 61 weiblichen SLE Patientinnen bestimmt.

2.2. Patientenauswahl

Einschlusskriterien

- Volljährige Patientinnen mit gesichertem systemischem Lupus erythematodes (ICD 10: M32)

Ausschlusskriterien

- Fehlende Einwilligung
- Minderjährigkeit

In der folgenden Tabelle wird die Kohorte der Studie beschrieben. Ebenfalls wird ein Überblick über Laborparameter, sowie den errechneten Nährstoffkonsum aus dem Ernährungsfragebogen gegeben.

Tabelle 2-1. Beschreibung der Kohorte

	Patientenkohorte		
	n	i. D	σ
Alter (in Jahren)	61	45,7	12,0
BMI	61	25,1	4,4
Dauer der Erkrankung	61	16,24	8,44
Glukokortikoiddosis in mg/d	37	4,8	2,4
CRP in mg/dl	61	0,3	0,7
DNS-AK-ELISA U/l	61	205,7	345,0
C3c in mg/dl	56	91,9	16,7
C4 in mg/dl	56	17,1	8,5
SLEDAI	60	4,7	5,2
Homocystein in $\mu\text{mol/l}$	56	15,2	5,8
VitB6 in $\mu\text{g/l}$	46	16,5	25,2
Die Folgenden Werte sind Nährstoffangaben, welche aus dem Fragebogen ermittelt wurden. Sie zeigen die Aufnahme des Nährstoffes pro Tag an.			
VitB6 in mg/d	61	2,0	1,2
Folat in $\mu\text{g/d}$	61	269,6	129,1
VitB12 in $\mu\text{g/d}$	61	4,4	3,0
Methionin in g/d	61	1,7	0,8
Cholin in mg/d	61	302,9	137,9
Cystein in mg/d	61	871,4	351,6

2.3. Datenmanagement

2.3.1. Anonymisierung, Pseudonymisierung und Verblindung

Die wissenschaftlichen Auswertungen für die Studien erfolgten als zusammengefasste (aggregierte und anonymisierte) Analysen und wurden nur auf dieser Basis veröffentlicht (Individuelle Auswertungen mit Bezug zu einer Einzelperson waren nicht Gegenstand dieser Untersuchungen). Hierfür wurden bei der Aufklärung, der Fragebogenausgabe und der Blutentnahme spezielle pseudonymisierte Barcodes verwendet. Um bestimmte Routinelaborparameter

und durch das ärztliche Personal in der klinischen Untersuchung ermittelte *Scores* zur Krankheitsaktivität mit den pseudonymisierten Daten zusammenzuführen und dabei die Verblindung und somit eine Erwartungshaltung des Studienpersonals und Studienärzte auszuschließen, wurden die Daten durch eine in der Studienzentrale angestellte Kraft zusammengeführt und als einheitlicher pseudonymisierter Datensatz exportiert. Schließlich wurde der pseudonymisierte Datensatz durch die auswertenden Studienärzte beurteilt. Eine individuelle Nachbearbeitung des Datensatzes nach Freigabe war nicht mehr möglich.

2.3.2. Datensatz und Variablen

Zur Auswertung und Beantwortung der zuvor formulierten Fragestellungen wurde von unserer Studienzentrale ein Datensatz generiert, in welchem die gesamten pseudonymisierten erhobenen Informationen gesammelt wurden.

Zur Identifikation wurde für jeden Patienten eine *Match-ID* vergeben. Des Weiteren wurden unter anderem folgende Parameter eingefügt:

Alter, Geschlecht, BMI, oben genannte Blutparameter, SLEDAI-Score, Zugehörige Werte zum Fettsäurenprofil (MUFA, PUFA, HUFA), Rohdaten aller Antworten des Fragebogens, sowie Daten zur Methylierung relevanter Promotorstellen.

2.4. Studienablauf

Der Einschluss der Patienten für die Studie erfolgte von September 2016 bis November 2017. Alle Patientinnen mit zutreffenden Einschlusskriterien, welche sich in diesem Zeitraum in Behandlung in der rheumatologischen Ambulanz der Universitätsklinik Düsseldorf befanden, wurden um die Teilnahme an der Studie gebeten.

Im Vorfeld wurden jeweils mit *Barcodes* bestückte Blutentnahmebehälter und Fragebögen mit frankiertem Rückumschlag vorbereitet. Am Untersuchungstag wurde eine erweiterte Standarddokumentation der SLE-Patienten (inklusive Routine-Kerndokumentation, SLEDAI) durch die behandelnden Ärzte durchgeführt.

Vor Untersuchung und Blutentnahme wurden die Patienten von den Doktoranden und Ärzten umfassend für die Studie aufgeklärt. Die Aufklärung wurde dreifach unterzeichnet (Patient, Patientenakte, Studienzentrale). Die Aufklärung für die Studienzentrale wurde sowohl mit Barcode, als auch Patienten-ID beklebt um die oben beschriebene Verblindung durch das Personal in der Studienzentrale zu ermöglichen. Letztgenannte Aufklärung wurde am selben Tag in der Studienzentrale abgegeben. Die auswertenden Studienärzte und Doktoranden hatten keine Möglichkeit auf einen Zugriff für eine mögliche Verknüpfung von Barcodes mit tatsächlichen nicht-anonymisierten Patientendaten.

Die Fragebögen wurden von den Patienten ohne Zeitdruck zu Hause ausgefüllt und mit voradressiertem und frankiertem Rückumschlag an unsere Studienzentrale versendet. Sollte ein Fragebogen nach vier Wochen beziehungsweise drei Monaten nicht an die Studienzentrale versendet worden sein, wurden die Patienten am jeweiligen Zeitpunkt telefonisch durch die Studienzentrale erinnert.

Nach Rückerhalt der mittels Barcodes pseudonymisierten Fragebögen erfolgte zur Vermeidung von Fehlern bei der Digitalisierung eine zweifach-Eingabe in dem Programm „EpiData“ (Lauritsen JM & Bruus M, 2000-2008) (Lauritsen JM., 2000-2008). Die generierten Tabellen wurden mit demselben Programm abgeglichen und Fehler, welche bei der Eingabe entstanden waren, manuell korrigiert und erneut abgeglichen, bis eine fehlerfreie Übertragung der Daten gewährleistet war.

Durch die Studienzentrale wurden letztendlich alle klinischen Daten, Fragebogenantworten und Laborwerte in einem Datensatz pseudonymisiert zusammengefügt, sodass eine Auswertung erfolgen konnte.

2.5. *Score* zur Erfassung der Krankheitsaktivität

Um eine objektive Einschätzung der Krankheitsaktivität bei Patienten mit SLE zu ermöglichen wurde in der rheumatologischen Ambulanz bei jedem Patienten der SLEDAI-2000-*Score* (Gladman et al., 2002) ermittelt.

2.6. Robert-Koch-Institut-Fragebogen/DEGS-Fragebogen zur Bestimmung der Ernährungsgewohnheiten

Zur Bestimmung der Ernährungsgewohnheiten wurde ein vom Robert-Koch-Institut entwickelter Ernährungsfragebogen von den Patienten ausgefüllt. Der Ernährungsfragebogen wurde für die „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ (Gosswald et al., 2012) entwickelt und zuvor in einer separaten Studie zur Erfassung der Ernährung im Zeitraum der letzten 4 Wochen unter Erwachsenen validiert (Haftenberger et al., 2010).

Ein breites Spektrum an Nahrung wird in dem Fragebogen durch insgesamt 53 Kategorien abgedeckt. Hierbei werden Häufigkeit des Konsums der jeweiligen Kategorie, bestimmte Einzelheiten (fettarm vs. regulär), sowie die Portionsgröße erfragt. Um die Einschätzung des Patienten zu objektivieren, wurden neben die Fragen zu den Portionsgrößen Beispielbilder abgebildet.

Abbildung 2. Beispiel einer Frage im RKI-Ernährungsfragebogen (Haftenberger et al., 2010)



31 Wie oft haben Sie **Wurst** (z. B. Salami, Leberwurst) gegessen?
Nicht gemeint ist Schinken.

- Nie → Bitte weiter mit Frage 32
- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> 1 Mal im Monat | <input type="radio"/> 1 Mal am Tag |
| <input type="radio"/> 2–3 Mal im Monat | <input type="radio"/> 2 Mal am Tag |
| <input type="radio"/> 1–2 Mal pro Woche | <input type="radio"/> 3 Mal am Tag |
| <input type="radio"/> 3–4 Mal pro Woche | <input type="radio"/> 4–5 Mal am Tag |
| <input type="radio"/> 5–6 Mal pro Woche | <input type="radio"/> Öfter als 5 Mal am Tag |

31a Wenn Sie **Wurst** essen, wie viel essen Sie davon meistens?

- ½ Scheibe
- 1 Scheibe
- 2 Scheiben
- 3 Scheiben
- 4 Scheiben (oder mehr)

31b Essen Sie **fettarme Wurst**?

- Selten oder nie
- Etwa zur Hälfte
- Überwiegend
- Weiß ich nicht

2.6.1. Aus dem Fragebogen ermittelte Variablen

Um die Angaben der Patienten in einem Datensatz zu quantifizieren wurden in einem ersten Schritt Nährstoffe definiert, welche über den Fragebogen ermittelt werden sollten. In Bezug auf die Fragestellung wählten wir zur Erfassung der Methylierung folgende relevante Nährstoffe aus: Gesamtlipidgehalt, Vitamin B6, Folat (natürlich vorkommende Form des Vitamins B9), Folsäure (synthetische Form des Vitamin B9), Vitamin B12, gesättigte Fettsäuren, einfach-ungesättigte Fettsäuren, mehrfach-ungesättigte Fettsäuren, Cholesterin, Methionin, Glycin, Cholin und Vitamin D.

Der zweite Schritt bestand darin die Nährstoffangaben zu ermitteln. Hierzu wurden die jeweiligen Nährstoffkonzentrationen aus der Datenbank des „*United States Department of Agriculture*“ (USDA, 2019) entnommen

(USDA, 2018) (Food and nutrient database for dietary studies, <https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md-bhnrc/beltsville-human-nutrition-research-center/food-surveys-research-group/docs/fndds-download-databases/>, Zugriff vom 05.01.2019). Hier konnten die genannten Nährstoffkonzentrationen zu jedem der gelisteten Fragen des RKI-Fragebogens ermittelt werden. In der Tabelle 2-2 sind die ermittelten Nährstoffe mit Identifizierungsnummer der Datenbank des „*United States Department of Agriculture*“ USDA aufgelistet. Zudem wurden die Einheiten der Nährstofftabelle für die spätere Verrechnung speziell angepasst, sodass sie der im Fragebogen erfragten Menge übereinstimmten (z.B. pro Portion / pro Glas / pro Flasche) (siehe Anhang: 6.3). Die Tabellenkalkulationen in 2.6.1. und 2.6.2 erfolgten mittels Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2018). Die Verrechnung der Daten (Tabelle 2-2. und erhobener Datensatz aus dem Fragebogen) wird separat unter dem Punkt 2.6.2 thematisiert.

2.6.2. Anpassung der Rohdaten des Fragebogens und die Berechnung des Nährstoffkonsums

Für die Auswertung erfolgte eine standardisierte Umwandlung des Datensatzes. Es wurde festgelegt, dass die vergebenen Koeffizienten der Tabelle im Verlauf so konvertiert werden sollten, dass man im Endeffekt die konsumierte „Menge X pro Tag“ errechnet. Die Menge „X“ konnte dann wiederum mit den zuvor in o.g. Tabelle 2-2. erhobenen Nährstoffdaten verrechnet werden, um im Endeffekt den Konsum in „Einheit“ pro Tag des gewünschten Nährstoffs zu errechnen.

Zur Veranschaulichung wird dieser Prozess nun für die erste Frage des Fragebogens beispielhaft erläutert:

Bei der initialen Umwandlung des Fragebogens in einen digitalen Datensatz wurden die Antworten von oben nach unten nummeriert. Die Fragen V1-V53 im Fragebogen zielen immer auf die Häufigkeit des Konsums eines Produktes ab. Es wird folgende Frage gestellt: „Wie oft haben sie in den letzten 4 Wochen folgendes Produkt konsumiert? Die erste Frage bezieht sich also auf die Häufigkeit des Konsums. In diesem Fall wird in der ersten Frage nach Milchkonsum gefragt. Wie man in folgender Tabelle sehen kann, wurden die Antworten zuerst in aufsteigender Reihenfolge mit natürlichen Zahlen nummeriert. Um dann neue Koeffizienten zu errechnen, wurden die Aussagen („Alte Koeffizienten“) auf 4 Wochen, also 28 Tage bezogen errechnet („Rechnung“). Als neuer Koeffizient „1“ wurde hierbei die Aussage „Ein Mal pro Tag“ definiert. Alle anderen Koeffizienten wurden nach dieser Definition angepasst.

Tabelle 2-3. Umrechnung der Koeffizienten für Fragen V1-V53

Alte Koeffizienten	Neue Koeffizienten	Rechnung
„1“ Nie	0	Nie = 0
„2“ 1 Mal im Monat	0,0357	1/28
„3“ 2-3 Mal im Monat	0,0893	2,5/28
„4“ 1-2 Mal pro Woche	0,214	1,5/7
„5“ 3-4 Mal pro Woche	0,5	3,5/7
„6“ 5-6 Mal pro Woche	0,786	5,5/7
„7“ 1 Mal am Tag	1	1 pro Tag wird als Standard definiert.
„8“ 2 Mal am Tag	2	2*1
„9“ 3 Mal am Tag	3	3*1
„10“ 4-5 Mal am Tag	4,5	4,5*1
„11“ Öfter als 5 Mal am Tag	5	

Die Zusatzfrage erhebt Information über die Menge des konsumierten Produktes. In diesem Konkreten Fall wird gefragt: „Wenn Sie Milch trinken, wie viel trinken Sie davon meistens?“ Vorausschauend wurde die in 2-2. gezeigte Tabelle genau nach der „Standardeinheit“ in jeder der im Fragebogen befindlichen Frage zur Mengeneinheit erhoben. Konkret wird hier ein Glas Milch als eine „Standardeinheit“ betrachtet. Somit wird auch hier das eine Glas Milch mit dem Koeffizienten „1“ definiert. Die anderen Mengenangaben werden nach dieser Definition angepasst.

Tabelle 2-4. Beispielumrechnung zur Frage zur Bestimmung der konsumierten Menge

Alte Koeffizienten	Neue Koeffizienten	Rechnung
„1“ 1/2 Glas (oder weniger)	0,5	1/2
„2“ 1 Glas (200ml)	1	Menge 1 wird als Standard definiert.
„3“ 2 Gläser	2	2*1
„4“ 3 Gläser	3	3*1
„5“ 4 Gläser	4	4*1

Nun wurden die Koeffizienten so angepasst, dass man die Menge pro Tag errechnen kann. Hierzu Beispiele:

1. Der Patient gibt an 1 Mal Milch pro Tag zu trinken und hiervon jeweils 1 Glas. Die Rechnung ist dementsprechend: $1 \times 1 = 1$ Glas/Tag
2. Der Patient gibt an 3-4 Mal in der Woche Milch zu trinken. Hiervon trinkt er dann jedoch 2 Gläser. Die Rechnung lautet: $0,5 \times 2 = 1$ Glas/Tag. Im Durchschnitt trinkt er also trotzdem 1 Glas/Tag.
3. Der Patient gibt an 2-3 Mal im Monat Milch zu trinken. Hiervon trinkt er dann nur ein halbes Glas. Die Rechnung lautet: $0,0893 \times 0,5 = 0,04465$ Gläser / Tag.

Für jede Frage des Fragebogens wurde eine solche Umrechnungstabelle angelegt und der Datensatz dementsprechend angepasst. Letztendlich muss noch die Verrechnung mit den ermittelten Nährstoffen erfolgen. In den meisten Fällen kann dies direkt mit Verknüpfung mit der Nährstofftabelle 2-2. erfolgen. In einigen wenigen Fragen, wie auch bei der ersten Frage (Milch), wird nach einer Unterart des jeweiligen Produktes in der darauffolgenden Zusatzfrage gefragt. In diesem Fall: „Welche Art von Milch trinken Sie meistens?“

Tabelle 2-5. Verknüpfung der Nährwerte mit der Frage

Koeffizient	Entspricht in der Nährwertetabelle folgender Spalte
1 Vollmilch (mindestens 3,5% Fett)	V1.1
2 Fettarme Milch (1,5% Fett)	V1.2
3 Magermilch (max. 0,3% Fett)	V1.3
4 Sojamilch	V1.4
5 Laktosefreie Milch	V1.5

Hierbei muss daher ein zusätzlicher Zwischenschritt berücksichtigt werden und die ursprünglich verteilten Koeffizienten „1-5“, welche in diesem Fall den Milchsorten entsprechen mit der korrekten Sorte verknüpft werden.

Zum Verständnis ein letztes Beispiel zu Errechnung des Vitamin B12 Gehalts:

1. Ein Patient trinkt „1 Mal pro Tag“, „1 Glas Milch“ und dabei die Sorte Vollmilch. Die Rechnung lautet: $1 \times 1 \times$ „V1.1 (Vit. B12)“ (aus Tabelle 2-2.). Die Rechnung 1×1 sagt aus, dass 1 Glas Milch pro Tag konsumiert wird. Das Ergebnis wird mit dem Nährstoffgehalt (Vit. B12) der Vollmilch verrechnet: $1 \text{ Glas/Tag} \times 0,93\mu\text{g VitB12}$ entspricht dem Konsum von $0,93\mu\text{g}$ Vitamin B12 durch den Konsum von Milch pro Tag.
2. Ein Patient trinkt „3-4 Mal pro Woche“, „1 Glas Milch“ und dabei die Sorte Magermilch. Die Rechnung lautet: $0,5 \times 1 \times$ „V1.3 (Vit. B12)“ (aus Tabelle 2-2.). Die Rechnung $0,5 \times 1$ sagt aus, dass im Durchschnitt $\frac{1}{2}$ Glas Milch pro Tag konsumiert wird. Das Ergebnis wird mit dem Nährstoffgehalt (Vit. B12) der Magermilch verrechnet: $\frac{1}{2} \text{ Glas/Tag} \times 1,03\mu\text{g Vit. B12}$ entspricht einem durchschnittlichen Konsum von $0,515 \mu\text{g}$ Vit. B12 durch Magermilch pro Tag.

Für jede Frage und Unterfrage des gesamten Fragebogens wurden nach diesem Prinzip alle Koeffizienten so angepasst, dass in 13 separat angelegten Tabellen der Gesamtkonsum von „Gesamtlipidgehalt, Vitamin B6, Folat, Folsäure, Vitamin B12, gesättigten Fettsäuren, einfach-ungesättigten Fettsäuren, mehrfach-ungesättigten Fettsäuren, Cholesterin, Methionin, Glycin, Cholin und Vitamin D“ in „Einheit“ / Tag für jeden einzelnen Patienten bestimmt werden konnte. Die somit errechneten Daten wurden in die Auswertungstabelle eingefügt und konnten nun der Auswertung dienen. (Die Umrechnungstabellen befinden sich im Anhang unter den Punkten 6.1 und 6.2).

2.7. Blutproben und ermittelte Parameter

Während der Sichtung der Patienten in der Ambulanz wurden neben der körperlichen Untersuchung und Erfassung des Aktivitätsscore routinemäßige Blutproben abgenommen.

Bei allen Patienten wurden für die Studie folgende Parameter bestimmt:

- Alter
- *Body-Mass-Index*
- Erkrankungsdauer

- SLEDAI-2k
- Homocystein (Blut)
- Vitamin B6 (Blut)
- Cholesterol (Blut): MUFA / PUFA / SFA
- 25-Hydroxy-Vitamin D (Blut)
- Methylierung des CF40L in CD4+ T-Zellen (siehe 2.7.1)

Letztendlich wurden nach ausführlicher Aufklärung Proben in der Biobank des Instituts zur Analyse der epigenetischen Modifikationen sowie für mögliche Folgeprojekte im Hiller-Forschungszentrum eingefroren:

- 4 EDTA-Röhrchen (T- und B-Zellisolierung, Epigenetik, funktionelle Studien)
- 1 Serumröhrchen (CD40L-Messung, Reserve)

2.7.1. Methylierung des CD40L in CD4+ T-Zellen

Die Methoden zur Bestimmung der Methylierung des CD40L in CD4+ T-Zellen, sowie die Bestimmung selbst, resultieren aus anderen Arbeit der Arbeitsgruppe (Vordenbaumen et al., 2021, Rosenbaum et al., 2016) und werden an dieser Stelle zusammengefasst:

Isolation der CD4+ T-Zell DNA

„Aus den EDTA Blutproben wurden periphere mononukleäre Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Danach wurden die Zellen in 4ml *autoMACS Running Buffer* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) resuspendiert und anschließend nach Herstellerangaben unter Benutzung von „*CD4 MicroBeads human isolation kit*“ (Miltenyi Biotec GmbH) getrennt. Anschließend erfolgte die Isolation der DNA mit „*Magnetic beads*“ mittels *MagCore (MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit*, RBC Bioscience, New Taipei City, Taiwan)“ (Vordenbaumen et al., 2021).

Erheben der CD40L Promotor und *Enhancer* Methylierung in CD4+ T-Zellen

Zur quantitativen Analyse aberrant-methylierter CG-reicher Regionen für eine größere Kohorte wurden zuvor insgesamt 21 Bereiche, davon 6 für die Promotor Region, sowie insgesamt 15 Bereiche für die *Enhancer* Region des CD40L-Gens ausgewählt (siehe Anhang 6.6.). Die Bereiche wurden mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert. (Vordenbaumen et al., 2021)

In dieser Studie wurde mittels genannter Methode die mittlere Methylierung des gesamten CD40L, sowie zuvor identifizierten signifikanten mit der Krankheitsaktivität assoziierten Methylierungsstellen CpG17 und CpG22 bestimmt (Vordenbaumen et al., 2021).

2.8. Referenzwerte – Empfohlene Tagesdosis

Zur geplanten Analyse der erhobenen Daten wurden für die erhobenen Ernährungsparameter Referenzwerte für empfohlene Tagesdosen recherchiert. Im Folgenden werden diese in Tabelle 2-6. dargestellt.

Tabelle 2-6. Referenzwerte – Empfohlene Tagesdosis für Erwachsene

Nährstoff	Männlich*	Weiblich	Erläuterung	Quelle
Gesättigte Fettsäuren	13 g/d	13 g/d		(AHA, 2020)
Ungesättigte Fettsäuren (n6)	17 g/d	12 g/d		(Medicine, 2005)
Ungesättigte Fettsäuren (n3)	1,6 g/d	1,1 g/d		(Medicine, 2005)
PUFA Gesamt (n6+n3)	18,6 g/d	13,1 g/d		(Medicine, 2005)
Cholesterol	< 300 mg/d	< 300 mg/d	Geringe Zufuhr vorteilhaft.	(DGE, 2010)
Vit. B6	1,6 mg/d	1,4 mg/d		(DGE, 2020)
Folat	300 µg/d	300 µg/d		(Medicine, 2005)
Folsäure			In Folat inbegriffen.	
Vit. B12	4 µg/d	4 µg/d		(DGE, 2020)
Vit. D	20 µg/d oder 800 IU	20 µg/d oder 800 IU		(DGE, 2020)
Methionine	10,4 mg/kg KG /d	10,4 mg/kg KG /d		(Joint et al., 2007)
Cysteine	4,1 mg/kg KG /d	4,1 mg/kg KG /d		(Joint et al., 2007)
Choline	550 mg/d	425 mg/d		(Institute of Medicine et al., 1998)
* Für diese Studie sind lediglich die Referenzwerte für die weibliche Population relevant. Zum Vergleich wurden die Referenzwerte für die männliche Population in diese Tabelle aufgenommen.				

2.9. Statistische Auswertung

Assoziationen zwischen DNA-Methylierung an spezifischen Stellen in Bezug auf den Konsum bestimmter Nährstoffe sowie in Bezug auf Krankheitsaktivität wurden mittels linearer Regression analysiert. Die p-Werte wurden nach Benjamini & Hochberg adjustiert. Zudem wurde das Modell für den BMI adjustiert. Assoziationen zwischen DNA-Methylierung und Nahrungsmittelaufnahme wurden mittels univariabler linearer Regression, gefolgt von multivariabler linearer Regression der Nährstoffe, welche eine signifikante bis grenzwertig-signifikante Assoziationen ($p < 0,1$) aufwiesen, analysiert. Die Krankheitsaktivität wurde nach SLEDAI-Score erfasst. Die statistische Auswertung und Visualisierung erfolgten mit den Programmen „R – Version 3.5.2“ (R Development Core Team, 2018) und Affinity Photo (Serif Europe Ltd., 2021). Die

Fragebogendaten wurden mit dem Programm EpiData EntryClient (Lauritsen JM & Bruus M, 2000-2008) und EpiData Manager (Lauritsen JM., 2000-2008) erfasst.

3. Ergebnisse

3.1. Patienten

In der gesamten Kohorte waren initial 127 Frauen (61 mit Zustimmung für die Analyse der epigenetischen Analysen) und 18 Männer eingeschlossen. Aufgrund der teils unterschiedlichen Ausprägung der Methylierung des X-Chromosoms bei Frauen und Männern mit SLE (Hewagama et al., 2013, Lu et al., 2007), und der geringen Population an männlichen SLE-Patienten wurde im Weiteren ausschließlich die weibliche Population mit vorliegenden Daten zur Methylierung ausgewertet.

Somit ergab sich für die Methylierungsanalysen eine Kohorte bestehend aus 61 weiblichen SLE-Patienten im Alter von $45,7 \pm 12$ Jahren und einer Erkrankungsdauer von $16 \pm 8,4$ Jahren. Die immunsuppressive Therapie der Patienten bestand vornehmlich aus Antimalariamitteln (68,9%) und Glukokortikoiden (63,9% mit einer mittleren täglichen Dosis von $4,8 \pm 2,4$ mg). Tabelle 3-1. zeigt einen Überblick über die analysierte Kohorte. Zudem ist in der Tabelle die mittlere tägliche Zufuhr der Nährstoffe Vitamin B6, Vitamin B12, Folat, Methionin, Cholin und Cystein angegeben.

Tabelle 3-1. Überblick über die weibliche Kohorte mit Daten zur Methylierung

Weibliche Patienten mit Daten zur Methylierung			
	Anzahl (n)	MW	σ
Alter (Jahre)	61	45,7	12,0
BMI	61	25,1	4,4
Erkrankungsdauer (Jahre)	61	16,24	8,44
SLEDAI	60	4,7	5,2
Homocystein in $\mu\text{mol/l}$ (gemessen im Blut)	56	15,2	5,8
VitB6 in $\mu\text{g/l}$ (gemessen im Blut)	46	16,5	25,2
Antimalariamittel	42 (68,9%)		
Glukokortikoide	39 (63,9%)		
Azathioprin	9 (14,8%)		
Mycophenylat	5 (8,2%)		
Rituximab	4 (2,4%)		
Belimumab	3 (4,9%)		
Methotrexat	2 (1,2%)		
Ciclosporin	3 (1,8%)		
Folgende Nährstoffangaben sind aus dem FFQ ermittelt:			
VitB6 in mg/d	61	2,0	1,2
Folat in $\mu\text{g/d}$	61	269,6	129,1
VitB12 in $\mu\text{g/d}$	61	4,4	3,0
Methionin in g/d	61	1,7	0,8
Cholin in mg/d	61	302,9	137,9
Cystein in mg/d	61	871,4	351,6
n = Anzahl, MW = Mittelwert, σ = Standardabweichung, FFQ = Fragebogen, d = Tag			

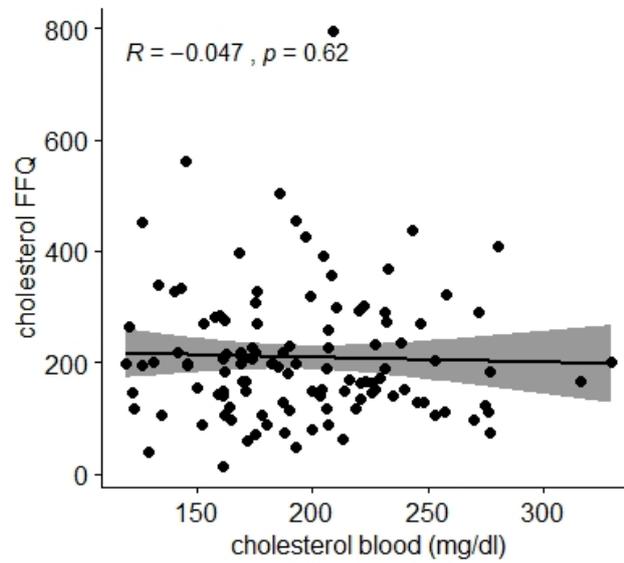
3.2. Beantwortung der Fragestellungen

1. Korrelieren die im Fragebogen ermittelten Werte mit den Blutmesswerten (Vit. D, Vit. B6, Cholesterol)?

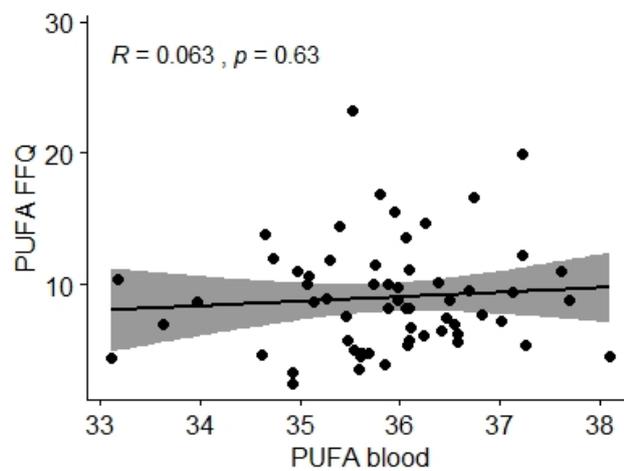
Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden sowohl aus dem Fragebogen, als auch aus dem Blut folgende Parameter ermittelt: Cholesterol, einfach ungesättigte Fettsäuren (MUFA), mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA), gesättigte Fettsäuren (SFA), Vitamin B6 und Vitamin D. In der Analyse zeigte sich, dass die ermittelten Werte aus dem Fragebogen und Messwerte im Blut für die Fettsäuren (PUFA: $p=0,63$; MUFA: $p=0,55$; SFA: $p=0,075$), Vitamin B6 ($p=0,55$) Vitamin D ($p=0,58$) und Cholesterol ($p=0,62$) nicht gut übereinstimmten.

Der Rangkorrelationskoeffizient (R) nach Spearman wurde bestimmt. Die Veranschaulichung erfolgt in den folgenden Graphen.

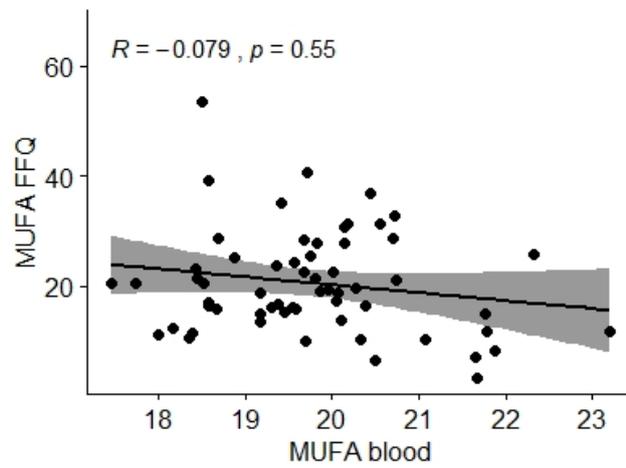
a) **Cholesterol**: $R = -0,047$, $p = 0,62$



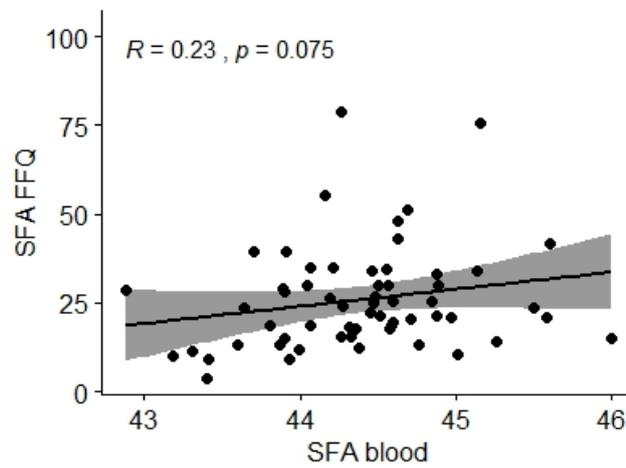
b) **PUFA** (polyunsaturated fatty acids): $R = 0,063$, $p = 0,63$



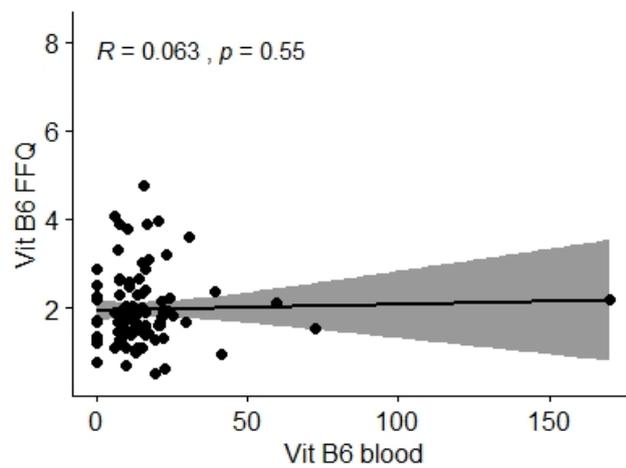
c) **MUFA** (monounsaturated fatty acids): $R = -0,079$, $p = 0,55$



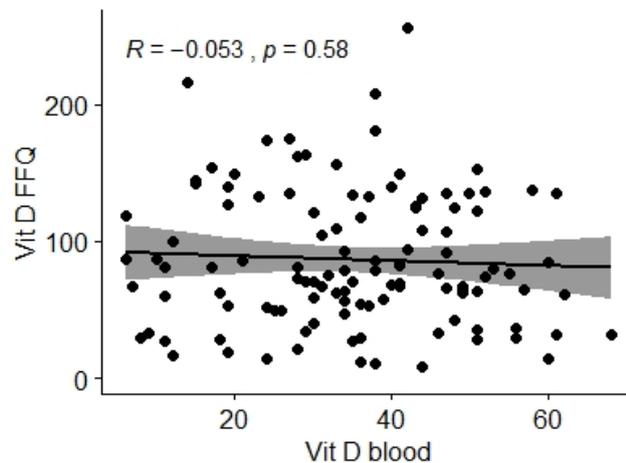
d) **SFA** (saturated fatty acids): $R = 0,23$, $p = 0,075$



e) **Vit. B6**: $R = 0,063$, $p = 0,55$



f) **Vit. D:** $R=-0,053$, $p=0,58$



2. Ist die Krankheitsaktivität (SLEDAI) abhängig von der Methylierung des CD40-Liganden?

In einer vorherigen Studie konnte bereits nachgewiesen werden, dass bestimmte Methylierungsstellen im Promotor CD40L-Gen mit der Krankheitsaktivität assoziiert sind (Vordenbaumen et al., 2021). Dies bestätigte sich erneut in der Analyse der Daten. Die Krankheitsaktivität ist assoziiert mit Hypomethylierungen an CpG17 & CpG22 des CD40L bei Frauen mit SLE.

SLE~ CD40L-Methylierung	E	2,5% KI	97,5% KI	p	p (adj.)
Mittlere Methylierung	-21,89	-77,65	33,88	0,4347	0,4347
CpG17	-32,57	-60,56	-4,57	0,0234	0,0351
CpG22	-38,28	-61,20	-15,36	0,0015	0,0044

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit,
p (adj.) = Adjustierte Irrtumswahrscheinlichkeit

3. Ist die Methylierung der T-Zell-DNA des CD40-Liganden mit einer methylendonatorenreichen Ernährung, gemessen an dem Fragebogen und mittels im Blut ermittelten Biomarkern, assoziiert?

Im Folgenden werden die einzelnen Methylendonatoren bzw. Substrate im C1-Zyklus mit der mittleren Methylierung, sowie der ermittelten kritischen Stellen des CD40L abgeglichen.

- a) **Methionin** (aus FFQ): Methionin ist direkter Vorläufer von S-Adenosyl-Methionin (SAM), dem Substrat für DNA-Methylierung im C1-Zyklus.

Hypothese: DNA-Methylierung ~ Methionin (g/d)

Ergebnis: Methionin ist assoziiert zur mittleren CD40L-Methylierung und an CpG17. Umgerechnet ergibt sich hieraus, dass eine Erhöhung der Methioninzufuhr um 498 mg pro Tag mit einer 10 % höheren Methylierungsrate von CpG17 verbunden ist. In ähnlicher Weise ist eine Erhöhung der Methioninzufuhr um 949 mg pro Tag mit einer 10 % höheren mittleren Methylierungsrate des gesamten CD40L-Promotors assoziiert.

CD40L-Methylierung ~ Methionin (g/d) FFQ	E	2,5% KI	97,5% KI	p	p (adj.)
Mittlere Methylierung	9,49	1,02	17,96	0,03	0,04
CpG17	4,98	0,58	9,39	0,03	0,04
CpG22	2,56	-1,35	6,48	0,19	0,19

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit, p (adj.) = Adjustierte Irrtumswahrscheinlichkeit

- b) **Folat und Cholin** (aus FFQ): C1-Donatoren, deren Methylgruppen aus Homocystein Methionin generieren lassen, sind Folat und Cholin (via Betain).

Hypothese: DNA-Methylierung ~ Cholin ($\mu\text{g/d}$), DNA-Methylierung ~ Folat ($\mu\text{g/d}$)

Ergebnis: Cholin, aber nicht Folat, ist assoziiert zur mittleren CD40L-Methylierung. Damit ist eine Erhöhung von 168 mg Cholin pro Tag mit einer 10% höheren mittleren Methylierungsrate des gesamten CD40L-Promotors verbunden.

CD40L-Methylierung ~ Cholin (g/d) FFQ	E	2,5% KI	97,5% KI	p	p (adj.)
Mittlere Methylierung	1,68	0,37	2,99	0,01	0,04
CpG17	0,63	-0,08	1,35	0,08	0,12
CpG22	0,18	-0,45	0,80	0,57	0,57

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit, p (adj.) = Adjustierte Irrtumswahrscheinlichkeit

CD40L-Methylierung ~ Folat ($\mu\text{g/d}$) FFQ	E	2,5% KI	97,5% KI	p	p (adj.)
Mittlere Methylierung	718,07	-571,00	2007,14	0,27	0,81
CpG17	12,74	-676,63	702,11	0,97	0,97
CpG22	18,93	-576,93	614,78	0,95	0,97

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit, p (adj.) = Adjustierte Irrtumswahrscheinlichkeit

c) **Homocystein** (aus Blut): Homocystein kann einerseits durch den Folatzyklus oder durch Cholin/Betain zu Methionin umgewandelt werden, andererseits aber auch über Vitamin B6 zu Cystathion und letztendlich zu Glutathion (GSH).

Hypothese: 1/Methylierung \sim Homocystein ($\mu\text{mol/l}$)

Ergebnis: Keine Signifikante Assoziation zu der Methylierung.

CD40L-Methylierung ~ Homocystein ($\mu\text{mol/l}$)	E	2,5% KI	97,5% KI	p	p (adj.)
Mittlere Methylierung	-4,97	-61,53	51,60	0,86	0,86
CpG17	30,91	-0,97	62,79	0,06	0,17
CpG22	20,37	-7,94	48,68	0,15	0,23

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit, p (adj.) = Adjustierte Irrtumswahrscheinlichkeit

d) **Cystein** (aus FFQ): Aus Cystein wird Glutathion generiert, welches ein Redoxhemmer ist. Glutathion übt eine verstärkende Wirkung auf die MAT1 (C1-Zyklus) aus, indem es oxidativen und nitrosativen Stress inhibiert.

Hypothese: Methylierung \sim Cystein ($\mu\text{g/d}$)

Ergebnis: Cystein als Substrat für Homocystein und auch für das Antioxidans Glutathion ist assoziiert zur mittleren CD40L-Methylierung und an CpG17. Somit ist eine Erhöhung von 238 mg pro Tag mit einer 10 % höheren Methylierungsrate von CpG17 und eine Erhöhung von 434 mg pro Tag mit einer 10 % höheren mittleren Methylierungsrate des gesamten CD40L-Promotors verbunden.

CD40L-Methylierung ~ Cystein (g/d)	E	2,5% KI	97,5% KI	p	p (adj.)
Mittlere Methylierung	4,34	0,94	7,74	0,01	0,02
CpG17	2,38	0,61	4,15	0,009	0,02
CpG22	0,99	-0,62	2,59	0,22	0,22

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit, p (adj.) = Adjustierte Irrtumswahrscheinlichkeit

- e) **Vit. B6 und Vit. B12** (Vit. B6 aus Blut und FFQ, Vit. B12 aus Fragebogen):
 Vitamin B6 katalysiert den Folsäurezyklus und die Metabolisierung von Cystein zu Homocystein, Vitamin B12 die Metabolisierung von Homocystein zu Methionin.

Hypothese: Vitamine ~ Methylierung

Ergebnis: Die Katalysatoren Vitamin B6 und B12 sind nicht assoziiert zur CD40L-Methylierung (Blut und FFQ).

CD40L-Methylierung~ Vit B6 (mg/d) (FFQ)	E	2,5% KI	97,5% KI	p	p (adj.)
Mittlere Methylierung	6,91	-4,74	18,56	0,24	0,72
CpG17	0,25	-5,93	6,44	0,93	0,93
CpG22	0,88	-4,46	6,23	0,74	0,93

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit, p (adj.) = Adjustierte Irrtumswahrscheinlichkeit

CD40L-Methylierung~ Vit B6 ($\mu\text{g/l}$) (Blut)	E	2,5% KI	97,5% KI	p	p (adj.)
Mittlere Methylierung	-81,49	-415,32	252,34	0,62	0,86
CpG17	16,32	-170,26	202,90	0,86	0,86
CpG22	23,37	-142,02	188,75	0,78	0,86

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit,
p (adj.) = Adjustierte Irrtumswahrscheinlichkeit

CD40L-Methylierung~ Vit B12 ($\mu\text{g/d}$) (FFQ)	E	2,5% KI	97,5% KI	p	p (adj.)
Mittlere Methylierung	24,82	-5,60	55,24	0,11	0,16
CpG17	12,85	-2,88	28,58	0,11	0,16
CpG22	5,02	-8,83	18,86	0,47	0,47

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit,
p (adj.) = Adjustierte Irrtumswahrscheinlichkeit

4. Gibt es eine direkte Assoziation der erhobenen Nährstoffdatenangaben und insbesondere bezüglich der Methylendonatoren mit der Krankheitsaktivität?

Im Folgenden wurde analysiert, ob einzelne Nährstoffe eine Assoziation zu der Krankheitsaktivität besitzen.

Hypothese: SLEDAI ~ Nährstoffe

Ergebnis: Die Nährstoffe sind für sich genommen nicht direkt mit der Krankheitsaktivität assoziiert.

SLEDAI~ Nährstoffe	E	2,5% KI	97,5% KI	p	p (adj.)
Methionin (g/d)	-0,4047	-1,42	0,61	0,43	0,90
Folat ($\mu\text{g/d}$)	0,0005	-0,01	0,01	0,89	0,96
Cholin (mg/d)	-0,0013	-0,01	0,00	0,67	0,90
Homocystein ($\mu\text{mol/l}$)	-0,0454	-0,20	0,11	0,56	0,90
Cystein (mg/d)	-0,0005	0,00	0,00	0,66	0,90
Vit. B6 (FFQ) (mg/d)	-0,0222	-0,90	0,85	0,96	0,96
Vit. B6 (Blut) ($\mu\text{g/l}$)	0,0331	-0,01	0,07	0,11	0,86
Vit. B12 (FFQ) ($\mu\text{g/d}$)	-0,1665	-0,46	0,12	0,26	0,90

E = Regressionskoeffizient (β), KI = Konfidenzintervall, p = Irrtumswahrscheinlichkeit,
p (adj.) = Adjustierte Irrtumswahrscheinlichkeit

5. Gibt es eine Indikatornahrung für die DNA-Methylierung?

Zuletzt erfolgte die Analyse der einzelnen Methylierungsmarker (Global, CpG17, CpG22) mittels linearen Modells, adjustiert für Alter und BMI bezüglich der Hauptlieferanten für Cholin, Methionin und Cystein. Zuvor wurden diesbezüglich Tabellen zur Ermittlung derjenigen Fragen mit für die Fragestellung relevantem Nährstoffgehalt erstellt. Ein „cut-off“ für die relevanten Fragen von ca. 3,3% des täglichen Nährstoffbedarfs pro Portion wurde definiert. Die Tabellen können dem Anhang (Punkt 6.4. Identifikation der relevanten Fragen im RKI-Fragebogen zur Ermittlung von Methylierungsmarkern) entnommen werden. In einem nächsten Schritt erfolgte eine multivariable Analyse der Hauptlieferanten (Mengen kombiniert). Die einzelnen Fragen wurden dabei (kombiniert) auf eine Assoziation mit der globalen Methylierung sowie den relevanten Stellen CpG17 und CpG22 überprüft. Die Auswertungstabellen können ebenfalls dem Anhang (Punkt 6.5. Identifikation der relevanten Fragen im RKI-Fragebogen zur Ermittlung von Methylierungsmarkern) entnommen werden. Somit konnte die Nahrung mit den größten Assoziationen zur Methylierung bestimmt werden:

- Fleisch ($\beta = 0,025$; $p = 0,038$) – zu mittlerer Methylierung
- Eiscreme ($\beta = 0,063$; $p = 0,009$) – zu mittlerer Methylierung
- Weißbrot ($\beta = 0,03$; $p = 0,036$) – für CpG22

- gekochte Kartoffeln ($\beta = 0,062$; $p = 0,005$) – für CpG17

Somit führt der mittlere, jeweils tägliche Konsum

- einer Portion Fleisch zu einem Anstieg der mittleren CD40L Methylierung von 2,5%.
- einer Portion Eiscreme zu einem Anstieg der mittleren CD40L Methylierung von 6,3%.
- einer Portion Weißbrot zu einem Anstieg der CpG22 Methylierung von 3%.
- einer Portion gekochter Kartoffeln zu einem Anstieg der CpG17 Methylierung von 6%.

Ergebnisse der Analyse weiterer Nahrung lassen sich aus Tabelle 3-2 entnehmen.

Tabelle 3-2. Nahrung mit der größten Assoziation zur Methylierung

Nahrung (Portion pro Tag)	CpG17		CpG22		Mean CD40L	
	β (95%-CI)	p_{univ} (p_{mult})	β (95%-CI)	p_{univ} (p_{mult})	β (95%-CI)	p_{univ} (p_{mult})
Pizza	0.19 (0.01-0.36)	0.04 (0.2)	-0.003 (-0.24-0.18)	0.8 (NA)	0.031 (-0.07-0.13)	0.5 (NA)
Milchprodukte	0.03 (0.001-0.05)	0.047 (0.054)	0.012 (-0.02-0.04)	0.4 (NA)	0.01 (-0.001-0.02)	0.1 (NA)
Pommes	0.25 (0.01-0.48)	0.04 (0.19)	0.1 (-0.17-0.39)	0.4 (NA)	0.1 (-0.04-0.23)	0.1 (NA)
Gekochte Kartoffeln	0.06 (0.02-0.1)	0.004 (0.005)	0.03 (-0.02-0.08)	0.2 (NA)	0.02 (0.001-0.05)	0.046 (0.12)
Weißbrot	0.02 (-0.01-0.05)	0.2 (NA)	0.03 (-0.001-0.06)	0.09 (0.04)	-0.003 (-0.02-0.01)	0.8 (NA)
Bier	0.18 (-0.19-0.55)	0.3 (NA)	0.39 (-0.03-0.81)	0.07 (0.1)	0.04 (-0.17-0.24)	0.7 (NA)
Früchtetee / Kräutertee	0.003 (-0.01-0.01)	0.6 (NA)	0.012 (-0.001-0.02)	0.06 (0.06)	0.005 (-0.001-0.01)	0.1 (NA)
Fleisch	0.025 (-0.01-0.07)	0.2 (NA)	0.002 (-0.04-0.05)	0.9 (NA)	0.025 (0.001-0.05)	0.02 (0.04)
Eiscreme	0.06 (-0.04-0.2)	0.2 (NA)	0.008 (-0.1-0.12)	0.9 (NA)	0.063 (0.01-0.11)	0.01 (0.009)

3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

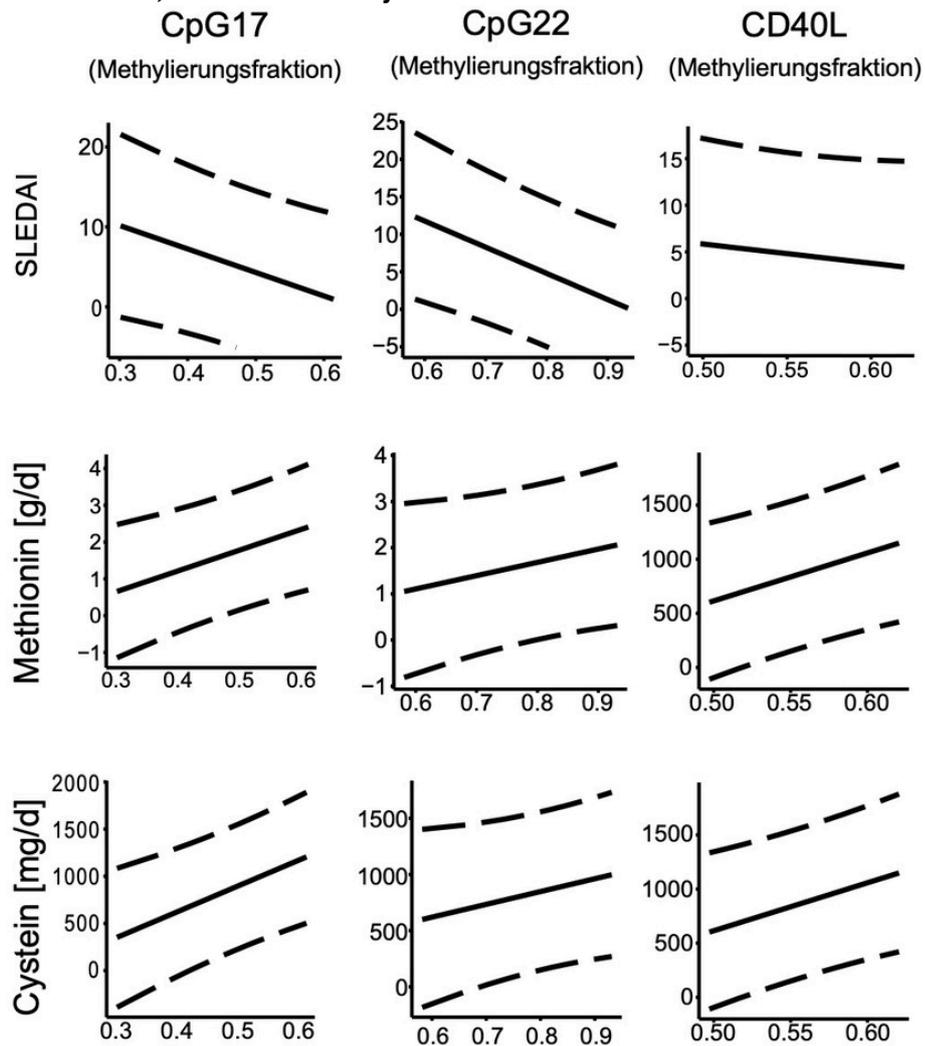
Zusammengefasst zeigten sich folgende Ergebnisse:

- Ermittelte Werte aus dem Fragebogen und Messwerte im Blut stimmen für Fettsäuren, Vitamin B6, Vitamin D und Cholesterol nicht gut überein.
- Es bestätigt sich, dass die Krankheitsaktivität mit Hypomethylierungen an CpG17 & CpG22 des CD40L bei Frauen mit SLE assoziiert ist.
- Methionin ist zur mittleren CD40L-Methylierung und an CpG17 assoziiert.
- Cholin, aber nicht Folat, ist zur mittleren CD40L-Methylierung assoziiert.

- Cystein und auch für die Antioxidans Glutathion sind zur mittleren CD40L-Methylierung und an CpG17 assoziiert.
- Die Katalysatoren Vitamin B6 und B12 sind nicht zur CD40L-Methylierung assoziiert.
- Die Nährstoffe sind für sich genommen nicht direkt mit der Krankheitsaktivität assoziiert.
- Die Nahrungsmittel mit den stärksten signifikanten Assoziationen zur Methylierung sind V30 (Fleisch), V50 (Eiscreme), V19 (Weißbrot) und V42 (gekochte Kartoffeln)

Die wichtigsten Assoziationen der Methylierungsfractionen von CpG17, CpG22 der Fraktion des CD40L sind für SLEDAI, Methionin und Cystein in der folgenden Abbildung zusammengefasst.

Abbildung 3. Assoziationen der Methylierungsfraction von CpG17, CpG22 und CD40L im Vergleich zu SLEDAI, Methionin und Cystein



Legende zu Abbildung 3: Die Fraktion der methylierten CpG-Stellen des CD4 T-Zell CD40L an zwei verschiedenen Stellen (CpG17, CpG22) und des gesamten CD40L wurde mit dem SLEDAI und der durch den RKI-Ernährungsfragebogen ermittelten Aufnahme von Methionin- und Cystein verglichen. Die Linien stellen die Steigung der linearen Regressionsanalyse, bereinigt um Alter und *Body-Mass-Index* dar, die gestrichelten Linien die Vorhersageintervalle.

4. Diskussion

Sowohl genetische als auch Umweltfaktoren spielen eine essentielle Rolle bei der Krankheitsgenese sowie der Krankheitsausprägung beim systemischen Lupus erythematoses (Alarcon-Riquelme, 2019, Renauer et al., 2015, Richardson, 2019, Lanata et al., 2018). Zudem gibt es diverse Assoziationen verschiedener dysregulierter immunologischer Prozesse (Pan et al., 2020). Ebenfalls gewinnt der Einfluss der Ernährung auf epigenetische Modifikationen und die daraus resultierende Beeinflussung der Genexpression zunehmend an Beachtung und Anerkennung (Sedley, 2020). Unter anderem beim SLE scheint dieser Aspekt eine besondere Stellung einzunehmen, da in Bezug auf diverse Mikronährstoffe Dysbalancen beschrieben wurden (Borges et al., 2012, Islam et al., 2020).

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss nutritiver Methylendonatoren auf die CD40L-Methylierung von T-Zellen und die Krankheitsaktivität bei Patientinnen mit SLE zu erforschen. Um eine mögliche Assoziation der CD40L-Methylierung abhängig von Nahrung zu bestimmen, wurde hierfür der Konsum bestimmter Mikronährstoffe (u.a. Methylendonatoren) bei SLE Patienten mittels validiertem Ernährungsfragebogen (Haftenberger et al., 2010) ermittelt.

In einer vorherigen Studie konnte bereits gezeigt werden, dass Hypomethylierung an bestimmten Schlüsselstellen (CpG17 und 22) innerhalb der CD40L-Promotor-Region mit einer erhöhten Krankheitsaktivität bei Frauen mit SLE assoziiert war (Vordenbaumen et al., 2021). Dies bestätigte sich auch in dieser Arbeit. Zudem stellte es eine erste Parallele zu einer Studie dar, in der sich herausstellte, dass für SLE-anfällige Mäuse unter methylendonatorenreicher Ernährung eine erhöhte Methylierung des CD40L in T-Zellen sowie eine signifikant erniedrigte Krankheitsaktivität besaßen (Strickland et al., 2013).

In der weiteren Auswertung der erhobenen Daten zeigten sich in Bezug auf die Nahrung und Methylendonatoren signifikante Assoziationen zwischen erhöhter Methylierung des CD40L und den konsumierten Mikronährstoffen Methionin für

CpG17 und die mittlere CD40L-Methylierung, Cystein für CpG17 und der mittleren Methylierung des CD40L sowie Cholin für die mittlere Methylierung des CD40L. Eine homogene Assoziation der Mikronährstoffe auf die spezifischen Methylierungsstellen konnte nicht nachgewiesen werden. Es könnte sein, dass dies durch eine relativ kleine Kohorte von 61 Patientinnen im Rahmen der statistischen Auswertung bedingt ist. Es aber auch denkbar, dass unterschiedliche Nährstoffkonzentrationen auf anderen Wegen nur bestimmte Methylierungsstellen begünstigen oder bestimmte Stellen für Enzyme bereits bei geringeren Konzentrationen der oben genannten Nährstoffe zugänglich sind.

Ebenfalls konnte keine Assoziation zwischen DNA-Methylierung und den Vitaminen B6 und B12 nachgewiesen werden. Bei örtlicher und auch zeitlicher Variabilität der Qualität der Nahrung und dem Ernährungsstil könnte es jedoch durchaus sein, dass sich dies bei Populationen mit Defiziten der genannten Vitamine anders darstellt (Imamura et al., 2015). Die in dieser Studie analysierte Kohorte zeigte im Durchschnitt beispielsweise normwertige Vitamin B6 Serumspiegel. Somit kann es sein, dass der Vitaminhaushalt (Vit. B6/B12) in dieser Kohorte keinen limitierenden Faktor in Bezug auf den C1-Zyklus und die DNA-Methylierung darstellten.

Auch wenn die erhobenen Daten mittels Fragebogen nicht unbedingt die Verfügbarkeit der Mikronährstoffe auf zellulärer Ebene repräsentiert (Sedley, 2020), legen sie dennoch eine gewisse Assoziation zwischen dem Konsum von Methylendonatoren (Cystein, Methionin, Cholin) und der DNA-Methylierung nahe. Die Ergebnisse unterstützen somit die Beobachtungen des oben genannten Mausversuchs (Strickland et al., 2013). Eine ausreichende Aufnahme der genannten Mikronährstoffe könnte also die Krankheitsaktivität bei SLE-Patienten und Ausprägung von Symptomen positiv beeinflussen. Dabei muss beachtet werden, dass eine vermehrte Aminosäure- und somit auch Proteinaufnahme auch schädliche Effekte, beispielhaft auf die Nierenfunktion, mit sich bringen kann (Milovanov lu et al., 2009). Gegebenenfalls ist daher eine selektive, gezielte Supplementierung mittels Nahrungsergänzungsmitteln oder bestimmter Medikamente bei nachgewiesenem Nährstoffmangel zu erwägen.

Beispielsweise konnte durch Folatsubstitution der C1-Zyklus positiv beeinflusst werden (Poirier et al., 2001), und eine Assoziation mit einer generellen Erhöhung der DNA-Methylierung gezeigt werden (Anderson et al., 2012). MTX wird als Folsäure-Analogon in der SLE-Therapie genutzt und behindert somit die DNA-Synthese sowie die Zellteilung (Zhao et al., 2020). Zur Linderung der Nebenwirkungen bei MTX-Therapie wird Folat substituiert (Baran et al., 2014). Da MTX und Folsäure somit als Gegenspieler zu betrachten sind, könnte man vermuten, dass MTX auch die DNA-Methylierung beeinflusst. Diesbezüglich gibt es keine spezifische Studie zur MTX-Einnahme bei SLE-Patienten. In der Literatur finden sich in Studien divergente Ergebnisse. Einerseits wird über die Assoziation eines Anstiegs unter MTX-Therapie (Oosterom et al., 2018, Forster et al., 2017, de Andres et al., 2015), andererseits auch in Mensch- (Guderud et al., 2020) und Tierversuchen (Kusari et al., 2017) über eine Verminderung der globalen Methylierung berichtet. Für SLE-Patienten wäre es besonders interessant, ob und welche Assoziation es mit den oben genannten SLE-relevanten Genloci unter MTX-Therapie gibt.

Eine N-Cysteinsubstitution war mit einer Verbesserung der Krankheitssymptome bei SLE assoziiert (Lai et al., 2012) und weist positive Effekte auf zellulärer und genetischer Ebene auf (Shah et al., 2014). An dieser Stelle soll unabhängig von der Funktion des Cysteins als Methylendonator auch auf die Auswirkung des Mikronährstoffes auf den zellulären oxidativen Stress eingegangen werden. Cystein als wichtigstes Substrat (Lyons et al., 2000) zur Generierung von GSH, dem „wichtigsten niedermolekularem Antioxidans, das in den Zellen synthetisiert wird“ (Forman et al., 2009), war zur mittleren CD40L-Methylierung und an CpG17 assoziiert. Durch Katalyse des C1-Stoffwechsels als Antioxidans durch Enthemmen von MAT1 (Avila et al., 1998) kann es durchaus sein, dass oxidativer Stress einen höheren Stellenwert bei dem Prozess der DNA-Methylierung besitzt, insbesondere weil bereits positive Effekte auf zellulärer und genetischer Ebene bei SLE Patienten in Bezug zu Krankheitsaktivität und Endorganschaden durch N-Acetyl-Cystein-Substitution gezeigt werden konnten (Shah et al., 2014). Gegebenenfalls gibt es weitere Schnittstellen, welche durch gezielte Ernährung

auch im Bereich des oxidativen Stresses beeinflusst und in Zukunft erforscht werden können (Pizzino et al., 2017).

Auf Basis der genannten möglichen positiven Effekte der spezifischen Nährstoffsubstitution ermittelten wir, ob sich in unserer Studie ohne gezielte Substitution eine direkte Assoziation einzelner Nährstoffe in Bezug auf die Krankheitsaktivität nachweisen ließ. Hierbei zeigte sich in Bezug auf den SLEDAI keine signifikante Assoziation der einzelnen Nährstoffe. Dies könnte an einer zu geringen Probandenzahl liegen, um einen signifikanten Effekt in diesem komplexen Zusammenspiel verschiedener Nährstoffe im C1-Zyklus (Mentch and Locasale, 2016) nachzuweisen. Gegebenenfalls ist auch das Zuführen eines einzelnen Nährstoffes nicht ausschlaggebend, sondern eine Kombination mehrerer nötig. So ist der Effekt eines einzelnen Nährstoffes auf die Verfügbarkeit von SAM (Oaks and Perl, 2014) und die Funktion der DNMTs (Li and Zhang, 2014) abhängig von verschiedenen Faktoren, unter anderem auch vom oxidativen und nitrosativen Zellstress (Avila et al., 1998). Außerdem können nicht nur am C1-Zyklus beteiligte Nährstoffe, sondern zum Beispiel auch Fettsäuren (insbesondere mehrfach-ungesättigte Fettsäuren) einen Einfluss auf die DNA-Methylierung ausüben, wobei der Einfluss wahrscheinlich von der Bioverfügbarkeit anderer Cofaktoren und Methylendonatoren abhängig ist (Kulkarni et al., 2011, Sarabi and Naghibalhossaini, 2018).

Gegebenenfalls kann ein Effekt einzelner Nährstoffe auch erst durch eine höhere Substitutionsdosis erreicht werden. Im Fall der positiven Assoziation der N-Acetylcystein-Substitution in Bezug auf die Krankheitsaktivität (Lai et al., 2012), ergab sich bei einer Dosis von 1,2 g/Tag kein Effekt, bei 2,4 g/Tag und 4,8 g/Tag jedoch nachweislich die Reduktion der Krankheitsaktivität. Zum Vergleich liegt die empfohlene Tagesdosis von Cystein bei einer Person mit 70kg Körpergewicht bei ca. 0,28g/Tag. Somit zeigte sich in der genannten Studie erst ab einer empfohlenen zirka 10-fachen Tagesdosis ein signifikanter Effekt. Weitere Untersuchungen und Studien bei der Substitution der genannten Methylendonatoren mit gegebenenfalls an diesen Gedanken angepassten

Substitutionsdosen könnten mehr Aufschluss über deren Wirkungen bei SLE ergeben.

Unabhängig von einzelnen Nährstoffen wurde auch analysiert, ob eine Indikatornahrung unter den Hauptlieferanten für Cholin, Methionin und Cystein für die DNA-Methylierung bei SLE zu ermitteln ist. Hierbei wurden Fleisch ($\beta = 0,025$; $p = 0,038$) und Eiscreme ($\beta = 0,063$; $p = 0,009$) in Bezug auf die mittlere Methylierung, Weißbrot ($\beta = 0,03$; $p = 0,036$) für CpG22 und gekochte Kartoffeln ($\beta = 0,062$; $p = 0,005$) für CpG17 als Nahrung mit der am stärksten signifikanten Assoziation zur CD40L-Methylierung identifiziert. Weitere Nahrungsmittel mit signifikanter, beziehungsweise mit angrenzendem Signifikanzniveau sind in Tabelle 3-2 aufgelistet. Konkrete Nahrungsempfehlungen für Lupuspatientinnen hieraus abzuleiten und diese dann noch auf den individuellen Patienten mit jeweils spezifischen Nahrungsgewohnheiten anzupassen bleibt eine enorme Herausforderung. Auf Basis unserer Daten sind bestimmte Nahrungsmittel zwar mit einer verbesserten Methylierung und damit geringeren Krankheitsaktivität assoziiert, allerdings sind diese nicht unbedingt „gesunde“ Nahrungsmittel im Sinne eines kardiovaskulären Risikos (z.B. frittierte Kartoffeln oder Eiscreme) (Imamura et al., 2015). Weiterhin deuten Studienergebnisse darauf hin, dass eine vermehrte Methylierung allgemeine Alterungsprozesse begünstigen kann (He et al., 2021). Eine Bestätigung unserer These, dass Methyldonatoren einen günstigen Einfluss auf die Krankheitsaktivität bei Lupuspatientinnen hat, könnte am ehesten durch eine randomisiert kontrollierte Interventionsstudie mit der Substitution verschiedener Methyldonatoren zusätzlich zur Standardtherapie erforscht werden. Wichtig wäre dabei voraussichtlich, bei der Randomisierung für die sonstigen Ernährungsgewohnheiten zu kontrollieren. Aus Sicht der SLE-Patienten ist Krankheitsaktivität und der generelle Gesundheitszustand von wichtiger Bedeutung. Hierfür besteht von Seiten der Patienten ein großer Bedarf an Beratung bezüglich der Ernährung sowie die nötige Bereitschaft diese bei einer möglichen Linderung der Krankheitslast dementsprechend anzupassen (Robinson et al., 2019). Aufgrund der generell komplexen Interaktionen von Nährstoffen, könnten verschiedene Mikronährstoffe bei wiederum verschiedenen

Gruppen mit unterschiedlichem Ernährungsstil kritisch für die DNA-Methylierung erscheinen. Um Patientenwohl sowie -zufriedenheit zu gewährleisten, wird daher eine Konsultation auf individueller Ebene benötigt. Dabei sollten im besten Fall multiple Faktoren miteinbezogen werden, wie zum Beispiel auch der positive Einfluss einer günstigen Fettsäurekonstellation im Rahmen der Ernährung (Vordenbaumen et al., 2020).

In dieser Arbeit wurden sowohl objektiv als auch subjektiv erhobene Daten verarbeitet und analysiert. Die Methylierung des CD40L konnte objektiv ermittelt werden und in Zusammenhang mit den ermittelten Blutwerten und der erfragten Ernährung in den letzten 4 Wochen gebracht werden. Dabei zeigte sich, dass die erfassten Biomarker (Vitamin D, Vitamin B6 und Cholesterol) nicht gut mit den errechneten Daten aus dem Fragebogen übereinstimmten, obwohl die allgemeinen Ergebnisse bezüglich auf die Krankheitsaktivität mit dem Tiermodell übereinstimmten und ein validierter Fragebogen verwendet wurde. Die Erfassung von Nährstoffen mittels FFQs gilt als eine verlässliche Methode, insbesondere, wenn der Fragebogen besonders viele verschiedene Nahrungsmittel und einen Zeitraum von unter 12 Monaten abfragt (Cui et al., 2021). Beide Aspekte treffen bei dem verwendeten FFQ zu. Die Erfassung von Mikronährstoffen mittels Blutanalyse stellt eine genaue Momentaufnahme dar und weist eine intraindividuelle zeitliche Variabilität auf (Shvetsov et al., 2009). Insbesondere für Vitamin B stellte sich in einer Studie heraus, dass eine einmalige Blutentnahme für die Beurteilung des Vitamin-B-Status einer Person nicht ausreichend ist (van Dokkum et al., 1990). Ebenso können die Zeit der Blutentnahme nach dem letzten Mahl (Sedlmeier et al., 2018) als auch die Art der konsumierten Nahrung die biologische (präanalytische) und laboratorische (analytische) Variabilität die Laborergebnisse der bestimmten Biomarker beeinflussen (Blanck et al., 2003). Diese Studien weisen somit auf, dass man nicht unbedingt vergleichbare Daten aus FFQ und objektiven Biomarker-Messungen erhalten und erwarten kann. Es wird vorgeschlagen, dass man zur Evaluation des metabolischen Status beide Informationsquellen zur gegenseitigen Ergänzung nutzt (Holen et al., 2016). Daher kann die Diskrepanz

der Ergebnisse aus FFQ und Blutprobe als mögliche Konsequenz dieser Variabilität gewertet werden. Möglicherweise eignet sich auf Grund der Ergebnisse der Fragebogen in Bezug auf eine Langzeit-Evaluation der Ernährung und assoziierter Krankheitsaktivität sogar besser als die objektiv im Labor bestimmte Momentaufnahme.

Zuletzt ist zu erwähnen, dass in dieser Arbeit eine gezielt weibliche Studienkohorte auf Änderungen der Methylierung des CD40L untersucht wurde. Der CD40L ist auf dem X-Chromosom gelegen und es wurde mehrmals die Assoziation einer verminderten X-Chromosom-Inaktivierung bei Frauen mit der Krankheitsausprägung bei SLE nachgewiesen (Hewagama et al., 2013, Lu et al., 2007). Da die Methylierung verschiedene DNA-Bereiche beeinflussen kann, könnte eine ähnliche Auswirkung von Methyldonatoren auch bei männlichen SLE Patienten vorliegen. Aus den uns vorliegenden Daten können diesbezüglich jedoch keine Rückschlüsse gezogen werden und mehr Forschung auf diesem Gebiet ist hierfür benötigt. Somit könnten die aktuellen Ergebnisse weitere Studien und Forschung zur Methylierung und Ernährungsforschung bei SLE Patienten anregen.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

- ADAMS, J. S. & HEWISON, M. 2010. Update in vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab*, 95, 471-8.
- AHA 2020. America Heart Association recommendation for saturated fats
<https://www.heart.org/en/healthy-living/healthy-eating/eat-smart/fats/saturated-fats>.
- ALARCÓN, G. S., MCGWIN, G., BERTOLI, A. M., FESSLER, B. J., CALVO-ALÉN, J., BASTIAN, H. M., VILÁ, L. M. & REVEILLE, J. D. 2007. Effect of hydroxychloroquine on the survival of patients with systemic lupus erythematosus: data from LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA L). *Ann Rheum Dis*, 66, 1168-72.
- ALARCON-RIQUELME, M. E. 2019. New Attempts to Define and Clarify Lupus. *Curr Rheumatol Rep*, 21, 11.
- ANDERSON, O. S., SANT, K. E. & DOLINOY, D. C. 2012. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J Nutr Biochem*, 23, 853-9.
- APARICIO-SOTO, M., SÁNCHEZ-HIDALGO, M., CÁRDENO, A., LUCENA, J. M., GONZÁLEZ-ESCRIBANO, F., CASTILLO, M. J. & ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, C. 2017. The phenolic fraction of extra virgin olive oil modulates the activation and the inflammatory response of T cells from patients with systemic lupus erythematosus and healthy donors. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61, 1601080.
- ARCHER, E., MARLOW, M. L. & LAVIE, C. J. 2018. Controversy and debate: Memory-Based Methods Paper 1: the fatal flaws of food frequency questionnaires and other memory-based dietary assessment methods. *Journal of Clinical Epidemiology*, 104, 113-124.
- ARINGER, M., COSTENBADER, K., DAIKH, D., BRINKS, R., MOSCA, M., RAMSEY-GOLDMAN, R., SMOLEN, J. S., WOFSEY, D., BOUMPAS, D. T., KAMEN, D. L., JAYNE, D., CERVERA, R., COSTEDOAT-CHALUMEAU, N., DIAMOND, B., GLADMAN, D. D., HAHN, B., HIEPE, F., JACOBSEN, S., KHANNA, D., LERSTRØM, K., MASSAROTTI, E., MCCUNE, J., RUIZ-IRASTORZA, G., SANCHEZ-GUERRERO, J., SCHNEIDER, M., UROWITZ, M., BERTSIAS, G., HOYER, B. F., LEUCHTEN, N., TANI, C., TEDESCHI, S. K., TOUMA, Z., SCHMAJUK, G., ANIC, B., ASSAN, F., CHAN, T. M., CLARKE, A. E., CROW, M. K., CZIRJÁK, L., DORIA, A., GRANINGER, W., HALDA-KISS, B., HASNI, S., IZMIRLY, P. M., JUNG, M., KUMÁNOVICS, G., MARIETTE, X., PADJEN, I., PEGO-REIGOSA, J. M., ROMERO-DIAZ, J., RÚA-FIGUEROA FERNÁNDEZ, Í., SEROR, R., STUMMVOLL, G. H., TANAKA, Y., TEKTONIDOU, M. G., VASCONCELOS, C., VITAL, E. M., WALLACE, D. J., YAVUZ, S., MERONI, P. L., FRITZLER, M. J., NADEN, R., DÖRNER, T. & JOHNSON, S. R. 2019. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatology*, 71, 1400-1412.
- ARMITAGE, R. J., FANSLAW, W. C., STROCKBINE, L., SATO, T. A., CLIFFORD, K. N., MACDUFF, B. M., ANDERSON, D. M., GIMPEL, S. D., DAVIS-SMITH, T., MALISZEWSKI, C. R., CLARK, E. A., SMITH, C. A., GRABSTEIN, K. H., COSMAN, D.

- & SPRIGGS, M. K. 1992. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*, 357, 80-82.
- AVILA, M. A., CORRALES, F. J., RUIZ, F., SANCHEZ-GONGORA, E., MINGORANCE, J., CARRETERO, M. V. & MATO, I. M. 1998. Specific interaction of methionine adenosyltransferase with free radicals. *Biofactors*, 8, 27-32.
- BANCHEREAU, J., BAZAN, F., BLANCHARD, D., BRIERE, F., GALIZZI, J. P., VAN KOOTEN, C., LIU, Y. J., ROUSSET, F. & SAELAND, S. 1994. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol*, 12, 881-922.
- BANNISTER, A. J. & KOUZARIDES, T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21, 381-395.
- BARAN, W., BATYCKA-BARAN, A., ZYCHOWSKA, M., BIENIEK, A. & SZEPIETOWSKI, J. C. 2014. Folate supplementation reduces the side effects of methotrexate therapy for psoriasis. *Expert Opin Drug Saf*, 13, 1015-21.
- BARRETT, T. B., SHU, G. & CLARK, E. A. 1991. CD40 signaling activates CD11a/CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells. *J Immunol*, 146, 1722-9.
- BASTA, F., FASOLA, F., TRIANTAFYLLIAS, K. & SCHWARTING, A. 2020. Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Therapy: The Old and the New. *Rheumatol Ther*, 7, 433-446.
- BAUMANN, I., KOLOWOS, W., VOLL, R. E., MANGER, B., GAIPL, U., NEUHUBER, W. L., KIRCHNER, T., KALDEN, J. R. & HERRMANN, M. 2002. Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 46, 191-201.
- BAUMGARTH, N. 2000. A two-phase model of B-cell activation. *Immunol Rev*, 176, 171-80.
- BI, Y., LIU, G. & YANG, R. 2011. mTOR Regulates T-Cell Differentiation and Activation in Immunity and Autoimmunity. 21, 313-322.
- BLANCK, H. M., BOWMAN, B. A., COOPER, G. R., MYERS, G. L. & MILLER, D. T. 2003. Laboratory issues: use of nutritional biomarkers. *J Nutr*, 133 Suppl 3, 888s-894s.
- BORGES, M. C., DOS SANTOS FDE, M., TELLES, R. W., LANNA, C. C. & CORREIA, M. I. 2012. Nutritional status and food intake in patients with systemic lupus erythematosus. *Nutrition*, 28, 1098-103.
- BRINKS, R., FISCHER-BETZ, R., SANDER, O., RICHTER, J. G., CHEHAB, G. & SCHNEIDER, M. 2014. Age-specific prevalence of diagnosed systemic lupus erythematosus in Germany 2002 and projection to 2030. *Lupus*, 23, 1407-11.
- BUYON, J. P., PETRI, M. A., KIM, M. Y., KALUNIAN, K. C., GROSSMAN, J., HAHN, B. H., MERRILL, J. T., SAMMARITANO, L., LOCKSHIN, M., ALARCÓN, G. S., MANZI, S., BELMONT, H. M., ASKANASE, A. D., SIGLER, L., DOOLEY, M. A., VON FELDT, J., MCCUNE, W. J., FRIEDMAN, A., WACHS, J., CRONIN, M., HEARTH-HOLMES, M., TAN, M. & LICCIARDI, F. 2005. The effect of combined estrogen and progesterone hormone replacement therapy on disease activity in systemic lupus erythematosus: a randomized trial. *Ann Intern Med*, 142, 953-62.
- CHEN, L., MORRIS, D. L. & VYSE, T. J. 2017. Genetic advances in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Rheumatol*, 29, 423-433.
- CHEUNG, W. L., BRIGGS, S. D. & ALLIS, C. D. 2000. Acetylation and chromosomal functions. *Current Opinion in Cell Biology*, 12, 326-333.
- COIT, P., YALAVARTHI, S., OGNENOVSKI, M., ZHAO, W., HASNI, S., WREN, J. D., KAPLAN, M. J. & SAWALHA, A. H. 2015. Epigenome profiling reveals significant DNA

- demethylation of interferon signature genes in lupus neutrophils. *Journal of Autoimmunity*, 58, 59-66.
- COJOCARU, M., COJOCARU, I. M., SILOSI, I. & VRABIE, C. D. 2011. Manifestations of systemic lupus erythematosus. *Maedica*, 6, 330-336.
- CORVETTA, A., DELLA BITTA, R., LUCHETTI, M. M. & POMPONIO, G. 1991. 5-Methylcytosine content of DNA in blood, synovial mononuclear cells and synovial tissue from patients affected by autoimmune rheumatic diseases. *J Chromatogr*, 566, 481-91.
- CUI, Q., XIA, Y., WU, Q., CHANG, Q., NIU, K. & ZHAO, Y. 2021. A meta-analysis of the reproducibility of food frequency questionnaires in nutritional epidemiological studies. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, 18, 12.
- D'CRUZ, D. P., KHAMASHTA, M. A. & HUGHES, G. R. V. 2007. Systemic lupus erythematosus. *The Lancet*, 369, 587-596.
- DANCHENKO, N., SATIA, J. A. & ANTHONY, M. S. 2006. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus*, 15, 308-318.
- DE ANDRES, M. C., PEREZ-PAMPIN, E., CALAZA, M., SANTA CLARA, F. J., ORTEA, I., GOMEZ-REINO, J. J. & GONZALEZ, A. 2015. Assessment of global DNA methylation in peripheral blood cell subpopulations of early rheumatoid arthritis before and after methotrexate. *Arthritis Res Ther*, 17, 233.
- DE LA HABA, G. & CANTONI, G. L. 1959. The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine. *J Biol Chem*, 234, 603-8.
- DEAPEN, D., ESCALANTE, A., WEINRIB, L., HORWITZ, D., BACHMAN, B., ROY-BURMAN, P., WALKER, A. & MACK, T. M. 1992. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 35, 311-8.
- DEGUCHI, T. & BARCHAS, J. 1971. Inhibition of transmethylations of biogenic amines by S-adenosylhomocysteine. Enhancement of transmethylation by adenosylhomocysteinase. *J Biol Chem*, 246, 3175-81.
- DENG, C., KAPLAN, M. J., YANG, J., RAY, D., ZHANG, Z., MCCUNE, W. J., HANASH, S. M. & RICHARDSON, B. C. 2001. Decreased Ras-mitogen-activated protein kinase signaling may cause DNA hypomethylation in T lymphocytes from lupus patients. *Arthritis Rheum*, 44, 397-407.
- DENIS, H., NDLOVU, M. N. & FUKS, F. 2011. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Rep*, 12, 647-56.
- DGE, D. G. F. E. 2010. Cholesterinwerte im Griff.
- DGE, D. G. F. E. 2020. Referenzwerte
<https://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/>.
- DOMINGUEZ-SALAS, P., MOORE, S. E., BAKER, M. S., BERGEN, A. W., COX, S. E., DYER, R. A., FULFORD, A. J., GUAN, Y., LARITSKY, E., SILVER, M. J., SWAN, G. E., ZEISEL, S. H., INNIS, S. M., WATERLAND, R. A., PRENTICE, A. M. & HENNIG, B. J. 2014. Maternal nutrition at conception modulates DNA methylation of human metastable epialleles. *Nature Communications*, 5, 3746.
- DRAZIC, A., MYKLEBUST, L. M., REE, R. & ARNESEN, T. 2016. The world of protein acetylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1864, 1372-1401.

- DUBOIS, E. L. & STRAIN, L. 1973. Effect of diet on survival and nephropathy of NZBNZW hybrid mice. *Biochemical Medicine*, 7, 336-340.
- EKBLOM-KULLBERG, S., KAUTIAINEN, H., ALHA, P., LEIRISALO-REPO, M. & JULKUNEN, H. 2013. Smoking and the risk of systemic lupus erythematosus. *Clinical Rheumatology*, 32, 1219-1222.
- ELISIA, I., LAM, V., CHO, B., HAY, M., LI, M. Y., YEUNG, M., BU, L., JIA, W., NORTON, N., LAM, S. & KRYSTAL, G. 2020. The effect of smoking on chronic inflammation, immune function and blood cell composition. *Sci Rep*, 10, 19480.
- ESHEBA, N. 2015. Effect of Nigella Sativa and Vitamin E on Some Oxidative / Nitrosative Biomarkers in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Life Science Journal*, 12, 157-162.
- FANOURIKIS, A., KOSTOPOULOU, M., ALUNNO, A., ARINGER, M., BAJEMA, I., BOLETIS, J. N., CERVERA, R., DORIA, A., GORDON, C., GOVONI, M., HOUSSIAU, F., JAYNE, D., KOULOUMAS, M., KUHN, A., LARSEN, J. L., LERSTRØM, K., MORONI, G., MOSCA, M., SCHNEIDER, M., SMOLEN, J. S., SVENUNGSSON, E., TESAR, V., TINCANI, A., TROLDORGBORG, A., VAN VOLLENHOVEN, R., WENZEL, J., BERTSIAS, G. & BOUMPAS, D. T. 2019. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 78, 736-745.
- FEIL, R. & FRAGA, M. F. 2012. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet*, 13, 97-109.
- FINZEL, S., SCHAFFER, S., RIZZI, M. & VOLL, R. E. 2018. [Pathogenesis of systemic lupus erythematosus]. *Z Rheumatol*, 77, 789-798.
- FORMAN, H. J., ZHANG, H. & RINNA, A. 2009. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular aspects of medicine*, 30, 1-12.
- FORSTER, V. J., MCDONNELL, A., THEOBALD, R. & MCKAY, J. A. 2017. Effect of methotrexate/vitamin B12 on DNA methylation as a potential factor in leukemia treatment-related neurotoxicity. *Epigenomics*, 9, 1205-1218.
- FURIE, R., PETRI, M., ZAMANI, O., CERVERA, R., WALLACE, D. J., TEGZOVÁ, D., SANCHEZ-GUERRERO, J., SCHWARTING, A., MERRILL, J. T., CHATHAM, W. W., STOHL, W., GINZLER, E. M., HOUGH, D. R., ZHONG, Z. J., FREIMUTH, W. & VAN VOLLENHOVEN, R. F. 2011. A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 63, 3918-30.
- GERGIANAKI, I., FANOURIKIS, A., ADAMICHOU, C., SPYROU, G., MIHALOPOULOS, N., KAZADZIS, S., CHATZI, L., SIDIROPOULOS, P., BOUMPAS, D. T. & BERTSIAS, G. 2019. Is systemic lupus erythematosus different in urban versus rural living environment? Data from the Cretan Lupus Epidemiology and Surveillance Registry. *Lupus*, 28, 104-113.
- GLADMAN, D. D., IBANEZ, D. & UROWITZ, M. B. 2002. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol*, 29, 288-91.
- GOSSWALD, A., LANGE, M., KAMTSIURIS, P. & KURTH, B. M. 2012. [DEGS: German Health Interview and Examination Survey for Adults. A nationwide cross-sectional and longitudinal study within the framework of health monitoring conducted by the Robert Koch Institute]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 55, 775-80.
- GUDERUD, K., SUNDE, L. H., FLAM, S. T., MAEHLLEN, M. T., MJAAVATTEN, M. D., LILLEGRAVEN, S., AGA, A. B., EVENROD, I. M., NORLI, E. S., ANDREASSEN, B. K.,

- FRANZENBURG, S., FRANKE, A., HAAVARDSHOLM, E. A., RAYNER, S., GERVIN, K. & LIE, B. A. 2020. Rheumatoid Arthritis Patients, Both Newly Diagnosed and Methotrexate Treated, Show More DNA Methylation Differences in CD4(+) Memory Than in CD4(+) Naive T Cells. *Front Immunol*, 11, 194.
- HAFTENBERGER, M., HEUER, T., HEIDEMANN, C., KUBE, F., KREMS, C. & MENSINK, G. B. 2010. Relative validation of a food frequency questionnaire for national health and nutrition monitoring. *Nutr J*, 9, 36.
- HAKKIM, A., FÜRNRÖHR, B. G., AMANN, K., LAUBE, B., ABED, U. A., BRINKMANN, V., HERRMANN, M., VOLL, R. E. & ZYCHLINSKY, A. 2010. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 9813-8.
- HAN, G.-M. & HAN, X.-F. 2016. Lycopene reduces mortality in people with systemic lupus erythematosus: A pilot study based on the third national health and nutrition examination survey. *Journal of Dermatological Treatment*, 27, 430-435.
- HANDONO, K., FIRDAUSI, S. N., PRATAMA, M. Z., ENDHARTI, A. T. & KALIM, H. 2016. Vitamin A improve Th17 and Treg regulation in systemic lupus erythematosus. *Clinical Rheumatology*, 35, 631-638.
- HANDONO, K., PRATAMA, M. Z., ENDHARTI, A. T. & KALIM, H. 2015. Treatment of low doses curcumin could modulate Th17/Treg balance specifically on CD4+ T cell cultures of systemic lupus erythematosus patients. *Central European Journal of Immunology*, 40, 461-469.
- HE, X., LIU, J., LIU, B. & SHI, J. 2021. The use of DNA methylation clock in aging research. *Exp Biol Med (Maywood)*, 246, 436-446.
- HEDRICH, C. M., MABERT, K., RAUEN, T. & TSOKOS, G. C. 2017. DNA methylation in systemic lupus erythematosus. *Epigenomics*, 9, 505-525.
- HERRMANN, M., VOLL, R. E., ZOLLER, O. M., HAGENHOFER, M., PONNER, B. B. & KALDEN, J. R. 1998. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 41, 1241-50.
- HEWAGAMA, A., GORELIK, G., PATEL, D., LIYANARACHCHI, P., MCCUNE, W. J., SOMERS, E., GONZALEZ-RIVERA, T., MICHIGAN LUPUS, C., STRICKLAND, F. & RICHARDSON, B. 2013. Overexpression of X-linked genes in T cells from women with lupus. *J Autoimmun*, 41, 60-71.
- HOCK, A. D. 2014. Review: Vitamin D3 deficiency results in dysfunctions of immunity with severe fatigue and depression in a variety of diseases. *In Vivo*, 28, 133-45.
- HOLEN, T., NORHEIM, F., GUNDERSEN, T. E., MITRY, P., LINSEISEN, J., IVERSEN, P. O. & DREVON, C. A. 2016. Biomarkers for nutrient intake with focus on alternative sampling techniques. *Genes & nutrition*, 11, 12-12.
- HUANG, C. S., CHANG, L. S., ANDERSON, M. E. & MEISTER, A. 1993. Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 19675-19680.
- IMAMURA, F., MICHA, R., KHATIBZADEH, S., FAHIMI, S., SHI, P., POWLES, J. & MOZAFFARIAN, D. 2015. Dietary quality among men and women in 187 countries in 1990 and 2010: a systematic assessment. *The Lancet Global Health*, 3, e132-e142.

- INSTITUTE OF MEDICINE, S. C. O. T. S. E. O. D. R., INTAKES, ITS PANEL ON FOLATE, O. B. V. & CHOLINE 1998. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B(6), Folate, Vitamin B(12), Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. Washington (DC): National Academies Press (US)
- Copyright © 1998, National Academy of Sciences.
- ISLAM, M. A., KHANDKER, S. S., KOTYLA, P. J. & HASSAN, R. 2020. Immunomodulatory Effects of Diet and Nutrients in Systemic Lupus Erythematosus (SLE): A Systematic Review. *Front Immunol*, 11, 1477.
- IZMIRLY, P. M., WAN, I., SAHL, S., BUYON, J. P., BELMONT, H. M., SALMON, J. E., ASKANASE, A., BATHON, J. M., GERALDINO-PARDILLA, L., ALI, Y., GINZLER, E. M., PUTTERMAN, C., GORDON, C., HELMICK, C. G. & PARTON, H. 2017. The Incidence and Prevalence of Systemic Lupus Erythematosus in New York County (Manhattan), New York: The Manhattan Lupus Surveillance Program. *Arthritis Rheumatol*, 69, 2006-2017.
- JAVIERRE, B. M. & RICHARDSON, B. 2011. A New Epigenetic Challenge: Systemic Lupus Erythematosus. In: BALLESTAR, E. (ed.) *Epigenetic Contributions in Autoimmune Disease*. Boston, MA: Springer US.
- JOINT, F. A. O. W. H. O. U. N. U. E. C. O. P., AMINO ACID REQUIREMENTS IN HUMAN, N., FOOD, AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED, N., WORLD HEALTH, O. & UNITED NATIONS, U. 2007. Protein and amino acid requirements in human nutrition : report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Geneva: World Health Organization.
- KANG, H.-K., ECKLUND, D., LIU, M. & DATTA, S. K. 2009. Apigenin, a non-mutagenic dietary flavonoid, suppresses lupus by inhibiting autoantigen presentation for expansion of autoreactive Th1 and Th17 cells. *Arthritis Research & Therapy*, 11, R59.
- KARNELL, J. L., RIEDER, S. A., ETTINGER, R. & KOLBECK, R. 2019. Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 141, 92-103.
- KIM, Y. I. 2005. Nutritional epigenetics: impact of folate deficiency on DNA methylation and colon cancer susceptibility. *J Nutr*, 135, 2703-9.
- KINOSHITA, K., KISHIMOTO, K., SHIMAZU, H., NOZAKI, Y., SUGIYAMA, M., IKOMA, S. & FUNAUCHI, M. 2010. Successful Treatment With Retinoids in Patients With Lupus Nephritis. *American Journal of Kidney Diseases*, 55, 344-347.
- KOUZARIDES, T. 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128, 693-705.
- KULKARNI, A., DANGAT, K., KALE, A., SABLE, P., CHAVAN-GAUTAM, P. & JOSHI, S. 2011. Effects of altered maternal folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid on placental global DNA methylation patterns in Wistar rats. *PLoS One*, 6, e17706.
- KUSARI, F., O'DOHERTY, A. M., HODGES, N. J. & WOJEWODZIC, M. W. 2017. Bi-directional effects of vitamin B12 and methotrexate on *Daphnia magna* fitness and genomic methylation. *Sci Rep*, 7, 11872.
- LAI, Z. W., HANCZKO, R., BONILLA, E., CAZA, T. N., CLAIR, B., BARTOS, A., MIKLOSSY, G., JIMAH, J., DOHERTY, E., TILY, H., FRANCIS, L., GARCIA, R., DAWOOD, M., YU, J., RAMOS, I., COMAN, I., FARAONE, S. V., PHILLIPS, P. E. & PERL, A. 2012. N-acetylcysteine reduces disease activity by blocking mammalian target of rapamycin in T cells from systemic lupus erythematosus patients: a

- randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*, 64, 2937-46.
- LAL, G., ZHANG, N., VAN DER TOUW, W., DING, Y., JU, W., BOTTINGER, E. P., REID, S. P., LEVY, D. E. & BROMBERG, J. S. 2009. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J Immunol*, 182, 259-73.
- LANATA, C. M., CHUNG, S. A. & CRISWELL, L. A. 2018. DNA methylation 101: what is important to know about DNA methylation and its role in SLE risk and disease heterogeneity. *Lupus Sci Med*, 5, e000285.
- LANGFELD, C. D., AINSWORTH, H. C., GRAHAM, D. S. C., KELLY, J. A., COMEAU, M. E., MARION, M. C., HOWARD, T. D., RAMOS, P. S., CROKER, J. A., MORRIS, D. L., SANDLING, J. K., ALMLÖF, J. C., ACEVEDO-VÁSQUEZ, E. M., ALARCÓN, G. S., BABINI, A. M., BACA, V., BENGTSSON, A. A., BERBOTTO, G. A., BIJL, M., BROWN, E. E., BRUNNER, H. I., CARDIEL, M. H., CATOGGIO, L., CERVERA, R., CUCHO-VENEGAS, J. M., DAHLQVIST, S. R., D'ALFONSO, S., DA SILVA, B. M., DE LA RÚA FIGUEROA, I., DORIA, A., EDBERG, J. C., ENDREFFY, E., ESQUIVEL-VALERIO, J. A., FORTIN, P. R., FREEDMAN, B. I., FROSTEGÅRD, J., GARCÍA, M. A., DE LA TORRE, I. G., GILKESON, G. S., GLADMAN, D. D., GUNNARSSON, I., GUTHRIDGE, J. M., HUGGINS, J. L., JAMES, J. A., KALLENBERG, C. G. M., KAMEN, D. L., KARP, D. R., KAUFMAN, K. M., KOTTYAN, L. C., KOVÁCS, L., LAUSTRUP, H., LAUWERYS, B. R., LI, Q.-Z., MARADIAGA-CECEÑA, M. A., MARTÍN, J., MCCUNE, J. M., MCWILLIAMS, D. R., MERRILL, J. T., MIRANDA, P., MOCTEZUMA, J. F., NATH, S. K., NIEWOLD, T. B., OROZCO, L., ORTEGO-CENTENO, N., PETRI, M., PINEAU, C. A., PONS-ESTEL, B. A., POPE, J., RAJ, P., RAMSEY-GOLDMAN, R., REVEILLE, J. D., RUSSELL, L. P., SABIO, J. M., AGUILAR-SALINAS, C. A., SCHERBARTH, H. R., SCORZA, R., SELDIN, M. F., SJÖWALL, C., SVENUNGSSON, E., THOMPSON, S. D., TOLOZA, S. M. A., TRUEDSSON, L., TUSIÉ-LUNA, T., VASCONCELOS, C., VILÁ, L. M., WALLACE, D. J., WEISMAN, M. H., WITHER, J. E., BHANGALE, T., OKSENBERG, J. R., RIOUX, J. D., GREGERSEN, P. K., SYVÄNEN, A.-C., RÖNNBLUM, L., CRISWELL, L. A., JACOB, C. O., SIVILS, K. L., TSAO, B. P., SCHANBERG, L. E., BEHRENS, T. W., et al. 2017. Transancestral mapping and genetic load in systemic lupus erythematosus. *Nature Communications*, 8, 16021.
- LANZAVECCHIA, A. 1998. From antigen presentation to T-cell activation. *Research in Immunology*, 149, 626.
- LARSEN, F., GUNDERSEN, G., LOPEZ, R. & PRYDZ, H. 1992. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics*, 13, 1095-1107.
- LAURITSEN JM & BRUUS M 2000-2008. EpiData Entry. A comprehensive tool for validated entry and documentation of data. The EpiData Association, Odense Denmark.
- LAURITSEN JM. 2000-2008. EpiData Classic, Data Management and basic Statistical Analysis System. Odense Denmark, EpiData Association, <http://www.epidata.dk>.
- LEDERMAN, S., YELLIN, M. J., CLEARY, A. M., PERNIS, A., INGHIRAMI, G., COHN, L. E., COVEY, L. R., LEE, J. J., ROTHMAN, P. & CHESS, L. 1994. T-BAM/CD40-L on helper T lymphocytes augments lymphokine-induced B cell Ig isotype switch recombination and rescues B cells from programmed cell death. *J Immunol*, 152, 2163-71.

- LEE, Y. H., CHOI, S. J., JI, J. D. & SONG, G. G. 2016. Overall and cause-specific mortality in systemic lupus erythematosus: an updated meta-analysis. *Lupus*, 25, 727-34.
- LEUNG, Y. T., SHI, L., MAURER, K., SONG, L., ZHANG, Z., PETRI, M. & SULLIVAN, K. E. 2015. Interferon regulatory factor 1 and histone H4 acetylation in systemic lupus erythematosus. *Epigenetics*, 10, 191-9.
- LI, E. & ZHANG, Y. 2014. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6, a019133.
- LOCASALE, J. W. 2013. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer*, 13, 572-83.
- LOCASALE, J. W. & CANTLEY, L. C. 2011. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell Metab*, 14, 443-51.
- LU, Q., WU, A., TESMER, L., RAY, D., YOUSIF, N. & RICHARDSON, B. 2007. Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus. *J Immunol*, 179, 6352-8.
- LYONS, J., RAUH-PFEIFFER, A., YU, Y. M., LU, X. M., ZURAKOWSKI, D., TOMPKINS, R. G., AJAMI, A. M., YOUNG, V. R. & CASTILLO, L. 2000. Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 5071-5076.
- MAESHIMA, E., LIANG, X.-M., GODA, M., OTANI, H. & MUNE, M. 2007. The efficacy of vitamin E against oxidative damage and autoantibody production in systemic lupus erythematosus: a preliminary study. *Clinical Rheumatology*, 26, 401-404.
- MAK, A., CHEUNG, M. W. L., CHIEW, H. J., LIU, Y. & HO, R. C.-M. 2012. Global Trend of Survival and Damage of Systemic Lupus Erythematosus: Meta-Analysis and Meta-Regression of Observational Studies from the 1950s to 2000s. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 41, 830-839.
- MAO, S. & HUANG, S. 2014. Association between vitamin D receptor gene BsmI, FokI, Apal and TaqI polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Rheumatology International*, 34, 381-388.
- MCMURRAY, R. W. & MAY, W. 2003. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis Rheum*, 48, 2100-10.
- MEDICINE, I. O. 2005. *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids*, Washington, DC, The National Academies Press.
- MEIER, C. R., STURKENBOOM, M. C., COHEN, A. S. & JICK, H. 1998. Postmenopausal estrogen replacement therapy and the risk of developing systemic lupus erythematosus or discoid lupus. *J Rheumatol*, 25, 1515-9.
- MENTCH, S. J. & LOCASALE, J. W. 2016. One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity. *Ann N Y Acad Sci*, 1363, 91-8.
- MENTCH, S. J., MEHRMOHAMADI, M., HUANG, L., LIU, X., GUPTA, D., MATTOCKS, D., GOMEZ PADILLA, P., ABLES, G., BAMMAN, M. M., THALACKER-MERCER, A. E., NICHENAMETLA, S. N. & LOCASALE, J. W. 2015. Histone Methylation Dynamics and Gene Regulation Occur through the Sensing of One-Carbon Metabolism. *Cell Metab*, 22, 861-73.
- MERCER, T. R., DINGER, M. E. & MATTICK, J. S. 2009. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*, 10, 155-9.

- MERRILL, J. T., NEUWELT, C. M., WALLACE, D. J., SHANAHAN, J. C., LATINIS, K. M., OATES, J. C., UTSET, T. O., GORDON, C., ISENBERG, D. A., HSIEH, H. J., ZHANG, D. & BRUNETTA, P. G. 2010. Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial. *Arthritis Rheum*, 62, 222-33.
- MICROSOFT CORPORATION 2018. Microsoft Excel. Retrieved from <https://office.microsoft.com/excel>.
- MILOVANOV IU, S., LYSENKO, L. V., MILOVANOVA, L. & DOBROSMYSLOV, I. A. 2009. [The role of balanced low-protein diet in inhibition of predialysis chronic kidney disease progression in patients with systemic diseases]. *Ter Arkh*, 81, 52-7.
- MINAMI, Y., HIRABAYASHI, Y., NAGATA, C., ISHII, T., HARIGAE, H. & SASAKI, T. 2011. Intakes of vitamin B6 and dietary fiber and clinical course of systemic lupus erythematosus: a prospective study of Japanese female patients. *J Epidemiol*, 21, 246-54.
- MINAMI, Y., SASAKI, T., ARAI, Y., KURISU, Y. & HISAMICHI, S. 2003. Diet and systemic lupus erythematosus: a 4 year prospective study of Japanese patients. *J Rheumatol*, 30, 747-54.
- MISTRY, P. & KAPLAN, M. J. 2017. Cell death in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Clin Immunol*, 185, 59-73.
- MOK, C. C., BRO, E. T., HO, L. Y., SINGH, R. J. & JANNETTO, P. J. 2018. Serum 25-hydroxyvitamin D3 levels and flares of systemic lupus erythematosus: a longitudinal cohort analysis. *Clinical Rheumatology*, 37, 2685-2692.
- MOURA DOS SANTOS FDE, M., BORGES, M. C., TELLES, R. W., CORREIA, M. I. & LANNA, C. C. 2013. Excess weight and associated risk factors in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*, 33, 681-8.
- NAVARRO QUIROZ, E., CHAVEZ-ESTRADA, V., MACIAS-OCHOA, K., AYALA-NAVARRO, M. F., FLORES-AGUILAR, A. S., MORALES-NAVARRETE, F., DE LA CRUZ LOPEZ, F., GOMEZ ESCORCIA, L., MUSSO, C. G., AROCA MARTINEZ, G., GONZALES TORRES, H., DIAZ PEREZ, A., CADENA BONFANTI, A., SARMIENTO GUTIERREZ, J., MEZA, J., DIAZ ARROYO, E., BELLO LEMUS, Y., AHMAD, M. & NAVARRO QUIROZ, R. 2019. Epigenetic Mechanisms and Posttranslational Modifications in Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Mol Sci*, 20.
- NICULESCU, M. D. & ZEISEL, S. H. 2002. Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J Nutr*, 132, 2333S-2335S.
- OAKS, Z. & PERL, A. 2014. Metabolic control of the epigenome in systemic Lupus erythematosus. *Autoimmunity*, 47, 256-64.
- OOSTEROM, N., GRIFFIOEN, P. H., DEN HOED, M. A. H., PIETERS, R., DE JONGE, R., TISSING, W. J. E., VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M. & HEIL, S. G. 2018. Global methylation in relation to methotrexate-induced oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*, 13, e0199574.
- ORTIZ, T. T., TERRERI, M. T., CAETANO, M., SOUZA, F. S., D'ALMEIDA, V., SARNI, R. O. & HILARIO, M. O. 2013. Dyslipidemia in pediatric systemic lupus erythematosus: the relationship with disease activity and plasma homocysteine and cysteine concentrations. *Ann Nutr Metab*, 63, 77-82.

- PAN, L., LU, M. P., WANG, J. H., XU, M. & YANG, S. R. 2020. Immunological pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. *World J Pediatr*, 16, 19-30.
- PANDEY, K. B. & RIZVI, S. I. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2, 270-278.
- PARIKH, S. V., ALMAANI, S., BRODSKY, S. & ROVIN, B. H. 2020. Update on Lupus Nephritis: Core Curriculum 2020. *American Journal of Kidney Diseases*, 76, 265-281.
- PARTHUN, M. R. 2007. Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase. *Oncogene*, 26, 5319-5328.
- PERL, A. 2010. Pathogenic mechanisms in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, 43, 1-6.
- PETERLIK, M. & CROSS, H. S. 2009. Vitamin D and calcium insufficiency-related chronic diseases: molecular and cellular pathophysiology. *Eur J Clin Nutr*, 63, 1377-86.
- PETRI, M. 2008. Sex hormones and systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 17, 412-5.
- PIZZINO, G., IRRERA, N., CUCINOTTA, M., PALLIO, G., MANNINO, F., ARCORACI, V., SQUADRITO, F., ALTAVILLA, D. & BITTO, A. 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 8416763-8416763.
- POIRIER, L. A., WISE, C. K., DELONGCHAMP, R. R. & SINHA, R. 2001. Blood determinations of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and homocysteine: correlations with diet. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10, 649-55.
- PONTICELLI, C. & MORONI, G. 2017. Hydroxychloroquine in systemic lupus erythematosus (SLE). *Expert Opin Drug Saf*, 16, 411-419.
- QUDDUS, J., JOHNSON, K. J., GAVALCHIN, J., AMENTO, E. P., CHRISP, C. E., YUNG, R. L. & RICHARDSON, B. C. 1993. Treating activated CD4+ T cells with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors, 5-azacytidine or procainamide, is sufficient to cause a lupus-like disease in syngeneic mice. *J Clin Invest*, 92, 38-53.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RAHMAN, A. & ISENBERG, D. A. 2008. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*, 358, 929-39.
- RAHMAN, P., GLADMAN, D. D. & UROWITZ, M. B. 1998. Smoking interferes with efficacy of antimalarial therapy in cutaneous lupus. *J Rheumatol*, 25, 1716-9.
- RAUEN, T., HEDRICH, C. M., JUANG, Y. T., TENBROCK, K. & TSOKOS, G. C. 2011. cAMP-responsive element modulator (CREM) α protein induces interleukin 17A expression and mediates epigenetic alterations at the interleukin-17A gene locus in patients with systemic lupus erythematosus. *J Biol Chem*, 286, 43437-46.
- RCI, R. C. F. I. I. 2021. Regensburg Center for Interventional Immunology (RCI), Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany; Department of Internal Medicine III, Hematology and Oncology, University Hospital Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany.

- RENAUER, P., COIT, P., JEFFRIES, M. A., MERRILL, J. T., MCCUNE, W. J., MAKSIMOWICZ-MCKINNON, K. & SAWALHA, A. H. 2015. DNA methylation patterns in naïve CD4⁺ T cells identify epigenetic susceptibility loci for malar rash and discoid rash in systemic lupus erythematosus. *Lupus Sci Med*, 2, e000101.
- RHODE, P. R., BURKHARDT, M., JIAO, J., SIDDIQUI, A. H., HUANG, G. P. & WONG, H. C. 1996. Single-chain MHC class II molecules induce T cell activation and apoptosis. *J Immunol*, 157, 4885-91.
- RICHARDSON, B. 2019. Epigenetically Altered T Cells Contribute to Lupus Flares. *Cells*, 8.
- RICHARDSON, B., SCHEINBART, L., STRAHLER, J., GROSS, L., HANASH, S. & JOHNSON, M. 1990. Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 33, 1665-73.
- RIDER, V., JONES, S., EVANS, M., BASSIRI, H., AFSAR, Z. & ABDU, N. I. 2001. Estrogen increases CD40 ligand expression in T cells from women with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 28, 2644-9.
- ROBINSON, G. A., MCDONNELL, T., WINCUP, C., MARTIN-GUTIERREZ, L., WILTON, J., KALEA, A. Z., CIURTIN, C., PINEDA-TORRA, I. & JURY, E. C. 2019. Diet and lupus: what do the patients think? *Lupus*, 28, 755-763.
- RODRÍGUEZ HUERTA, M. D., TRUJILLO-MARTÍN, M. M., RÚA-FIGUEROA, Í., CUELLAR-POMPA, L., QUIRÓS-LÓPEZ, R. & SERRANO-AGUILAR, P. 2016. Healthy lifestyle habits for patients with systemic lupus erythematosus: A systemic review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 45, 463-470.
- RODRÍGUEZ-DORANTES, M., TÉLLEZ-ASCENCIO, N., CERBÓN, M. A., LÓPEZ, M. & CERVANTES, A. 2004. [DNA methylation: an epigenetic process of medical importance]. *Rev Invest Clin*, 56, 56-71.
- ROSENBAUM, A., BLECK, E., SCHNEIDER, M., PONGRATZ, G. & VORDENBAUMEN, S. 2016. Assessment of direct versus indirect magnetic bead-based T-cell isolation procedures followed by magnetic bead-based DNA isolation. *Lupus Sci Med*, 3, e000167.
- SAELAND, S., DUVERT, V., MOREAU, I. & BANCHEREAU, J. 1993. Human B cell precursors proliferate and express CD23 after CD40 ligation. *The Journal of experimental medicine*, 178, 113-120.
- SARABI, M. M. & NAGHIBALHOSSAINI, F. 2018. The impact of polyunsaturated fatty acids on DNA methylation and expression of DNMTs in human colorectal cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 101, 94-99.
- SCOFIELD, R. H., BRUNER, G. R., NAMJOU, B., KIMBERLY, R. P., RAMSEY-GOLDMAN, R., PETRI, M., REVEILLE, J. D., ALARCÓN, G. S., VILÁ, L. M., REID, J., HARRIS, B., LI, S., KELLY, J. A. & HARLEY, J. B. 2008. Klinefelter's syndrome (47,XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: support for the notion of a gene-dose effect from the X chromosome. *Arthritis and rheumatism*, 58, 2511-2517.
- SEDLEY, L. 2020. Advances in Nutritional Epigenetics-A Fresh Perspective for an Old Idea. Lessons Learned, Limitations, and Future Directions. *Epigenetics insights*, 13, 2516865720981924-2516865720981924.
- SEDLMEIER, A., KLUTTIG, A., GIEGLING, I., PREHN, C., ADAMSKI, J., KASTENMÜLLER, G. & LACRUZ, M. E. 2018. The human metabolic profile reflects macro- and micronutrient intake distinctly according to fasting time. *Scientific Reports*, 8, 12262.

- SEGAL, B. M., THOMAS, W., ZHU, X., DIEBES, A., MCELVAIN, G., BAECHLER, E. & GROSS, M. 2012. Oxidative stress and fatigue in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 21, 984-92.
- SERIF EUROPE LTD. 2021. Affinity Photo
- SHAH, D., MAHAJAN, N., SAH, S., NATH, S. K. & PAUDYAL, B. 2014. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci*, 21, 23.
- SHELNUTT, K. P., KAUWELL, G. P., GREGORY, J. F., 3RD, MANEVAL, D. R., QUINLIVAN, E. P., THERIAQUE, D. W., HENDERSON, G. N. & BAILEY, L. B. 2004. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T polymorphism affects DNA methylation in response to controlled folate intake in young women. *J Nutr Biochem*, 15, 554-60.
- SHVETSOV, Y. B., HERNANDEZ, B. Y., WONG, S. H., WILKENS, L. R., FRANKE, A. A. & GOODMAN, M. T. 2009. Intraindividual variability in serum micronutrients: effects on reliability of estimated parameters. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 20, 36-43.
- SLAE, M., HESHIN-BEKENSTEIN, M., SIMCKES, A., HEIMER, G., ENGELHARD, D. & EISENSTEIN, E. M. 2014. Female polysomy-X and systemic lupus erythematosus. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 43, 508-512.
- STRAND, V., LEVY, R. A., CERVERA, R., PETRI, M. A., BIRCH, H., FREIMUTH, W. W., ZHONG, Z. J. & CLARKE, A. E. 2014. Improvements in health-related quality of life with belimumab, a B-lymphocyte stimulator-specific inhibitor, in patients with autoantibody-positive systemic lupus erythematosus from the randomised controlled BLISS trials. *Ann Rheum Dis*, 73, 838-44.
- STRICKLAND, F. M., HEWAGAMA, A., WU, A., SAWALHA, A. H., DELANEY, C., HOELTZEL, M. F., YUNG, R., JOHNSON, K., MICKELSON, B. & RICHARDSON, B. C. 2013. Diet influences expression of autoimmune-associated genes and disease severity by epigenetic mechanisms in a transgenic mouse model of lupus. *Arthritis Rheum*, 65, 1872-81.
- SUN LD, Z. K., WANG Q 2007. Study of riboflavin nutritional status in patients with systemic lupus erythematosus. .
- TAAMS, L. S., VAN EDEN, W. & WAUBEN, M. H. 1999. Antigen presentation by T cells versus professional antigen-presenting cells (APC): differential consequences for T cell activation and subsequent T cell-APC interactions. *Eur J Immunol*, 29, 1543-50.
- TIMLIN, H., MANNO, R. & DOUGLAS, H. 2019. Hyperhomocysteinemia and Lupus Nephritis. *Cureus*, 11, e5065.
- UGARTE-GIL, M. F., ACEVEDO-VÁSQUEZ, E., ALARCÓN, G. S., PASTOR-ASURZA, C. A., ALFARO-LOZANO, J. L., CUCHO-VENEGAS, J. M., SEGAMI, M. I., WOJDYLA, D., SORIANO, E. R., DRENKARD, C., BRENOL, J. C., DE OLIVEIRA E SILVA MONTANDON, A. C., COSTALLAT, L. T., MASSARDO, L., MOLINA-RESTREPO, J. F., GUIBERT-TOLEDANO, M., SILVEIRA, L. H., AMIGO, M. C., BARILE-FABRIS, L. A., CHACÓN-DÍAZ, R., ESTEVA-SPINETTI, M. H., PONS-ESTEL, G. J., MCGWIN, G., JR. & PONS-ESTEL, B. A. 2015. The number of flares patients experience impacts on damage accrual in systemic lupus erythematosus: data from a multiethnic Latin American cohort. *Ann Rheum Dis*, 74, 1019-23.
- UMMARINO, D. 2016. Rheumatoid arthritis: Smoking influences autoimmunity to vimentin. *Nat Rev Rheumatol*, 12, 624.

- UNIVERSITY-HOSPITAL-REGENSBURG 2021. Department of Internal Medicine III, Hematology and Oncology, University Hospital Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany.
- URBONAVICIUTE, V., FÜRNRÖHR, B. G., MEISTER, S., MUNOZ, L., HEYDER, P., DE MARCHIS, F., BIANCHI, M. E., KIRSCHNING, C., WAGNER, H., MANFREDI, A. A., KALDEN, J. R., SCHETT, G., ROVERE-QUERINI, P., HERRMANN, M. & VOLL, R. E. 2008. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med*, 205, 3007-18.
- USDA 2018. Food and nutrient database for dietary studies, <https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md-bhnrc/beltsville-human-nutrition-research-center/food-surveys-research-group/docs/fndds-download-databases/>.
- USDA, H., DAVID B.; AHUJA, JASPREET K.C.; WU, XIANLI; SOMANCHI, MEENA; NICKLE, MELISSA; NGUYEN, QUYEN A.; ROSELAND, JANET M.; WILLIAMS, JUHI R.; PATTERSON, KRISTINE Y.; LI, YING; PEHRSSON, PAMELA R. 2019. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Legacy Release. Nutrient Data Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, ARS, USDA. <https://data.nal.usda.gov/dataset/usda-national-nutrient-database-standard-reference-legacy-release>.
- VAN DOKKUM, W., SCHRIJVER, J. & WESSTRA, J. A. 1990. Variability in man of the levels of some indices of nutritional status over a 60-d period on a constant diet. *Eur J Clin Nutr*, 44, 665-74.
- VORDENBAUMEN, S., ROSENBAUM, A., GEBHARD, C., RAITHEL, J., SOKOLOWSKI, A., DUSING, C., CHEHAB, G., RICHTER, J. G., BRINKS, R., REHLI, M. & SCHNEIDER, M. 2021. Associations of site-specific CD4(+)-T-cell hypomethylation within CD40-ligand promoter and enhancer regions with disease activity of women with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 30, 45-51.
- VORDENBAUMEN, S., SOKOLOWSKI, A., KUTZNER, L., RUND, K. M., DUSING, C., CHEHAB, G., RICHTER, J. G., BRINKS, R., SCHNEIDER, M. & SCHEBB, N. H. 2020. Erythrocyte membrane polyunsaturated fatty acid profiles are associated with systemic inflammation and fish consumption in systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. *Lupus*, 29, 554-559.
- WANG, M., ZHOU, G., LV, J., ZENG, P., GUO, C. & WANG, Q. 2017a. Curcumin modulation of the activation of PYK2 in peripheral blood mononuclear cells from patients with lupus nephritis. *Reumatologia/Rheumatology*, 55, 269-275.
- WANG, Y. F., ZHANG, Y., LIN, Z., ZHANG, H., WANG, T. Y., CAO, Y., MORRIS, D. L., SHENG, Y., YIN, X., ZHONG, S. L., GU, X., LEI, Y., HE, J., WU, Q., SHEN, J. J., YANG, J., LAM, T. H., LIN, J. H., MAI, Z. M., GUO, M., TANG, Y., CHEN, Y., SONG, Q., BAN, B., MOK, C. C., CUI, Y., LU, L., SHEN, N., SHAM, P. C., LAU, C. S., SMITH, D. K., VYSE, T. J., ZHANG, X., LAU, Y. L. & YANG, W. 2021. Identification of 38 novel loci for systemic lupus erythematosus and genetic heterogeneity between ancestral groups. *Nat Commun*, 12, 772.
- WANG, Z., CHANG, C., PENG, M. & LU, Q. 2017b. Translating epigenetics into clinic: focus on lupus. *Clinical Epigenetics*, 9, 78.
- WILLEMZE, A., VAN DER WOUDE, D., GHIDEY, W., LEVARHT, E. W., STOOKEN-RIJSBERGEN, G., VERDUYN, W., DE VRIES, R. R., HOUWING-DUISTERMAAT, J. J.,

- HUIZINGA, T. W., TROUW, L. A. & TOES, R. E. 2011. The interaction between HLA shared epitope alleles and smoking and its contribution to autoimmunity against several citrullinated antigens. *Arthritis Rheum*, 63, 1823-32.
- WU, G., FANG, Y. Z., YANG, S., LUPTON, J. R. & TURNER, N. D. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*, 134, 489-92.
- YI, P., MELNYK, S., POGRIBNA, M., POGRIBNY, I. P., HINE, R. J. & JAMES, S. J. 2000. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem*, 275, 29318-23.
- ZAMANSKY, G. B. 1985. Sunlight-Induced Pathogenesis in Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Investigative Dermatology*, 85, 179-180.
- ZANDMAN-GODDARD, G., SOLOMON, M., ROSMAN, Z., PEEVA, E. & SHOENFELD, Y. 2012. Environment and lupus-related diseases. *Lupus*, 21, 241-50.
- ZHANG, Y., ZHAO, M., SAWALHA, A. H., RICHARDSON, B. & LU, Q. 2013. Impaired DNA methylation and its mechanisms in CD4(+)T cells of systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*, 41, 92-9.
- ZHANG, Z., SONG, L., MAURER, K., PETRI, M. A. & SULLIVAN, K. E. 2010. Global H4 acetylation analysis by ChIP-chip in systemic lupus erythematosus monocytes. *Genes & Immunity*, 11, 124-133.
- ZHAO, M., TANG, J., GAO, F., WU, X., LIANG, Y., YIN, H. & LU, Q. 2010. Hypomethylation of *IL10* and *IL13* Promoters in CD4⁺ T Cells of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 931018.
- ZHAO, M., ZHOU, Y., ZHU, B., WAN, M., JIANG, T., TAN, Q., LIU, Y., JIANG, J., LUO, S., TAN, Y., WU, H., RENAUER, P., DEL MAR AYALA GUTIÉRREZ, M., CASTILLO PALMA, M. J., ORTEGA CASTRO, R., FERNÁNDEZ-ROLDÁN, C., RAYA, E., FARIA, R., CARVALHO, C., ALARCÓN-RIQUELME, M. E., XIANG, Z., CHEN, J., LI, F., LING, G., ZHAO, H., LIAO, X., LIN, Y., SAWALHA, A. H. & LU, Q. 2016. IFI44L promoter methylation as a blood biomarker for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 75, 1998-2006.
- ZHAO, X., ZHANG, J., LIANG, Y., LI, J., DING, S., WANG, Y., CHEN, Y. & LIU, J. 2020. Advances In Drug Therapy For Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Med Chem*.
- ZHENG, R., GONZALEZ, A., YUE, J., WU, X., QIU, M., GUI, L., ZHU, S. & HUANG, L. 2019. Efficacy and Safety of Vitamin D Supplementation in Patients With Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Am J Med Sci*, 358, 104-114.
- ZHOU, Y., YUAN, J., PAN, Y., FEI, Y., QIU, X., HU, N., LUO, Y., LEI, W., LI, Y., LONG, H., SAWALHA, A. H., RICHARDSON, B. & LU, Q. 2009. T cell CD40LG gene expression and the production of IgG by autologous B cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*, 132, 362-70.
- ZONANA-NACACH, A., BARR, S. G., MAGDER, L. S. & PETRI, M. 2000. Damage in systemic lupus erythematosus and its association with corticosteroids. *Arthritis Rheum*, 43, 1801-8.

6. Anhang

6.1. Anpassung der Fragebogenantworten zur Berechnung der jeweiligen Nährstoffwerte in „Menge in Einheit / Tag“, sowie zur Verrechnung mit den Nährstoffangaben aus Tabelle 2-2.

Vor der Änderung der Tabelle besitzt die ursprünglich erstellte Tabelle noch andere „value labels“ (simple aufsteigende Nummerierung mit natürlichen Zahlen). Diese müssen konvertiert werden. Für jede Fragentabelle im Fragebogen (V „X“) wird eine „Konvertierungstabelle“ erstellt. Diese Tabellen sind unten getrennt aufgeführt. Einige Konvertierungstabellen sind gleich und können auf mehrere Fragen angewendet werden. Alle gleich konvertierten Tabellen für im folgenden genannte Fragen werden hier aufgezählt.

KONVERTIERUNGSTABELLEN

Fragen V1-V53 im Fragebogen (ohne Zusatzfragen)

(Im Fragebogen wird nach den letzten 4 Wochen gefragt. Daher **1 Monat = 28 Tage**)

Die Koeffizienten sind auf die dritte Nachkommastelle gerundet.

Alte Koeffizienten	Neue Koeffizienten	Rechnung
„1“ Nie	0	Nie = 0
„2“ 1 Mal im Monat	0,0357	1/28
„3“ 2-3 Mal im Monat	0,0893	2,5/28
„4“ 1-2 Mal pro Woche	0,214	1,5/7
„5“ 3-4 Mal pro Woche	0,5	3,5/7
„6“ 5-6 Mal pro Woche	0,786	5,5/7
„7“ 1 Mal am Tag	1	1 pro Tag wird als Standard definiert.
„8“ 2 Mal am Tag	2	2*1
„9“ 3 Mal am Tag	3	3*1
„10“ 4-5 Mal am Tag	4,5	4,5*1
„11“ Öfter als 5 Mal am Tag	5	

V1b

Koeffizient	Entspricht in der Nährwertetabelle folgender Spalte in Tabelle 2-2.
„1“ Vollmilch (mindestens 3,5% Fett)	V1.1
„2“ Fettarme Milch (1,5% Fett)	V1.2
„3“ Magermilch (max. 0,3% Fett)	V1.3
„4“ Sojamilch	V1.4
„5“ Laktosefreie Milch	V1.5

V1a, V2a, V3a, V4a, V5a, V6a, V7a, V8a, V9a, V10a, V11a, V13a, V14a, V17a, V18a, V19a, V20a, V21a, V22a, V23a, V26a, V28a, V29a, V46a, V31a, V32a, V35a, V50a

Alte Koeffizienten	Neue Koeffizienten	Rechnung
„1“ 1/2 Glas (oder weniger)	0,5	1/2

„2“	1 Glas (200ml)	1	Standard
„3“	2 Gläser	2	2*1
„4“	3 Gläser	3	3*1
„5“	4 Gläser	4	4*1

V4b, V5b

Alte Koeffizienten	Neue Koeffizienten	Rechnung
„1“	Unverdünnt	1
„2“	Etwa 1/4 Saft, 3/4 Wasser	0,25
„3“	Etwa 1/2 Saft, 1/2 Wasser	0,5
„4“	Etwa 3/4 Saft, 1/4 Wasser	0,75
		1/4
		1/2
		3/4

V7b, V8b, V9b

Alte Koeffizienten	Neue Koeffizienten	Rechnung
„1“	Nein	0
„2“	1 Teelöffel	1
„3“	2 Teelöffel	2
„4“	3 Teelöffel oder mehr	3
		0
		Standard
		2*1
		3*1

V12a, V24a, V25a

Alte Koeffizienten	Neue Koeffizienten	Rechnung
„1“	1 Glas (125ml)	1
„2“	2 Gläser	2
„3“	3 Gläser	3
„4“	4 Gläser	4
„5“	5 Gläser (oder mehr)	5
		Standard
		2*1
		3*1
		4*1
		5*1

V15a, V16a, V36a, V51a, V52a, V27a, V30a, V33a, V34a, V37a, V38a, V39a, V41a, V44a, V45a, V53a, V40a, V43a,

Alte Koeffizienten	Neue Koeffizienten	Rechnung
„1“	1/4 Schale	0,25
„2“	1/2 Schale	0,5
„3“	1 Schale	1
„4“	2 Schalen	2
„5“	3 Schalen oder mehr	3
		1/4
		1/2
		Standard
		2*1
		3*1

V21b, V22b, V23b, V31b

Alte Koeffizienten	Neue Koeffizienten	Rechnung
„1“	Selten oder nie	0,25
		1/4

„2“	Etwa zur Hälfte	0,5	1/2
„3“	Überwiegend	1	Standard
„4“	Weiß ich nicht	0	0

V27b, V30b, V34b

Hierbei bezieht sich die Frage darauf, ob das Produkt frittiert oder paniert ist. In den Rechnungen wird später darauf eingegangen.

Alte Koeffizienten	Neue Koeffizienten	Rechnung
„1“	(Fast) nie	0
„2“	1/4 des Verzehrs	0,25
„3“	1/2 des Verzehrs	0,5
„4“	3/4 des Verzehrs	0,75
„5“	(Fast) immer	1

V42a

Alte Koeffizienten	Neue Koeffizienten	Rechnung
„1“	1/2 Portion oder 1 Kartoffel	0,5
„2“	1 Portion oder 2 Kartoffeln	1
„3“	1/2 Portionen oder 3 Kartoffeln	1,5
„4“	2 Portionen oder 4 Kartoffeln	2
„5“	2 1/2 Portionen oder 5 Kartoffeln (oder mehr)	2,5

V47a

Standard ist hierbei 1 Kekse.

Alte Koeffizienten	Neue Koeffizienten	Rechnung
„1“	2 Kekse (oder weniger)	2*1
„2“	3 Kekse	3*1
„3“	4 Kekse	4*1
„4“	5 Kekse	5*1
„5“	6 Kekse (oder mehr)	6*1

V48a

Alte Koeffizienten	Neue Koeffizienten	Rechnung
„1“	1/2 kleinen Schokoriegel (oder weniger)	0,25
„2“	1/4 Tafel oder 1 kleinen Schokoriegel	0,5
„3“	1/2 Tafel oder 1 großen Schokoriegel	1
„4“	1 Tafel oder 2 große Schokoriegel	2

„5“ 2 Tafeln (oder mehr)	4	4*1
--------------------------	---	-----

V49a

Alte Koeffizienten	Neue Koeffizienten	Rechnung
„1“ 1 Stück	1	Standard
„2“ 2-5 Stück	3,5	(2+5)/2
„3“ 6-10 Stück	8	(6+10)/2
„4“ 11-20 Stück	15,5	(11+20)/2
„5“ 21 Stück (oder mehr)	21	21

V56

Koeffizienten	Neue Koeffizienten
„1“ Ja	1
„2“ Nein	0

V57

Alte Koeffizienten	Neue Koeffizienten	Rechnung
„1“ Täglich	1	Standard
„2“ 5-6 Mal pro Woche	0,786	(5+6)/7
„3“ 3-4 Mal pro Woche	0,5	(3+4)/7
„4“ 1-2 Mal pro Woche	0,214	(1+2)/7
„5“ Nie	0	0

6.2. Bestimmung der Nährstoffaufnahme eines einzelnen Patienten anhand des Fragebogens

Der Nährstoffkonsum kann nach der Umrechnung durch simple Multiplikation mit den Nährstoffwerten bei den meisten Fragen ermittelt werden. Einige Fragen des Fragebogens benötigen auf Grund Ihrer Formulierung sowie Zusatzfragen andere Rechenschritte. Im Folgenden werden alle benötigten Rechenschritte aufgezählt. Hierbei steht „V“ für die Frage im Ernährungsfragebogen und „E“ für den ermittelten Nährstoffgehalt pro konsumierte Einheit aus der Tabelle 2-2. Bei einigen Fragen musste auf Grund von Diskrepanzen in den ermittelten Nährstoffangaben der Mittelwert ausgerechnet werden. Dies ist durch die Abkürzung „Mean“ gekennzeichnet. Errechnet werden die Gesamtaufnahme von „total lipid (g)“, „VitB6 (mg)“, „Folate total (µg)“, „Folid acid (µg)“, „VitB12 (µg)“, „fatty acids total saturated (g)“, „fatty acids total monounsaturated (g)“, „fatty acids total polyunsaturated (g)“, „cholesterol (mg)“, „methionine (g)“, „glycine (g)“, „choline (mg)“, „VitD (IU)“. Hierbei sind die Rechnungen für jeden Nährstoff identisch. Lediglich die Einheiten müssen übertragen werden.

„Einfache“ Rechnungen:

V2	$V2 * V2a * E2$
V3	$V3 * V3a * E3$
V4	$V4 * V4a * V4b * Mean(E4.1, E4.2)$
V5	$V5 * V5a * V5b * E5$
V6	$V6 * V6a * E6$

V7	$V7 * V7a * E7$
V8	$V8 * V8a * \text{Mean}(E8.1, E8.2)$
V9	$V9 * V9a * E9$
V10	$V10 * V10a * E10$
V11	$V11 * V11a * E11$
V12	$V12 * V12a * E12$
V13	$V13 * V13a * \text{Mean}(E13.1, E13.2, E13.3)$
V14	$V14 * V14a * E14$
V15	$V15 * V15a * \text{Mean}(E15.1, E15.2)$
V16	$V16 * V16a * E16$
V17	$V17 * V17a * E17$
V18	$V18 * V18a * E18$
V19	$V19 * V19a * E19$
V20	$V20 * V20a * \text{Mean}(E20.1, E20.2)$
V24	$V24 * V24a * \text{Mean}(E24.2, E24.2)$
V25	$V25 * V25a * E25$
V26	$V26 * V26a * \text{Mean}(E26.1, E26.2)$
V28	$V28 * V28a * E28$
V29	$V29 * V29a * E29$
V30	$V30 * V30a * \text{Mean}(E30.1, E30.2, E30.3)$
V31	$V31 * V30a * E31$
V32	$V32 * V32a * E32$
V33	$V33 * V33a * \text{Mean}(E33.1, E33.2, E33.3)$
V34	$V34 * V34a * \text{Mean}(E34.1, E34.2)$
V35	$V35 * V35a * \text{Mean}(E35.1, E35.2)$
V36	$V36 * V36a * E36$
V37	$V37 * V36a * \text{Mean}(E37.1, E37.2, E37.3, E37.4, E37.5, E37.6)$
V38	$V38 * V38a * \text{Mean}(E38.1, E38.2, E38.3)$
V39	$V39 * V39a * \text{Mean}(E39.1, E39.2, E39.3, E39.4)$
V40	$V40 * V40a * \text{Mean}(E40.1, E40.2, E40.3)$
V41	$V41 * V41a * \text{Mean}(E41.1, E41.2, E41.3)$
V42	$V42 * V42a * E42$
V43	$V43 * V43a * \text{Mean}(E43.1, E43.2, E43.3)$
V44	$V44 * V44a * \text{Mean}(E44.1, E44.2, E44.3)$
V45	$V45 * V45a * \text{Mean}(E45.1, E45.2, E45.3, E45.4)$
V46	$V46 * V46a * \text{Mean}(E46.1, E46.2, E46.3, E46.4, E46.5, E46.6, E46.7)$
V47	$V47 * V47a * \text{Mean}(E47.1, E47.2, E47.3, E47.3, E47.4)$
V48	$V48 * V48a * \text{Mean}(E48.1, E48.2, E48.3)$
V49	$V49 * V49a * \text{Mean}(E49.1, E49.2, E49.3)$
V50	$V50 * V50a * \text{Mean}(E50.1, E50.2, E50.3)$
V51	$V51 * V51a * E51$
V52	$V52 * V52a * E52$
V53	$V53 * V53a * \text{Mean}(E53.1, E53.2, E53.3)$

„Komplizierte“ Rechnungen:

V1	$V1 * V1a * (E1.1-E1.6)$
V21	$V21 * V21a * (1-V21b) * E21 + V21 * V21a * V21b * \text{„E21 reduced fat“}$
V22	$V22 * V22a * (1-V22b) * \text{Mean}(E22.1, E22.2) + V22 * V22a * V22b * \text{„E22 reduced fat“}$

V23	$V23 * V23a * (1-V23b) * \text{Mean}(E23.1, E23.2, E23.3) + V23 * V23a * V23b * \text{„E23 reduced fat“}$
V27	$V27 * V27a * (1-V27b) * \text{Mean}(E27.1, E27.2) + V27 * V27a * V27b * \text{„E27 fried“}$

6.3. Quellenangabe zu den ermittelten Nährstoffangaben in Tabelle 2-2., sowie Angaben zu Dichtenumrechnungen zur Anpassung der Daten an die oben genannten Rechenschritte bzw. Tabellenumformungen

Alle Nährstoffreferenzwerte wurden aus der USDA Datenbank bezogen. Zur Umrechnung wurden unter anderem Dichteangaben zu den jeweiligen Nährstoffen benötigt. Alle Informationen zur Umwandlung in der Tabelle 2-2. können der folgenden Tabelle entnommen werden. Zudem sind alle ID Nummern der USDA Datenbank direkt in die Tabelle 2-2. eingearbeitet.

V1	V1a: Dichte von Milch: https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/milch/43045 1,018–1,048 g/cm ³ Mittelwert der Dichte: 1,033 g/cm ³ → 1 Glas Milch = 200ml = 206,6 g Milch
V2	Cola als Referenz, da am häufigsten konsumiert. http://daten.didaktikchemie.uni-bayreuth.de/experimente/standard/0204_dichte3.htm Dichte von Cola: 1,0389 g/cm ³ → 1 Glas Cola: 200ml = 207,78g Choline: https://nutritiondata.self.com/facts/beverages/3986/2
V3	Cola light als Referenz für Light-Getränke.
V4	Quelle beliebtester Fruchtsaft: http://www.dlg-verbraucher.info/de/lebensmittel-wissen/warenkunde/fruchtsaeft-ein-ueberblick.html Quelle: https://www.deutsche-lebensmittelbuch-kommission.de/sites/default/files/downloads/leitsaetzefruchtsaeft.pdf Dichte für Apfel- & Orangensaft: 1,040 g/cm ³ → 1 Glas = 200ml = 208g
V5	Beliebtester Gemüsesaft in Deutschland ist Tomatensaft: Quelle https://www.fruchtsaft.de Daher als Referenz ausgewählt. Dichte: https://www.aqua-calc.com/page/density-table/substance/tomato-blank-juice-coma-and-blank-canned-coma-and-blank-without-blank-salt-blank-added 1,03 g/cm ³ → 1 Glas = 200ml = 206g
V6	Wasser
V7	Kräuter & Früchtetee/Kräutertee (14381) als Referenz. Zucker hat keine Relevanz auf die von uns untersuchten Stoffe. Daher kann Element 7b ignoriert werden.
V8	Schwarzer und grüner Tee.
V9	Normaler schwarzer Kaffee.
V10	https://www.aqua-calc.com/page/density-table/substance/alcoholic-blank-beverage-coma-and-blank-beer-coma-and-blank-regular-coma-and-blank-budweiser Dichte von Bier: 1,01 g/cm ³ → 1 Flasche = 330ml = 333,3g
V11	→ 1 Flasche = 333,3g (siehe V10)
V12	Wein hat die gleiche Dichte wie Wasser: https://www.aqua-calc.com/page/density-table/substance/alcoholic-blank-beverage-coma-and-blank-wine-coma-and-blank-table-coma-and-blank-all
V13	3 „Standard-reference-Cocktails“ aus USDA Datenbank ausgewählt.
V14	Alcoholic beverage, distilled, all (gin, rum, vodka, whiskey) 80 proof (entspricht 40%) https://www.aqua-calc.com/page/density-table/substance/alcoholic-blank-beverage-coma-and-blank-distilled-coma-and-blank-all-blank--op-gin-coma-and-blank-rum-coma-and-blank-vodka-coma-and-blank-whiskey-cp--blank-80-blank-proof Dichte: 0,94g / cm ³ , 20ml = 18,8g, hat jedoch keine Relevanz für die gesuchten Nährstoffe.

V15	<p>Dichte für normale Cornflakes (MALT-O-MEAL Frosted Flakes): https://www.aqua-calc.com/page/density-table/substance/cereals-blank-ready-to-eat-coma-and-blank-malt-o-meal-coma-and-blank-frosted-blank-flakes-blank--op-cup-blank--op-1-blank-nlea-blank-serving-cp--cp- $0,17\text{g/cm}^3 \rightarrow 1 \text{ Schale} = 150\text{ml} = 25,5\text{g}$. Zum Vergleich wurden auch andere Cornflakes ausgewählt. Cereals ready to eat, Ralston Corn Flakes: https://www.aqua-calc.com/page/density-table/substance/cereals-blank-ready-to-eat-coma-and-blank-ralston-blank-corn-blank-flakes-blank--op-cup-blank--op-1-blank-nlea-blank-serving-cp--cp- Dichte $0,12\text{g/cm}^3 \rightarrow 1 \text{ Schale} = 150\text{ml} = 18\text{g}$</p>
V16	<p>Alpen Cereal, weil es aus der Schweiz kommt und dem deutschen Müsli somit am ähnlichsten ist. Sonst werden Cornflakes und Cereal im Englischen häufig als Synonyme gebraucht. 43218, Cereals ready-to-eat, ALPEN Dichte dieses Produktes: https://www.aqua-calc.com/page/density-table/substance/cereals-blank-ready-to-eat-coma-and-blank-alpen-blank--op-cup-blank--op-1-blank-nlea-blank-serving-cp--cp- $0,35\text{g/cm}^3 \rightarrow 1 \text{ Schale} = 150\text{ml} = 52,5\text{g}$</p>
V17	<p>Normales Vollkornbrot: Bread, multi-grain (includes whole-grain), 28397. Laut USDA: 1 Scheibe = 26g</p>
V18	<p>Grau- / Mischbrot \rightarrow Roggenbrot in den Standard References (SR). Laut USDA: 1 Scheibe = 32g</p>
V19	<p>Weißbrot / Brötchen \rightarrow Weißbrot aus den SR. Laut USDA: 1 Scheibe = 28g</p>
V20	<p>Butter \rightarrow SR 01145 Butter, without salt. Maßeinheit in Teelöffeln. 1 Teelöffel = 5ml Dichte Butter: $0,96\text{g/cm}^3$. 1 Teelöffel = 5 ml = 4,8g Margarine \rightarrow SR 04617 Margarine, regular, 80% fat, composite, stick, without salt. Dichte Margarine: $0,96\text{g/cm}^3$. 1 Teelöffel = 4,8g</p>
V21	<p>Frischkäse, im englischen Cream cheese \rightarrow SR 01017 Cheese, cream. Dichte: $0,98\text{g/cm}^3$. Gemessen in Esslöffeln = 3 Teelöffel = 15ml, 1 Esslöffel = 14,7g Zur Frage nach fettarmem Frischkäse: Cheese, cream, low fat, 43274. Dichte: $1,01\text{g/cm}^3$. 1 Esslöffel = 15ml = 15,15g</p>
V22	<p>Käse. Repräsentativ beliebte zwei beliebte Käsesorten in D aus des SR ausgewählt. 1 Scheibe Käse: 20g 22.1 SR Cheese, gouda 01022 22.2 SR Cheese, edam 01018 Zur Frage nach V22.3 = Fettarmer Käse. Als einzige SR war Cheese, provolone, reduced fat angegeben. Daher repräsentativ ausgewählt. 01208</p>
V23	<p>23.1 Quark: Cheese, cottage, creamed, 01012 23.2 Quark fettarm: Cheese, cottage, lowfat, 01016 23.3 Joghurt: Yogurt, plain, whole milk, 01116 23.4 Joghurt fettarm: Yogurt, plain, low fat, 01117</p>
V24	<p>V24.1 Honig. Dichte = $1,42\text{g/cm}^3$. 1 Teelöffel = 5ml = 7,1g Honey, 19296 V24.2 Dichte bei 1g/cm^3</p>
V25	<p>Nuss Nougatcreme \rightarrow SR Chocolate-flavored hazelnut spread, 19125 Dichte: $1,25\text{g/cm}^3$ 1 Teelöffel = 5 ml = 6,25g</p>
V26	<p>Ei. Spiegelei und Omelett 1 Ei (Größe M) wiegt ungefähr 60g V26.1 Spiegelei: Egg, whole, cooked, scrambled, 01132 V26.2 Omelett: Egg, whole, cooked, omelet, 01130</p>
V27	<p>Hähnchen. Repräsentativ zwei verschiedene SR ausgewählt. V27.1: Chicken, roasting, meat only, cooked, 05114, roasted In den SR wird 1 Unit als 1 Portion aufgezählt. Also 1 Unit = 171g in Tabelle eingetragen. V27.2: Chicken, stewing, meat only, cooked, 05126 In den SR 1 Unit = 137g. V27.3: Frage nach paniert oder frittiert. Nuggets (wie im Beispiel im Fragebogen) als SR genommen. School Lunch, chicken nuggets, whole grain breaded, 21611</p>
V28	<p>V28.1: SR für einen Hamburger ausgewählt Fast foods, hamburger, large, single patty, with condiments, 21202 Es gibt keine Angaben zum Nährstoffgehalt von Döner.</p>
V29	<p>Bratwurst: SR für fertige Bratwurst ausgewählt. Gewicht gekocht: 85g Bratwurst, pork, cooked, 07013</p>

V30	Schweine-, Rind-, Wildfleisch (150g als Standardportion) V30.1 Pork, fresh, ground, cooked, 10220, 150g V30.2 Beef, composite of trimmed retail cuts, separable lean and fat, trimmed to 0" fat, select, cooked, 13363 V30.3 Game meat, deer, ground, cooked, pan-broiled, 17344
V31	Salami, cooked, beef and pork, 07069 Laut USDA eine Scheibe = 12,3g
V32	Ham, chopped, not canned, 07027Laut USDA eine Scheibe = 21g
V33	Kalter Fisch: Räucherlachs, Matjes, Thunfisch. V33.1: Fish, salmon, chinook, smoked, 15077 (1 Scheibe Räucherlachs = 28g) V33.2: Fish, herring, Atlantic, pickled, 15041 (1 Stück laut USDA = 15g) V33.3: Fish, tuna, white, canned in water, drained solids, 15126 (1 Portion = 20g)
V34	Fisch als warme Mahlzeit V34.1: Fish, pollock, Atlantic, cooked, dry heat, 15067 V34.2: Fish, trout, rainbow, farmed, cooked, dry heat, 15241 Laut Fragebogen entspricht 1 Portion = 4 Fischstäbchen. 1 Stäbchen = 30g → x4 = 120g
V35	Früchte. Wie im Beispiel von Apfel und Banane ausgegangen. Apfel-Gewicht ist ungefähr 130-170g V35.1: Apples, raw, with skin, 09003 V35.2: Bananas, raw, 09040 Das Gewicht einer Banane ist ungefähr: 130g
V36	Gegartes Obst (Konservenobst) → Konservenobst als Beispiel im Fragebogen. Daher Frucht Salat in Konserven als Referenz genommen. 09102, Fruit salad, (peach and pear and apricot and pineapple and cherry), canned, water pack, solids and liquids 150g als Portion
V37	Gemüse. Dafür beliebte Gemüsesorten herausgesucht und repräsentativ aufgelistet. Alles pro 150g Portion aufgelistet so wie im Beispielbild im Fragebogen. Karotten, Broccoli, Tomaten, Gurke, Zwiebel, Kopfsalat V37.1: Carrots, raw, 11124 V37.2: Broccoli, raw, 11090V37.3: Tomatoes, orange, raw, 11695V37.4: Cucumber, with peel, raw, 11205V37.5: Onions, raw, 11282 V37.6: Lettuce, iceberg, raw, 11252
V38	Hülsenfrüchte Bohnen, Erbsen, Linsen (alles pro 150g) V38.1: Beans, snap, green, raw, 11052 V38.2: Peas, green, raw, 11304 V38.3: Lentils, raw, 16069
V39	Gegartes GemüseV39.1: Carrots, cooked, boiled, drained, without salt, 11125 V39.2: Broccoli, cooked, boiled, drained, without salt, 11091 V39.3: Tomatoes, red, ripe, cooked, 11530 V39.4: Onions, cooked, boiled, drained, without salt, 11283
V40	Nudeln: Spaghetti, Ravioli, Lasagne 250g als Standardportion. V40.1: Spaghetti, spinach, cooked, 20127 V40.2: Restaurant, Italian, cheese ravioli with marinara sauce, 36055, V40.3: Restaurant, Italian, lasagna with meat, 36041
V41	Reis, Couscous, BulgurV41.1: Rice, white, medium-grain, enriched, cooked, 20051 V41.2: Couscous, cooked, 20029V41.3: Bulgur, cooked, 20013
V42	Potatoes, boiled, cooked in skin, flesh, without salt, 11365
V43	Kartoffeln gebratenV43.1: Potatoes, hash brown, home-prepared, 11370 V43.2: Potato wedges, frozen, 11410, (Includes foods for USDA's Food Distribution Program) V43.3: Potato puffs, frozen, oven-heated, 11399
V44	Pommes. Eine Portion 170gV44.1: Restaurant, family style, french fries, 36014 V44.2: Potatoes, french fried, steak fries, salt added in processing, frozen, oven-heated, 11412 V.44.3: McDONALD'S, french fries, 21238
V45	Pizza ungefähr 400g pro Pizza V45.1: Pizza, cheese topping, regular crust, frozen, cooked, 21224 V45.2: Pizza, meat and vegetable topping, regular crust, frozen, cooked, 21226 V45.3: PIZZA HUT 12" Cheese Pizza, Pan Crust, 21272 V45.4: PIZZA HUT 12" Pepperoni Pizza, Pan Crust, 21275
V46	Kuchen, Torte, Backwaren (Muffins, Apfeltaschen, Baklava). Viele verschiedene ausgewählt, um besser repräsentativ zu gestalten. Einheit immer pro ein Stück laut Standard Reference Wert! V46.1: Cake, chocolate, prepared from recipe without frosting, 18101 (1 Stück 95g) V46.2: Cake, snack cakes, creme-filled, chocolate with frosting, 18127 (1 Stück 50g) V46.3: Cake, cheesecake, commercially prepared, 18147 (1 Stück 80g) V46.4: Cake, fruitcake, commercially prepared, 18110 (1 Stück 43g) V46.5: Doughnuts, cake-type, plain, chocolate-coated or frosted, 18249 (1 Stück 43g)V46.6: Doughnuts, cake-type, plain, sugared or glazed, 18250 (1 Stück 45g)

	V46.7: Muffins, blueberry, commercially prepared (Includes mini-muffins), 18274 (66g)
V47	Kekse V47.1: Cookies, Marie biscuit, 28351 (28g) V47.2: Cookies, butter, commercially prepared, enriched, 18155 (Stück 5g) V47.3: Cookies, oatmeal, commercially prepared, regular, 18178 (Stück 18g) V47.4: Cookies, chocolate chip, commercially prepared, soft-type, 18160 (Stück 12,2g)
V48	Schokolade (Bei Schokolade alles pro Schokoriegel (41g)) V48.1: Candies, sweet chocolate, 19081 (1 Schokoriegel = 41g) V48.2: Chocolate, dark, 70-85% cacao solids, 19904 V48.3: Candies, milk chocolate, 19120
V49	Süßigkeiten (10g pro Stück) Bestehen eigentlich nur aus Zucker und Gelatine daher überall 0. V49.1: Candies, gumdrops, starch jelly pieces, 19106 V49.2: Candies, caramels, 19074 V49.3: Candies, jellybeans, 19108
V50	Eiscreme: Standardwerte für Vanille, Schokolade, Erdbeere als Referenz genommen Pro eine Kugel. V50.1: Ice creams, vanilla, 19095, V50.2: Ice creams, chocolate, 19270, V50.3: Ice creams, strawberry, 19271,
V51	Kartoffelchips - hierfür die ganz normale Standard Reference für potato chips salted genommen pro 35g (entspricht ungefähr 1/5 Packung Chips) V51: Snacks, potato chips, plain, salted, 19411,
V52	Salzgebäck - exemplarisch Salzstangen wie im Beispiel pro 35g V52: Snacks, sesame sticks, wheat-based, salted, 19418,
V53	Nüsse - Erdnüsse, Walnüsse, Haselnüsse pro Portion (50g) V53.1: Nuts, walnuts, english, 12155, V53.2: Nuts, mixed nuts, oil roasted, with peanuts, with salt added, 12637, V53.3: Nuts, hazelnuts or filberts, 12120.

6.4. Identifikation der relevanten Fragen im RKI-Fragebogen zur Ermittlung von Methylierungsmarkern

Nach den oben genannten Referenzwerten in Tabelle 2-6 wurden für die Nährstoffe Methionin, Cholin und Cystein relevante Fragen im Fragebogen nach definierter „Menge pro Portion“ herausgesucht. Im Folgenden finden sich die ermittelten Fragen im Fragebogen je nach definiertem relevantem Grenzwert für die Nährstoffe.

Methionin

Der Referenzwert bei einem 70kg schweren Menschen liegt bei ca. 726mg. Es wurde eine untere Grenze von 3,3% des Referenzwertes festgelegt. Dabei entsteht folgende Tabelle bezüglich der Fragen, absteigend sortiert nach Menge in g/Portion.

Frage	Lebensmittel	Methionin in g/Portion
V27	Geflügel	1,1695
V30	Fleisch	1,042
V45	Pizza	0,929
V34	warmer Fisch	0,886
V29	Bratwurst	0,615
V23	Quark, Joghurt	0,462
V32	Schinken	0,419
V40	Nudeln	0,403
V26	Eier	0,1845
V1	Milch	0,171
V38	Hülsenfrüchte	0,157
V53	Nüsse	0,123
V33	kalter Fisch	0,118
V41	Reis	0,11

V43	gebratene Kartoffel	0,081
V44	Pommes	0,075
V52	Salzgebäck	0,067
V46	Kuchen, Torten	0,061
V42	gekochte Kartoffel	0,06
V50	Eiscreme	0,053
V18	Graubrot/Mischbrot	0,044
V19	Weißbrot	0,039
V51	Kartoffelchips	0,038
V31	Wurst	0,037
V17	Vollkornbrot	0,036
V39	gegartes Gemüse	0,03
V21	Frischkäse	0,028
V15	Cornflakes	0,02

Cholin

Wie bei Methionin wurde eine untere Grenze von 3,3% abhängig vom Tagesbedarf festgelegt. Hierbei entsteht folgende Tabelle bezüglich der Fragen, absteigend sortiert nach Menge in mg/Portion.

Frage	Lebensmittel	Cholin in mg/Portion
V26	Eier	140,6
V30	Fleisch	138,5666
V34	warmer Fisch	101,5
V40	Nudeln	83,8
V29	Bratwurst	79,9
V45	Pizza	77,6
V38	Hülsenfrüchte	70,066
V44	Pommes	67,7
V28	Hamburger	56,9
V43	gebratene Kartoffeln	48,6
V46	Kuchen, Torten	41,0666
V1	Milch	36,8
V10	Bier	33,7
V11	Malzbier	33,6
V23	Quark, Joghurt	29
V42	gekochte Kartoffeln	27
V39	gegartes Gemüse	23,5
V53	Nüsse	22,8
V32	Schinken	16,2
V16	Müsli	16,1
V50	Eiscreme	16,05
V48	Schokolade	15,6
V33	kalter Fisch	15,466

Cystein

Wie bei Methionin wurde eine untere Grenze von 3,3% abhängig vom Tagesbedarf festgelegt. Hierbei entsteht folgende Tabelle bezüglich der Fragen, absteigend sortiert nach Menge in mg/Portion.

Frage	Lebensmittel	Cystein in mg/Portion
V45	Pizza	586,666
V27	Geflügel	540,1
V30	Fleisch	494,5
V34	warmer Fisch	310,8
V29	Bratwurst	296,65
V28	Hamburger	215
V40	Nudeln	210
V38	Hülsenfrüchte	186
V41	Reis	151,33
V23	Joghurt, Quark	142
V26	Eier	130,2
V53	Nüsse	128,833
V43	gebratene Kartoffeln	77
V52	Salzgebäck	70,35
V18	Graubrot	55,36
V19	Weißbrot	53,48
V39	gegartes Gemüse	51,375
V22	Käse	50,9
V42	gekochte Kartoffeln	48
V46	Kuchen, Torten	46,24
V17	Vollkornbrot	45,76
V33	kalter Fisch	42,76
V1	Außer Sojamilch	41,32
V32	Schinken	40
V44	Pommes	37,4
V37	rohes Gemüse	34,75
V51	Kartoffelchips	31,15
V31	Wurst	24,1
V7	Cornflakes	19,8
V48	Schokolade	19,68
V50	Eiscreme	19
V5	Tomatensaft	16,48
V47	Kekse	14,69

6.5. Analyse einer möglichen Assoziation der Hauptlieferanten für Methionin, Cholin und Cystein mit der Methylierung an der CD40L-DNA (global, CpG17, CpG22)

Bei der Auswertung wurden die Mengen an Methionin, Cholin und Cystein kombiniert, um einen Gesamteffekt der einzelnen Fragen erkennen zu können.

a. CpG17

CpG17	E	2.5CI	97.5CI	p univ.	p multiv.
V27	0,037	-0,04	0,11	0,3346	
V41	0,010	-0,01	0,03	0,2924	
V52	-0,117	-0,36	0,13	0,3403	
V18	-0,003	-0,03	0,02	0,8176	
V19	0,018	-0,01	0,05	0,2352	
V51	0,116	-0,04	0,27	0,1467	
V31	0,011	-0,03	0,05	0,6068	

V17	0,001	-0,02	0,02	0,9210	
V28	0,113	-0,16	0,39	0,4160	
V48	-0,001	-0,02	0,02	0,9596	
V30	0,025	-0,01	0,07	0,2108	
V45	0,186	0,01	0,36	0,0406	0,2
V34	-0,034	-0,21	0,15	0,7086	
V29	0,190	-0,10	0,48	0,1897	
V23	0,025	0,00	0,05	0,0466	0,054
V32	0,044	-0,02	0,11	0,1984	
V40	0,044	-0,04	0,13	0,3127	
V26	-0,002	-0,04	0,04	0,9217	
V1	0,002	-0,01	0,01	0,6783	
V38	-0,043	-0,22	0,14	0,6334	
V53	-0,057	-0,12	0,00	0,0678	
V33	-0,011	-0,15	0,13	0,8709	
V43	0,085	-0,12	0,29	0,4005	
V44	0,248	0,01	0,48	0,0390	0,19
V46	0,036	-0,03	0,10	0,2685	
V42	0,062	0,02	0,10	0,0037	0,005
V50	0,058	-0,04	0,15	0,2285	
V39	0,005	-0,04	0,05	0,8385	
V21	0,001	-0,03	0,03	0,9637	
V15	-0,068	-0,13	0,00	0,0373	
V10	-0,028	-0,09	0,04	0,4003	
V11	0,179	-0,19	0,55	0,3388	
V16	-0,018	-0,06	0,03	0,4356	
V22	-0,001	-0,02	0,02	0,9170	
V37	-0,021	-0,05	0,01	0,1452	
V7	0,003	-0,01	0,01	0,6182	
V5	-0,080	-0,24	0,08	0,3107	
V47	-0,004	-0,06	0,05	0,8880	

b. CpG22

CpG22	E	2.5CI	97.5CI	p univ.	p multiv.
V27	-0,022	-0,11	0,07	0,6272	
V41	0,012	-0,01	0,03	0,2799	
V52	-0,085	-0,37	0,20	0,5473	
V18	-0,015	-0,05	0,02	0,3398	
V19	0,030	0,00	0,06	0,0868	0,036
V51	0,009	-0,18	0,19	0,9254	
V31	-0,005	-0,05	0,04	0,8384	
V17	0,013	-0,01	0,03	0,1929	
V28	-0,066	-0,39	0,25	0,6805	
V48	-0,003	-0,03	0,02	0,8248	
V30	0,002	-0,04	0,05	0,9245	
V45	-0,030	-0,24	0,18	0,7815	
V34	-0,018	-0,23	0,19	0,8606	
V29	0,269	-0,06	0,60	0,1077	
V23	0,012	-0,02	0,04	0,4069	
V32	0,001	-0,08	0,08	0,9732	
V40	-0,044	-0,15	0,06	0,3867	

V26	-0,003	-0,05	0,04	0,8858	
V1	0,005	0,00	0,01	0,3392	
V38	-0,138	-0,34	0,07	0,1865	
V53	-0,052	-0,12	0,02	0,1523	
V33	-0,057	-0,21	0,10	0,4774	
V43	-0,102	-0,34	0,13	0,3848	
V44	0,110	-0,17	0,39	0,4365	
V46	0,047	-0,03	0,12	0,2114	
V42	0,032	-0,02	0,08	0,2109	
V50	0,008	-0,10	0,12	0,8866	
V39	0,008	-0,05	0,06	0,7667	
V21	0,017	-0,01	0,05	0,2812	
V15	-0,008	-0,09	0,07	0,8291	
V10	-0,043	-0,12	0,03	0,2626	
V11	0,388	-0,03	0,81	0,0686	0,1
V16	-0,028	-0,08	0,02	0,2909	
V22	0,003	-0,02	0,03	0,8262	
V37	-0,013	-0,05	0,02	0,4313	
V7	0,012	0,00	0,02	0,0601	0,06
V5	0,041	-0,14	0,22	0,6569	
V47	-0,002	-0,06	0,06	0,9416	

c. Mittlere Methylierung CD40L

mean	E	2.5CI	97.5CI	p univ.	p multiv.
V27	0,032	-0,01	0,08	0,1417	
V41	0,001	-0,01	0,01	0,9184	
V52	-0,147	-0,28	-0,02	0,0279	
V18	0,009	-0,01	0,02	0,2550	
V19	-0,003	-0,02	0,01	0,7552	
V51	0,003	-0,08	0,09	0,9394	
V31	-0,001	-0,02	0,02	0,9417	
V17	0,000	-0,01	0,01	0,9255	
V28	-0,080	-0,23	0,07	0,2877	
V48	-0,005	-0,02	0,01	0,3437	
V30	0,025	0,00	0,05	0,0230	0,038
V45	0,031	-0,07	0,13	0,5386	
V34	0,085	-0,01	0,18	0,0896	
V29	0,056	-0,11	0,22	0,4901	
V23	0,011	0,00	0,02	0,1106	
V32	0,003	-0,03	0,04	0,8764	
V40	-0,015	-0,06	0,03	0,5343	
V26	0,013	-0,01	0,03	0,2554	
V1	0,000	0,00	0,00	0,8995	
V38	-0,023	-0,13	0,08	0,6518	
V53	-0,019	-0,05	0,01	0,2613	
V33	0,022	-0,05	0,10	0,5702	

V43	-0,020	-0,13	0,09	0,7209	
V44	0,097	-0,04	0,23	0,1469	
V46	0,019	-0,02	0,05	0,2953	
V42	0,024	0,00	0,05	0,0457	0,12
V50	0,063	0,01	0,11	0,0148	0,009
V39	0,013	-0,01	0,04	0,3224	
V21	0,007	-0,01	0,02	0,3499	
V15	0,002	-0,03	0,04	0,8991	
V10	0,013	-0,03	0,05	0,5077	
V11	0,036	-0,17	0,24	0,7260	
V16	-0,008	-0,03	0,02	0,5328	
V22	-0,004	-0,02	0,01	0,5612	
V37	0,000	-0,02	0,02	0,9904	
V7	0,005	0,00	0,01	0,1054	
V5	0,007	-0,08	0,09	0,8792	
V47	-0,009	-0,04	0,02	0,5275	

6.6. Analyierte CD40L Promotor und *Enhancer* Regionen

CpG-Stellen des CD40L-*Enhancers* und der Promotorregion fortlaufend nummeriert mit Kennzeichnung der jeweiligen Positionen in Bezug auf das Chromosom X (GRCh37/hg19).

CpG	Position	Region
CpG1	135726342 - 135726343	Enhancer 1
CpG2	135726386 - 135726387	Enhancer 1
CpG3	135726602 - 135726603	Enhancer 1
CpG4	135726606 - 135726607	Enhancer 1
CpG5	135726646 - 135726647	Enhancer 1
CpG6	135726707 - 135726708	Enhancer 1
CpG7	135726744 - 135726745	Enhancer 1
CpG8	135726746 - 135726747	Enhancer 1
CpG9	135726752 - 135726753	Enhancer 1
CpG10	135726862 - 135726863	Enhancer 1
CpG11	135728699 - 135728700	Enhancer 2
CpG12	135728914 - 135728915	Enhancer 2
CpG13	135728921 - 135728922	Enhancer 2
CpG14	135728989 - 135728990	Enhancer 2
CpG15	135729052 - 135729053	Enhancer 2
CpG16	135730241 - 135730242	Promotor
CpG17	135730265 - 135730266	Promotor
CpG18	135730298 - 135730299	Promotor
CpG19	135730306 - 135730307	Promotor
CpG20	135730413 - 135730414	Promotor*
CpG21	135730438 - 135730439	Promotor
CpG22	135730445 - 135730446	Promotor

* Aufgrund technischer Probleme konnte der Methylierungsstatus von CpG20 innerhalb der Promotorregion bei 11 von 60 Patienten nicht quantifiziert werden. Daher wurde CpG20 in den Analysen ausgelassen.

7. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Stefan Vordenbäumen, der die Studie initiierte, eine umfassende wissenschaftliche Betreuung leistete und mich in jedem Schritt tatkräftig und hilfsbereit unterstützte.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schneider danke ich vielmals für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion in der Poliklinik für Rheumatologie an der Universitätsklinik Düsseldorf.

Für die intensive Unterstützung bei der Aufklärung und Erfassung der Patientendaten möchte ich mich beim gesamten Personal der Klinik bedanken. Ohne intensive ärztliche, pflegerische und administrative Unterstützung wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Besonderen Dank für die eine außerordentliche Betreuung bei der Datenerfassung und Auswertung schulde ich Herrn PD Dr. Ralph Brinks, Herrn Dipl. Dok. Hasan Acar und Herrn Dipl. Dok. Thilo Kluß.

Danken möchte ich ebenfalls dem Ehepaar Werner und Brigitte Hiller für die Gründung des Hiller Forschungszentrums für Rheumatologie, sowie dem angestellten Personal, welches mich ebenfalls gekonnt und leidenschaftlich bei der Verarbeitung und Auswertung des Probenmaterials unterstützte. Für den persönlichen Einsatz und ihre Unermüdlichkeit möchte ich mich besonders bei Frau Ellen Bleck und Frau Birgit Opgenoorth bedanken.

Ein ganz großer Respekt und Dank gelten den Patienten der Rheumatologischen Ambulanz, welche mir mit der Teilnahme an dieser Studie großes Vertrauen entgegenbrachten und mich durch ihr aktives und selbstloses Engagement unterstützten.

Ganz besonders Danke ich jedoch meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Freundin, ohne deren stets gewährte Unterstützung mir das Studium der Medizin und die Anfertigung der vorliegenden Dissertation nicht möglich gewesen wäre.