

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg Universität Mainz

**Vaskuläre Inflammation und Dysfunktion des Systemischen Lupus
erythematoses (SLE) im MRL Fas^{lpr}-Mausmodell – IL-6 als Mediator der
Krankheitsinitiation**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Paul Christoph Claßen, geb. Marczynski
aus Mainz

Mainz, 2021

Vorbemerkungen

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

Vorbemerkungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits im International Journal of Molecular Science publiziert:

Marczynski, P.; Meineck, M.; Xia, N.; Li, H.; Kraus, D.; Roth, W.; Mockel, T.; Boedecker, S.; Schwarting, A.; Weinmann-Menke, J., **Vascular Inflammation and Dysfunction in Lupus-Prone Mice-IL-6 as Mediator of Disease Initiation.** *Int J Mol Sci* **2021**, 22, (5).

In vorliegender Arbeit wird aus Gründen der Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Es sind ausdrücklich weibliche sowie weitere Geschlechteridentitäten mitgemeint. Bezieht sich eine Aussage auf eine bestimmte Patientengruppe, ist das im Text deutlich gemacht.

Inhaltsverzeichnis

Vorbemerkungen	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	11
1 Einleitung/Ziel der Dissertation	12
2 Literaturdiskussion	14
2.1 Systemischer Lupus erythematoses	14
2.1.1 Manifestationen und Klassifikation	14
2.1.2 Therapie des SLE	16
2.1.3 Epidemiologie.....	17
2.1.4 Ätiologie und Pathogenese	17
2.1.5 Pathogenese der Manifestationen	20
2.2 kardiovaskuläre Manifestation des SLE	21
2.2.1 Klinisches Bild und Epidemiologie	21
2.2.2 Pathogenese	22
2.2.3 Diagnostik	27
2.2.4 Therapie	29
2.3 Einfluss von Zytokinen	30
2.3.1 Einfluss von IL-6	30
2.3.2 Einfluss weiterer Zytokine.....	31
2.4 Einfluss von ATI auf die Krankheitsaktivität	33
2.5 Lupusmausmodelle	34
2.5.1 Kardiovaskuläre Beteiligung in Lupusmausmodellen.....	36
3 Material und Methoden	39
3.1 Material	39

3.2	Methoden.....	39
3.2.1	Mäuse.....	39
3.2.2	Genotypisierung durch PCR	40
3.2.3	Sakrifizierung und Gewebeaufbereitung	41
3.2.4	Analyse der Gewebeschnitte	42
3.2.5	RNA-Isolation und qPCR.....	45
3.2.6	IL-6 ELISA.....	47
3.2.7	Erfassung der Endothelfunktion	48
3.2.8	Isolation und Kultivierung von Endothelzellen aus Aorta und Niere.....	48
3.2.9	Statistische Auswertung	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Das MRL-<i>Fas</i>^{lpr} Mausmodell eignet sich zur Untersuchung vaskulärer Fragestellungen.....	51
4.1.1	Vaskuläre und perivaskuläre Infiltrate sind in MRL- <i>Fas</i> ^{lpr} Mäusen erhöht	51
4.1.2	MRL- <i>Fas</i> ^{lpr} Mäuse zeigen beginnende, atherosklerotische Veränderungen	52
4.1.3	Charakterisierung (peri)vaskulärer Infiltrate.....	54
4.1.4	Expression verschiedener Inflammediatoren.....	56
4.1.5	Stimulation von Endothelzellen.....	59
4.2	Die vaskuläre Inflammation ist in <i>Il6</i>^{-/-} MRL-<i>Fas</i>^{lpr} Mäusen abgeschwächt.....	62
4.3	IL-6 vermittelt vaskuläre Dysfunktion in MRL-<i>Fas</i>^{lpr} Mäusen.....	67
4.4	ATI-freie Ernährung mindert die vaskuläre Beteiligung in MRL-<i>Fas</i>^{lpr} Mäusen	68
5	Diskussion	70
5.1	Eignung des MRL-<i>Fas</i>^{lpr} Mausmodells in Bezug auf vaskuläre Fragestellungen.....	70
5.1.1	Vaskuläre und perivaskuläre Infiltrate	70
5.1.2	Beginnende atherosklerotische Veränderungen.....	71
5.1.3	Expression verschiedener Inflammediatoren.....	72
5.1.4	Stimulation von Endothelzellen.....	76

Inhaltsverzeichnis

5.1.5	Fazit	77
5.2	Rolle von IL-6 bei der vaskulären Inflammation.....	77
5.3	Rolle von ATI-freier Ernährung bei der vaskulären Inflammation.....	81
6	Zusammenfassung	84
7	Literaturverzeichnis.....	86
8	Anhang	100
8.1	Materialliste.....	100
8.1.1	Geräte.....	100
8.1.2	Verbrauchsartikel.....	102
8.1.3	Reagenzien und Kits	105
8.1.4	Puffer	109
8.1.5	Primer.....	110
8.1.6	Antikörper.....	111
8.2	Klassifikation des SLE	112
9	Danksagung.....	113
10	Tabellarischer Lebenslauf	114

Abkürzungsverzeichnis

ACR	-	American College of Rheumatology
ADAM17	-	A Disintegrin And Metalloprotease
AK	-	Antikörper
ANA	-	Antinukleäre Antikörper
ANCA	-	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
Anti-dsDNA-Ak	-	Anti-Doppelstrang-DNA-Antikörper
ATI	-	Amylase-Trypsin-Inhibitoren
BAFF	-	B cell activating factor
CAC	-	circulating angiogenic cells
CD	-	Cluster of differentiation
CEC	-	cholesterol efflux capacity
CIMT	-	Karotis-Intima-Media-Dicke
CSF-1	-	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
CVE	-	kardiovaskuläre Ereignisse
DAMPs	-	Damage-associated molecular pattern
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
eNOS	-	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPC	-	endothelialen Progenitorzellen
EULAR	-	European League Against Rheumatism
EvG-Färbung	-	Elastika-van-Gieson-Färbung
FMD	-	flow-mediated dilatation
GFD	-	gluten-free diet
GP	-	Glykoprotein
HDL	-	High Density Lipoprotein
HE-Färbung	-	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
hsCRP	-	hochsensitives C-reaktives Protein
HUVECs	-	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM-1	-	Intercellular adhesion molecule 1
IFN	-	Interferon
Ig	-	Immunglobulin
IL	-	Interleukin
IMT	-	Intima-Media-Dicke
JAK-Inhibitor	-	Januskinase-Inhibitor

Abkürzungsverzeichnis

KHK	-	Koronare Herzkrankheit
LDG	-	Low-Density Granulozyten
LDL	-	Low Density Lipoprotein
LPS	-	Lipopolysaccharide
MRL	-	Murphy Roths Large
mRNA	-	messenger Ribonukleinsäure
MRT	-	Magnetresonanztomographie
NET	-	Neutrophil extracellular traps
NF κ B	-	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	-	Stickstoffmonoxid
oxLDL	-	Oxidiertes Low-Density Lipoprotein
PAMPs	-	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PAS	-	periodic acid–Schiff reaction
P-C4d	-	Platelet bound complement split product
PCR	-	Polymerasekettenreaktion
PTPRZ	-	Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type Z
PWV	-	Pulswellengeschwindigkeit
RAGE	-	multiligand receptor for advanced glycation end products
RNA	-	Ribonukleinsäure
ROS	-	Reaktive Sauerstoffspezies
RTQ-PCR	-	Real Time Quantitative PCR
S100A8	-	S100-Calcium-bindendes Protein A8
sCD-163	-	Soluble CD-163
SCLE	-	subakut kutaner Lupus erythematodes
SEM	-	standard error of the mean
SLE	-	systemische Lupus erythematodes
SLICC	-	Systemic Lupus International Collaborating Clinics
STAT	-	Signal Transducers and Activators of Transcription
sVCAM-1	-	Soluble Vascular Cell Adhesion Protein 1
TGF	-	Transforming Growth Factor
TIA	-	transitorische ischämische Attacke

Abkürzungsverzeichnis

TLR	-	Toll-like Rezeptoren
TNF	-	Tumornekrosefaktor
Treg	-	Regulatorische T-Zellen
UV	-	Ultraviolett
VCAM	-	vascular cell adhesion protein
VEGF	-	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	-	von-Willebrand-Faktor
ZNS	-	Zentrales Nervensystem
β2-GPI	-	Beta-2-Glykoprotein I

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 THERAPIE DES NICHT-RENALEN SLE	17
ABBILDUNG 2 URSACHEN DER VORZEITIGEN UND VERSTÄRKTEN ATHEROSKLEROSE	27
ABBILDUNG 3 PERIVASKULÄRE UND VASKULÄRE INFILTRATION DER NIERE, LUNGE UND SPEICHELDRÜSE (MRL-FAS ^{LPR})	51
ABBILDUNG 4 INTRARENALE, PERIVASKULÄRE UND VASKULÄRE LEUKOZYTENINFILTRATION (MRL-FAS ^{LPR} VS. FAS-++).....	52
ABBILDUNG 5 INTIMA-MEDIA-DICKE DER SUPRARENALEN AORTA (MRL-FAS ^{LPR} VS. FAS-++)	53
ABBILDUNG 6 STRUKTURELLE VERÄNDERUNGEN DER GEFÄßWAND (MRL-FAS ^{LPR} VS. FAS- ++).....	54
ABBILDUNG 7 CHARAKTERISIERUNG DER (PERI)VASKULÄREN INFILTRATE (MRL-FAS ^{LPR} VS. FAS-++).....	55
ABBILDUNG 8 IGG-ABLAGERUNGEN (MRL-FAS ^{LPR} VS. FAS-++).....	56
ABBILDUNG 9 INFLAMMATORISCHE ZYTOKINE IN DEN NIEREN (MRL-FAS ^{LPR} VS. FAS-++)	58
ABBILDUNG 10 INFLAMMATORISCHE ZYTOKINE IN DER SUPRARENALEN AORTA MIT IHREM PERIVASKULÄREN BINDEGEWEBE (MRL-FAS ^{LPR} VS. FAS-++)	59
ABBILDUNG 11 STIMULATION AORTALER ENDOTHELZELLEN (MRL-FAS ^{LPR} VS. FAS-++).....	61
ABBILDUNG 12 IL-6 KONZENTRATION IM SERUM (<i>IL6</i> ^{+/-} VS. <i>IL6</i> ^{+/+} MRL-FAS ^{LPR}).....	62
ABBILDUNG 13 PERIVASKULÄRE UND VASKULÄRE INFILTRATIONEN IN DER NIERE (<i>IL6</i> ^{-/-} VS. <i>IL6</i> ^{+/-} MRL-FAS ^{LPR})	63
ABBILDUNG 14 INTIMA-MEDIA-DICKE DER SUPRARENALEN AORTA (<i>IL6</i> ^{-/-} VS. <i>IL6</i> ^{+/-} MRL- FAS ^{LPR}).....	63
ABBILDUNG 15 INFILTRATION UND INFLAMMATORISCHE ZYTOKINE DER SUPRARENALEN AORTA UND DES PERIVASKULÄREN BINDEGEWEBES (<i>IL6</i> ^{-/-} VS. <i>IL6</i> ^{+/-} -MRL-FAS ^{LPR}).....	65
ABBILDUNG 16 STIMULATION RENALER ENDOTHELZELLEN (<i>IL6</i> ^{-/-} VS. <i>IL6</i> ^{+/+} -MRL-FAS ^{LPR})	66
ABBILDUNG 17 ENDOTHELFUNKTION (<i>IL6</i> ^{-/-} VS. <i>IL6</i> ^{+/-} MRL-FAS ^{LPR}).....	67
ABBILDUNG 18 INTIMA-MEDIA-DICKE DER SUPRARENALEN AORTA UND ENDOTHELFUNKTION IN ABHÄNGIGKEIT VON ERNÄHRUNG UND IL-6 EXPRESSION.....	69

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 ACR-KRITERIEN ZUR KLASSIFIKATION DES SLE (2019).....	15
TABELLE 2 MÖGLICHE BIOMARKER FÜR KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN.....	28
TABELLE 3 VERGLEICH DER WICHTIGSTEN ETABLIERTEN MAUSMODELLE	36
TABELLE 4 VERSUCHSANSÄTZE GENOTYPISIERUNGS PCR.....	41
TABELLE 5 PCR-PROGRAMM GENOTYPISIERUNGS PCRS.....	41
TABELLE 6 REAKTIONSANSATZ QPCR.....	46
TABELLE 7 RTQ-PCR ZYKLEN	47
TABELLE 8 ACR-KRITIEREN ZUR KLASSIFIKATION DES SLE (1982 MIT UPDATE 1997).....	112

1 Einleitung/Ziel der Dissertation

An systemischem Lupus erythematodes erkrankte Personen haben ein hohes Risiko an kardiovaskulären Komplikationen zu sterben [1, 2]. Während die SLE bedingte Mortalität in den vergangenen Jahren durch verbesserte Behandlung sinkt, bleibt die kardiovaskuläre Mortalität unter SLE Patienten unverändert hoch [3]. Insbesondere junge Frauen im Alter von 35 bis 44 Jahren haben gegenüber gleichaltrigen Kontrollpersonen ein mehr als 50fach erhöhtes Risiko für einen Herzinfarkt [4]. Diese erhöhte Inzidenz lässt sich durch traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren nicht erklären [5].

Die genaue dafür ursächliche Pathogenese einer verstärkt und verfrüht auftretenden Atherosklerose ist ungeklärt. Neben therapieassoziierten Einflüssen werden verschiedene SLE bedingte Ursachen diskutiert [6]. Dabei kommt es zu einer Imbalance zwischen Endothel schädigenden Einflüssen und Reparaturkapazität [6]. Einer Endothelschädigung folgt eine Rekrutierung von Immunzellen, insbesondere T-Zellen, Monozyten und Makrophagen, die zur Plaqueformation und Thrombusbildung beiträgt [7, 8]. Die Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 erzeugt ein inflammatorisches Milieu, welches das Einwandern weiterer Immunzellen fördert und so zur Atherogenese beiträgt [9].

Insbesondere IL-6 fördert die Atherogenese und korreliert zusätzlich mit der Krankheitsaktivität des SLE [10, 11]. Umgekehrt führt eine IL-6 Defizienz zu einer geringeren Ausprägung zahlreicher Manifestationen des SLE im MRL Fas^{lpr}-Mausmodell, welches einen SLE-ähnlichen Phänotyp ausbildet [12]. Ferner zeigen unveröffentlichte Daten, dass eine Ernährung frei von Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATI) die Krankheitsaktivität bei diesen Mäusen abmildert.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Eignung des MRL Fas^{lpr}-Mausmodells zur Untersuchung kardiovaskulärer Fragestellungen zu prüfen. Dabei wird auf mikroskopischer und mRNA-Ebene ermittelt, ob die Mäuse verglichen mit dem MRL-++ Kontrollstamm eine stärkere entzündliche Infiltration ihrer Gefäße zeigen. Darüber hinaus wird die Bedeutung von IL-6 und ATI-freier Ernährung auf die Initiation der SLE-spezifischen Atherogenese untersucht.

Ein besseres Verständnis der im Rahmen des SLE auftretenden Atherosklerose könnte zu einer früheren Identifikation von Patienten mit einem besonders hohen

Einleitung/Ziel der Dissertation

Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse unter dieser Patientengruppe beitragen und mögliche Ansätze für therapeutische Strategien für diese Patienten liefern.

2 Literaturdiskussion

2.1 Systemischer Lupus erythematodes

Der systemische Lupus erythematodes (SLE) ist eine entzündliche Systemerkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen, bei der das Immunsystem körpereigene Zellen und Gewebe befällt. Die serologischen und klinischen Manifestationen sind in Schweregrad und Ausprägung sehr variabel und können so gut wie jedes Organ betreffen. Der Krankheitsverlauf zeichnet sich durch den Wechsel zwischen Schüben und Phasen mit geringer Krankheitsaktivität und im besten Fall einer Remission aus.

2.1.1 Manifestationen und Klassifikation

Einen guten Überblick über die verschiedenen Manifestationen des SLE bieten die verschiedenen Klassifikationssysteme. Lange Zeit dominierten die 11 Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) von 1982 mit einem Update von 1997 [13, 14] (siehe Tabelle 8). Aufgrund einer zwar guten Spezifität, aber einer insbesondere im Frühstadium begrenzten Sensitivität, wurden 2012 die Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) Kriterien entwickelt [15]. Darin finden weitere Manifestationen wie die nichtvernarbende Alopezie, der Nachweis von Komplementverbrauch, der subakut kutane Lupus erythematodes (SCLE) sowie der histologische Nachweis einer Lupusnephritis Berücksichtigung, deren alleiniger Nachweis in Kombination mit Autoantikörpern zur Diagnosestellung ausreicht [15]. Die Sensitivität konnte erhöht werden, jedoch sank die Spezifität [15]. 2019 wurden die ACR-Kriterien erneuert: Bei der EULAR/ACR-Klassifikation wurden die Kriterien erweitert, es wurde mit dem Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANAs) ein notwendiges Eingangskriterium geschaffen und die einzelnen Kriterien wurden unterschiedlich stark gewichtet [16]. Diese Klassifikation vereint eine gute Sensitivität und Spezifität und ist dahingehend den anderen Klassifikationen überlegen [16].

Die klinische Diagnose erfolgt nicht allein auf Grundlage der vorgestellten Klassifikationssysteme. Diese haben ihre Bedeutung als Orientierungshilfe und insbesondere in der klinischen Forschung.

Eingangskriterium: ANA \geq 1:80			
folgende Kriterien zählen nicht, wenn eine alternative, wahrscheinlichere Erklärung vorliegt			
einmaliges Auftreten ist ausreichend, Kriterien müssen nicht gleichzeitig vorliegen			
\geq 1 klinisches Kriterium ist erforderlich			
es wird nur der höchste Punktwert jeder der 10 Domänen gewertet			
Klinische Domänen		Immunologische Domänen	
<i>Konstitutionell</i>		<i>Antiphospholipidantikörper</i>	2
Fieber	2	Anti-cardiolipin-AK oder Anti- β 2-GPI-AK oder Lupus-Antikoagulans	
<i>Hämatologisch</i>		<i>Komplementsystem</i>	
Leukopenie	3	Low C3 <u>oder</u> low C4	3
Thrombozytopenie	4	Low C3 <u>und</u> low C4	4
Autoimmune Hämolyse	4		
<i>Neuropsychiatrisch</i>		<i>SLE-spezifische Antikörper</i>	6
Delir	2	Anti-dsDNA-Ak oder	
Psychose	3	Anti-Smith-Ak	
Krampfanfall	5		
<i>Mukokutan</i>			
Nicht-vernarbende Alopezie	2		
Orale Ulzeration	2		
SCLE oder diskoider Lupus	4		
Akut kutaner Lupus	6		
<i>Serös</i>			
Pleura/Perikarderguss	5		
Akute Perikarditis	6		
<i>Muskuloskeletal</i>			
Gelenkbeteiligung	6		
<i>Renal</i>			
Proteinurie $>0,5\text{g}/24\text{h}$	4		
Lupusnephritis Klasse II oder V	8		
Lupusnephritis Klasse III oder IV	10		
Klassifikation als SLE wenn \geq 10 Punkte erreicht werden			

Tabelle 1 ACR-Kriterien zur Klassifikation des SLE von 2019 [16]

2.1.2 Therapie des SLE

Das Therapieziel ist das Erreichen einer Remission oder zumindest einer möglichst niedrigen Krankheitsaktivität sowie das Verhindern weiterer Schübe [17]. Dabei bilden Hydroxychloroquin in einer Dosierung ≤ 5 mg/kg Körpergewicht zusammen mit Glukokortikoiden die Therapiegrundlage für alle Lupuspatienten [17]. Die Glukokortikoiddosis zur Dauertherapie sollte möglichst gering, zumindest unter 7,5 mg/Tag (Prednisolonäquivalent) liegen [17].

Durch zusätzliche Gabe der Immunmodulatoren Methotrexat, Azathioprin oder Mycophenolat-Mofetil können Glukokortikoide eingespart oder sogar ganz auf sie verzichtet werden [17].

Ist der Krankheitsverlauf chronisch-aktiv oder nicht gut kontrollierbar extrarenal-schubweise, sollte Belimumab eingesetzt werden [17]. Bei einem ausgeprägten Organbefall oder wiederkehrender Erkrankung kann, in der Regel nachdem andere Medikamente keine ausreichende Wirkung gezeigt haben, Rituximab off-label angewendet werden [17].

Bei einem Nierenbefall, sollte zusätzlich zu Hydroxychloroquin, ACE-Hemmer oder AT1-Antagonist und Prednisolon zunächst mit Mycophenolat-Mofetil oder niedrigdosiert, intravenös mit Cyclophosphamid behandelt werden [17, 18]. Droht ein Nierenversagen oder eine andere organbedrohende Manifestation, ist eine höhere Cyclophosphamid-Dosis angezeigt [17]. Zur Erhaltungstherapie sollte Mycophenolat-Mofetil oder Azathioprin genutzt werden [17]. Neue Daten zeigen, dass mindestens für die Lupusnephritis Klassen III (+V), IV (+V) und V eine zusätzliche Therapie mit Belimumab bei sehr gutem Sicherheitsprofil das Therapieansprechen signifikant verbessert [19].

Die Patienten sollten sich zusätzlich vor Sonne schützen, aufgrund der durch die Therapie erhöhten Infektionsgefahr Impfungen wahrnehmen und wie unter 2.2.4 beschrieben ihr kardiovaskuläres Risikoprofil optimieren [17].

Literaturdiskussion

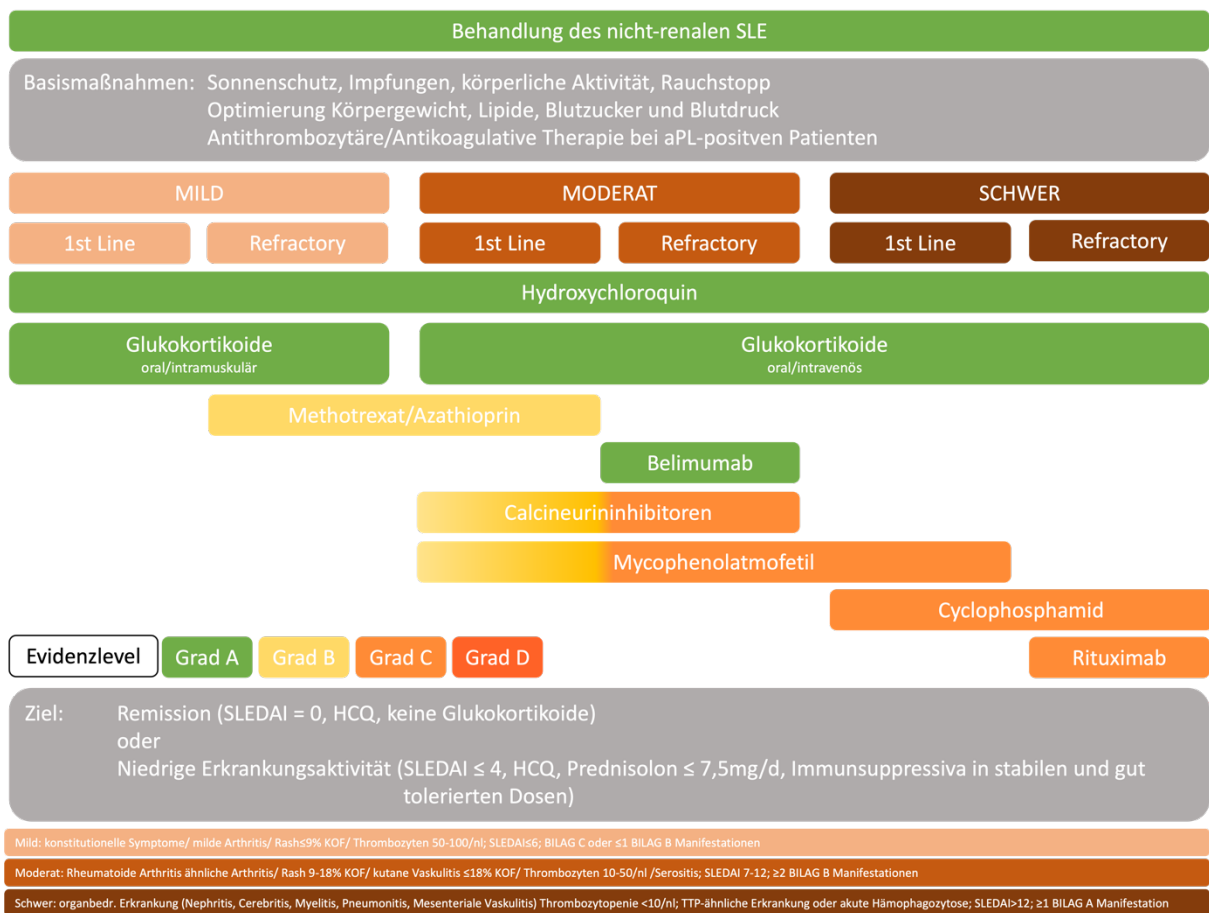


Abbildung 1 Therapie des nicht-renalen SLE nach [17]

(SLEDAI = Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, BILAG = British Isles Lupus Assessment Group disease activity index, HCQ = Hydroxychloroquin, KOF = Körperoberfläche)

2.1.3 Epidemiologie

Betroffen sind im Verhältnis 2:1 bis 15:1 insbesondere Frauen [20]. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 30. und 70. Lebensjahr, bei Männern etwas später [20]. Menschen dunkler Hautfarbe haben ein höheres Risiko am SLE zu erkranken [20]. Bei Betrachtung mehrerer Studienkollektive zu verschiedenen Zeitpunkten zeigt sich eine zunehmende Inzidenz im Verlauf der letzten Jahrzehnte [20].

2.1.4 Ätiologie und Pathogenese

Die genaue Ätiologie des SLE ist ungeklärt. Es werden genetische, umweltbedingte, immunregulatorische, hormonelle und epigenetische Einflüsse diskutiert [21].

Die in früheren Studien gefundenen paarweisen Konkordanzraten eineiiger Zwillinge von 24%, fallen in jüngeren Studien mit 14,3 % geringer aus, lassen aber dennoch auf

eine genetische Komponente schließen [22, 23]. Es lassen sich mehr als 70 Risikoloci identifizieren, die mit SLE assoziiert sind [24]. Dabei sind sowohl das spezifische als auch das unspezifische Immunsystem betroffen [25]. Insbesondere sind Gene betroffen, die bei Apoptose, DNA-Abbau, der Beseitigung von Immunkomplexen, TLR-, Interferon (IFN) Typ 1- und NF κ B-Signalwegen sowie der B- und T-Zell-Funktion eine Rolle spielen [25, 26].

Während moderater Alkoholkonsum einen protektiven Effekt zu haben scheint, wirken andere Umweltfaktoren wie Quarzstaubexposition, Nikotinkonsum, UV-Licht und manche Medikamente risikoe erhöhend [27, 28]. Auch für weitere Umweltfaktoren wie Infektionen (z.B. Epstein-Barr-Virus), Ernährungsfaktoren und Umweltverschmutzung wird ein risikoe erhöhender Zusammenhang vermutet [27].

Für eine Beteiligung hormoneller Faktoren spricht die deutlich erhöhte Inzidenz bei Frauen. Es konnte gezeigt werden, dass ein frühes Alter bei der Menarche, östrogenhaltige orale Kontrazeption und postmenopausale Hormontherapie mit einem erhöhten Risiko zu erkranken einhergehen [29]. Sexualhormone beeinflussen die Regulation des Immunsystems sowie die Schwere des SLE-Krankheitsverlaufs [29].

Das Zusammenspiel verschiedener Immundefekte bewirkt einen Verlust der Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen [21]. Infolge entstehen Autoantikörper, Immunkomplexe, inflammatorische Zytokine und autoreaktive T-Zellen [21].

Die exakte Ätiologie ist nicht vollständig geklärt. Ein Modell geht von einer Störung des Abräumens von Zellmaterial bei der Apoptose sowie der NETose, ein Weg des Zelltodes bei neutrophilen Granulozyten, aus [30]. So werden dem Immunsystem Autoantigene präsentiert, die zu Autoimmunität führen können [30]. Üblicherweise wird Zellschrott sehr schnell beseitigt, sodass nukleäre Antigene dem Immunsystem nicht längere Zeit exponiert sind [31]. Besteht jedoch eine Imbalance zwischen dem Anfall apoptotischer Zellen und Störungen des Abräumens dieser, kann es zur Bildung von Autoantikörpern kommen [31]. Durch Bindung von antinukleären Antikörpern (ANAs) wie ds-DNA-Ak entstehen Ablagerungen von Immunkomplexen [30]. Makrophagen und dendritische Zellen räumen diese ab und erzeugen durch die Produktion von IFN- α und anderen Zytokinen ein inflammatorisches und apoptoseinduzierendes Milieu [30].

Mehr als ein Drittel der Patienten entwickeln zusätzlich die klassisch für Vaskulitiden typischen Anti-Neutrophilen zytoplasmatischen Antikörper (ANCA) [32]. Dabei

könnten nicht abgeräumte NETs Autoantigene beinhalten, die zur Bildung von ANCAs führen [30]. Plasmazytoide dendritische Zellen phagozytieren ANCA-Ak-Ag-Immunkomplexe, was ebenfalls zu einer erhöhten IFN- α -Ausschüttung führt [30]. ANCAs kommen vermehrt bei Patienten vor, die auch eine Lupusnephritis entwickeln, weshalb sie als serologischer Marker für diese dienen könnten [30].

Die DNA oder RNA-enthaltenden Immunkomplexe können das angeborene Immunsystem über die Toll-like-Rezeptoren 9 bzw. 7 aktivieren [33]. Aktivierte dendritische Zellen, produzieren IFN- α sowie TNF α [21, 33].

Auf diese Weise kann auch das spezifische Immunsystem stimuliert werden. IFN- α bewirkt beispielsweise die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und das Entstehen antigenpräsentierender Zellen sowie T-Zellen, was wiederum zur Bildung weiterer Autoantikörper und Immunkomplexe beiträgt [34]. Ein wichtiger Mediator ist der B-Cell Activating Factor (BAFF), welcher ebenfalls durch Toll-like-Rezeptoren und auch durch IFN- α induziert wird und das Überleben und die Differenzierung von autoantikörperproduzierenden B-Zellen fördert [35, 36].

Verschiedene Veränderungen des Zellmetabolismus von Immunzellen, beispielsweise eine verstärkte Energiegewinnung durch Glykolyse, bewirken veränderte Differenzierung, Zytokinausschüttung, Proliferation und Funktion [37].

Auch auf T-Zell-Ebene gibt es zahlreiche Auffälligkeiten bei Lupus-Betroffenen. Regulatorische T-Zellen (Treg), welche B- und T-Zell-vermittelte Autoantikörperproduktion vermindern, finden sich bei Lupuspatienten in verminderter Zahl und funktionell beeinträchtigt [34]. Follikuläre T-Helfer-Zellen sind an der Bildung von Keimzentren beteiligt und korrelieren in ihrer Anzahl mit der Krankheitsaktivität [38]. Sie entstehen infolge der Aktivierung naiver CD4⁺-T-Zellen durch ein Zusammenspiel aus Antigen-präsentierenden Zellen, IL-6 und IL-21 [38]. Bestimmte Subpopulationen der T-Zellen wie die Th17-Zellen kommen bei SLE-Patienten vermehrt vor. Das Verhältnis von Th17 zu Treg korreliert signifikant positiv mit der Krankheitsaktivität [39].

Es wird deutlich, dass zahlreiche Veränderungen an der Krankheitsentstehung und -aufrechterhaltung beteiligt sind, von denen nicht alle hier genannt sind. Es ist nicht geklärt, welche primär bei der Krankheitsentstehung mitwirken bzw. sekundäre Folgen anderer Defekte sind.

2.1.5 Pathogenese der Manifestationen

Vermittelt durch Immunkomplexe, Autoantikörper, Zytokine und T-Zellen kommt es zu Endorganschäden [21]. Diese können nahezu alle Gewebe, insbesondere Haut, Schleimhäute, Gelenke, Serosa, Nieren, Nervensystem, das hämatologische System, Lunge, Gefäße, Muskeln und das Herz betreffen [40].

Eine bedeutsame Manifestation ist die Lupusnephritis. Hierbei lagern sich Immunkomplexe in der Niere ab [34]. Diese entstehen entweder im Blutkreislauf oder direkt vor Ort, wenn Autoantikörper gegen glomeruläre Antigene oder nicht abgeräumten apoptotischen Zellschrott gerichtet sind [34]. Die Immunkomplexe bestehen aus Antigenen und anti-DNA-Antikörpern sowie insbesondere bei der Lupusnephritis aus Antikörpern gegen den Komplementfaktor C1q [21]. Diese intraglomerulären Immunkomplexe führen über die Aktivierung des Komplementsystems und die Bindung an Fc-Rezeptoren von beispielsweise Makrophagen zu einem inflammatorischen Milieu [21, 34]. Entzündungsvermittelnde Zytokine und Leukozytenmigration fördernde Chemokine werden ausgeschüttet [41]. Dazu trägt auch die Aktivierung von T-Zellen durch autoantigenpräsentierende B-Zellen bei [34]. Aufgrund geringer Affinität der Fc γ -Rezeptoren sowie Autoantikörper gegen die Komplementfaktoren C1q und C3b ist die Beseitigung der Immunkomplexe durch Leukozyten beeinträchtigt [34]. In dem inflammatorischen Milieu wird das Nierengewebe durch aktivierte Granulozyten und Makrophagen sowie freiwerdende proteolytische Enzyme und Sauerstoffradikale geschädigt [34]. Das führt zu Nekrosen, Vernarbung und beeinträchtigter Nierenfunktion [34].

Die Ablagerung von Immunkomplexen spielt auch bei den übrigen Manifestationen beispielsweise in der Haut, dem ZNS oder der Serosa (z.B. bei Perikarditis) eine Rolle [21, 42].

Neben den immunkomplexbildenden Antikörpern gegen nukleäre Antigene, treten auch Antikörper gegen die Zelloberfläche auf, welche insbesondere bei den hämatologischen Manifestationen bedeutsam sind. Die bei etwa 10 % der Patienten auftretende autoimmun-hämolytische Anämie wird durch IgG Antikörper gegen Erythrozyten verursacht [43]. Ebenso wie eine Anämie kann eine Thrombozytopenie auftreten. Hierbei spielen Autoantikörper gegen GPIIb/IIIa sowie gegen den Thrombopoetin-Rezeptor eine Rolle [43]. Auch Leukopenien können auftreten, wengleich hier zahlreiche pathogenetische und therapiebedingte Mechanismen

diskutiert werden, tragen Autoantikörper gegen neutrophile Granulozyten oder Lymphozyten dazu bei [44].

Die Pathogenese der Lupus-Arthritis ist bislang wenig verstanden. Histologisch finden sich vaskuläre Veränderungen, perivaskuläre mononukleäre Leukozyten sowie oberflächliche Fibrinablagerungen [45]. Darüber hinaus wird eine durch endotheliale Hypertrophie, inflammatorische Zellen und Thromben verursachte Gefäßobliteration beschrieben [46]. In der Synovialflüssigkeit finden sich im Vergleich zu anderen Arthritis verursachenden Erkrankungen weniger Leukozyten [47].

2.2 kardiovaskuläre Manifestation des SLE

2.2.1 Klinisches Bild und Epidemiologie

Der systemische Lupus erythematoses ist assoziiert mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse. Die kardiovaskuläre Manifestation umfasst die Perikarditis, Myokarditis, Erkrankungen am Reizleitungssystem, Vaskulitis, Herzklappenerkrankungen sowie die Folgen einer verstärkten und verfrüht auftretenden Atherosklerose [42]. Dazu zählen primär die koronare Herzkrankheit inklusive Myokardinfarkt, die periphere arterielle Verschlusskrankheit, der ischämische Schlaganfall inklusive Transitorisch Ischämische Attacke (TIA) und Aortenaneurysmata [48]. Ferner lassen sich auch die vaskuläre Demenz, Angina abdominalis, Mesenterialinfarkte und Nierenarterienstenosen als atherosklerotisch bedingte Folgeerkrankungen betrachten [48].

Urowitz et al. beschrieben schon 1976 einen zweigipfligen Verlauf der Todeskurve: Patienten, die kurz nach der Diagnose sterben, sterben eher aufgrund der Krankheitsaktivität und Infektionen, wohingegen ein zweiter Mortalitäts Gipfel im späten Krankheitsverlauf auf Myokardinfarkte durch atherosklerotische Herzkrankheit zurückzuführen sei [49]. Das Risiko für einen Myokardinfarkt bei SLE Patienten ist in den meisten Studien 2-10fach erhöht [50]. Das absolute Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse (CVE) steigt mit zunehmendem Alter der SLE-Patienten, jedoch ist die Inzidenz für CVE insbesondere bei jungen Frauen mit SLE gegenüber der gleichaltrigen Vergleichspopulation sehr stark erhöht [50]. Dabei haben Frauen zwischen 35 und 44 Jahren ein über 50fach erhöhtes Risiko für einen Herzinfarkt [4]. Die Menge von atherosklerotischen Plaques in Karotiden und Femoralarterien ist 2fach erhöht [51]. Obwohl die lupusspezifische Mortalität in den vergangenen Jahren

immer weiter sank, bleibt das Risiko für einen Tod durch ein kardiovaskuläres Ereignis unverändert hoch [3, 52]. Die Inzidenz für kardiovaskuläre Ereignisse steigt mit Krankheits- und Therapiedauer [4]. Während in der Allgemeinbevölkerung die kardiovaskuläre Mortalität in den letzten Jahren sank, zeigte sich ein ähnlicher Rückgang unter SLE Patienten nicht [53].

2.2.2 Pathogenese

Zu der bei Lupus Patienten verstärkten und verfrüht auftretenden Atherosklerose trägt ein multifaktorielles Geschehen bei. Hierbei spielen neben der Therapie und traditionellen Risikofaktoren auch ein durch den Lupus verursachtes inflammatorisches Milieu eine bedeutende Rolle.

Primär nicht immunologische Einflussfaktoren

Die traditionellen Risikofaktoren für die Entwicklung von Atherosklerose sind ein erhöhter Low Density Lipoprotein (LDL)-Spiegel, Diabetes, arterielle Hypertension und Zigarettenrauchen [48]. Somit muss zunächst betrachtet werden, ob diese Risikofaktoren, unter Umständen auch als Folge der Erkrankung oder Therapie, unter Lupus-Patienten epidemiologisch vermehrt vorkommen. In einer kanadischen Studie wurden 250 Lupus-Patientinnen mit 250 alterskorrelierten Kontrollpatientinnen, die zur jährlichen Routineuntersuchung eine Hausarztpraxis besuchten, verglichen. Hierbei zeigte sich ein vergleichbarer Body-Mass-Index, wobei das Taille-Hüft-Verhältnis und der Anteil der Patientinnen mit „sitzendem Lebensstil“ unter den Lupus-Patientinnen signifikant höher war. Auch lag sowohl der Anteil der Hypertonie- als auch der Diabetes-Patientinnen in der Lupus-Gruppe signifikant höher. Der mittlere Cholesterol- und LDL-Spiegel sowie der aktuelle Raucherstatus unterschieden sich nicht signifikant. Interessanterweise unterschied sich aber der Framingham-Risk-Score für ein kardiovaskuläres Ereignis in den nächsten 10-Jahren in beiden Gruppen nicht [54]. Eine Metaanalyse von 24 Studien kommt zu dem Ergebnis, dass das Risiko für ein metabolisches Syndrom unter SLE Patienten 1,88mal höher als in der Vergleichsgruppe ist [55]. Somit scheinen SLE-Patienten aufgrund gegenüber Kontrollgruppen vermehrt vorkommenden traditionellen Risikofaktoren, ein höheres Risiko für Atherosklerose zu haben. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass der Framingham-Risk-Score, in den alle oben genannten Risikofaktoren eingehen, das erhöhte Risiko für CVE unter SLE-Patienten nicht vollständig erklärt [5, 56].

Ein weiterer wesentlicher Punkt, der das Risiko für CVE bei Lupus-Patienten erhöhen könnte, sind Folgen der Therapie. In der Hopkins Lupus Cohort konnte für Glucocorticoide ein dosisabhängiger Anstieg der Inzidenz für CVE ab 10mg/Tag für eine Dauer ab 10 Jahren nachgewiesen werden: Für eine Dosis von 20mg/Tag zeigte sich beispielsweise nach Altersadjustierung ein 5facher Anstieg der Inzidenz [57]. Ein Confounder könnte die Krankheitsaktivität sein, die ebenfalls zu einer erhöhten Rate an CVE führt und mit einer erhöhten Glucocorticoiddosis einhergehen dürfte [6, 50, 58]. Jedoch zeigte sich in der Hopkins Lupus Cohort die Korrelation zwischen Glucocorticoiden und CVE auch nach Adjustierung für die Krankheitsaktivität [57]. Unabhängig von SLE ist auch die Behandlung mit Glucocorticoiden, die ihrerseits Hypertonie, Diabetes und Übergewicht fördern, mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert [59]. Während Hydroxychloroquin positive Effekte auf Risikofaktoren wie den Lipidstoffwechsel zu haben scheint, zeigen sich für Azathioprin ebenfalls risikoerhöhende Effekte [50].

Auch die Atherosklerose der Allgemeinbevölkerung hat eine inflammatorische Komponente

Neben den traditionellen Risikofaktoren und der Therapie gibt es zahlreiche Hinweise, dass auch die Lupus bedingte Inflammation zur verstärkten Atherosklerose beiträgt. Unabhängig von Autoimmunerkrankungen wächst die Evidenz für eine inflammatorische Komponente von Atherosklerose: Sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem sind in die Pathogenese der Atherosklerose involviert. Makrophagen, die durch Aufnahme von abgelagerten Lipide zu Schaumzellen werden, bilden einen großen Anteil der atherosklerotischen Plaques [60]. Durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) und Damage-assoziierte molekulare Muster (DAMPs) aktivierte Makrophagen produzieren proinflammatorische Zytokine [60]. Die Interaktion von antigenpräsentierenden dendritischen Zellen mit T-Zellen führt zur Aktivierung und Differenzierung letzterer [60]. $IFN\gamma$ und TNF produzierende Th1-Zellen fördern zusätzlich die Aktivierung von Makrophagen und tragen zur vaskulären Inflammation bei [60]. Außerdem wirkt $IFN\gamma$ als Trigger für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und wirkt direkt auf Endothelzellen, indem es die Expression von Adhäsionsmolekülen wie des Vascular Cell Adhesion Protein 1 (VCAM-1) fördert und so die Leukozyten und Monozyten-Adhäsion und Infiltration begünstigt [61]. Drei große Studien zeigen, dass antiinflammatorische Therapie mit Canakinumab beziehungsweise Colchizin das Risiko für atherosklerotisch bedingte

Folgeerkrankungen mindert. Die CANTOS-Studie zeigt die Wirksamkeit einer antiinflammatorischen Therapie mit dem IL-1 β adressierenden Canakinumab bei Patienten, die einen Myokardinfarkt überlebt haben [62]. Gemessen am primären Endpunkt Myokardinfarkt, Schlaganfall und kardiovaskulär bedingtem Tod zeigt sich im Studienarm mit einer Dosierung von 150 mg/3 Wochen ein signifikanter Risikorückgang von 15 % verglichen mit der Placebogruppe [62]. Eine Behandlung mit Canakinumab wirkt sich nicht auf LDL, Cholesterol oder High Density Lipoprotein (HDL) aus, senkt aber den IL-6 und CRP-Spiegel [63]. Antiinflammatorische Effekte von Colchizin vermindern sowohl das kardiovaskuläre Risiko von Patienten nach Myokardinfarkt als auch das von Patienten mit koronarer Herzkrankheit [64, 65].

Diese Erkenntnisse legen nahe, dass dysregulierte Immunprozesse beim systemischen Lupus erythematodes auch zu verstärkter Atherosklerose beitragen könnten. Es wird ein Ungleichgewicht zwischen Endothelschädigung durch Inflammation und Abschwächung atheroprotektiver Mechanismen angenommen [6]. Hierbei sind sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem von Bedeutung.

Einfluss des angeborenen Immunsystems

Eine wichtige Rolle spielen die beim SLE erhöhten Interferone, die zur IFN-Signatur, der verstärkten Expression IFN-abhängiger Gene, führen [66]. Bei SLE-Patienten mit ausgeprägter IFN Typ 1 Signatur zeigt sich eine verstärkte Aktivierung des Endothels als früher Schritt der Atherogenese sowie eine schlechtere Endothelfunktion [67, 68]. Im Mausversuch zeigt sich, dass die Blockade des JAK-STAT Signalwegs mit Tofacitinib, der Hauptweg des Interferonrezeptorsignalings, zu einer verbesserten Endothelfunktion führt [69]. Eine IFN α -Signatur führt beim Menschen zu einer verstärkten Expression von Scavenger-Rezeptor-A in Makrophagen, was zu einer erhöhten Lipidaufnahme und Schaumzellgenerierung beiträgt [70]. In mit Insulin stimulierten Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) senkt IFN- α die NO-Produktion und führt zu einer geringeren Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) [71], was eine Endotheldysfunktion und somit die Atherogenese begünstigt. Hohe IFN-I Spiegel sind bei SLE Patienten mit niedrigen Spiegeln von für die Endothelreparatur wichtigen endothelialen Progenitorzellen (EPC) assoziiert [68, 72]. IFN- α führt zur Apoptose von EPCs und den ebenfalls zur Reparatur wichtigen circulating angiogenic cells (CACs) sowie der Beeinträchtigung

der Differenzierung dieser zu reifen Endothelzellen [73]. Bei SLE Patienten zeigt sich eine erhöhte Expression Typ I IFN-regulierter Gene in Thrombozyten sowie deren gesteigerte Aktivierung [74]. Eine andere Untersuchung findet keine direkte Korrelation zwischen Thrombozytenaktivierung und Typ-I Interferonen, sieht aber die Thrombozytenaktivierung als Folge eines aktivierten und dysfunktionalen Endothels und vermutet einen Beitrag dieser zur kardiovaskulären Manifestation [67].

Eine Subpopulation der Granulozyten, die Low-Density Granulozyten (LDG), kommen bei einigen Lupus Patienten vermehrt vor [75]. Ein erhöhtes Vorkommen von LDGs geht mit vermehrten, nicht verkalkten koronaren Plaques und einer verminderten cholesterol efflux capacity (CEC) einher [76]. Unter der CEC versteht man die Fähigkeit von HDL zum Abtransport von Cholesterol aus dem Gewebe [77]. Ist diese Fähigkeit Cholesterol von den Makrophagen aufzunehmen gemindert, kommt es in der Allgemeinbevölkerung zu einer erhöhten Intima-Media-Dicke der Karotis und einem erhöhten Risiko für koronare Herzkrankheit [77]. Die von LDGs vermehrt gebildeten Neutrophil extracellular traps (NETs) [78], beinhalten oxidativen Stress verursachende Enzyme, die zur Oxidation von HDL führen und somit die CEC senken können [79]. LDGs führen in Kokultur mit Endothelzellen zur Schädigung letzterer [78]. Überschreitet die Menge an NETs die Abbaukapazität der Endothelzellen, kommt es durch Spaltung von VE-cadherin zu Veränderungen der Zell-Zell-Kontakte, was zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels mit verstärkter Albuminpassage führt [80]. Gelangt der zytoplasmatische Teil des VE-Cadherins, das β -Catenin, in den Zellkern kann es eine Epithelial-mesenchymale Transition auslösen und so zur Dedifferenzierung von Endothel führen [80]. Des Weiteren können NETs eine $\text{IFN}\alpha$ -Freisetzung durch plasmazytoide dendritische Zellen hervorrufen [78], aber auch selbst Typ I Interferone freisetzen [75].

Einfluss des erworbenen Immunsystems

Auch das erworbene Immunsystem ist an der Atherogenese bei Lupuspatienten beteiligt. In der Allgemeinbevölkerung sind B-Zellen bei der Entwicklung von Atherosklerose von Bedeutung, indem sie einerseits antiatherogen Entzündungsprozesse mildern, andererseits aber auch fördern können [81]. B-Zellen können beispielsweise neutralisierende Antikörper gegen oxidationsspezifische Epitope bilden und so protektiv wirken [82]. Der B-Cell activating factor (BAFF) hingegen schädigt Endothelzellen und behindert deren Reparatur, während eine

Behandlung mit anti-BAFF-Antikörpern die Menge an atherosklerotischen Plaques reduzieren und SLE bedingte Veränderungen der für die Reparatur von Endothelzellen wichtigen EPCs rückgängig machen kann [36]. Unter Lupus Patienten sind Anti-Endothelzell-Antikörper weit verbreitet, welche oxidativen Stress verursachen und Apoptose der Endothelzellen bewirken können [83, 84]. Auch die häufig bei SLE Patientin nachweisbaren Antiphospholipid-Antikörper erhöhen nicht nur das Risiko für Thrombosen, sondern zeigen auch eine signifikante Assoziation mit Herzinfarkt, ischämischen Schlaganfall und peripherer Gefäßkrankheit [2, 85]. Besonders hervorzuheben sind das β 2-Glycoprotein I (β 2-GPI) und gegen dieses gerichtete Antikörper. β 2-GPI bildet mit oxLDL und Antikörpern Komplexe, wodurch die Aufnahme durch Makrophagen und die Schaumzellbildung gefördert werden [86, 87]. Komplexe aus oxLDL, β 2-GPI und Anti- β 2-GPI-Antikörpern führen in HUVECs zur Expression proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 β und IL-6), proadhäsiver Oberflächenmoleküle wie Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) und VCAM-1 und erhöhen die Monozytenrekutierung [88]. β 2-Glycoprotein I-reaktive T-Zellen sind mit einer erhöhten Intima-Media-Dicke und atherosklerotischen Plaques assoziiert [89].

Oxidiertes LDL (oxLDL), welches durch eine Immunaktivierung zur Atherogenese beiträgt, ist in Form von Immunkomplexen bei SLE Patienten erhöht [90, 91]. Ein vermehrtes Vorkommen der beteiligten Anti- β 2-GPI-Antikörper ist bei SLE Patienten mit einer reduzierten Paraoxonase-Aktivität assoziiert [92]. Die Paraoxonase wiederum hat eine antioxidative Wirkung auf LDL [93], welche durch Anti- β 2-GPI-Antikörper und anti-HDL-Antikörper gemindert werden könnte [92]. Außerdem hat β 2-GPI selbst auch einen vor Oxidation schützenden Effekt, der durch Anti- β 2-GPI-Antikörper verloren gehen könnte [92]. Sowohl die Paraoxonase als auch HDL schützen vor einer Oxidation von LDL [94]. Bei SLE Patienten sind die Paraoxonase-Aktivität als auch die HDL-Konzentration und dessen antioxidative Kapazität vermindert [95]. Jedoch ist dysfunktionales, proinflammatorisches HDL bei SLE Patienten erhöht, korreliert mit Karotisplaque und trägt ebenfalls zur LDL-Oxidation bei [96]. Neben der verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen bewirkt oxLDL die Aktivierung von Apoptosewegen und fördert seinerseits die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies, wodurch die Endotheldysfunktion und Atherosklerose begünstigt wird [97]. Zusätzlich fördert oxLDL die NET-Bildung und wirkt auch auf diese Weise endothelschädigend [98].

Ebenso können T-Zellen von pathogenetischer Bedeutung sein. Beispielsweise korreliert der Spiegel von CD4⁺CCR5⁺-T-Zellen unabhängig mit der Entwicklung von Atherosklerose in den Karotiden von SLE-Patienten [99]. Dabei ist CCR5 essentiell für die Adhäsion dieser T-Zellen in atherosklerotischen Plaques [100]. Weiterhin an der Atherogenese beteiligt sind natürliche Killer-T-Zellen, die sowohl pro- als auch antiatherogene Phänotypen einnehmen können [101].

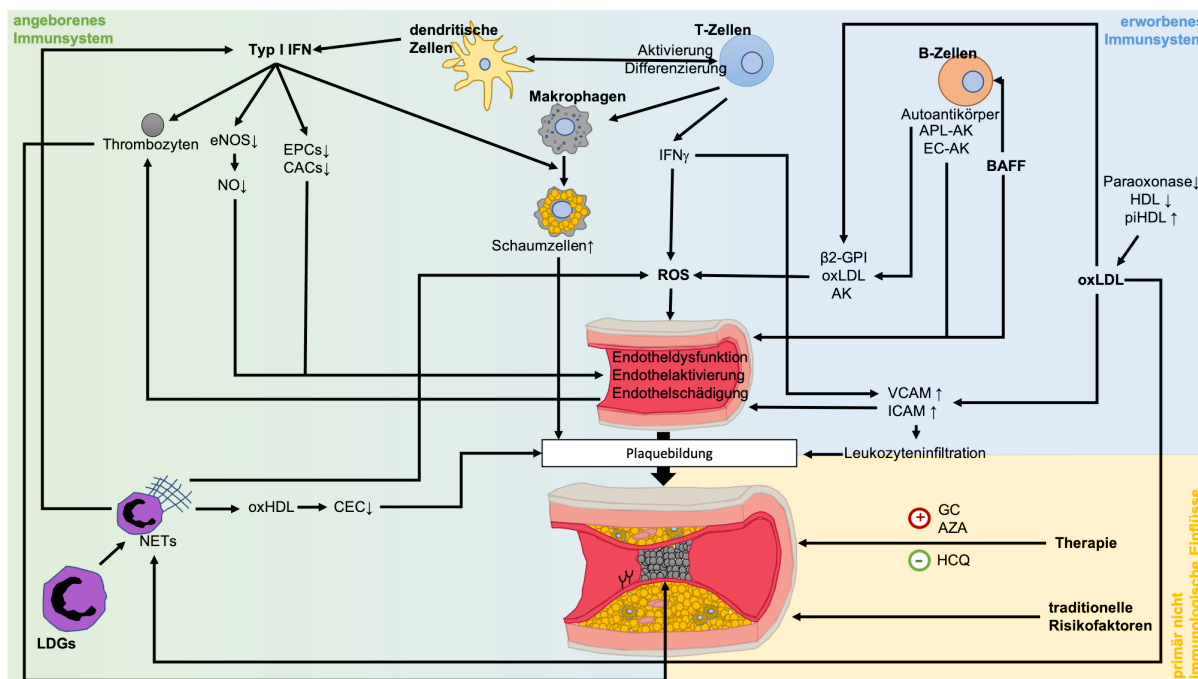


Abbildung 2 Ursachen der vorzeitigen und verstärkten Atherosklerose wie in Kapitel 2.2.2 erläutert. IFN = Interferon, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, NO = Stickstoffmonoxid, EPCs = Endothelial progenitor cell, CACs = Circulating Angiogenic Cells, BAFF = B-cell activating factor, APL-AK = Antiphospholipid-Antikörper, EC-AK = Endothelzell-Antikörper, ROS = reaktive Sauerstoffradikale, AK = Antikörper, β 2-GPI = β 2-glycoprotein I, HDL = High Density Lipoprotein, LDL = Low Density Lipoprotein, piHDL = dysfunktionales, proinflammatorisches HDL, oxHDL = oxidiertes HDL, oxLDL = oxidiertes LDL, LDGs = Low-Density Granulocytes, NETs = Neutrophil extracellular traps, CEC = cholesterol efflux capacity, VCAM = vascular cell adhesion molecule, ICAM = Intercellular adhesion molecule, GC = Glukocortikoide, AZA = Azathioprin, HCQ = Hydroxychloroquin

2.2.3 Diagnostik

Die Etablierung von früh nachweisbaren Biomarkern ist wichtig, um Patienten zu identifizieren, die von einer noch zu etablierenden, zielgerichteten Therapie besonders profitieren würden. Es zeigt sich, dass Patienten mit Antiphospholipid-Antikörpern und erhöhten Markern für Endothelzellaktivierung und -schaden wie dem von-Willebrand-Faktor, sVCAM-1 und Fibrinogen ein höheres Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis haben [85]. Eine Übersicht möglicher Biomarker bietet Tabelle 2.

Biomarker	
Antiphospholipid-Antikörper	[85, 102]
Fibrinogen	[85]
sVCAM-1	[85]
vWF	[85]
Hypoalbuminämie	[85]
hsCRP	[85, 102]
IL-6	[103]
sCD163	[104]
high-sensitivity cardiac troponin T	[105]
Homocystein	[106, 107]
VEGF	[108]
piHDL	[106]
Leptin	[106]
C3	[109]
TGF-beta1	[110]
Typ I IFN	[111]
P-C4d	[112]

Tabelle 2 Mögliche Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen im Rahmen des SLE

Während viele Zeichen der Krankheitsaktivität wie Arthritis, Serositis oder venöse Thrombosen ebenfalls das Risiko für ein CVE erhöhen bzw. mit einem erhöhten Risiko einhergehen, geht eine Thrombozytopenie mit einem geringeren Risiko einher [85]. Auch pathogenetisch relevante Antikörper wie beispielsweise anti-HDL-Antikörper könnten als frühe Biomarker dienen [113]. Da auf traditionellen Risikofaktoren basierende Scores wie der Framingham Risk Score das Risiko für CVE bei SLE unterschätzen, müssen für die Berechnung des tatsächlichen Risikos von SLE Patienten weitere Faktoren wie die Krankheitsaktivität, niedrige C3-Spiegel und Lupus-Antikoagulanzen positivität berücksichtigt werden [114]. Insbesondere bei Frauen führen Scores, in die nur traditionelle Risikofaktoren einfließen, zu einer Unterschätzung des Risikos [115]. Einen weiteren Stellenwert für die Diagnostik, auch für Fragestellungen in der Forschung, hat die Bildgebung. Zur Erfassung einer subklinischen Atherosklerose der Koronararterien eignen sich Computertomographie und Magnetresonanztomographie. In der Computertomographie zeigen sich auch nach Adjustierung für traditionelle Risikofaktoren signifikant mehr koronare Verkalkungen

bei SLE Patientinnen gegenüber Frauen ohne SLE [116]. Im MRT zeigt sich unter SLE Patienten eine diffuse Kontrastverstärkung der Koronarien, während diese sich bei KHK-Patienten eher regional-fleckig darstellt [117]. Ein häufig verwendetes und einfach via Ultraschall zu erhebendes Maß für subklinische Atherosklerose ist die Erfassung der Karotis-Intima-Media-Dicke (CIMT), die bei SLE-Patienten erhöht ist [118] und mit einem häufigeren Auftreten von CVE korreliert [119]. Ein weiteres nicht-invasives Verfahren zur Erfassung der Endotheldysfunktion ist die flow-mediated dilatation (FMD) der A. brachialis. Diese ist bei SLE Patienten signifikant verringert [120] und zeigt eine geschädigte Endothelfunktion an, auch wenn diese noch nicht an einer manifesten kardiovaskulären Erkrankung leiden [121]. Eine eingeschränkte FMD bei SLE Patienten ist ein unabhängiger Prädiktor für kardiovaskulärer Ereignisse [122]. Ein weiteres Verfahren, um die Gefäßsteifigkeit zu erfassen, ist die Messung der Pulswellengeschwindigkeit (PWV). Diese zeigt Atherosklerose an und ist bei SLE Patienten sowohl peripher als auch zentral signifikant erhöht [122].

2.2.4 Therapie

Eine spezifische Therapie zur Senkung des kardiovaskulären Risikos beim SLE gibt es nicht. Die EULAR empfiehlt ein Erheben der traditionellen und krankheitsspezifischen Risikofaktoren: Krankheitsaktivität, Krankheitsdauer, Nierenbeteiligung, Phospholipidantikörper und dauerhafte Glucocorticoidtherapie [17]. Abhängig vom Risikoprofil kann eine Low-Dose Aspirin Therapie oder lipidsenkende Therapie erwogen werden [17]. Die Untersuchung des Effektes einer Statintherapie bei Lupuspatienten, ergab zwar signifikant niedrigere hsCRP-, Gesamtcholesterin- und LDL-Werte in der Atorvastatin-Gruppe, jedoch unterschied diese sich in Bezug auf CIMT und CVE nicht signifikant von der Placebogruppe [123]. Weitere und größere Studien sind notwendig. Für eine Low-Dose Aspirin Therapie allein und in Kombination mit Hydroxychloroquin liegen Daten vor, die eine geringere Rate an kardiovaskulären Ereignissen zeigen [124, 125]. Eine Therapie mit Hydroxychloroquin allein zeigte in einer randomisierten, doppelblinden, Placebo kontrollierten Studie mit 125 Herzinfarktpatienten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf kardiovaskuläre Ereignisse im nächsten Jahr, senkte aber den IL-6 Serumlevel signifikant in der Hydroxychloroquin-Gruppe [126].

2.3 Einfluss von Zytokinen

2.3.1 Einfluss von IL-6

Das proinflammatorische Interleukin-6 wurde 1973 als von T-Zellen produzierter und für die Antikörperproduktion durch B-Zellen wichtiger Botenstoff beschrieben [127]. Neben T-Zellen wird es auch von Makrophagen, Monozyten, B-Zellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Tubulusepithelzellen und Endothelzellen produziert [128]. IL-6 hat zahlreiche immunologische Effekte wie die Förderung des Wachstums und der Differenzierung von B-Zellen, die Auslösung der hepatischen Akute-Phase-Reaktion sowie die Differenzierung und Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen [129]. IL-6 wirkt neben diesen regulatorischen Aufgaben in Infektion und Inflammation auch auf Hämatopoese und Onkogenese [128].

Der IL-6 Rezeptor besteht aus zwei Einheiten, dem IL-6-Rezeptor und einer β -Untereinheit, dem gp130 [130]. Es bestehen im Wesentlichen drei Wege des IL-6-Rezeptor-Signalings: Das klassische *cis-Signaling* findet an Zellen statt, die sowohl den IL-6R als auch gp130 exprimieren (Leukozyten, Hepatozyten, manche Epithelzellen), sodass IL-6 mit diesen einen Komplex bilden kann [130]. Wird der IL-6R durch ADAM17 abgespalten entsteht löslicher IL-6R (sIL-6R) [130]. Auf diese Weise kann IL-6 auch an Zellen ohne membranständigen IL-6-Rezeptor wirken, indem es Komplexe mit gp130, welches ubiquitär exprimiert wird, und sIL-6R bildet [130]. Man spricht hierbei von *soluble trans-Signaling*. Ein weiterer Weg ist das *IL-6 cluster-signaling* oder auch *trans-presentation* genannt. Dabei bindet IL-6 an den IL-6R einer dendritischen Zelle und gp130 einer T-Zelle [131]. Während das cis-Signaling vor allem in der Akute-Phase-Reaktion und für die Infektionsbekämpfung wichtig ist sowie antiinflammatorische Effekte vermittelt, ist das trans-Signaling insbesondere für die proinflammatorische Wirkung verantwortlich [130].

Im NZB/W F1 Mausmodell zeigt sich, dass IL-6 die Autoantikörperproduktion von B-Zellen erhöht [132]. Der Knockout von IL-6 im MRL-*Fas^{lpr}* Mausmodell zeigt eine verlängerte Überlebenszeit und Milderung der Krankheitsaktivität [12]. Auch unter SLE Patienten korreliert der IL-6 Serumspiegel mit der Krankheitsaktivität [11]. Eine Behandlung mit Tocilizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen den IL-6R, zeigt in einer Phase I Studie insbesondere eine Verbesserung von arthritischen Manifestationen und eine signifikante Reduktion von anti-dsDNA-Antikörper-Spiegeln sowie eine Abnahme zirkulierender Plasmazellen [133]. Nichtsdestotrotz verfehlte eine

Phase II Studie mit einem gegen IL-6 gerichteten monoklonalen Antikörper ihren primären Endpunkt in der Verringerung der Krankheitsaktivität [134]. Post-Hoc Analysen zeigen jedoch eine verringerte Schubhäufigkeit sowie eine signifikante Verbesserung der Krankheitsaktivität bei Patienten mit höherer Krankheitsaktivität zum Einschlusszeitpunkt [134]. Neben der Korrelation von IL-6 mit der Krankheitsaktivität, findet sich auch eine signifikante Assoziation mit koronarer Atherosklerose [103]. Eine weitergehende Analyse der bereits erwähnten CANTOS-Studie kommt in der Allgemeinbevölkerung zu dem Ergebnis, dass Patienten, die unter Behandlung mit Canakinumab eine IL-6 Reduktion unter 1,65ng/l erreichten signifikant in Bezug auf CVE und Mortalität gegenüber der Placebogruppe profitierten, während die Patienten, bei denen es nicht gelang, den IL-6 Spiegel zu senken, sich in keinem dieser Endpunkte von der Placebogruppe unterschieden [135]. Obwohl IL-6 Endothelzellen aktiviert, prothrombotische Effekte hat, die Proliferation von glatten Muskelzellen und die Akkumulation von lipidbeladenen Makrophagen fördert, hat IL-6 durch eine Steigerung der CEC und durch die Inhibition anderer inflammatorischer Zytokine auch atheroprotektive Eigenschaften [136]. Welche Effekte überwiegen und wie groß die Bedeutung für die vorzeitige Atherosklerose bei SLE Patienten ist bedarf weiterer Untersuchungen.

2.3.2 Einfluss weiterer Zytokine

Im Folgenden sollen weitere Zytokine vorgestellt werden, deren Expression im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. IL-6 wurde bereits unter 2.3.1 vorgestellt und auf IFN α wurde in den Kapiteln 2.1.4 und 2.2.2 eingegangen. Die Bedeutung von TNF- α , IL-1 β , IL-18, S100A8, CSF-1 und IL-34 für den SLE und die Atherosklerose soll hier erläutert werden.

TNF- α wird unter anderem von Makrophagen und Monozyten freigesetzt, wenn diese mit Immunkomplexen und Komplementfaktoren in Kontakt kommen [137, 138]. TNF- α wirkt als Inflammationsmediator und kann Apoptose induzieren [139]. Außerdem stimuliert TNF- α T-, B- und dendritische Zellen [139]. Die Serumlevel sind bei SLE erhöht und korrelieren schwach mit der Krankheitsaktivität [140, 141]. Patienten mit erhöhten TNF- α -Spiegeln haben mit höherer Wahrscheinlichkeit eine renale Beteiligung [141]. Auch im MRL-*Fas*^{lpr}-Modell korreliert die TNF- α -Expression mit dem Schweregrad der Lupusnephritis [142]. Eine Therapie mit TNF- α -Blockern zeigt zwar

partiell im Tiermodell und auch beim Menschen Erfolge, jedoch wird bei der Behandlung von Menschen auch ein Anstieg von ANAs, anti-dsDNA-AKs und Anticardiolipin-Antikörpern beobachtet und es kann zu einem medikamenteninduzierten Lupus kommen [143]. Auch auf die Atherogenese sind Einflüsse von TNF- α beschrieben. TNF- α trägt zur frühen Atherosklerose (Schaumzellgenerierung, Lipidakkumulation und Erhöhung der Intima-Media-Dicke) bei und mindert die Endothelfunktion [144]. Eine Behandlung mit TNF- α -Blockern hingegen mindert zumindest bei Psoriasis Patienten die Intima-Media-Dicke der A. carotis [145]. Bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis konnte gezeigt werden, dass TNF- α unter anderem IL-18, IL-6 und IL-1 induzieren kann [146, 147] und somit die Inflammation verstärkt. Letzteres wiederum kann seinerseits IL-6 induzieren [148].

Die renale Expression des zur IL-1-Familie gehörenden IL-1 β ist in MRL-*Fas*^{lpr}-Mäusen mit Lupusnephritis erhöht [149, 150]. Es wird von glomerulären Makrophagen produziert [150]. Diese Rolle von IL-1 β für die Lupusnephritis findet sich auch in humanen Untersuchungen: Neben der Tatsache, dass der Serumspiegel von IL-1 β in vielen Untersuchungen signifikant erhöht ist und dieser mit der Krankheitsaktivität korreliert, scheint IL-1 β insbesondere mit renaler Beteiligung assoziiert zu sein [151]. Aber auch ein Einfluss von IL-1 β auf die Atheroskleroseentwicklung erscheint wahrscheinlich: Die Behandlung von Herzinfarktpatienten mit Canakinumab (anti-IL-1 β) senkt das Risiko an einem zukünftigen kardiovaskulären Ereignis zu versterben [62].

Ähnlich verhält es sich mit IL-18. Auch IL-18 ist sowohl bei MRL-*Fas*^{lpr}-Mäusen als auch bei SLE Patienten erhöht, korreliert bei letzteren mit der Krankheitsaktivität und ist mit renaler Beteiligung assoziiert [152, 153]. Übereinstimmend entwickeln MRL-*Fas*^{lpr}-Mäuse, bei denen anti-IL-18-Antikörper induziert wurden, einen milderen Krankheitsverlauf mit einer verringerten Lupusnephritis und längerer Überlebenszeit [154]. IL-18 wird auch in humanen atherosklerotischen Plaques exprimiert und ist dort mit Instabilität der Plaques assoziiert [155] und könnte somit die Wahrscheinlichkeit kardiovaskulärer Ereignisse erhöhen.

S100A8 wird von aktivierten Granulozyten und Monozyten produziert und kann den TLR4 aktivieren [156]. Das Serumlevel von S100A8 ist bei Lupus Patienten allgemein, aber insbesondere während einer Infektion erhöht und es findet sich eine Korrelation mit der Krankheitsaktivität [157]. Die S100/Calgranuline, zu denen S100A8 zählt, binden neben TLR4 an RAGE (multiligand receptor for advanced glycation end

products) und wirken auf diese Weise als Mediatoren für Inflammation und Atherosklerose, indem sie beispielsweise die Produktion von ROS fördern [158, 159].

Der Monozytenkolonien-stimulierende Faktor (CSF-1) ist ein wichtiger Überlebens- und Proliferationsfaktor von Makrophagen, der deren Aktivierung bewirkt und chemotaktisch wirkt [160]. CSF-1 wird von Tubulusepithelzellen zu Beginn der Lupusnephritis exprimiert, steigt mit der Krankheitsaktivität, lässt sich in Serum und Urin nachweisen und kann daher als früher Biomarker einer sich entwickelnden Lupusnephritis dienen [161]. CSF-1 trägt auch zur Atherogenese bei, indem er die Proliferation und das Überleben von Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen fördert und dort von Endothel- und glatten Muskelzellen produziert wird [162]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von CSF-1 atherosklerotische Läsionen reduziert [163]. Bei chronischen Hämodialysepatienten ist CSF-1 ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse und korreliert positiv mit den IL-6 und IL-18 Serumspiegeln [164].

Neben CSF-1 stellt auch IL-34 einen Wachstumsfaktor für Makrophagen dar, der im MRL-*Fas^{pr}*-Mausmodell zusammen mit seinen Rezeptoren cFMS und Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type Z (PTPRZ) verstärkt renal exprimiert wird und dessen Knockout sowohl die Lupusnephritis als auch die systemische Erkrankung mildert [165]. IL-34 ist im Serum und Urin von SLE-Patienten mit Lupusnephritis erhöht und korreliert mit der Krankheitsaktivität [165, 166]. Außerdem korreliert IL-34 histopathologisch mit der Makrophagen- und T-Zellinfiltration der Niere [165]. IL-34 trägt des weiteren auch zur Atherogenese bei, indem es die Generierung von Schaumzellen fördert, die Aufnahme von oxLDL durch Makrophagen begünstigt und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- α und IL-1 β bewirkt [167].

2.4 Einfluss von ATI auf die Krankheitsaktivität

Das in Weizenkörnern am häufigsten vorkommenden Protein ist mit 85-90 % das Gluten [168]. Unter Gluten versteht man verschiedene verwandte Proteine, die vor allen Dingen als Baustofflieferanten dienen [168]. Die nicht zu Gluten zählenden Amylase-Trypsin-Inhibitoren sind Proteine, die wachstumsregulatorische und vor Parasiten schützende Funktionen haben und 2-4 % der Gesamtproteinmenge in Weizen ausmachen [168-170]. Glutenfreie Lebensmittel enthalten so gut wie keine ATIs [171].

ATIs stimulieren Zellen des angeborenen Immunsystems: dendritische Zellen, Makrophagen und Monozyten [172]. Sie binden dafür an deren Toll-like-Rezeptor 4, was zu einer Aktivierung dieser Zellen und damit des angeborenen Immunsystems führt [172]. Dabei kommt es zu geringen intestinalen Inflammation, die in der Regel bei der gesunden Bevölkerung symptomlos bleibt und sich mehr durch eine Zellaktivierung und Freisetzung inflammatorischer Mediatoren als durch verstärkte Infiltration auszeichnet [169]. Die so aktivierten Immunzellen wandern in die mesenterialen Lymphknoten. Die ATIs verstärken die Antigenpräsentation der dendritischen Zellen, Makrophagen und Monozyten und führen so bei Interaktion mit T-Zellen zu einer verstärkten T-Zell-Antwort. Treffen die ausgewanderten antigenpräsentierenden Zellen in den Lymphknoten auf bereits aktivierte, zirkulierende T-Zellen, die andernorts chronische Entzündung, wie sie auch beim SLE und anderen Autoimmunkrankheiten auftritt, unterhalten, könnten sie die Wirkung dieser T-Zellen verstärken und so zur Krankheitsaktivität beitragen [169]. Diese These wird durch den Nachweis verstärkter, allergeninduzierter IgE-vermittelter Inflammation von Darm und Lungen bei ATI-haltiger Ernährung gegenüber Kontrollernahrung unterstützt [173].

Unveröffentlichte Daten zeigen, dass auch die Fütterung von MRL-*Fas^{lpr}* Mäusen mit ATI-angereichertem Futter eine gegenüber glutenfreier Diät verstärkte, systemische Inflammation auslöst. Die Fütterung mit ATI-freiem Futter führt zu geringerer Infiltration durch T-Zellen und Makrophagen in der Niere sowie zur Abschwächung der Hautläsionen und geringerem Lymphknotenbefall. Darüber hinaus kommt es zu einer Abnahme der Expression inflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- α und IL-18.

2.5 Lupusmausmodelle

Nicht alle Fragestellungen zur weiteren Aufklärung der Pathogenese, Ätiologie und des Ermitteln potenzieller therapeutischer Targets können ethisch vertretbar in klinischer Forschung untersucht werden. Aus diesem Grund sind Tiermodelle erforderlich, bei welchen es hinreichend schnell zu einem dem systemischen Lupus erythematoses ähnlichem Bild kommt. Kein etabliertes Tiermodell deckt alle Manifestationen des SLE ab, weshalb zur Untersuchung bestimmter Fragestellungen unterschiedliche Tiermodelle genutzt werden müssen. Im Folgenden soll eine kurze Übersicht über die wichtigsten, spontanen Mausmodelle gegeben und auf die Eignung dieser für kardiovaskuläre Fragestellungen eingegangen werden.

Eines der ersten Mausmodelle für SLE sind die F1 Nachkommen der Kreuzung der Mausstämmen New Zealand Black (NZB) und New Zealand White (NZW): NZB/W F1 [174]. Der NZB Stamm leidet an einem spontanen Autoimmunsyndrom mit autoimmunhämolytischer Anämie, Autoantikörpern und Hepatosplenomegalie, während der NZW Stamm klinisch gesund bleibt [174, 175]. Die F1 Nachkommen der Kreuzung entwickeln eine Lupusnephritis, die sich gut als Modell eignet [174]. Verwandt ist der New Zealand Mixed (NZM) Stamm, der durch Rückkreuzung von NZB/W F1 und NZW entstand und von dem die Linien NZM2328 und NZM2410 heute als Mausmodelle dienen [176, 177]. Auch sie entwickeln Autoantikörper und eine Glomerulonephritis, jedoch keine Vaskulitis [177]. Als ein weiteres spontanes Modell dienen männliche BXSB/Yaa-Mäuse, welche durch eine Duplikation von 16 Genen (Translokation von X zu Y-Chromosom), insbesondere durch Verdopplung des TLR-7 Gens eine verstärkte Aktivierung des Typ1-IFN Signalwegs zeigen [175].

Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell basiert auf dem MRL-*Fas^{lpr}*-Stamm. Die Murphy Roths Large (MRL) Mäuse zeichnen sich durch eine amphibienähnliche, für Säugetiere hohe Fähigkeit zur Geweberegeneration aus [178]. Das erschwert eine Kennzeichnung der Mäuse durch Ohrlochung, da diese schnell unter Knorpelbildung heilen und zur ursprünglichen Gewebekonfiguration zurückkehren [178]. Die MRL-*Fas^{lpr}* Mäuse unterscheiden sich vom Kontrollstamm, den MRL-++ Mäusen, insbesondere durch die autosomal rezessive *lpr*-Mutation (lymphoproliferation) und zeichnen sich durch eine massive T-Zell Proliferation aus [179]. Auch die MRL-++ Mäuse als Kontrollstamm entwickeln eine autoimmune Störung, die sich jedoch milder und viel später entwickelt [180]. Die *lpr*-Mutation liegt im Gen des Fas-Rezeptors, welcher eine wichtige Rolle in der Apoptose spielt und dessen Verlust beispielsweise die Akkumulation autoreaktiver T-Zellen fördert [181]. Das MRL-*Fas^{lpr}*-Mausmodell unterscheidet sich von den übrigen Mausmodellen dadurch, dass es neben der immunkomplexvermittelten Lupusnephritis weitere Manifestationen wie Arthritis, Zerebritis, Vaskulitis und Hautbefall sowie auch serologisch ein vollständigeres Bild mit ANA, anti-dsDNA, anti-SM und zirkulierenden Immunkomplexen abbildet [179, 182, 183]. Der Krankheitsbeginn liegt bei etwa 2-3 Monaten und die Mäuse versterben meist nach 5-8 Monaten an einer Glomerulonephritis [179, 184]. Weibchen sind stärker betroffen [179].

	NZB/W F1	BXSB	MRL- <i>Fas^{lpr}</i>	MRL-++
Glomerulonephritis	chronische GN nach 4-5 Monaten	akute/subakute GN nach 4-5 Monaten	akute/subakute GN nach 3-4 Monaten	akute/subakute GN spät im Leben
Herz	Akute und alte Myokardinfarkte			k.A.
Gefäße	keine Vaskulitis	keine Vaskulitis	akute Polyarteriitis	k.A.
Lymphatische Organe	kortikale Thymusatrophie, medulläre Hyperplasie; leichte LK Hyperplasie	kortikale Thymusatrophie, medulläre Hyperplasie; moderate LK Hyperplasie	kortikale Thymusatrophie, medulläre Hyperplasie; schwere LK Hyperplasie	leichter Befall
Arthritis	keine	keine	mikroskopische Synovitis	milde mikroskopische Synovitis
ZNS-Befall	keiner	keiner	kognitive Dysfunktion	späte kognitive Dysfunktion
Hautbefall	keiner	keiner	Ausschlag Gesicht/Rücken	mild
Serologie				
ANA	+	++	++++	+
Anti-dsDNA	+	+	+++	+
Immunkomplexe	+	+	+++	+
Alter bei Tod in Mo (♀/♂)				
50% Mortalität	8,5/15	15/5,1	5/5,5	17/23
90% Mortalität	12,8/19	24/8	7,3/8,6	23/27
M/W Prävalenz	F>>M	M>>>>F	F≈M	F>M

Tabelle 3 Vergleich der wichtigsten etablierten Mausmodelle für den SLE [177, 179, 185]

2.5.1 Kardiovaskuläre Beteiligung in Lupusmausmodellen

Sowohl in NZB/W und BXSB als auch in MRL-*Fas^{lpr}* Mäusen sind vaskuläre Läsionen in Form von fokal-segmentalen eosinophilen und PAS-positiven Ablagerungen in Gefäßwänden beschrieben [186]. Weiterhin finden sich in den Koronarien IgG- und C3-Ablagerungen sowie myokardiale Infarkte [186].

NZB/W F1 Mäuse zeigen eine reduzierte Acetylcholin-induzierte endothelabhängige Vasodilatation durch Acetylcholin gegenüber den Kontrollen [187]. Durch Behandlung

der Mäuse mit Hydroxychloroquin und anderen Antioxidantien lässt sich diese normalisieren [187]. Dieser Effekt lässt sich auf die geringere Produktion von ROS und erhöhte NO-Verfügbarkeit zurückführen [187, 188]. Die Anzahl und Funktion von EPCs ist gemindert [189]. Eine orale Behandlung von Mäusen mit *Lactobacillus fermentum* schwächt neben der allgemeinen Krankheitsaktivität auch die kardiovaskuläre Beteiligung, indem die endothelabhängige Vasodilatation verbessert und die Menge an ROS in den Gefäßwänden verringert wird [190]. Eine high-fat Diät bewirkt bei NZB/W F1 Mäusen eine verschlechterte endothelabhängige Vasodilatation der A. carotis gegenüber der Standardernährung [191].

In NZM Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein IFN-Rezeptor Knockout die endothelabhängige Vasorelaxation verbessert und die Anzahl von EPC erhöht [192]. Eine IFN- α Exposition via eines Adenovirus hingegen verschlechtert die endothelabhängige Vasorelaxation [192].

Während BXSB Mäuse bislang nicht als Modell dienen, zeigt sich insbesondere bei den männlichen (NZW X BXSB) F1-Mäusen mit 80% eine hohe Rate von degenerativer koronarer Herzkrankheit, die mit Myokardinfarkten assoziiert ist, jedoch eine zelluläre inflammatorische Komponente vermissen lässt [193].

Bei MRL-*Fas*^{lpr} Tieren hingegen wurde eine schwere koronare Arteriitis festgestellt, die nicht mit Myokardinfarkten assoziiert war, obwohl insgesamt die Rate an Myokardinfarkten bei diesen Mäusen erhöht ist [186, 194]. MRL-*Fas*^{lpr} Mäuse zeigen gegenüber MRL-++ Mäusen eine verschlechterte Acetylcholin-abhängige Vasorelaxation, die sich jedoch durch NET-bildungs-hemmende Stoffe verbessern lässt [195]. Auch die Gabe von Tofacitinib, einem JAK-Inhibitor, verbessert die endothelabhängige Vasorelaxation und erhöht die Differenzierung von EPCs in Endothelzellen in vitro [69]. Tofacitinib, welches in das Interferonsignaling eingreift, moduliert auch die NET-Bildung und senkt den Serumspiegel von Interleukinen wie TNF- α , IFN γ , und IL-2 [69]. MRL-*Fas*^{lpr} Mäuse zeigen eine erhöhte ICAM-1 und VCAM-1 Expression gegenüber MRL-++ Mäusen und in Reaktion auf eine TNF- α -Injektion wird eine verstärkte Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel mit folgender Leukozyten-Extravasation beobachtet [196].

Gemessen an der Rate der Mäuse mit Myokardinfarkt zeigt sich bei 24 Wochen alten Mäusen mit einer Häufigkeit von 53% die höchste Rate an alten oder akuten Myokardinfarkten bei männlichen (NZW X BXSB) F1-Mäusen Mäusen, gefolgt von

Literaturdiskussion

MRL-*Fas^{pr}* Mäusen mit 25% und BXSB mit 4% [194]. Zu beachten ist jedoch, dass sich die Geweberegenerationseigenschaften des MRL-Stamm auch auf den Herzmuskel auswirken und Kryo-induzierte Verletzungen im Gegensatz zu C57BL/6-Kontrollen narbenlos repariert werden [178], sodass die Anzahl der alten Myokardinfarkte höher liegen könnte.

3 Material und Methoden

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in den Laborräumen der Arbeitsgruppe Weinmann-Menke der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

3.1 Material

Eine detaillierte Aufstellung der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sowie Reagenzien findet sich im Anhang unter Materialliste.

3.2 Methoden

3.2.1 Mäuse

MRL-*Fas^{lpr}*, MRL-++ sowie //6-Knockout BALB/C Mäuse wurden bei Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) gekauft. In dieser Arbeit werden MRL-*Fas^{lpr}* Mäuse in den Altersstufen 1,5 Monate, 3 Monate und 5 Monate mit Kontrolltieren der gleichen Altersstufen des MRL-++ Stammes verglichen. Neben dem Alter wurde als alternatives Kriterium für die Gruppe der 5-monatigen MRL-*Fas^{lpr}* Tiere eine hinreichend schwere Belastung, die eine sofortige Sakrifizierung erforderlich machte, angewendet. Die MRL-*Fas^{lpr}* //6-Knockout-Mäuse wurden durch ein Backcross-Intercross-Schema generiert. Die Nachkommen wurden via PCR genotypisiert.

Die Tiere werden in den zentralen Versuchstierställen der Universitätsmedizin Mainz unter standardisierten, pathogenarmen Bedingungen gehalten und gezüchtet. Die Temperatur beträgt 22 ± 2 °C, die relative Luftfeuchtigkeit liegt bei 55 ± 5 % und es wird ein Tag-Nacht-Rhythmus mit Lichtwechsel um 06:00 und 18:00 Uhr simuliert. Die Haltung erfolgt in Makrolonkäfigen mit Metallgitterdeckel, integrierter Futtertraufe sowie Trinkflasche. Als Streu kommt Weichholzgranulatstreu zum Einsatz. Der Umgang mit den Tieren erfolgte ordnungsgemäß und wurde unter der Nummer G17-1-074 genehmigt.

Fütterungsversuche werden unter der Verwendung von ATI-freiem Futter (bereitgestellt durch die AG Schuppan der Universitätsmedizin Mainz) durchgeführt. Diese Mäuse erhalten ab einem Alter von vier bis fünf Wochen für sieben bis zehn Wochen ATI-freies Futter, bevor sie im Alter von 13-14 Wochen sakrifiziert werden.

3.2.2 Genotypisierung durch PCR

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgt durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion. Es wird eine Gewebeprobe (Zehenendglied) abgetrennt und bei -20 °C gelagert. Zur DNA-Extraktion werden die Proben nach Zugabe von 150 µl Base-Lösung für 30 min bei 95 °C im Thermomixer inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 150 µl Neutralisationslösung hinzugegeben und die Proben für 5-10 s gevortext.

Im Anschluss wird aus der DNA, in Abhängigkeit vom nachzuweisenden Produkt entsprechenden Primern, Wasser sowie dem REDTaqReadyMixPCR, wie in Tabelle 4 aufgeführt, ein Ansatz erstellt. Dieser durchläuft bei der PCR die drei klassischen Phasen: Während der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA in ihre einzelnen, komplementären Stränge getrennt. Es folgt das Annealing, bei dem sich die Primer an die DNA anlagern. Während der dritten Phase findet katalysiert durch das Enzym DNA-Polymerase die Elongation statt und aus den zwei Einzelsträngen entstehen zwei Doppelstränge. Diese drei Schritte werden wiederholt, wobei sich nach jedem Zyklus die Anzahl der DNA-Stränge verdoppelt. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Primer sind unterschiedliche Temperaturen zu wählen. Die Dauer und Temperatur der Zyklen sind in Tabelle 5 dargestellt.

Zur Identifizierung der PCR-Produkte werden diese im Anschluss in einem 2%igem Agarosegel unter Zusatz von GELRED nach ihrer Länge elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem bekannten Längenstandard verglichen.

Bei der *FAS*-PCR entstehen für homozygote $MRL^{lpr/lpr}$ Tiere ein Produkt bei 212 bp, bei $MRL^{+/+}$ Tieren ein kürzeres Produkt bei 184 bp und bei heterozygoten $MRL^{lpr/+}$ Tieren beide Produkte. Zur Bestimmung des Genotyps bei den *Il6*-Knockout Mäusen wird sowohl eine *Il6* als auch eine *NEO*-PCR durchgeführt, da die Generierung des Knockouts durch die Insertion einer Neomycin-Kassette erfolgte. Eine negative *NEO*-PCR sowie ein Produkt bei 174 bp der *Il6* PCR entspricht dem *Il6*-Wildtyp, während ein Produktnachweis bei der *NEO*-PCR bei 450 bp sowie ein Produkt bei 174 bp der *Il6* PCR für einen *Il6* heterozygoten Genotyp spricht. Kein Produkt bei der *Il6* PCR und eine positive *NEO*-PCR zeigen einen homozygoten *Il6* Knockout an.

FAS-PCR	NEO-PCR	Il6 PCR
12,5 µl REDTaqReadyMixPCR	12 µl REDTaqReadyMixPCR	12 µl REDTaqReadyMixPCR
1,25 µl F1 <i>fas/Etn</i> primer (antisense)	1,25 µl <i>NEO3</i> forward primer	1,25 µl <i>Il6</i> forward primer

Material und Methoden

1,25 µl R2 <i>fas</i> primer (antisense)	1,25 µl <i>NEO4</i> reverse primer	1,25 µl <i>I/6</i> reverse primer
6,25 µl H ₂ O	8,5 µl H ₂ O	8,5 µl H ₂ O
2,5 µl DNA	2,5 µl DNA	2,5 µl DNA

Tabelle 4 Versuchsansätze Genotypisierungs PCR

FAS-PCR	NEO-PCR	I/6 PCR
95 °C 240 s	95 °C 320 s	
94 °C 60 s (Denaturierung)	94 °C 60 s (Denaturierung)	
60 °C 90 s (Annealing)	58 °C 60 s (Annealing)	
72 °C 180 s (Elongation)	72 °C 120 s (Elongation)	
35 Zyklen (Schritt 2-4)	34 Zyklen (Schritt 2-4)	
72 °C 600 s	72 °C 600 s	
10 °C unendlich	10 °C unendlich	

Tabelle 5 PCR-Programm Genotypisierungs PCRs

3.2.3 Sakrifizierung und Gewebeaufbereitung

3.2.3.1 *Sakrifizierung*

Die Sakrifizierung der Mäuse erfolgt durch zervikale Dislokation. Im Anschluss werden die Körperhöhlen mit einer Schere eröffnet und Blut wird zur Plasmagewinnung aus dem linken Ventrikel unter Nutzung einer 1 ml Spritze gewonnen. Nieren, Aorta und Herz werden präpariert und in eine Petrischale mit PBS auf Eis gegeben.

Die Nieren und das Herz werden je in vier Scheiben unterteilt. Die mittleren werden der Aufarbeitung für Kryo- und Paraffingewebeschnitte zugeteilt, während die Nierenpole bzw. die Herzspitze und -basis der Gewebekonservierung zugeführt werden. Die Aorta wird in drei Abschnitte geteilt, die ebenfalls für Gewebeschnitte und Gewebekonservierung verwendet werden.

3.2.3.2 *Gewebekonservierung*

Die Gewebe wird in Eppendorfgefäßen in N₂ schockgefroren und im Anschluss bei -80 °C aufbewahrt.

Das aus der Herzpunktion gewonnene Blut wird in Plasmaröhrchen überführt und bei 8000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wird bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

3.2.3.3 Kryogewebeschnitte

Zur Anfertigung der Kryogewebeschnitte werden die Organteile von Herz, Aorta und Niere zunächst in OCT eingebettet und im Anschluss in 2-Methylbutan mit Trockeneis schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Pro Kryoblock werden mit dem Kryomikrotom bei ~ -22 °C 4 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Diese werden bei -40 °C bis zur Färbung mit Kieselgel als Trockenmittel gelagert.

3.2.3.4 Paraffingewebeschnitte

Das Gewebe für die Erstellung von Paraffingewebeschnitten wird in ROTI®Histofix 4 % Formalin-Lösung eingelegt. Nach Einbettung des Gewebes in Paraffinblöcke und Anfertigung von 4 µm dicken Scheiben durch das Institut für allgemeine Pathologie der Universitätsmedizin Mainz, werden die Gewebeschnitte bis zur Färbung bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.4 Analyse der Gewebeschnitte

3.2.4.1 HE-, PAS- und EvG-Färbung

Eine Hämatoxylin-Eosin-, eine PAS- sowie eine Elastika-van-Gieson-Färbung wurde durch das Institut für allgemeine Pathologie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Bei der HE-Färbung erscheinen Zellkerne sowie Ribosomen und das raue endoplasmatische Retikulum blauviolett, während sich das Zytoplasma rot anfärbt. Typ-I-Kollagenfasern erscheinen in einem kräftigen rot, wohingegen Typ-III-Kollagenfasern sowie elastische Fasern nur sehr schwach angefärbt werden.

Die PAS-Färbung ist eine histochemische Färbung, bei der Perjodsäure an Molekülen mit vielen Zuckerresten Aldehydgruppen bildet, die sich durch das Schiff-Reagenz rotviolett färben. Auf diese Weise färben sich Muzine, Glykogen und glykoproteinbesetzte Basallaminae an. Sie eignet sich zur Beurteilung entzündlicher Infiltrate.

Bei der EvG-Färbung erscheinen Kerne blauschwarz, das Zytoplasma gelblich, Kollagenfasern rot und elastische Fasern schwarzviolett. Sie eignet sich zur Beurteilung von Veränderungen der Gefäßwände.

Zur Evaluation der glomerulären und interstitiellen Infiltration der Niere wird semiquantitativ auf einer Skala von 0-3 ein Score erhoben, indem 10 zufällig ausgewählte High-Power-Fields gemessen an der höchsten Menge von Infiltrat bewertet werden: 0 = normal, 1 = mild, 2 = moderat, 3 = schwer.

Für die perivaskulären Infiltrationen wird ebenfalls semiquantitativ ein Score abhängig der Anzahl der Zelllagen infiltrierender Zellen um die Gefäßwände herum erhoben: 0 = keine, 1 = <5 Zelllagen, 2 = 5-10 Zelllagen, 3 = >10 Zelllagen).

3.2.4.2 Bestimmung der Intima-Media-Dicke

Die Intima-Media-Dicke wird bei HE-gefärbten Gewebeschnitten der Aorta mit Hilfe der Carl Zeiss AxioVision Software bestimmt.

3.2.4.3 Immunhistochemische Färbungen

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen lassen sich Antigene in Gewebeschnitten identifizieren. So lassen sich z.B. bestimmte Immunzellen identifizieren. Antikörper binden an die nachzuweisende Struktur und werden schlussendlich beispielsweise durch eine enzymatisch katalysierte Farbreaktion sichtbar gemacht.

Es wird zwischen direkten und indirekten Nachweisverfahren unterschieden. Bei der direkten Methode ist das die Farbreaktion katalysierende Enzym oder ein Fluoreszenzfarbstoff direkt an den gegen das nachzuweisende Antigen gerichteten Antikörper gekoppelt, man spricht von „labeled antibody“. Hierbei findet zwar keine Signalverstärkung statt, jedoch ist das Hintergrundsignal aufgrund des Fehlens weiterer Antikörper geringer.

Im Gegensatz dazu findet bei indirekten Verfahren ein sekundärer Antikörper Anwendung, wodurch das Signal amplifiziert werden kann. Der sekundäre Antikörper ist gegen das Fc-Fragment des primären Antikörpers gerichtet. Bei der in dieser Arbeit verwendeten ABC-Methode ist dieser biotinyliert. Aufgrund einer hohen Affinität von Avidin zu Biotin und der Verwendung von biotinylierter Meerrettichperoxidase (HRP) erfolgt eine Komplexbildung an den Sekundärantikörpern, die zur enzymatischen

Umsetzung von DAB-Substrat (3,3'-diaminobenzidine) führt. Dadurch entstehen braune Präzipitate. Um die Hintergrundfärbung bei dieser sehr sensitiven Methode zu reduzieren ist das vorherige Blocken von endogenen Peroxidasen, endogenen Biotins, endogener Biotinrezeptoren und Avidinbindestellen sowie unspezifischer Bindungsstellen mit Normalserum wichtig.

3.2.4.4 CD4 und CD68

Die Kryogewebeschnitte werden zunächst bei Raumtemperatur 30 min getrocknet und im Anschluss in 25 % Ethanol/75 % Aceton für 10 min fixiert. Nach einem Waschschrift werden endogene Peroxidasen mit einer 0,2 % Natriumazid/0,6 % H₂O₂ in 0,1 % BSA/PBS (CD4) oder 0,6 % H₂O₂ in Methanol (CD68) für 1h respektive 30min geblockt. Da die spätere Farbstoffreaktion auf einer durch eine Peroxidase katalysierten Reaktion beruht, kann auf diese Weise die Hintergrundfärbung reduziert werden. Aus diesem Grund müssen auch endogenes Biotin, Biotinrezeptoren und Avidinbindestellen im Gewebe geblockt werden, weshalb die Gewebeschnitte nach einem Waschschrift für je 15 min bei Raumtemperatur zunächst mit 100 µl/Schnitt Avidin- und nach einem weiteren Waschschrift mit Biotin-Solution inkubiert werden. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, werden die Schnitte mit 10% Normalserum (rabbit) in 10 % BSA/PBS für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift folgt die Inkubation bei 4 °C über Nacht mit dem Primärantikörper rat anti-mouse CD4 bzw. rat anti-mouse CD68 jeweils in 0,1 % BSA/PBS in 1:400 respektive 1:500 Verdünnung. Nachdem die Schnitte erneut gewaschen wurden, werden sie für 1 h bei Raumtemperatur mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (rabbit anti-rat) in gleicher Verdünnung wie bei dem Primärantikörper inkubiert. Es folgt ein Waschschrift. Die Schnitte werden nun mit dem 30 min vor Verwendung anzusetzenden Avidin-Biotin-Komplex (10 µl Avidin, 10 µl biotinylierte HRP in 1 ml PBS) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift wird die Färbung mit DAB-Solution entwickelt und anschließend mit Leitungswasser abgestoppt. Es folgt eine Gegenfärbung der Zellkerne für 15-60 s mit Hämalaun, bevor die Gewebeschnitte entwässert werden (70 % Ethanol 10 min, 90 % Ethanol 10 min, 100 % Ethanol 10 min, Xylol 3x10 min). Das Eindecken der gefärbten Gewebeschnitte erfolgt mit Permount Eindeckmedium und Deckgläsern.

Zur Auswertung werden die positiven Zellen in abhängig von der Gewebemenge 3 bis 10 Gesichtsfeldern (High Power Field, HPF) bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt.

3.2.4.5 IgG-DyLight® 488 Immunfluoreszenz-Färbung

Zum direkten Nachweis von IgG-Ablagerungen werden Kryogewebeschnitte für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet, in PBS gewaschen und im Anschluss in eiskaltem 20 % Aceton/80 % Methanol für 15 min bei -20 °C fixiert. Nach einem Waschschrift folgt das Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit 10 % Normalserum in IF-Puffer. Ein weiterer Waschschrift folgt, bevor die Schnitte mit dem DyLight® 488 labeled goat anti-mouse IgG-Antikörper in der Verdünnung 1:400 für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach zwei Waschschriften folgt die Anfärbung der Zellkerne mit dem fluoreszierenden 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), welches sich an doppelsträngige DNA anlagert. Das Eindecken erfolgt mit einem Deckglas.

3.2.5 RNA-Isolation und qPCR

3.2.5.1 Isolation der mRNA

Die Isolation der mRNA aus den konservierten Gewebeproben erfolgt mit dem innuPREP RNA Mini Kit 2.0 (Analytik Jena) nach den Herstellerangaben: 10 mg des Gewebes wird in 400 µl RNA Lysis Buffer mit Hilfe des TissueLyser LT (Qiagen) und je zwei 5 mm Stainless Steel Beads (Qiagen) für 7,5 min bei 50 Hz zerkleinert. Mit Hilfe einer DNA-bindenden Säule wird diese aus dem Gewebelysat entfernt. Es folgen Waschschriften, bei denen das Filtrat über eine RNA-bindende Säule nacheinander mit je 400 µl 70 % Ethanol/DEPC-Wasser, je 500 µl Washing Solution HS und je 700 µl Washing Solution LS aufgereinigt wird. Schließlich wird die RNA mit je 60 µl RNase freiem Wasser eluiert und die Konzentration mit dem NanoDrop2000 bestimmt.

3.2.5.2 Quantifizierung verschiedener Zytokine mittels quantitativer RT-PCR

Die Expression verschiedener Zytokine und Oberflächenmarker kann mit Hilfe der RTQ-PCR quantifiziert werden. Die RTQ-PCR erfolgt mit dem QuantiNova SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) als One-Step RT-PCR. Zunächst werden die Reaktionsansätze nach dem Schema in Tabelle 6 unter dem Einsatz von 50 ng RNA

Material und Methoden

in RNase freiem Wasser und QuantiNova Yellow Template Dilution Buffer in einer 96-Well qPCR-Platte erstellt.

2x QuantiNova SYBR Green RT-PCR Master Mix	10 µl
QN SYBR Green RT-Mix	0,2 µl
10x QuantiTect Primer Mix	2 µl
oder Sigma forward/reverse-Primer	je 0,5 µl
RNA-Template	variabel
RNase freies Wasser	variabel
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 6 Reaktionsansatz qPCR

Die Reaktion läuft in fünf Schritten im LightCycler 480 (Roche) ab. Zunächst muss die mRNA in cDNA umgeschrieben werden. An die dafür notwendige HotStarRT-Script Reverse Transcriptase ist bei Raumtemperatur ein RT-Blocker gebunden, der sich im ersten Schritt bei Erhitzung der Proben auf 50 °C löst und damit die 10-minütige reverse Transkription startet. Die QuantiNova DNA-Polymerase ist zu Beginn ebenfalls durch Bindung an den QuantiNova Guard und einen Antikörper inaktiv. Während des 2-minütigen zweiten Schritts, der Denaturierung, werden die Proben auf 95 °C erhitzt, wodurch die DNA-Polymerase freigegeben und aktiviert wird. Im dritten Schritt findet nun in 55 Zyklen eine PCR statt. Ein Zyklus besteht dabei aus der Denaturierung mit Erhitzen auf 95 °C gefolgt von dem kombinierten Primer-Annealing und der Extension mit Fluoreszenzmessung bei 60 °C. Gemessen wird die Fluoreszenz des Farbstoffs SYBR Green I, der diese nach Bindung doppelsträngiger DNA-Moleküle bildet. Somit nimmt die Fluoreszenz proportional zur Menge des PCR-Produkts zu. Es folgt ein weiterer Schritt zur Messung der Schmelzkurven des Produkts als Qualitätskontrolle. Durch Erhitzen der Proben von 60 °C auf 95 °C unter kontinuierlicher Fluoreszenzmessung, kann das Zerfallen des Produkts in Einzelstränge erfasst werden, da SYBR Green I nur bei Bindung an doppelsträngige DNA fluoresziert. Eine Übersicht bietet Tabelle 7.

Schritt	Zeit	Temperatur
Reverse Transkription	10 min	50 °C
PCR Aktivierung und Denaturierung	2 min	95 °C
PCR-Zyklen (55x)		

Denaturierung	15 s	95 °C
Annealing/Extension	30 s	60 °C
Schmelzkurven		60 °C-95 °C
Abkühlen		40 °C

Tabelle 7 RTQ-PCR Zyklen

Zur Quantifizierung werden Cp-Werte (crossing point) ermittelt. Diese bezeichnen den Punkt, an dem sich die Fluoreszenz der Probe erstmals von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Dieser Punkt wird bei dem Zyklus festgelegt, in dem die zweite Ableitung der Fluoreszenzkurve ihr Maximum hat. Diese Cp-Werte für die einzelnen Targets werden dann zu den entsprechenden Cp-Werten des Housekeeping-Gens Aktin in Verhältnis gesetzt und in der relativen Expression zu den Kontrolltieren (3 Monate alte MRL Fas-++ Mäuse) nach der $\Delta\Delta C_p$ -Methode verglichen. Ausgehend von einer perfekten Verdoppelung der DNA in jedem Zyklus errechnet sich das Verhältnis $2^{C_p^{Reference}-C_p^{Target}}$.

3.2.6 IL-6 ELISA

Ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein antikörperbasiertes Verfahren zum quantitativen Nachweis verschiedenster Antigene.

Eine 96-Well-Mikrotiterplatte wird mit einem gegen IL-6 gerichteten Capture-Antikörper in der Konzentration 2 µg/ml in PBS über Nacht gecoated. Nach einem Waschschrift werden unspezifische Bindungsstellen mit 1% BSA/PBS für 1 h geblockt. Ein Waschschrift folgt, bevor die Standards, Negativkontrollen und unverdünnten Proben (100 µl/Well) aufgetragen werden. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C findet ein Waschschrift statt, bevor die Wells 2 h mit dem biotinylierten Detection-Antikörper in der Konzentration 75 ng/ml in PBS inkubiert werden. Nach dem Waschen der Wells werden diese 20 min mit einer Streptavidin-HRP Lösung inkubiert, bevor nach einem weiteren Waschschrift, die Substrat-Lösung hinzugegeben wird. Wie bereits unter Immunhistochemische Färbungen beschrieben findet eine Farbreaktion statt, welche durch eine Stop-Solution (1M H₂SO₄) abgestoppt wird. Zur Konzentrationsbestimmung wird die Absorption in einem Microplate-Reader gemessen.

3.2.7 Erfassung der Endothelfunktion

Die Erfassung der Endothelfunktion erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Pharmakologie der Universitätsmedizin Mainz, Arbeitsgruppe Prof. Li/Dr. Xia [197]. Die thorakale Aorta wird isoliert und in Ringe einer Länge von 2-3 mm geteilt. Mit Hilfe eines Wire-Myograph-Systems (Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark) wird die isometrische Spannung bestimmt. Nach einer Equilibrationsphase von 60 min wird zweimalig eine Kontraktion mit 120 mM KCl ausgelöst. Um die Endothelfunktion zu messen, wird eine submaximale Kontraktion mit Noradrenalin ausgelöst (80 % von der KCl Kontraktion), bevor die Vasodilatation mit Acetylcholin induziert und bestimmt wird.

3.2.8 Isolation und Kultivierung von Endothelzellen aus Aorta und Niere

3.2.8.1 Isolation von Endothelzellen

Nach Sakrifizierung der Mäuse durch zervikale Dislokation werden die Aorta und Nieren entnommen. Diese werden freipräpariert und mit Hilfe einer sterilen Schere zerkleinert. Das Gewebe wird für 45 Minuten bei 37 °C in einer Kollagenase-Dispase-Lösung inkubiert. Das renale Gewebe wird zusätzlich im Anschluss mit Hilfe des gentleMACS Dissociators weiter zerkleinert. Sowohl die Aorta als auch die Nieren werden mit Hilfe einer 14G Kanüle und einer 10ml Spritze circa 10-mal aspiriert, um eine Einzel-Zell-Suspension zu erhalten. Das Gewebe wird durch einen 70 µm Cell Strainer filtriert, welcher mit 20 % FCS/DMEM+1xPS gespült wird. Es folgt eine Zentrifugation bei 1500rpm für 5 Minuten. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml Ery-Lyse-Puffer inkubiert und nach 5 min mit PBS abgestoppt. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 1500rpm für 5 Minuten werden die Endothelzellen der Aorta in Endothelzell-Medium aufgenommen und in Kultur genommen. Zur Gewinnung der Endothelzellen aus der renalen Zellsuspension erfolgt eine MACS Cell Separation. Hierbei werden Zellen mit Hilfe von an Antikörper gegen spezifische Oberflächenmoleküle gekoppelten magnetischen Nanopartikeln selektiert. Dabei erfolgt zunächst eine Negativselektion, bei der CD45 exprimierende Zellen aus der Zellsuspension entfernt werden. Im Anschluss findet eine Positivselektion der CD31 exprimierenden Endothelzellen statt. Die vorherige Negativselektion ist notwendig, da die CD45 exprimierenden Leukozyten häufig auch CD31 exprimieren. Die Selektion erfolgt nach Herstellerangaben mit verkürzten Zentrifugationszeiten mit Hilfe von LS Columns: Nachdem die Zellen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt wurden,

werden sie in 90 µl MACS-Puffer/ 10^7 -Zellen aufgenommen und mit 10 µl gegen CD45 gerichtete MicroBeads/ 10^7 -Zellen für 15 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen mit 1-2 ml Puffer/ 10^7 -Zellen gewaschen und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Zellen werden in Puffer aufgenommen und auf die vorgespülte, in einen Magneten eingespannte LS Column gegeben. Die Säule wird dreimal mit 3 ml Puffer gewaschen. Der Durchfluss enthält die CD45 negative Zellfraktion inklusive der Endothelzellen. Dieser wird abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min) und die Zellen werden in 90 µl MACS-Puffer/ 10^7 -Zellen aufgenommen und mit 10 µl gegen CD31 gerichtete MicroBeads/ 10^7 -Zellen für 15 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss finden die gleichen Schritte wie bei der Negativselektion statt, mit dem Unterschied, dass der Durchfluss verworfen wird und die CD31-positiven Zellen aus der Säule mit MACS Puffer außerhalb des Magneten eluiert werden. Um die Reinheit der Zellen zu Erhöhen erfolgt eine weitere CD31-Selektion. Die so gewonnenen Endothelzellen aus der Niere werden nach Zentrifugation (1500 rpm, 5 min) in Endothelzellmedium aufgenommen. Der Mediumwechsel erfolgt alle 2 Tage. Eine erste Passage oder das Verwenden der Zellen für weitere Versuche kann nach etwa einer Woche erfolgen.

3.2.8.2 Passage von Endothelzellen

Wenn die Zellen 100% konfluent sind, kann eine Passage (1:2) erfolgen. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen werden mit PBS gewaschen. Im Anschluss wird Trypsin zugesetzt und die Zellen für 5 min bei 37 °C inkubiert, um diese zu lösen. Im nächsten Schritt werden die Zellen mit PBS ab gespült und in einem Falcon gesammelt. Zum Abstoppen des Trypsins wird FCS hinzugegeben. Anschließend erfolgt ein Zentrifugationsschritt (1500 rpm, 5 min), bevor die Zellen wieder in Endothelzellmedium aufgenommen und erneut ausgesäht werden können.

3.2.8.3 Stimulation der Endothelzellen

Zur Stimulation der Endothelzellen werden unterschiedliche Stimulanzen wie beispielsweise Interleukine verwendet. Dafür wird das Medium mit den unterschiedlichen Stimulanzen versetzt und die Zellen werden im Anschluss in diesen unterschiedlichen Medien und einem Kontrollmedium für 18 h inkubiert. Im Anschluss daran wird die RNA wie unter 3.2.5.1 beschrieben aus den Zellen isoliert. Mit Hilfe der

Material und Methoden

RTQ-PCR (s. 3.2.5.2) kann nun die unterschiedlich induzierte Expression anderer Zytokine oder Rezeptoren bestimmt werden.

3.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt unter der Verwendung von GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, USA). Die jeweiligen, verwendeten Verfahren sind in den Beschreibungen der zugehörigen Abbildungen benannt.

4 Ergebnisse

4.1 Das MRL-*Fas*^{lpr} Mausmodell eignet sich zur Untersuchung vaskulärer Fragestellungen

Zunächst wurde untersucht, ob sich das MRL-*Fas*^{lpr}-Mausmodell zur Untersuchung der kardiovaskulären Manifestation eignet. Dazu wurden perivaskuläre, entzündliche Infiltrate nachgewiesen. Diese wurden mit Hilfe von RTQ-PCR sowie immunhistochemischen Färbungen charakterisiert. Die Intima-Media-Dicke der suprarenalen Aorta wurde evaluiert und das vaskuläre und perivaskuläre Gewebe wurde auf die Expression von Inflammationsmediatoren untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das MRL-*Fas*^{lpr} Mausmodell eine ausgeprägte vaskuläre Beteiligung zeigt und sich daher exzellent zur Untersuchung der pathogenetischen Mechanismen sowie zur Evaluation möglicher therapeutischer Strategien eignet.

4.1.1 Vaskuläre und perivaskuläre Infiltrate sind in MRL-*Fas*^{lpr} Mäusen erhöht

Zur Untersuchung der vaskulären und perivaskulären Infiltration wurden PAS-gefärbte Gewebeschnitte verschiedener Organe untersucht. Wie in Abbildung 3 zu sehen, zeigte sich bei 5 Monate alten MRL-*Fas*^{lpr} Mäusen eine deutliche, die Gefäße umgebende, leukozytäre Infiltration.

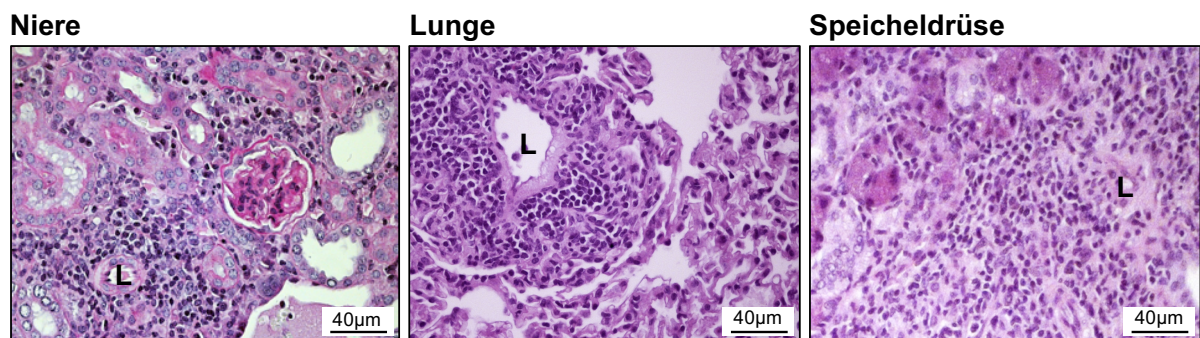


Abbildung 3 perivaskuläre und vaskuläre Infiltration der Niere, Lunge und Speicheldrüse von 5 Monate alten MRL-*Fas*^{lpr} Mäusen. L, Lumen des Gefäßes

Ergebnisse

Eine solche perivaskuläre Infiltration fand sich bei den MRL- $+/+$ Kontrolltieren nicht. Weiterhin zeigte sich bei den MRL-*Fas^{lpr}* Mäusen ein signifikanter Anstieg der infiltrierenden Zellen mit fortschreitendem Krankheitsverlauf (Abbildung 4).

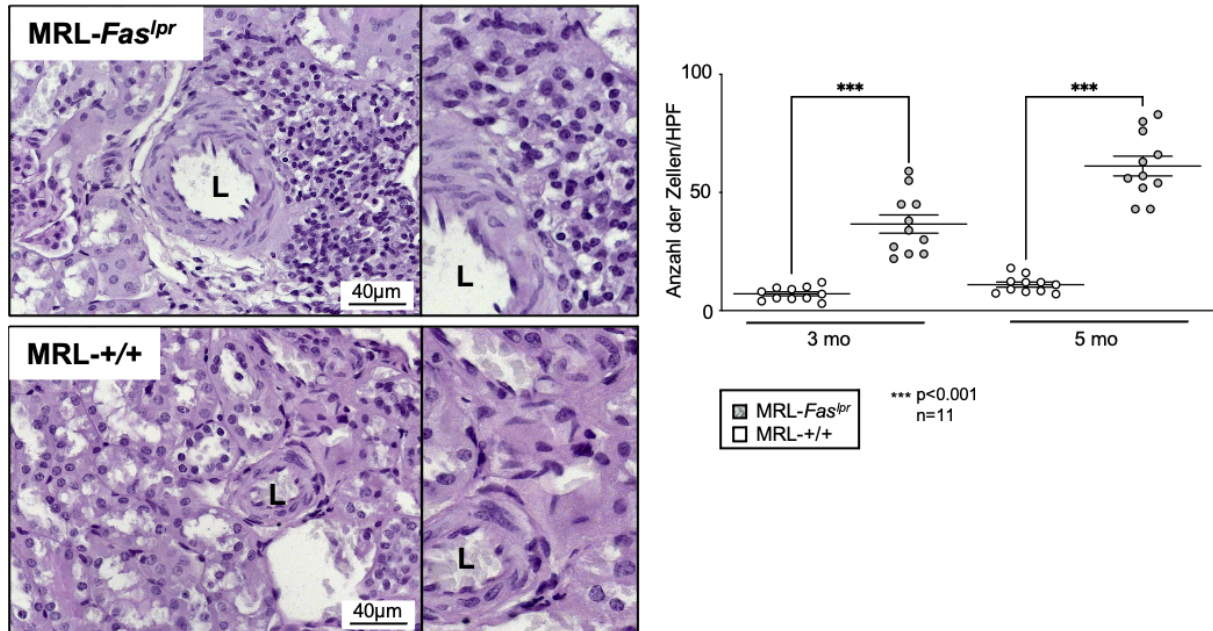


Abbildung 4 Intrarenale, perivaskuläre und vaskuläre Leukozyteninfiltration bei MRL-*Fas^{lpr}* Mäusen in den Altersstufen 3 Monate und 5 Monate verglichen mit gleichaltrigen Tieren des MRL- $+/+$ -Kontrollstamms. n=11. Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Statistische Analyse mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test. L, Lumen des Gefäßes. HPF, High Power Field

4.1.2 MRL-*Fas^{lpr}* Mäuse zeigen beginnende, atherosklerotische Veränderungen

Es sollte überprüft werden, ob neben diesen infiltrativen Prozessen auch Gefäßwandveränderungen in Form von frühen atherosklerotischen Veränderungen vorliegen. Dafür wurde die Intima-Media-Dicke bestimmt und die Gefäßwand wurde auf morphologische Veränderungen untersucht.

Die Intima-Media-Dicke der suprarenalen Aorta zeigte sich bei MRL-*Fas^{lpr}* Mäusen gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Die Intima-Media-Dicke stieg mit weiter fortgeschrittener Erkrankung. Auch der Unterschied zwischen MRL-*Fas^{lpr}* Mäusen und Kontrollen wurde im Krankheitsverlauf größer.

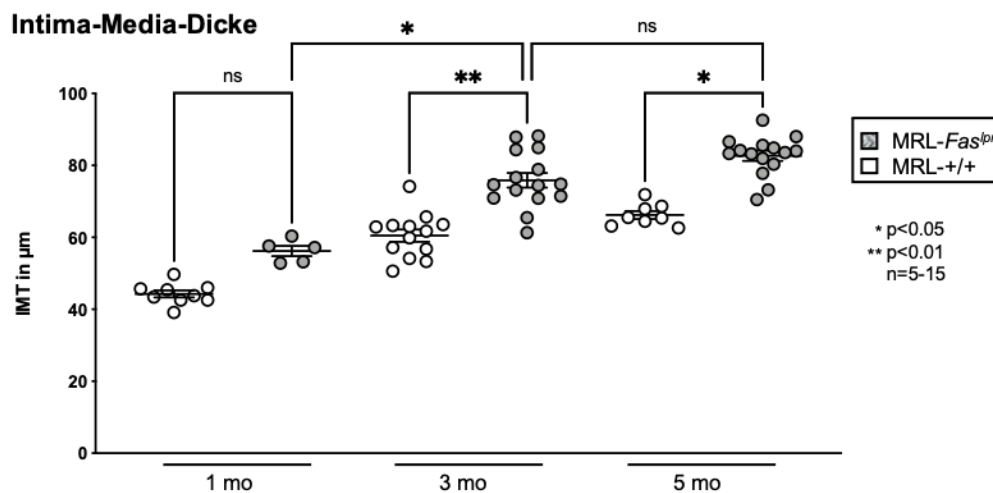
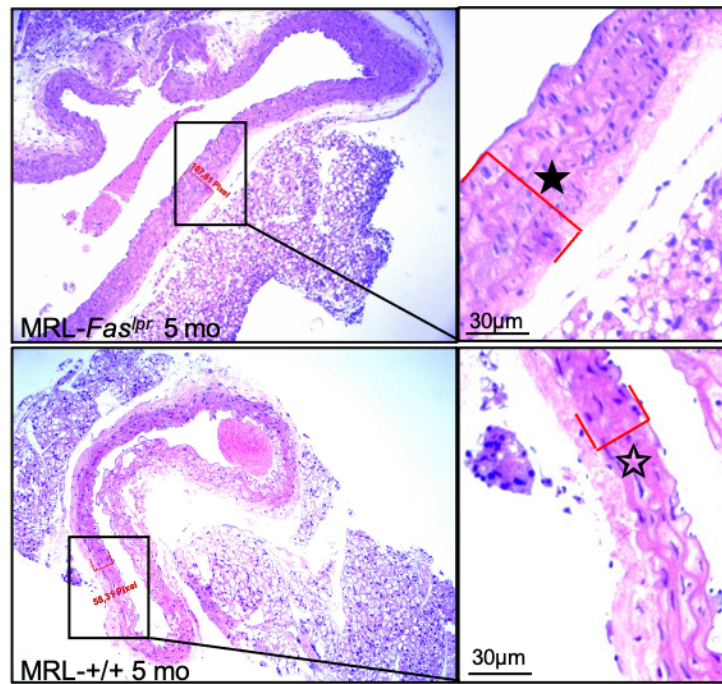
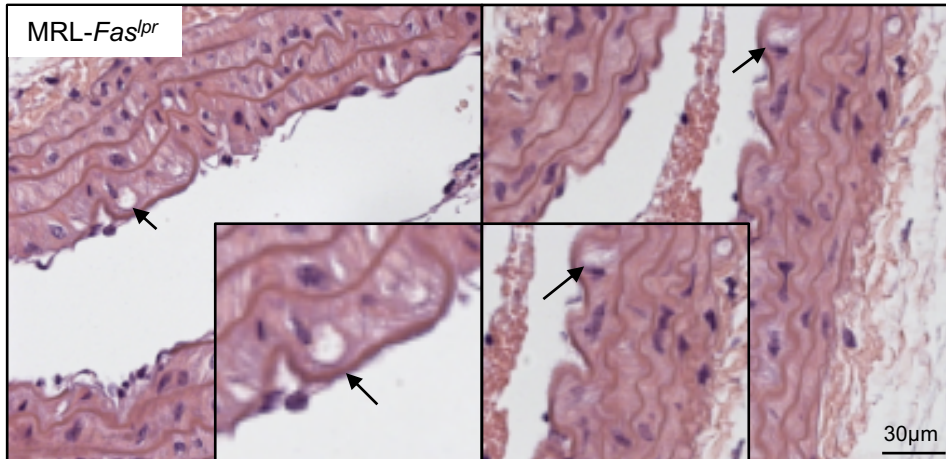


Abbildung 5 Die Intima-Media-Dicke der suprarenalen Aorta von MRL-*Fas^{lpr}* Mäusen verglichen mit MRL-*+/+* Mäusen jeweils der Altersstufen 1, 3 und 5 Monate. ★=107,81 Pixel, ☆=58,31 Pixel. n=5-15. Werte sind Mittelwerte ± SEM. Statistische Analyse mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test.

In der Gefäßwand ließen sich bei 5-monatigen Mäusen Schaumzellen als Zeichen einer beginnenden Atherosklerose nachweisen (Abbildung 6A). In der Elastika-van-Gieson-Färbung lässt sich neben der Auflockerung der Adventitia auch eine Ausdünnung der elastischen Fasern erkennen (Abbildung 6B).

A. Schaumzellen



B. Auflockerung der Adventitia und Abnahme elastischer Fasern

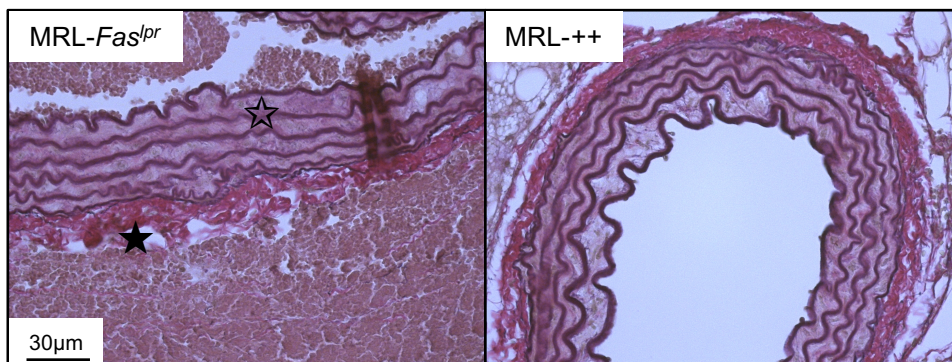


Abbildung 6 (A) Schaumzellen (markiert durch Pfeile) in der Gefäßwand von MRL-Fas^{pr} Mäusen (5 Mo). Vergrößerung 20x, Ausschnitt 40x. (B) Vergleichende Elastika-van-Gieson-Färbung von MRL-Fas^{pr} Mäusen (5 Mo) mit MRL-++ Mäusen (5 Mo). ☆=Abnahme der Dicke der elastischen Fasern, ★=Auflockerung und Verdickung der Adventitia.

4.1.3 Charakterisierung (peri)vaskulärer Infiltrate

Zur weiteren Charakterisierung der perivaskulären und vaskulären Infiltrate wurden diese mit Hilfe der RTQ-PCR und mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass es sich bei den infiltrierenden Zellen insbesondere um CD68⁺-Makrophagen und um CD4⁺-T-Zellen handelt.

In dem vaskulären und perivaskulären Gewebe der suprarenalen Aorta ließ sich ein signifikanter Anstieg der Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD68 der MRL-Fas^{pr} Mäuse gegenüber den jeweiligen Kontrolltieren im Alter von 3 und 5 Monaten feststellen. Darüber hinaus zeigte sich eine Zunahme der Infiltration mit zunehmendem Alter und damit zunehmender Krankheitsaktivität. Diese Entwicklung war signifikant bei dem Vergleich 1,5-monatiger mit 3-monatigen Mäusen (Abbildung 7A).

Ergebnisse

Um diese Ergebnisse mikroskopisch zu bestätigen, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Mit Hilfe dieser ließ sich eine signifikant gegenüber den Kontrolltieren erhöhte Infiltration mit CD68 und CD4 positiven Zellen nachweisen. Auch auf Zellebene zeigt sich eine mit der Krankheitsaktivität zunehmende Infiltration (Abbildung 7B).

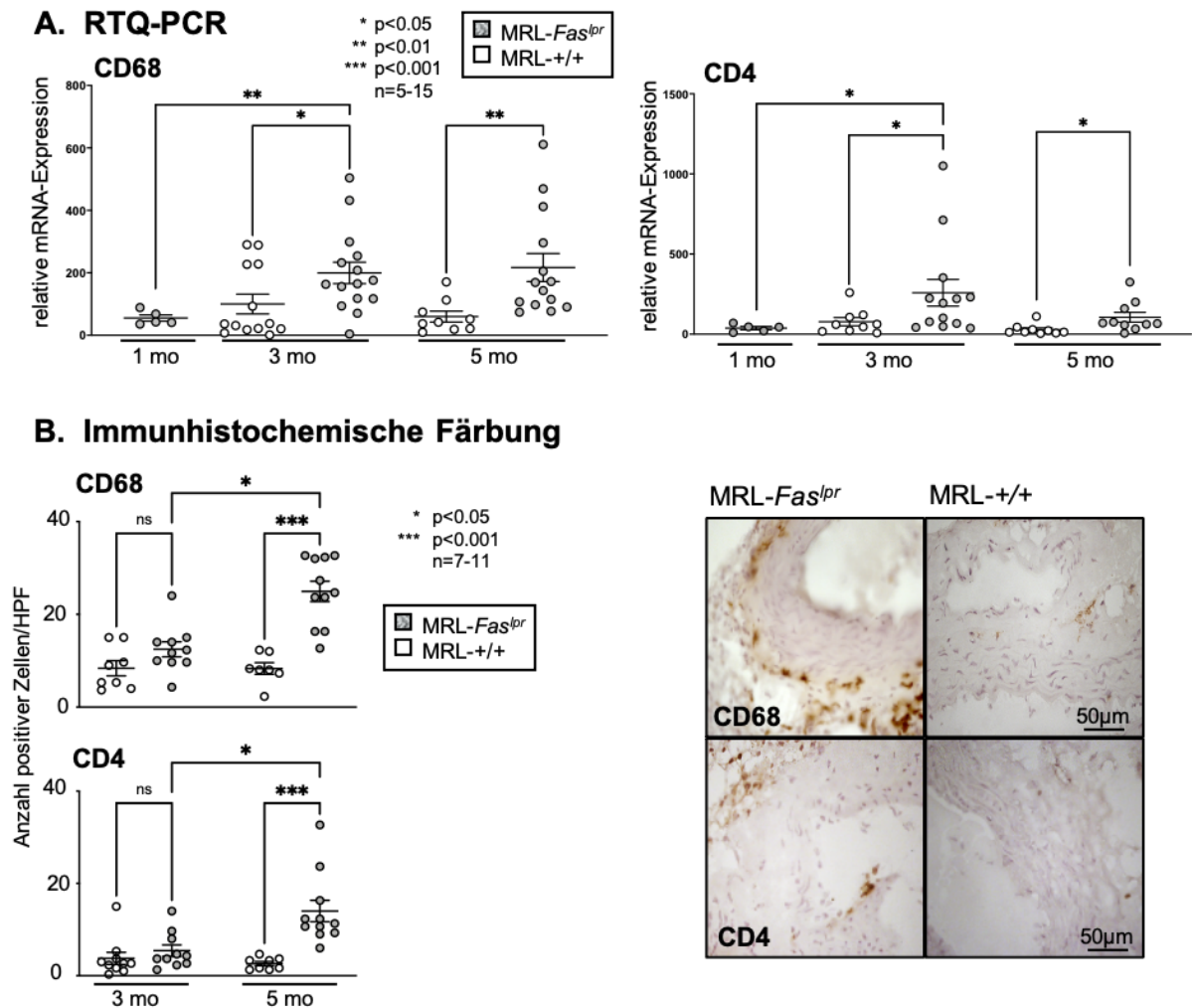


Abbildung 7 Charakterisierung der (peri)vaskulären Infiltrate. (A) Untersuchung der Infiltrate bei MRL-*Fas*^{lpr} Mäusen der Altersstufen 1, 3 und 5 Monate und Kontrollen auf die Expression von CD68 und CD4 mit Hilfe der RTQ-PCR. Statistische Analyse mit dem Mann-Whitney U Test. (B) Untersuchung der Infiltrate bei MRL-*Fas*^{lpr} Mäusen der Altersstufen 3 und 5 Monate und Kontrollen mit Hilfe immunhistochemischer Färbung gegen CD68 und CD4. Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Statistische Analyse mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test. HPF, High Power Field

Neben den infiltrativen Zellen wurde das Gewebe der suprarenalen Aorta auch auf die Ablagerung von IgG hin mit Hilfe einer Fluoreszenzfärbung untersucht. Ähnlich wie in den Glomeruli der Niere finden sich bei den MRL-*Fas*^{lpr}-Mäusen signifikant mehr IgG-Ablagerungen als bei dem Kontrollstamm (Abbildung 8).

IgG-Ablagerungen

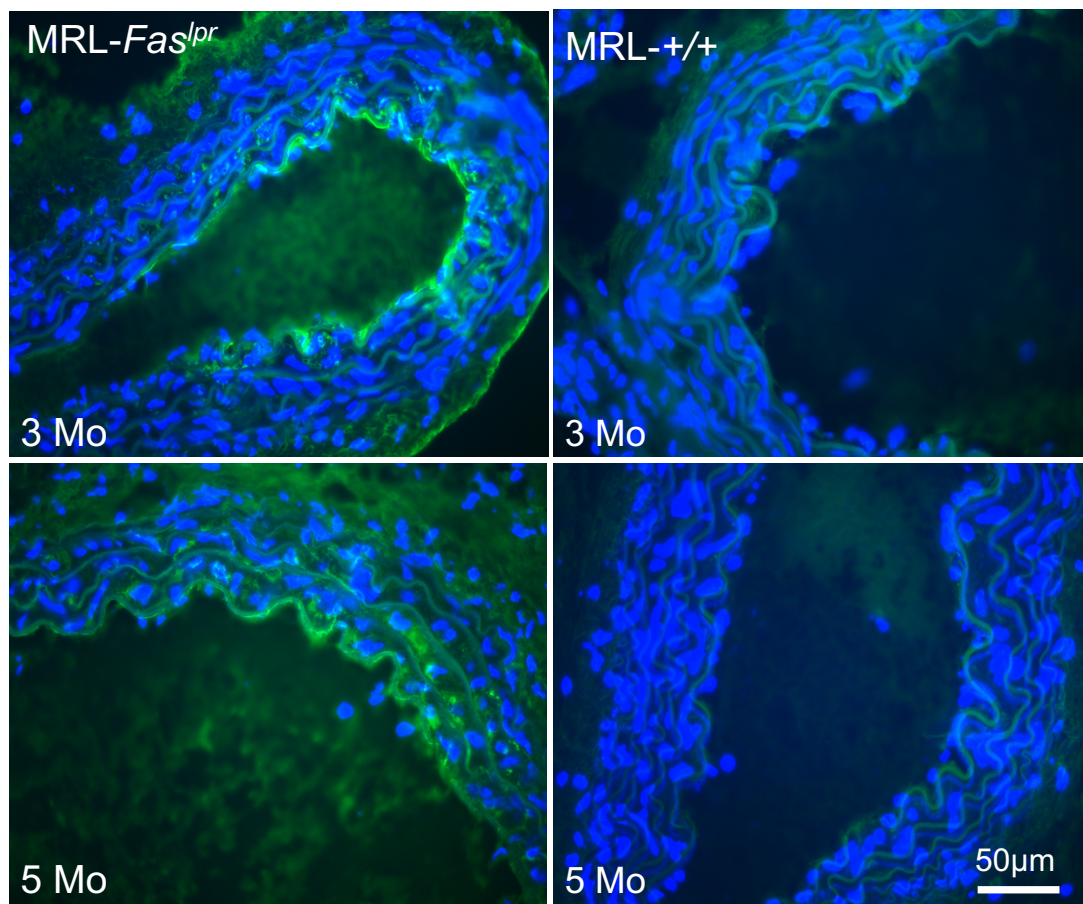


Abbildung 8 IgG-DyLight® 488 Immunfluoreszenz-Färbung. Deutliche IgG-Ablagerungen bei MRL-*Fas*^{lpr}-Mäusen.

4.1.4 Expression verschiedener Inflammationsmediatoren

Es ist bereits bekannt, dass die Expression einiger Zytokine bei MRL-*Fas*^{lpr} Mäusen in Nieren, Milz, Leber und Lymphknoten gesteigert ist und die Krankheitsaktivität fördert [149]. Es sollte untersucht werden, ob sich eine solche gesteigerte Zytokinexpression auch im perivaskulären und vaskulären Gewebe nachweisen lässt. Als Methode kam die RTQ-PCR zur Anwendung.

Es wurde die Expression von IL-6, TNF- α , IL-18, CSF-1, IFN- α , IL-34, S100A8 und IL-1 β sowohl in der Aorta als auch zur Kontrolle und als Bezugsgröße in der Niere von MRL-*Fas*^{lpr} und MRL-+/+ Mäusen der Altersstufen 1, 3 und 5 Monate vergleichend bestimmt.

In dem Gewebe der Niere konnte bei MRL-*Fas*^{lpr} Tieren für TNF- α , IL-18, CSF-1, IFN- α , S100A8, IL-6 und IL-1 β eine signifikante Erhöhung der Expression gegenüber

Ergebnisse

gleichaltrigen Kontrolltieren festgestellt werden. Obwohl weitere Tendenzen zu sehen sind, zeigte sich nur für IL-1 β und IFN- α ein signifikanter Anstieg der Expression mit weiter voranschreitender Krankheitsaktivität. Die Expression von IL-34 unterschied sich in dieser Untersuchung nicht signifikant (Abbildung 9).

Bei der Untersuchung der Expression der gleichen Zytokine in der suprarenalen Aorta und dem umgebenden Bindegewebe fand sich für IL-6, TNF- α , CSF-1, IFN- α , S100A8, IL34 und IL-1 β eine Erhöhung gegenüber den Kontrollmäusen. Für IL-6, TNF- α , CSF-1, IFN- α und IL-1 β zeigte sich zudem signifikante Expressionszunahmen mit zunehmendem Alter. Für die Expression von IL-18 zeigte sich in dieser Untersuchung kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen (Abbildung 10).

Zytokinexpression Niere

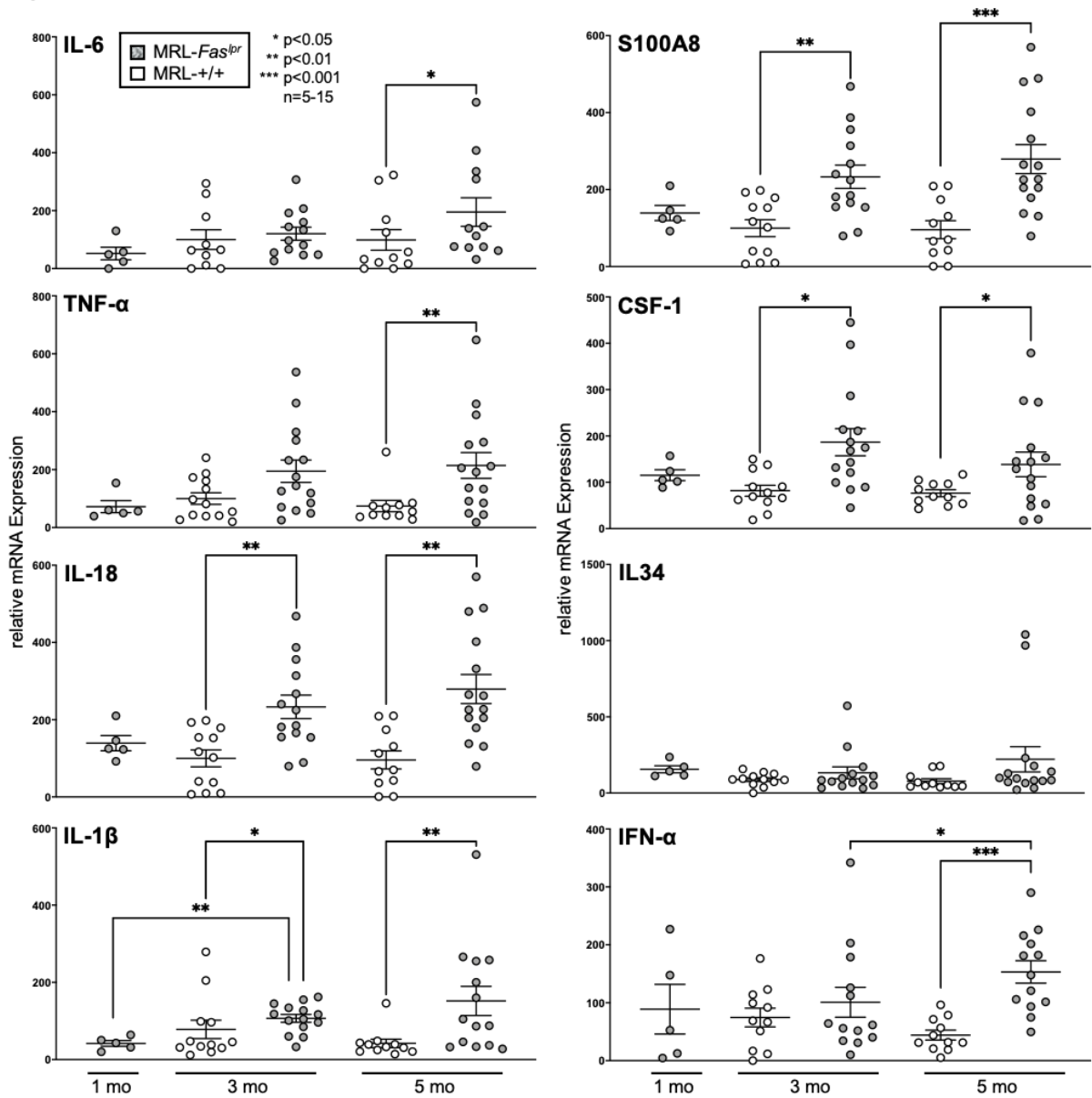


Abbildung 9 Hochregulation inflammatorischer Zytokine in den Nieren bei MRL-*Fas*^{lpr} Mäusen (1, 3 und 5 Mo) verglichen mit MRL-+/+ Mäusen (3 und 5 Mo) im Krankheitsverlauf. n = 5-15. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM. Statistische Analyse mit dem Mann-Whitney U Test.

Zytokinexpression Aorta

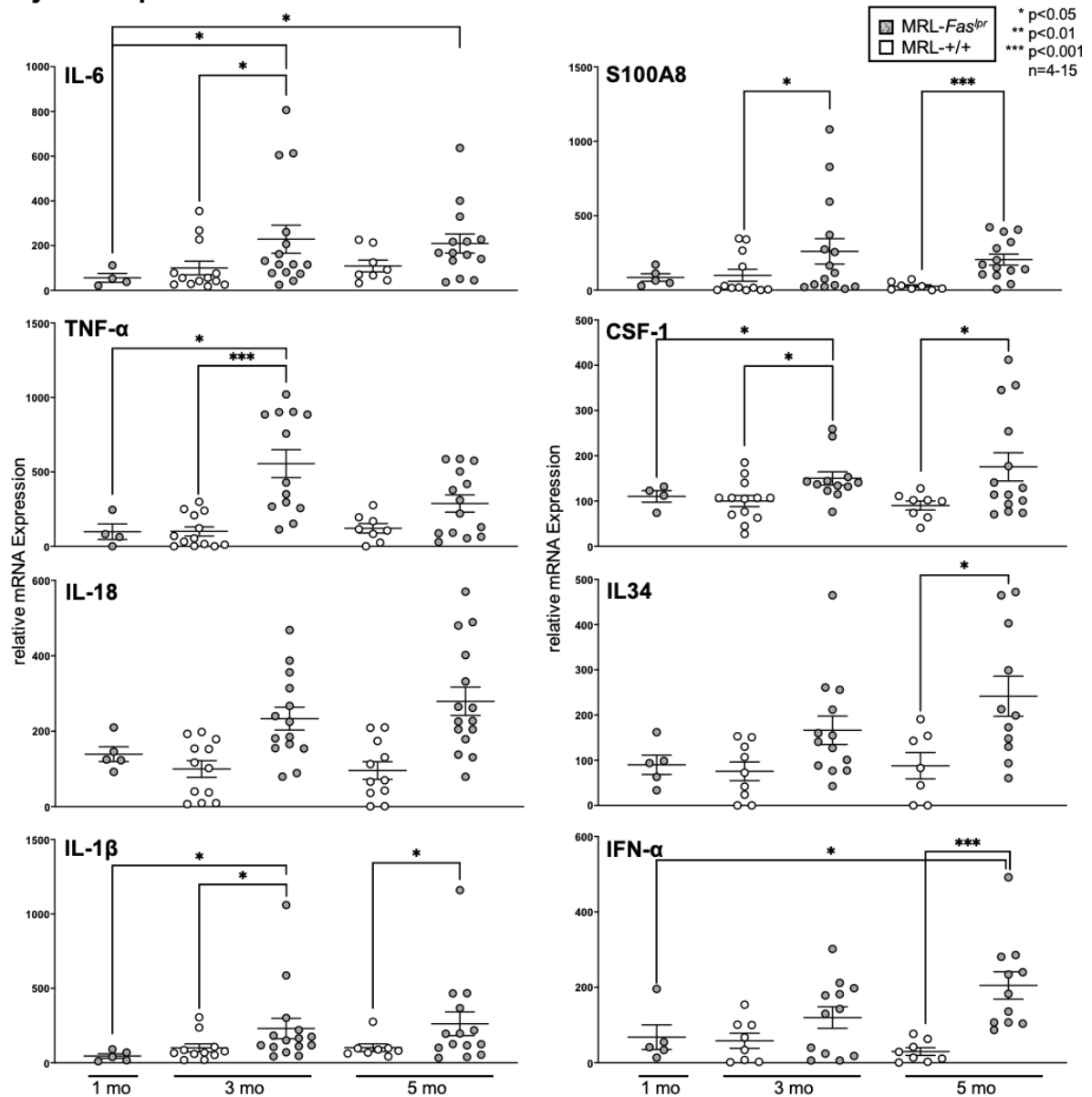


Abbildung 10 Hochregulation inflammatorischer Zytokine in der suprarenalen Aorta mit ihrem perivaskulären Bindegewebe bei MRL-Fas^{lpr} Mäusen (1, 3 und 5 Mo) verglichen mit MRL-+/+ Mäusen (3 und 5 Mo) im Krankheitsverlauf. n = 4-15. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM. Statistische Analyse mit dem Mann-Whitney U Test.

4.1.5 Stimulation von Endothelzellen

Um zu untersuchen, ob Veränderungen auf Ebene der Endothelzellen allein eine Rolle bei der unterschiedlichen Expression von Entzündungsmediatoren oder Entzündungszellmigration spielen, wurden aus der Aorta isolierte Endothelzellen mit verschiedenen Zytokinen stimuliert und im Anschluss auf eine unterschiedliche Expression von proinflammatorischen Chemokinen, Zytokinen sowie Adhäsionsproteinen untersucht. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied

Ergebnisse

zwischen den MRL-*Fas*^{lpr} Mäusen und den Kontrollen. Eine Stimulation mit TNF- α oder IL-1 β führte zu einer erhöhten Expression von VCAM, ICAM und CCL-2. Die Stimulation mit IFN- β bewirkt eine verstärkte Expression von CXCL10 sowie IL-6, welches auch durch IL-1 β induziert wird. Jedoch lässt sich kein unterschiedliches Expressionsverhalten der Endothelzellen in Abhängigkeit von den verglichenen Genotypen feststellen.

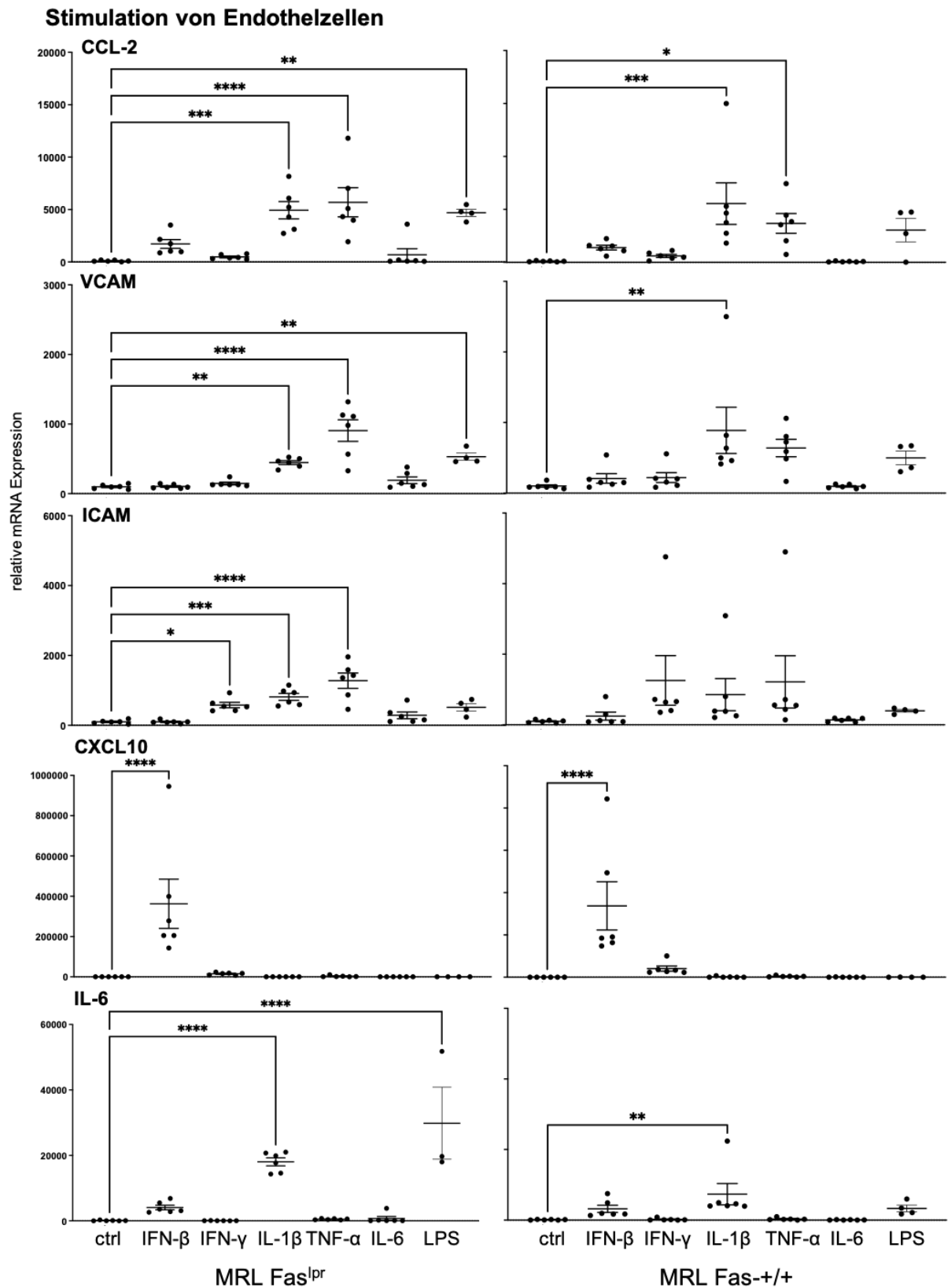


Abbildung 11 Expression von CCL-2, VCAM, ICAM, CXCL10 und IL-6 nach 18h Stimulation aortaler Endothelzellen mit IFN-β, IFN-γ, IL-1β, TNF-α, IL-6 und LPS von 5-monatigen MRL Fas^{lpr} Mäusen verglichen mit Kontrollen. n=2. Statistische Analyse mit Ordinary one-way ANOVA.

4.2 Die vaskuläre Inflammation ist in *Il6*^{-/-} MRL-*Fas*^{lpr} Mäusen abgeschwächt

Für IL-6 konnte bereits eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Lupusnephritis in MRL-*Fas*^{lpr} Mäusen gezeigt werden [12]. Aus diesem Grund und aufgrund der unter 4.1.4 vorgestellten Ergebnisse, der deutlich gesteigerten IL-6 Expression in 5 Monate alten MRL-*Fas*^{lpr} Nieren, sowie ein progredienter Anstieg der IL-6 Expression von 1,5 bis 5 Monaten in der Aorta, wurde der Einfluss von IL-6 auf die vaskuläre Inflammation untersucht. Dafür wurde die vaskuläre und perivaskuläre Infiltration von Mäusen mit dem gleichen genetischen Hintergrund, aber einem Knockout im *Il6*-Gen untersucht.

Um zu bestätigen, dass die Mäuse mit dem Knockout kein IL-6 exprimieren und dass sich *Il6*^{+/-} und *Il6*^{+/+} MRL-*Fas*^{lpr} Mäuse in ihrer IL-6 Expression nicht signifikant unterscheiden und somit sowohl für *Il6* heterozygote als auch homozygote Tiere als Kontrollen geeignet sind, wurden zunächst die IL-6 Spiegel im Serum der betreffenden Mäuse mit Hilfe eines ELISAs untersucht (Abbildung 12). Wie zu erwarten, exprimieren *Il6*^{-/-} MRL-*Fas*^{lpr}-Mäuse so gut wie kein IL-6 (minimale Detektion ist als Hintergrund im ELISA zu werten). Aufgrund der ähnlichen IL-6 Expression von *Il6*^{+/-} und *Il6*^{+/+} MRL-*Fas*^{lpr} Mäusen kommen beide Genotypen als Kontrollen in Betracht.

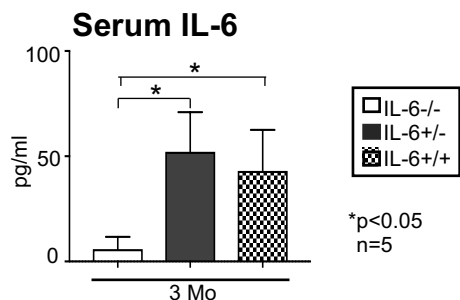


Abbildung 12 Messung der IL-6 Konzentration im Serum von *Il6*^{+/-} und *Il6*^{+/+} MRL-*Fas*^{lpr} Mäusen. n=5. Werte sind Mittelwerte ± SEM. Statistische Analyse mit dem Mann-Whitney U Test.

Zur semiquantitativen Beurteilung der vaskulären und perivaskulären Infiltration in der Niere wurde ein Score, wie unter 3.2.4.1 erläutert, erhoben. Es zeigt sich ein signifikanter Rückgang dieser bei *Il6*^{-/-} MRL-*Fas*^{lpr}-Mäusen gegenüber *Il6*^{+/-} MRL-*Fas*^{lpr}-Mäusen. Auch die glomerulären und interstitiellen leukozytären Infiltrationen in der Niere sind in Abwesenheit von IL-6 vermindert (Abbildung 13).

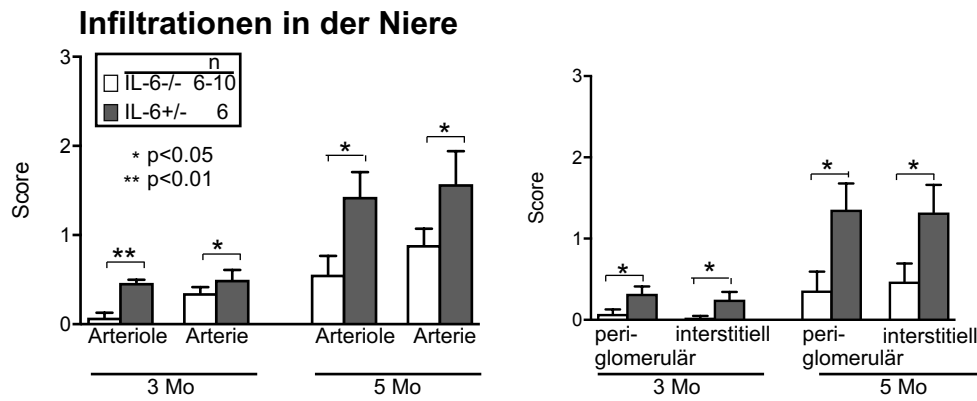


Abbildung 13 Score der perivaskuläre und vaskuläre Infiltrationen in der Niere sowie Score der periglomerulären und interstitiellen Infiltrationen in der Niere. Verglichen sind jeweils *Il6^{-/-}* mit *Il6^{+/-}* MRL-*Fas^{lpr}*-Mäusen der Altersstufen 3 und 5 Monate. Werte sind Mittelwerte ± SEM. Statistische Analyse mit dem Mann-Whitney U Test.

Wie bei den MRL-*Fas^{lpr}*- und MRL-++ Mäusen (vgl. 4.1.2) wurde auch bei den *Il6^{-/-}* MRL-*Fas^{lpr}*-Mäusen und Kontrolltieren die Intima-Media-Dicke bestimmt. Bei der Betrachtung der Intima-Media-Dicke der Aorta zeigte sich eine verringerte mittlere Dicke bei den *Il6^{-/-}* MRL-*Fas^{lpr}*-Mäusen (Abbildung 14).

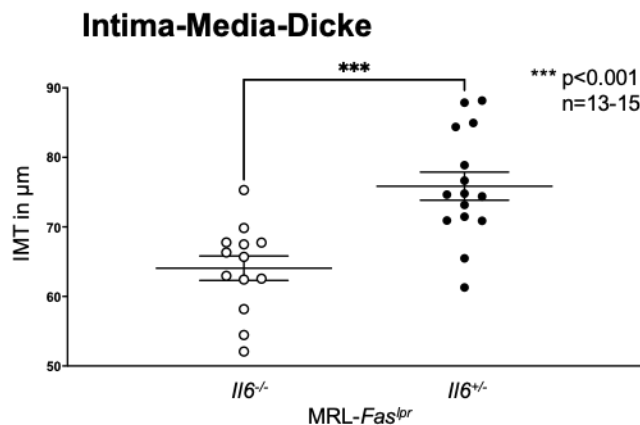


Abbildung 14 Intima-Media-Dicke der suprarenalen Aorta von *Il6^{-/-}* verglichen mit *Il6^{+/-}* MRL-*Fas^{lpr}*-Mäusen der Altersstufe 3 Monate. n= 13-15. Werte sind Mittelwerte ± SEM. Statistische Analyse mit dem Mann-Whitney U Test.

Die beobachtete verringerte perivaskuläre Infiltration der Nieren ließ sich auch für die Aorta auf mikroskopischer Ebene mittels immunhistochemischer Färbung und auf mRNA-Ebene mittels RTQ-PCR bestätigen. Die Expression von CD68 und CD4 war bei 3 Monate alten *Il6^{-/-}* MRL-*Fas^{lpr}*-Mäusen gegenüber *Il6^{+/-}* MRL-*Fas^{lpr}*-Mäusen signifikant vermindert. Das deutet auf eine verringerte Infiltration durch T-Zellen und Makrophagen hin (Abbildung 15A).

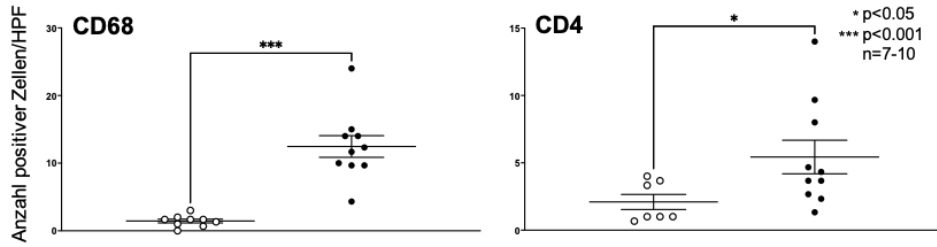
Weiterhin wurde die Zytokinexpression der Aorta und des sie umgebenden Bindegewebes untersucht. Für TNF-α, IL-18 und IL-1β zeigte sich ein signifikanter Rückgang der Expression bei *Il6^{-/-}* MRL-*Fas^{lpr}*-Mäusen. Während sich bei IL-34, IL-18,

Ergebnisse

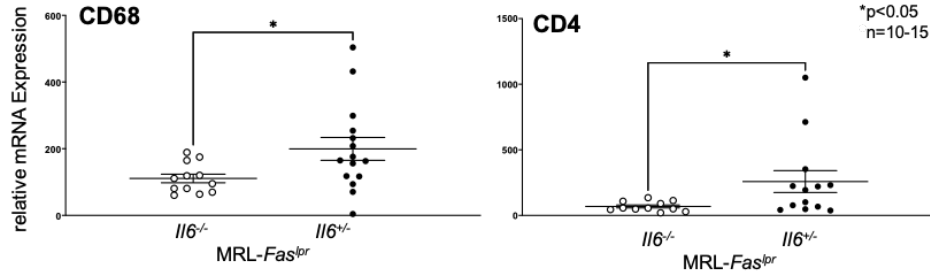
CSF-1 und S100A8 in dieser Untersuchung nicht signifikante Tendenzen zeigten, ließ sich für die Expression von IFN- α kein Unterschied nachweisen (Abbildung 15B).

A. (peri)vaskuläre Infiltration

A.1 Immunhistochemie



A.2 RTQ-PCR



B. (peri)vaskuläre Inflammation

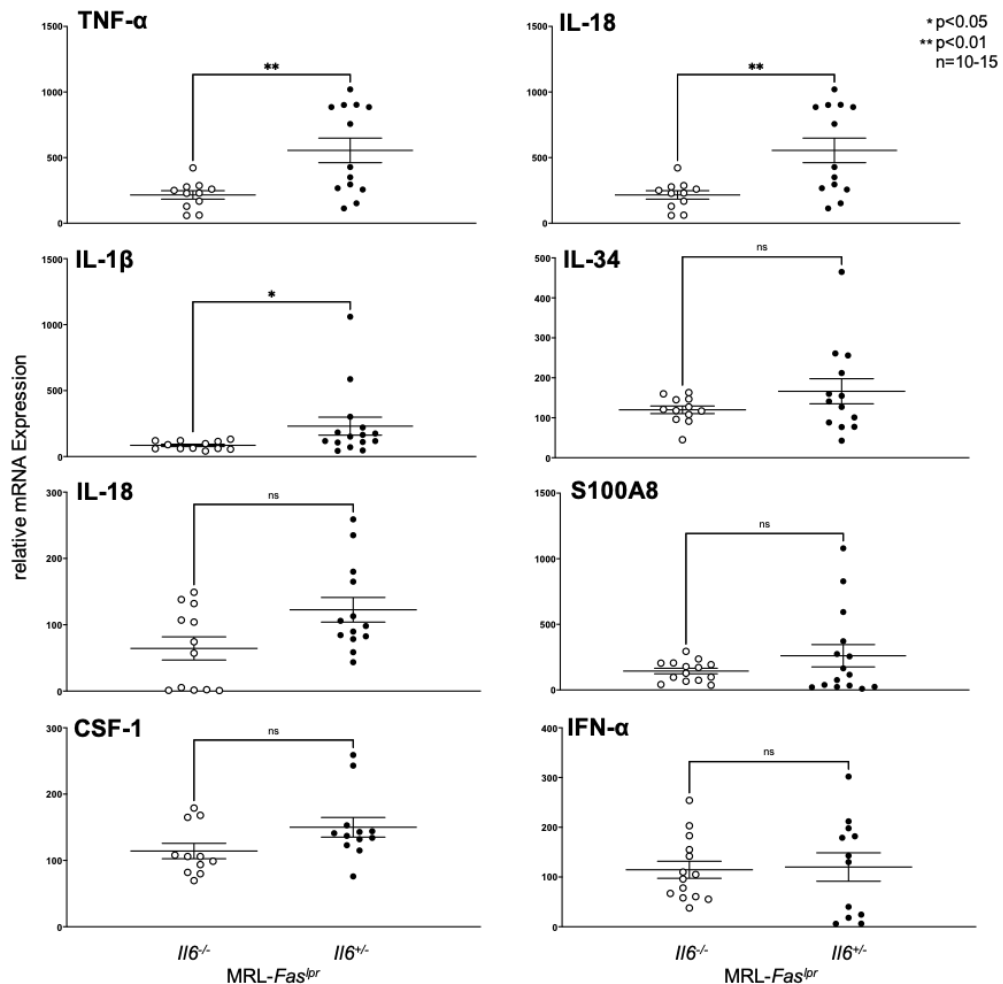


Abbildung 15 (A) Infiltration der suprarenalen Aorta und des perivaskulären Bindegewebes mit CD68⁺-Makrophagen und CD4⁺-T-Zellen bei 3-monatigen *Il6*^{-/-}-MRL-*Fas*^{pr} Mäusen verglichen mit MRL *Il6*^{+/-}-MRL-*Fas*^{pr}-Mäusen. A.1 Erfasst mit Hilfe immunhistochemischer Färbung n=7-10. A.2 Gemessen mit RTQ-PCR. n=10-15. Werte sind Mittelwerte ± SEM. Statistische Analyse mit dem Mann-Whitney U Test. (B) Hochregulation inflammatorischer Zytokine in der suprarenalen Aorta mit ihrem perivaskulären Bindegewebe bei 3-monatigen *Il6*^{-/-}-MRL-*Fas*^{pr} Mäusen verglichen mit *Il6*^{+/-}-MRL-*Fas*^{pr}-Mäusen. Gemessen mit RTQ-PCR. n=10-15. Werte sind Mittelwerte ± SEM. Statistische Analyse mit dem Mann-Whitney U Test.

Ergebnisse

Außerdem wurde untersucht, ob sich das *in vitro* Expressionsverhalten von CCL2, VCAM, ICAM, CXCL10 oder IL-6 durch renale Endothelzellen in Reaktion auf eine Stimulation mit TNF- α , IL-1 β , IFN- β , IFN- γ oder IL-6 zwischen *Il6*^{-/-} MRL-*Fas*^{lpr}-Mäusen und *Il6*^{+/+} MRL-*Fas*^{lpr}-Mäusen unterscheidet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Stimulation von renalen Endothelzellen

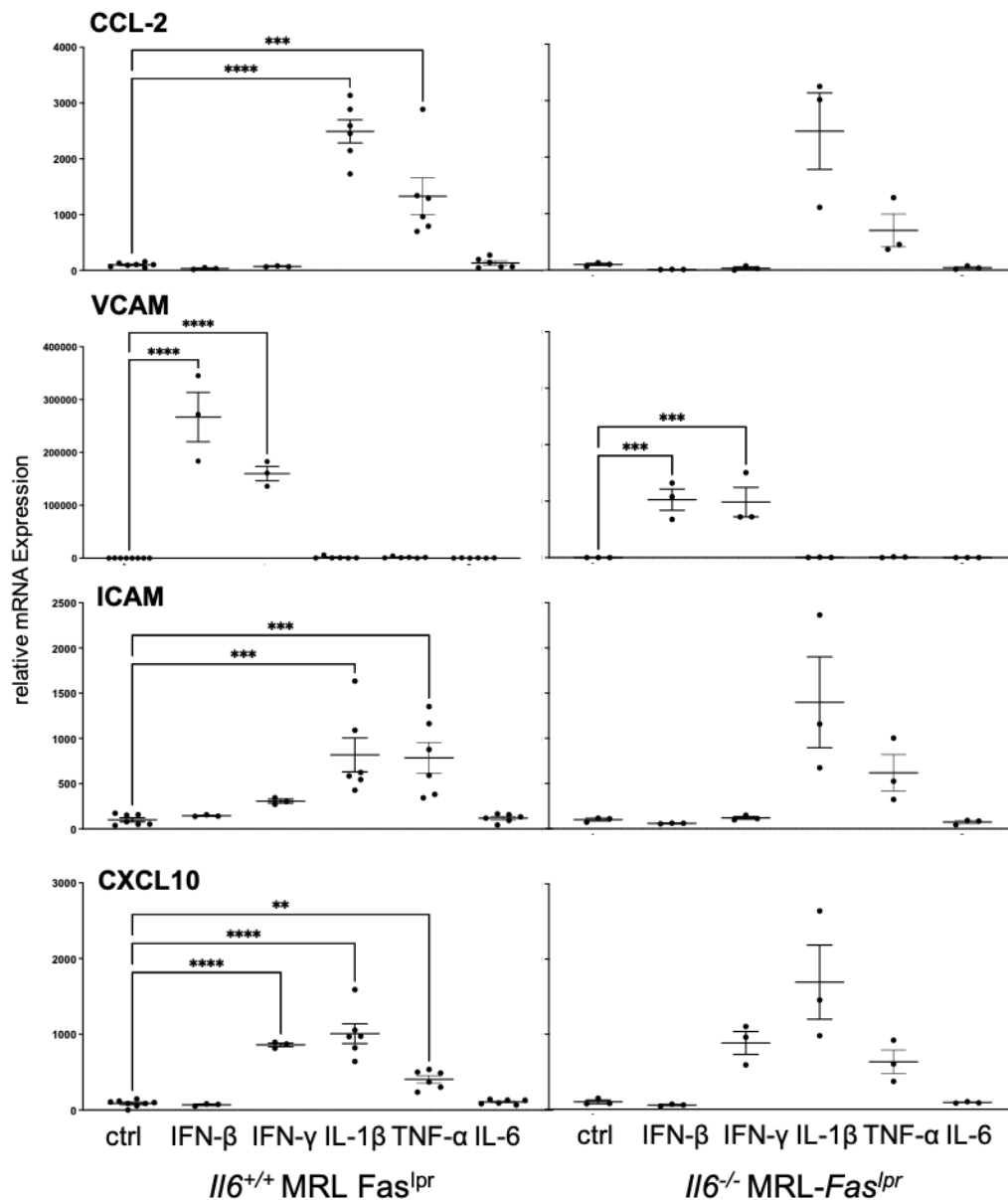


Abbildung 16 Expression von CCL-2, VCAM, ICAM und CXCL10 nach 18h Stimulation renaler Endothelzellen mit IFN- β , IFN- γ , IL-1 β , TNF- α und IL-6 von *Il6*^{-/-}-MRL-*Fas*^{lpr} Mäusen (5 Mo) verglichen mit *Il6*^{+/+}-MRL-*Fas*^{lpr}-Mäusen (5 Mo). n=2. Statistische Analyse mit Ordinary one-way ANOVA.

Der Knockout von IL-6 führt zu einer verringerten perivaskulären Infiltration in der Niere. Außerdem sinkt die perivaskuläre Infiltration von Makrophagen und T-Zellen im Bereich der Aorta. Damit in Einklang steht der Rückgang der Expression von inflammatorischen Zytokinen im aortalen Gewebe.

4.3 IL-6 vermittelt vaskuläre Dysfunktion in MRL-*Fas*^{lpr} Mäusen

Um zu untersuchen, ob die Verringerung der Infiltrationen und der Rückgang der Expression von inflammatorischen Zytokinen auch funktionelle Auswirkungen hat, wurden Endothelfunktionsmessungen durchgeführt. Hierbei wurde die Relaxationsfähigkeit in Abhängigkeit verschiedener Acetylcholin-Konzentrationen bestimmt. Nachdem mit Hilfe von Noradrenalin eine Vasokonstriktion induziert worden war, wurde die Relaxation bei ansteigenden Konzentrationen von Acetylcholin (10^{-10} mol/l bis $10^{-5,5}$ mol/l) gemessen. Es zeigt sich eine deutlich verbesserte Relaxation bei den *Il6*^{-/-} MRL-*Fas*^{lpr}-Mäusen gegenüber den heterozygoten Mäusen (Abbildung 17).

Die Abwesenheit von IL-6 bewirkt somit nicht nur eine geringere Expression von Zytokinen und geringere Infiltration von Immunzellen, sondern verbessert auch signifikant die endotheliale Funktion gemessen an der acetylcholinabhängigen Relaxationsfähigkeit.

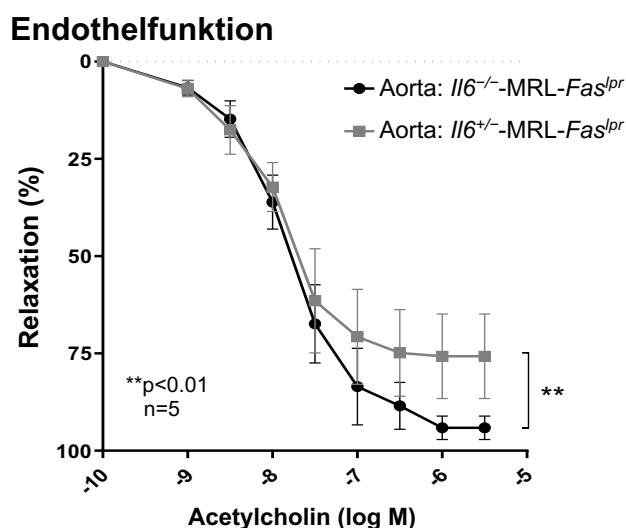


Abbildung 17 Relaxation der suprarenalen Aorta in Abhängigkeit verschiedener Acetylcholin-Konzentrationen von *Il6*^{-/-} MRL-*Fas*^{lpr}-Mäusen verglichen mit *Il6*^{+/-} MRL-*Fas*^{lpr}-Mäusen jeweils im Alter von 3 Monaten. n=5. Werte sind Mittelwerte ± SEM. Statistische Analyse mit two-way ANOVA.

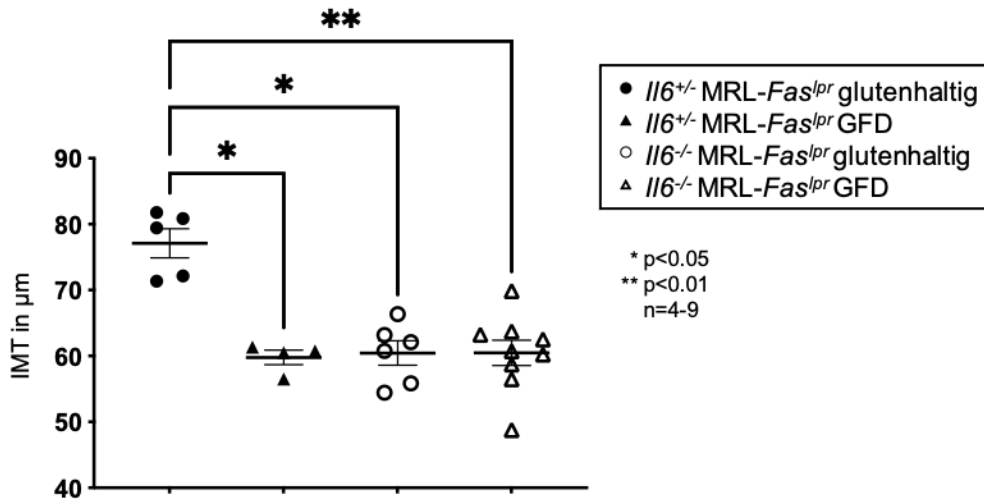
4.4 ATI-freie Ernährung mindert die vaskuläre Beteiligung in MRL-FasIpr Mäusen

Bei Amylase-Trypsin-Inhibitoren handelt es sich um in Weizen vorkommende Proteine, die Zellen des angeborenen Immunsystems über den Toll-like-Rezeptor 4 stimulieren können [172]. Auf diese Weise kann eine ATI-haltige Ernährung die Krankheitsaktivität von Autoimmunerkrankungen verstärken [169]. Unveröffentlichte Daten zeigen, dass eine ATI-freie Ernährung der MRL-Fas^{Ipr} Mäuse die Krankheitslast mindert. IL-6 könnte eine wesentliche Rolle bei der Stimulation der dendritischen Zellen, Makrophagen und Monozyten spielen, weshalb die Wirkung der ATI-freien Ernährung auch im Kontext der Fähigkeit zur IL-6 Expression untersucht wurde.

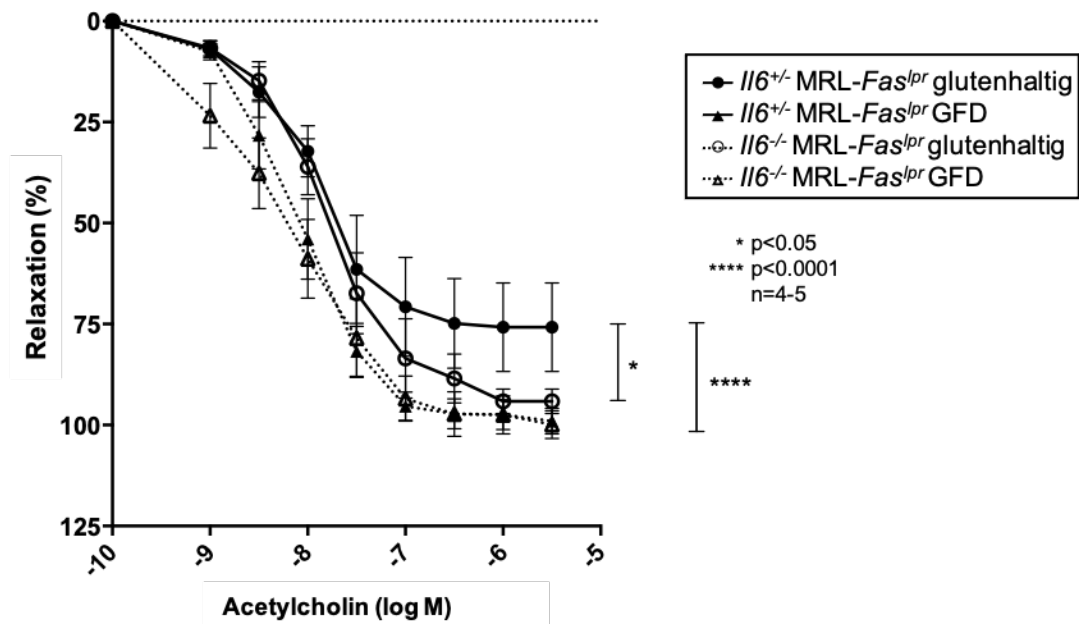
In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss der ATI-freien Ernährung auch auf die vaskuläre Beteiligung untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine ATI-freie Ernährung die Dicke der Intima-Media signifikant, in einem ähnlichen Ausmaß wie eine IL-6 Defizienz reduziert. Interessanterweise unterscheiden sich die glutenhaltig ernährten *Il6*-Knockout Mäuse nicht von den ATI-frei ernährten *Il6*-Wildtyp Mäusen (Abbildung 18A).

Im nächsten Schritt wurde dann der Einfluss auf die Endothelfunktion gemessen. Dafür wurde die Relaxationsfähigkeit in Abhängigkeit verschiedener Acetylcholin-Konzentrationen bestimmt. Es zeigt sich eine deutlich verbesserte Relaxation bei den ATI-frei ernährten Mäusen (Abbildung 18B).

A. Intima-Media-Dicke



B. Endothelfunktion



Gruppe	Mittelwertdifferenz	Konfidenzintervall	Signifikanz	adjust. p-Wert
<i>II6</i> ^{+/-} glutenhaltig vs. <i>II6</i> ^{-/-} glutenhaltig	-7,763	-15,08 bis -0,4409	*	0,0339
<i>II6</i> ^{+/-} glutenhaltig vs. <i>II6</i> ^{+/-} GFD	-16,13	-25,22 bis -7,034	****	<0,0001
<i>II6</i> ^{+/-} glutenhaltig vs. <i>II6</i> ^{-/-} GFD	-19,02	-28,50 bis -9,538	****	<0,0001
<i>II6</i> ^{-/-} glutenhaltig vs. <i>II6</i> ^{+/-} GFD	-8,363	-15,03 bis -1,692	**	0,0085
<i>II6</i> ^{-/-} glutenhaltig vs. <i>II6</i> ^{-/-} GFD	-11,26	-18,63 bis -3,888	***	0,0009
<i>II6</i> ^{+/-} GFD vs. <i>II6</i> ^{-/-} GFD	-2,896	-8,051 bis 2,259	ns	0,4594

Abbildung 18 (A) Die Intima-Media-Dicke der suprarenalen Aorta von dreimonatigen MRL-*Fas*^{lpr} Mäusen der Genotypen *II6*^{+/-} und *II6*^{-/-} jeweils ATI-frei (GFD) und glutenhaltig ernährt. n=4-9. Werte sind Mittelwerte ± SEM. Statistische Analyse mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test. (B) Relaxation der suprarenalen Aorta in Abhängigkeit verschiedener Acetylcholin-Konzentrationen von ATI-frei und glutenhaltig ernährten *II6*^{+/-} und *II6*^{-/-} MRL-*Fas*^{lpr}-Mäusen im Alter von 3 Monaten. n=4-5. Werte sind Mittelwerte ± SEM. Statistische Analyse mit two-way ANOVA.

5 Diskussion

5.1 Eignung des MRL-*Fas*^{lpr} Mausmodells in Bezug auf vaskuläre Fragestellungen

Die Mortalität bei Lupus-Patienten durch direkt mit der Krankheitsaktivität in Verbindung stehende Ursachen, wie beispielsweise die Nierenerkrankung, hat im Laufe der Zeit durch verbesserte Therapie immer weiter abgenommen, während das Risiko an einer Herzkreislauferkrankung zu sterben unverändert hoch geblieben ist [1]. Einer Betrachtung der Todesursachen aus Frankreich zur Folge ist der Tod durch kardiovaskuläre Erkrankungen, wie Herzinfarkt oder Schlaganfall, die häufigste Todesursache unter SLE-Patienten [198]. Diese Tatsachen erfordern die intensive Aufklärung der Pathomechanismen der verfrüht und verstärkt auftretenden Atherosklerose und die Entwicklung neuer Therapien.

Mit einem möglichst realitätsnahen, die Erkrankung umfassend abbildenden Mausmodell können die komplexen Zusammenhänge und Mechanismen in vivo untersucht werden. Durch die Möglichkeit des Knockouts einzelner Gene und des Untersuchens der daraus resultierenden Veränderungen ergeben sich entscheidende Vorteile gegenüber der Forschung am Menschen. Ein umfassend untersuchtes Modell des kardiovaskulären Lupus war bislang fehlend.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die Eignung des MRL-*Fas*^{lpr}-Mausmodells zur Untersuchung kardiovaskulärer Fragestellungen zu prüfen. Dieses Mausmodell ist für die Lupus-Forschung von besonderer Bedeutung, da die Mäuse gegenüber anderen Mausmodellen eine große Bandbreite an Manifestationen zeigen und gleichzeitig durch eine vergleichsweise frühe Manifestation der Erkrankung eine hinreichend effiziente Untersuchung möglich wird (vgl. 2.5).

5.1.1 Vaskuläre und perivaskuläre Infiltrate

In dieser Arbeit konnte bewiesen werden, dass das MRL-*Fas*^{lpr}-Mausmodell eindeutig eine Gefäßbeteiligung in Form von infiltrierenden Makrophagen und T-Zellen zeigt. Dies geht mit einer erhöhten Intima-Media-Dicke, der Expression proinflammatorischer Entzündungsmediatoren und mit subendothelialen IgG-Ablagerungen einher. Weiterhin wurden Zeichen früher, atherosklerotischer Veränderungen nachgewiesen.

Bisherige Untersuchungen der vaskulären Beteiligung in Lupusmausmodellen zeigten neben einem erhöhten arteriellen Blutdruck und verminderter Funktion von EPCs eine verminderte endothelabhängige Relaxation in NZB/W F1 Mäusen [189, 199]. Auch für das MRL-*Fas^{lpr}*-Modell konnte eine verminderte endothelabhängige Relaxation gezeigt werden [195].

Die Ergebnisse dieser Arbeit ergaben, dass eine eingeschränkte Endothelfunktion der Aorta von einer perivaskulären und vaskulären Leukozyteninfiltration begleitet wird. Bisher wurden nur eosinophile und PAS-positive Ablagerungen in Koronarwänden von NZB/W F1, MRL-*Fas^{lpr}* und BXSB Mäusen beschrieben, die mit keiner relevanten perivaskulären Infiltration einher gingen [186]. Im Gegensatz zu diesen frühen Untersuchungen, zeigt sich in dieser Arbeit für MRL-*Fas^{lpr}*-Mäuse sowohl immunhistochemisch als auch in der RTQ-PCR eine klare entzündliche vaskuläre und perivaskuläre Infiltration mit T-Zellen und Makrophagen.

Beim kutanen Lupus erythematodes kommt es beim Menschen zu perivaskulären Infiltrationen mit Leukozyten [200]. Es bestehen Hinweise, dass es auch im humanen SLE zu einer solchen periaortalen Infiltration kommt. Radiologisch kann bestimmt werden, dass die Menge des perivaskulären, die Aorta umgebenden Fettgewebes mit SLE und Atherosklerose assoziiert ist [201]. In einer aufbauenden Studie wurde zusätzlich gezeigt, dass dieses Gewebe eine erhöhte Dichte aufweist, was auf Inflammation hindeuten kann [202]. Somit besteht der Verdacht, dass auch SLE-Patienten Infiltrate und inflammatorische Veränderungen in dem perivaskulären Gewebe aufweisen. Das liefert Hinweise auf die Eignung der MRL-*Fas^{lpr}*-Mäuse als Modell der humanen vaskulären Manifestation.

Die nachgewiesenen subendothelialen Ablagerungen von IgG in der Aorta stehen im Einklang mit den bereits beschriebenen IgG- und C3-Ablagerungen in den Koronargefäßen von MRL-*Fas^{lpr}* Mäusen [186]. Das spricht für eine Ablagerung von Immunkomplexen, die auch für die Atherogenese beim humanen SLE eine Bedeutung haben könnten. In der Niere treten subendotheliale Immunkomplexablagerung verbreitet auf und dienen als Kriterium der Lupusnephritis Klasse 3 und 4 [203].

5.1.2 Beginnende atherosklerotische Veränderungen

Neben der Infiltration mit Entzündungszellen, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MRL-*Fas^{lpr}*-Mäuse eine mit dem Alter und der Krankheitsaktivität steigende,

erhöhte Intima-Media-Dicke aufweisen. Die Intima-Media-Dicke ist sowohl in der kardiovaskulären Forschung als auch in der kardiovaskulären Manifestation des SLE von Bedeutung. So dient die Intima-Media-Dicke in klinischen Studien als Surrogatmarker für das kardiovaskuläre Risiko [204, 205] und als früher Marker sich entwickelnder Atherosklerose [206]. Auch bei SLE-Patienten, die an zahlreichen Stellen, unter anderen an der Aorta, erhöhte Intima-Media-Dicken aufweisen, ist die Intima-Media-Dicke der Karotis prädiktiv für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse [119, 207]. Eine erhöhte Karotis-Intima-Media-Dicke und der Nachweis von Plaque ist ein von traditionellen Risikofaktoren und der Medikation unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse [119].

Sowohl die perivaskuläre Infiltration als auch IgG-Ablagerungen und die Intima-Media-Dicke bilden somit die humane vaskuläre Manifestation ab und sind einfach zu erfassende Parameter im Mausmodell, um Erfolge therapeutischer und präventiver Maßnahmen zu evaluieren.

Mit der Abnahme elastischer Fasern, der Zunahme und Auflockerung der Adventitia, der Präsenz von Schaumzellen sowie der Zunahme der Intima-Media-Dicke zeigen sich zwar frühe atherosklerotische Veränderungen, jedoch entwickelt sich kein Vollbild eines lipidhaltigen Atheroms. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Mäuse einen sehr effizienten, atheroprotektiven Lipoproteinstoffwechsel aufweisen, der ohne eine Mutation, die ein proatherogenes Lipidprofil schafft, das Entstehen des Vollbilds einer Atherosklerose verhindert [208]. Eine Möglichkeit die Atherosklerose zu verstärken wäre die Kreuzung von Lupus- und Atherosklerose-Mausmodellen wie der Kreuzung von *Nba2.Yaa* Mäusen mit *Apoe^{-/-}*-Mäusen [209]. Von besonderem Interesse ist allerdings die Initiation der atherosklerotischen Prozesse, die die *MRL-Fas^{lpr}* Mäuse hinreichend abbilden.

5.1.3 Expression verschiedener Inflammationsmediatoren

Des Weiteren wurde die Expression von inflammatorischen Zytokinen in der Niere und der Aorta mit dem sie umgebenden Bindegewebe untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die mit zunehmender Krankheitsaktivität ansteigende Infiltration mit Leukozyten, von einer verstärkten Zytokinexpression im aortalen Gewebe begleitet wird. Das zur Niere ähnliche Expressionsverhalten der Zytokine im Bereich der Aorta spricht für ähnliche pathogenetische Mechanismen. Auf die verschiedenen Zytokine

soll nun eingegangen werden. Dabei soll insbesondere erörtert werden, inwiefern diese im Lupusmausmodell und im humanen SLE von Bedeutung sind und welche Bedeutung sie für die murine und humane Atherogenese haben könnten.

Am deutlichsten zeigt sich die Expression von TNF- α und IL-6 im Vergleich zu den Kontrollen sowie mit zunehmender Krankheitsaktivität erhöht:

TNF- α wird sowohl in der Niere als auch der Aorta verstärkt in den MRL-*Fas*^{lpr}-Mäusen exprimiert. TNF- α hat in dem MRL-*Fas*^{lpr}-Mausmodell und im humanen Lupus eine große Bedeutung. Bei MRL-*Fas*^{lpr}-Mäusen kommt TNF- α sowohl im Serum als auch in der Niere mit fortschreitendem Alter vermehrt vor [142]. Auch im humanen SLE korreliert TNF- α mit der Krankheitsaktivität und ist insbesondere mit der Lupusnephritis assoziiert [139]. Die gewonnenen Erkenntnisse fügen sich gut in den Kontext der Literatur ein und zeigen enge Parallelen zum humanen SLE, was die Eignung des Mausmodells unterstützt. Im Folgenden soll erörtert werden, ob eine TNF- α adressierende Therapie ein Ansatz für eine Therapie insbesondere der kardiovaskulären Manifestation darstellt. Während eine anti-TNF- α -Therapie bei MRL-*Fas*^{lpr}-Mäusen in Lunge und Gelenken wirksam ist, scheint sie keine Auswirkung auf die renale Manifestation zu haben [210-212]. Im Gegensatz dazu ist die Therapie beim Menschen neben Arthritis und Hautmanifestation auch bei der Nephritis wirksam [143]. Die Auswirkung einer solchen Therapie auf die vaskuläre Inflammation, ist bisher nicht umfassend untersucht, jedoch scheint TNF- α die Hochregulation von endothelialen Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 im Lupusmausmodell zu bewirken [213]. Ein Beitrag zur vaskulären Inflammation durch TNF- α ist somit zu erwarten und könnte eine Mitursache der beobachteten leukozytären Infiltration sein. Beim Menschen reicht der Effekt von Arzneistoffen, die gegen TNF- α bei anderen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt werden, von keiner signifikanten Veränderung [214], über eine Verminderung des Fortschreitens des Anstiegs der Intima-Media-Dicke der Karotis [215] bis hin zu einer Verbesserung der Endothelfunktion [216]. TNF- α -Blocker könnten also durchaus positive Effekte in Bezug auf das kardiovaskuläre Risiko erzielen, werden jedoch nicht verbreitet zur Therapie des SLE eingesetzt, unter anderem, da sie zur Induktion von Autoantikörpern und des Lupus-like-Syndroms bei Patienten mit rheumatoider Arthritis führen können [217].

IL-6, das ähnlich wie TNF- α eine verstärkte Expression gegenüber Kontrollen sowie im Krankheitsverlauf zeigte, wurde für weitergehende Untersuchungen ausgewählt und wird unter 5.2 separat diskutiert.

Sowohl für die Wachstumsfaktoren **CSF-1** als auch **IL-34** zeigt sich eine verstärkte Expression in Aorta und periaortalen Bindegewebe der MRL-*Fas^{lpr}* Mäuse. Eine verstärkte Expression von CSF-1 und IL-34 bei MRL-*Fas^{lpr}*-Mäusen in der Niere bzw. renaler Zellen wurde bereits beschrieben [165, 218]. Wenngleich nicht für alle Altersstufen signifikant, zeigt sich das auch in diesen Untersuchungen in der RTQ-PCR des Nierengewebes, mehr für CSF-1 als für IL-34. Ein ähnliches aortales Expressionsverhalten passt zu der Bedeutung der Makrophagen nicht nur für die Lupusnephritis, sondern auch für die Atherogenese. Zudem wurde auch immunhistochemisch eine verstärkte Infiltration mit Makrophagen gezeigt, was Folge und Ursache der Expression von CSF-1 und IL-34 sein könnte. Hieraus ergibt sich auch ein möglicher therapeutischer Ansatz: Tyrosinkinasen vermitteln in zellulären Signalwegen Zellüberlebens- und Differenzierungssignale, weshalb Mutationen dieser zur Tumorentstehung führen können [219]. In der Tumorthherapie sind daher Tyrosinkinase-Inhibitoren als Behandlung etabliert [219]. Eine Blockade des Rezeptors von CSF-1 und IL-34, einer Tyrosinkinase, wäre somit eine therapeutische Option, würde jedoch mit zahlreichen Nebenwirkungen einher gehen. Eine selektivere Blockade, beispielsweise des PTPRZ – eines weiteren IL-34 Rezeptors, könnte bei geringeren Nebenwirkungen eine durch IL-34 verstärkte Atherogenese mildern. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Knockout von IL-34 bei MRL *Fas^{lpr}* Tieren die Lupusnephritis mildert und PTPRZ von Makrophagen, B- und T-Zellen exprimiert wird [165]. Die Untersuchung der vaskulären Beteiligung von IL-34 defizienten MRL *Fas^{lpr}* Mäusen könnte Hinweise auf eine durch IL-34 verstärkte Transformation von Makrophagen zu Schaumzellen liefern. Sollten sich die Hinweise erhärten, könnten Patienten bei einer selektiven Blockade des PTPRZ zusätzlich zur Milderung der renalen Manifestation von einer Reduktion des kardiovaskulären Risikos profitieren.

S100A8, das bei Lupus-Patienten im Serum erhöht ist [157] und eine Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielt [158, 159], zeigt in diesen Untersuchungen sowohl im Nierengewebe als auch dem Gewebe der Aorta eine erhöhte Expression und könnte auch eine Bedeutung für die Pathogenese der lupusbedingten Atherosklerose haben. Im MRL-*Fas^{lpr}*-Mausmodell wurde die Expression von S100A8 nach bestem Wissen noch nicht untersucht.

IL-1 β und **IL-18** sind im humanen SLE von Bedeutung [151, 152] und im MRL-*Fas*^{lpr}-Mausmodell wurde bereits für beide eine erhöhte renale Expression beschrieben [150, 220]. Diese Beobachtung lässt sich durch diese Untersuchungen bestätigen. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit ein ähnliches Expressionsmuster in dem vaskulären und perivaskulären Gewebe der Aorta festgestellt. Da beide Zytokine auch eine Bedeutung für die Atherosklerose haben [62, 155], könnten sie als mögliche therapeutische Targets für diese Manifestation dienen.

IFN- α zeigte sich hier sowohl in dem Gewebe der Aorta als auch der Niere bei den MRL-*Fas*^{lpr}-Mäusen erhöht, signifikant im höheren Alter. Während die krankheitsfördernde Rolle von IFN- α im humanen Lupus nicht sehr umstritten ist [221], wird IFN- α im MRL-*Fas*^{lpr}-Mausmodell kontrovers diskutiert. Zum einen wurde gezeigt, dass das Fehlen des Rezeptors für Typ I Interferone zu einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufs führt, was auf eine schützende Funktion von Typ I-Interferonen hindeutet [222]. Andere Untersuchungen kommen zum gegenteiligen Ergebnis und zeigen bei Knockout des Rezeptors für Typ-I Interferone eine geringere Ausprägung von Nephritis und Proteinurie [223]. Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen ebenfalls eine mildere Erkrankung bei Knockout des IFN- α -Rezeptors. Der Serumlevel von IFN- α ist bei MRL-*Fas*^{lpr}-Mäusen erhöht [224]. Zusätzlich konnte im MRL-*Fas*^{lpr}-Mausmodell gezeigt werden, dass die Therapie mit Tofacitinib, welches unter anderem die IFN- α Produktion senkt und JAK1/STAT1-vermitteltes Typ I-Interferon-Signaling hemmt [225], die Gefäßfunktion verbessert [69]. Hinsichtlich dieser Ergebnisse passt die beobachtete, erhöhte Expression von IFN- α in den hier untersuchten Geweben gut in das Bild der Literatur. Bei SLE-Patienten findet sich zum einen eine unabhängige Assoziation von Typ-I Interferonen und Atherosklerose-Entwicklung und zum anderen ist eine hohe Typ-I Interferon-Aktivität mit einer verschlechterten Endothelfunktion verbunden [111].

Zur Messung der Expression der erwähnten Zytokine wurde die Methode der RTQ-PCR gewählt. Bei einigen Messungen wie der Expression von TNF- α oder auch IL-34 ist die Streuung insbesondere in der Gruppe der MRL-*Fas*^{lpr}-Mäuse groß. Einerseits kann dies auf eine interindividuell variable Ausprägung der Erkrankung hindeuten, andererseits könnte es auch vom individuellen Zeitpunkt der Untersuchung abhängen, wenn man annimmt, dass die Erkrankung auch in dem Modell schubweise verläuft. Methodisch ist anzumerken, dass eine unterschiedliche Zusammensetzung des Gewebes durch beispielsweise unterschiedliche Mengen an der Aorta anhaftenden

perivaskulären Gewebes im Einzelfall Einfluss auf die Menge der gemessenen Expression haben kann.

Zusammengefasst werden im perivaskulären und vaskulären Gewebe einige proinflammatorische Zytokine vermehrt exprimiert, die auch für die Entwicklung der Atherosklerose von Bedeutung sein und mögliche therapeutische Targets darstellen könnten. Die veränderte Zytokinexpression kann sowohl zur Inflammation und der Leukozyteninfiltration beitragen als auch Folge dieser sein. In jedem Fall zeigt sie eine vaskuläre Inflammation mit Ähnlichkeit zum humanen SLE und zu atherosklerotischen Entwicklungen, was die Eignung des Mausmodells zur Untersuchung der lupusspezifischen Atherosklerose untermauert.

5.1.4 Stimulation von Endothelzellen

Bei der *in vitro* Stimulation von Endothelzellen der Aorta mit Entzündungsmediatoren zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen MRL-*Fas*^{lpr} Tieren und Kontrollen in Bezug auf die Fähigkeit der Endothelzellen zur Expression von CCL-2, CXCL10, VCAM, ICAM und IL-6.

IL1- β und TNF- α sorgen für eine erhöhte Expression von VCAM und ICAM an aus MRL-*Fas*^{lpr} isolierten Endothelzellen der Aorta, während IFN- γ nur ICAM induziert. Diese Ergebnisse bestätigen Erkenntnisse, die bereits an HUVECs gewonnen wurden [226]. In dem verwendeten Mausmodell konnte *in vivo* eine verstärkte Expression von VCAM und ICAM mittels radioaktiver Antikörper gemessen werden, die sich mit Hilfe von Antiserum gegen TNF- α und IL1- β reduzieren lässt [213]. Sowohl VCAM als auch ICAM werden in der Atherogenese bereits früh verstärkt exprimiert und tragen zur Leukozytenmigration bei [227]. Somit könnte eine verstärkte Expression von IL1- β und TNF- α zur verfrühten und verstärkten Atherogenese im Kontext des SLE beitragen.

Chemokine wie CCL-2 und CXCL10 fördern Atherosklerose durch Einflüsse auf die Monozyten- und T-Zellrekrutierung [228, 229]. Sie lassen sich in den isolierten murinen Endothelzellen der Aorta durch IL-1 β und TNF- α bzw. IFN- β induzieren. Die Induktion von CCL-2 durch IL-1 β und TNF- α in Endothelzellen ist bekannt [230]. Auch sind sowohl IFN- β als auch IFN- γ als potente Induktoren von CXCL10 beschrieben [231]. Somit reproduzieren die Ergebnisse diese an HUVECs gewonnenen Erkenntnisse und zeigen, dass diese Mechanismen auch an den aus der Aorta gewonnenen Endothelzellen in dem verwendeten Mausmodell ihre Gültigkeit haben. Auch in dieser

Arbeit zeigt sich eine Induktion von CXCL10 durch IFN- γ , wenngleich diese sehr viel schwächer als die durch IFN- β ausfällt.

Erhoffte Unterschiede im Expressionsverhalten der untersuchten Chemokine und Rezeptoren in Reaktion auf die Stimulation durch Zytokine zwischen MRL-*Fas*^{pr} Tieren und Kontrollen, die beispielsweise auf epigenetische Veränderungen schließen ließen, lassen sich nicht sicher feststellen. Da sich auch keine Unterschiede zwischen MRL-*Fas*^{pr} Mäusen und Kontrollen der nicht stimulierten Zellen finden lassen, ist davon auszugehen, dass unterschiedliche Mengen an exprimierten Rezeptoren und Chemokinen nicht langfristig über mehrere Zellpassagen in vitro überdauern. Es konnte jedoch ein Protokoll etabliert werden, um Endothelzellen sowohl aus der Niere als auch der Aorta zu isolieren und kultivieren. Somit stehen für aufbauende Versuche Endothelzellen dieses Mausmodells zur Verfügung, um beispielsweise komplexere Abläufe in Ko-Kultur mit verschiedenen Leukozyten zu untersuchen. Über vaskuläre Fragestellungen hinaus ist dies auch für die weitere Aufklärung der Pathogenese der Lupusnephritis von Bedeutung.

5.1.5 Fazit

In Bezug auf die Frage inwiefern sich das MRL-*Fas*^{pr} Mausmodell zur Beurteilung von kardiovaskulären Fragestellungen im Kontext des SLE eignet, lässt sich abschließend festhalten, dass das MRL-*Fas*^{pr} Mausmodell hervorragend geeignet ist. Es bildet nicht nur eine große Bandbreite der Lupusmanifestationen ab und zeigt eine frühe Krankheitsmanifestation, sondern bietet in einem gut etablierten Modell auch ein in vielen Punkten mit dem humanen SLE vergleichbares vaskuläres Krankheitsbild. Zahlreiche Indikatoren stehen zur Evaluation von Effekten auf diese Manifestation zur Verfügung.

5.2 Rolle von IL-6 bei der vaskulären Inflammation

IL-6 spielt eine wichtige Rolle in Autoimmunität und Autoinflammation. Beim humanen SLE ist der IL-6 Serumspiegel gegenüber gesunden Kontrollpersonen erhöht und korreliert zusätzlich mit der Krankheitsaktivität [11]. Obwohl größere Studien bislang noch fehlen, ist eine Therapie mit Tocilizumab, einem Antikörper gegen den IL-6-Rezeptor, insbesondere bei extrarenalen Manifestationen wirksam und senkt neben

der Krankheitsaktivität auch serologische Aktivitätsmarker [133]. Die Therapie mit einem monoklonalen Antikörper gegen IL-6 selbst verpasste kürzlich ihren primären Endpunkt, zeigte jedoch ebenfalls Effekte in Post-Hoc-Analysen [134]. Es gibt also anfängliche Evidenz für die Wirksamkeit einer IL-6-adressierenden Therapie.

Auch im Mausmodell konnten Effekte bei verminderter IL-6 Expression beobachtet werden. So bewirkt der Knockout von IL-6 bei MRL-*Fas^{lpr}* Mäusen eine Verlängerung der Überlebenszeit und einen abgemilderten Krankheitsverlauf [12]. Die renale Infiltration mit Makrophagen und Lymphozyten sowie die renale Ablagerung von IgG und C3 ist vermindert [12]. Die Ergebnisse dieser Arbeit fügen sich gut in dieses Bild ein: Gegenüber den Kontrollen kommt es zu einer geringeren perivaskulären, periglomerulären und interstitiellen Infiltration der Niere. Neben der abgemilderten renalen Infiltration, die mit einer geringeren VCAM-1 Expression einhergeht [12], zeigen vorliegende Untersuchungen auch eine abgemilderte Infiltration im perivaskulären und vaskulären Gewebe der suprarenalen Aorta.

Mögliche Mechanismen hierfür könnte ebenfalls eine geringere Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie VCAM oder ICAM sein. Ferner gibt es Hinweise, dass IL-6 die Leukozytenmigration fördert und die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen begünstigt [232, 233]. Die verringerte Krankheitsaktivität und geringere vaskuläre Inflammation bei *Il6^{-/-}* MRL-*Fas^{lpr}*-Mäusen bestätigt sich auch in der verringerten Intima-Media-Dicke.

Passend zu der verminderten Leukozyteninfiltration sind zahlreiche proinflammatorische Zytokine im perivaskulären und vaskulären Gewebe der Aorta bei IL-6 defizienten Mäusen vermindert. Signifikant ist dieser Unterschied für die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-18 und IL-1 β , welche alle in die Atherogenese involviert sind und neben IL-6 auch potentielle therapeutische Targets darstellen [234]. Zu beachten ist, dass sich die unterschiedlichen Mediatoren auch gegenseitig beeinflussen: *Il6^{-/-}* MRL-*Fas^{lpr}*-Mäuse exprimieren beispielsweise vermehrt das antiinflammatorische IL-10 [12], welches unter anderem die IL-1 und TNF- α Expression mindern kann [235].

IL-6 ist auch selbst in die Atherogenese involviert [10]. Im Mausversuch nimmt nach IL-6 Injektion die Größe atherosklerotischer Läsionen zu [236]. Aber auch bei der humanen Atherogenese ist IL-6 von Bedeutung: Bei der bereits vorgestellten CANTOS-Studie ließen sich kardiovaskuläre Ereignisse und kardiovaskulär bedingte

Todesfälle nur bei den Patienten signifikant reduzieren, die in Folge der Canakinumab-Therapie einen verminderten IL-6-Spiegel aufwiesen [135]. In einer Meta-Analyse wurde gezeigt, dass eine Mutation im IL-6-Rezeptor, die die Signaltransduktion beeinflusst und Inflammation mindert, das Risiko für koronare Herzkrankheit senkt [237]. Das alles spricht für eine Beteiligung von IL-6 an der inflammatorischen Komponente der Atherogenese. Auch bei SLE-Patienten im Speziellen konnte eine Assoziation zwischen dem Serumspiegel von IL-6 und Atherosklerose nachgewiesen werden [103].

Um zu untersuchen, ob sich die beobachtete verminderte perivaskuläre und vaskuläre Infiltration und die geringere Intima-Media-Dicke bei *Il6^{-/-}* MRL-*Fas^{lpr}*-Mäusen auch funktionell auf das Endothel auswirkt, wurde die Endothelfunktion vergleichend zu *Il6^{+/-}* MRL-*Fas^{lpr}*-Mäusen bestimmt. Die Acetylcholin-abhängige Vasorelaxation dient dabei als Maß für die Endothelfunktion und wird durch Atherosklerose beeinträchtigt. Das wurde erstmals bei Hasen beschrieben, deren Acetylcholin-abhängige Vasorelaxation infolge einer durch cholesterolhaltige Diät induzierten Atherosklerose gemindert wurde [238]. Auch beim Menschen ist sowohl bei früher als auch später koronarer Atherosklerose eine veränderte Reaktion koronarer Gefäße auf Acetylcholin beschrieben [239]. Diese Vasorelaxation ist endothelabhängig und geht bei vorheriger Entfernung der Endothelzellen verloren [240]. Sie beruht unter anderem auf der Freisetzung von Stickstoffmonoxid [241]. Es wurde bereits gezeigt, dass MRL-++ Tiere eine gegenüber MRL-*Fas^{lpr}*-Mäusen verbesserte Acetylcholin-induzierte Vasorelaxation zeigen [78]. Somit eignet sich die Erfassung der Endothelfunktion zur Evaluierung von Endothelschäden und früher atherosklerotischer Veränderungen im MRL-*Fas^{lpr}* Mausmodell gut und eine Untersuchung der Auswirkung des Knockouts erscheint sinnvoll. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Endothelfunktion bei IL-6 Defizienz signifikant verbessert. Das steht in Einklang mit dem milderen Befall der *Il6^{-/-}* MRL-*Fas^{lpr}*-Mäuse. IL-6 leistet somit mindestens in dem verwendeten Lupusmausmodell einen wesentlichen Beitrag zur Endotheldysfunktion. Eine solche kann mit gestörter Vasorelaxation, verstärkter Plättchenaggregation, sowie verstärkter Proliferation glatter Muskelzellen und Atherosklerose einhergehen und somit zu kardiovaskulären Ereignissen beitragen [242].

Obwohl die Elimination von IL-6 allein ausreichend ist, um die vaskuläre Manifestation im MRL-*Fas^{lpr}* Mausmodell gemessen an verschiedenen Größen signifikant abzumildern, ist davon auszugehen, dass weitere Zytokine beteiligt sind. So wurde

beispielsweise für das bei *Il6^{-/-}* MRL-*Fas^{lpr}*-Mäusen im perivaskulären Gewebe vermindert exprimierte IL-18 beschrieben, dass die Blockade des IL-18-Rezeptors, bei MRL-*Fas^{lpr}*-Mäusen zu einem milderen Krankheitsverlauf und verlängerten Überleben führt [243]. Auch IL-10, das in den *Il6^{-/-}* MRL-*Fas^{lpr}*-Mäusen vermehrt exprimiert wird [12], könnte einen Einfluss haben. Welche Effekte auf die vaskuläre Manifestation durch IL-6 selbst oder im Wechselspiel mit anderen Zytokinen vermittelt werden, bedarf weiterer Untersuchungen.

Bei dem Vergleich der Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM und ICAM sowie der Chemokine CCL-2 und CXCL10 isolierter, renaler Endothelzellen in Reaktion auf Stimulation mit unterschiedlichen Zytokinen zeigt sich, bei allerdings geringer Versuchstierzahl, kein signifikanter Unterschied zwischen *Il6^{-/-}* MRL-*Fas^{lpr}*-Mäusen und Kontrollen. Somit ergibt sich ein äquivalentes Bild zu dem Vergleich von MRL-*Fas^{lpr}*- mit MRL-+++Mäusen (vgl. 5.1). Entweder wirkt sich die Abwesenheit von IL-6 nicht auf Endothelzellebene in Bezug auf die untersuchte Expression von Zielstrukturen aus oder aber etwaige Veränderungen überdauern nicht mehrere kulturelle Passagen. Auch könnten die gegenseitige Beeinflussung verschiedener Zellen notwendig sein. Allerdings zeigt diese Untersuchung, dass renale Endothelzellen sich vergleichbar zu denen aus der Aorta verhalten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass IL-6 im Mausmodell einen wesentlichen Einfluss auf die Endothelfunktion und die vaskuläre Inflammation hat. Die Abwesenheit von IL-6 bewirkt gemessen an der perivaskulären Infiltration, der perivaskulären Expression von Entzündungsmediatoren, der Intima-Media-Dicke und der Endothelfunktion, eine mildere vaskuläre Manifestation.

Welche molekularen Mechanismen dabei genau für die Veränderungen verantwortlich sind, müssen weitere Untersuchungen in diesem Mausmodell klären. Parallel könnte bei SLE-Patienten weiter untersucht werden, ob sie von der pharmakologischen Adressierung von IL-6, oder aber auch dessen unterschiedlicher Rezeptoren profitieren und sich so das kardiovaskuläre Risiko der Patienten senken lässt.

Interessant wäre auch die differenzierte Betrachtung einzelner Patientengruppen: So eignet sich eine etwaige Therapie vielleicht insbesondere für die SLE-Patienten, die Biomarker (vgl. 2.2.3) für die vorzeitige und verstärkte lupusbedingte Atherosklerose aufweisen. Ebenso kann untersucht werden, ob Patienten mit weiteren

kardiovaskulären Risikofaktoren, von einer IL-6 adressierenden Therapie im Besonderen profitieren.

5.3 Rolle von ATI-freier Ernährung bei der vaskulären Inflammation

ATI-frei ernährte *Il6^{+/-}* MRL-*Fas^{pr}*-Mäuse zeigen eine geringere vaskuläre Manifestation gegenüber ATI-haltig ernährten Geschwistertieren. Das wird einerseits durch eine geringere Intima-Media-Dicke und andererseits funktionell anhand einer verbesserten Endothelfunktion deutlich.

Diese Ergebnisse fügen sich gut in das Bild der bislang unveröffentlichten Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe einer geringeren Krankheitsaktivität durch ATI-freie Diät in diesem Mausmodell ein und zeigen, dass sich die Effekte auch auf die vaskuläre Manifestation auswirken.

Darüber hinaus unterstützen auch diese Beobachtungen die Theorie einer ATI-vermittelten Verstärkung autoimmuner Krankheiten: ATIs führen via TLR 4 zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Die so aktivierten dendritischen Zellen, Makrophagen und Monozyten wandern aus der Darmwand in mesenteriale Lymphknoten, in denen sie auf zirkulierende krankheitsverursachende T-Zellen der Grunderkrankung treffen und deren Aktivität verstärken, sodass es zu einer Aktivitätszunahme auch einer bestehenden Autoimmunerkrankung kommt [169].

In Bezug auf die vaskuläre Inflammation gibt es Hinweise darauf, dass auch T-Zellen Atherosklerose begünstigen [99]. Neben einer Abmilderung der Krankheitsaktivität beim SLE zeigt sich auch eine durch ATI-freie Diät abgemilderte murine allergische Atemwegsinflammation sowie abgemilderte Verläufe von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Autoimmunenzephalitiden [169, 244]. Zudem wird eine abgemilderte murine Alzheimer Entwicklung beobachtet, welche zumindest partiell ebenfalls inflammatorisch vermittelt ist [245].

ATIs sind somit ein wichtiger ernährungsbedingter Kostimulus für die Inflammation in Autoimmunerkrankungen wie dem SLE.

Interessanterweise entspricht sowohl die Verringerung der Intima-Media-Dicke als auch die Verbesserung der Endothelfunktion in ihrem Ausmaß der durch IL-6-Defizienz abgemilderten vaskulären Manifestation. Eine zusätzliche ATI-freie Diät bei *Il6^{-/-}* MRL-*Fas^{pr}*-Mäusen hat keinen zusätzlichen Effekt. Das lässt spekulieren, ob die

Wirkung einer ATI bedingten Verstärkung des SLE, zumindest teilweise, durch IL-6 vermittelt wird.

Dazu passt, dass in vitro IL-6 die inflammatorische Wirkung von Toll-like-Rezeptor aktivierenden Liganden verstärkt [246]. In humanen Muskelzellen bewirkt IL-6 eine vermehrte Expression von TLR-4 Rezeptoren via STAT3 [247]. Auf diese Weise könnte IL-6 die Wirkung der ATIs potenzieren beziehungsweise eine Suppression von IL-6 den Effekt abmildern.

Davon ausgehend, dass T-Zellen die entscheidenden Effekte der ATI assoziierten Verstärkung von Autoimmunerkrankungen vermitteln, sind wesentliche Einflüsse von IL-6 auf T-Zellen beschrieben. So dient IL-6 als Regulator des Treg/Th17-Verhältnisses, welches bei SLE mit der Krankheitsaktivität korreliert [39], vermindert die Differenzierung zu Treg und begünstigt die Entstehung von pathologischen Th17-Zellen [248]. Außerdem ist IL-6 an der Aktivierung naiver CD4⁺-T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen beteiligt [38]. Eine verminderte Anzahl an autoreaktiven T-Zellen könnte den Effekt einer ATI vermittelten Aktivitätssteigerung dieser abschwächen.

ATIs aktivieren wie Lipopolysaccharide (LPS) den TLR-4-MD2-CD14-Komplex [172, 249]. Eine LPS induzierte Aktivierung von TLR-4 hat eine Hochregulation von IL-6 trans-signaling unter anderem via NF-κB zur Folge [250], was auch auf eine Bedeutung von IL-6-Signaling für die Wirkung der Aktivierung des TLR-4 durch ATIs hinweisen könnte.

Dem entgegen steht, dass IL-6 die Reifung von dendritischen Zellen hemmt und IL-6 Knockout Mäuse erhöhte Mengen an dendritischen Zellen aufweisen [251]. Diese sind die am stärksten durch ATIs aktivierten Zellen [169]. Trotzdem weisen in diesen Untersuchungen ATI-haltig ernährte *Il6*^{-/-} MRL-*Fas*^{lpr}-Mäuse keine verstärkte, sondern eine im gleichen Maße wie ATI-frei ernährte Kontrollen geminderte vaskuläre Manifestation auf. Dabei zu bedenken ist, dass IL-6 die Expression des CSF-1-Rezeptors auf Monozyten fördert, wodurch sich diese durch autokrine Stimulation stärker zu Makrophagen zu Lasten der Anzahl von dendritischen Zellen differenzieren [233]. Diese können ebenfalls, wenn auch etwas geringer als dendritische Zellen, die T-Zell-Aktivität steigern [169], weshalb sich kein Widerspruch ergibt.

Diskussion

Welcher Mechanismus hierbei am wichtigsten ist und welche Rolle IL-6 bei der Aktivitätssteigerung des erworbenen Immunsystems durch das angeborene Immunsystem im Lymphknoten einnimmt, bedarf weiterer Untersuchungen.

6 Zusammenfassung

Der systemische Lupus erythematodes ist eine chronisch inflammatorische Autoimmunerkrankung, die insbesondere Frauen im mittleren Lebensalter betrifft [252]. Obwohl die Lupus spezifische Mortalität durch verbesserte Behandlung und Diagnose in den vergangenen Jahren zurückgegangen ist, haben die Patienten ein mit der Allgemeinbevölkerung verglichen dreifach erhöhtes Todesrisiko [53]. Gründe dafür liegen neben Infektionen und Nierenerkrankung in einem hohen Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen [253]. Das Risiko für einen Myokardinfarkt ist gegenüber der Allgemeinbevölkerung 2-10fach erhöht [50]. Dabei ist das Risiko unabhängig von traditionellen Risikofaktoren erhöht [5]. Die Ursache und Pathogenese für eine bei Lupuspatienten verstärkt und verfrüht auftretende Atherosklerose ist nicht gut verstanden [6].

Um molekulare Mechanismen der kardiovaskulären Manifestation zu untersuchen, gab es bislang kein gut untersuchtes Mausmodell.

Die Eignung des MRL-*Fas*^{lpr} Mausmodells als Modell der kardiovaskulären Manifestation konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Mäuse gegenüber den Kontrollen eine von lokal verstärkter Expression proinflammatorischer Zytokine begleitete erhöhte vaskuläre und perivaskuläre Infiltration zeigen. Darüber hinaus lassen sich eine erhöhte Intima-Media-Dicke sowie vermehrte IgG-Ablagerungen nachweisen. Bereits beschrieben sind koronare vaskuläre PAS-positive Ablagerungen in Gefäßwänden, eine koronare Arteriitis sowie eine verminderte endothelabhängige Vasorelaxation [186, 195]. In vorliegender Arbeit konnten aortale Infiltrate gezeigt werden, die mit unterschiedlichen Verfahren insbesondere als CD68- und CD4-positive Zellen charakterisiert werden konnten. Weiterhin wurden mit der Messung der Intima-Media-Dicke ein einfach zu erfassender Parameter gefunden, um den Grad der kardiovaskulären Affektion in diesem Mausmodell zu messen. Das MRL-*Fas*^{lpr} Mausmodell ähnelt in vielen Punkten der humanen kardiovaskulären Manifestation, ist umfassend und gut evaluierbar und damit ein exzellent geeignetes Modell.

Es wurde bereits festgestellt, dass IL-6 defiziente MRL-*Fas*^{lpr}-Mäuse eine verlängerte Überlebenszeit und einen abgemilderten Krankheitsverlauf aufweisen [12]. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von IL-6 auf die vaskuläre Inflammation im MRL-*Fas*^{lpr} Mausmodell untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass IL-6-defiziente Mäuse eine

geringe perivaskuläre Infiltration und Inflammation sowie geringere Intima-Media-Dicken aufweisen. Weiterhin führt die Elimination von IL-6 zu einer funktionellen Verbesserung der Vasorelaxationsfähigkeit und somit zu einer verbesserten Endothelfunktion. Es konnte bewiesen werden, dass der Knockout des *IL-6*-Gens allein ausreicht, um die Endothelfunktion erheblich zu verbessern. Ob sich IL-6 adressierende Wirkstoffe im humanen SLE als wirksame Therapie - zumindest für eine Patientenpopulation mit hohem Risiko für oder aber bereits nachgewiesener kardiovaskulärer Manifestation – eignen, ist eine interessante zu untersuchende Fragestellung.

Neben dem Einfluss von IL-6 wurde der Effekt einer ATI-freien Ernährung auf die vaskuläre Manifestation untersucht. In Modellen anderer Autoimmunerkrankungen konnte bereits eine Abmilderung der Krankheitsverläufe bei ATI-freier Ernährung nachgewiesen werden [169, 244]. Noch nicht veröffentlichte Daten zeigen auch für den SLE eine geringere renale Infiltration sowie abgemilderten Lymphknotenbefall und abgeschwächte Hautläsionen. Konkordant damit weisen die Versuche vorliegender Arbeit für ATI-frei ernährte *MRL-Fas^{lpr}* Tiere eine verringerte Intima-Media-Dicke und eine verbesserte Endothelfunktion nach. Dabei ist die Wirkung einer ATI-freien Ernährung mit der einer IL-6 Defizienz vergleichbar. Eine ATI-freie Ernährung IL-6 defizienter Tiere hat keinen zusätzlichen Effekt. Eine zumindest teilweise Vermittlung des Effekts einer ATI-freien Ernährung durch IL-6 erscheint möglich. Sollten sich diese Ergebnisse auf den humanen SLE übertragen lassen, wäre der Verzicht auf ATI-haltige Lebensmittel für SLE Patienten ein einfacher und vielversprechender Weg ihr durch die Erkrankung stark erhöhtes kardiovaskuläres Risiko zu senken.

7 Literaturverzeichnis

1. Bernatsky, S., et al., *Mortality in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(8): p. 2550-7.
2. Ajeganova, S., I. Hafstrom, and J. Frostegard, *Patients with SLE have higher risk of cardiovascular events and mortality in comparison with controls with the same levels of traditional risk factors and intima-media measures, which is related to accumulated disease damage and antiphospholipid syndrome: a case-control study over 10 years*. *Lupus Sci Med*, 2021. **8**(1).
3. Bjornadal, L., et al., *Cardiovascular disease a hazard despite improved prognosis in patients with systemic lupus erythematosus: results from a Swedish population based study 1964-95*. *J Rheumatol*, 2004. **31**(4): p. 713-9.
4. Manzi, S., et al., *Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study*. *Am J Epidemiol*, 1997. **145**(5): p. 408-15.
5. Esdaile, J.M., et al., *Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(10): p. 2331-7.
6. Giannelou, M. and C.P. Mavragani, *Cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus: A comprehensive update*. *J Autoimmun*, 2017. **82**: p. 1-12.
7. Atehortua, L., et al., *Endothelial Alterations in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis: Potential Effect of Monocyte Interaction*. *Mediators Inflamm*, 2017. **2017**: p. 9680729.
8. Nhek, S., et al., *Activated Platelets Induce Endothelial Cell Activation via an Interleukin-1beta Pathway in Systemic Lupus Erythematosus*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017. **37**(4): p. 707-716.
9. Moriya, J., *Critical roles of inflammation in atherosclerosis*. *J Cardiol*, 2019. **73**(1): p. 22-27.
10. Hartman, J. and W.H. Frishman, *Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy*. *Cardiol Rev*, 2014. **22**(3): p. 147-51.
11. Ding, J., et al., *Serum interleukin-6 level is correlated with the disease activity of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis*. *Clinics (Sao Paulo)*, 2020. **75**: p. e1801.
12. Cash, H., et al., *Interleukin 6 (IL-6) deficiency delays lupus nephritis in MRL-Faslpr mice: the IL-6 pathway as a new therapeutic target in treatment of autoimmune kidney disease in systemic lupus erythematosus*. *J Rheumatol*, 2010. **37**(1): p. 60-70.
13. Tan, E.M., et al., *The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1982. **25**(11): p. 1271-7.
14. Hochberg, M.C., *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1997. **40**(9): p. 1725.
15. Petri, M., et al., *Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2012. **64**(8): p. 2677-86.
16. Aringer, M., et al., *2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus*. *Arthritis Rheumatol*, 2019. **71**(9): p. 1400-1412.

17. Fanouriakis, A., et al., *2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 2019. **78**(6): p. 736-745.
18. Houssiau, F.A., et al., *The 10-year follow-up data of the Euro-Lupus Nephritis Trial comparing low-dose and high-dose intravenous cyclophosphamide*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(1): p. 61-4.
19. Furie, R., et al., *Two-Year, Randomized, Controlled Trial of Belimumab in Lupus Nephritis*. N Engl J Med, 2020. **383**(12): p. 1117-1128.
20. Rees, F., et al., *The worldwide incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: a systematic review of epidemiological studies*. Rheumatology (Oxford), 2017. **56**(11): p. 1945-1961.
21. Tsokos, G.C., *Systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med, 2011. **365**(22): p. 2110-21.
22. Deapen, D., et al., *A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1992. **35**(3): p. 311-8.
23. Ulf-Moller, C.J., et al., *Concordance of autoimmune disease in a nationwide Danish systemic lupus erythematosus twin cohort*. Semin Arthritis Rheum, 2018. **47**(4): p. 538-544.
24. Jeong, D.Y., et al., *Genetic variation and systemic lupus erythematosus: A field synopsis and systematic meta-analysis*. Autoimmun Rev, 2018. **17**(6): p. 553-566.
25. Graham, R.R., et al., *Review of recent genome-wide association scans in lupus*. J Intern Med, 2009. **265**(6): p. 680-8.
26. Rullo, O.J. and B.P. Tsao, *Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 2013. **72 Suppl 2**: p. ii56-61.
27. Barbhaiya, M. and K.H. Costenbader, *Environmental exposures and the development of systemic lupus erythematosus*. Curr Opin Rheumatol, 2016. **28**(5): p. 497-505.
28. Lisnevskaja, L., G. Murphy, and D. Isenberg, *Systemic lupus erythematosus*. Lancet, 2014. **384**(9957): p. 1878-1888.
29. Costenbader, K.H., et al., *Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(4): p. 1251-62.
30. Mahajan, A., M. Herrmann, and L.E. Munoz, *Clearance Deficiency and Cell Death Pathways: A Model for the Pathogenesis of SLE*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 35.
31. Tsokos, G.C., et al., *New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus*. Nat Rev Rheumatol, 2016. **12**(12): p. 716-730.
32. Pradhan, V.D., et al., *Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in systemic lupus erythematosus: prevalence, clinical associations and correlation with other autoantibodies*. J Assoc Physicians India, 2004. **52**: p. 533-7.
33. Marshak-Rothstein, A., *Toll-like receptors in systemic autoimmune disease*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(11): p. 823-35.
34. Parikh, S.V., et al., *Update on Lupus Nephritis: Core Curriculum 2020*. Am J Kidney Dis, 2020. **76**(2): p. 265-281.
35. Vincent, F.B., et al., *The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity*. Cytokine Growth Factor Rev, 2013. **24**(3): p. 203-15.
36. Mockel, T., et al., *B cell activating factor (BAFF): Structure, functions, autoimmunity and clinical implications in Systemic Lupus Erythematosus (SLE)*. Autoimmun Rev, 2020: p. 102736.
37. Teng, X., et al., *Immune cell metabolism in autoimmunity*. Clin Exp Immunol, 2019. **197**(2): p. 181-192.

38. Kim, S.J., K. Lee, and B. Diamond, *Follicular Helper T Cells in Systemic Lupus Erythematosus*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1793.
39. Yuliasih, Y., L.D. Rahmawati, and R.M. Putri, *Th17/Treg Ratio and Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus*. *Caspian J Intern Med*, 2019. **10**(1): p. 65-72.
40. Aringer, M. and M. Schneider, *[Systemic lupus erythematosus]*. *Dtsch Med Wochenschr*, 2016. **141**(8): p. 537-43.
41. Liao, X., T. Pirapakaran, and X.M. Luo, *Chemokines and Chemokine Receptors in the Development of Lupus Nephritis*. *Mediators Inflamm*, 2016. **2016**: p. 6012715.
42. Doria, A., et al., *Cardiac involvement in systemic lupus erythematosus*. *Lupus*, 2005. **14**(9): p. 683-6.
43. Newman, K., et al., *Management of immune cytopenias in patients with systemic lupus erythematosus - Old and new*. *Autoimmun Rev*, 2013. **12**(7): p. 784-91.
44. Fayyaz, A., et al., *Haematological manifestations of lupus*. *Lupus Sci Med*, 2015. **2**(1): p. e000078.
45. Goldenberg, D.L. and A.S. Cohen, *Synovial membrane histopathology in the differential diagnosis of rheumatoid arthritis, gout, pseudogout, systemic lupus erythematosus, infectious arthritis and degenerative joint disease*. *Medicine (Baltimore)*, 1978. **57**(3): p. 239-52.
46. Labowitz, R. and H.R. Schumacher, Jr., *Articular manifestations of systemic lupus erythematosus*. *Ann Intern Med*, 1971. **74**(6): p. 911-21.
47. Grossman, J.M., *Lupus arthritis*. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2009. **23**(4): p. 495-506.
48. Libby, P., et al., *Atherosclerosis*. *Nat Rev Dis Primers*, 2019. **5**(1): p. 56.
49. Urowitz, M.B., et al., *The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus*. *Am J Med*, 1976. **60**(2): p. 221-5.
50. Schoenfeld, S.R., S. Kasturi, and K.H. Costenbader, *The epidemiology of atherosclerotic cardiovascular disease among patients with SLE: a systematic review*. *Semin Arthritis Rheum*, 2013. **43**(1): p. 77-95.
51. Tektonidou, M.G., et al., *Subclinical atherosclerosis in Systemic Lupus Erythematosus: Comparable risk with Diabetes Mellitus and Rheumatoid Arthritis*. *Autoimmun Rev*, 2017. **16**(3): p. 308-312.
52. Nossent, J., et al., *Current causes of death in systemic lupus erythematosus in Europe, 2000--2004: relation to disease activity and damage accrual*. *Lupus*, 2007. **16**(5): p. 309-17.
53. Yurkovich, M., et al., *Overall and cause-specific mortality in patients with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis of observational studies*. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2014. **66**(4): p. 608-16.
54. Bruce, I.N., et al., *Risk factors for coronary heart disease in women with systemic lupus erythematosus: the Toronto Risk Factor Study*. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(11): p. 3159-67.
55. Sun, C., et al., *Prevalence and risk of metabolic syndrome in patients with systemic lupus erythematosus: A meta-analysis*. *Int J Rheum Dis*, 2017. **20**(8): p. 917-928.
56. Wilson, P.W., et al., *Prediction of coronary heart disease using risk factor categories*. *Circulation*, 1998. **97**(18): p. 1837-47.
57. Magder, L.S. and M. Petri, *Incidence of and risk factors for adverse cardiovascular events among patients with systemic lupus erythematosus*. *Am J Epidemiol*, 2012. **176**(8): p. 708-19.

58. Urowitz, M.B., D. Ibanez, and D.D. Gladman, *Atherosclerotic vascular events in a single large lupus cohort: prevalence and risk factors*. J Rheumatol, 2007. **34**(1): p. 70-5.
59. Wei, L., T.M. MacDonald, and B.R. Walker, *Taking glucocorticoids by prescription is associated with subsequent cardiovascular disease*. Ann Intern Med, 2004. **141**(10): p. 764-70.
60. Libby, P., *Inflammation in Atherosclerosis-No Longer a Theory*. Clin Chem, 2021. **67**(1): p. 131-142.
61. Voloshyna, I., M.J. Littlefield, and A.B. Reiss, *Atherosclerosis and interferon-gamma: new insights and therapeutic targets*. Trends Cardiovasc Med, 2014. **24**(1): p. 45-51.
62. Ridker, P.M., et al., *Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease*. N Engl J Med, 2017. **377**(12): p. 1119-1131.
63. Ridker, P.M., et al., *Effects of interleukin-1beta inhibition with canakinumab on hemoglobin A1c, lipids, C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen: a phase IIb randomized, placebo-controlled trial*. Circulation, 2012. **126**(23): p. 2739-48.
64. Tardif, J.C., et al., *Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction*. N Engl J Med, 2019. **381**(26): p. 2497-2505.
65. Nidorf, S.M., et al., *Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease*. N Engl J Med, 2020. **383**(19): p. 1838-1847.
66. Ronnblom, L. and D. Leonard, *Interferon pathway in SLE: one key to unlocking the mystery of the disease*. Lupus Sci Med, 2019. **6**(1): p. e000270.
67. Tyden, H., et al., *Endothelial dysfunction is associated with activation of the type I interferon system and platelets in patients with systemic lupus erythematosus*. RMD Open, 2017. **3**(2): p. e000508.
68. Lee, P.Y., et al., *Type I interferon as a novel risk factor for endothelial progenitor cell depletion and endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(11): p. 3759-69.
69. Furumoto, Y., et al., *Tofacitinib Ameliorates Murine Lupus and Its Associated Vascular Dysfunction*. Arthritis Rheumatol, 2017. **69**(1): p. 148-160.
70. Li, J., et al., *Interferon-alpha priming promotes lipid uptake and macrophage-derived foam cell formation: a novel link between interferon-alpha and atherosclerosis in lupus*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(2): p. 492-502.
71. Buie, J.J., et al., *IFN- α Negatively Regulates the Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide Production: Implications for Systemic Lupus Erythematosus*. J Immunol, 2017. **199**(6): p. 1979-1988.
72. Vasa, M., et al., *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease*. Circ Res, 2001. **89**(1): p. E1-7.
73. Denny, M.F., et al., *Interferon-alpha promotes abnormal vasculogenesis in lupus: a potential pathway for premature atherosclerosis*. Blood, 2007. **110**(8): p. 2907-15.
74. Lood, C., et al., *Platelet transcriptional profile and protein expression in patients with systemic lupus erythematosus: up-regulation of the type I interferon system is strongly associated with vascular disease*. Blood, 2010. **116**(11): p. 1951-7.
75. Denny, M.F., et al., *A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs*. J Immunol, 2010. **184**(6): p. 3284-97.
76. Carlucci, P.M., et al., *Neutrophil subsets and their gene signature associate with vascular inflammation and coronary atherosclerosis in lupus*. JCI Insight, 2018. **3**(8).

77. Khera, A.V., et al., *Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis*. N Engl J Med, 2011. **364**(2): p. 127-35.
78. Knight, J.S. and M.J. Kaplan, *Lupus neutrophils: 'NET' gain in understanding lupus pathogenesis*. Curr Opin Rheumatol, 2012. **24**(5): p. 441-50.
79. Smith, C.K., et al., *Neutrophil extracellular trap-derived enzymes oxidize high-density lipoprotein: an additional proatherogenic mechanism in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheumatol, 2014. **66**(9): p. 2532-2544.
80. Pieterse, E., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Drive Endothelial-to-Mesenchymal Transition*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017. **37**(7): p. 1371-1379.
81. Sage, A.P., et al., *The role of B cells in atherosclerosis*. Nat Rev Cardiol, 2019. **16**(3): p. 180-196.
82. Mangge, H., et al., *Beyond Macrophages and T Cells: B Cells and Immunoglobulins Determine the Fate of the Atherosclerotic Plaque*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(11).
83. Dieude, M., J.L. Senecal, and Y. Raymond, *Induction of endothelial cell apoptosis by heat-shock protein 60-reactive antibodies from anti-endothelial cell autoantibody-positive systemic lupus erythematosus patients*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(10): p. 3221-31.
84. Margutti, P., et al., *Autoantibodies to the C-terminal subunit of RLIP76 induce oxidative stress and endothelial cell apoptosis in immune-mediated vascular diseases and atherosclerosis*. Blood, 2008. **111**(9): p. 4559-70.
85. Gustafsson, J., et al., *Predictors of the first cardiovascular event in patients with systemic lupus erythematosus - a prospective cohort study*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(6): p. R186.
86. Zhang, X., et al., *Involvement of TLR4 in oxidized LDL/beta2GPI/anti-beta2GPI-induced transformation of macrophages to foam cells*. J Atheroscler Thromb, 2014. **21**(11): p. 1140-51.
87. Bassi, N., et al., *OxLDL/beta2GPI-anti-oxLDL/beta2GPI complex and atherosclerosis in SLE patients*. Autoimmun Rev, 2007. **7**(1): p. 52-58.
88. Zhang, G., et al., *OxLDL/beta2GPI/antibeta2GPI Ab complex induces inflammatory activation via the TLR4/NFkappaB pathway in HUVECs*. Mol Med Rep, 2021. **23**(2).
89. Conti, F., et al., *Subclinical atherosclerosis in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome: focus on beta2GPI-specific T cell response*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(3): p. 661-8.
90. Horkko, S., et al., *Immunological responses to oxidized LDL*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(12): p. 1771-9.
91. Oates, J.C., et al., *Associations between Accelerated Atherosclerosis, Oxidized Ldl Immune Complexes, and in Vitro Endothelial Dysfunction in Systemic Lupus Erythematosus*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 2020. **131**: p. 157-177.
92. Delgado Alves, J., et al., *Antibodies to high-density lipoprotein and beta2-glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(10): p. 2686-94.
93. Chistiakov, D.A., et al., *Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases*. Biochimie, 2017. **132**: p. 19-27.
94. Navab, M., et al., *Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3*. J Lipid Res, 2000. **41**(9): p. 1495-508.

95. Gaal, K., et al., *High-density lipoprotein antioxidant capacity, subpopulation distribution and paraoxonase-1 activity in patients with systemic lupus erythematosus*. *Lipids Health Dis*, 2016. **15**: p. 60.
96. McMahon, M., et al., *Dysfunctional proinflammatory high-density lipoproteins confer increased risk of atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2009. **60**(8): p. 2428-37.
97. Kattoor, A.J., S.H. Kanuri, and J.L. Mehta, *Role of Ox-LDL and LOX-1 in Atherogenesis*. *Curr Med Chem*, 2019. **26**(9): p. 1693-1700.
98. Obama, T., et al., *Cooperative Action of Oxidized Low-Density Lipoproteins and Neutrophils on Endothelial Inflammatory Responses Through Neutrophil Extracellular Trap Formation*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 1899.
99. Baragetti, A., et al., *Disease trends over time and CD4(+)CCR5(+) T-cells expansion predict carotid atherosclerosis development in patients with systemic lupus erythematosus*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2018. **28**(1): p. 53-63.
100. Li, J., et al., *CCR5+T-bet+FoxP3+ Effector CD4 T Cells Drive Atherosclerosis*. *Circ Res*, 2016. **118**(10): p. 1540-52.
101. Bakshi, J., et al., *Unmet Needs in the Pathogenesis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2018. **55**(3): p. 352-367.
102. Tselios, K., et al., *Optimal Monitoring For Coronary Heart Disease Risk in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Systematic Review*. *J Rheumatol*, 2016. **43**(1): p. 54-65.
103. Asanuma, Y., et al., *Increased concentration of proatherogenic inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus: relationship to cardiovascular risk factors*. *J Rheumatol*, 2006. **33**(3): p. 539-45.
104. David, C., et al., *Soluble CD163 is a biomarker for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus patients at apparent low risk for cardiovascular disease*. *Scand J Rheumatol*, 2020. **49**(1): p. 33-37.
105. Divard, G., et al., *High-sensitivity cardiac troponin T is a biomarker for atherosclerosis in systemic lupus erythematosus patients: a cross-sectional controlled study*. *Arthritis Res Ther*, 2017. **19**(1): p. 132.
106. McMahon, M., et al., *A panel of biomarkers is associated with increased risk of the presence and progression of atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheumatol*, 2014. **66**(1): p. 130-9.
107. Boucelma, M., et al., *Cardiovascular risk and lupus disease*. *Int Angiol*, 2011. **30**(1): p. 18-24.
108. Colombo, B.M., et al., *Traditional and non traditional risk factors in accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: role of vascular endothelial growth factor (VEGATS Study)*. *Autoimmun Rev*, 2009. **8**(4): p. 309-15.
109. Manger, K., et al., *Factors associated with coronary artery calcification in young female patients with SLE*. *Ann Rheum Dis*, 2003. **62**(9): p. 846-50.
110. Jackson, M., et al., *Activation of transforming growth factor-beta1 and early atherosclerosis in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Res Ther*, 2006. **8**(3): p. R81.
111. Somers, E.C., et al., *Type I interferons are associated with subclinical markers of cardiovascular disease in a cohort of systemic lupus erythematosus patients*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e37000.

112. Kao, A.H., et al., *Relation of platelet C4d with all-cause mortality and ischemic stroke in patients with systemic lupus erythematosus*. *Transl Stroke Res*, 2014. **5**(4): p. 510-8.
113. Liu, Y. and M.J. Kaplan, *Cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus: an update*. *Curr Opin Rheumatol*, 2018. **30**(5): p. 441-448.
114. Petri, M.A., E. Barr, and L.S. Magder, *Development of a systemic lupus erythematosus cardiovascular risk equation*. *Lupus Sci Med*, 2019. **6**(1): p. e000346.
115. Boulos, D., et al., *Cardiovascular risk profiles in a lupus cohort: what do different calculators tell us?* *Lupus Sci Med*, 2017. **4**(1): p. e000212.
116. Kiani, A.N., et al., *Coronary calcification in SLE: comparison with the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2015. **54**(11): p. 1976-81.
117. Varma, N., et al., *Coronary vessel wall contrast enhancement imaging as a potential direct marker of coronary involvement: integration of findings from CAD and SLE patients*. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2014. **7**(8): p. 762-70.
118. Henrot, P., et al., *Assessment of subclinical atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: A systematic review and meta-analysis*. *Joint Bone Spine*, 2018. **85**(2): p. 155-163.
119. Kao, A.H., et al., *Relation of carotid intima-media thickness and plaque with incident cardiovascular events in women with systemic lupus erythematosus*. *Am J Cardiol*, 2013. **112**(7): p. 1025-32.
120. Lima, D.S., et al., *Brachial endothelial function is impaired in patients with systemic lupus erythematosus*. *J Rheumatol*, 2002. **29**(2): p. 292-7.
121. Mak, A., et al., *Endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus - a case-control study and an updated meta-analysis and meta-regression*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 7320.
122. Mendoza-Pinto, C., et al., *Endothelial dysfunction and arterial stiffness in patients with systemic lupus erythematosus: A systematic review and meta-analysis*. *Atherosclerosis*, 2020. **297**: p. 55-63.
123. Schanberg, L.E., et al., *Use of atorvastatin in systemic lupus erythematosus in children and adolescents*. *Arthritis Rheum*, 2012. **64**(1): p. 285-96.
124. Iudici, M., et al., *Low-dose aspirin as primary prophylaxis for cardiovascular events in systemic lupus erythematosus: a long-term retrospective cohort study*. *Rheumatology (Oxford)*, 2016. **55**(9): p. 1623-30.
125. Fasano, S., et al., *Longterm Hydroxychloroquine Therapy and Low-dose Aspirin May Have an Additive Effectiveness in the Primary Prevention of Cardiovascular Events in Patients with Systemic Lupus Erythematosus*. *J Rheumatol*, 2017. **44**(7): p. 1032-1038.
126. Ulander, L., et al., *Hydroxychloroquine reduces interleukin-6 levels after myocardial infarction: The randomized, double-blind, placebo-controlled OXI pilot trial*. *Int J Cardiol*, 2021. **337**: p. 21-27.
127. Choy, E.H., et al., *Translating IL-6 biology into effective treatments*. *Nat Rev Rheumatol*, 2020. **16**(6): p. 335-345.
128. Naka, T., N. Nishimoto, and T. Kishimoto, *The paradigm of IL-6: from basic science to medicine*. *Arthritis Res*, 2002. **4 Suppl 3**: p. S233-42.
129. Akira, S., T. Taga, and T. Kishimoto, *Interleukin-6 in biology and medicine*. *Adv Immunol*, 1993. **54**: p. 1-78.
130. Avci, A.B., E. Feist, and G.R. Burmester, *Targeting IL-6 or IL-6 Receptor in Rheumatoid Arthritis: What's the Difference?* *BioDrugs*, 2018. **32**(6): p. 531-546.

131. Heink, S., et al., *Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells*. Nat Immunol, 2017. **18**(1): p. 74-85.
132. Mihara, M. and Y. Ohsugi, *Possible role of IL-6 in pathogenesis of immune complex-mediated glomerulonephritis in NZB/W F1 mice: induction of IgG class anti-DNA autoantibody production*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1990. **93**(1): p. 89-92.
133. Illei, G.G., et al., *Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(2): p. 542-52.
134. Wallace, D.J., et al., *Efficacy and safety of an interleukin 6 monoclonal antibody for the treatment of systemic lupus erythematosus: a phase II dose-ranging randomised controlled trial*. Ann Rheum Dis, 2017. **76**(3): p. 534-542.
135. Ridker, P.M., et al., *Modulation of the interleukin-6 signalling pathway and incidence rates of atherosclerotic events and all-cause mortality: analyses from the Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS)*. Eur Heart J, 2018. **39**(38): p. 3499-3507.
136. Reiss, A.B., N.M. Siegart, and J. De Leon, *Interleukin-6 in atherosclerosis: atherogenic or atheroprotective?* Clinical Lipidology, 2017. **12**(1): p. 14-23.
137. Aringer, M. and J.S. Smolen, *Tumour necrosis factor and other proinflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus: a rationale for therapeutic intervention*. Lupus, 2004. **13**(5): p. 344-7.
138. Debets, J.M., et al., *Fc-receptor cross-linking induces rapid secretion of tumor necrosis factor (cachectin) by human peripheral blood monocytes*. J Immunol, 1988. **141**(4): p. 1197-201.
139. Postal, M. and S. Appenzeller, *The role of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. Cytokine, 2011. **56**(3): p. 537-43.
140. Gabay, C., et al., *Circulating levels of tumor necrosis factor soluble receptors in systemic lupus erythematosus are significantly higher than in other rheumatic diseases and correlate with disease activity*. J Rheumatol, 1997. **24**(2): p. 303-8.
141. McCarthy, E.M., et al., *The association of cytokines with disease activity and damage scores in systemic lupus erythematosus patients*. Rheumatology (Oxford), 2014. **53**(9): p. 1586-94.
142. Yokoyama, H., B. Kreft, and V.R. Kelley, *Biphasic increase in circulating and renal TNF-alpha in MRL-lpr mice with differing regulatory mechanisms*. Kidney Int, 1995. **47**(1): p. 122-30.
143. Aringer, M. and J.S. Smolen, *Efficacy and safety of TNF-blocker therapy in systemic lupus erythematosus*. Expert Opin Drug Saf, 2008. **7**(4): p. 411-9.
144. Kleinbongard, P., G. Heusch, and R. Schulz, *TNFalpha in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure*. Pharmacol Ther, 2010. **127**(3): p. 295-314.
145. Di Minno, M.N., et al., *Carotid intima-media thickness in psoriatic arthritis: differences between tumor necrosis factor-alpha blockers and traditional disease-modifying antirheumatic drugs*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(3): p. 705-12.
146. Charles, P., et al., *Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF-alpha therapy in rheumatoid arthritis*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1521-8.
147. Matsui, K., H. Tsutsui, and K. Nakanishi, *Pathophysiological roles for IL-18 in inflammatory arthritis*. Expert Opin Ther Targets, 2003. **7**(6): p. 701-24.
148. Weber, A., P. Wasiliew, and M. Kracht, *Interleukin-1 (IL-1) pathway*. Sci Signal, 2010. **3**(105): p. cm1.

149. Lemay, S., C. Mao, and A.K. Singh, *Cytokine gene expression in the MRL/lpr model of lupus nephritis*. *Kidney Int*, 1996. **50**(1): p. 85-93.
150. Boswell, J.M., et al., *Novel and enhanced IL-1 gene expression in autoimmune mice with lupus*. *J Immunol*, 1988. **141**(1): p. 118-24.
151. Umare, V., et al., *Effect of proinflammatory cytokines (IL-6, TNF-alpha, and IL-1beta) on clinical manifestations in Indian SLE patients*. *Mediators Inflamm*, 2014. **2014**: p. 385297.
152. Esfandiari, E., et al., *A proinflammatory role of IL-18 in the development of spontaneous autoimmune disease*. *J Immunol*, 2001. **167**(9): p. 5338-47.
153. Mende, R., et al., *Analysis of Serum Interleukin (IL)-1beta and IL-18 in Systemic Lupus Erythematosus*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1250.
154. Bossu, P., et al., *IL-18 cDNA vaccination protects mice from spontaneous lupus-like autoimmune disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(24): p. 14181-6.
155. Mallat, Z., et al., *Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability*. *Circulation*, 2001. **104**(14): p. 1598-603.
156. Vogl, T., et al., *Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock*. *Nat Med*, 2007. **13**(9): p. 1042-9.
157. Soyfoo, M.S., et al., *Phagocyte-specific S100A8/A9 protein levels during disease exacerbations and infections in systemic lupus erythematosus*. *J Rheumatol*, 2009. **36**(10): p. 2190-4.
158. Oesterle, A. and M.A. Bowman, *S100A12 and the S100/Calgranulins: Emerging Biomarkers for Atherosclerosis and Possibly Therapeutic Targets*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. **35**(12): p. 2496-507.
159. Xiao, X., et al., *S100 proteins in atherosclerosis*. *Clin Chim Acta*, 2020. **502**: p. 293-304.
160. Pixley, F.J. and E.R. Stanley, *CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action*. *Trends Cell Biol*, 2004. **14**(11): p. 628-38.
161. Menke, J., et al., *Colony-stimulating factor-1: a potential biomarker for lupus nephritis*. *J Am Soc Nephrol*, 2015. **26**(2): p. 379-89.
162. Sinha, S.K., et al., *Local M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) Expression Regulates Macrophage Proliferation and Apoptosis in Atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021. **41**(1): p. 220-233.
163. Qiao, J.H., et al., *Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice*. *Am J Pathol*, 1997. **150**(5): p. 1687-99.
164. Deng, X., et al., *Association of plasma macrophage colony-stimulating factor with cardiovascular morbidity and all-cause mortality in chronic hemodialysis patients*. *BMC Nephrol*, 2019. **20**(1): p. 321.
165. Wada, Y., et al., *IL-34-Dependent Intrarenal and Systemic Mechanisms Promote Lupus Nephritis in MRL-Fas(lpr) Mice*. *J Am Soc Nephrol*, 2019. **30**(2): p. 244-259.
166. Xie, H.H., et al., *Elevated Serum Interleukin-34 Level in Patients with Systemic Lupus Erythematosus Is Associated with Disease Activity*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 3462.
167. Liu, Q., et al., *IL-34 promotes foam cell formation by enhancing CD36 expression through p38 MAPK pathway*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 17347.
168. Biesiekierski, J.R., *What is gluten?* *J Gastroenterol Hepatol*, 2017. **32 Suppl 1**: p. 78-81.
169. Schuppan, D. and V. Zevallos, *Wheat amylase trypsin inhibitors as nutritional activators of innate immunity*. *Dig Dis*, 2015. **33**(2): p. 260-3.
170. Finnie, C., et al., *Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley*. *Plant Physiol*, 2002. **129**(3): p. 1308-19.

171. Zevallos, V.F., et al., *Nutritional Wheat Amylase-Trypsin Inhibitors Promote Intestinal Inflammation via Activation of Myeloid Cells*. *Gastroenterology*, 2017. **152**(5): p. 1100-1113.e12.
172. Junker, Y., et al., *Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4*. *J Exp Med*, 2012. **209**(13): p. 2395-408.
173. Bellinghausen, I., et al., *Wheat amylase-trypsin inhibitors exacerbate intestinal and airway allergic immune responses in humanized mice*. *J Allergy Clin Immunol*, 2019. **143**(1): p. 201-212 e4.
174. Howie, J.B. and B.J. Helyer, *The immunology and pathology of NZB mice*. *Adv Immunol*, 1968. **9**: p. 215-66.
175. Li, W., A.A. Titov, and L. Morel, *An update on lupus animal models*. *Curr Opin Rheumatol*, 2017. **29**(5): p. 434-441.
176. Rudofsky, U.H. and D.A. Lawrence, *New Zealand mixed mice: a genetic systemic lupus erythematosus model for assessing environmental effects*. *Environ Health Perspect*, 1999. **107 Suppl 5**: p. 713-21.
177. Richard, M.L. and G. Gilkeson, *Mouse models of lupus: what they tell us and what they don't*. *Lupus Sci Med*, 2018. **5**(1): p. e000199.
178. Heber-Katz, E., et al., *Spallanzani's mouse: a model of restoration and regeneration*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2004. **280**: p. 165-89.
179. Andrews, B.S., et al., *Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains*. *J Exp Med*, 1978. **148**(5): p. 1198-215.
180. The Jackson Laboratory, *MRL/MpJ [Internet] Zitiert am: 16.02.2021. URL: <https://www.jax.org/strain/000486>*. . 2021.
181. Drappa, J., N. Brot, and K.B. Elkon, *The Fas protein is expressed at high levels on CD4+CD8+ thymocytes and activated mature lymphocytes in normal mice but not in the lupus-prone strain, MRL lpr/lpr*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(21): p. 10340-4.
182. Furukawa, F., et al., *Spontaneous autoimmune skin lesions of MRL/n mice: autoimmune disease-prone genetic background in relation to Fas-defect MRL/1pr mice*. *J Invest Dermatol*, 1996. **107**(1): p. 95-100.
183. Gulinello, M. and C. Putterman, *The MRL/lpr mouse strain as a model for neuropsychiatric systemic lupus erythematosus*. *J Biomed Biotechnol*, 2011. **2011**: p. 207504.
184. Kolaja, G.J. and P.E. Fast, *Renal lesions in MRL mice*. *Vet Pathol*, 1982. **19**(6): p. 663-8.
185. Keil, A., et al., *Suppression of lupus nephritis and skin lesions in MRL/lpr mice by administration of the topoisomerase I inhibitor irinotecan*. *Arthritis Res Ther*, 2016. **18**(1): p. 243.
186. Accinni, L. and F.J. Dixon, *Degenerative vascular disease and myocardial infarction in mice with lupus-like syndrome*. *Am J Pathol*, 1979. **96**(2): p. 477-92.
187. Gomez-Guzman, M., et al., *Chronic hydroxychloroquine improves endothelial dysfunction and protects kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus*. *Hypertension*, 2014. **64**(2): p. 330-7.
188. Virdis, A., et al., *Early treatment with hydroxychloroquine prevents the development of endothelial dysfunction in a murine model of systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Res Ther*, 2015. **17**: p. 277.

189. Thacker, S.G., et al., *Lupus-prone New Zealand Black/New Zealand White F1 mice display endothelial dysfunction and abnormal phenotype and function of endothelial progenitor cells*. *Lupus*, 2010. **19**(3): p. 288-99.
190. Toral, M., et al., *Lactobacillus fermentum CECT5716: a novel alternative for the prevention of vascular disorders in a mouse model of systemic lupus erythematosus*. *FASEB J*, 2019. **33**(9): p. 10005-10018.
191. Gilbert, E.L. and M.J. Ryan, *High dietary fat promotes visceral obesity and impaired endothelial function in female mice with systemic lupus erythematosus*. *Genet Med*, 2011. **8**(2): p. 150-5.
192. Thacker, S.G., et al., *Type I interferons modulate vascular function, repair, thrombosis, and plaque progression in murine models of lupus and atherosclerosis*. *Arthritis Rheum*, 2012. **64**(9): p. 2975-85.
193. Hang, L.M., S. Izui, and F.J. Dixon, *(NZW x BXSB)F1 hybrid. A model of acute lupus and coronary vascular disease with myocardial infarction*. *J Exp Med*, 1981. **154**(1): p. 216-21.
194. Yoshida, H., et al., *Quantitative analysis of myocardial infarction in (NZW x BXSB)F1 hybrid mice with systemic lupus erythematosus and small coronary artery disease*. *Am J Pathol*, 1987. **129**(3): p. 477-85.
195. Knight, J.S., et al., *Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/lpr mice*. *Ann Rheum Dis*, 2015. **74**(12): p. 2199-206.
196. Marshall, D., et al., *MRL/lpr lupus-prone mice show exaggerated ICAM-1-dependent leucocyte adhesion and transendothelial migration in response to TNF-alpha*. *Rheumatology (Oxford)*, 2003. **42**(8): p. 929-34.
197. Xia, N., et al., *Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Perivascular Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. **36**(1): p. 78-85.
198. Thomas, G., et al., *Mortality associated with systemic lupus erythematosus in France assessed by multiple-cause-of-death analysis*. *Arthritis Rheumatol*, 2014. **66**(9): p. 2503-11.
199. Ryan, M.J. and G.R. McLemore, Jr., *Hypertension and impaired vascular function in a female mouse model of systemic lupus erythematosus*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007. **292**(2): p. R736-42.
200. Filotico, R. and V. Mastrandrea, *Cutaneous lupus erythematosus: clinico-pathologic correlation*. *G Ital Dermatol Venereol*, 2018. **153**(2): p. 216-229.
201. Shields, K.J., et al., *Perivascular adipose tissue of the descending thoracic aorta is associated with systemic lupus erythematosus and vascular calcification in women*. *Atherosclerosis*, 2013. **231**(1): p. 129-35.
202. Shields, K.J., et al., *Association of aortic perivascular adipose tissue density with aortic calcification in women with systemic lupus erythematosus*. *Atherosclerosis*, 2017. **262**: p. 55-61.
203. Almaani, S., A. Meara, and B.H. Rovin, *Update on Lupus Nephritis*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017. **12**(5): p. 825-835.
204. Willeit, P., et al., *Carotid Intima-Media Thickness Progression as Surrogate Marker for Cardiovascular Risk: Meta-Analysis of 119 Clinical Trials Involving 100 667 Patients*. *Circulation*, 2020. **142**(7): p. 621-642.
205. Bots, M.L., *Carotid intima-media thickness as a surrogate marker for cardiovascular disease in intervention studies*. *Curr Med Res Opin*, 2006. **22**(11): p. 2181-90.

206. Bots, M.L. and D.E. Grobbee, *Intima media thickness as a surrogate marker for generalised atherosclerosis*. Cardiovasc Drugs Ther, 2002. **16**(4): p. 341-51.
207. Svensson, C., et al., *High-Frequency Ultrasound of Multiple Arterial Areas Reveals Increased Intima Media Thickness, Vessel Wall Appearance, and Atherosclerotic Plaques in Systemic Lupus Erythematosus*. Front Med (Lausanne), 2020. **7**: p. 581336.
208. Hsueh, W., et al., *Recipes for creating animal models of diabetic cardiovascular disease*. Circ Res, 2007. **100**(10): p. 1415-27.
209. Santiago-Raber, M.L., et al., *Atherosclerotic plaque vulnerability is increased in mouse model of lupus*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 18324.
210. Edwards, C.K., 3rd, et al., *Inhibition of superantigen-induced proinflammatory cytokine production and inflammatory arthritis in MRL-lpr/lpr mice by a transcriptional inhibitor of TNF-alpha*. J Immunol, 1996. **157**(4): p. 1758-72.
211. Deguchi, Y. and S. Kishimoto, *Tumour necrosis factor/cachectin plays a key role in autoimmune pulmonary inflammation in lupus-prone mice*. Clin Exp Immunol, 1991. **85**(3): p. 392-5.
212. Kim, N., et al., *TNFalpha inhibition in MRL/lpr mice ameliorates pulmonary but not renal disease*. J Autoimmun, 2002. **19**(4): p. 215-22.
213. McHale, J.F., et al., *TNF-alpha and IL-1 sequentially induce endothelial ICAM-1 and VCAM-1 expression in MRL/lpr lupus-prone mice*. J Immunol, 1999. **163**(7): p. 3993-4000.
214. Gonzalez-Juanatey, C., et al., *Effect of anti-tumor necrosis factor alpha therapy on the progression of subclinical atherosclerosis in severe rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2006. **55**(1): p. 150-3.
215. Angel, K., et al., *Effect of 1-year anti-TNF-alpha therapy on aortic stiffness, carotid atherosclerosis, and calprotectin in inflammatory arthropathies: a controlled study*. Am J Hypertens, 2012. **25**(6): p. 644-50.
216. Sidiropoulos, P.I., et al., *Sustained improvement of vascular endothelial function during anti-TNFalpha treatment in rheumatoid arthritis patients*. Scand J Rheumatol, 2009. **38**(1): p. 6-10.
217. Uppal, S.S., S.J. Hayat, and R. Raghupathy, *Efficacy and safety of infliximab in active SLE: a pilot study*. Lupus, 2009. **18**(8): p. 690-7.
218. Yui, M.A., et al., *Increased macrophage colony-stimulating factor in neonatal and adult autoimmune MRL-lpr mice*. Am J Pathol, 1991. **139**(2): p. 255-61.
219. Esteban-Villarrubia, J., et al., *Tyrosine Kinase Receptors in Oncology*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(22).
220. Faust, J., et al., *Correlation of renal tubular epithelial cell-derived interleukin-18 up-regulation with disease activity in MRL-Faslpr mice with autoimmune lupus nephritis*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(11): p. 3083-95.
221. Bengtsson, A.A. and L. Ronnblom, *Role of interferons in SLE*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2017. **31**(3): p. 415-428.
222. Hron, J.D. and S.L. Peng, *Type I IFN protects against murine lupus*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 2134-42.
223. Nickerson, K.M., et al., *Exacerbated autoimmunity in the absence of TLR9 in MRL.Fas(lpr) mice depends on Ifnar1*. J Immunol, 2013. **190**(8): p. 3889-94.
224. Hadj-Slimane, R., et al., *An essential role for IFN-alpha in the overexpression of Fas ligand on MRL/lpr lymphocytes and on their spontaneous Fas-mediated cytotoxic potential*. J Interferon Cytokine Res, 2004. **24**(12): p. 717-28.

225. Boor, P.P.C., et al., *JAK-inhibitor tofacitinib suppresses interferon alfa production by plasmacytoid dendritic cells and inhibits arthrogenic and antiviral effects of interferon alfa*. *Transl Res*, 2017. **188**: p. 67-79.
226. Pober, J.S., et al., *Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon*. *J Immunol*, 1986. **137**(6): p. 1893-6.
227. Price, D.T. and J. Loscalzo, *Cellular adhesion molecules and atherogenesis*. *Am J Med*, 1999. **107**(1): p. 85-97.
228. Wan, W. and P.M. Murphy, *Regulation of atherogenesis by chemokines and chemokine receptors*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2013. **61**(1): p. 1-14.
229. Heller, E.A., et al., *Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells*. *Circulation*, 2006. **113**(19): p. 2301-12.
230. Zhao, B., et al., *Effect of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on gene expression in human endothelial cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. **284**(6): p. C1577-83.
231. Buttman, M., et al., *Interferon-beta is a potent inducer of interferon regulatory factor-1/2-dependent IP-10/CXCL10 expression in primary human endothelial cells*. *J Vasc Res*, 2007. **44**(1): p. 51-60.
232. Kaplanski, G., et al., *IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation*. *Trends Immunol*, 2003. **24**(1): p. 25-9.
233. Chomarat, P., et al., *IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(6): p. 510-4.
234. Libby, P., *Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy: Biological Basis of CANTOS and Beyond*. *J Am Coll Cardiol*, 2017. **70**(18): p. 2278-2289.
235. Fiorentino, D.F., et al., *Pillars Article: IL-10 Inhibits Cytokine Production by Activated Macrophages*. *J. Immunol.* 1991. **147**: 3815-3822. *J Immunol*, 2016. **197**(5): p. 1539-46.
236. Huber, S.A., et al., *Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(10): p. 2364-7.
237. Collaboration, I.R.G.C.E.R.F., et al., *Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies*. *Lancet*, 2012. **379**(9822): p. 1205-13.
238. Habib, J.B., et al., *Preservation of endothelium-dependent vascular relaxation in cholesterol-fed rabbit by treatment with the calcium blocker PN 200110*. *Circ Res*, 1986. **58**(2): p. 305-9.
239. Ludmer, P.L., et al., *Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries*. *N Engl J Med*, 1986. **315**(17): p. 1046-51.
240. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. *Nature*, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
241. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
242. Anderson, T.J., et al., *Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. *Am J Cardiol*, 1995. **75**(6): p. 71B-74B.
243. Kinoshita, K., et al., *Blockade of IL-18 receptor signaling delays the onset of autoimmune disease in MRL-Fas^{lpr} mice*. *J Immunol*, 2004. **173**(8): p. 5312-8.
244. Zevallos, V.F., et al., *Dietary wheat amylase trypsin inhibitors exacerbate murine allergic airway inflammation*. *Eur J Nutr*, 2019. **58**(4): p. 1507-1514.

245. Dos Santos Guilherme, M., et al., *Dietary Wheat Amylase Trypsin Inhibitors Impact Alzheimer's Disease Pathology in 5xFAD Model Mice*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(17).
246. Caiello, I., et al., *IL-6 amplifies TLR mediated cytokine and chemokine production: implications for the pathogenesis of rheumatic inflammatory diseases*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e107886.
247. Kim, T.H., et al., *IL-6 induction of TLR-4 gene expression via STAT3 has an effect on insulin resistance in human skeletal muscle*. Acta Diabetol, 2013. **50**(2): p. 189-200.
248. Kimura, A. and T. Kishimoto, *IL-6: regulator of Treg/Th17 balance*. Eur J Immunol, 2010. **40**(7): p. 1830-5.
249. Kennedy, M.N., et al., *A complex of soluble MD-2 and lipopolysaccharide serves as an activating ligand for Toll-like receptor 4*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34698-704.
250. Greenhill, C.J., et al., *IL-6 trans-signaling modulates TLR4-dependent inflammatory responses via STAT3*. J Immunol, 2011. **186**(2): p. 1199-208.
251. Park, S.J., et al., *IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3844-54.
252. Pons-Estel, G.J., M.F. Ugarte-Gil, and G.S. Alarcon, *Epidemiology of systemic lupus erythematosus*. Expert Rev Clin Immunol, 2017. **13**(8): p. 799-814.
253. Ocampo-Piraquive, V., et al., *Mortality in systemic lupus erythematosus: causes, predictors and interventions*. Expert Rev Clin Immunol, 2018. **14**(12): p. 1043-1053.

8 Anhang

8.1 Materialliste

8.1.1 Geräte

Autoklav	Systemec GmbH, D
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific Inc., USA HERAcell 150i, Serial No 41329682
Einkanal-Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, D „Reference“ 0,5 – 10 µl „Reference“ 10 – 100 µl „Reference“ 100 – 1000 µl
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, USA AF 20 AS 230/50/1
elektronische Pipette	Sartorius AG, D Biohit, 16001441
ELISA Reader	Thermo Fisher Scientific Inc., USA Appliskan MR, Seriennr.: 2001-2070082
ELISA-Washer	Thermo Fisher Scientific Inc., USA Microplate Washer, Serial No 888-1233A
Feinwaage	Ohaus Corporation, USA Analytical Plus, Model No AP110S
Gefrierschrank, -40 °C	Liebherr, D
Gefrierschrank, -80 °C	Thermo Fisher Scientific Inc., USA TSX Series, TSX60086V
Gelkammer	Owl Separation Systems, Asheville, USA EasyCast Electrophoresis System Model #B2, Serial No. 067705 PEQLAB Biotechnologie GmbH,

Anhang	Model: 40-1214, Serial No: 019088
Kryostat	Leica, Wetzlar, D Modell CM 1850-1-1
Kühlschrank	Liebherr, D Premium NoFrost
Lichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D Axiophot mit ICS Optik, Kamera: AxioCam MRc
LightCycler	Roche AG, CH LightCycler 480 II, Seriennr.: 25515
MACS	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, D Multistand, 004266 mit MidiMACS
MACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, D gentleMACS™ Dissociator, Cat No 130-093-235
Mehrfachdispenser	Eppendorf AG, Hamburg, D Multipette plus, Order No 4981 000.019
Molekular Imager	BIO-Rad Laboratories, California, USA Universal Hood II, Serial No: 720BR/01952
PCR-Cycler	Biometra, Göttingen, D T Gradient Thermocycler 96, Serial No 1409207
Photometer	Thermo Fisher Scientific Inc., USA NanoDrop 2000 Spectrophotometer, P826
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, D Modell 990550
Stainless Steel Beads	Qiagen, Hilden, D 5mm Durchmesser, Serial No. 69989
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific Inc., USA ScientificHERASafe KS 12, Serial No 41342410

Anhang

Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, D Thermomixer comfort, No 5355 00472
Tischzentrifuge	Qualitron Inc., Pakistan Catalog No.: DW-41-230-NEW
TissueLyser	Qiagen, Hilden, D TissueLyser LT, Serial No 23.1001/07485
Voltmeter	Biometra GmbH, Göttingen, D Powerpack P25, 9312217
Vortexer	Thermo Fisher Scientific Inc., USA Vortex Genie-2 Model No G560E
Waage	Sartorius Laboratory, Göttingen, D Fabr.-Nr. 36030012
Wasserbad	memmert, Schwabach, D Typ: WNB 7
Zentrifugen	Eppendorf AG, Hamburg, D Modell 5417R Thermo Fisher Scientific Inc., USA Heraeus Multifuge X3R, Serial No 75004515

8.1.2 Verbrauchsartikel

CellStrainer	Corning, Durham, USA 40 µm, REF 431750 70 µm, REF 352350 100 µm, REF 431752
Combitips	Eppendorf AG, Hamburg, D Combitips advanced 5 ml, Cat No 0030089456 Combitips advanced 10 ml, Cat No 0030089464

Anhang	Combitips advanced 25 ml, Cat No 0030089472
C-Tubes	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, D gentleMACSTM C-Tubes, Cat No 130-093-237
Deckgläser	IDL GmbH & Co. KG, Nidderau, D 24 x 60 mm, Art.-Nr. 190002460
ELISA-Platte	Corning Inc., USA Costar Assay Plate, 96 Well, REF 9018
Falcon-Röhrchen	Greiner bio-one, D Röhrchen, 50 ml, REF 227261 Röhrchen, 15 ml, REF 188271
Handschuhe	Carl Roth GmbH + Co. KG, CH Latex Einmalhandschuhe, L-951.1
Kanülen	Becton Dickinson, USA BD Microlance 3, 26G, REF 303800 BD Microlance 3, 18G, REF 304622
Kryoschale	Sakura Finetek, USA Tissue-Tek Cryomold, 0004228-01
Kryotomklingen	FEATHER Safety Razor Co. Ltd., Japan Microtome Blades, Typ A35
Färbekasten	Carl Roth GmbH & Co KG, CH H554.1 nach Hellendahl, H550.1
LS Column	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, D LS Column, 130-042-401
Multiwellplatte	Greiner bio-one, D Zellkulturplatte 96 Well, REF 650180 Zellkulturplatte 24 Well, REF 662160

Anhang

	Zellkulturplatte 6 Well, REF 657160
Objektträger	Thermo Fisher Scientific Inc., USA Menzel-Gläser, SUPERFROST Plus, REF J1800AMNZ
Parafilm	Thermo Fisher Scientific Inc., USA Bemis Parafilm M, PM-996
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co, D 0,5-20 µl (weiß) 10-200 µl (gelb) 100-1000 µl (blau)
Plasmaröhrchen	Greiner bio-one, D MiniCollect, 1ml, K3EDTA, REF 450474
Plate Sealer	Greiner bio-one, D Ampliseal, REF 676040
Reaktionsgefäße	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, D 0,5 ml SafeSeal Reagiergefäß REF 72.704 1,5 ml Reagiergefäß 72.690.001 2 ml SafeSeal Reagiergefäß 72.695.500
RTQ-PCR-Platte	Greiner bio-one, D Sapphire Microplate, 96 Well, REF 669285
Sterile Syringe Filter	VWR International, USA PN: 514-0061
Skalpell	Feather Safety Razor Co., LTD., Japan Safeshield Scalpel No. 11 pfm, REF 02.001.40.011
Spritzen	Becton Dickinson, USA 20 ml, BD Discardit II, REF 300296 10 ml, BD Discardit II, REF 309110

Anhang

	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
	1 ml, Injekt-F, REF 9166017V
Stripetten	Greiner bio-one, D
	50 ml, REF 768180
	25 ml, REF 760180
	10 ml, REF 607180
	5 ml, REF 606180
Terralin	Schülke & Mayr GmbH, D
	Terralin Liquid, 1551356
Wachsstift	DAKO GmbH, Jena, D
	Dako Pen, REF S2002
Zellkulturschale	Corning Durham, USA
	100/20 mm, 500001672
Zellschaber	Corning Durham, USA
	Cell Scraper, 3010
8.1.3 Reagenzien und Kits	
0.5% Trypsin-EDTA (10x)	Gibco, Grand Island, NY, USA
	15400-054
2-Methylbutan	Carl-Roth GmbH & Co. KG, CH
	Art. Nr. 3927.1
50 bp Ladder, Trackit 50 bp	Invitrogen, Waltham, MA, USA
	Cat. No. 10488-043
ABC-Complex Standard	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
	PK-6100
Aceton	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
	131007.1211

Anhang	
Agarose Standard	Carl Roth GmbH & Co. KG, CH, Rotigarose Art.-Nr. 3810.3
Aqua dest.	Fresenius Kabi France, F Amupwa®, B207151-06
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA SP-2001
BSA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D Albumin bovine Fraction V pH 7.0, 11930.03
CD31 Microbeads	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, D 130-097-418,
CD45 Microbeads	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, D 130-052-301,
Collagenase I	gibco, Grand Island, NY, USA 17100-017
Collagenase VIII	Sigma Life Science, St. Louis, MO, USA C2139-1G
DAB-Lösung	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA SK-4100
DEPC-treated Water	Ambion, USA AM9922
Dispase	gibco, Grand Island, NY, USA 17105-041
DMEM +GlutaMAX	gibco, Grand Island, NY, USA 31966-021
EndothelialCell Medium	PromoCell, Heidelberg, D Growth Medium Kit, C-22110
Ethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, D

Anhang

	A2551, 2500
FCS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D filtr. Bovine serum EU Professional, P30-8500
Gelred Nucleid Acid Stain	BIOTIUM, CA, USA Cat. No. 41003
Glykol/Harzlösung	Sakura Finetek Germany GmbH, D Tissue-Tek, OCT Compound, REF 4583
Hämalaun	AppliChem GmbH, Darmstadt, D Meyers Hämalaun, A0884.0500
HEPES (1M in H2O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA 83264
Methanol	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D Art. Nr. 8388.5
murin rekombinantes IFN β	PBL Assay Science, Piscataway, NJ, USA Cat No 12400-1
murin rekombinantes IFN γ	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, D Cat No 130-105-774
murin rekombinantes IL1 β	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA Cat No 401-ML-005
human rekombinantes IL6	PeptoTech GmbH, D CatNo: 200-06
human rekombinantes TNF α	PeptoTech GmbH, D Cat No 200-06
murine IL-6 ELISA	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA Cat. No. DY406
Natronlauge 5M	MERCK, Darmstadt, D 1.09913.0001

Anhang

Normalserum (rabbit)	DAKO, Glostrup, DNK X0902
PBS	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, D8537
PenStrep	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA P0781-100ML
Permout	Thermo Fisher Scientific Inc., USA Permout Mounting Media, SP15-100
REDTaqReadyMixPCR	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Cat. No. R2523-100RXN
RNA-Isolation	Analytik Jena GmbH, Jena, D inuPREP RNA Mini Kit 2.0, REF 845-KS-2040250
Roti-Histofix 4%	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D Art. Nr. P087.6
RTQ-PCR	Qiagen, Hilden, D QuantiNova SYBR Green RT-PCR Kit, REF 208156
Salzsäure 32%	MERCK, Darmstadt, D EMSURE 1.00319.1000
Schwefelsäure 1M	MERCK KGaA, Darmstadt, D K26573231 921
TMB Substrat-Reagent Set	BD Biosciences, San Diego, CA, USA Cat No. 555214
TRIS PUFFERAN	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D Art. Nr. 4855.2
Tween 20	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, D Cat No. 822184
Wasserstoffperoxid 30 %	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D

8.1.4 Puffer

ACK-Lyse Puffer	0,15 M NH ₄ Cl; 10 mM KHCO ₃ ; 0,1 mM Na ₂ EDTA in H ₂ O, pH = 7,4
Base-Lösung 50x (DNA-Extraktion)	12,5 ml 5N NaOH, 1 ml 0,5 M EDTA, 36,5 ml Aqua _{dest} , pH12
Blocking Solution (ELISA)	1% BSA in 1x PBS
Blocking Solution (IHC, CD4)	5% rabbit-serum, 10% BSA in 1x PBS
Blocking Solution (IHC, CD68)	10% rabbit-serum, 10% BSA in 1x PBS
Collagenase/Dispase-Solution	7,5 mg Collagenase VIII, 50µl 1M HEPES, 5ml HBSS, 1 U/ml Dispase, 250 U/ml Collagenase I
EDTA (Zellisolation)	pH 8 0,5 M EDTA in H ₂ O pH 8
Elektrophorese Puffer 50x TAE Puffer	2 M Tris; 1 M Essigsäure; 50 mM Na ₂ EDTA in H ₂ O, pH = 8,3
MACS-Puffer	50 ml PBS (pH 7,2) + 500 µl FCS + 200 µl 0,5 M EDTA
Neutralisationslösung 50x (DNA-Extr.)	15,75 g Tris-HCL in 50 ml Aqua _{dest} , pH5
Reagent Diluent (ELISA)	1 % BSA in 1x PBS
Waschpuffer (ELISA)	0,05% Tween 20 in 1x PBS
Waschpuffer (IHC, CD4)	1x PBS, 0,1 % BSA, 1 % FBS
Waschpuffer (IHC; CD68)	1x PBS, 0,1 % BSA

Anhang

8.1.5 Primer

PCR

Fas Primer (forward) 5'GTA AAT AAT TGT GCT TCG TCA G'3

Fas/Etn Primer (reverse) 5'TAG AAA GGT GCA CGG GTG TG'3

Fas Primer (reverse) 5'CAA ATC TAG GCA TTA ACA GTG'3

NEO 3 (forward) 5'CGT CCA GAT CAT CCT GAT C'3

NEO 4 (reverse) 5'ATT GAA CAA GAT GGA TTG CAC'3

IL-6 (forward) 5'TTC CAT CCA GTT GCC TTC TTG 248 G'3

IL-6 (reverse) 5'TTC TCA TTT CCA CGA CGA TTT CCC'3

RTQ-PCR

QuantiTect Primer Assay

Qiagen, Hilden, D

Mm_IL-6_1_SG, QT00098875

Mm_IL-1 β _2_SG, QT01048355

Mm_IL-34_1_SG, QT00198142

Mm_CSF-1_1_SG, QT01164324

Mm_IL-18_1_SG, QT00171129

Mm_CD68_1_SG, QT00254051

Mm_CD4_1_SG, QT00096166

Mm_TNF-alpha_1_SG, QT00104006

Mm_S100a8_1_SG, QT00250264

Mm_Actb_2_SG, QT01136772

Mm_Ccl2_1_SG, QT00167832

Mm_Vcam1_1_SG, QT00128793

Mm_Icam1_1_SG, QT00155078

Mm_Cxcl10_1_SG, QT00093436

Mm_Vegfa_1_SG, QT00160769

Anhang

weitere Primer

SIGMA Aldrich, St. Louis, MO, USA

IFN-alpha forward:

5'-TGC TGG CTG TGA GGA CAT AC-3'

IFN-alpha reverse:

5'-TCC 550 TCT CCA CAC TTT GTC TCA G-3'

8.1.6 Antikörper

CD4

BD Biosciences, San Diego, CA, USA

purified rat anti-mouse CD4 (0,5 mg/ml), Cat. No. 553043

CD68

Bio-Rad AbD Serotec Limited, Oxford, GBR

purified rat anti-mouse CD68 (0,25 mg/ml), Cat. No. 1957

IgG

Abcam, Cambridge, GBR

DyLight® 488 labeled goat anti-mouse IgG (H+L), ab96879

anti-rat

Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Biotinylated rabbit anti-rat, mouse adsorbed, Cat. No. BA-4001

8.2 Klassifikation des SLE

Kriterium	Definition
Schmetterlingserythem	fixes Erythem, flach oder erhaben über den Wangen, oft Aussparung der Nasolabialfalten
Diskoider Hautbefall	erythematös, keratotisch, atrophe Narben
Photosensibilität	Hautreaktion auf Sonnenlicht
Orale Ulzeration	orale oder nasopharyngeale Ulzerationen, i.d.R. schmerzlos
Arthritis	nichterosive Arthritis von ≥ 2 peripheren Gelenken
Serositis	Pleuritis und/oder Perikarditis
Nierenbefall	Proteinurie $\geq 0,5$ g/d oder $\geq 3+$ und/oder zelluläre Zylinder
Neurologischer Befall	Krampfanfälle und/oder Psychose
Hämatologischer Befall	Hämolytische Anämie mit Retikulozytose und/oder Leukopenie $\leq 4000/\mu\text{l}$ und/oder Lymphopenie $\leq 1500/\mu\text{l}$ und/oder Thrombozytopenie $\leq 100000/\mu\text{l}$
Immunologische Auffälligkeiten	anti-ds-DNA-Antikörper und/oder anti-Sm-Antikörper Antiphospholipid Antikörper erhöhte Serumspiegel IgG oder IgM Anticardiolipin-Ak Nachweis Lupus-Antikoagulans falsch-positiver Syphilis-Test ≥ 6 Monate
Antinukleäre Antikörper	Positiver ANA-Titer

Tabelle 8 ACR-Kriterien zur Klassifikation des SLE von 1982 mit Update 1997 [1, 2]

9 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung vorliegender Arbeit unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt hierbei meiner Doktormutter, ..., für die Überlassung des Themas, die exzellente Betreuung während des gesamten Promotionsvorhabens und das große Vertrauen.

Weiterhin bedanke ich mich bei ... für die Bereitschaft zur Zweitbegutachtung dieser Arbeit.

Ich danke ... und ... für die gelungene Zusammenarbeit bei den Endothelfunktionsmessungen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere ..., ..., ... und ... für die Unterstützung bei dem experimentellen Teil der Arbeit und die angenehme, fördernde Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ganz herzlich danken möchte ich auch meinen Eltern für ihre Unterstützung jeglicher Art während meines gesamten Studiums. Außerdem bedanke ich mich bei meiner Freundin ..., die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit stets motiviert und unterstützt hat.

10 Tabellarischer Lebenslauf

