

Aus der Medizinischen Klinik  
mit Schwerpunkt Rheumatologie und klinische Immunologie CCM  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## **DISSERTATION**

### **Thema:**

*Der Einfluss von Schwangerschaft auf den Adipozytokin- und den  
Peroxisom-Proliferator-aktivierten Signalweg in peripheren  
mononuklearen Blutzellen bei gesunden Spendern und Patienten mit  
rheumatoider Arthritis.*

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Janine Weix

aus Kassel

Datum der Promotion: 25. Oktober 2013

**Für Oma, Mama, Papa  
und Frau Schneider**

## Inhaltsverzeichnis

Abstrakt .....	4
Ausführliche Anteilserklärung .....	6
Ausgewählte Publikation.....	10
Lebenslauf .....	20
Publikationsliste .....	22
Selbständigkeitserklärung.....	23
Eidesstattliche Versicherung .....	23
Danksagung .....	24

## **Abstrakt**

### Deutsch:

Ziel der Studie: Identifikation von Kandidatengenen, welche durch die Schwangerschaft beim Menschen reguliert werden und potentiell die Krankheitsaktivität bei Rheumatoider Arthritis (RA) beeinflussen können.

Methoden: Periphere mononukleare Blutzellen (PBMC) von gesunden Spenderinnen wurden zu 4 Zeitpunkten der Schwangerschaft entnommen (je einmal während des ersten, zweiten und dritten Trimesters, sowie sechs Wochen post partum) und die daraus isolierte Messenger RNA (mRNA) mit Hilfe von Affymetrix GeneChips analysiert. Basierend auf den GeneChip Daten wurden ausgewählte Zielgene per quantitativer real-time Polymerasekettenreaktion (qPCR) analysiert. Hier wurden PBMC von gesunden Spenderinnenn, sowie von RA Patientinnen verwendet. Um die zelluläre Quelle der Kandidaten mRNA zu bestimmen, wurden Monozyten und T-Lymphozyten von gesunden Spenderinnenn und von RA Patientinnen mit Hilfe von Magnetic Beads positiv selektioniert und auch die daraus isolierte RNA per qPCR analysiert.

Resultate: Durch einfache Varianzanalyse konnten 1286 mRNAs identifiziert werden, die im Bezug auf die vier Zeitpunkte unterschiedlich exprimiert waren. Die Unterschiede wurden dabei größer, je weiter die Schwangerschaft voran geschritten war, um dann post partum wieder kleiner zu werden. Die anschließende Signalweganalyse wies auf eine regulatorische Rolle der Schwangerschaft im Adipozytokin-Signalweg, sowie im Peroxisom-Proliferator-aktivierten (PPAR) Signalweg hin. Von den 19 selektierten Kandidatengenen zeigten AKT3, SOCS3, FADS2, STAT1, und CD36 eine durch Schwangerschaft beeinflusste Regulation. In den Proben der schwangeren RA Patientinnen waren die Unterschiede konform zu denen der gesunden Kontrollen, jedoch waren sie bei den RA Patientinnen ausgeprägter. Sowohl T-Lymphozyten als auch Monocyten trugen zur regulierten Expression dieser Gene bei.

Schlussfolgerung: Die Resultate zeigen, dass normale Schwangerschaft beim Menschen zu Veränderungen der Genexpression in verschiedenen molekularen Signalwegen bei PBMC führt. Diese Veränderungen werden jedoch postpartum

wieder rückgängig gemacht. Veränderungen bei RA Patientinnen, obwohl in dieselbe Richtung gehend, überschreiten jedoch die bei Gesunden festgestellten Veränderungen. Gene aus dem Adipozytokin- und Peroxisom-Proliferator-aktivierten (PPAR) Signalweg kommen als Kandidaten für die Modulation von Krankheitsaktivität bei RA in Frage.

#### Englisch:

**Objective.** To identify candidate genes that are regulated by human pregnancy and have the potential to modulate rheumatoid arthritis (RA) disease activity.

**Methods.** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy pregnant volunteers were analyzed using Affymetrix GeneChips at 4 time points (during the first, second, and third trimesters and 6 weeks postpartum). Based on the GeneChip data, target genes were further analyzed via real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using PBMCs from healthy controls and RA patients. In order to determine the cellular source of the candidate gene messenger RNA (mRNA), monocytes and lymphocytes from healthy controls and RA patients were positively selected using magnetic beads, and their mRNA was analyzed by qPCR.

**Results.** One-way analysis of variance identified 1,286 mRNAs that were differentially expressed with regard to the 4 time points. The changes became more pronounced as pregnancy progressed, and they were reversed postpartum. A subsequent pathway analysis suggested a regulatory role of pregnancy on the adipoadipocytokine pathway as well as on the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) signaling pathway. Of 19 preselected candidate genes, AKT3, SOCS3, FADS2, STAT1, and CD36 proved to be differentially regulated by pregnancy. In samples from RA patients, the differences were concordant with those in healthy controls but more pronounced. Both T lymphocytes and monocytes contributed to the regulated expression of these genes.

**Conclusion.** Our findings indicate that normal human pregnancy leads to changes in the expression of several molecular pathways in PBMCs, which are reversed postpartum. Changes in RA patients, although concordant, exceed the levels observed in healthy controls. Genes of the adipocytokine and PPAR signaling pathways qualify as candidates for the modulation of RA disease activity during pregnancy.

## **Ausführliche Anteilserklärung**

Janine Weix hatte folgenden Anteil an der eingereichten Publikation:

**Weix J**, Förger F, Häupl T, Surbek D, Østensen M, Villiger PM, Influence of pregnancy on the adipocytokine and peroxisome proliferator-activated receptor pathways in peripheral blood mononuclear cells from healthy donors and rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2012 Jul;64(7):2095-103

Beitrag im Einzelnen:

### **Beteiligung an Idee, Konzept und Design der Studie**

- Der Projektantrag war bereits gestellt und bewilligt.
- Mitbeteiligung an Erstellung weiterer Anträge für Folgeprojekte, wodurch weitere Ideen für Experimente zu diesem Manuskript entstanden.

### **Beteiligung an Auswahl der Testverfahren**

- Literaturrecherche und -studium für Vorschläge zu den verschiedenen Methoden
- Recherche und Unterbreitung der Vorschläge für die verschiedenen Methoden
- Vorschläge für Durchführung der Methoden
- Beteiligung an der Auswahl der Methoden

### **Aufbereitung der Proben**

- Beteiligung an Auswahl der Probanden und Definition der Kriterien für einheitliche Gruppenbildung
- Beteiligung an der Aufklärung der Probanden
- Abholung der Blutproben an den verschiedenen Standorten
- Aufreinigung der Proben:
  - o Isolierung der PBMC aus Vollblut (Ficoll Gradient)
  - o Zellzahlbestimmung
  - o Lysieren der Zellen
  - o Isolation T-Lymphozyten und Monozyten (positive Magnetic Bead Selektionierung)
- Beschriftung und Einlagerung der Proben bei -80°C
- Verwaltung der Proben

## **Vorbereitung und Durchführung der Versuche**

- Planung der Experimente aufgrund Verfügbarkeit der Proben
- Kalkulation und Bestellung der benötigten Materialien
- Designen und Bestellen der Primer
- Isolation der mRNA
- Messung der isolierten mRNA Menge
- Qualitätsbestimmung bei mRNA
- Einlagerung mRNA bei -80°C
- Mitbeteiligung an Durchführung der Affymetrix Human Gene 1.0 ST (GeneChip) Experimente. Die Experimente wurden in der Core Facility in Basel durchgeführt. JW hat die Proben vorbereitet. Ab dem vorletzten Schritt, der Hybridisierung hat der Mitarbeiter der Core Facility übernommen und JW dann die Rohdaten aus den Messungen übergeben.
- Vorbereitung und Durchführung der qPCRs

## **Aufbereitung und Auswertung der Ergebnisse**

- Aufbereitung der Rohdaten
- Analyse der GeneChip-Ergebnisse mit verschiedenen Algorithmen
- Analyse der qPCR Ergebnisse mit verschiedenen Statistik-Methoden
- Mitbeteiligung an der Interpretation der Ergebnisse, d.h. Vorstellung der Ergebnisse vor den anderen Autoren, Diskussion über die Ergebnisse mit den anderen Autoren, gemeinsame Entscheidung zur weiteren Vorgehensweise.

## **Erstellung der Grafiken**

- Erstellung der Vorschläge für die Grafiken der Publikation
- Beteiligung an der Auswahl der Grafiken
- Nach Auswahl, entsprechende Anpassung der Grafiken
- Fertigstellung der Grafiken für Manuskript

## **Literaturrecherche und -studium**

- Recherche und Studium der Literatur für das Anfertigen des Manuskripts
- Zusammenstellung der Literaturliste aus Ergebnissen eigener Recherche und aus der Recherche von F. Förger.

## **Erstellung mehrerer Teile des Manuskripts, Überarbeitung des Manuskripts**

- Erstellung der Teile Methoden und Resultate, sowie Teile der Einleitung,

Diskussion und des Abstracts. – Überarbeitung und Ergänzung durch F. Förger.

- Beteiligung abschließende Überarbeitung durch alle Autoren.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift der Doktorandin

---



ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>

Journal Citation Reports<sup>®</sup>

WELCOME ? HELP

2011 JCR Science Edition

Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)

Journals from: **subject categories RHEUMATOLOGY** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by: **Impact Factor** [SORT AGAIN](#)

Journals 1 - 20 (of 29)

Navigation icons: [ 1 | 2 ]

Page 1 of 2

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data <sup>↓</sup>						Eigenfactor <sup>®</sup> Metrics <sup>↓</sup>	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>®</sup> Score	Article Influence <sup>®</sup> Score
<input type="checkbox"/>	1	ANN RHEUM DIS	0003-4967	24321	8.727	7.792	2.475	364	5.5	0.06822	2.371
<input type="checkbox"/>	2	NAT REV RHEUMATOL	1759-4790	1196	8.388	8.395	1.561	66	1.9	0.00793	3.351
<input type="checkbox"/>	3	ARTHRITIS RHEUM-US	0004-3591	43887	7.866	7.979	1.542	406	7.6	0.09867	2.648
<input type="checkbox"/>	4	NAT CLIN PRACT RHEUM	1745-8382	1058	5.846	5.246		0	4.4	0.00644	1.800
<input type="checkbox"/>	5	SEMIN ARTHRITIS RHEU	0049-0172	3001	4.969	4.860	0.516	93	7.5	0.00613	1.466
<input type="checkbox"/>	6	ARTHRIT CARE RES	2151-464X	7910	4.851	5.045	0.506	247	4.3	0.03133	1.670
<input type="checkbox"/>	7	ARTHRITIS RES THER	1478-6354	7538	4.445	4.689	0.550	271	4.4	0.03082	1.530
<input type="checkbox"/>	8	CURR OPIN RHEUMATOL	1040-8711	3426	4.309	4.000	1.102	88	5.4	0.01112	1.362
<input type="checkbox"/>	9	RHEUMATOLOGY	1462-0324	11896	4.058	4.401	1.157	286	5.1	0.03900	1.396
<input type="checkbox"/>	10	OSTEOARTHR CARTILAGE	1063-4584	7723	3.904	4.365	0.812	170	5.2	0.02327	1.279
<input type="checkbox"/>	11	J RHEUMATOL	0315-162X	20898	3.695	3.649	0.779	362	9.0	0.03633	1.117
<input type="checkbox"/>	12	RHEUM DIS CLIN N AM	0889-857X	1773	3.020	2.950	0.300	40	8.0	0.00437	0.985
<input type="checkbox"/>	13	BEST PRACT RES CL RH	1521-6942	1888	2.653	3.494	0.063	63	5.3	0.00633	1.065
<input type="checkbox"/>	14	SCAND J RHEUMATOL	0300-9742	2596	2.472	2.520	0.526	76	8.0	0.00475	0.723
<input type="checkbox"/>	15	LUPUS	0961-2033	4338	2.337	2.392	0.283	191	6.2	0.01042	0.658
<input type="checkbox"/>	16	JOINT BONE SPINE	1297-319X	2100	2.274	2.247	0.496	113	4.4	0.00671	0.594
<input type="checkbox"/>	17	CLIN EXP RHEUMATOL	0392-856X	5042	2.148	2.151	0.301	226	6.2	0.01114	0.548
<input type="checkbox"/>	18	CLIN RHEUMATOL	0770-3198	4068	1.996	1.722	0.433	231	4.7	0.01271	0.486
<input type="checkbox"/>	19	RHEUMATOL INT	0172-8172	3024	1.885	1.673	0.467	270	4.3	0.00907	0.438
<input type="checkbox"/>	20	BMC MUSCULOSKEL DIS	1471-2474	2444	1.577	2.324	0.172	285	3.9	0.01155	0.737

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Journals 1 - 20 (of 29)

Navigation icons: [ 1 | 2 ]

Page 1 of 2

## **Ausgewählte Publikation**

**Weix J**, Förger F, Häupl T, Surbek D, Østensen M, Villiger PM. Influence of pregnancy on the adipocytokine and peroxisome proliferator-activated receptor pathways in peripheral blood mononuclear cells from healthy donors and rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2012 Jul;64(7):2095-103. doi: 10.1002/art.34375.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationsliste

- (1) **Weix J**, Häupl T, Raio L, Villiger PM, Förger F, Pregnancy and rheumatoid arthritis can give rise to an increased expression of some type I IFN-inducible genes, *Transl Res.* 2013 Mar 15. doi:pii: S1931-5244(13)00069-8. 10.1016/j.trsl.2013.02.007. [Epub ahead of print]
- (2) **Weix J**, Förger F, Häupl T, Surbek D, Østensen M, Villiger PM, Influence of pregnancy on the adipocytokine and peroxisome proliferator-activated receptor pathways in peripheral blood mononuclear cells from healthy donors and rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2012 Jul;64(7):2095-103
- (3) Adler S, Krivine A, **Weix J**, Rozenberg F, Launay O, Huesler J, Guillevin L, Villiger PM., Protective effect of A/H1N1 vaccination in immune-mediated disease--a prospectively controlled vaccination study., *Rheumatology (Oxford).* 2012 Apr;51(4):695-700.

# Selbständigkeitserklärung

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Janine Weix, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema *"Der Einfluss von Schwangerschaft auf den Adipozytokin- und den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Signalweg in peripheren mononuklearen Blutzellen bei gesunden Spendern und Patienten mit rheumatoider Arthritis"* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

## Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater und wissenschaftlichen Betreuer PD Dr. med. Thomas Häupl, meinem externen Betreuer Prof. Dr. med. Peter Villiger, sowie Dr. med. Frauke Förger und dem gesamten Team der Rheumaforschung in Berlin und Bern für die Betreuung und Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Meinen Eltern, meiner Oma und meinem Bruder danke ich von ganzem Herzen dafür, dass sie mir das notwendige Selbstvertrauen mitgegeben und immer an mich geglaubt haben, sowie für ihren uneingeschränkten Rückhalt. Ihr seid die Besten!

Ich danke all meinen lieben Freunden, speziell Dirk, Kathrin, Véronique, Andreas, Anke und Elisa dafür, dass sie mich immer wieder motiviert haben, jederzeit für mich da waren und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Schließlich danke ich Wulf Maurer, der mir für meinen Ausbildungsweg die besten Grundlagen gegeben hat.