

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

Neue Therapieansatzpunkte des  
Systemischen Lupus Erythematodes  
- Caspase-1 Inhibition als Therapietarget -

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
vorgelegt von

Federica Fasola  
aus Mailand

Mainz, 2019

Tag der Promotion:

09.07.2019



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung/ Ziel der Dissertation</b> .....	<b>10</b>
<b>2. Literaturdiskussion</b> .....	<b>12</b>
2.1 Der Systemische Lupus Erythematodes (SLE) .....	12
2.2 MRL-Fas <sup>lpr</sup> , ein Lupus-Mausmodell, das dem humanen SLE sehr ähnlich ist	15
2.3 Pathogenese des SLE .....	16
2.4 Rolle der Interleukin-1 Familie in der Pathogenese des SLE .....	17
2.5 IL-18 und IL-1 $\beta$ im MRL-Fas <sup>lpr</sup> Mausmodell .....	20
2.6 Aktivierungsmechanismen von IL-1 $\beta$ und IL-18: NLRP3-Inflammasom und Caspase-1 .....	22
2.7 Rolle des NLRP3-Inflammasoms und der Caspase-1 in der Pathogenese des SLE .....	25
2.8 NLRP3-Hemmung .....	25
2.9 Caspase-1 Hemmung .....	27
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
3.1 Materialien .....	29
3.1.1 Verwendete Laborgeräte .....	29
3.1.2 Verwendete Verbrauchsartikel .....	31
3.1.3 Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	33
3.1.4 Verwendete Puffer und Lösungen .....	42
3.2. Methoden .....	44
3.2.1 Haltung, Behandlung und Untersuchungen der Mäuse .....	44
3.2.2 Gewebekonservierung .....	46
3.2.3 Gewebefärbung .....	46
3.2.4 Immunhistochemie .....	47
3.2.5 Tunel-Assay .....	50
3.2.6 ELISA .....	50
3.2.7 Durchflusszytometrie .....	52
3.2.8 RNase Protection Assay .....	53
3.2.9 Caspase Substrate Assay .....	53
3.2.10 Proteome Profiler Array .....	54
3.2.11 SCOREs .....	55



3.2.12 Patientenkollektiv .....	56
3.2.13 Statistisch angewandten Methoden .....	57
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>60</b>
4.1 Ergebnisse in den Mausmodellen .....	60
4.1.1 Wirkung der Caspase-1 Inhibition auf dem SLE .....	60
4.1.2 Differenzierung der Rolle von IL-18 und IL-1 $\beta$ in der Pathogenese von LN und systemischer Erkrankung .....	65
4.1.3 Spezifizität und Wirkmechanismus der Caspase-1 Hemmung .....	67
4.1.4 Caspase-1 vermittelte Pyroptose .....	68
4.1.5 Caspase-1 vermittelte Aktivierung von Leukozytenpopulationen und Induktion von Zytokinen .....	71
4.2 Ergebnisse im Patientenkollektiv .....	75
4.2.1 IL-18 Konzentration im Serum .....	75
4.2.2 IL-18 Expression in der Niere .....	76
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>78</b>
5.1 Rolle der Caspase-1 im SLE .....	78
5.2 Therapeutischer Wirkmechanismus der Caspase-1 Inhibition .....	81
5.2.1 Spezifizität der Caspase-1 Hemmung .....	81
5.2.2 Differenzierung zwischen der pathogenetischen Rolle von IL-1 $\beta$ und IL-18 .....	81
5.2.3 Pyroptose nach Caspase-1 Hemmung .....	83
5.3 Differenzierung und Aktivierungsstatus der intrarenalen Leukozyten- populationen sowie Expressionsmuster der inflammatorischen Zytokine und Chemokine nach Caspase-1 Inhibition .....	84
5.4 IL-18 im humanen SLE und Ausblick .....	88
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>90</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>93</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>105</b>
8.1 Tabellarische Auswertung .....	105
<b>Danksagung .....</b>	<b>111</b>
<b>Tabellarischer Lebenslauf .....</b>	<b>112</b>



**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ad	zu
AK	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
BAFF	B-cell activating factor
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CRP	C-reaktive Protein
dest.	Destilliert
DLE	Diskoide Lupus erythematoses
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
GC	Glukokortikoid
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HRP	horse-radish- peroxidase
IC	Immunkomplex
IFN	Interferon

Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
LK	Lymphknoten
LN	Lupus Nephritis
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute
Mio	Million
MMF	Mycophenolat Mofetil
NET	Neutrophile extrazelluläre Traps
mRNA	messenger RNA
PBS	Kochsalzlösung
pDC	plasmazytoiden dendritische Zellen
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluoride
PS	Phosphatidylserine
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.c.	subcutan
SCLE	Subakut kutane Lupus erythematoses
sec	Sekunde

SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
TdT	terminale deoxynucleotidyl transferase
TEZ	Tubulusepithelzellen
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TUNEL	Terminal TdT-dependent dUTP biotin nick end labelling assay
WHO	World Health Organisation

## 1. Einleitung und Ziel der Dissertation

Der Systemische Lupus Erythematoses (SLE) ist eine komplexe autoimmune Systemerkrankung, welche nahezu jedes Organ befallen kann und dessen Pathogenese teilweise noch immer unklar ist. Die aktuellen immunsuppressiven Therapiemöglichkeiten des SLE sind mit Nebenwirkungen und Komplikationen verbunden, sodass stets nach neuen Therapieansätzen gesucht wird.

In mehreren wissenschaftlichen Arbeiten wurde bereits die Rolle des IL-18 und des IL-1 $\beta$  in der Pathogenese des SLE untersucht und eine positive Korrelation mit systemischer Erkrankung, Krankheitsaktivität, Lupusnephritis und irreversiblen Organschaden nachgewiesen. Die inaktiven Proformen des IL-18 und des IL-1 $\beta$  werden mittels des Enzyms Caspase-1 (oder IL-1 $\beta$  Converting Enzym) in die biologisch aktive Form des IL-18 und IL-1 $\beta$  überführt. Dieses Enzym stellt somit ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt dar, um den pathogenetischen Effekt von IL-18 und IL-1 $\beta$  zu hemmen.

Die Ziele dieser Arbeit sind die Rolle der Caspase-1 und der durch die Caspase-1 aktivierten Interleukine (IL-18 und IL-1 $\beta$ ) in der Pathogenese des SLE sowie die Wirkung der Caspase-1 Inhibition als Therapiemöglichkeit zu untersuchen. Die Hypothese, dass eine gezielte Caspase-1 Inhibition zu einer Besserung der Krankheitsaktivität führen könnte, soll anhand von vier Gesichtspunkten an einem MRL-Fas<sup>lpr</sup> Lupusmausmodell und anschließend an einem SLE-Patientenkollektiv untersucht werden:

1. Untersuchungen über die Wirkung der Caspase-1 Blockade auf die Entwicklung der Lupusnephritis und der systemischen Krankheitsaktivität im MRL-Fas<sup>lpr</sup> Mausmodell
2. Differenzierung zwischen der Rolle der isolierten IL-18 und IL-1 $\beta$ -Blockade auf die Entwicklung der Lupusnephritis und Krankheitsaktivität im MRL-Fas<sup>lpr</sup> Mausmodell
3. Untersuchung des Wirkmechanismus der Caspase-1 im MRL-Fas<sup>lpr</sup> Mausmodells

- a. Untersuchung der Wirkung der Caspase-1-Blockade auf renaler IL-18, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  und Caspase Expression sowie auf die o.g. Zytokine im Serum und auf die renale Apoptoserate.
  - b. Untersuchung der Effekte auf die intra-renale Zytokin- und Chemokinexpression sowie Anzahl und Aktivierungsstatus infiltrierender Zellen.
4. Translation in den humanen systemischen Lupus erythematodes
- a. IL-18 Konzentrationen im Serum in Korrelation zur Krankheitsaktivität
  - b. Intra-renale Expression von IL-18

## 2. Literaturdiskussion

### 2.1 Der Systemische Lupus Erythematos (SLE)

#### - Klinik, Diagnostik, Therapie, Epidemiologie und Prognose -

Der SLE ist eine komplexe autoimmune Systemerkrankung, die nahezu jedes Organ befallen kann und von einem variablen klinischen Verlauf charakterisiert ist.

Die Prävalenz schwankt zwischen 40 und 400 pro 100.000 Einwohner, je nach ethnischer Zugehörigkeit und Geschlecht. In Deutschland beträgt sie 36,7 pro 100.000 Einwohner mit einem Verhältnis von Frauen zu Männern von 4:1. (1) Die Erkrankung beginnt vor allem zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auf, kann sich allerdings in jeder Altersgruppe, auch im Kindesalter manifestieren.

Der klinische Verlauf zeigt zumeist einen Wechsel von Schüben und zwischenzeitlicher Remission. Die initialen Symptome sind meistens unspezifisch mit febrilen oder subfebrilen Temperaturen, einer ausgeprägten kognitiven und/oder körperlichen Fatigue-Symptomatik, Krankheitsgefühl, Gewichtsverlust sowie Arthralgien und Myalgien.

Dazu zeigen sich Symptome, die zu dem jeweiligen Organbefall passen.

Bei ungefähr 75% der SLE-Patienten ist die Haut betroffen, bei 25 % sogar als Erstsymptom. Der akut kutane Lupus erythematos, der als Schmetterlingserythem oder als generalisiertes makulopapulöses Exanthem auftreten kann ist einer der Lupus erythematos spezifischen Manifestationen. Dazu zählen auch der diskoidale Lupus erythematos (DLE) und der subakut kutane Lupus erythematos (SCLE). Der erste ist durch entzündliche erythematöse Plaques charakterisiert, die zu Vernarbungen und in behaarten Bereichen zur irreversiblen Alopezie führen. Beim SCLE treten symmetrische anuläre Hautveränderungen ohne Narbenbildung auf. Weitere allerdings LE-unspezifische Hautmanifestationen sind z.B. periunguale Teleangiektasien, Livedo Racemosa oder Raynaud-Syndrom.

Eine evidente Nierenbeteiligung tritt bei circa 50 % der SLE Patienten auf, wobei durch immunhistochemische Färbungen von Nierenbiopsien bei fast jedem Patienten eine Immunkomplexnephritis nachzuweisen ist. Das Auftreten einer Lupusnephritis (Glomerulonephritis) ist prognostisch relevant und manifestiert sich mit Proteinurie, Erythrozyturie und Zylindurie sowie im weiteren Krankheitsverlauf mit pathologischen Nierenfunktionsparametern und einer erhöhten Konzentration von harnpflichtigen Substanzen im Serum. Eine Nierenbiopsie ist bereits bei einer geringen Proteinurie



im Bereich von 300-500 mg/d indiziert oder bei wiederholtem Vorliegen eines aktiven Sediments oder einer unklarerer Erhöhung von Nierenfunktionsparametern. Dies ermöglicht eine morphologische Klassifikation in einer der sechs Formen (revidierte histologische Klassifikation der Lupusnephritis 2004), die einer entsprechend differenzierten Therapie bedürfen.

Etwa die Hälfte der Patienten weisen unspezifische und indolente Lymphknoten-Schwellungen auf mit histologischem Nachweis einer folliculären Hyperplasie und vereinzelt Nekrosen. Eine Splenomegalie ist typischerweise mit einer periarteriellen Fibrose (sogenannte „Zwiebelschalen-Läsion“) assoziiert. Eine Leberbeteiligung manifestiert sich durch eine durchaus deutliche Transaminasen-Erhöhung.

Bei etwa 90 % der Patienten kommt es zu Arthralgien, Myalgien und Arthritiden, die bei einem chronischen Verlauf zu nicht destruirenden, in seltenen Fällen auch destruirenden Gelenkdeformierungen (Jaccoud-Arthropathie) führen können.

Mögliche kardiovaskuläre Manifestationen des SLE sind die frühzeitige Arterioklerose, die zu den Haupttodesursachen des SLE zählt, die Libman-Sacks-Endokarditis sowie eine Perikarditis, Myokarditis und Koronararteriitis. Etwas seltener kommt es auch zu einer pulmonalen Beteiligung (z.B. mit einer Pleuritis, Pneumonitis oder Lungenfibrose), sowie zu Manifestationen des zentralen und peripheren Nervensystems (z.B. mit Cephalgien und neuropsychischen Manifestationen) oder des Gastrointestinaltrakts (z.B. mit Diarrhoe, Erbrechen und intestinale Vaskulitiden).

(2)

Zur Diagnosestellung des SLE dienen neben den klinischen Manifestationen, verschiedene Laborparameter. Insbesondere zeigt sich während aktiver SLE-Phasen eine hohe Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG). Das C-reaktive Protein (CRP) ist hingegen normwertig oder nur leicht erhöht. Des Weiteren lassen sich im Blutbild oft Zytopenien (Thrombozyto-, Leukozyto- oder Lymphozytopenie) sowie autoimmunhämolytische Anämien nachweisen.

Darüber hinaus sind serologische Parameter wie antinukleären Antikörpern (ANA), anti-dsDNA, anti-Sm Antikörper, anti-Phospholipid Antikörper sowie ein erniedrigtes Komplement (C3, C4 oder CH50) Teil der immunologischen Parameter zur Klassifizierung des SLE.

Die Therapie des SLE orientiert sich an der Krankheitsaktivität sowie an den vorhandenen Organbeteiligungen. Bis auf ein Medikament (Belimumab) sind die

beim SLE eingesetzten Therapien pathophysiologisch nicht spezifisch ausgerichtet und basieren auf wenigen randomisierten kontrollierten Studien.

Bei allgemeinen konstitutionellen Symptomen sowie bei einem leichten bis mittelschweren Erscheinungsbild werden Antimalariamittel, Glukokortikoide (GC) und nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) empfohlen. Bei persistierender Krankheitsaktivität sollte gegebenenfalls auch eine immunsuppressive Therapie mit Methotrexat, Azathioprin oder Mycophenolat Mofetil (MMF) erwogen werden, um GC einzusparen. (3) (2)

Eine Kombination von GC und Immunsuppressiva sollte bei SLE mit schwerem Verlauf und aktiver Organbeteiligung (z.B. bei einer Glomerulonephritis Klasse III und IV) direkt angesetzt werden. Hier kommen Azathioprin, MMF oder Cyclophosphamid als Induktionstherapie und MMF oder Azathioprin als Erhaltungstherapie in Frage.

2011 wurde Belimumab, ein monoklonaler Antikörper gegen den B-Lymphozytenstimulator Blys, als Zusatztherapie bei Antikörper-positivem SLE, als erstes SLE-spezifisches Medikament in Europa zugelassen. Die Indikation zur Belimumab-Therapie wird bei SLE-Patienten gestellt, bei denen trotz Standardtherapie eine hohe Krankheitsaktivität, Unverträglichkeit gegenüber anderen SLE-Medikamenten oder ein hoher GC-Bedarf besteht. (3) (2) (4) (5)

Dank einer früheren Diagnosestellung sowie eines besseren und zügigeren Managements mit differenzierter Behandlung hat sich die Prognose des SLE innerhalb der letzten 50 Jahren signifikant gebessert (1955 vs. 2003:

Fünfjahresüberlebensrate 5% vs. 95%, Zehnjahresüberlebensrate 0% vs. 92%). (6)

Trotz der verbesserten SLE-Prognose, gibt es immer noch einen nicht geringen Teil von Patienten, die kein oder nur ein unzureichendes therapeutisches Ansprechen durch die medikamentöse Therapie erreichen sowie Patienten, die unter den zugelassenen Medikamenten schwere Nebenwirkungen aufweisen.

Infektionen, kardiovaskuläre Komplikationen und die Lupus Nephritis (LN) tragen in der Tat immer noch in hohem Maße zu Morbidität und Mortalität bei SLE-Patienten bei und eine kürzlich publizierte Studie zeigte eine fehlende Besserung der Mortalität bei SLE-Patienten in den letzten 2 Jahrzehnten. (7) (8) (9)

Belimumab, das einzige zugelassene Biologikum für SLE, wurde in der Phase III der klinischen Studien nicht für Patienten mit schwerer LN zugelassen, die somit auch von der aktuellen einzig möglichen biologischen Therapie ausgeschlossen sind.

Die Therapie des SLE ist somit noch mit großen Schwierigkeiten sowie oft mit

unzureichender Effektivität verbunden und gleicht laut dem Lupus-Experten R.J. Falk „mehr einer Kunst als einer Wissenschaft“. (10) Aus diesem Grunde sind weitere umfassende Studien über die Pathogenese des SLE und hiernach die Entwicklung von neuen zielgerichteten Therapiemöglichkeiten von erheblicher Bedeutung.

## **2.2 MRL-Fas<sup>lpr</sup>, ein Lupus-Mausmodell, das dem humanen SLE sehr ähnlich ist**

Lupus-Mausmodelle können in zwei unterschiedliche Gruppen aufgeteilt werden: spontane und induzierte (einschließlich „Gene Targeting“). Die meist verwendeten Lupus-Mausmodelle, die spontan einen SLE entwickeln, sind NZB/W, BXSB/Yaa und MRL-Fas<sup>lpr</sup> Mäuse.

MRL-Fas<sup>lpr</sup> Mäuse weisen wie der MRL +/+ Stamm, die MRL-Hintergrundgene auf. Diese Gene führen zur Ausbildung eines dem humanen systemischen Lupus erythematoses ähnlichen Krankheitsbild. Dazu weist der MRL-Fas<sup>lpr</sup> Mausstamm eine Mutation im Fas-Gen (CD95) auf, die sich mit der Expression eines funktionsuntüchtigen Fas-Rezeptors (Fas-R) zeigt. (11) Durch eine Fas-Liganden /Fas-R Interaktion kommt es normalerweise zur Induktion der Apoptose um eine Expansion autoreaktiver Leukozyten und somit die Entstehung autoimmuner Prozesse zu unterbinden. Die Genmutation in den MRL-Fas<sup>lpr</sup> Mäusen führt hingegen zu einer ausgeprägten Lymphoproliferation, zu einer Akkumulation autoreaktiver T-Zellen und zu einer Zunahme von zirkulierenden Immunkomplexen (IC). Aus diesem Grund kommt es im MRL-Fas<sup>lpr</sup> Mausstamm zur Entwicklung von Krankheitssymptomen bereits in einem Alter von 3 Monaten.

Unter allen SLE-Mausmodelle entwickeln die MRL-Fas<sup>lpr</sup> Mäuse einen multi-organ SLE, der dem humanen SLE sowohl klinisch als auch pathogenetisch sehr ähnelt. Besonders die Nieren- als auch die Hautbeteiligung, allerdings auch eine ausgeprägte Lymphadenopathie und Splenomegalie, die Lungen-, die Tränen- und Speicheldrüsenbeteiligung sowie die arthritischen Gelenkveränderungen sind mit dem humanen SLE vergleichbar. (12) Die Nierenbeteiligung zeigt sich durch IC-Ablagerungen und Infiltration von Monozyten und Lymphozyten in glomeruläre, interstitielle und perivaskuläre Bereiche. Die rapid progressive GN führt bereits ab einem Alter von 3 Monaten zu Nierenveränderungen und ab einem Alter von 6 Monaten zu einer Mortalität von 50%. Die kutane Beteiligung tritt wie beim Menschen sehr häufig auf (80% Inzidenz) und wird durch einen Leukozyten-abhängigen Entzündungsprozess vermittelt. Auch im Falle der kutanen Beteiligung wird diese

bereits ab einem Alter von 3 Monaten manifest und zeigt eine Zunahme der Inzidenz und des Schweregrades im weiteren Verlauf. Zudem lassen sich im Serum eine Vielzahl an Autoantikörper, wie z.B. anti-DNA und anti-Sm nachweisen. (13) (14) MRL-Fas<sup>lpr</sup> Mäuse eignen sich somit besonders für Studien über SLE und wurden häufig zur Untersuchung der pathogenetischen Rolle von verschiedenen Zytokinen verwendet.

### 2.3 Pathogenese des SLE

Der SLE ist eine sehr heterogene Erkrankung mit einer komplexen und zum Teil noch unklaren Ätiopathogenese. Das Auftreten klinischer Symptome beim SLE setzt eine genetische Disposition voraus, die allerdings meistens nicht auf dem Defekt eines einzelnen Gens, sondern auf dem kumulativen Effekt verschiedener Gendefekte basiert. Unterschiedliche Stressfaktoren wie u.a. UV-Licht, Infektionen, Rauchen und Medikamente führen a.e. über epigenetische Mechanismen zu einem immunologischen Toleranzbruch. Die Mechanismen, wodurch es im adaptiven Immunsystem zum Toleranzbruch gegen körpereigene Strukturen kommt, sind insbesondere Clearance-Defekte von IC und apoptotischem Material, eine gesteigerte NETose (Freisetzung von NETs – (neutrophile extrazelluläre Traps)) und eine Hochregulation von Typ-I-Interferonen (Typ-I-IFN). Hierdurch kommt es zur Induktion von Autoimmunprozessen sowie im weiteren Verlauf zur Amplifizierung chronischer Autoimmunprozesse.

IFN- $\alpha$  ist unter den Typ-I-IFN primär mit systemischer Autoimmunität verbunden. Es fördert die Reifung von plasmazytoiden dendritische Zellen (pDC), die wiederum durch Antigenpräsentation die Expansion autoreaktiver T-Zellen anregen. T-Zellen tragen vor allem durch Freisetzung von Zytokine wie IFN- $\gamma$  oder IL-2 sowie hiermit verbundene kostimulatorische Mechanismen zur Pathogenese des SLE bei.

Weiterhin können IL-17-produzierende T-Zellen beim SLE durch zelluläre Mechanismen direkt zu Endorganschäden führen.

Unter IFN-I Stimulation sezernieren pDC BAFF (B-cell activating factor), wodurch die Differenzierung von B-Zellen und den Immunklassenwechsel gefördert werden.

Autoantikörper-sezernierende Plasmablasten/Plasmazellen und B-Zellen als deren Vorläufer spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese des SLE. Charakteristisch bei SLE-Patienten ist eine B-Zell-Hyperaktivität, die sich während SLE-Aktivitätsphasen in der Expansion von zirkulierenden kurzlebigen Plasmablasten

wiederspiegelt.

Neben proliferierenden B-Zellen und die kurzlebigen Plasmablasten bilden sich auch autoreaktiven Gedächtnisplasmazellen wodurch es zu einer Chronifizierung der Erkrankung sowie zu einer Therapierefraktärität kommt.

Beim SLE sind mehr als 100 pathogene Autoantikörpern bekannt, die nicht nur gegen Zellkernbestandteile (dsDNA, Nukleosomen, Sm, U1RNP, Ro/SSA und La/SSB) sondern auch gegen zytoplasmatische Antigene (ribosomale P-Proteine), Komplementfaktoren, Zelloberflächenmoleküle sowie Phospholipide gerichtet sind. Autoantikörper binden sich an Nukleinsäuren oder Zellfragmenten und bilden IC, die durch Ablagerung ins Gewebe zu einer Komplement-Aktivierung und –Verbrauch sowie wiederum zu einer Entzündungsreaktion mit Zerstörung des Gewebes führen.

(15) Wie in einer positiven Feedback-Schleife stimulieren IC das angeborene Immunsystem durch Toll-like Rezeptoren (TLRs) weiter und tragen somit auch zur Chronifizierung der Erkrankung bei. Autoantikörper können des Weiteren entzündliche Prozesse direkt initiieren, sowie zur Zellyse oder vorzeitigen Phagozytose von Zellen führen (z. B. bei Zytopenien). Zudem aktivieren Autoantikörper Rezeptoren oder hemmen Clearance-Mechanismen von apoptotischem Material. (16) (17)

#### **2.4 Rolle der Interleukin-1 Familie in der Pathogenese des SLE**

Interleukine (IL) sind immunmodulatorische Peptide, die zu der Überfamilie der Zytokine gehören. Das Wort Interleukin stammt aus dem Lateinischen: *inter* = *zwischen* und Griechischen *leukos* = *weiß*. Das Hauptziel der IL ist in der Tat die Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellen des Immunsystems und die Modulation der Immunantwort gegen fremde oder eigene Antigene.

Zahlreiche Studien haben bewiesen, dass eine gestörte Regulierung der IL-Produktion und Synthese an der Aufrechterhaltung der immunologischen und inflammatorischen Antwort und somit an der Pathogenese vieler autoimmuner Erkrankungen beteiligt ist.

Die Familie der Interleukine-1 umfasst 11 Interleukine, einige mit proinflammatorischen, andere mit antiinflammatorischen Eigenschaften. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-18, die gemeinsame Aspekte in der Regulation, Expression und Sekretion aufweisen, sind die meist untersuchten Interleukine im Rahmen autoimmuner

Erkrankungen und wurden bereits in mehreren Studien mit der SLE-Pathogenese in Zusammenhang gebracht.

Im Gegensatz zu IL-18, ist IL-1 $\beta$  nicht nachweisbar im Serum von gesunden Kontrollen. Aufgrund seiner starken entzündlichen Wirkung, wird seine Aktivität durch die Expression von Rezeptoren und mehreren Inhibitoren genau abgestimmt. IL1Ra ist z.B. ein löslicher IL-1- ähnlicher Antagonist, der am IL-1 Rezeptor (IL-1R1) bindet und somit die Bindung von IL-1 an IL-1R1 verhindert.

Eine pathologische übermäßige Aktivität von IL-1 unterliegt einer großen Anzahl von autoimmunen, autoinflammatorischen, kardiovaskulären und chronischen Erkrankungen und dies wurde auch durch die Effektivität der Therapie mit Anakinra (rekombinante IL-1R Antagonist) oder Canakinumab (Anti-IL-1 $\beta$ -Antikörper) bewiesen. (18)

Die Rolle von IL-1 $\beta$  in der Pathogenese des SLE ist allerdings kontrovers. Während einige Studien eine klare Korrelation zwischen Serum-IL-1 $\beta$  Konzentration und Krankheitsaktivität (19) (20) (21) sowie Organschaden (22) aufweisen, fanden andere Studien keine relevante Assoziation. (23) (22)/ (19) Wenige Studien fanden erhöhte IL-1 $\beta$  Serum-Konzentrationen bei SLE-Patienten mit einer LN. (24) Der Grund dieser widersprüchlichen Daten ist unklar, vermutlich wird IL-1 $\beta$  nur vorübergehend im Serum sezerniert, bzw. ausschließlich in betroffenen Geweben exprimiert. Die Messung von IL1 $\beta$  im Serum scheint somit nicht die optimalste Methode zu sein, um die Rolle dieses IL in der SLE-Pathogenese zu bestimmen. Allerdings konnten auch verschiedene genetische Studien keine Polymorphismen des IL-1 $\beta$  finden, die mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines SLE verbunden seien. (25) (26)

IL-18 ist strukturell mit der IL-1 Familie verwandt und trotz unterschiedlicher Genexpression, Synthese und Expression, haben IL18 und IL-1 $\beta$  einen gleichen Aktivierungsweg. IL-18 wird von unterschiedlichen Zellen sezerniert.

Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen stellen die wichtigste IL-18 Quelle dar, allerdings sind auch Keratinozyten, Osteoblasten, intestinalen epithelialen Zellen, Zellen der Nebennierenrinde und renalen tubulären Epithelzellen (TEZ) an der Synthese von IL-18 beteiligt.

IL-18 wurde ursprünglich als Faktor identifiziert, der die Synthese von IFN- $\gamma$  durch T-Zellen und NK-Zellen fördert und wurde deswegen auch als „IFN- $\gamma$  induzierender Faktor“ bezeichnet. Mittlerweile sind weitere sowohl proinflammatorische als auch

immunmodulierende Funktionen von IL-18 bekannt. Durch die IFN- $\gamma$  Produktion und Proliferation von T-Zellen sowie die Induktion und Verstärkung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen wird ihm eine wichtige Rolle in der Regulation der Antwort von T1-Helferzellen (Th1-Zellen) zugewiesen. Zudem ist IL-18 an der Induktion von Zytokine in Th1-, Th2-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Natural killer (NK)-Zellen beteiligt. Weiterhin kann IL-18 die Expression von Adhäsion- und kostimulatorischen Molekülen sowie die Freisetzung von Matrix-Metalloproteinasen fördern. Insgesamt spielt IL-18 somit eine entscheidende Rolle in der Entzündungskaskade und im folgenden Gewebeschaden.

Es ist bereits bekannt, dass IL-18 eine relevante pathogenetische Rolle in vielen Autoimmunerkrankungen spielt wie z.B. bei der rheumatoiden Arthritis, dem Sjögren Syndrom, der primären biliären Cholangitis, den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, im Morbus Behçet und dem SLE. (27) (28)

Mehrere Studien haben bereits die Bedeutung des IL-18 in der Pathogenese des SLE bewiesen, insbesondere bei der LN (22) und beim kutanen Lupus erythematodes. (29) Eine Studie von Wong et al., die von Park et al. sowie von weiteren Studiengruppen bestätigt wurde, zeigte, dass die Serumkonzentration von IL-18 in SLE-Patienten deutlich höher als in den Kontrollen ist und, dass die Konzentration mit der Krankheitsaktivität, insbesondere mit SLEDAI und Anti-dsDNA korreliert. (30) (31) (32) (33) Eine relevante Korrelation der IL-18 Konzentration wurde auch in Patienten mit LN im Vergleich zu SLE-Patientin ohne LN gefunden sowie mit dem LN-Stadium (höchste IL-18 Konzentration im Stadium IV, gefolgt von Stadium V). (22) (33) (34) Eine Korrelation mit einer anderen Organbeteiligung, wie z.B. des zentralen Nervensystems oder eine kardiale Beteiligung fand sich hingegen nicht. (33) (35)

Durch die immunhistochemische Färbung von Nierenbiopsien konnte auch eine erhöhte glomeruläre Expression von IL-18 in SLE-Patienten mit GN nachgewiesen werden. Hier spielt IL-18 eine entscheidende Rolle in der Migration von dendritischen Zellen in die Niere. (36) (34)

Weiterhin wurde die IL-18 Konzentration im Urin untersucht. In gleicher Weise konnte hier eine Korrelation von IL-18 mit akuter Tubulusnekrose, akuter Niereninsuffizienz und verzögerte Transplantatfunktion gezeigt werden. (28)

Auch genetische Studien konnten die Rolle von IL-18 als pathogenetischer Faktor des SLE bestätigen. Verschiedene Polymorphismen in der Promoter Region von IL-18 wurden mit einem erhöhten Risiko eines SLE zu entwickeln assoziiert. (37) (38)

Obwohl schon viel über die Rolle von IL-18 und der SLE-Pathogenese erforscht und bekannt ist, bleibt einiges noch unklar bzw. kontrovers. Petrackova et al. konnten eine Assoziation zwischen Organschaden (SDI (SCLICC-ACR Damage Index) >0) und erhöhte IL-18 Serum Konzentrationen nachweisen. (39) In einer anderen prospektiven Studie mit einem größeren Patientenkollektiv fand sich allerdings keine relevante Korrelation. Hier konnte allerdings bewiesen werden, dass eine hohe IL-18 Serum-Konzentration mit einem Organschaden in der Folgeuntersuchung einherging, sodass IL-18 als ein prädiktiver Biomarker für Endorganschaden in Frage kommt (22). Des Weiteren fand sich eine Korrelation mit der GN-Klasse mit besonders hohen Titern bei der diffusen proliferativen und membranösen Glomerulonephritis (GN) (Klasse IV und V Nephritis laut der WHO-Klassifikation) (35). Auch diese Assoziation ist allerdings kontrovers und konnte in einer Studie nicht bestätigt werden. (22)

## **2.5 IL-18 und IL-1 $\beta$ im MRL-Fas<sup>lpr</sup> Mausmodell**

Im MRL-Fas<sup>lpr</sup> Mausmodell zeigt sich eine Korrelation zwischen erhöhter IL-1 $\beta$  Gen-Expression mit dem Schweregrade und dem Fortschreiten des SLE. (40) Mäuse mit einem IL-1 $\beta$  Mangel weisen wiederum eine reduzierte Krankheitsaktivität sowie eine niedrigere Konzentration an dsDNA- und proinflammatorische Zytokine im Vergleich zu Kontrollmäusen und Mäusen mit einem IL-1 $\alpha$  Mangel auf. (41)

Ebenso konnte in der MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Maus eine Hochregulation der IL-18 Expression in allen beteiligten Organen, einschließlich in den nephritischen (42) Nieren, nachgewiesen werden. Außerdem konnte im Lupus-Mausmodell durch eine IL-18 Gabe die Nierenerkrankung exazerbiert werden und wiederum durch eine IL-18 Hemmung die Lymphoproliferation sowie die Nephritis gelindert und die Lebensrate verlängert werden. Die IL-18 Inhibition erfolgte in vivo in einem murinen Lupusmodell mit wiederholter Gabe von einer cDNA, welche für den Prekursor des IL-18 kodierte. Diese geimpften Mäuse entwickelten hiermit Auto-AK gegen IL-18 und hatten eine relevante prognostische Besserung des SLE. (43) (42) (44) Neumann et al. haben auch gezeigt, dass in MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäuse Lymphknoten (LK)-Zellen sowie autoreaktive T-Zellen aus LK eine Hyperexpression von IL-18 Rezeptoren und somit eine hyperreaktive Antwort auf IL-18 aufweisen. (45)

Kinoshita et al. untersuchten die SLE-Expression in MRL-Fas<sup>lpr</sup> Mäuse mit Knock-down von IL-18 R $\alpha$ , eine der zwei Untereinheiten des IL-18 Rezeptors. Die Mäuse



wiesen eine abgeschwächte Systemerkrankung auf, mit einer relevanten Besserung der Haut-, Nieren- und Lungenbeteiligung sowie eine verlängerte Lebensrate. Eine komplette präventive Wirkung konnte allerdings nicht festgestellt werden. IL-18 induziert die Sekretion von verschiedenen Zytokine, u.a. TNF $\alpha$  durch Makrophagen. Neben einer signifikanten Reduktion der IFN- $\gamma$  Transkription in der Niere fand man erwartungsgemäß auch eine und reduzierte TNF $\alpha$  -Transkription. Da der Isotypenwechsel von Anti-DNA IgM zu IgG IFN- $\gamma$ -abhängig ist, fand sich in den IL-18R $\alpha$  knock-down Mäuse auch eine signifikant niedrigere Konzentration von IgG2a anti-DNA. (46)

Favilli et al. haben sich in ihrer Studie mit der Frage befasst, ob IL-18 als Folge der autoimmunen Antwort mit mehreren anderen Zytokinen freigesetzt wird oder, ob IL-18 eine zentrale Rolle in den pathogenetischen Mechanismen spielt, die die Erkrankung initiieren. Hierfür untersuchten sie IL-18 in LK, die bereits bei Krankheitsbeginn involviert sind und fanden eine deutlich verstärkte Genexpression und Proteinsynthese bereits vor Ausbruch des SLE, (28) sodass vermutlich IL-18 unter den pathogenetischen Mechanismen zählt, die zur Lymphadenopathie und im weiteren Verlauf zur systemischen Erkrankung führen. IL-18 hat zum Teil vergleichbare Funktionen sowie synergistische Mechanismen mit IL-12 unter anderem die Aktivierung von NK Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten sowie die IFN- $\gamma$  Synthese. Trotz funktioneller Ähnlichkeit weisen IL-12 und IL18 allerdings unterschiedliche intrazelluläre Signalwege. IL-12 aktiviert Stat4 und überträgt sein Signal durch Janus Kinase 2 und TYK. Bei einer IL-12 Hemmung durch Knock-down von Stat4 zeigte sich allerdings ein klinisches Erscheinungsbild, welches mit dem der wild-type Maus vergleichbar ist. Durch eine Hochregulation von IL-18 fand ein kompensatorisches proinflammatorische Mechanismus statt, sodass postuliert werden kann, dass IL-18 auch unabhängig von IL-12 eine IFN- $\gamma$  Synthese fördern kann, die zum Ausbruch des vollem SLE-Erscheinungsbild ausreichend ist. (47) IL-18-defiziente Mäuse zeigen wiederum eine unterdrückte IFN- $\gamma$  Produktion trotz normaler IL-12 Konzentration. (46) Trotz synergischem Mechanismus von IL-12 und IL-18, scheint unter den beiden Zytokinen nur eine IL-18 Hemmung als therapeutische Ziel in Frage zu kommen.

## 2.6 Aktivierungsmechanismen von IL-1 $\beta$ und IL-18: NLRP3-Inflammasom und Caspase-1

Da mehrere Studien auf eine relevante pathogenetische Rolle des IL-18 und vermutlich des IL-1 $\beta$  beim SLE und somit möglicherweise auf eine Fehlregulation ihrer Aktivierungsprozesse hinweisen, wurden weitere Studien durchgeführt, um mehr Klarheit über die Aktivierungsmechanismen dieser Interleukine zu bekommen. Ein besseres Verständnis der Aktivierungsmechanismen von IL-18 und IL-1 $\beta$  könnte in der Tat zur Entwicklung von neuen Therapietargets im SLE dienen.

Die inaktiven Vorformen von IL-1 $\beta$  und IL-18 werden durch das IL-1 $\beta$ -converting Enzym oder **Caspase-1** zu reifen und aktiven Glykoproteinformen gespalten. (48) Die Caspase-1 ist ein Heterodimer, das in verschiedenen Zellen exprimiert wird, u.a. B-Zellen, neutrophile Granulozyten und Makrophagen und gehört zu der Gruppe der Cystein-Proteasen, die an der Signalübertragung zum programmierten Zelltod und an der Zytokinaktivierung beteiligt sind. (49) Zur Aktivierung der inaktiven IL-Proformen bilden zwei Caspase-1 Moleküle mit zwei Molekülen von Pro-IL-18 oder Pro-IL-1 $\beta$  ein Tetramer. (50) Die Aktivierung der IL-Proformen erfolgt intrazellulär und erst die aktive Form wird sezerniert. Bei einer Caspase-1 Hemmung kommt es zur Akkumulation von IL-1 $\beta$  und IL-18 sowohl innerhalb als auch außerhalb der Zelle, als Hinweis, dass die Sekretion von IL-18 unabhängig von der Aktivierung stattfindet. (51)

Eine Aktivierung von IL-18 kann alternativ auch durch die Proteinase-3 stattfinden. Die Caspase-3 kann hingegen das Pro-IL-18 an verschiedenen Stellen spalten, allerdings entstehen hierdurch nur biologisch inaktive Fragmente. Diese Caspase gehört zusammen mit der Caspase 8 und 9 zu den Apoptose-induzierenden Caspasen. (50) Durch eine Pan-Caspase-Inhibition werden die Caspasen 1, 3, 4 und 7 inhibiert wodurch neben der Interleukin-Aktivierung auch verschiedene Kaskaden gehemmt werden. (52)

**Nod-like receptors (NLRs)** sind Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR), die ähnlich wie die Toll-like receptors (TLR) PAMP und DAMP (jeweils pathogen- und damage-associated molecular patterns) erkennen und eine Immunreaktion zur Eliminierung des Pathogens, bzw. eine Entzündungsreaktion einleiten. Während es sich bei TLR um membrangebundene Rezeptoren handelt, sind NLR lösliche Proteine im Zytosol.

NLR weisen eine dreigliedrige Struktur auf:

- eine Pyrin Domäne am C-Terminus (PYD), worüber bestimmt wird, welche Signalwege bei Aktivierung der Rezeptoren downstream ausgelöst werden
- eine C-terminale Domäne, in der sich Leucin-reiche Sequenzen wiederholen und, die PAMPs erkennt und bindet
- eine zentral gelegene namensgebende NOD-Domäne (nucleotide-binding oligomerization domain), die der eigenen Oligomerisierung dient.

Bis dato sind 23 NLRs bekannt. NLRP3 dient der Zusammensetzung eines Multi-Protein-Komplexes, das **Inflammasom**:

Die PYD-Domäne des NLRP3 ermöglicht die Interaktion mit einem Adaptor-Protein, das ASC (apoptosis-associated speck-like protein), welches wiederum eine CARD-Domäne (caspase activation and recruitment domain) beinhaltet. Nach bestimmten Signalen durch PAMPs und DAMPs, wie z.B. ATP kommt es durch CARD-CARD und PYD-PYD Protein-Protein Wechselwirkung zur Interaktion von NLRP3 und ASC Proteine und Bildung eines Proteingerüsts. Dieses Proteingerüst bildet zusammen mit der Pro-Caspase-1 ein Multi-Protein-Komplex, das NLRP3-Inflammasom, wodurch das Proenzym der Caspase-1 nach proteolytischer Spaltung in seiner enzymatisch aktiven Form umgewandelt werden kann. (53) (54)

Unterschiedliche Signale können zur Bildung des Inflammasom-Komplexes führen. Wird ein PAMP oder DAMP durch ein TLR erkannt, wird NFκB, ein spezifischer Transkriptionsfaktor, aktiviert. Dieser regt die Synthese von Pro-IL-1β, Pro-IL18 und NLRP3 an, die zunächst inaktiv im Zytoplasma verbleiben. Nach diesem „Priming-Ereignis“ ist ein zweites Signal zur Bildung des Inflammasom-Komplexes notwendig. Schroder und Tschopp haben hierzu drei möglich Modelle vorgeschlagen: Bindet sich extrazelluläres ATP an ein P2X7-Rezeptor kommt es zum Transport von intrazellulären Kalium-Ionen nach außen und zur Bildung des NLRP3-Inflammasoms. Alternativ lösen PAMP und DAMP die Bildung von reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und hierdurch die NLRP3-Aktivierung aus. Im dritten Modell können Umweltreize, wie Asbest oder Siliziumoxid, Kristall- oder Partikelstrukturen bilden, die zur Freisetzung von Cathepsin B aus dem Lysosom und anschließend zur Bildung des NLRP3-Inflammasom-Komplexes führen. (55) (56)

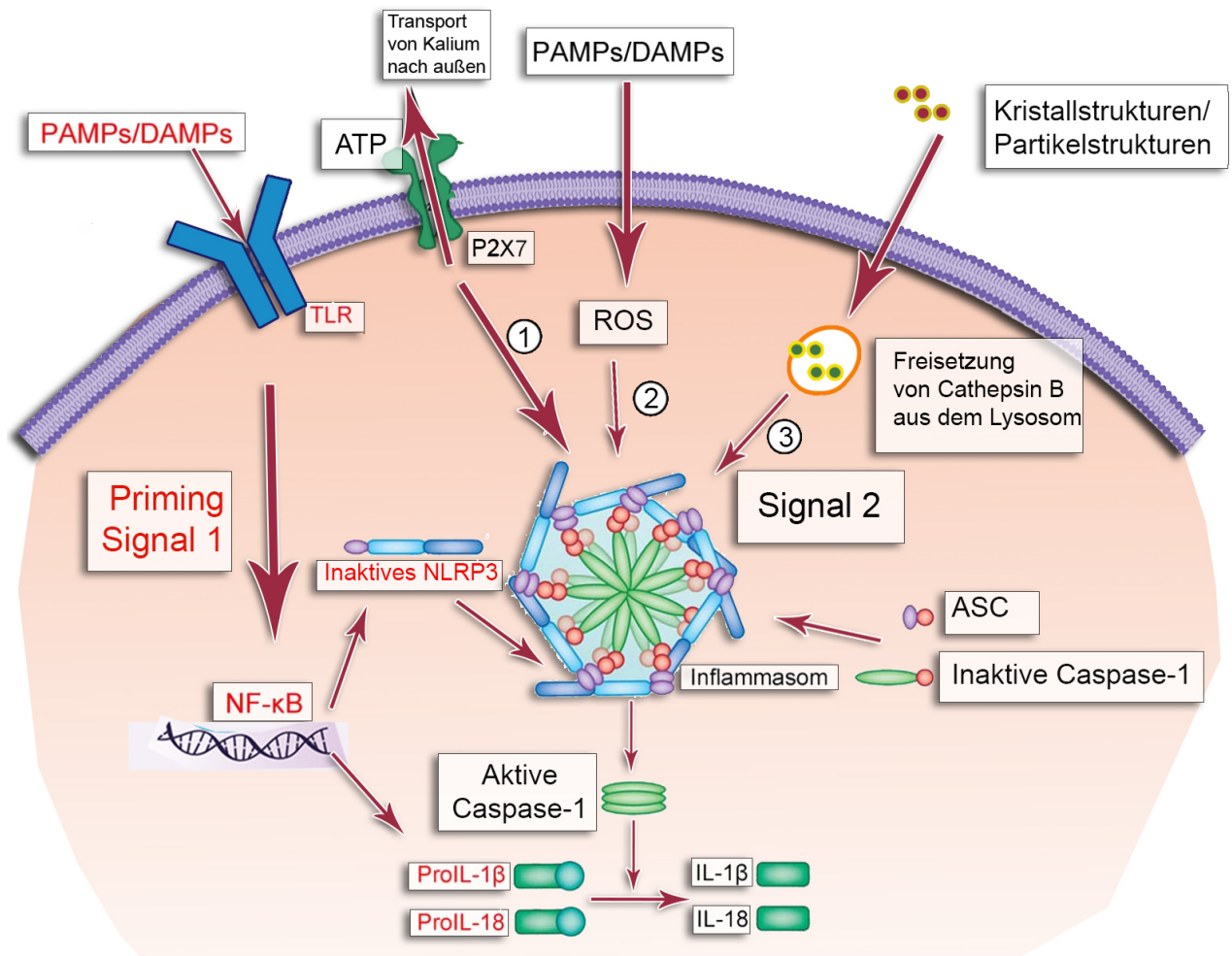


Abb. 2.1: **Aktivierungskaskade vom Inflammasom-Komplex sowie der IL-1 $\beta$  und IL-18**, modifiziert aus Bo-Zong et al. 2015 (56):

Die Aktivierung des Inflammasom-Komplex braucht zwei Signale, ein Priming Signal (in rot dargestellt) und ein zweites Signal (in schwarz dargestellt).

**Priming Signal:** Wird ein PAMP oder DAMP durch ein TLR erkannt, wird NF $\kappa$ B, ein spezifischer Transkriptionsfaktor, aktiviert. Dieser regt die Synthese von Pro-IL-1 $\beta$ , Pro-IL18 und NLRP3 an, die zunächst inaktiv im Zytoplasma verbleiben.

**Zweites Signal:** hier wurden mehrere mögliche Aktivierungskaskaden postuliert, Schroder und Tschopp schlagen drei möglich Modelle vor:

- 1) Bindet sich extrazelluläres ATP an ein P2X7-Rezeptor kommt es zum Transport von intrazellulären Kalium-Ionen nach außen und zur Bildung des NLRP3-Inflammasoms.
- 2) PAMP und DAMP lösen direkt die Bildung von reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und hierdurch die NLRP3-Aktivierung aus.
- 3) Umweltreize, wie Asbest oder Siliziumoxid, bilden Kristall- oder Partikelstrukturen, die zur Freisetzung von Cathepsin B aus dem Lysosom und anschließend zur Bildung des NLRP3-Inflammasom-Komplexes führen. (55)

## 2.7 Rolle des NLRP3-Inflammasoms und der Caspase-1 in der Pathogenese des SLE

Die pathogenetische Rolle des Inflammasoms wurde bereits in mehreren autoinflammatorischen und rheumatologischen Erkrankungen erkannt. Bei den Kryopyrinopathien führt eine aktivierende Mutation vom NLRP3 zu einer pathologisch erhöhten IL-1 $\beta$ -Synthese. (57) In Gicht und Pseudogicht führen jeweils Mononatriumurat- und Kalziumpyrophosphat-Kristalle zu einer Aktivierung von NLRP3 und folglich zu einer Gelenkentzündung. (58) Zudem werden Studien zur pathogenetischen Rolle von NLRP3 in Diabetes mellitus Typ II, entzündliche Darmerkrankungen und metabolische Syndrom geführt. (59) (60)

Auch beim SLE wurden bereits verschiedene Studien durchgeführt, um die pathogenetische Rolle des NLRP3 und der Caspase-1 zu untersuchen. Honarpisheh et al. konnten beweisen, dass die Expression von NLRP3 in den Nieren von MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäusen mit der Progression der LN parallel zunimmt. (61) In Nierenbiopsien von SLE Patienten mit LN konnte vergleichsweise eine vermehrte Expression von NLRP3 und Caspase-1 nachgewiesen werden. (62)

Die Hochregulation vom Inflammasom wurde durch mehrere Mechanismen erklärt: IC führen zur Hochregulation der TLR9-abhängigen Aktivierung von NF $\kappa$ B. (63) Zudem fördert C3a die Aktivierung des Inflammasom-Komplexes durch eine vermehrte ATP Freisetzung. (64) NETs (Neutrophil extracellular traps) werden von einer Subgruppe von proinflammatorischen Lupus Neutrophilen freigesetzt. Diese aktivieren die Caspase-1. IL-18 kann wiederum eine Freisetzung von NETs fördern, daraus ergibt sich eine positive Feedback-Schleife, in der die Aktivierung des Inflammasom zur Freisetzung von IL-18 führt und IL-18 durch die NETose das Inflammasom aktiviert. (65)

## 2.8 NLRP3-Hemmung –

### Kontroverse Daten über die Rolle von NLRP3 in der Pathogenese vom SLE

Nachdem die pathogenetische Rolle von **NLRP3** im SLE erkannt wurde, erfolgten mehrere Studien, die das Inflammasom als Therapietarget untersuchten. Tsai et al. verabreichten NZB/NZW F<sub>1</sub> Lupus-Mäusen Epigallocatechingallat, das, durch eine NF $\kappa$ B-Hemmung, die Hochregulation von NLRP3 unterdrückt. Hierdurch konnten Niereninsuffizienz, Proteinurie und schwere Nierenschädigungen verhindert werden.

(66) Des Weiteren führte eine gezielte NFκB-Hemmung in MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäuse zur Vorbeugung von LN und zur Reduktion der anti-dsDNA Titer um 50%. (67)

Sowohl in der Niere von MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäusen als auch in den Nierenbiopsien von SLE Patienten findet sich eine Hochregulierung vom Rezeptor P2X7, der an der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms beteiligt ist. (68) Durch eine Inhibition des P2X7-Rezeptors kommt es zu einer Hemmung von Anti-dsDNA, IC-Ablagerung sowie Entzündungsreaktion in der Niere und Zhao et al. konnten eine positive Wirkung der P2X7-Hemmung auf der LN sowohl in MRL-Fas<sup>lpr</sup>- als auch in NZM2328-Mäuse nachweisen. (69)

Neben diesen Ergebnissen, die die pathogenetische Rolle von NLRP3 im SLE beweisen, zeigten einige Studien auch Daten, die genau das Gegenteil bewiesen. Yang et al. fanden eine reduzierte Expression von Inflammasom-Bestandteile in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) von SLE-Patienten. Die Expression zeigte sogar eine umgekehrte Korrelation mit der Krankheitsaktivität, sodass womöglich eine protektive Wirkung des NLRP3 Inflammasoms postuliert wurde. (70) Ma et al. bestätigten diese Erkenntnisse und fanden sogar eine negative Korrelation zwischen Expression von NLRP3 in PBMCs von SLE Patienten und LN, sodass NLRP3 vermutlich eine protektive Wirkung in der Pathogenese des SLE und der LN haben könnte. Die Expression von Caspase-1 korrelierte hingegen mit der Krankheitsaktivität und wurde nach der Therapie unterdrückt. (71)

Lech et al. untersuchten NLRP3- und ASC-knock out B6<sup>lpr</sup>-Lupus Mäuse. Schon innerhalb der ersten 6 Lebensmonaten zeigten diese Mäuse eine ausgeprägte Lymphoproliferation, Splenomegalie, T-Zell Infiltrate in der Lunge und eine schwere proliferative LN, Merkmale, die bei den Kontroll- B6<sup>lpr</sup>-Lupus Mäusen nicht nachweisbar waren. In den knock-out Mäusen zeigten sich des Weiteren eine Zunahme der DC und Makrophagen-Aktivierung, der Expression verschiedener proinflammatorischen Mediatoren und der Expansion der meisten T- und B-Zell Subtypen. (72)

Als mögliche Erklärung dieser Dichotomie der NLRP3-Inflammasom Rolle im SLE konnten Shi et al. zeigen, dass die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms u.a. von der Zellphase abhängig ist. Während der Interphase führen LPS oder ATP zu einer Inflammasom-Aktivierung, diese wird hingegen während der Mitose durch die selben Stimuli stark gehemmt. (73)

## 2.9 Caspase-1 Hemmung

### Fragestellung und Ziel der Untersuchung

Aufgrund der noch unklaren und dichotomen Funktion des NLRP3-Inflammasoms in autoimmunen Prozessen, fokussierte man sich zunehmend auf die Caspase-1 Hemmung als Therapiemöglichkeit.

Bereits in verschiedenen Krankheitsmodelle, nicht ausschließlich aus dem autoimmunen Formkreis, konnte durch eine Caspase-1 Inhibition eine klinische Besserung erzielt werden. Sowohl eine genetische, als auch eine pharmakologische Caspase-1-Hemmung führten z.B. im Mausmodell zu einer relevanten Besserung der Cisplatin induzierten Nephrotoxizität. (74) Ebenso konnte durch eine Caspase-1 Hemmung im Mausmodell die Prognose nach intracerebraler Blutung gebessert werden, a.e. durch Hemmung der Pyroptose. (75) Kong et al. zeigten eine Caspase-1-Hemmung abhängigen Besserung der murinen akuten „Graft-versus-host-disease“. (76) Auch einige Studien über die Myasthenia gravis in einem Ratten-Modell ergaben eine Besserung nach pharmakologischer Caspase-1 Hemmung. (77) (78)

Über entzündliche Darmerkrankungen und die pathogenetische Rolle des NLRP3-Inflammasoms und der Caspase-1 wurden bereits verschiedene Studien durchgeführt. Pellegrini et al. zeigten, dass eine Caspase-1 Hemmung zu einer Besserung der Colitis in der Ratte führt, allerdings ist hier eine direkte NLRP3-Hemmung effektiver als eine Caspase-1 Hemmung. (79)

Gleicherweise konnten Aira et al. durch pharmakologische Inhibition der Caspase-1 in einem murinen Psoriasis-Modell eine relevante Besserung des klinischen, immunhistochemischen und serologischen Erscheinungsbild der Psoriasis nachweisen. (80)

Angesichts der mehrfach nachgewiesenen Rolle der Caspase-1 in der Pathogenese des **SLE**, erhofft man sich auch hier eine valide Therapiemöglichkeit durch Hemmung der Caspase-1 entwickeln zu können.

Es wurden bereits verschiedene Studien mit diesem Enzym als Therapietarget durchgeführt: Kahlenberg et al. untersuchten das SLE-Erscheinungsbild in Caspase-1 -/- Pristan-induzierten Lupus-Mäusen. In diesen knock-out Mäusen zeigten sich eine fehlende Hochregulation der IL-18- und IL-1 $\beta$ -Synthese sowie folglich eine fehlende IFN-Typ I Immunantwort und keine Autoantikörper- Entwicklung. Weiterhin fand sich eine Aufhebung der normalerweise durch Pristan induzierten IC-GN. (81) Neben der enzymatischen Aktivierung von IL-18 und IL-1 $\beta$  weist die Caspase-1 auch

andere Funktionen auf, u.a. die Pyroptose, eine inflammatorische Variante des programmierten Zelltods. Kahlenberg et al. postulierten, dass eine aberrante Entfernung von pyroptotische Zelltrümmern auch zur Pathogenese des SLE beitragen könnte. Kahlenberg et al. konnten in Caspase 1<sup>-/-</sup> Mäuse in der Tat weniger Annexin V detektieren, als Marker für apoptotische und pyroptotische Zelltrümmer. (81)

Weiterhin konnten Kahlenberg et al. durch Hemmung der Caspase-1 eine Verbesserung in der Differenzierung von endothelialer Progenitorzellen in reifen Endothelzellen nachweisen. Dies zeigt, dass durch eine genetische Caspase-1 Hemmung auch einen protektiven Effekt auf das Gefäßsystem erzielt werden kann. (81)

Unserem Wissen nach, wurden bis dato keine pharmakologische Caspase-1 Inhibition in murinen Lupusmodellen untersucht. Die Ziele dieser Arbeit sind die Rolle der Caspase-1 und der durch die Caspase-1 aktivierten Interleukine (IL-18 und IL-1 $\beta$ ) in der Pathogenese des SLE sowie die Wirkung der Caspase-1 Inhibition als Therapiemöglichkeit zu untersuchen.



### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Verwendete Laborgeräte

Abzug	NUAIRE, Inc., Minnesota, USA ClassII, Biological safety cabinet Modell NU 440-600E, Serial No 63231 ACS
ELISA Reader	Thermo Electron Corporation, Vantaa Finland Appliskan Version 2.3 Type 2001 Ref. 523.0000
ELISA Washer	Tri Continent Multiwash Advantage, Modell 8441-07
FACSan	Becton-Dickinson, Mountain-View, USA
Folienschweißautomat	Hawo Gerätebau GmbH Obrigheim D, Typ HM500DL
Gefriertruhen	Uni Equip, Martinsried, D -20°C  ThermoScientific Type HFC 586 Basic Klasse N - 80°C
Kryostat	Leica, Nussloch, D Modell CM1850
Kühlschränke	Robert-Bosch Hausgeräte GmbH Kühl-Gefrier Kombi Gerät Modell KKEE26A Cat. No. FD 7511
Mikroskop	Lichtmikroskop Helmut Hund-GmbH, Wetzlar, D Type Wilovert (2202889)
Mikrotom	Modell RM2125
Neubauer Zählkammer	Neubauer Improved LAFONTAINE

	Tiefe 0,01mm, Fläche 0,002mm <sup>2</sup>
pH Meter	Wissenschaft-Technische, Werkstätten GmbH & Co KG, Willheim Deutschland Modell inoLab ph Level 1 Cat. No. 02400016
Pipettus	Hirschman Laborgeräte, Deutschland Pipetus standard Modell 8806295  Multipipettus Eppendorf
Röntgenkassette	Siemens, Deutschland 18x24 cm Dr. Gross- Suprema GmbH, Heidelberg, D 35x43 cm
Schüttler	Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik Vibrofix VF1 electronic  Heidolph Rüttler Modell DUOMAX 2030
Sterile Arbeitsbank	NUARE, Inc., Minnesota, USA Labgard Class II, Laminar flow biological safety cabinet Modell NV 440- 600E  Thermo Scientific MSC Advantage  Thermo Electron LED GmbH Langenselhold D, Type MSC 1.8
Varioclav	Dampfsterilisator Typ 500 H+P Labortechnik GmbH Oberschleißheim bei München D
Vortexer	Heidolph Modell Reax Control
Waage	Satorius laboratory, Göttingen, D Digitalwaage

	Feinwaage Capacity 110g x 0,1mg Ohaus Analytical Plus 1105 AS Waagetechnik GmbH, Garching D
Wasserbad	Köttermann Typ 2043 Hänigsen/W.D.
Zentrifugen	UNIQUIP Laborgeräte & Vertrieb, Martinsried, D Univapo concentrator centrifuge 100H  Hettich Zentrifugen, Rotina 48R Tuttlingen

### 3.1.2 Verwendete Verbrauchsartikel

Combitips	Eppendorf, unsteril 2,5ml (50µl) Cat. No. 0030069.242 5ml (100µl) Cat. No. 0030069.250  Sterile, individually sealed Eppendorf Biopur Combitips Plus 2,5ml (50µl) Cat. No. 0030069.447 5ml (100µl) Cat. No. 0030069.455
Deckgläser	Superior Marienfeld Laboratory Glassware 21x 26
Einmal-Insulinspritze	Omnican F Single use fine dosage syringue with integrated needle 0,01 ml-1ml sterile, REF. 9161502
Einmalspritzen	Becton Dickinson, USA Steril, 2ml, 5ml, 10ml, 20ml
Falcon-Röhrchen	Greiner bio-one, Cellstar Deutschland 50 ml Cat. No. 227261 15 ml Cat. No. 188271

Filterpapier	Schleicher&Schuell, D-Dassel Folded Filters 270 mm REF. 311652
Frischhaltefolie	For 96 well plate ELISA Fasson Fas Roll S-695
Handschuhe	Semper Care Premium Latex Handschuhe, powder free Cat. No. 823781045
Objektträger	Engelbrecht medizin u labortechnik GmbH Artikel Nr. 11102
Petrischalen	Greiner bio-one, Cellstar, Deutschland 94/16mm für Gewebeulturen, steril Cat. No. 632171  FALCONR, Becton Dickinson, USA 100/15mm Ten- twenty-nine™, steril Cat. No. 351029 (weisse) 100/20mm PRIMARIATM tissue Culture Dish (Surface Modified Polystyrene steril) Cat. No. 353803 (rote)  Greiner bio-one, Cellstar Deutschland 6-Well Platten steril Cat. No. 657160 96 Well Platten steril Cat. No. 655180
Pipettenspitzen	Standartips, Eppendorf, Hamburg, Deutschland  10 µl Cat. No. 0030001.167 20 µl Cat. No. 0030001.168  100 µl Cat. No. 0030015.001 1000 µl Cat. No. 0030015.002
Röntgenfilme	Kodak, USA BioMaxFilm 35x43 Cat. No. 8715187

Serologische Pipetten	FALCONR ,Becton Dickinson, USA Polystyrene, steril 5 ml Cat. No. 356543 10 ml Cat: No. 356551 25 ml Cat. No.356525
Skalpelle	Feather Safety Razor Co., LTD. Medical Division Disposable scapel, No.20 Cat. No. 02.001.03.020
Super PAP PEN	Dako Cytomation Glostrup Denmark REF. S2002
Teststreifen zur Harnanalyse	BAYER Vital GmbH, D Multistix 10SG Cat. No. 2kuc
Zellsiebe	FALCONR ,Becton Dickinson, USA Nylon, steril 40 µm Cat. No. 352340 70 µm Cat. No. 352350

### 3.1.3 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

<b>ABC-Methode (Immunhistochemie)</b>	Avidin Binding Suppressing Kit Elite Standard Cat. No. PK-6100 AB-Komplex (Avidin und Biotin Lösung)  Blocking Kit Avidin/Biotin Cat. No. SP-2001  StrepABComplex/AB Cat. No. K0391
Aceton	Cat. No. 32201
Ammoniumchlorid	Merck, D; NH <sub>4</sub> CL; M 53,49 g/mol Cat. No. 1.01145.1000; Lot: A779045434

**Antikörper (FACS)**

**FITC Rat anti mouse CD4** CloneRM4-5, 0,5 mg/ml  
Cat. No. 553047, Lot. Nr. #62786

**FITC Rat Anti-mouse CD11b**, 0,5 mg/ml  
Cat. No. 553310, Lot. Nr. # 5274805

**PE Rat Anti-Mouse IFN- $\gamma$  Clone XMG1.2**, 0,2 mg/ml  
Cat. No. 554412 Lot. Nr. M051507

**Anti-mouse IL-6 PE** Clone(MP5-20F3) 0,2mg/ml  
Cat. No. 12-7061-82 Lot. Nr. #E02082-1630

**Anti-mouse IL12/IL23p40** (Clone C17.8) 0,2 mg/ml  
Cat. No. 12-7123-82 Lot. Nr. #E02104-1631

**Rat anti-mouse TNF-  $\alpha$  PE** 0,2 mg/ml  
Cat. No. 554419 Lot. Nr. 51215

**Anti-mouse CD 86** Clone:GL 1  
Cat. No. 17-0862-81 Lot. Nr. # E07183-1633

**Conjugated anti-mouse CD69(VEA)** Clone H1.2F3,  
0,2 mg/ml  
Cat. No. 45-0691-82 Lot. Nr. #E032855

**Anti-rat anti-mouse CD25(PC61)PE**  
Cat. No. 553866 Lot. Nr. #25390

**Rat anti mouse Fox P3** (Clone MF 23)Alexa Fluor  
647 0,2 mg/ml  
Cat. No. 560401 Lot. Nr. 63111

**Rat anti mouse Ly-6C** Clone:AL21 0,1 mg/ml  
Cat. No. 560592 Lot. Nr.#4233710

**Anti-mouse CD 206 PE** Clone:C068C2, 0,2 mg/ml  
Cat. No. 141706 Lot. Nr. #B146077

**PE anti-mouse LAP (TGF- $\beta$ 1)** Clone: TW7-164 0,2  
mg/ml

Cat. No. 141404 Lot. Nr. B195899

**Rat Anti-Mouse IL-17A** Clone TC11 18H10  
(RUO) BV421

Cat. No. 566286

**Antikörper**  
(Immunhistochemie)

**Purified rat-anti-mouse CD4** Clone RM4-5 0,5  
mg/ml

Cat. No. 553043, Lot. Nr. M065428

**Purified rat-anti-mouse CD8a**, 0,5mg/ml

Cat. No. 553027; Lot: M050797

**Purified rat-anti-mouse CD45R/B220**, 0,5mg/ml

Cat. No. 553084; Lot: M068443

**Rat-anti-mouse F4/80** (IgG)

Cat. No. MCAP497

**Monoclonal Rat anti-mouse Ki67**

Antigen Clone TEC-3 Cat. No. M7249; Lot 101

**IL-18 (M-19), goat polyclonal** IgG, 200 $\mu$ g/ml

Cat. No. sc-6179; Lot: B110

**Sekundärantikörper:**

Biotinylated rabbit-anti-rat IgG (H+L), mouse  
adsorbed Cat. No. BA-4001

Biotinylated rabbit-anti-goat IgG (H+L)

Cat. No. Ba-5000

Biotinylated goat-anti-rabbit IgG (H+L), mouse  
adsorbed Cat. No. 2RB1001

BSA

Albumin bovine Fraction V, ph 7.0, Standard grade,

lyophil Cat. No. 11930; Lot: 14177

Caspase-1-Inhibitor ORAL	Pralnacase Bestell. Nr. 4501090008; HMR 3480
Caspase Assay, fluorimetric	Kit Cat. No. 03 005 372 001 - Substrat Stock Lösung - Positive Kontrolle (Lysat aus apoptotische U937 Zellen) - R110 Standard - Inkubation Puffer
DNase	2,5 ml TrisHCl, 50 mM, pH 7,5; 0,25 µl MgCl <sub>2</sub> , 1 M; 0,0025 g BSA
Diaminobenzin (DAB)	Peroxidase Substrate Kit Cat. No. SK-4100
DMSO	Sigma Diagnostics inc., USA Dimethyl Sulfoxide Cat. No. 5879
DNase	Reaction Buffer Cat. No. Y02340 Amplification Grade Cat. No. 18068-015
EDTA	Ethylendiamintetraessig-Trinatriumsalz-2-hydrat, C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>8</sub> x2H <sub>2</sub> O M 394,22 g/mol Cat. No. 64073
Eindeckmedium	Vectoshield Mounting Medium for Fluorescence Cat. No. H-100  DAKOR Ultramount aqueous permanent Mounting medium Cat. No. S1964 DAKOR Glycergel Mounting medium Cat. No. C0563
<b>ELISA</b>	<b>dsDNA ELISA</b> Varelisa dsDNA antibodies Cat. No. 14148/14196



Konjugat (dsDNA Elisa)

IgG HRP Konjugat (anti-mouse) Cat. No.  
14148/14196

**Mouse IFN- $\gamma$  Set, OPTEIATM**

Cat. No. 555138; Lot: 0000038638

- Capture Antibody: Anti-mouse IFN- $\gamma$

Cat. No. 26121E

- Detection Antibody: Biotinylated anti-mouse IFN- $\gamma$

Cat. No. 26122E

- Enzyme Reagenz: Horseradish peroxidase

Cat. No. 26437E

- Standard: Recombinant mouse IFN- $\gamma$  lyophilized

Cat. No. 554587

**Mouse IL-12(p70) Set, OPTEIATM**

Cat. No.555256; Lot: M075191

- Capture Antibody: Anti- mouse IL-12

Cat. No. 26611E

- Detection Antibody: Biotinylated anti-mouse IL-12

Cat. No. 26612E

- Enzyme Reagenz: Horseradish peroxidase

Cat. No. 26437E

- Standard: Recombinant mouse IL-12 lyophilized

Cat. No. 554594

**Mouse IL-18 Set, OPTEIATM**

Cat. No. 558853; Lot: 0000044262

- Capture Antibody: Anti- mouse IL-18

Cat. No. 26941E

- Detection Antibody: Biotinylated anti-mouse IL-18

Cat. No. 26942E

- Enzyme Reagenz: Horseradish peroxidase

Cat. No. 26437E

- Standard: Recombinant mouse IL-18 lyophilized  
Cat. No. 558853

**Mouse IL-1 $\beta$  Set, OPTEIATM**

Cat. No. 550603 ; Lot: 0000046785

- Capture Antibody: Anti- mouse IL-1 $\beta$   
Cat. No. 550605
- Detection Antibody: Biotinylated anti-mouse IL-1 $\beta$   
Cat. No. 550623
- Enzyme Reagenz: Horseradish peroxidase  
Cat. No. 554577
- Standard: Recombinant mouse IL-1 $\beta$  lyophilized  
Cat. No. 559603

**Mouse TNF- $\alpha$  Set, OPTEIATM (Mono/Poly)**

Cat. No. 558874; Lot: 0000041921

- Capture Antibody: Anti- mouse TNF- $\alpha$   
Cat. No. 557516
- Detection Antibody: Biotinylated anti-mouse TNF- $\alpha$   
Cat. No. 557432
- Enzyme Reagenz: Horseradish peroxidase  
Cat. No. 554589
- Standard: Recombinant mouse TNF- $\alpha$  lyophilized  
Cat. No. 558874

**Human Total IL-18 DuoSet ELISA R&D**

Cat. No. 558874 DY318-05

- Human Total IL-18 Capture Antibody  
Cat. No. 844541
- Human Total IL-18 Detection Antibody  
Cat. No. 844542
- Human Total IL-18 Standard  
Cat. No. 844543

	- Streptavidin-HRP Cat. No. 893975
<b>ELISA Zusätze</b>	- Coating Buffer, Sodium Carbonate pH 9,5 Cat. No. 2713KC - Stop Solution Cat. No. 2608KZ - Substrate Reagent A Cat. No. 2606KZ - Substrate Reagent B Cat. No. 2607KZ - Wash Concentrate 20x Cat. No. 2605KZ
Entellan	Cat. No. 1.07961.0500
Ethanol	100%, 70% Cat. No. 32205
Formaldehydlösung	min. 37% Cat. No. 1.04003.1000
Foetal Calf Serum	Cat. No. A15-043; Lot: A01128-320
Fuchsin Substrat	Chromogen System Cat. No. K0624
H <sub>2</sub> O	Aqua B. Braun, steril
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid, 30% Cat. No. 1.07209.0250
Hämalaunlösung	Hämalaunlösung, Mayers Cat. No. 1.09249.0500
IL-1-Rezeptor Antagonist	Amgen, München
Kaliumhydrogencarbonat	Merck KGaA, D KHCO <sub>3</sub> , M 100,12 g/mol Cat. No. 4852
Ketamin	0.2 mg/g/Body weight
Levamisole	Cat. No. L-9756; Lot: 81K3654
Luminol Reagent,	Cat. No. NEL 105
Natriumcitrat 0,1%	Cat. No. 71497

Normalserum	DAKO Corporation, USA Goat-Serum Cat. No. X0907 Rabbit Cat. No. X0902
O.C.T.	Tissue TeckR O.C.T. TM Compound Cat. No. 4583
Pan-Caspase- Inhibitor	[ZVAD-fmk], Sigma
<b>PAS-Reaktion</b>	Periodic Acid-Schiff (PAS) Kit Cat. No. 395B-1KT - Hematoxylin Solution, Gill No. 1 100 mL - Periodic Acid Solution (395-1) 2 x 100 ml - Schiff's Reagent (kit only) 4 x 50 mL
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluoride Cat. No. P-7626
Protease-Inhibitor	Complete Protease inhibitor cocktail tablets Cat. No. 1697498 Aprotinin (Sigma, Catalog # A6279) Leupeptin (Sigma, Catalog # L8511) Pepstatin (Sigma, Catalog # P4265)
<b>Proteom Profiler Array</b>	Kit Cat. No. ARY006 - Mouse Cytokine Array Panel A (4 Nitrozellulosemembranen) - Array Buffer 4 und Array Buffer 6 (Protein-Puffer) - Wash Buffer Concentrate - Detection Antibody Cocktail, Mouse Cytokine Array Panel A - Streptavidin-HRP - Chemi Reagent 1 (Hydrogen peroxide) - Chemi Reagent 2 (Luminol)
<b>RNase Protection Assay</b>	Qiagen RNeasy, cat. no. 74104 Riboquant; PharMingen Cat. No. 45024K mCK-2b, cat. no. 45051 mCK-3, cat. no. 45003P

Saponinlösung	Saponin pure Cat. No. 34655; Lot: 13561
TMB	Substrate Reagent Set Cat. No. 555214; Lot: M074899
Tris	$C_4H_{11}NO_3$ MG 121,14 g/mol Cat. No. 4855.2; Lot: 08356698
TrisHCl	$C_4H_{12}ClNO_3$ M 157,6 g/mol Cat. No. 1547.1000; Lot: L 151047532
Triton-X-100	Cat. No. T 8787
<b>TUNEL</b>	In Situ Cell Death Detection Kit, AP - Converter AP - Label solution - Enzyme solution Cat. No. 1684809  TUNEL-Reagenz Fast Red Reagenz Cat. No. 1496549  Converter-AP (TUNEL) Anti-fluorescein-AK, Fab Fragment vom Schaf, konjugiert mit der alkalischen Phosphatase  Enzym Lösung (TUNEL) Terminale desoxynucleotidyl transferase vom Kälber Thymus in Lagerungs-Buffer 10 x konzentriert  Label-Lösung (TUNEL) Nukleotid Mischung in Reaktions Buffer 1x konzentriert
Tween 20	Cat. No. 822184
Xylol	Merck KGaA, D $C_6H_4(CH_3)_2$ Cat. No. K30359385214

### 3.1.4 Verwendete Puffer und Lösungen

ACK-Lyse Puffer	8,29 g NH <sub>4</sub> Cl (0,15 M) 1 g KHCO <sub>3</sub> (10 mM) 37,2 g Na <sub>2</sub> EDTA (0,1mM)
	Die o.g. Salze werden mit Aqua dest. ad 800ml aufgefüllt und gelöst. Anschließend erfolgt die pH-Wert Einstellung auf 7,2-7,4 durch Titration mit 0,1 molarer HCl. Abschließend Zugabe von Aqua dest. auf ein Volumen von 1000ml und Filtration der Lösung durch einen 0,2 µm Filter.
Assay Diluent	PBS mit 10 % FCS, pH 7,0
Blocking-Puffer (Immunhistochemie)	100ml 100 % Methanol, 3 ml 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,2 % Na-Azid (NaN <sub>3</sub> ) 0,6 % Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) in 0,1 % BSA/PBS
Citrat-Puffer	10 mmol/l pH 6,0 Na-Citrat
FACS Puffer	PBS 950ml, 5% Fetal bovine serum 50ml, 0.09% NaN <sub>3</sub> 0,9g
FACS-Lösung 1%	1 g Paraformaldehyd in 100 ml PBS lösen
Fix/Perm Buffer (FACS)	1xPBS 206,25ml, 5% Fetal bovine serum 12,5ml, 0.09% NaN <sub>3</sub> 0,25g, 4% Paraformaldehyde: 32% Lösung in PBS ansetzen (32g in 100 ml), Puder löst sich auf Wärmeschüttler nach 1-2 Stunden bei 56-60°C, dann 31,25 ml zur der vorbereiteten Fix/Perm Lösung zugeben, 0,5% Saponin 1,25 g
Hämalaunlösung	1 g Hämatoxyllin, 50 g Kalium-Aluminiumsulfat, 0,2 g Natriumjodat, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure ad 1000ml Aqua dest

Paraformaldehydlösung 4 %	4 g Paraformaldehyd werden in 100ml PBS gelöst und für 3-4 h auf Heizplatte bei 70 °C mittels Rührfisch vermischt bis Lösung klar wird. Nach Abkühlung wird einen pH von 7,4 eingestellt.
PBS (10x)	81,8 g/l NaCl, 15,6 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, Einstellung auf einen pH von 6,6, Verdünnung mit Aqua bidest (pH 7,2)
Permeabilisierungslösung	0,1 % Triton-X-100 in 0,1 % Natriumcitrat
Sample Diluent	Pharmacia Diagnostics, India 5 x PBS mit BSA + 0,095 % NaCl + Detergenz
Saponin	500 ml PBS, 0,5 g Saponin , 0,5 g BSA, 5 ml FCS
Saponin Buffer (FACS)	PBS 237,5ml, 5% Fetal bovine serum 12,5ml, 0.09% NaN <sub>3</sub> 0,25g, 0,5% Saponin 1,25 g
Stop Solution	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 28ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ad 500ml Aqua dest.
TBS	0,05 M Tris/HCl (7,8 g) 0,15 M NaCl (8,8 g) ad 1l H <sub>2</sub> O, dann pH 7,6 einstellen
Wash Buffer (dsDNAElisa)	Pharmacia Diagnostics, India 20 x PBS Konzentrat + 0,095 % NaCl + Detergenz
Wash Buffer (Elisa)	PBS mit 0,05 % Tween-20 Nach der Herstellung für 3 Tage bei 2-8 °C haltbar.

## 3.2. Methoden

### 3.2.1 Haltung, Behandlung und Untersuchungen der Mäuse

#### Haltung der Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäuse eingesetzt, die wir von der Firma „The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)“ erhielten. Die Mäuse wurden in den pathogenfreien Mausställen der Universitätsmedizin Mainz gehalten, weiter gezüchtet und in Tierräumen mit künstlicher Beleuchtung mit einem 12-stündigem Tag- Nacht-Rhythmus (Lichtwechsel um 6:00 Uhr und Dunkelphase um 18:00 Uhr) sowie bei einer Luftfeuchtigkeit von 55% + 5% und einer Raumlufttemperatur von 22°C + 2°C untergebracht.

Maximal 5 Mäuse teilen sich ein Käfig und werden jeweils nach Geschlecht und Alter sortiert. In den Zuchtkäfigen werden hingegen immer 2 Weibchen mit einem Männchen im Alter von 3-4 Monaten gehalten. Die Haltung und Nutzung der Mäuse für unser Versuchsvorhaben wurde vom Ständigen Ausschuss für Tiere der Johannes-Gutenberg Universität Mainz gemäß der „NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ überprüft und genehmigt.

#### Antikörper-Gabe

##### I) Caspase-1 Inhibitor

Der Caspase-1 Inhibitor wurde dem täglich frisch zubereitetes Maus-Futter dazugegeben (4,2 g Caspase-1 Inhibitor / kg SSNIFF R/M-H Maus-Futter, Aventis Pharma, G), mit dem Ziel einer Plasma-Konzentration von > 2µg/ml. Die Kontrollgruppe erhielt SSNIFF R/M-H Maus-Futter ohne den Caspase-1 Inhibitor. Die Therapie begann ab einem Lebensalter von entweder 2.5 oder 4 Monaten und wurde bis zu zu einem Alter von 5 ½ Monaten fortgeführt. Danach wurden die Mäuse sakrifiziert.

##### II) Pan-Caspase-Inhibitor

Der Pan-Caspase-Inhibitor (Carbobenzoxymethyl-L-valyl-L-alanyl-L-aspartyl-(β-D-methyl)-fluoromethylketone wurde bei 4 Monate alten MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäusen bis zu einem Alter von 5 ½ Monaten verabreicht. Die Mäuse erhielten täglich eine Einzeldosis von 10 mg/kg Körpergewicht subcutan (s.c.). Nach Beendigung des Spritzzyklus wurden die Mäuse sakrifiziert.



Der Pan-Caspase-Inhibitor wurde mit 100% DMSO gemischt und mittels 0,15 M PBS auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt um eine Endkonzentration von 2% DMSO nicht zu überschreiten. Den Mäusen wurden dann etwa 300-400 µl des Pan-Caspase-Inhibitor-Präparats täglich s.c. verabreicht (bei der Endkonzentration von 1 mg/ml: 10µl/g Körpergewicht). Den Mäusen der Kontrollgruppe wurde täglich PBS mit 2% DMSO s.c. injiziert. Es wurden insgesamt 10 Mäuse behandelt, 5 in der Therapiegruppe und 5 in der Kontrollgruppe.

### **III) IL-1-Rezeptor Antagonist**

MRL-Fas<sup>lpr</sup> Mäusen erhielten ab einem Alter von 4 Monaten bis zu einem Alter von 5 ½ Monaten ein IL-1-Rezeptor Antagonist (Amgen, München) in einer Konzentration von 10µg/kg Körpergewicht. Die Kontrollgruppe erhielt PBS mit 2% DMSO. Es wurden insgesamt 29 Mäuse behandelt, 19 in der Therapiegruppe und 10 in der Kontrollgruppe.

### **Sakrifizierung und Obduktion der Versuchstiere**

Nachdem die Mäuse narkotisiert wurden, wurde das Sternum eröffnet. Unter Sicht konnte mittels einer Insulinspritze mit s.c. Injektionskanüle (0,45x25mm; 26G x 0,5) in die Region des rechten Ventrikels des Herzens eingestochen und das Blut aus dem Herzen aspiriert werden, bis dieses zu schlagen aufhörte. Danach folgte das Freipräparieren der Nieren und der Milz. Des Weiteren wurden ein Stück Leber, ein Stück Lunge und ein Lymphknoten entnommen. Nachdem die Organe gedrittelt wurden, erfolgten die Konservierungsverfahren (siehe Gewebekonservierung). Anschließend wurden die zervikalen, axillären, inguinalen, mediastinalen und mesenterialen Lymphknotenstationen auf Vergrößerung und Anzahl der Lymphknoten untersucht. Die Größe wurde mit einer Skala von 0 bis 3 bewertet.

### **Serumgewinnung**

Das Serum konnte durch direkter Blutentnahme aus dem schlagenden Herzen der narkotisierten Mäuse erfolgen. Das entnommene Blut (je nach Maus zwischen 0,5 – 2,0 ml) wurde in ein 2,0 ml Eppendorfgefäß bei 8000 U/min für 15 min abzentrifugiert. Das Serum wurde dann in ein neues steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und in einer -80°C Tiefkühltruhe aufbewahrt.

## **Bestimmung von BUN und Proteinurie**

Während der Dauer des Therapieversuchs wurde die Proteinurie 2x pro Woche sowohl in der Therapie- als auch in der Kontrollgruppe untersucht. Einige Tropfen Urin konnten durch Bestreichen des Unterbauches der Maus gewonnen werden. Nach Auftragen der Urintropfen auf einen Urin-Teststreifen erfolgte die semiquantitative Bestimmung des aktuellen Proteinuriewert.

Die Harnstoffbestimmung wurde mittels eines kolorimetrischen Basisanalysekits gemäß den Herstelleranweisungen durchgeführt.

### **3.2.2 Gewebekonservierung**

Nach der Organentfernung wird jeweils ein Teil der Organe in einem mit 10 ml 4%-igen Formaldehy-Lösung gefüllten 50 ml Falconröhrchen asserviert und anschließend im Pathologischen Institut der Universitätsmedizin Mainz in Paraffin eingebettet.

Die Paraffinblöcke werden dann mittels Mikrotom in 5 µm dünne Gewebsschnitte geschnitten und abschließend auf Poly-L-lysin beschichtete Objektträger aufgetragen und in Präparatekästen bei RT gelagert.

Ein weiteres Teil der Niere wird nach Entfernen der Nierenkapsel und nach stückweise Abpräparieren des Rindengewebes in Kryoröhrchen asserviert. Diese Gewebeproben werden zunächst in flüssigen Stickstoff gegeben und bei -80°C bzw. im Stickstofftank bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Ein anderes Teil der Organe wird in ein mit O.C.T. –Zuckerlösung gefülltes Aluminiumtöpfchen gegeben und ebenso zunächst in flüssigen Stickstoff zur Verfestigung gehalten und anschließend in einem -80°C Tiefkühlschrank gelagert. Diese Gewebepreparate werden dann am Kryomikrotom in einer Schnittdicke von stets 6 µm geschnitten, anschließend auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgetragen und bei -80°C in Präparatekästen aufbewahrt.

### **3.2.3 Gewebefärbung**

#### **Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Vor der Färbung werden die Kryoschnitte luftgetrocknet und die Paraffinschnitte mit Xylol sowie in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und in Aqua dest. hydriert.

Die Schnitte können anschließend in einer wässrigen Hämalaun-Lösung inkubiert werden (jeweils 6 min bei Paraffinschnitte und 1 min bei Kryoschnitte). Nach Abgießen des Hämalauns und Spülen der Schnittpräparate, werden diese 5 min lang in Eosin gegeben. Nach erneutem Spülen werden die Schnitte am Mikroskop kontrolliert, mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol-Lösung dehydriert und mit Entellan eingedeckt. Die Präparate können nun im Dunkeln und bei RT aufbewahrt werden.

### **Färbung mit der PAS-Reaktion**

Die Periodic Acid Schiff Reaktion ist eine histochemische Färbung, bei der v.a. kohlenhydrathaltigen Komponente dargestellt werden können, wie Glykogen, Glykoproteine oder Glykolipide.

Wir verwendeten hierzu Paraffinschnitte, die zunächst mit Xylol sowie in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und in Aqua dest. rehydriert wurden.

Die Schnitte werden in 1%iger Perjodsäure für 6-8 min inkubiert. Nach einem Waschvorgang erfolgt die Inkubation im Schiff'sches Reagenz für 15-20 min.

Anschließend werden die Schnitte unter Leitungswasser gewaschen und auf die rosane Färbung untersucht. Danach werden die Schnitte in Gil's Hämatoxylin für 90 Sekunden inkubiert und erneut gewaschen. Die Schnitte werden dann in 2%igem  $\text{NaHCO}_3$  1 sec lang getaucht und erneut mit Wasser gewaschen. Nun kann die Färbung unter dem Mikroskop beurteilt werden und ggf. könne die Schnitte kurz in 1% HCl in Ethanol gehalten werden, um die blaue Färbung zu reduzieren bzw. in Hämatoxylin um die blaue Färbung zu verstärken.

### **3.2.4 Immunhistochemie**

Mit Immunohistochemie bezeichnet man eine Methode, die zur Detektion von Antigenen in Gewebeschnitten dient.

Hierbei unterscheidet man eine direkte Methode, wobei der primäre AK bereits mit einem Amplifikator gekoppelt ist und eine sensitivere indirekte Methode, bei der erst ein sekundärer AK mit einem Marker gekoppelt ist. Dieser AK ist gegen das  $F_c$ -Fragment des primären AK gerichtet und ermöglicht eine Amplifikation um das 20-100-fache. Die am häufigsten benutzte immunhistochemische indirekte Methode ist die Avidin-Biotin-Komplexmethode (ABC-Methode). Hierzu werden ein biotinylierter Sekundär-AK und Peroxidase als Amplifikator verwendet.

Damit der Primär-AK sich an das gesuchte Protein binden kann, muss die native Struktur des Proteins erhalten bleiben. Für die Immunhistochemie verwendet man somit entweder Paraffin- oder tiefgefrorene Gewebeschnitte, die nach Bindung des AKs fixiert werden.

### **Zellphänotypisierung**

Zur Zellphänotypisierung von Lymphozyten nutzt man die Expression der jeweiligen Zelloberflächenproteine aus, die durch spezifische Antikörper gebunden werden.

Zur Bestimmung der intrarenalen Leukozytenpopulationen verwendeten wir Kryoschnitte.

Die Gewebeschnitte werden, nach 30-minütiger Lufttrocknung, mittels eines Fettstiftes umkringelt und für 10 min in eine Küvette mit 0,1% BSA in PBS gestellt. Dies wiederholt sich zwischen allen folgenden Schritten. Anschließend werden die Gewebeschnitte in eiskaltem Aceton fixiert und die endogene Peroxidase geblockt. Dies erfolgt mit Natriumazid für 10 min bei der CD4/CD8 Färbung und Methanol über 30 min für die F4/80/B220 Färbung. Auf den Objektträger kommt zunächst ein Tropfen Avidin und nach 15 min Inkubation ein Tropfen Biotin. Zum Abdecken von unspezifischen Antikörperbindungsstellen im Gewebe werden nun die Schnitte mit Normalserum aus der gleichen Spezies des Sekundär-AKs über 30 min inkubiert. Hiernach erfolgt ausnahmsweise kein Waschschrift, das Serum wird abgekippt und der Primär-AK (jeweils 100 µl) bzw. 0,1% BSA in PBS bei den Negativkontrollen dazugegeben. Nach mindestens 12 h Inkubation bei 4°C werden die Schnitte mit einem biotinylierten Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wird das Avidin-Biotin-Komplex (AB-Komplex), der Peroxidase markiert ist, zur Signalverstärkung verwendet. Nach erneuter 1 stündigen Inkubation bei RT erfolgt die Substratfärbung mit Diaminobenzidin. Danach wird mit Hämalaun gegengefärbt. Abschließend erfolgt die Fixierung der Objektträger zur Aufbewahrung mit Entellan oder Immuno-Mount-Eindeckmedium.

### **Detektion von IL-18 auf Kryogewebe**

Die IL-18 Färbung wird nach derselben Methode der Zellphänotypisierung durchgeführt, sodass hier nur die dazu differierenden Schritte beschrieben werden. Die Waschlösung ist hier Saponinlösung, zur anschließenden Fixierung werden die

Gewebeschnitte für 10 min mit 100% eiskaltem Ethanol inkubiert und nach dem Waschen mit Na-Azid geblockt. Nach dem Biotin/Avidin Schritt werden die Schnitte mit 10 % Normalserum in 1% BSA/Saponinlösung inkubiert. Der Primär-AK (goat-anti-mouse) wird in der Verdünnung 1:50 in 1% BSA/Saponin dazugegeben und über Nacht inkubiert. Der Sekundär-AK wird in einer Verdünnung von 1:200 dazupipettiert und 1 h bei RT inkubiert. Die restlichen Schritte werden wie oben durchgeführt.

### **Immunohistochemischer Nachweis von Ki-67**

Ki67 ist ein Protein, das sich während der Interphase im Zellkern befindet. Während der Mitose lagert sich das Protein an die Chromosomen und kann dann als Proliferationsmarker immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Hierfür werden Paraffinschnitte verwendet. Diese werden mit Xylol sowie in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und in Aqua dest. hydriert. Nach einem Waschschrift wird die endogene Peroxidase mit Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,1% BSA/PBS geblockt und die Schnitte für 30 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgt die Antigendemaskierung durch eine Inkubation mit 10mM Natriumcitrat für 45 Min bei 95°C.

Die Gewebeschnitte werden mittels eines Fettstiftes umkringelt und für 15 min bei RT mit 50-100 µl Avidin und nach erneutem Waschen mit 50-100 µl Biotin inkubiert.

Die Schnitte werden nun mit Normalserum aus der gleichen Spezies des Sekundär-AKs (goat) über 30 min inkubiert. Danach wird der Primär-AK (rabbit-anti-mouse Ki67, 1:200 diluiert) bzw. 0,1% BSA in PBS bei den Negativkontrollen dazugegeben. Nach 1 h Inkubation bei RT und Waschen der Schnitte, werden diese mit dem Sekundärantikörper (biotinylierter goat anti-rabbit, 1:200 diluiert) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wird nach 2-maligem Waschen das Avidin-Biotin-Komplex (AB-Komplex), der Peroxidase markiert ist, zur Signalverstärkung verwendet. Nach erneuter 1 stündigen Inkubation bei RT erfolgt die Substratfärbung mit Diaminobenzidin. Die Reaktion wird mit Leitungswasser gestoppt, danach wird mit Hämalaun gegengefärbt.

Abschließend erfolgt die Dehydrierung der Schnitte und die Fixierung der Objektträger zur Aufbewahrung mit Paramount.

### 3.2.5 Tunel-Assay

Die Tunel-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling) dient zum Nachweis von apoptotischen Zellen. Während des programmierten Zelltod wird die DNA durch Endonukleasen fragmentiert. An den Bruchenden der DNA-Fragmente werden Hydroxygruppen frei, die während des Assays durch das Enzym TdT (Terminal Desoxynucleotidyl Transferase) mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden versehen werden. Diese können dann mit entsprechenden Mikroskopen sichtbar gemacht werden.

Zur Apoptose-Detektion in der Niere von MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäusen verwendeten wir Kryoschnitte. Nachdem diese für 30 min luftgetrocknet und in TBS gestellt werden, erfolgt die Fixierung in 4% Paraformaldehyd für 30 min bei RT. Nach 10-minütigem Waschen werden die Schnitte mit einer Permeabilisationslösung (0,1 % Triton-X-100 in 0,1 % Natriumcitrat) für 2 min bei 4°C inkubiert und erneut mit TBS gewaschen. Danach werden die Schnitte mit jeweils 50 µl TUNEL-Reaktionslösung (die Negativkontrolle mit 50 µl Label Solution) 1 h bei 37°C inkubiert. Die Positivkontrolle wird mit DNase vorbehandelt.

Nach erneutem Waschen über 10 min, werden die fluoreszierenden Zellen unter dem Mikroskop ausgewertet. Anschließend wird die Converter-Peroxidase zugegeben (50 µl pro Schnitt), 30 min bei RT inkubiert und erneut für 10 min gewaschen. Nachdem das Fast Red Reagenz dazugegeben wird, färben sich die positiven Zellen rötlich. Abschließend wird die Reaktion mit Leitungswasser gestoppt, es erfolgen die Gegenfärbung mit Hämalaun und das Eindecken. Eine weitere Auswertung unter dem Mikroskop ist möglich.

### 3.2.6 ELISA

Das ELISA ist ein antikörperbasiertes Assay, womit sich Antikörper oder Antigene durch verschiedene Methoden quantitativ bestimmen lassen. Zur Bestimmung von Zytokin- und dsDNA-Antikörper wandten wir die Sandwich-ELISA-Methode an. Mit dieser Technik wird die Menge eines Antigens zwischen zwei Lagen von Antikörpern bestimmt. Zunächst wird ein sogenannter Capture Antikörper an einen Untergrund gebunden (Flachboden einer 96-Well-Platte). Das Antigen, welches gemessen werden soll, wird hinzugefügt und bindet an diesen Fangantikörper mit hoher Affinität. Ein zweiter markierter Detektionsantikörper wird hinzugefügt, bindet an ein

anderes Epitop des Antigens und katalysiert eine enzymatische Farbreaktion. Danach wird die optische Dichte in einem Photometer bei der entsprechenden Wellenlänge gemessen. Ein Standard, welches bei Beginn des Versuches verdünnt an die Platte gebunden wird, dient der Erstellung einer Eichkurve mit dem ELISA-Reader Computerprogramm. Diese ermöglicht wiederum die Errechnung der entsprechenden Antigenkonzentrationen der eingesetzten Proben. erstellt, anhand derer dann die errechnet werden können.

### **Zytokin-ELISA**

Wir bestimmten die Serumkonzentration von IL-18, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  bei MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäusen und die Serumkonzentration von IL-18 bei SLE-Patienten. Die Seren wurden nicht verdünnt, allerdings führten wir den gesamten Versuch nur mit 50  $\mu$ l, anstatt mit 100  $\mu$ l pro Well durch.

Das Capture Antibody wird zunächst laut Herstellerinformationen mittels Coating Puffer verdünnt und auf der 96-Well-Platte aufgetragen (100  $\mu$ l pro Well). Nach einer Nacht Inkubation bei 4°C werden die Wells 3 x mit Wasch Puffer (PBS mit 0,05% Tween-20) gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu verhindern werden die Wells mit dem Assay-Diluent geblockt (200  $\mu$ l pro Well im murinen ELISA, 300  $\mu$ l pro Well im humanen ELISA). Nach 1 h Inkubation bei RT und erneutem 3-maligem Waschen der Wells werden der gemäß den Herstelleranweisungen verdünnten Standard (100  $\mu$ l pro Well) sowie die Proben in die Wells pipettiert (jeweils 50  $\mu$ l Serum pro Well). Nach erneuter Inkubation von 2 h bei RT und 5-maligem Waschen der Wells wird ein biotinylierter, polyklonaler AK, welcher spezifisch für das jeweilige untersuchte Zytokin ist, zugegeben (100  $\mu$ l pro Well). Die Platten werden nun 1 h bei RT inkubiert und anschließend 5-malig gewaschen. Danach wird das Enzym-Reagenz (Avidin- horseradisch peroxidase conjugate) in entsprechender Verdünnung zugegeben (100  $\mu$ l pro Well) und für 30 min inkubiert. Es erfolgt dann ein 7-maliges Waschen pro Well und die Substratlösung wird dazu pipettiert (100  $\mu$ l pro Well). Während der 30 min Inkubation färbt sich das farblose Substrat, dank des antikörpergebundenen Enzyms, in ein blaues Substrat um. Durch Zugabe der Stop-Lösung (2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) verfärbt es sich in ein gelbes Substrat. Die Intensität der Gelbfärbung, die zur Menge des gebundenen Zytokins und somit zur Serumkonzentration proportional ist, wird in einem Microplate-ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen ist. Die Zytokinkonzentrationen werden

abschließend mittels der durch die Standardkonzentrationsergebnisse erhaltenen Eichkurve errechnet.

### **Albumin ELISA**

Das Procedere entspricht bis auf wenige Unterschiede den bereits oben beschriebenen ELISA's. Die zu untersuchenden Proben (Maus-Urin) werden auf 1:2500 verdünnt und es werden jeweils 100 µl pro Well pipettiert.

### **dsDNA ELISA**

Das Procedere entspricht bis auf wenige Unterschiede den bereits oben beschriebenen ELISA's: Die ELISA-Platten sind bereits mit dem Capture-Antibody ge-coated.

Die zu untersuchenden Proben werden 1:200 verdünnt und 30 min bei RT inkubiert, anschließend gewaschen und mit dem enzymmarkierten sekundären Anti-Maus Antikörper erneut für 30 Minuten inkubiert. Nach 3-maligem Waschen werden 100 µl TMB-Substrat zugegeben und 10 min im Dunkeln inkubiert, danach wird die enzymatische Reaktion mit 50 µl Stop-Lösung beendet. Abschließend können mittels photometrischer Bestimmung die dsDNA Konzentrationen im Serum bestimmt werden.

### **3.2.7 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, um Oberflächenmolekülen, intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNA quantitativ zu bestimmen. Sie wird beispielsweise eingesetzt, um verschiedene Immunzell-Subtypen dank der unterschiedlichen Größe und Morphologie zu identifizieren, zu trennen und zu charakterisieren.

Zunächst werden die zu untersuchende Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen hochspezifische Zelloberflächenantigene z.B. Cluster of Differentiation Marker (CD-Marker) markiert. Anschließend wird ein Fluoreszenz-markiertes Anti-Immuglobin-Antikörper dazugegeben. Wenn das markierte Zellgemisch anschließend im FACS-Gerät durch eine Düse gedrückt werden, passieren vereinzelt Zellen einen Laserstrahl. Die mit Farbstoffmolekülen markierten Zellen führen zur Fluoreszenzanregung und Ausstrahlung. Durch empfindliche Photodetektoren werden das gestreute und das emittierte Licht gemessen. Die Größe und die



Granularität der Zellen werden dank des gestreuten Lichtes bestimmt während die Zellen dank der Fluoreszenz differenziert werden.

Auf dem Computer werden die Daten als ein Histogramm (bei einem einzigen Fluoreszenzfarbstoff) oder als zweidimensionales Streudiagramm (bei zwei oder mehr Antikörpern mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen) zusammengefasst.

Zur Untersuchung der Effekte einer Caspase-Inhibition auf die Differenzierung und Aktivierung der Leukozytenpopulationen in der Niere erfolgte eine FACS-Analyse der Nierengewebelysate von MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäusen.

Hierzu wurden die Nierenteile verwendet, die in Kryoröhrchen asserviert wurden.

Diese werden durch ein 40 µm Sieb passiert und bei 1500 U/min für 10 min zentrifugiert. Das Lysat wird dann für 5 min mit ACK-Lysepuffer zur Lyse roter Blutkörperchen inkubiert und erneut zentrifugiert. Nach einmaliges Waschen mit PBS werden die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und anschließend gezählt. Ziel ist 3 mio Zellen je Probe zu verwenden. Die Zellen werden nun in 500-750 µl FACS Puffe resuspendiert und können mittels des FACS-Zytometer weiter untersucht werden. Um in der FACS-Analyse die infiltrierenden Leukozyten von dem Parenchymzellen insbesondere der großen Anzahl von Tubulusepithelzellen zu differenzieren, erfolgt in jedem eingesetzten Antikörpermix für die FACS-Färbung immer der Einsatz eines Pan-Leukozyten Markers. Im Falle der MRL-Fas<sup>lpr</sup> Mäuse ist dies ein anti-CD45.1 Ak.

### **3.2.8 RNase Protection Assay**

Um die mRNA von intrarenalen Zytokinen und Chemokinen zu erfassen verwendeten wir einen multiprobe RNase Protection Assay System. Zunächst wird die komplette RNA aus Nierengewebelysaten extrahiert und hybridisiert entsprechend der Herstellerangaben. Die „RNase geschützten“ Proben werden nun gereinigt, in denaturierenden Polyacrylamidgel gelöst und durch Autoradiographie visualisiert. Insgesamt wurden 5 Proben pro Behandlungsgruppe analysiert und mittels Densitometrie bezogen zu den Haushaltsgenen quantifiziert.

### **3.2.9 Caspase Substrate Assay**

Mittels eines Caspase Substrate Assay konnten wir die Caspase-Aktivität mit einer fluorimetrischen Messung quantitativ detektieren. Hierfür verwendeten wir

Nierengewebelysate. Die Zellen werden auf Mikroplatten kultiviert und es werden apoptotische Prozesse induziert, wodurch wiederum die Caspasen aktiviert werden. Zunächst werden 50 µl Apoptose induzierendes Agent bzw. nur das Diluent bei Negativkontrollen pipettiert. Anschließend werden die Zellen ( $4 \times 10^4$  per Well), bzw. das Standard, und die positive Kontrolle (Lysat aus apoptotischen U937 Zellen) in den Mikroplatten hinzugegeben und inkubiert. Danach werden pro Wells je 100 µl Substrat Working solution gegeben und die abgedeckten Mikroplatten 1 h bei 37°C inkubiert.

Die Intensität der Fluoreszenzfärbung, die zur Menge des während der Untersuchung entstandenen Fluorochroms und somit zur Konzentration aktivierter Caspasen proportional ist, wird bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die jeweilige Caspase-Aktivität wird abschließend mittels der durch die Standardkonzentrationsergebnisse erhaltenen Kalibrierungskurve errechnet.

### **3.2.10 Proteome Profiler Array**

Um den Effekt einer Caspase-1 Inhibition auf die Expression von mehreren Zytokinen in der Niere von MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäusen gleichzeitigen zu bestimmen, erfolgte eine Proteomanalyse.

Als Proteomanalyse bezeichnet man eine quantitative Bestimmung der in einem Gewebe oder Flüssigkeit vorhandenen Proteine. Es werden somit gleichzeitig die Proteinexpression, aber auch die posttranslationalen Proteinmodifizierung und den Proteinabbau analysiert.

Hierzu wurden Nierengewebelysate von behandelten Mäusen untersucht und mit denen von scheinbehandelten Mäusen verglichen. Hierzu wurden die Nierenteile verwendet, die in Kryoröhrchen asserviert wurden.

Es erfolgt zunächst die Homogenisierung des Gewebes mit PBS und einem Protease Inhibitor. Anschließend wird Triton X-100 dazugegeben und das Lysat erneut bei -80°C eingefroren. Nachdem das Lysat aufgetaut ist, wird es bei 10000 U/min für 5 min zentrifugiert, um verbleibende Zelltrümmer zu entfernen. Auf Nitrocellulosemembranen sind bereits 40 unterschiedliche Anti-Zytokin AK immobilisiert. Nachdem jeweils 2 ml Blockpuffer in den 4 Wells der Platte pipettiert werden, wird jeweils eine Membran pro Well dazugegeben. Die Platte wird nun 1h auf einem Schwenktisch inkubiert, danach kann man den Blockpuffer abpipettieren. In der Zwischenzeit werden die Proben vorbereitet: pro 1 ml Probe werden jeweils

0,5 ml einer 2. Pufferlösung und 15 µl Detection-AK Cocktail dazugegeben. Nach 1 h Inkubation bei RT kann man jeweils eine Probe in einem Well pipettieren. Die Platten werden nun abgedeckt und eine Nacht auf einem Schwenktisch bei 4°C inkubiert. Am Folgetag können die Membranen von den Platten entnommen werden und 3-malig mit einem Waschpuffer gewaschen werden. Nachdem auch die Platte gespült wurde, wird in jedem Well 2,0 ml Streptavidin-HRP (Streptavidin mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert) pipettiert und die Membranen erneut hinzugefügt. Nach 30 min Inkubation auf einem Schwenktisch bei RT werden Membranen und Platte erneut gewaschen und die Membranen in einer Plastikschrutzhülle gelegt. Auf den Membranen wird dann jeweils 1 ml Chemi Reagent Mix, welcher Wasserstoffperoxid und Luminol beinhaltet, pipettiert. Nach 1 min Inkubation wird der Chemi Reagent Mix entfernt, die Membranen mit einer Plastikfolie bedeckt, in einer Autoradiografie Filmkassette gelegt und einem Röntgenfilm 1-10 min lang ausgesetzt. Nun können die Zytokinkonzentrationen mittels einer Analyse-Software aus dem entwickelten Film errechnet werden.

### **3.2.11 SCOREs**

Um den Ausmaß der Nieren- und Hautbeteiligung zu bewerten wurde jeweils ein Score bestimmt.

#### **Hautbeteiligung**

Die Hautbeteiligung wurde wöchentlich makroskopisch erfasst und mit einem Score-System von 0 bis 3 beschrieben (0 - keine Hautbeteiligung, 1- leicht (Schnauze und Ohren), 2 – moderat < 2 cm (Schnauze, Ohren, infrascapular) und 3 – schwer >2 cm (Schnauze, Ohren, infrascapular).

#### **Nierenbeteiligung-Score**

Die Nierenbeteiligung wurde histologisch erfasst. Infiltrate wurden interstiell, perivaskulär und periglomerulär beurteilt (siehe Tabelle 3.1) und aus den 3 Werten wurde ein Mittelwert errechnet.

<b>Score</b>	<b>Interstitiell (in 10 Areas)</b>	<b>Perivaskulär (in 10 Gefäßen)</b>	<b>Periglomerulär (in 10 Glomeruli)</b>
0	Keine Infiltrate	Keine Infiltrate	Keine Infiltrate
1	Wenige Infiltrate (<50 Zellen)	Um Gefäßen: <5 Zellenschichten	Um Glomerulus: <5 Zellenschichten
2	Infiltrate: 50-75 Zellen	Um Gefäßen: 5-10 Zellenschichten	Um Glomerulus: 5-10 Zellenschichten
3	Infiltrate: 75-100 Zellen	Um Gefäßen: >10 Zellenschichten	Um Glomerulus: <10 Zellenschichten
4	Infiltrate: >100 Zellen	Um Gefäßen: >50 Zellenschichten	Um Glomerulus: >25 Zellenschichten

Tabelle 3.1: Histologischer Nierenbeteiligung-Score auf interstitieller, perivaskulärer und periglomerulärer Ebene.

### 3.2.12 Patientenkollektiv

Die Patienten, die in dieser Studie eingeschlossen wurden, stellten sich in der Universitätsmedizin Mainz in dem Zeitraum vor.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission für klinische Studien Rheinland-Pfalz genehmigt. Alle Patienten wurden aufgeklärt und unterschrieben eine Einwilligung zur Teilnahme an der Studie.

Insgesamt wurden 21 Patienten rekrutiert, die den revidierten Klassifikationskriterien des American College of Rheumatology (mindestens 4 Kriterien) entsprachen. Diese Patienten wurden mit 29 alters- und geschlechts gematched gesunden Kontrollen verglichen. Die freiwilligen, gesunden Kontrollen wurden eingeschlossen, wenn eine Nierenerkrankung, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie oder eine Autoimmunerkrankung ausgeschlossen werden konnte.

Zum Zeitpunkt des Einschlusses in der Studie wurden jeweils 10 ml Blut und 10 ml Urin für die Studie gewonnen. Blut wurde bei 8000 U/min für 10 min zentrifugiert und das somit gewonnene Serum wurde aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Alle Proben wurden retrospektiv in der Universitätsmedizin Mainz untersucht.

Das SLE-Labor einschließlich ANA, anti-dsDNA Ak, Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), C reaktives Protein (CRP), Kreatinin, C3 und C4 sowie eine 24-h Proteinurie und ein aktives Sediment, wurde jeweils zum Zeitpunkt des Einschlusses in der Studie sowie bei jeder Verlaufskontrolle entnommen. Diese Laborwerte wurden im Zentrallabor der Universitätsmedizin bestimmt.

Die Krankheitsaktivität wurde mittels des Systemic Lupus Erythematoses Disease Activity Index (SLEDAI) bewertet. Hierfür werden insgesamt 24 klinische und laborchemische Parameter, die 9 unterschiedliche Organsysteme abbilden mit unterschiedlichen Faktoren gewichtet. Der Score erreicht einen Maximalwert von 105 (Siehe Abb. 3.1.).

### **3.2.13 Statistisch angewandten Methoden**

Für die deskriptive Statistik werden für die kategorialen Daten und Häufigkeit, für die stetigen Daten Minimum, Maximum, Median und Quartile, sowie Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

Die Berechnung statistischer Unterschiede zwischen zwei Gruppen von nicht normalverteilten Daten erfolgte durch den ungepaarten Mann Whitney U-Test (nonparametrisches Testverfahren).

Für die Statistik und Erstellung der Graphiken wurde das Programm Graph-Pad Prism Version 8.0 (Graph Pad, San Diego, CA) verwendet.

## SLEDAI – Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

## Systemischer Lupus erythematoses (SLE)

Name

Geb.-Datum

Datum

Seite 1/2

Die Punkte werden zugewiesen, wenn der Deskriptor zurzeit des Arztbesuchs oder während der 10 vorausgehenden Tage vorgelegen hat bzw. vorliegt.

Beschreibung	Definition	
Anfall	Beginn vor kurzem; metabolische, infektiöse oder medikamentöse Ursachen müssen ausgeschlossen werden	8
Psychose	Fähigkeit, normale Aktivitäten auszuführen, aufgrund einer schweren Störung der Realitätswahrnehmung verändert; umfasst Halluzinationen, Inkohärenz, ausgeprägt lockeres Assoziieren, verarmten Gedankeninhalt, ausgeprägt unlogisches Denken, bizarres, desorganisiertes oder katatonisches Verhalten; Urämie und medikamentöse Ursachen müssen ausgeschlossen werden	8
Psychoorganisches Syndrom	veränderte geistige Funktion mit Beeinträchtigung von Orientierung, Gedächtnis und anderen intellektuellen Funktionen; mit sehr schnellem Beginn und fluktuierenden klinischen Merkmalen; umfasst Beeinträchtigung des Bewusstseins mit verringerter Fähigkeit zu fokussieren und Unfähigkeit zu anhaltender Konzentration auf die Umgebung, plus mindestens zwei der folgenden Merkmale: Wahrnehmungsstörungen, inkohärentes Reden, Schlaflosigkeit oder Schläfrigkeit tagsüber oder gesteigerte oder gesenkte psychomotorische Aktivität; metabolische, infektiöse oder medikamentöse Ursachen müssen ausgeschlossen werden	8
Sehstörung	retinale Veränderungen bei SLE; umfassen Schwellung der Nervenfasern (cytoid bodies), Netzhautblutungen, seröse Exsudate oder Hämorrhagien in der Choroidea oder Opticus-Neuritis; metabolische, infektiöse oder medikamentöse Ursachen müssen ausgeschlossen werden	8
Hirnnerven-Störung	neu beginnende sensorische oder motorische Neuropathie, bei der die Hirnnerven betroffen sind	8
Lupus-Kopfschmerz	schwerer, anhaltender Kopfschmerz; kann migräneartig sein, darf aber nicht auf Analgetika ansprechen	8
Zerebrovaskulärer Insult	neu beginnender zerebrovaskuläre(r) Insult(e); Ausschluss einer Arteriosklerose.	8
Vaskulitis	Ulzeration; Gangrän; schmerzhafte Fingerknötchen; periungualer Infarkt; Splitterblutungen oder Nachweis einer Vaskulitis durch Biopsie oder Angiogramm	8
Arthritis	mehr als zwei Gelenke mit Schmerz und Entzündungszeichen (also Empfindlichkeit, Schwellung oder Erguss)	4
Myositis	Schwäche oder Schmerzen proximaler Muskeln, einhergehend mit erhöhter Kreatin-Phosphokinase oder Aldolase oder Nachweis einer Myositis mittels Veränderungen im EMG oder Biopsie	4

Harnzylinder	granuläre Zylinder oder Erythrozyten-Zylinder	4
Hämaturie	> 5 Erythrozyten im Mikroskopierfeld bei 400facher Vergrößerung (high power field, hpf); Steine, Infektion oder andere Ursachen müssen ausgeschlossen werden	4
Proteinurie	> 0,5 g/24 Stunden; neu beginnend oder Steigerung in jüngster Zeit um mehr als 0,5 g/24 Stunden	4
Pyurie	> 5 Leukozyten im Mikroskopierfeld bei 400facher Vergrößerung; Ausschluss einer Infektion	4
Erythem	Neubeginn oder erneutes Auftreten eines Erythems	2
Alopezie	Neubeginn oder erneutes Auftreten von pathologischem Haarausfall, diffus oder als Alopecia areata	2
Schleimhaut-Ulzera	Neubeginn oder erneutes Auftreten oraler oder nasaler Ulzerationen	2
Pleuritis	pleuritischer Schmerz im Brustkorb, mit Pleurareiben oder Erguss oder Verdickung der Pleura	2
Perikarditis	perikardialer Schmerz mit mindestens einem der folgenden Merkmale: Reiben, Erguss oder Bestätigung durch EKG oder Echokardiogramm	2
Komplementverminderung	verringerte Werte für CH50, C3 oder C4, unterhalb der für die Labortests normalen unteren Referenzbereiche	2
erhöhte dsDNA-Antikörper	im Labortest oberhalb des Normbereichs	2
Fieber	> 38 °C; Ausschluss einer infektiösen Ursache	1
Thrombozytopenie	< 100.000 Thrombozyten pro µl	1
Leukopenie	< 3.000 Leukozyten pro µl; Ausschluss einer medikamentösen Ursache	1

**Berechnung:**

Summe Punkte = SLEDAI =

Abb. 3. 1 SLEDAI Fragebogen (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index)  
Aus Medal Rheumatologie, Kriterien für die Klassifikation, Diagnose, Aktivität und Prognose  
rheumatologischer Erkrankungen; Kuipers, Zeidler, Köhler; Wiskom Verlag, Seite 83

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse in den Mausmodellen

#### 4.1.1 Wirkung der Caspase-1 Inhibition auf dem SLE

Nachdem wir in Vorarbeiten zeigen konnten, dass IL-18 eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des SLE spielt, untersuchten wir hier eine mögliche Hemmung der Bildung von aktivem IL-18 mittels einer Caspase-1 Inhibition. Hierzu wurden MRL-*Fas<sup>lpr</sup>*-Mäuse mit einem Caspase-Inhibitor über 3 Monate behandelt. Der Caspase-1-Inhibitor blockiert allerdings nicht nur die Bildung der aktiven-IL-18 Form, sondern auch die Bildung der aktiven IL-1 $\beta$  aus den Proformen des IL-18 und IL-1 $\beta$ . Die Therapie wurde bei 2,5 Monaten alten Mäusen begonnen und bis zu einem Lebensalter von 5,5 Monaten fortgeführt.

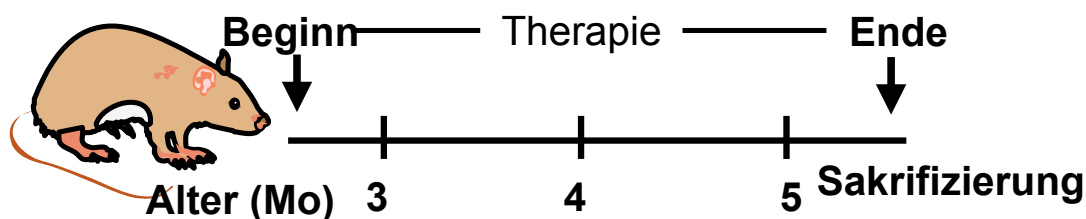


Abb. 4.1: Therapieschema mit Caspase-1 Inhibitor: tägliche Gabe von einem oralen Caspase-Inhibitor ab einem Alter von 2,5 Monaten bis zu einem Alter von 5,5 Monaten. Anschließend Sakrifizierung der Mäuse.

Um die Wirksamkeit der Caspase-1 Hemmung zu untersuchen, wurden die Konzentrationen von IL-18, IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  im Serum gemessen. Im Vergleich zu der scheinbehandelten Kontrollgruppe zeigten sich nach Caspase-1 Hemmung relevant niedrigere Werte der systemischen Zytokinexpression (siehe Abb. 4.2).

Die reduzierten Konzentrationen von IL-18, IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  wirkten sich wiederum protektiv auf die Erkrankungsprogression aus, mit abgeschwächter Lymphadenopathie, Splenomegalie und relevant reduzierter Inzidenz der Hautläsionen (siehe Abb. 4.3 und Abb. 4.4).



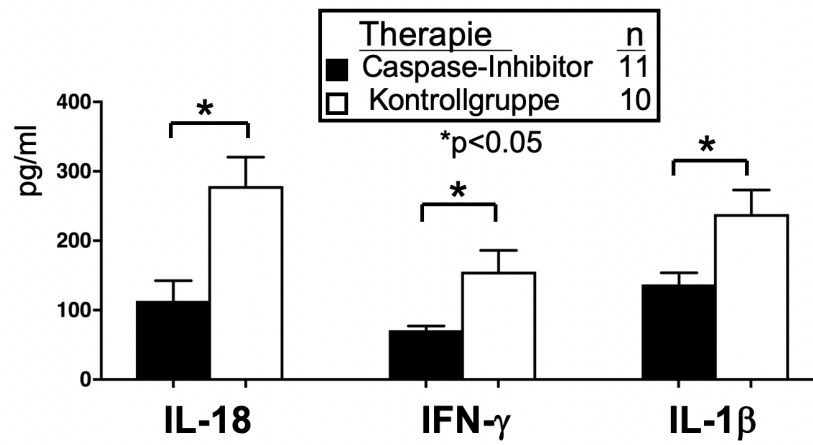


Abb. 4.2: Serum-ELISA - Erfolgreiche Hemmung von IL-18, IFN $\gamma$  und IL-1 $\beta$  durch Caspase-1 Hemmung im Vergleich zur Kontrollgruppe

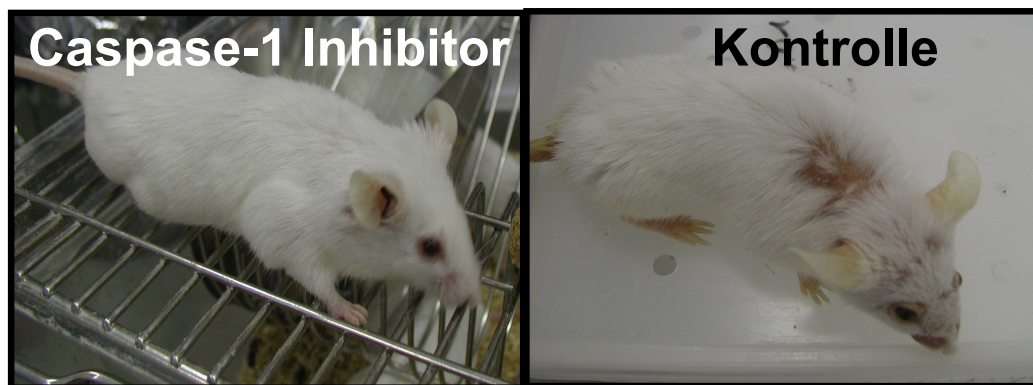


Abb. 4.3: Phänotyp der MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäuse nach Caspase-1-Inhibition im Vergleich zur Kontrollgruppe

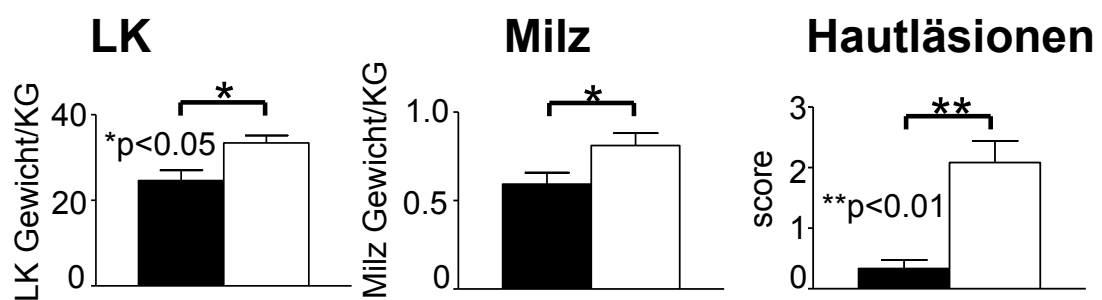
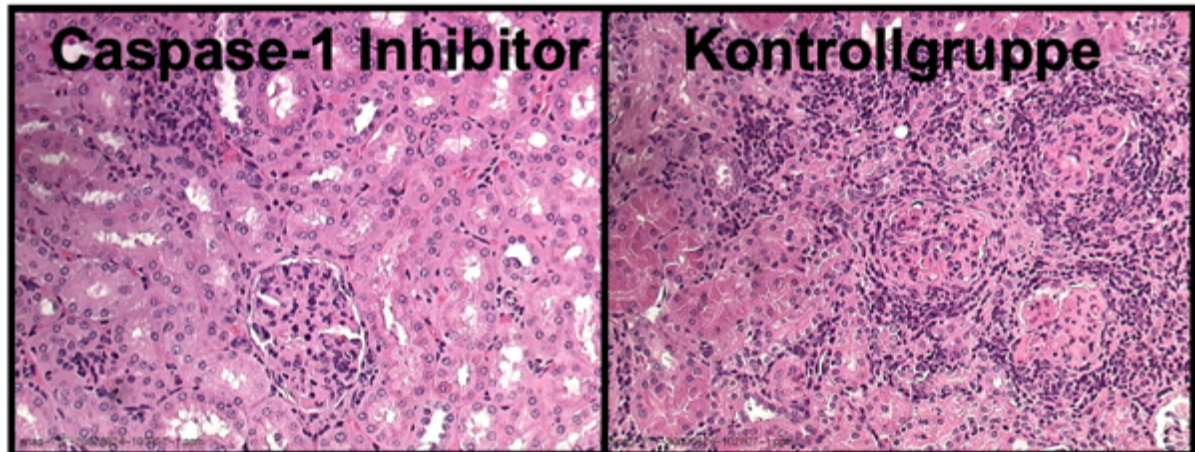


Abb. 4.4: Relevante Besserung von Lymphadenopathie und Splenomegalie sowie relevant reduzierte Hautläsionen in MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäuse nach Caspase-1 Inhibition im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Da wir uns besonders für den Effekt der Caspase-1 Hemmung auf die Nierenbeteiligung interessierten, untersuchten wir die Nieren histopathologisch. In den Nieren der behandelten Mäuse waren die pathologischen Veränderungen auf glomerulärer und tubulärer Ebene deutlich abgeschwächt im Vergleich zu den Kontrollmäusen.



Therapie	n
■ Caspase-Inhibitor	11
□ Kontrollgruppe	10

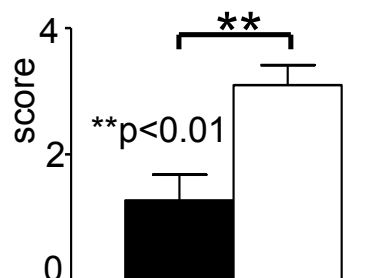


Abb. 4.5: Repräsentative Mikrofotografien (20 X): Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Niere einer MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Maus nach Behandlung mit einem Caspase-Inhibitor verglichen mit der Niere einer MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Maus mit Scheinbehandlung. Die histopathologische Veränderungen der Niere sind relevant schwächer ausgeprägt nach Caspase-1 Inhibition im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Weiterhin konnten wir durch Bestimmung der Proteinurie und des Blut-Harnstoff-Stickstoffs (BUN) eine relevant bessere Nierenfunktion nach Therapie mit Caspase-1-Inhibitor feststellen.

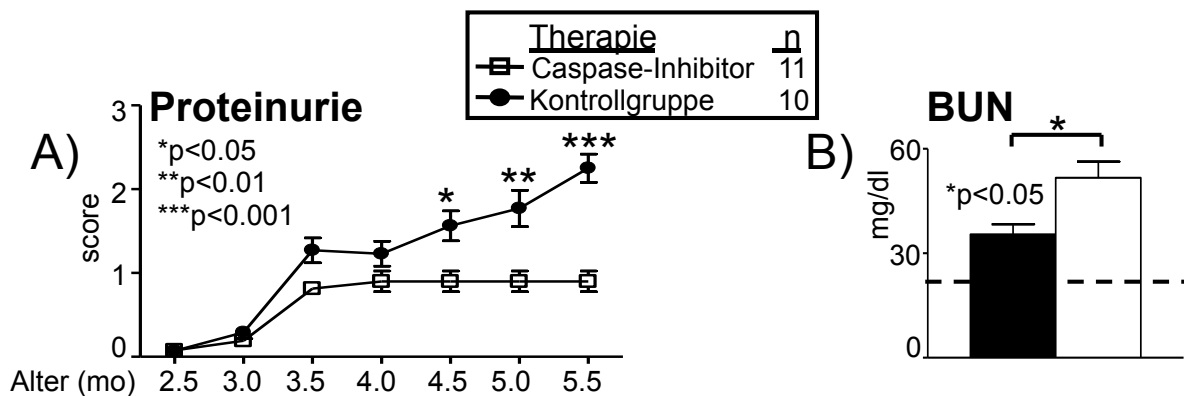


Abb. 4.6: Reduktion der Nierenfunktionseinschränkung in MRL-Fas<sup>Ipr</sup>-Mäusen nach Behandlung mit Caspase-1-Inhibition im Vergleich zur Kontrollgruppe.

A) Semiquantitative Proteinurie-Bestimmung 2) BUN, die gestrichelte Linie zeigt die BUN-Konzentration in gesunden MRL-Fas<sup>Ipr</sup>-Mäusen (Alter: 2 Monate)

Als zusätzlicher Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion nach Caspase-1 Hemmung, untersuchten wir die Albumin-Konzentration im Urin. Obwohl sich keine statistisch relevante Besserung der Albuminurie nachweisen lässt, kann eine Besserungstendenz nach Caspase-1 Inhibition erkannt werden, sodass auch hiermit ein nephroprotektiver Effekt der Caspase-1 Inhibition postuliert werden kann.

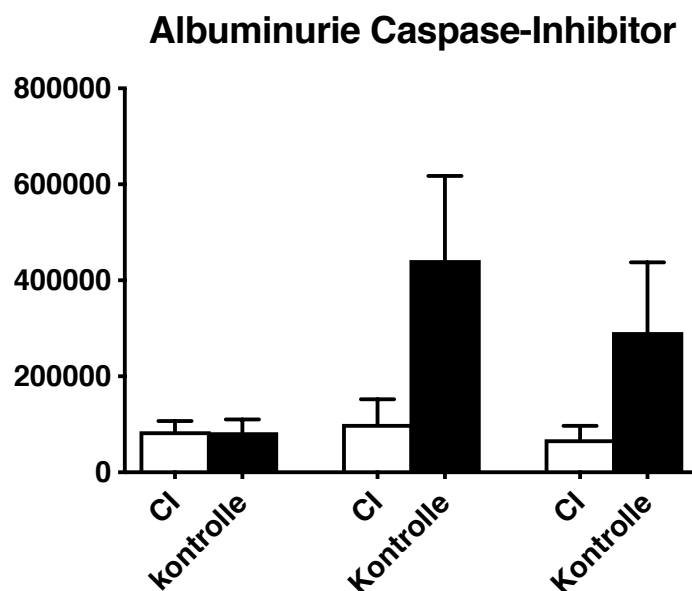


Abb. 4. 7: Albumin-ELISA im Urin von MRL-Fas<sup>Ipr</sup>-Mäusen nach Caspase-1 Inhibition im Vergleich zur Kontrollgruppe. Messungen jeweils zu Therapiestart, mit 4 Monaten und mit 5 Monate. Keine statistisch relevante Differenz nachweisbar, allerdings kann eine Besserungstendenz der Albuminurie nach Caspase-1 Inhibition erkannt werden.

Interessanterweise führte ein Therapiestart mit dem Caspase-Inhibitor auch nach Krankheitsbeginn, als therapeutischer Therapieansatz (Therapiedauer: 4,0 bis 5,5 Lebensmonat) zu einer Besserung der Nierenbeteiligung und der systemischen Erkrankung. Die Wirkung der Caspase Hemmung war in dieser Gruppe allerdings geringer als in den bereits vor Krankheitsausbruch behandelten Mäusen.

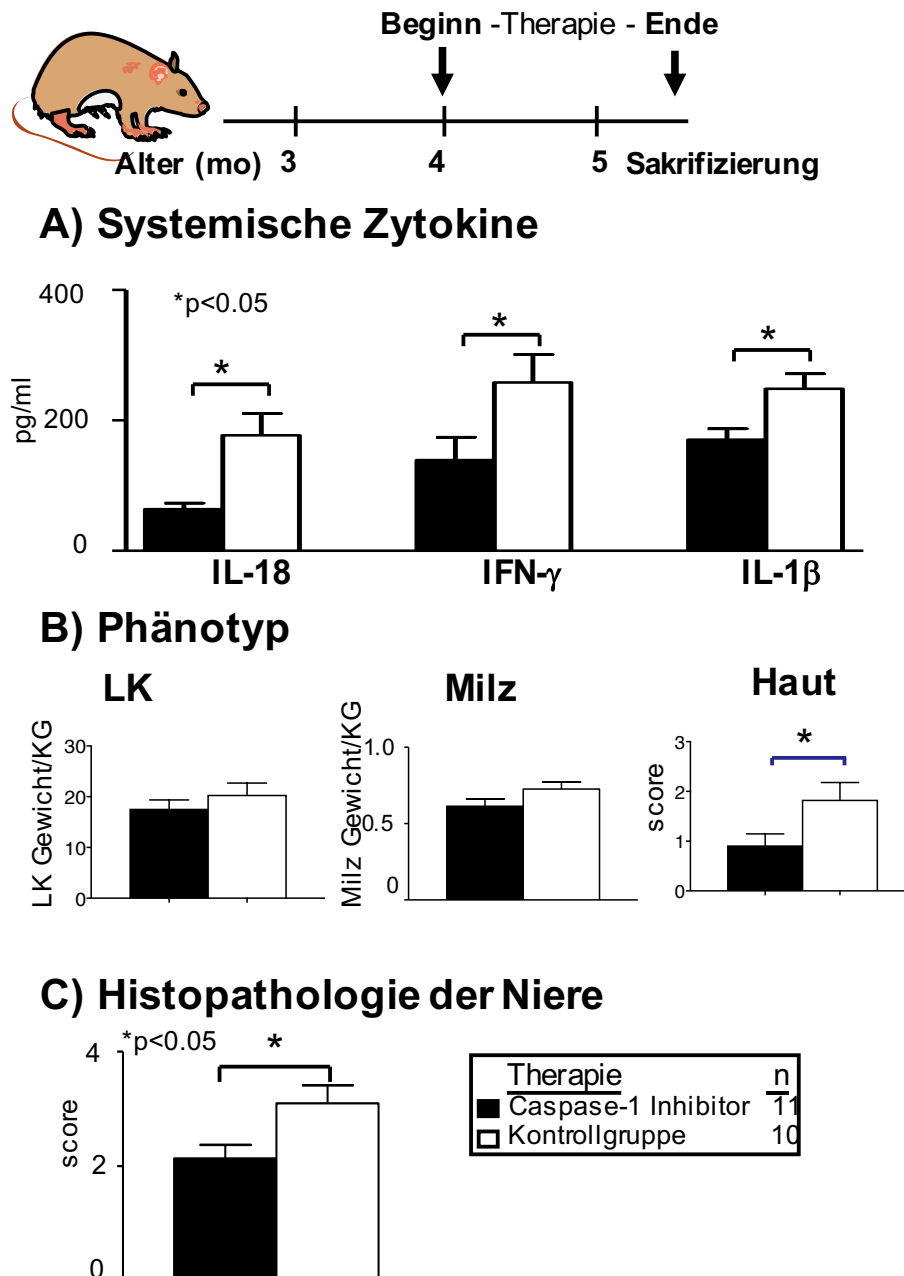


Abb. 4.8: Therapie mit Caspase-1 Inhibitor vom 4. Lebensmonat bis zum 5.5 Lebensmonat.  
 A) Serum-ELISA: Reduzierte Konzentration von IL-18, IFN $\gamma$  und IL-1 $\beta$  durch Caspase-1 Hemmung im Vergleich zur Kontrollgruppe  
 B) Nicht relevante Besserung der Lymphadenopathie und der Splenomegalie, relevante Besserung der Hautbeteiligung nach Caspase-1 Inhibition im Vergleich zur Kontrollgruppe.  
 C) Relevant schwächer ausgeprägte histopathologische Veränderungen der Niere nach Caspase-1 Inhibition im Vergleich zur Kontrollgruppe

Zusammenfassend kann man aus den erhobenen Daten/Ergebnissen postulieren, dass die Hemmung der Caspase-1 die Krankheitsprogression, a.e. durch die Reduktion der proinflammatorischen Zytokin-Konzentration von IL-18, IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$ , unterdrückt. Allerdings konnten wir mittels der Caspase-1 Inhibition nicht differenzieren, in wie weit die Reduktion von IL-18 oder IL-1 $\beta$  alleine oder zusammen diesen Effekt aus die Ausprägung des SLE und insbesondere der Nierenbeteiligung im MRL-*Fas*<sup>lpr</sup>-Mausmodell hatte

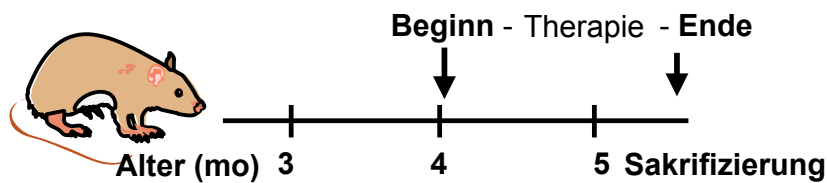
#### **4.1.2 Differenzierung der Rolle von IL-18 und IL-1 $\beta$ in der Pathogenese von LN und systemischer Erkrankung**

Um die Rolle von IL-18 und IL-1 $\beta$  in der Pathogenese der Nierenbeteiligung und systemischer Erkrankung in MRL-*Fas*<sup>lpr</sup>-Mäuse zu differenzieren, behandelten wir die Mäuse daher mit einem spezifischen IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1RA).

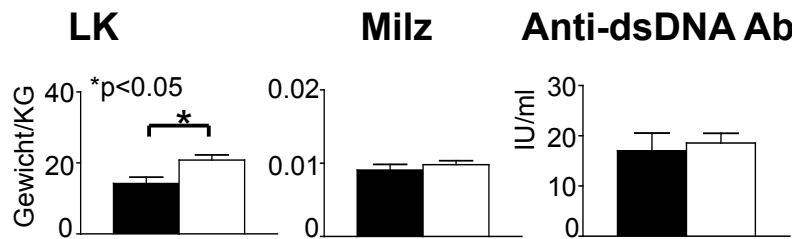
Wir fanden kein Unterschied im Gewicht von Lymphknoten und Milz sowie im Grad der Niereninsuffizienz und Nierenbeteiligung. Auch die Anzahl und der Phänotyp der infiltrierenden Leukozyten in der Niere sowie die Anzahl der apoptotischen renalen tubulären Epithelzellen (TEZ) und der proliferierenden Zellen war vergleichbar in der Gruppe mit IL-1RA behandelten Mäusen und in der mit scheinbehandelten Mäusen.

Eine Behandlung mit einem IL-1 Rezeptor Blocker hat somit keine Wirkung auf die Progression der Erkrankung in MRL-*Fas*<sup>lpr</sup>- Mäuse.

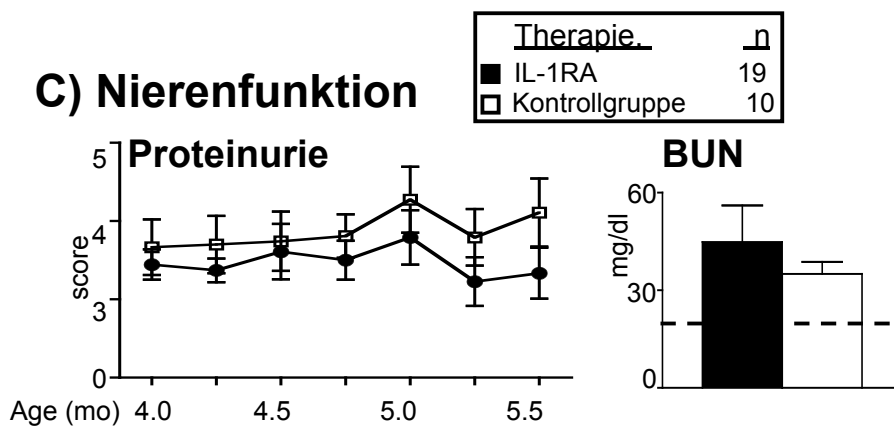
## A) Therapieschema mit IL-1 Rezeptor Antagonist



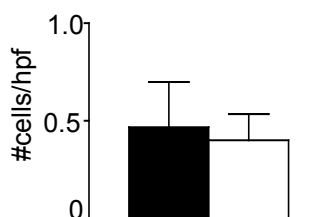
## B) Phänotyp



## C) Nierenfunktion



## D. Apoptosis



## E. Proliferation

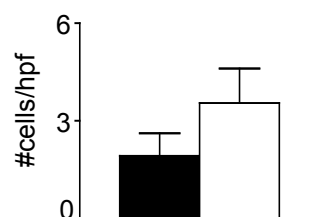


Abb. 4.9: Therapie mit IL-1 Rezeptor Antagonist

A) Therapieschema: Tägliche Gabe vom 4. Lebensmonat bis zum 5.5 Lebensmonat.

B) Relevante Besserung der Lymphadenopathie, keine relevante Besserung der Splenomegalie oder des Anti-dsDNA Titers nach Therapie mit IL-1 Rezeptor Antagonist im Vergleich zur Kontrollgruppe.

C) Vergleichbarer Verlust der Nierenfunktion in MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäuse, die mit einem IL-1 Rezeptor Antagonist behandelt wurden und in der Kontrollgruppe. Die Nierenfunktion wurde anhand einer semiquantitativen Proteinurie-Bestimmung und durch eine BUN-Bestimmung evaluiert. Die gestrichelte Linie zeigt die BUN-Konzentration in gesunden MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäusen (Alter: 2 Monate).

Kein relevanter Unterschied der D) intrarenalen Apoptose-Rate und E) der intrarenalen Proliferations-Rate zwischen Mäusen, die mit einem IL-1 Rezeptor Antagonist behandelt wurden und der Kontrollgruppe.

### 4.1.3 Spezifität und Wirkmechanismus der Caspase-1 Hemmung

Bevor wir den genauen Wirkmechanismus untersuchten, wodurch es bei den behandelten Mäusen zu einer Besserung der Nierenbeteiligung kommt, überprüften wir die Spezifität des Caspase-1 Inhibitors. Durch ein Caspase-Enzym-Assay konnten wir bestimmen, dass der Caspase-1 Inhibitor ausschließlich die Aktivität der Caspase-1, und nicht die der Caspase-3, -8 und -9 in Niere und Milz hemmt.

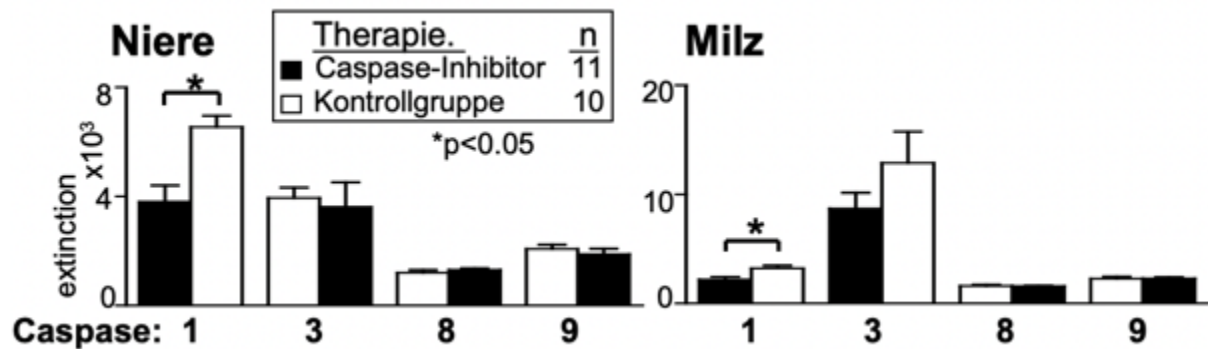


Abb. 4.10: Relevante Hemmung der Caspase-1 Aktivität in Niere und Milz nach Therapie mit einem Caspase-1 Inhibitor. Die Aktivität der Caspase-3, -8 und -9 ist von der Therapie mit dem Caspase-1 Inhibitor unbeeinflusst.

Des Weiteren untersuchten wir die Serumkonzentration der Interleukine, die durch die Caspase-1 aktiviert werden (IL-18 und IL-1 $\beta$ ) sowie die Konzentration der Zytokine, die durch IL-18 und IL-1 $\beta$  induziert werden (IFN- $\gamma$ , IL-12 und TNF- $\alpha$ ). Während die Konzentration von IL-18, IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  durch die Caspase-1 Inhibition absank, blieb die Serumkonzentration von IL-12 und TNF- $\alpha$  unverändert.

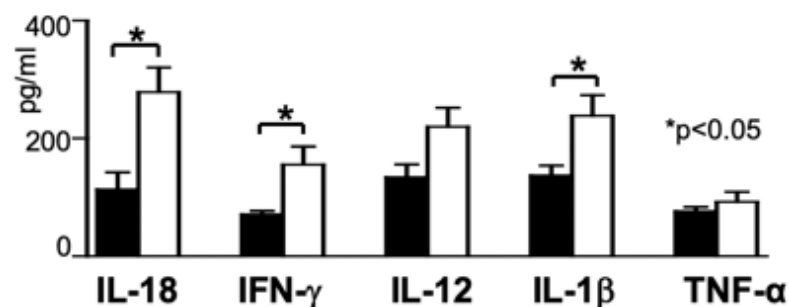


Abb. 4.11: Serum-ELISA - Erfolgreiche Hemmung von IL-18, IFN $\gamma$  und IL-1 $\beta$  durch Caspase-1 Hemmung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Keine relevante Änderung der Konzentration von IL-12 und TNF- $\alpha$  nach Caspase Inhibition.

Weiterhin interessierte uns die mRNA-Expression in der Niere von Caspase und Zytokinen nach Hemmung der Caspase-1. Die mRNA Expression der Caspase wird in der Niere durch die Caspase-1 Inhibition nicht beeinflusst. Die mRNA Expression der Interleukine (IL-18, IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$ ) hingegen sank durch die Caspase-1

Hemmung, obwohl nur die Expression vom IL-18 relevant beeinflusst wurde ( $p < 0.05$  vs. IL-1 $\beta$   $p = 0.06$  und IFN- $\gamma$  = 0.09).

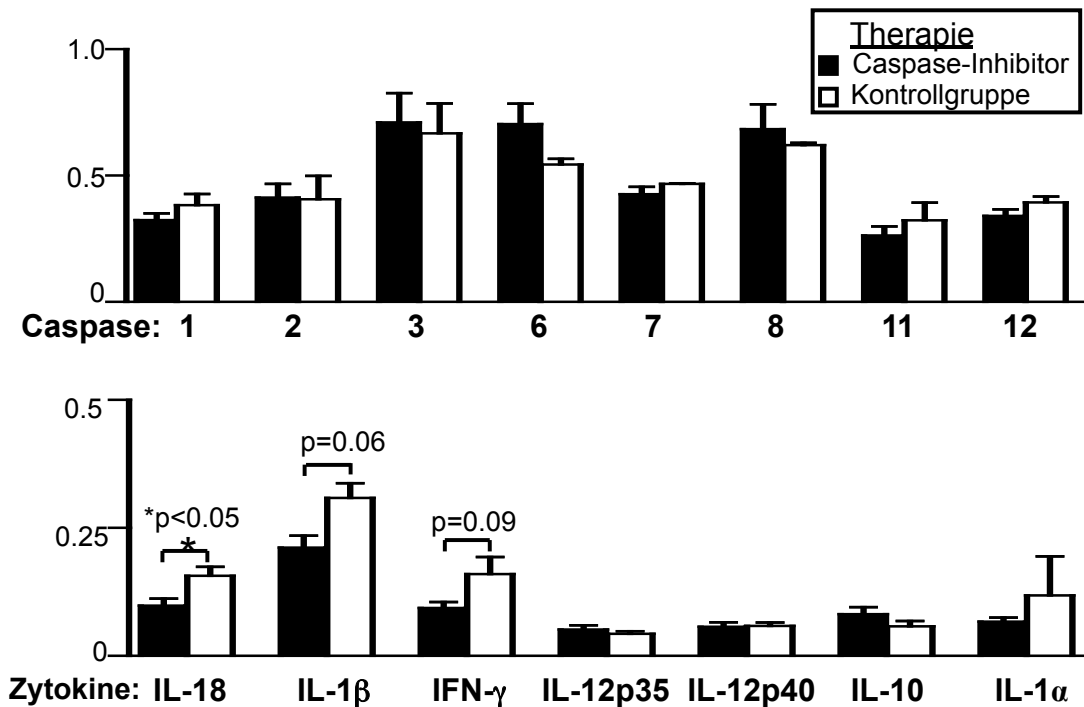


Abb. 4.12: RNase-protection assay. Relevant reduzierte mRNA Expression von IL-18 durch Therapie mit einem Caspase-1 Inhibitor im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nicht relevant reduzierte mRNA Expression von IL-1 $\beta$  ( $p=0.06$ ) und IFN- $\gamma$  ( $p=0.09$ ) durch Therapie mit einem Caspase-1 Inhibitor im Vergleich zur Kontrollgruppe. Kein Einfluss der Casapase-1 Inhibition auf die mRNA Expression der Caspase-1, -2, -3, -6, -7, -8, -11 und -12.

#### 4.1.4 Caspase-1 vermittelte Pyroptose

Ein weiterer nephroprotektiver Mechanismus der Caspase-1 Inhibition besteht in der Pyroptose-Hemmung, eine inflammatorische Variante des programmierten Zelltods. Die Pyroptose wird durch die Caspase-1 induziert und durch IL-18 verstärkt. In der Niere der behandelten Mäuse fand sich erwartungsgemäß eine reduzierte Anzahl an apoptotischen Zellen im Vergleich zur Gruppe mit scheinbehandelten Kontroll-Mäusen.



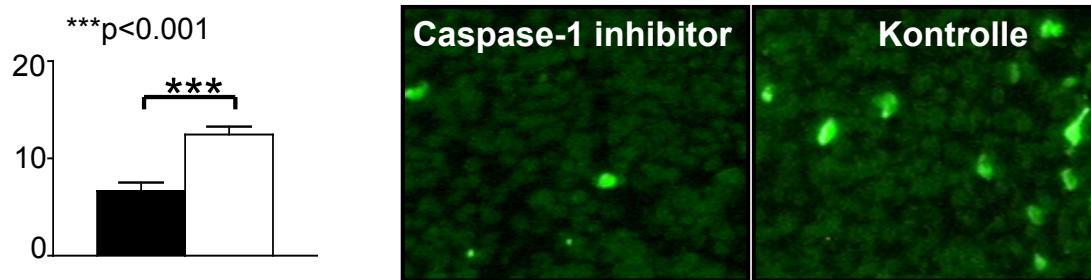


Abb. 4.13: Reduzierte intrarenale Apoptose nach Therapie mit einem Caspase-1 Inhibitor im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die kaskadenartige Aktivierung von anderer Caspasen (Effektor-Caspasen: 3,6 und 8) stellt die gemeinsame Endstrecke verschiedener Apoptosewege dar und eine Pan-Caspase Inhibition bietet somit eine umfangreiche Apoptosehemmung im Gegensatz zu der sehr spezifischen Casapase-1 induzierten Pyroptose. Da die Apoptose allerdings auch eine relevante physiologische Rolle spielt, wäre eine solche umfangreiche Inhibition des programmierten Zelltods auch womöglich mit mehreren Komplikationen und Nebenwirkungen (z.B. maligne Neoplasien) verbunden.

Wir verglichen somit eine Caspase-1 Inhibitor Therapie mit einer Therapie mit einem Pan-Caspase Inhibitor. Uns interessierte insbesondere, ob die klinische Wirkung dieser möglichen Therapieansätze, trotz vermutlich stärker ausgeprägtes Nebenwirkungsspektrum einer Pan-Caspase Hemmung, vergleichbar sind.

Hierfür behandelten wir eine Gruppe von 4 Monaten alten MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäusen bis zu einem Lebensalter von 5,5 Monaten mit einem spezifischen Caspase-1 Inhibitor und verglichen diese mit einer Mäuse-Gruppe, die mit einem unspezifischen Pan-Caspase Inhibitor behandelt wurden.

Um die Wirksamkeit der jeweiligen Caspase-Inhibition zu bestimmen, untersuchten wir zunächst die Serum Konzentration von IL-18 sowie die Caspase-3 Aktivität. Nach der spezifischen Caspase-1 Inhibition fand sich eine reduzierte IL-18 Konzentration. Nach der unspezifischen Pan-Caspase Behandlung fand sich neben der niedrigeren IL-18 Konzentration auch eine reduzierte Caspase-3 Aktivität.

Anschließend verglichen wir die Serumkonzentration der Zytokine, die Organbeteiligung sowie die Krankheitsausprägung in den MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäusen, die

mit dem Pan-Caspase-Inhibitor und, die mit dem spezifischen Caspase-1 Inhibitor behandelt wurden.

Unter den beiden Gruppen fand sich keine relevante Differenz in der Serumkonzentration von IL-18, IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  sowie in den histopathologischen Nierenveränderungen und in der Lymphadenopathie. Lediglich eine Besserung der Splenomegalie war in der Mäuse-Gruppe, die den Pan-Caspase-Inhibitor erhielt stärker ausgeprägt im Vergleich als in den Mäusen, die den spezifischen Caspase-1-Inhibitor erhielten.

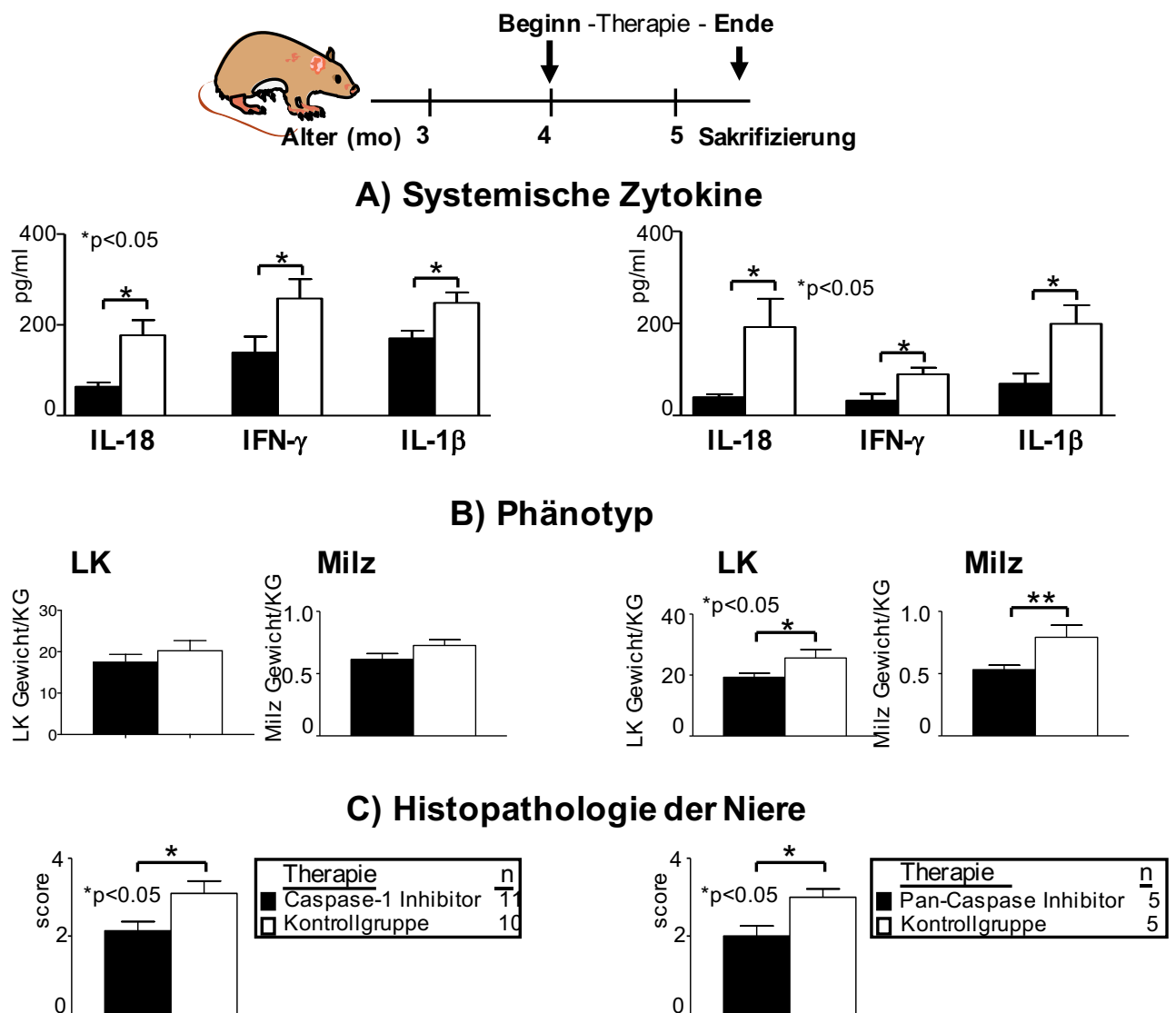


Abb. 4. 14: Therapieeffekte einer Behandlung mit Caspase-1 Hemmung waren vergleichbar mit einer Therapie mit Pan-Caspase Hemmung.  
 A) Serum-ELISA: Vergleichbar erfolgreiche Hemmung der IL-18, IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  Synthese durch eine Therapie mit einem Caspase-1 Inhibitor und mit einem Pan-Caspase Inhibitor  
 B) Besserung der Splenomegalie und der Lymphadenopathie nach Therapie nicht relevant in der Caspase-1 Inhibitor Gruppe, relevant in der Pan-Caspase Inhibitor Gruppe.  
 C) Relevant schwächer ausgeprägte histopathologische Veränderungen der Niere nach Therapie vergleichbar in der Caspase-1 Inhibitor und Pan-Caspase Inhibitor Gruppe.

#### 4.1.5. Caspase-1 vermittelte Aktivierung von Leukozytenpopulationen und Induktion von Zytokinen

Des Weiteren wollten wir die Wirkung der Caspase-1 Hemmung auf die intrarenalen Leukozyten-Population evaluieren. In behandelten Mäusen fand sich eine relevante Abnahme der F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und B220<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> B-Zellen im Vergleich zu der scheinbehandelten Kontrollgruppe.

##### Intrarenale Infiltrate

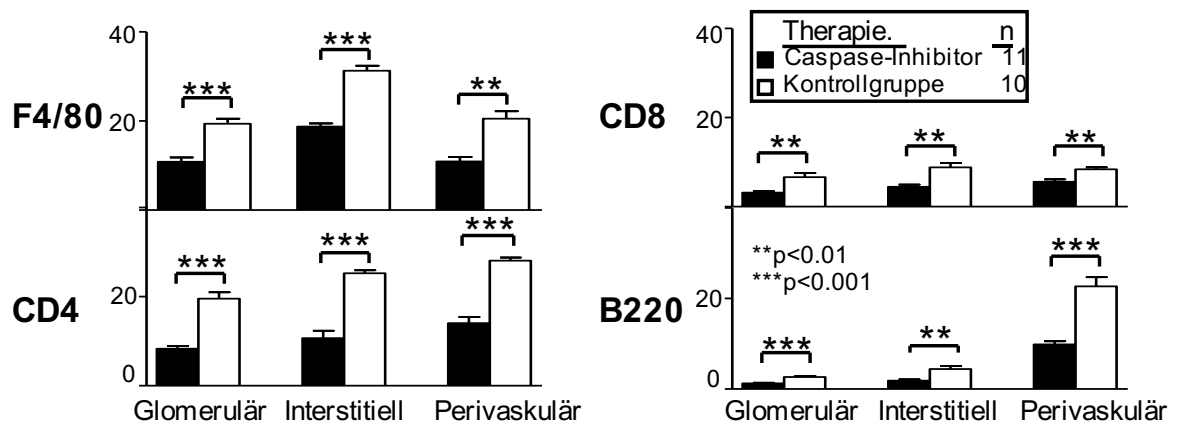


Abb. 4.15: Relevante Hemmung der F4/80 Makrophagen, CD4, CD8 und B220<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> Zellen nach Caspase-1 Inhibition im Vergleich zur Kontrollgruppe. Immunhistochemische Detektion der Leukozyten-Populationen auf glomerulärer, interstitieller und perivaskulärer Ebene.

Neben der Leukozytenpopulationen, interessierte uns auch die Aktivierung der intrarenalen Zellpopulationen sowie das Expressionsmuster inflammatorischer Zytokine und Chemokine.

In der Durchflusszytometrie der intrarenalen Zellen konnte zunächst eine relevante Abnahme der infiltrierenden Leukozyten (CD45 - Pan-Leukozyten Marker) bestätigt werden. Hier zeigte sich, dass es sowohl zu einer Reduktion der CD4<sup>+</sup> Zellen als auch CD11<sup>+</sup> Makrophagen durch die Behandlung mittels eines Caspase-1 Inhibitors kommt.

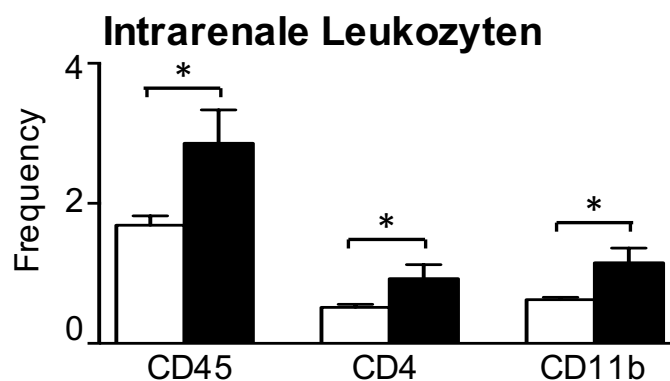


Abb. 4.16: Relevante Hemmung der CD45<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen nach Caspase-Inhibition im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durchflusszytometrische Detektion der Leukozyten-Populationen.

In einer weiteren durchflusszytometrischen Analyse haben wir 2 Leukozytenpopulationen ( $CD4^+$  und  $CD11b^+$ ) genauer mit einem zweiten Antikörper differenziert und deren Aktivierungsstatus sowie deren Zytokinexpression untersucht. Nach Caspase-1 Hemmung fand sich insbesondere eine relevante Abnahme folgender Leukozytenpopulationen:  $CD4^+CD86^+$ ,  $CD4^+CD69^+$ ,  $CD4^+Ly6c^+$ ,  $CD4^+IFN\gamma^+$ ,  $CD4^+CD206^+$ ,  $CD11b^+$ ,  $CD11b^+IL-12^+$ ,  $CD11b^+CD69^+$ ,  $CD11b^+Ly6c^+$ ,  $CD11b^+CD206^+$ . IL-6, TGF- $\beta$  und TNF- $\alpha$  sezernierende Zellen waren hingegen von der Caspase-1 Inhibition nicht relevant beeinflusst.

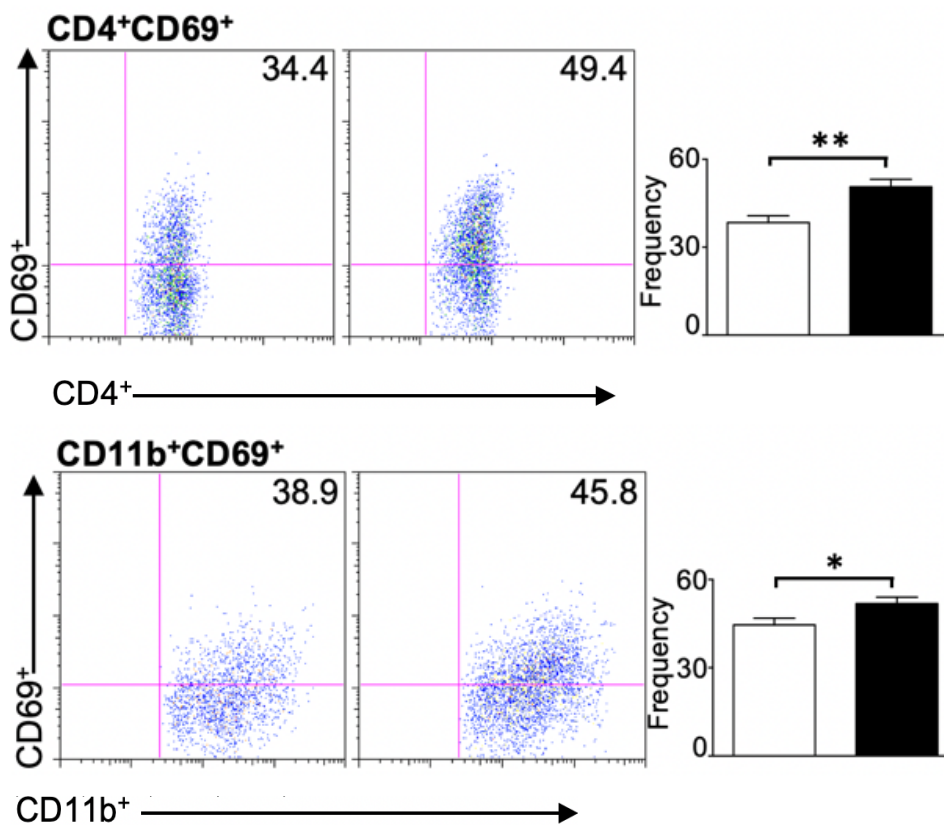


Abb. 4. 17: Beispiel von Dotplots nach durchflusszytometrischer Analyse: Untersuchung von jeweils  $CD69^+/CD4^+$ -Zellen bzw.  $CD69^+/CD11b^+$ -Zellen. Relevante Abnahme dieser Leukozytenpopulationen nach Caspase-1 Inhibition.

Zellen Zusätzl. Marker	CD45 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Zellen			CD45 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> Zellen		
	Frequency-Mittelwert ±SEM		Signifikanz	Frequency-Mittelwert ±SEM		Signifikanz
	CI	Kontrolle		CI	Kontrolle	
IFN- $\gamma$	12.95±2.01	18.78±2.49	n.s.	13.58±2.02	19.70±2.57	n.s.
IL-6	36.57±2.66	43.33±2.74	n.s.	20.40±2.37	23.75±3.0	n.s.
IL12	51.03±2.47	56.63±2.79	n.s.	43.77±2.57	52.14±2.60	*
IL-17	3.74±0.69	8.71±1.47	*	-	-	-
TNF- $\alpha$	43.74±2.39	52.49±3.06	n.s.	44.97±2.54	54.39±3.70	n.s.
CD86	39.54±3.60	48.89±1.76	*	28.09±1.82	30.40±1.88	n.s.
CD69	38.43±2.27	50.56±2.59	**	44.57±2.30	51.85±2.20	*
CD25	9.84±0.95	12.77±1.02	n.s.	-	-	-
FoxP3	7.83±0.93	7.24±0.27	n.s.	-	-	-
Ly6c	9.90±1.01	13.22±0.71	*	24.93±1.70	30.24±1.52	n.s.
CD206	15.40±1.25	9.50±1.45	**	9.70±0.84	6.47±0.45	*
TGF- $\beta$	26.37±1.72	23.23±2.81	n.s.	52.68±3.43	46.74±2.76	n.s.

*Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse: Intrarenale Leukozytenpopulationen in MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäuse nach Caspase-1 Inhibition im Vergleich zur scheinbehandelten Kontrollgruppe.*

*Unterschied in der Leukozytenpopulation zwischen den mit Caspase-1 Inhibitor behandelten Mäusen und der scheinbehandelten Kontrollgruppe:*

*\* und \*\* - relevanter Unterschied (jeweils p value <0,05 und <0,01)*

*n.s. - kein statistisch relevanter Unterschied*

*- - keine Messung für diese Zellpopulation erfolgt*

*SEM - Standard Error of Mean*

*CI - MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäusen, die mit Caspase-1 behandelt wurden*

*Bsp.: Bei CD4<sup>+</sup> Zellen, die IFN $\gamma$  produzieren, besteht hingegen kein relevanter Unterschied (n.s.).*

*CD11b<sup>+</sup> Zellen, die IL-12 produzieren, sind in den MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäusen, die mit Caspase-1 behandelt wurden deutlich geringer als in der scheinbehandelten Kontrollgruppe (\*)*

Durch die FACS-Analyse konnte bereits erkannt werden, dass die Anzahl der infiltrierenden Leukozyten als auch deren Aktivierung durch die Caspase-1 Inhibition reduziert bzw. gehemmt wird. Da wir uns in diesen Analysen nur auf die infiltrierenden Zellen fokussiert haben, aber gerade die TEZ der Niere ein Hauptproduktionsort verschiedener Zytokine und Chemokine darstellen ergänzten wir die Untersuchungen um eine Proteomanalyse aus Nierengewebe dieser mittels Caspase-1 Inhibition behandelten Tiere.

Hierzu untersuchten wir die Caspase-1 Inhibitor behandelten MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäuse und verglichen die Ergebnisse mit der scheinbehandelten Kontrollgruppe.

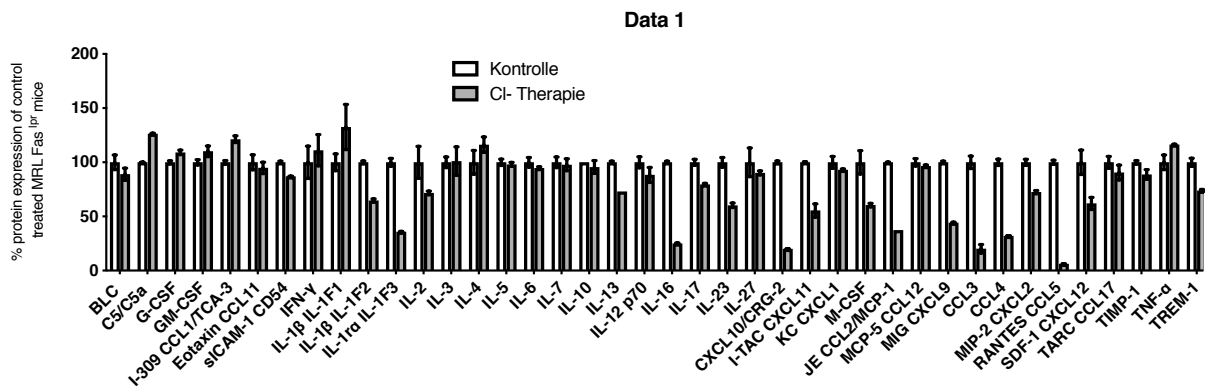


Abb. 4. 18: Proteomanalyse der Niere von MRL-Fas<sup>lpr</sup>- Mäusen. Hier werden zunächst alle Zytokine aufgeführt, die untersucht wurden.

Durch eine Caspase-1 Hemmung sinkt die Konzentration vieler Zytokine relevant ab. Wie zu erwarten war, ist die Konzentration von IL-1 $\beta$  bei Caspase-1 behandelten Mäusen relevant geringer als in der scheinbehandelten Kontrollgruppe. Auch der IL-1 Rezeptor Antagonist sinkt nach Caspase-1 Hemmung. Weitere Zytokine dessen Konzentration nach einer Behandlung mit einem Caspase-1 Inhibitor relevant abnimmt sind die proinflammatorische Interleukine IL-2, IL-16, IL-23 sowie die Chemokine CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 und den Macrophage Colony Stimulating Factor M-CSF. Wie bereits in der Durchflusszytometrie erkannt, sind einige Zytokine von der Caspase-1 Hemmung hingegen nicht bedeutend beeinflusst, wie z.B. das TNF- $\alpha$ , IL-12 und IL-6. TNF- $\alpha$  und IL-12 werden auch im Serum von MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäusen nicht durch eine Caspase-1 Inhibition relevant beeinflusst (siehe ELISA-Ergebnisse).

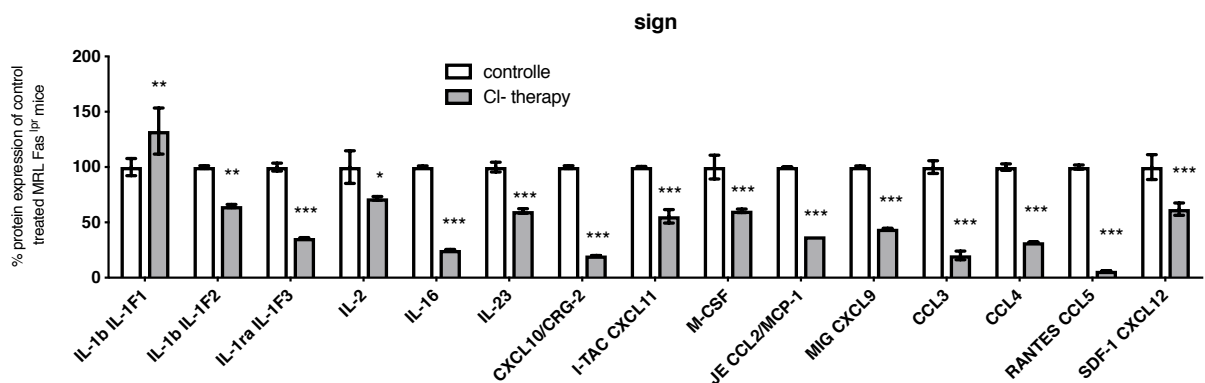


Abb. 4. 19: Proteomanalyse der Niere von MRL-Fas<sup>lpr</sup>- Mäusen. Hier werden nur die Zytokine gezeigt, dessen Expression durch eine Caspase-1 Behandlung relevant abnimmt.  
 \* - p value < 0,05, \*\* p value < 0,01, \*\*\* p value < 0,001.

In Zusammenschau sämtlicher Daten kann man postulieren, dass eine IL-18 Hemmung durch eine Caspase-1 Inhibition zu einer relevanten klinischen, laborchemischen und histologischen Besserung des SLE, insbesondere der LN und des CL führt. Die Besserung der Erkrankung in den MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäusen wird a.e. durch verschiedene Mechanismen vermittelt: die reduzierte Zytokin- Synthese führt zu einer verminderten Niereninfiltration durch Leukozyten, reduzierte Freisetzung von inflammatorischen Zytokine und Chemokine sowie zu einer Herunterregulierung der apoptotischen Signalwege.

Da die Hemmung des IL-18 durch eine Caspase-1 Inhibition als möglicher Therapietarget für den SLE in Frage kommt, versuchten wir in einem weiterführenden Ansatz die gewonnenen Erkenntnisse aus den experimentellen Untersuchungen im Mausmodell auf den humanen SLE zu übertragen.

## 4.2 Ergebnisse im Patientenkollektiv

### 4.2.1 IL-18 Konzetration im Serum

Im SLE-Patientenkollektiv untersuchten wir zunächst die Konzentration von IL-18 im Serum und verglichen diese Werte mit denen einer alters- und geschlechts-gematched gesunden Kontrollgruppe. Bei den SLE Patienten fand sich ein signifikant höhere IL-18 Serum Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe.

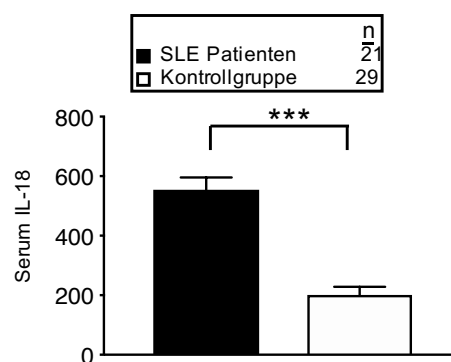


Abb. 4. 20: IL-18 Konzentration im Serum.  
Erhöhte Serum-Konzentration von IL-18 in SLE-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (p value < 0,0001).

Neben der Korrelation mit der Erkrankung allgemein, interessierte uns, ob das IL-18 im Serum auch mit der Krankheitsaktivität korreliert, insbesondere mit SLEDAI, C3 und dsDNA. Wir fanden eine signifikante Assoziation mit SLEDAI und C3 (hier inverse Korrelation), allerdings nicht mit dsDNA.

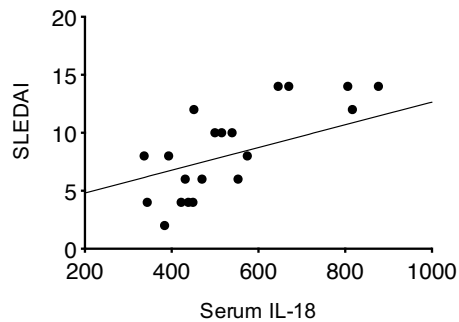


Abb. 4. 21: IL-18 Konzentration im Serum.  
Signifikante Korrelation zwischen Serum IL-18 und SLEDAI in SLE-Patienten ( $r$  0,47,  $p$  value 0,034)

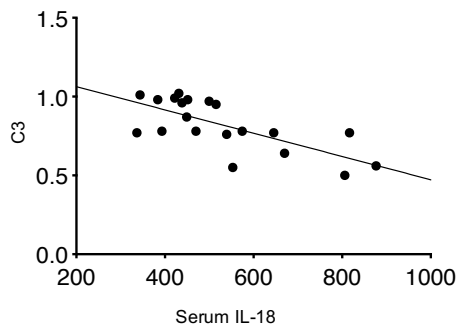


Abb. 4. 22:: IL-18 Konzentration im Serum.  
Signifikante inverse Korrelation zwischen Serum IL-18 und C3 in SLE-Patienten ( $r$  -0,78,  $p$  value 0,034).

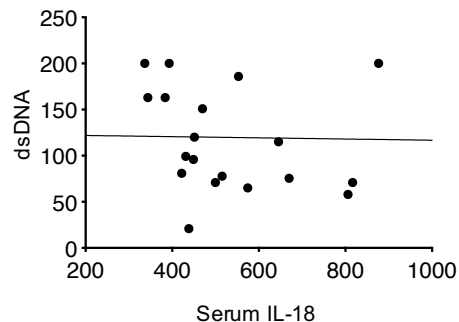


Abb. 4. 23: Abb. 5. 21: IL-18 Konzentration im Serum.  
Keine Korrelation zwischen Serum IL-18 und dsDNA in SLE-Patienten.

#### 4.2.2 IL-18 Expression in der Niere

Da wir im SLE-Mausmodell eine Korrelation und eine pathogenetische Rolle von IL-18 mit einer Nierenbeteiligung fanden, untersuchten wir die IL-18 Expression in der Niere von Patienten mit einer LN. In der immunhistochemischen Färbung ließ sich IL-18 deutlich erkennen. Hier zeigt sich nicht nur eine Expression der infiltrierenden Leukozyten, sondern insbesondere auch in den Tubulusepithelzellen sowie intra-glomerulär.



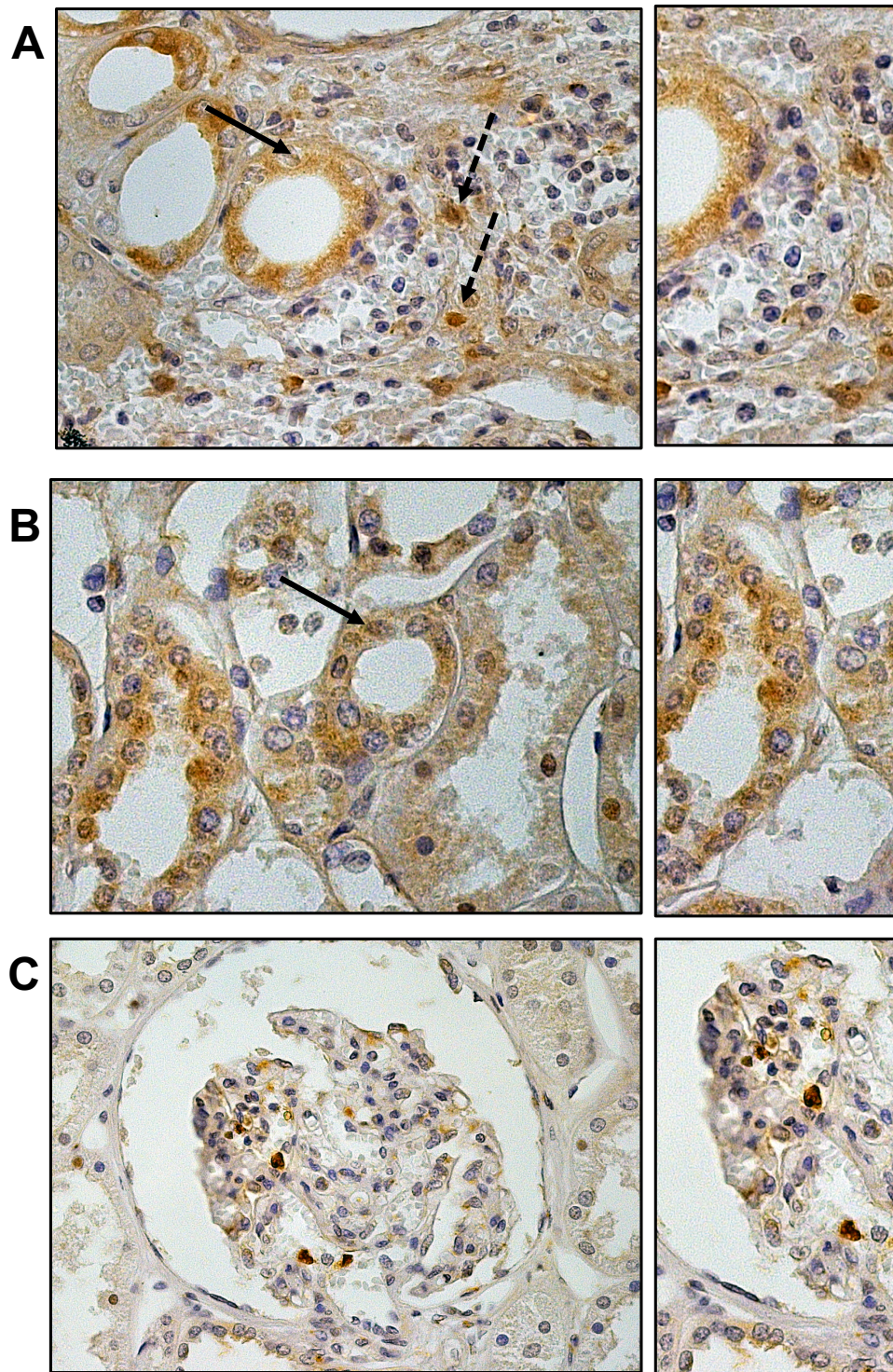


Abb. 4. 24.: Immunohistochemische Färbung der Niere von SLE Patienten mit LN:  
 IL-18 lässt sich gut erkennen (bräunliche Färbung);  
 Einfache Pfeile: Tubulusepithelzellen, gestrichelte Pfeile: infiltrierende Zellen;  
 A) Infiltrierende Zellen  
 B) Tubulusepithelzellen  
 C) Intraglomeruläre Zellen

## 5 Diskussion

### 5.1 Rolle der Caspase-1 im SLE

IL-18 spielt eine relevante pathogenetische Rolle in vielen Autoimmunerkrankungen unter anderem beim SLE und insbesondere bei der LN. (22)

Da die Aktivierung von IL-18 und IL-1 $\beta$  durch das Enzym Caspase-1 erfolgt, das wiederum durch den Inflammasom-Komplex aktiviert wird, wurden beim SLE verschiedene Studien durchgeführt, die die pathogenetische Rolle des NLRP3 und der Caspase-1 untersuchten. In MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäusen nimmt die Expression von NLRP3 in den Nieren mit der Progression der LN parallel zu. (61) In SLE Patienten mit LN konnte vergleichsweise eine vermehrte Expression von NLRP3 und Caspase-1 bei aktiver Nierenbeteiligung nachgewiesen werden. (62)

Nachdem die pathogenetische Rolle von NLRP3 im SLE erkannt wurde, untersuchte man die Rolle des Inflammasoms als Therapietarget. Durch eine Hemmung vom NLRP3 konnten verschiedene Studiengruppen eine relevante Besserung der Erkrankung in Lupusmausmodellen erzielen. (67) (66) Allerdings wurden diese Daten auch von einigen Studien widersprochen. Es fand sich zum einen eine reduzierte Expression von Inflammasom-Bestandteilen in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) von SLE-Patienten, bzw. sogar eine umgekehrte Korrelation der NLRP3 Expression mit der Krankheitsaktivität und LN, sodass womöglich eine systemische und nephroprotektive Wirkung des NLRP3 Inflammasoms angenommen werden kann. (70) (71)

Als mögliche Erklärung dieser dichotomen Rolle des NLRP3-Inflammasoms im SLE wurde postuliert, dass seine Aktivierung u.a. von der Zellphase abhängig ist. Shi et al. zeigten, dass LPS oder ATP während der Interphase zu einer Inflammasom-Aktivierung führen, diese wird hingegen während der Mitose durch die selben Stimuli stark gehemmt. (73) Aufgrund der noch unklaren und dichotomen Funktion des NLRP3-Inflammasoms in autoimmunen Prozessen, fokussierte man sich zunehmend auf die pathogenetische Rolle der in der -Aktivierungskaskade nachgeschalteten Caspase-1. Die Expression der Caspase-1 korreliert in der Tat mit der SLE Krankheitsaktivität und wird nach medikamentöser Therapie unterdrückt. (71) Mit dem Hintergedanken mittels einer Caspase-1 Inhibition eine valide, gezielte Therapiemöglichkeit zu entwickeln wurden bereits einige Studien durchgeführt. In Caspase-1 knock-out Lupus- Mäusen zeigten sich eine fehlende Hochregulation der IL-18- und IL-1 $\beta$ -Synthese sowie folglich eine fehlende IFN-Typ I Immunantwort, eine

relevant verminderte Autoantikörper-Entwicklung und eine ausbleibende Immunkomplex-Glomerulonephritis. (81) Um die Rolle der Caspase-1 in der Pathogenese des SLE zu erforschen, stellen allerdings knock-out Mäuse nicht die idealen Modelle dar. Das Gen von der Caspase-1 ist nämlich sehr nah an das Gen der Caspase-11, welche an einem alternativen Weg der Inflammation-Aktivierung beteiligt ist. Caspase-1 knock-out Mäusen verlieren somit auch die enzymatische Funktion der Caspase-11, was wiederum die Analyse einer isolierten Caspase-1 Inhibition erschweren. (82) Zudem hat eine knockout Maus bereits in der Entwicklung keine Expression der Caspase-1, sodass hierdurch ggf. vollkommen andere Effekte erzielt werden im Vergleich zu einer Hemmung der Caspase-1 erst mit beginnender Krankheitsaktivität

Unserem Wissen nach wurden bis dato keine pharmakologische Caspase-1 Inhibition in murinen Lupusmodellen untersucht. Die Ziele dieser Arbeit sind die Rolle der Caspase-1 und der durch die Caspase-1 aktivierten Interleukine (IL-18 und IL-1 $\beta$ ) in der Pathogenese des SLE sowie die Wirkung der Caspase-1 Inhibition als Therapiemöglichkeit zu untersuchen.

Hierzu evaluierten wir klinische, laborchemische und histologische Parameter von MRL-*Fas*<sup>lpr</sup>-Mäusen, die mit einem Caspase-Inhibitor über 3 Monate behandelt wurden und verglichen diese mit einer Kontrollgruppe von scheinbehandelten MRL-*Fas*<sup>lpr</sup>-Mäusen. Der Therapiebeginn wurde hier bewusst ab einem Alter von 2,5 Monaten, nämlich in sehr frühen Stadien der Krankheitsentwicklung gewählt. Mittels eines ELISAs konnte erwartungsgemäß eine reduzierte Serumkonzentration der Zytokine, die durch die Caspase-1 aktiviert werden, sowie vom IFN- $\gamma$ , der u.a. von IL-18 induziert wird, nachgewiesen werden.

Klinisch wirkte sich die Caspase-1 Inhibition protektiv auf die Erkrankungsprogression aus, die behandelten MRL-*Fas*<sup>lpr</sup>-Mäusen wiesen eine abgeschwächte Lymphadenopathie, Splenomegalie sowie eine relevant reduzierte Inzidenz der Hautläsionen auf.

Da wir uns besonders für den Effekt der Caspase-1 Hemmung auf die Nierenbeteiligung interessierten, und Kahlenberg et al. in den Caspase-1 knock-out Mäusen bereits eine Aufhebung der Immunkomplex-Glomerulonephritis gefunden hatten, evaluierten wir verschiedene Nierenfunktionsparametern. Sowohl die Proteinurie als auch der Harnstoff-Stickstoff im Serum zeigten eine relevante

Reduktion in der Caspase-1 Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Albuminurie war zwar in der Caspase-1 Behandlungsgruppe nicht relevant reduziert, allerdings ließ sich eine Besserungstendenz zeigen. Hier ist auch zu erwähnen, dass wir keine Normalisierung zur Kreatinin-Konzentration im Urin vorgenommen haben. Somit können die stark schwankenden Albumin-Mengen auch durch die unterschiedlich ausgeprägte Konzentration des Urins bedingt sein. Des Weiteren untersuchten wir nach 3 Monaten Behandlung die Nieren histopathologisch. In den behandelten Mäusen waren die glomerulären, perivaskulären und interstitiellen Infiltrate deutlich abgeschwächt im Vergleich zu den scheinbehandelten Kontrollmäusen (p-Value <0.01). Diese Daten bekräftigen somit den bereits in verschiedenen Studien vermutete nephroprotektive Effekt einer Caspase-1 Inhibition.

Da eine prophylaktische SLE-Therapie mit einem Caspase-1 Inhibitor im Menschen nicht realistisch ist bzw. nur selten Anwendung finden würde, fokussierten wir uns anschließend auf die Effekte eines Therapiebeginns nach Krankheitsausbruch, als therapeutischer Therapieansatz. Hierfür behandelten wir MRL-*Fas<sup>lpr</sup>*-Mäusen erst ab dem 4. Monat (mit bereits deutlichen Krankheitssymptomen in Form von Proteinurie Lymphadenopathie und Hautläsionen) bis zur Sakrifizierung im Alter von 5.5 Monaten. Interessanterweise führte ein Therapiestart mit dem Caspase-Inhibitor auch nach Krankheitsbeginn zu einer Besserung/Stabilisierung der Nierenbeteiligung und der systemischen Erkrankung. Die Wirkung der Caspase Hemmung war in dieser Gruppe allerdings geringer als in den bereits mit Beginn der ersten Krankheitssymptomen behandelten Mäuse. Diese Untersuchung sollte allerdings über einen längeren Zeitraum wiederholt werden, da eine Therapie von 1.5 Monaten vermutlich nicht den kompletten Wirkungs- und womöglich Nebenwirkungsprofil enthüllen kann.

Zusammenfassend kann man aus den erhobenen Daten postulieren, dass die Hemmung der Caspase-1 zu einer signifikanten Reduktion der proinflammatorischen Zytokine IL-18, IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  führt. Klinisch, laborchemisch und histologisch wurden durch eine Caspase-1 Inhibition die Krankheitsprogression, insbesondere die Nieren- und Hautbeteiligung sowie die Lymphadenopathie und Splenomegalie, abgeschwächt bzw. reduziert.

## 5.2 Therapeutischer Wirkmechanismus der Caspase-1 Inhibition

### 5.2.1 Spezifität der Caspase-1 Hemmung

Zunächst konnten wir durch ein Caspase-Enzym-Assay feststellen, dass der Caspase-1 Inhibitor ausschließlich die Aktivität der Caspase-1, und nicht die der Caspase-3, -8 und -9 in Niere und Milz hemmt.

Weiterhin interessierte uns die Serumkonzentration der Interleukine, die durch die Caspase-1 aktiviert werden (IL-18 und IL-1 $\beta$ ) sowie die Konzentration der Zytokine, die durch IL-18 und IL-1 $\beta$  induziert werden (IFN- $\gamma$ , IL-12 und TNF- $\alpha$ ). Während die Konzentration von IL-18, IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  durch die Caspase-1 Inhibition signifikant absank, zeigte sich nur eine nicht relevante Reduktionstendenz von IL-12 und TNF- $\alpha$ . Dies wundert allerdings nicht, da sowohl IL-12 als auch TNF- $\alpha$  Blocker auch andere Aktivierungswege aufweisen.

Abschließend untersuchten wir die mRNA-Expression von Caspase und Zytokinen in der Niere von MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäusen nach Hemmung der Caspase-1. Die mRNA Expression der Caspase-1 sowie der Effektor- (3,6,7), der Initiator-Caspasen (2,8) und anderer inflammatorischen Caspasen (11,12) wird durch eine Caspase-1 Inhibition nicht beeinflusst. Die mRNA Expression der Interleukine (IL-18, IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$ ) hingegen sank, obwohl nur die Expression von IL-18 signifikant beeinflusst wurde ( $p < 0.05$  vs. IL-1 $\beta$   $p = 0.06$  und IFN- $\gamma = 0.09$ ).

### 5.2.2 Differenzierung zwischen der pathogenetischen Rolle von IL-1 $\beta$ und IL-18

Obwohl ein therapeutischer Effekt der Caspase-1 Hemmung bereits vermutet und in unseren o.g. Untersuchungen bekräftigt wurde, ist bis dato der genaue therapeutische Wirkmechanismus einer Caspase-1 Inhibition nicht bekannt.

Insbesondere war das Ziel der folgenden Untersuchungen, die Rolle von IL-18 und IL-1 $\beta$  zu differenzieren, in wie weit also die Reduktion dieser zwei Zytokine alleine oder zusammen einen therapeutischen Effekt auf die Ausprägung des SLE und insbesondere der Nierenbeteiligung im MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mausmodell hatte.

Eine pathologisch übermäßige Aktivität von IL-1 unterliegt einer großen Anzahl von autoimmunen und autoinflammatorischen Erkrankungen, die Rolle von IL-1 $\beta$  in der Pathogenese des SLE ist allerdings kontrovers. Während einige Studien eine klare Assoziation zwischen Serum-IL-1 $\beta$  Konzentration und SLE-Krankheitsaktivität (19)

(20) (21) sowie -Organschaden (22) aufweisen, fanden andere Studien keine relevante Korrelation. (23) (22)/ (19)

Wir behandelten MRL-*Fas*<sup>lpr</sup>-Mäuse mit einem spezifischen IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1RA) und untersuchten hierunter die Ausprägung des SLE. Die Lymphadenopathie besserte sich unter der Therapie mit dem IL-1RA. Die Splenomegalie, die eingeschränkte Nierenfunktion (quantifiziert mittels Proteinurie und BUN), die dsDNA als Aktivitätsparameter sowie die intrarenale Proliferations- und Apoptose-Rate blieben allerdings unverändert.

In Zusammenschau dieser Befunde kann man postulieren, dass eine Behandlung mit einem IL-1 Rezeptor Blocker keine signifikante Wirkung auf die Progression der Erkrankung in MRL-*Fas*<sup>lpr</sup>- Mäuse hat und, dass der dominante therapeutische Mechanismus des Caspase-1 Inhibitors der fehlenden Aktivierung von IL-18 geschuldet ist.

In der Literatur findet man zum Teil widersprechende Daten hierzu. Lemay et al. beschrieben eine Korrelation zwischen erhöhter IL-1 $\beta$  Gen-Expression mit dem Schweregrade und dem Fortschreiten des SLE im MRL-*Fas*<sup>lpr</sup> Mausmodell. (40) Die Studiengruppe von Voronov fand, dass Mäuse mit einem IL-1 $\beta$  Mangel eine reduzierte Krankheitsaktivität sowie eine niedrigere Konzentration an dsDNA- und proinflammatorische Zytokine im Vergleich zu Kontrollmäusen und Mäusen mit einem IL-1 $\alpha$  Mangel aufweisen. (41)

Der Grund der widersprüchlichen Literaturdaten bezüglich IL-1 $\beta$  ist unklar. Eine mögliche Erklärung hierzu, könnte der Zeitpunkt sein, in dem IL-1 $\beta$  eine relevante pathogenetische Rolle im SLE spielt. IL-1 $\beta$  könnte vor allem in der Induktionsphase der Immunantwort und in der frühen T-Zell-Aktivierung involviert sein und eher eine nebensächliche Rolle in der Aufrechterhaltung und im Fortschreiten des SLE spielen.

Wir begannen die Therapie der MRL-*Fas*<sup>lpr</sup>-Mäuse mit einem IL-1RA erst nach Krankheitsausbruch. Um die oben genannte Hypothese zu überprüfen, wäre es interessant, dieselben Untersuchungen bei einem Therapiebeginn vor dem 2. Monat zu wiederholen.



### 5.2.3 Pyroptose nach Caspase-1 Hemmung

Die pathogenetische Rolle der Apoptose im SLE wurde mehrfach bewiesen. Durch eine reduzierte Phagozytose von apoptotischen Zellen und eine ineffiziente Clearance von apoptotischen Zelltrümmern kommt es zu einer vermehrten Bildung von Auto-Antikörpern und Immunkomplexen mit folgender Entzündungsreaktion und Gewebeschaden. (83) (84) (85)

Neben der enzymatischen Aktivierung von IL-18 und IL-1 $\beta$  hat die Caspase-1 auch andere Funktionen. u.a. die Pyroptose, eine inflammatorische Variante des programmierten Zelltods. Im Gegensatz zur Apoptose kommt es bei der Pyroptose zu einer Unterbrechung der Zellmembran mit Freisetzung von entzündlichen intrazellulären Inhaltsstoffe und nicht zu einem Verlust der Integrität der Mitochondrien oder zur Freisetzung des Cytochrom C. (86)

Caspase-1 ist nicht in der Apoptose involviert und Caspase-1 knock-out Mäuse weisen somit keine Apoptose-Defekte auf. Die Effektor-Caspasen, die an der Apoptose beteiligt sind, können wiederum nicht eine Pyroptose induzieren. (86) (87)

Die Pyroptose wird nicht nur durch die Caspase-1, sondern auch durch das IL-18 induziert und verstärkt. (42) Eine Caspase-1 Hemmung führt somit direkt und indirekt, durch die IL-18 Inhibition, zu einer Pyroptose-Unterdrückung.

Kahlenberg et al. konnten in Caspase 1 $^{-/-}$  Mäuse in der Tat weniger Annexin V detektieren, als Marker für pyroptotische Zelltrümmer und sie vermuteten, dass eine aberrante Entfernung dieser pyroptotische Zelltrümmern auch zur Pathogenese des SLE beitragen könnte. (81)

Auch in unserer Studie fand sich mittels eines Tunel-Assays erwartungsgemäß eine reduzierte Anzahl an apoptotischen Zellen in der Niere von behandelten Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Bereits in mehrere Studien wurde eine Inhibition der Apoptose in Lupusmausmodellen als mögliche Therapie untersucht. Seery et al. sowie Bengtsson et al. und weitere Studiengruppen benutzten hierfür ein Pan-Caspase Inhibitor, wodurch die Apoptose induzierenden Caspasen (Effektor-Caspasen: Caspase 3, 6 und 7) inhibiert werden. (88) (89) Durch eine Pan-Caspase Inhibition konnte eine relevante Besserung des SLE und insbesondere der Nierenbeteiligung erzielt werden.

Die Apoptose ist allerdings ein normaler physiologischer Prozess, das z.B. in der Elimination entarteter oder potentiell schädlichen Zellen involviert ist. Die Gabe eines

Pan-Caspase-Inhibitors könnte somit vor allem in der Langzeit-Therapie mit schweren unerwünschten Wirkungen, wie z.B. einer höheren Inzidenz von malignen Neoplasien, verbunden sein.

Auch aus diesem Grunde entschieden wir uns in unserer Studie für ein gezieltes Caspase-1 Inhibitor, der nicht die komplette Caspase-induzierte Apoptose hemmt, sondern isoliert die Pyroptose unterdrückt. Uns interessierte allerdings, ob die klinische Wirkung einer Caspase-1 Inhibition, trotz vermutlich schwächer ausgeprägtes Nebenwirkungsspektrum, einer Pan-Caspase Hemmung vergleichbar ist. Hierfür verglichen wir zwei Gruppe von MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäusen, die jeweils mit einem spezifischen Caspase-1 Inhibitor und mit einem Pan-Caspase Inhibitor behandelt wurden. Um die Wirksamkeit der jeweiligen Caspase-Inhibition zu bestimmen, untersuchten wir zunächst die Serum Konzentration von IL-18 sowie die Caspase-3 Aktivität. Nach der Caspase-1 Inhibition fand sich erwartungsgemäß eine reduzierte IL-18 Konzentration, nach der Pan-Caspase Hemmung ließ sich neben der niedrigeren IL-18 Konzentration auch eine reduzierte Caspase-3 Aktivität nachweisen.

Anschließend verglichen wir die Serumkonzentration der Zytokine, die Organbeteiligung sowie die Krankheitsausprägung in den zwei MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäuse Gruppen. Hier fand sich keine relevante Differenz in der Serumkonzentration von IL-18, IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  sowie in den histopathologischen Nierenveränderungen. In der Mäuse-Gruppe, die den Pan-Caspase-Inhibitor erhielt, war lediglich eine Besserung der Splenomegalie und der Lymphadenopathie stärker ausgeprägt im Vergleich zu den Mäusen, die den spezifischen Caspase-1-Inhibitor erhalten hatten. Obwohl die klinische Wirkung der Caspase-1 Hemmung bezüglich der Lymphadenopathie und Splenomegalie mit der eines Pan-Caspase Inhibitor nicht vergleichbar ist, ist vor allem der entscheidende nephroprotektive Effekt unter den zwei Therapieformen vergleichbar.

### **5.3 Differenzierung und Aktivierungsstatus der intrarenalen Leukozytenpopulationen sowie Expressionsmuster der inflammatorischen Zytokine und Chemokine nach Caspase-1 Inhibition**

Der Pathomechanismus des SLE ist durch ein komplexes Zusammenspiel von zahlreichen Immunzellen, Zytokine und der davon resultierenden



Entzündungskaskaden gekennzeichnet. Als nächster Schritt unserer Studie fokussierten wir uns auf diese Interaktion von Zytokinen und Immunzellen, um die Caspase-1 Hemmung aus einer breiteren Perspektive zu betrachten.

Wir untersuchten somit die Wirkung eines Caspase-1 Inhibitors auf die intrarenalen Leukozyten-Population sowie der Aktivierung anhand deren Expressionsmuster an inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen.

Mittels einer immunhistochemischen Färbung fanden wir eine signifikante Abnahme infiltrierender Leukozyten in der Niere von behandelten Mäusen im Vergleich zu der scheinbehandelten Kontrollgruppe. Wir untersuchten verschiedene Leukozyten-Populationen, sowohl F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, als auch CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und B220<sup>+</sup> B-Zellen. Bei allen infiltrierenden Zellen konnten wir nach Caspase-1 Inhibition eine relevante Abnahme sowohl auf glomerulärer, als auch auf interstitieller und perivaskulärer Ebene nachweisen.

In der Durchflusszytometrie der intrarenalen Zellen konnte zunächst eine relevante Abnahme der infiltrierenden Leukozyten (CD45 - Pan-Leukozyten Marker) bestätigt werden. Wie in der immunhistochemischen Untersuchung ließ sich auch in der Durchflusszytometrie eine Reduktion der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen sowie der myeloiden CD11<sup>+</sup> Zellen nachweisen.

Dank der weiteren Typisierung dieser zwei Zellpopulationen sowie der anschließenden Proteomanalyse des Nierengewebes konnten wir zusätzliche Informationen über den Aktivierungsstatus der Leukozyten sowie über die Freisetzung von Zytokine durch Leukozyten und TEZ gewinnen.

**CD69** ist ein Aktivitätsmarker, der vorübergehend auf verschiedenen Leukozytensubpopulationen exprimiert wird. Durch eine Caspase-1 Inhibition kam es zu einer hochsignifikanten Abnahme der aktivierten Lymphozyten (CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>). CD11<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> nehmen nach Caspase-1 Hemmung hingegen relevant zu. **CD206** ist ein Marker von aktivierten Monozyten und Makrophagen, die in einer anti-inflammatorischen Antwort involviert sind.

Diese Daten zeigen, dass sich durch eine Caspase-1 Blockade die infiltrierende Zellpopulation in der Niere signifikant ändert, zum einen nehmen die proinflammatorische Leukozyten relevant ab, zum anderen nimmt die antiinflammatorische Monozyten/Makrophagen-Population zu.

**CD25** und **FoxP3** sind hingegen Marker für regulatorische T-Zellen. Nach einer

Caspase-1 Hemmung kam es zu keiner signifikanten Änderung dieser Zellpopulationen, sodass vermutlich ein Caspase-1 Inhibitor keine relevante Änderung der T-Regulatorischen Antwort hervorruft.

**IL-17** ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches vorwiegend durch einen speziellen Typ von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen produziert wird, die Th17-Zellen. Die Induktion von Th17-Zellen und somit von IL-17 wird insbesondere durch IL-1 $\beta$  und IL-23 stimuliert (90) und bereits verschiedene Studien haben eine reduzierte IL-17 Produktion in IL-1-Rezeptor knock-out Mäusen (91) (92) und wiederum eine erhöhte IL-17 Expression in IL-1Ra knock-out Mäusen bewiesen. (93) Meng et al. zeigten im Mausmodell, dass eine NLRP3-Mutation mit folgender Überaktivierung des Inflammasoms zu einer Th17-dominanten Immunantwort mit Hautbeteiligung, Lymphadenopathie und Hepatosplenomegalie führt. (94)

Diese Daten lassen sich auch in unserer Analyse bestätigen. Bei MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäusen, die mit einem Caspase-1 Inhibitor behandelt wurden, findet sich in der durchflusszytometrischen Analyse eine geringere Frequenz an Th17 Zellen (CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> Zellen) im Vergleich zur scheinbehandelten Kontrollgruppe (p-Value=0,0262). Dies bestätigt die Hypothese, dass durch eine Caspase-1 Inhibition und somit einer niedrigeren IL-1 $\beta$  Konzentration, Th17-Zellen und folglich IL-17 in einem geringeren Maße synthetisiert werden. In der Proteom-Analyse ließ sich zwar keine relevant reduzierte IL-17 Expression, allerdings eine Abnahmetendenz nach Caspase-1 Hemmung nachweisen. Eine Erklärung hierfür ist, dass nicht nur Th17 CD4<sup>+</sup> Zellen an der IL-17 Synthese, sondern auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Neutrophile, NK-Zellen und Doppel-negative T-Zellen beteiligt sind. (95)

IL-17 ist an der Neutrophilenrekrutierung sowie an der lokalen Entzündungsreaktion beteiligt und erhöhte IL-17 Werte sowie vermehrte Th17-Zellen wurden bereits in SLE Patienten, v.a. mit Nierenbeteiligung beschrieben. (96) (97) IL-17 hat allerdings auch eine wichtige physiologische Funktion, da es bei einer normalen Serumkonzentration durch eine zytotoxische T-Zell Immunantwort zu einer Tumorregression führt. (98) Eine komplette Hemmung dieses Zytokins wäre somit womöglich mit schweren Nebenwirkungen (wie z.B. eine erhöhte Tumorinzidenz) assoziiert.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass pathologisch erhöhte Th17 Zellen und IL-17 im SLE eine wichtige pathogenetische Rolle spielen und, dass es durch

eine Caspase-1 Inhibition zu relevant reduzierten Th-17 Zellen sowie zu einer statistisch nicht relevanten Reduktion von IL-17-Expression kommt. Eine IL-17 Inhibition durch isolierter Th-17 Hemmung mittels Caspase-1 Inhibition, könnte neben den weiteren Effekten der Enzymhemmung eine zusätzliche protektive Rolle auf dem SLE spielen.

**Chemokine** sind Zytokine, die an der Chemotaxis, sowie an der Migration von Immunzellen durch die Gefäßwand beteiligt sind und somit eine lokale Entzündungsreaktion verstärken.

Auch mehrere Chemokine werden durch die Caspase-1 Inhibition unterdrückt, insbesondere CXCL-9 -10, -11, und -12 sowie CCL2, CCL3, CCL4 und CCL5.

CXCL-12, welches durch IL-17 induziert wird, war in behandelten Mäusen signifikant erniedrigt. Da Th17-Zellen nach der Caspase-1 Inhibitor Therapie auch signifikant unterdrückt waren, kann man eine Reduktion dieses Chemokins nachvollziehen. CXCL-12 wurde mehrfach in Zusammenhang mit der Pathogenese des SLE und insbesondere der LN gebracht. Dieses Chemokin führt zum einen zur Migration von unterschiedlichen Leukozyten, u.a. inflammatorischen Monozyten und Neutrophilen in die Niere und zum anderen provoziert es einen direkten Schaden auf die Nierenzellen. (99) Einige Studien konnten bereits durch eine CXCL12 Hemmung im NZB/W F1 Lupus-Mausmodell eine signifikante Besserung des systemischen SLE und der lokalen Entzündungsreaktion in der Niere nachweisen. (100) Ebenso fand sich eine erhöhte Expression von CXCL12 in Nierenzellen von Patienten mit LN. (101).

CXCL-9 -10, und -11 werden durch  $\text{INF-}\gamma$  stimuliert, sodass auch hier eine Reduktion dieser Chemokine nach einer Caspase-1 Inhibition nicht wundert. Diese drei Chemokine aus der CXC-Familie binden an den CXCR3 Rezeptor, welcher von verschiedenen Immunzellen unter anderen von Th17-Zellen exprimiert wird. Mehrere Studien in Lupusmausmodellen konnten nachweisen, dass CXCR3 auf verschiedenen Immunzellen exprimiert wird, die die Niere infiltrieren. Auch in SLE-Patienten mit LN konnte man vermehrte CXCR3-Zellen in der Niere nachweisen und feststellen, dass diese bis zu 60% der infiltrierenden Zellen ausmachen und mit der Proteinurie korrelieren. (102)

Ebenso waren CCL2, CCL3, CCL4, weitere Chemokine, die eine Rolle in der Replikation von myeloiden Zellen spielen, nach einer Caspase-1 Inhibition signifikant erniedrigt.

Zusammenfassend beeinflusst eine Therapie mit einem Caspase-1 Inhibitor auch die Konzentration dieser Chemokine und somit die transendotheliale Migration und die Chemotaxis sowie den lokalen Gewebeschaden. Diese Daten erweitern unser Wissen über die Wirkungsmechanismen einer Caspase-1-Inhibition und stärken die Hypothese, dass eine Caspase-1 Hemmung eine sinnvolle und effektive Therapie des SLE darstellen könnte.

#### **5.4 IL-18 im humanen SLE und Ausblick**

Da die IL-18 Inhibition durch eine Caspase-1 Hemmung als möglicher Therapietarget für den SLE in Frage kommt, versuchten wir in einem weiterführenden Ansatz die gewonnenen Erkenntnisse aus den experimentellen Untersuchungen im Mausmodell auf den humanen SLE zu übertragen.

Mittels eines Serum-ELISAs fanden wir zunächst eine signifikant höhere IL-18 Konzentration bei SLE-Patienten im Vergleich zu dem gesunden Kollektiv. Des Weiteren konnten wir eine relevante Korrelation der IL-18 Serumkonzentration mit der SLE-Krankheitsaktivität (SLEDAI, C3) nachweisen.

Unsere Daten bestätigen die Ergebnisse anderer Studiengruppen, die auch zeigen konnten, dass die Serumkonzentration von IL-18 in SLE-Patienten deutlich höher als in den Kontrollen ist und, dass die Konzentration mit der Krankheitsaktivität, insbesondere mit dem SLEDAI korreliert. (30) (31) (32) (33).

Des Weiteren untersuchten wir mittels immunhistochemischer Färbung die Expression von IL-18 in der Niere von SLE Patienten mit LN. IL-18 konnte in den Biopsien von Patienten mit LN deutlich nachgewiesen werden, insbesondere in TEZ, aber auch infiltrierende, interstitielle und intraglomeruläre Zellen exprimieren IL-18. Dies bestärkt erste Ergebnisse der Studien von Hu et al. und Tucci et al., die zumindest eine verstärkte glomeruläre Expression von IL-18 in SLE-Patienten mit GN nachweisen konnten. (36) (34)

Weiterführende Studien im murinen Lupusmodell vor allem über die Langzeiteffekte einer Therapie mit einem Caspase-1 Inhibitor sind notwendig. Es wäre interessant

sowohl die protektiven Effekte als auch die Nebenwirkungen einer Langzeittherapie mit einem Caspase-1 Hemmer sowie die Prognose und die Sterberate darunter zu untersuchen. Außerdem sollte die pathogenetische Rolle des IL-1 $\beta$  weiter untersucht werden, insbesondere wäre es interessant zu evaluieren, ob ein Therapiebeginn vor Krankheitsausbruch einen signifikant besseren klinischen Outcome bewirkt. Dies würde die Hypothese bekräftigen, dass IL-1 $\beta$  vor allem in der Induktionsphase der Immunantwort und in der frühen T-Zell-Aktivierung involviert ist und eine IL-1 $\beta$ -Blockade als SLE-Therapie nicht in Frage kommt.

Ebenso sollten weitere Studien im Menschen die pathogenetischen Rolle der Caspase-1 induzierten Zytokine erforschen. Es wäre interessant auch im Menschen die differenzierte Rolle von IL-1 $\beta$  und IL-18 zu analysieren und die Zytokinexpression mit eventuellen SLE-Subgruppen, wie z.B. die LN oder den CL zu korrelieren. Eine mögliche Rolle als Aktivitäts- oder Erkrankungsmarker wurde bereits von Favilli et al. postuliert. Sie fanden eine Korrelation von IL-18 im Urin mit der akuten Tubulusnekrose, der akuten Niereninsuffizienz und der verzögerten Transplantatfunktion. (28) Eine Assoziation von IL-18 mit bestimmten Patientensubgruppen bzw. eine Organbeteiligung wäre nicht nur zur Entwicklung von diagnostischen Laborparametern, sondern vor allem von neuen Therapiemöglichkeiten relevant. Die Therapie des SLE ist besonders bei einer schweren Organbeteiligung noch eine große Herausforderung. Ein Caspase-1 Inhibitor könnte ein neues Instrument für die „Kunst“ der SLE-Therapie und ein zielgerichtetes Therapeutikum der LN darstellen.

## 6. Zusammenfassung

In mehreren wissenschaftlichen Arbeiten wurde bereits die Rolle des IL-18 in der Pathogenese des SLE erkannt, die Rolle von IL-1 $\beta$  ist hingegen kontrovers. Die inaktiven Proformen des IL-18 und des IL-1 $\beta$  werden mittels des Enzyms Caspase-1 in die biologisch aktive Form des IL-18 und IL-1 $\beta$  überführt. Dieses Enzym stellt somit einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt dar.

In dieser Arbeit wurden die Rolle der Caspase-1 und der durch die Caspase-1 aktivierten Interleukine (IL-18 und IL-1 $\beta$ ) in der Pathogenese des SLE sowie die Wirkung einer pharmakologischen Caspase-1 Inhibition als Therapiemöglichkeit untersucht.

An einem MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Lupusmausmodell konnten wir nachweisen, dass die Hemmung der Caspase-1 zu einer signifikanten Reduktion der proinflammatorischen Zytokine IL-18, IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  führt. Klinisch, laborchemisch und histologisch wurden durch eine Caspase-1 Inhibition die Krankheitsprogression, insbesondere die Nieren- und Hautbeteiligung sowie die Lymphadenopathie und Splenomegalie, unterdrückt. Diese Daten bekräftigen den bereits in verschiedenen Studien vermuteten nephroprotektiven Effekt sowie die prognostisch günstige systemische Wirkung einer Caspase-1 Inhibition. (71) (81)

Pralnacasan, der orale Caspase-1 Inhibitor, den wir in unserer Studie verwendeten erwies sich als spezifisch. Er hemmt ausschließlich die Aktivität der Caspase-1 mit folgender Inhibition der mRNA-Expression und der Serum-Konzentration von IL-18, IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$ . Die Serum-Konzentration von IL-12 und TNF- $\alpha$  sowie die mRNA Expression der Caspase-1 und anderer Caspasen sind nach einer Caspase-1 Inhibition nicht signifikant verändert.

Weiterhin behandelten wir MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Mäuse mit einem spezifischen IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1RA) um die Rolle von IL-18 und IL-1 $\beta$  zu differenzieren. Hier konnten wir zeigen, dass eine Behandlung mit einem IL-1 Rezeptor Blocker keine signifikante Wirkung auf die Progression der Erkrankung in MRL-Fas<sup>lpr</sup>- Mäuse hat und, dass der dominante therapeutische Mechanismus des Caspase-1 Inhibitors der fehlenden Aktivierung von IL-18 geschuldet ist. Auch in der Literatur finden sich Studien, die keine Korrelation von IL-1 $\beta$  mit dem SLE nachweisen können, (23) (22)

(19) die Rolle dieses Zytokins in der Pathogenese des SLE bleibt allerdings noch unklar.

Neben der enzymatischen Aktivierung von IL-18 und IL-1 $\beta$  ist die Caspase-1 auch an der Pyroptose, eine inflammatorische Variante des programmierten Zelltods beteiligt. In der Literatur werden Caspase-1-defiziente Mäuse beschrieben, in denen Annexin V, als Marker für pyroptotische Zelltrümmer in reduzierter Form detektiert wird. (81) Erwartungsgemäß fand sich auch in unserer Studie eine reduzierte Anzahl an apoptotischen Zellen in der Niere von behandelten Mäusen.

Des Weiteren verglichen wir die Wirkung eines Pan-Caspase Inhibitors, der durch eine unspezifischen Caspase Hemmung zu einer Apoptose-Inhibition führt mit der spezifischen Pralnacasan-Therapie. Obwohl es unter der Pan-Caspase-Inhibition zu einer relevanten Besserung der Lymphadenopathie und Splenomegalie kommt, die in der Pralnacasan-Gruppe nicht beobachtet wurde, ist vor allem der entscheidende nephroprotektive Effekt unter den zwei Therapieformen vergleichbar.

Im murinen Lupusmodell untersuchten wir zuletzt die Anzahl, Differenzierung und Aktivierungsstatus der intrarenalen Leukozytenpopulationen nach Caspase-1 Inhibition. Bei allen analysierten infiltrierenden Zellen der lymphatischen und der myeloiden Reihe fand sich nach Caspase-1 Inhibition eine relevante Abnahme. Weiterhin verursacht die Caspase-1 Hemmung eine relevante Abnahme von aktivierten Lymphozyten sowie Monozyten/Makrophagen und eine Reduktion der Th17-Zellen, die an der Neutrophilenrekrutierung sowie an der lokalen Entzündungsreaktion beteiligt sind.

Auch verschiedene Chemokine wie CXCL 9 10 und 11, proinflammatorische Zytokine wie IL-16 und IL-23 und M-CSF, ein Zytokin, welches zur Stimulation, Rekrutierung und Differentiation von Monozyten/Makrophagen führt, werden durch eine Caspase-1 Inhibition gehemmt.

Zuletzt versuchten wir in einem weiterführenden Ansatz die gewonnenen Erkenntnisse aus den experimentellen Untersuchungen im Mausmodell auf den humanen SLE zu übertragen. In SLE-Patienten fanden wir deutlich erhöhte IL-18 Serumkonzentrationen sowie eine relevante Korrelation von IL-18 mit der SLE-Krankheitsaktivität. IL-18 konnte weiterhin in den Biopsien von Patienten mit LN in infiltrierenden Zellen als auch den residenten Tubulusepithelzellen deutlich nachgewiesen werden. Auch hier konnten wir die Ergebnisse anderer

Studiengruppen, bestätigen. (30) (31) (36) (34)

Die Ergebnisse unserer Studie geben somit Anhalt dafür, dass die Caspase-1 und das IL-18 eine wichtige pathogenetische Rolle im SLE spielen und, dass ein Caspase-1 Inhibitor als möglicher Therapieansatz für den SLE in Frage kommt.



## 7. Literaturverzeichnis

1. Brinks R, Fischer-Betz R, Sander O, Richter JG, Chehab G, Schneider M. *Age-specific prevalence of diagnosed systemic lupus erythematosus in Germany 2002 and projection to 2030*. s.l. : Lupus, 2014. pp. 23: 1407–11.
2. Annegret Kuhn, Gisela Bonsmann, Hans-Joachim Anders, Peter Herzer, Klaus Tenbrock, Matthias Schneider. *Diagnostik und Therapie des systemischen Lupus erythematosus*. s.l. : Deutsches Ärzteblatt , Juni 2015. pp. Heft 25, 423-432.
3. Zahi Touma, Dafna D Gladman. *Current and future therapies for SLE: obstacles and recommendations for the development of novel treatments*. s.l. : Lupus Science & Medicine, 2017.
4. Gesundheitswesen, Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im. *Belimumab – Nutzenbewertung gemäß § 35a SGB V*. 26.04.2012.
5. GlaxoSmithKline. *Benlysta (belimumab) prescribing information*. 2017  
[https://www.gsksource.com/pharma/content/dam/GlaxoSmithKline/US/en/Prescribing\\_Information/Benlysta/pdf/BENLYSTA-PI-MG.PDF](https://www.gsksource.com/pharma/content/dam/GlaxoSmithKline/US/en/Prescribing_Information/Benlysta/pdf/BENLYSTA-PI-MG.PDF).
6. Chehab G, Fischer-Betz R, Schneider M. *Entwicklung von Mortalität und Morbidität beim systemischen Lupus erythematosus*. [Changes in mortality and morbidity in systemic lupus erythematosus]. s.l. : Z Rheumatol, 2011. pp. 70: 480–5.
7. Bernatsky S1, Boivin JF, Joseph L, Manzi S, Ginzler E, Gladman DD, Urowitz M, Fortin PR, Petri M, Barr S, Gordon C, Bae SC, Isenberg D, Zoma A, Aranow C, Dooley MA, Nived O, Sturfelt G, Steinsson K, Alarcón G, Senécal JL, Zimmer M, Hanly J, Ensworth S, Pope J, Edworthy S, Rahman A, Sibley J, El-Gabalawy H, McCarthy T, St Pierre Y, Clarke A, Ramsey-Goldman R. *Mortality in systemic lupus erythematosus*. s.l. : Arthritis Rheum. , Aug2006. pp. 54(8):2550-7.
8. Lateef A, Petri M. *Unmet medical needs in systemic lupus erythematosus*. s.l. : Arthritis Res Ther, 2012. p. 14(Suppl 4):S4.
9. Jorge AM, Lu N, Zhang Y, Rai SK, Choi HK. *Unchanging premature mortality trends in systemic lupus erythematosus: a general population-based study (1999-2014)*. s.l. : Rheumatology (Oxford) , 2018. pp. 57:337–44.

10. Falk, . *Treatment of lupus nephritis - a work in progress*. s.l. : N. Engl. J. Med., 2000. pp. 343, 1182-1183.
11. Ermann J, Fathman CG. *Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation*. . s.l. : Nat Immunol, 2001 Sep. pp. 2(9):759-61.
12. Furukawa F, Yoshimasu T. *Animal models of spontaneous and drug-induced cutaneous lupus erythematosus*. s.l. : Autoimmun Rev, 2005. pp. 4:345–350.
13. Kanauchi H, Furukawa F, Imamura S. *Characterization of cutaneous infiltrates in MRL/lpr mice monitored from onset to the full development of lupus erythematosus-like skin lesions*. s.l. : J Invest Dermatol, 1991. pp. 96:478–483.
14. Menke J, Hsu MY, Byrne KT, Lucas JA, Rabacal WA, Croker BP, Zong XH, Stanley ER, Kelley VR. *Sunlight Triggers Cutaneous Lupus through a Colony Stimulating Factor-1 (CSF-1) Dependent Mechanism in MRL-Faslpr mice*. s.l. : J Immunol., 2008 Nov. pp. 181(10): 7367–7379.
15. Berden, J.H., Licht, R., van Bruggen, M.C., Tax, W.J. *Role of nucleosomes for induction and glomerular binding of autoantibodies in lupus nephritis*. s.l. : Curr. Opin. Nephrol. Hypertens, 1999. pp. 8: 299-306.
16. Hiepe, T. Alexander · A. Radbruch · F. *Pathogenese des systemischen Lupus erythematosus*. s.l. : Z Rheumatol , 2015. pp. 74:183–190.
17. Davidson, Zheng Liu & Anne. *Taming lupus—a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances*. s.l. : Nat Med., 2012. pp. 18(6):871-82.
18. Cavalli G, Dinarello CA. *Treating rheumatological diseases and co- morbidities with interleukin-1 blocking therapies*. s.l. : Rheumatology (Oxford)., 2015. pp. 54:2134–44.
19. McCarthy EM, Smith S, Lee RZ, Cunnane G, Doran MF, Donnelly S, Howard D, O'Connell P, Kearns G, Ní Gabhann J, Jefferies CA. *he association of cytokines with disease activity and damage scores in systemic lupus erythematosus patients*. s.l. : Rheumatology (Oxford), 2014 Sep. pp. 53(9):1586-94.
20. Maczynska I, Millo B, Ratajczak-Stefańska V, Maleszka R, Szych Z, Kurpisz M, Giedrys-Kalemba S. *Proinflammatory cytokine (IL-1beta, IL-6, IL-12, IL-18 and TNF-*

*alpha*) levels in sera of patients with subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE). s.l. : Immunol Lett, 2006 Jan. pp. 102(1):79-82.

21. Italiani P, Manca ML, Angelotti F, Melillo D, Pratesi F, Puxeddu I, Boraschi D, Migliorini P. *IL-1 family cytokines and soluble receptors in systemic lupus erythematosus*. s.l. : Arthritis Research & Therapy, 2018. p. 20(1):27.

22. Mende R, Vincent FB, Kandane-Rathnayake R, Koelmeyer R, Lin E, Chang J, Hoi AY, Morand EF, Harris J, Lang T. *Analysis of Serum Interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-18 in Systemic Lupus Erythematosus*. s.l. : Front Immunol., 2018 Jun. p. 9:1250.

23. Cigni A, Pileri PV, Faedda R, Gallo P, Sini A, Satta AE, Marras R, Carta E, Argiolas D, Rum I, Masala A. *Interleukin 1, interleukin 6, interleukin 10, and tumor necrosis factor  $\alpha$  in active and quiescent systemic lupus erythematosus*. s.l. : J Investig Med., 2014 Jun. pp. 62(5):825-.

24. Brugos B, Vincze Z, Sipka S, Szegedi G, Zeher M. *Serum and urinary cytokine levels of SLE patients*. s.l. : Pharmazie, 2012. pp. 67:411–3.

25. Wang B, Zhu JM, Fan YG, Feng CC, Chen GM, Chen H, Pan HF, Ye DQ. *The association of IL1alpha and IL1beta polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis*. s.l. : Gene, 2013 Sep. pp. 527(1):95-101.

26. Pontillo A, Girardelli M, Kamada AJ, Pancotto JA, Donadi EA, Crovella S, Sandrin-Garcia P. *Polimorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus*. s.l. : Autoimmunity., 2012 Jun. pp. 45(4):271-8.

27. Boraschi, D. & C.A. Dinarello. *IL-18 in autoimmunity: review*. s.l. : Eur. Cytokine Netw., 2006. pp. 17: 224–252.

28. Favilli F, Anzilotti C, Martinelli L, Quattroni P, De Martino S, Pratesi F, Neumann D, Beermann S, Novick D, Dinarello CA, Boraschi D, Migliorini P. *IL-18 activity in systemic lupus erythematosus*. s.l. : Ann N Y Acad Sci, Sep 2009. pp. 1173:301-9. .

29. Wang D, Drenker M, Eiz-Vesper B, Werfel T, Wittmann M. *Evidence for a pathogenetic role of interleukin-18 in cutaneous lupus erythematosus*. s.l. : Arthritis Rheum. pp. 58: 3205–3215.

30. Wong CK, Li EK, Ho CY, Lam CW. *Elevation of plasma interleukin-18 concentration is correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus.* s.l. : Rheumatology (Oxford), 2000. pp. 39: 1078–1081.
31. Wong CK, Ho CY, Li EK, Lam CW. *Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus.* s.l. : Lupus, 2000. pp. 9(8):589-93.
32. Park, M.C., Y.B. Park & S.K. Lee. *Elevated interleukin-18 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus.* s.l. : Clin. Rheumatol. , 2004. pp. 23: 225–229.
33. Jafari-Nakhjavani MR, Abedi-Azar S, Nejati B. *Correlation of plasma interleukin-18 concentration and severity of renal involvement and disease activity in systemic lupus erythematosus.* s.l. : J Nephrologist, 2016 Jan. pp. 5(1):28-33.
34. Tucci M, Quatraro C, Lombardi L, Pellegrino C, Dammacco F, Silvestris F. *Glomerular accumulation of plasmacytoid dendritic cells in active lupus nephritis: role of interleukin-18.* s.l. : Arthritis Rheum., 2008 Jan. pp. 58(1):251-62.
35. Calvani N, Richards HB, Tucci M, Pannarale G, Silvestris F. *Up-regulation of IL-18 and predominance of a Th1 immune response is a hallmark of lupus nephritis.* s.l. : Clin Exp Immunol., 2004 Oct. pp. 138(1): 171–178.
36. Hu D, Liu X, Chen S, Bao C. *Expressions of IL-18 and its binding protein in peripheral blood leukocytes and kidney tissues of lupus nephritis patients.* s.l. : Clin Rheumatol, 2010. pp. 29:717–21.
37. Song G, Choi S, Ji J, Lee Y. *Association between interleukin-18 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis.* . s.l. : Molecular Biology Reports., 2013 Mar. pp. 40(3):2581–7.
38. Wen D, Liu J, Du X, Dong JZ, Ma CS. *Association of interleukin-18 (-137G/C) polymorphism with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis.* *International reviews of immunology.* s.l. : Int Rev Immunol., 2014 Jan. pp. 33(1):34-44.
39. Petrackova, A., Smrzova, A., Gajdos, P., Schubertova, M., Schneiderova, P., Kromer, P., Snasel, V., Skacelova, M., Mrazek, F., Zadrazil, J., Horak, P., Kriegova,

- E. *Serum protein pattern associated with organ damage and lupus nephritis in systemic lupus erythematosus revealed by PEA immunoassay*. s.l. : Clinical proteomics, 2017. pp. Vol 14, 32.
40. Lemay S, Mao C, Singh AK. *Cytokine gene expression in the MRL/lpr model of lupus nephritis*. s.l. : Kidney Int, 1996. pp. 50:85–93.
41. Voronov E, Dayan M, Zinger H, Gayvoronsky L, Lin JP, Iwakura Y, Apte RN, Mozes E. *IL-1 beta-deficient mice are resistant to induction of experimental SLE*. s.l. : Eur Cytokine Netw, 2006 Jun. pp. 17(2):109-16.
42. Faust J, Menke J, Kriegsmann J, Kelley VR, Mayet WJ, Galle PR, Schwarting A. *Correlation of renal tubular epithelial cell-derived interleukin-18 up-regulation with disease activity in MRL-Faslpr mice with autoimmune lupus nephritis*. s.l. : Arthritis Rheum, 2002 Nov. pp. 46(11):3083-95.
43. Esfandiari E, McInnes IB, Lindop G, Huang FP, Field M, Komai-Koma M, Wei X, Liew FY. *A proinflammatory role of IL-18 in the development of spontaneous autoimmune disease*. s.l. : J Immunol., Nov 2001. pp. 167(9):5338-47.
44. Bossù P, Neumann D, Del Giudice E, Ciaramella A, Gloaguen I, Fantuzzi G, Dinarello CA, Di Carlo E, Musiani P, Meroni PL, Caselli G, Ruggiero P, Boraschi D. *IL-18 cDNA vaccination protects mice from spontaneous lupus-like autoimmune disease*. s.l. : Proc Natl Acad Sci U S A, 2003 Nov. pp. 100(24):14181-6.
45. Neumann D, Del Giudice E, Ciaramella A, Boraschi D, Bossù P. *Lymphocytes from autoimmune MRL lpr/lpr mice are hyperresponsive to IL-18 and overexpress the IL-18 receptor accessory chain*. s.l. : J Immunol, 2001 Mar. pp. 166(6):3757-62.
46. Kinoshita, K., Yamagata, T., Nozaki, Y., Sugiyama, M., Ikoma, S., Funauchi, M., Kanamaru, A. *Blockade of IL-18 receptor signaling delays the onset of autoimmune disease in MRL-Faslpr mice*. s.l. : J. Immunol. , 2004. pp. 173: 5312-5318.
47. Menke J, Bork T, Kutska B, Byrne KT, Blanford M, Relle M, Kelley VR, Schwarting A. *Targeting transcription factor Stat4 uncovers a role for interleukin-18 in the pathogenesis of severe lupus nephritis in mice*. s.l. : Kidney Int., 2011 Feb. pp. 79(4):452-63.

48. Gracie, J.A., S.E. Robertson & I.B. McInnes. *Interleukin-18*. s.l. : J. Leukoc. Biol. , 2003. pp. 73: 213–224.
49. MG, . *Caspases: key players in programmed cell death*. s.l. : Curr Opin Struct Biol., 2000 Dec. pp. 10(6):649-55.
50. Dinarello CA. *Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme*. s.l. : Ann N Y Acad Sci, 1998 Sep. pp. 856:1-11.
51. Fantuzzi, G., Dinarello, C.A. *Interleukin-18 and Interleukin-1 $\beta$ : Two cytokine substrates for ICE (Caspase-1)*. s.l. : J.Clin.Immunol, 1999. pp. 19: 1-11.
52. Slee EA1, Zhu H, Chow SC, MacFarlane M, Nicholson DW, Cohen GM. *Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32*. s.l. : Biochem J. , 1996 Apr . pp. 315 ( Pt 1):21-4.
53. Luigi Franchi, Tatjana Eigenbrod, Raúl Muñoz-Planillo, and Gabriel Nuñez. *The Inflammasome: A Caspase-1 Activation Platform Regulating Immune Responses and Disease Pathogenesis*. s.l. : Nat Immunol., 2009 Mar. p. 10(3): 241.
54. Shen HH, Yang YX, Meng X, Luo XY, Li XM, Shuai ZW, Ye DQ, Pan HF. *NLRP3: A promising therapeutic target for autoimmune diseases*. s.l. : Autoimmun Rev., 2018. pp. 17(7):694-702.
55. Schroder, K., and Tschopp, J. *The inflammasomes*. s.l. : Cell, 2010. pp. 140, 821–832.
56. Bo-Zong Shao, Zhe-Qi Xu, Bin-Ze Han, Ding-Feng Su and Chong Liu. *NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review*. s.l. : Front. Pharmacol, 2015 Nov. p. 6:262.
57. Campbell L, Raheem I, Malemud CJ, Askari AD. *The Relationship between NALP3 and Autoinflammatory Syndromes*. s.l. : Int J Mol Sci., 2016 May. p. 17(5).
58. Rock KL, Kataoka H, Lai J-J. *Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities*. s.l. : Nature reviews, 2013 Jan. pp. 9(1):13–23.
59. Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ, Zaki MH, van de Veerdonk FL, Perera D, Neale GA, Hooiveld GJ, Hijmans A, Vroegrijk I, van den Berg S, Romijn J, Rensen

- PC, Joosten LA, Netea MG, Kanneganti TD. *Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance*. s.l. : Proc Natl Acad Sci U S A, 2011 Sep. pp. 108(37):15324-9.
60. Zaki MH, Lamkanfi M, Kanneganti TD. *The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis*. . s.l. : Trends Immunol, 2011 Apr. pp. 32(4):171–9.
61. Mohsen Honarpisheh, Jyaysi Desai, Julian A. Marschner, Marc Weidenbusch, Maciej Lech, Volker Vielhauer, Hans-Joachim Anders, Shrikant R. Mulay. *Regulated necrosis-related molecule mRNA expression in humans and mice and in murine acute tissue injury and systemic autoimmunity leading to progressive organ damage, and progressive fibrosis*. s.l. : Bioscience Reports, 2016 Dec. p. 36 (6).
62. Kahlenberg JM, Thacker SG, Berthier CC, Cohen CD, Kretzler M, Kaplan MJ. *Inflammasome activation of IL-18 results in endothelial progenitor cell dysfunction in systemic lupus erythematosus*. s.l. : J Immunol., 2011 Dec. pp. 187(11):6143–56.
63. Shin MS, Kang Y, Lee N, Wahl ER, Kim SH, Kang KS, Lazova R, Kang I. *Self Double-Stranded (ds)DNA Induces IL-1 $\beta$  Production from Human Monocytes by Activating NLRP3 Inflammasome in the Presence of Anti-dsDNA Antibodies*. s.l. : J Immunol., 2013 Feb. pp. 190(4):1407-15.
64. Asgari E, Le Friec G, Yamamoto H, Perucha E, Sacks SS, Köhl J, Cook HT, Kemper C. *C3a modulates IL-1 $\beta$  secretion in human monocytes by regulating ATP efflux and subsequent NLRP3 inflammasome activation*. . s.l. : Blood, 2013 Nov. pp. 122(20):3473-81.
65. Kahlenberg JM, Carmona-Rivera C, Smith CK, Kaplan MJ. *Neutrophil Extracellular Trap– Associated Protein Activation of the NLRP3 Inflammasome Is Enhanced in Lupus Macrophages*. s.l. : The journal of immunology, 2013 Feb. pp. 190(3):1217–26.
66. Tsai PY, Ka SM, Chang JM, Chen HC, Shui HA, Li CY, Hua KF, Chang WL, Huang JJ, Yang SS, Chen A. *Epigallocatechin-3-gallate prevents lupus nephritis development in mice via enhancing the Nrf2 antioxidant pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation*. . s.l. : Free Radic Biol Med., 2011 Aug. pp. 51(3):744–54.

67. Zhao J, Zhang H, Huang Y, Wang H, Wang S, Zhao C, Liang Y, Yang N. *Bay11-7082 attenuates murine lupus nephritis via inhibiting NLRP3 inflammasome and NF- $\kappa$ B activation*. s.l. : Int Immunopharmacol., 2013 Sep. pp. 17(1):116-22.
68. Turner CM, Tam FW, Lai PC, Tarzi RM, Burnstock G, Pusey CD, Cook HT, Unwin RJ. *Increased expression of the pro-apoptotic ATP-sensitive P2X7 receptor in experimental and human glomerulonephritis*. s.l. : Nephrol Dial Transplant., 2007. pp. 22(2):386-95.
69. Zhao J, Wang H, Dai C, Wang H, Zhang H, Huang Y, Wang S, Gaskin F, Yang N, Fu SM. *P2X7 Blockade Attenuates Murine Lupus Nephritis by Inhibiting Activation of the NLRP3/ASC/Caspase 1 Pathway*. . s.l. : Arthritis Rheum., 2013 Dec. pp. 65(12):3176-85.
70. Yang Q, Yu C, Yang Z, Wei Q, Mu K, Zhang Y, Zhao W, Wang X, Huai W, Han L. *Deregulated NLRP3 and NLRP1 inflammasomes and their correlations with disease activity in systemic lupus erythematosus*. s.l. : J Rheumatol. , 2014. pp. 41(3):444–52.
71. Ma ZZ, Sun HS, Lv JC, Guo L, Yang Q. *Expression and clinical significance of the NEK7-NLRP3 inflammasome signaling pathway in patients with systemic lupus erythematosus*. s.l. : Journal of Inflammation, 2018. p. 15:16.
72. Maciej Lech, Georg Lorenz, Onkar P Kulkarni, Marian O O Grosser, Nora Stigrot, Murthy N Darisipudi, Roman Günthner, Maximilian W M Wintergerst, David Anz, Heni Eka Susanti, Hans-Joachim Anders. *NLRP3 and ASC suppress lupus-like autoimmunity by driving the immunosuppressive effects of TGF- $\beta$  receptor signalling*. s.l. : Ann Rheum Dis, 2015. pp. 74: 2224–2235.
73. Shi H, Wang Y, Li X, Zhan X, Tang M, Fina M, Su L, Pratt D, Bu CH, Hildebrand S, Lyon S, Scott L, Quan J, Sun Q, Russell J, Arnett S, Jurek P, Chen D, Kravchenko VV, Mathison JC, Moresco EM, Monson NL, Ulevitch RJ, Beutler B. *NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component*. . s.l. : Nat Immunol., 2016. pp. 17(3):250–8.
74. Kim JY, Park JH, Kim K, Jo J, Leem J, Park KK. *Pharmacological Inhibition of Caspase-1 Ameliorates Cisplatin-Induced*



*Nephrotoxicity through Suppression of Apoptosis, Oxidative Stress, and Inflammation in Mice.* s.l. : Mediators Inflamm., 2018 Dec. p. 23;2018:6571676.

75. Lin X, Ye H, Siaw-Debrah F, Pan S, He Z, Ni H, Xu Z, Jin K, Zhuge Q, Huang L. *AC-YVAD-CMK Inhibits Pyroptosis and Improves Functional Outcome after Intracerebral Hemorrhage.* s.l. : Biomed Res Int, 2018 Oct. p. 2018:3706047.

76. Kong QL, Chen W, Sun GZ, Cao J, Cheng H, Qi KM, Pan XY, Li ZY, Zeng LY, Xu KL. *aspase1 Inhibitor Ac-YVAD-CMK Prevents and Treats the Acute Graft Versus Host Disease in Mice.* s.l. : Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2017 Feb. pp. 25(1):203-208.

77. Wang CC, Zhang M, Li H, Li XL, Yue LT, Zhang P, Liu RT, Chen H, Li YB, Duan RS. *Caspase-1 inhibitor regulates humoral responses in experimental autoimmune myasthenia gravis via IL-6- dependent inhibiton of STAT3.* s.l. : Neurosci Lett., 2017 Aug. pp. 656:169-176.

78. Wang CC, Li H, Zhang M, Li XL, Yue LT, Zhang P, Zhao Y, Wang S, Duan RN, Li YB, Duan RS. *Caspase-1 inhibitor ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by innate dendric cell IL-1-IL-17 pathway.* . s.l. : J Neuroinflammation., 2015 Jun. p. 12:118.

79. Pellegrini C, Fornai M, Colucci R, Benvenuti L, D'Antongiovanni V, Natale G, Fulceri F, Giorgis M, Marini E, Gastaldi S, Bertinaria M, Blandizzi C, Antonioli L. *A Comparative Study on the Efficacy of NLRP3 Inflammasome Signaling Inhibitors in a Pre-clinical Model of Bowel Inflammation.* s.l. : Front Pharmacol., 2018 Dec. p. 9:1405.

80. Aira LE, Gonçalves D, Bossowski JP, Rubio-Patiño C, Chiche J, Paul-Bellon R, Mondragón L, Gesson M, Lecucq-Ottavi P, Obba S, Colosetti P, Luciano F, Bailly-Maitre B, Boyer L, Jacquel A, Robert G, Ricci JE, Ortonne JP, Passeron T, Lacour JP, Auberger P, Marchetti S. *Caspase 1/11 deficiency or pharmacological inhibition mitigates psoriasis-like phenotype in mice.* s.l. : J Invest Dermatol, 2018 Dec. pp. S0022-202X(18)32939-7.

81. Kahlenberg JM, Yalavarthi S, Zhao W, Hodgins JB, Reed TJ, Tsuji NM, Kaplan MJ. *An essential role of caspase 1 in the induction of murine lupus and its associated vascular damage.* . s.l. : Arthritis Rheumatol., 2014 Jan. pp. 66(1):152-62.

82. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, Zhang J, Lee WP, Roose-Girma M, Dixit VM. *Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11*. s.l. : Nature, 2011 Oct. pp. 479(7371):117-21.
83. Gaipal, U.S., A. Kuhn, A. Sheriff, L.E. Munoz, S. Franz, R.E. Voll, J.R. Kalden, and M. Herrmann. *Clearance of apoptotic cells in human SLE*. s.l. : Curr Dir Autoimmun, 2006. pp. 9:173-187.
84. Licht, R., J.W. Dieker, C.W. Jacobs, W.J. Tax, and J.H. Berden. *Decreased phagocytosis of apoptotic cells in diseased SLE mice*. s.l. : J Autoimmun, 2004. pp. 22:139-145.
85. Gaipal, U.S., L.E. Munoz, G. Grossmayer, K. Lauber, S. Franz, K. Sarter, R.E. Voll, T. Winkler, A. Kuhn, J. Kalden, P. Kern, and M. Herrmann. *Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE)*. s.l. : J Autoimmun, 2007. pp. 28:114-121. .
86. Bergsbaken T., Fink L. S., and Cookson B. T. *Pyroptosis: host cell death and inflammation*. s.l. : Nat Rev Microbiol., 2009 Feb. pp. 7(2): 99–109.
87. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA. *Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme*. s.l. : Science, 1995 Mar. pp. 31;267(5206):2000-3.
88. Bengtsson AA, Gullstrand B, Truedsson L, Sturfelt G. *SLE serum induces classical caspase-dependent apoptosis independent of death receptors*. s.l. : Clin Immunol., Jan 2008. pp. 126(1):57-66.
89. Seery, J.P., V. Cattell, and F.M. Watt. *Cutting edge: amelioration of kidney disease in a transgenic mouse model of lupus nephritis by administration of the caspase inhibitor carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-(beta-o-methyl)-fluoromethylketone*. s.l. : J Immunol, 2001. pp. 167:2452-2455.
90. Chung, Y., S. H. Chang, G. J. Martinez, X. O. Yang, R. Nurieva, H. S. Kang, L. Ma, S. S. Watowich, A. M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong. *Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling*. s.l. : Immunity, 2009. pp. 30: 576–587.

91. Sutton, C., C. Brereton, B. Keogh, K. H. Mills, and E. C. Lavelle. *A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis*. s.l. : J. Exp. Med., 2006. pp. 203: 1685–1691.
92. Stephen J. Lalor, Lara S. Dungan, Caroline E. Sutton, Sharee A. Basdeo, Jean M. Fletcher and Kingston H. G. Mills. *Caspase-1-Processed Cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 Promote IL-17 Production by  $\gamma\delta$  and CD4 T Cells That Mediate Autoimmunity*. s.l. : J Immunol, 2011. pp. 186:5738-5748.
93. Nakae, S., S. Saijo, R. Horai, K. Sudo, S. Mori, and Y. Iwakura. *IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist*. . s.l. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 2003. pp. 100: 5986–5990.
94. Meng G, Zhang F, Fuss I, Kitani A, Strober W. *A mutation in the Nlrp3 gene causing inflammasome hyperactivation potentiates Th17 cell-dominant immune responses*. s.l. : Immunity., 2009. pp. 30(6):860-74.
95. Ohl K, Tenbrock K. *Inflammatory cytokines in systemic lupus erythmatosus*. s.l. : J Biomed Biotechnol., 2011. p. 2011:432595.
96. Yap D, Lai K. *Cytokines and their roles in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: from basics to recent advances*. s.l. : J Biomed Biotechnol., 2010. p. 2010:365083.
97. Zickert A, Amoudruz P, Sundström Y, Rönnelid J, Malmström V, Gunnarsson I. *IL-17 and IL-23 in lupus nephritis - association to histopathology and response to treatment*. . s.l. : BMC Immunol., 2015. pp. 16:1–10.
98. Murugaiyan G, Saha B. *Protumor vs antitumor functions of IL-17*. s.l. : J Immunol, 2009. pp. 183:4169–75. .
99. Rizzo P, Perico N, Gagliardini E, Novelli R, Alison MR, Remuzzi G, Benigni A. *Nature and mediators of parietal epithelial cell activation in glomerulonephritides of human and rat*. s.l. : Am J Pathol., 2013. pp. 183(6):1769-1778.
100. Balabanian K., Couderc J, Bouchet-Delbos L, Amara A, Berrebi D, Foussat A, Baleux F, Portier A, Durand-Gasselini I, Coffman RL, Galanaud P, Peuchmaur M, Emilie D. *Role of the chemokine stromal cell-derived factor 1 in autoantibody*

*production and nephritis in murine lupus*. s.l. : J Immunol., 2003. pp. 170(6):3392-400.

101. Wang A., Guilpain P, Chong BF, Chouzenoux S, Guillevin L, Du Y, Zhou XJ, Lin F, Fairhurst AM, Boudreaux C, Roux C, Wakeland EK, Davis LS, Batteux F, Mohan C. *Dysregulated expression of CXCR4/CXCL12 in subsets of patients with systemic lupus erythematosus*. s.l. : Arthritis Rheum, 2010. pp. 62(11):3436-46.

102. Enghard P, Humrich JY, Rudolph B, Rosenberger S, Biesen R, Kuhn A, Manz R, Hiepe F, Radbruch A, Burmester GR, Riemekasten G. *CXCR3+CD4+ T cells are enriched in inflamed kidneys and urine and provide a new biomarker for acute nephritis flares in systemic lupus erythematosus patients*. s.l. : Arthritis Rheum., 2009. pp. 60(1):199-206.

## 8. Anhang

### 8.1 Tabellarische Auswertung

#### Tabellen zu Kapitel 4.1.1 Wirkung der Caspase-1 Inhibition auf dem SLE

	Min	25% Perzentile	Median	75% Perzentile	Max	Mittelwert	Standard- abweichung
IL18 CI	0.00	0.00	116.10	215.80	227.60	113.60	91.47
IL18 K	31.30	167.70	270.20	413.80	495.70	278.50	144.2
IFN- $\gamma$ CI	33.30	60.40	71.30	87.90	95.50	71.30	18.60
IFN- $\gamma$ K	41.80	64.50	122.00	255.00	332.00	155.40	106.80
IL1 $\beta$ CI	51.00	102.40	137.00	169.20	240.10	137.20	52.50
IL1 $\beta$ K	54.70	147.70	196.70	350.30	432.40	238.60	120.10

Tab. 8. 1 Serum-ELISA: Konzentration von IL-18, IFN $\gamma$  und IL-1 $\beta$  nach Caspase-1 Hemmung (CI) im Vergleich zur Kontrollgruppe (K)

	Min	25% Perzentile	Median	75% Perzentile	Max	Mittelwert	Standard- abweichung
Haut CI	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.33	0.49
Haut K	0.00	1.00	3.00	3.00	3.00	2.08	1.24
LK CI	14.00	18.50	23.50	32.50	36.00	24.60	7.69
LK K	26.00	27.25	32.50	37.75	43.00	33.42	5.96
Milz CI	0.27	0.45	0.59	0.67	1.11	0.59	0.22
Milz K	0.48	0.58	0.84	0.93	1.35	0.82	0.24

Tab. 8. 2: Effekte der Therapie vom 2.5 Lebensmonat bis zum 5.5 Lebensmonat mit Caspase-1 Inhibitor (CI) im Vergleich zur Kontrollgruppe (K).

Hautbeteiligung, Lymphadenopathie (LK-Gewicht/KG) und Splenomegalie (Milz-Gewicht/KG)  
LK – Lymphknoten, KG – Körpergewicht

	Min	25% Perzentile	Median	75% Perzentile	Max	Mittelwert	Standardab- weichung
Haut CI	0.00	0.00	1.00	1.75	2.00	0.92	0.79
Haut K	0.00	0.50	2.00	3.00	3.00	1.83	1.19
LK CI	7.50	12.75	17.25	20.00	30.00	17.63	5.98
LK K	9.50	13.25	21.50	23.25	35.50	20.38	8.00
Milz CI	0.37	0.46	0.66	0.72	0.92	0.61	0.17
Milz K	0.43	0.66	0.72	0.83	1.04	0.73	0.16

Tab. 8. 3 : Effekte der Therapie vom 4. Lebensmonat bis zum 5.5 Lebensmonat mit Caspase-1 Inhibitor (CI) im Vergleich zur Kontrollgruppe (K).  
Hautbeteiligung, Lymphadenopathie (LK-Gewicht/KG) und Splenomegalie (Milz-Gewicht/KG)  
LK – Lymphknoten, KG – Körpergewicht

	Min	25% Perzentile	Median	75% Perzentile	Max	Mittelwert	Standard- abweichung
CI	0.00	0.00	1.00	2.00	4.00	1.27	1.34
K	2.00	2.00	3.50	4.00	4.00	3.10	0.99

Tab. 8. 4 Histopathologischer Nieren-Score: Effekte der Therapie vom 2.5 Lebensmonat bis zum 5.5 Lebensmonat mit Caspase-1 Inhibition (CI) im Vergleich zur Kontrollgruppe (K).

	Min	25% Perzentile	Median	75% Perzentile	Max	Mittelwert	Standard- abweichung
BUN CI	24.00	26.50	33.00	44.50	55.00	35.42	10.13
BUN K	32.00	35.00	51.00	64.50	78.00	51.67	16.11

Tab. 8. 5: Effekte der Therapie vom 2.5 Lebensmonat bis zum 5.5 Lebensmonat mit Caspase-1 Inhibitor (CI) im Vergleich zur Kontrollgruppe (K).  
BUN- Blut-Harnstoff-Stickstoffs

	Min	25% Perzentile	Median	75% Perzentile	Max	Mittelwert	Standard- abweichung
CI (0)	27253	47572	76548	128438	156876	85713	47664
K (0)	20036	32636	76580	138296	176548	83689	60148
CI (4 Mo)	3624	5934	62861	117759	489972	101164	153597
K (4 Mo)	6719	10862	210615	1012105	1069089	442381	495321
CI (5 Mo)	25861	31538	49803	125678	150558	69006	55536
K (5 Mo)	8216	9478	217844	491225	969388	292505	355619

Tab. 8. 6 Albumin ELISA im Urin von MRL-Fas<sup>DP</sup>-Mäusen nach Caspase-1 (CI) Inhibition im Vergleich zur Kontrollgruppe (K). Messungen jeweils zu Therapiestart (0), mit 4 Monaten (4 Mo) und mit 5 Monate (5 Mo). Keine statistisch relevante Differenz nachweisbar, allerdings kann eine Besserungstendenz der Albuminurie nach Caspase-1 Inhibition erkannt werden.

### Tabellen zu Kapitel 4.1.2 Differenzierung der Rolle von IL-18 und IL-1β in der Pathogenese von LN und systemischer Erkrankung

	Min	25% Perzentile	Median	75% Perzentile	Max	Mittelwert	Standard- abweichung
IL-1- RA	6.40	7.35	10.30	23.40	49.10	17.00	12.75
K	8.70	11.45	16.80	22.95	40.90	18.56	8.63

Tab. 8.7: Anti-dsDNA bei Therapie mit IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1-RA) im Vergleich zur Kontrolle (K)

	Min	25% Perzentile	Median	75% Perzentile	Max	Mittelwert	Standard- abweichung
IL-1- RA	0.30	0.40	1.15	3.40	4.00	1.65	1.66
K	0.00	0.68	2.90	6.90	7.70	3.55	2.98

Tab. 8.8 Proliferationsrate bei Therapie mit IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1-RA) im Vergleich zur Kontrolle (K)

	Min	25% Perzentile	Median	75% Perzentile	Max	Mittelwert	Standard- abweichung
IL-1- RA	0.00	0.05	0.08	0.09	0.10	0.07	0.03
K	0.06	0.07	0.11	0.13	0.17	0.10	0.03

Tab. 8. 9 Lymphadenopathie(LK-Gewicht/KG) bei Therapie mit IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1-RA) im Vergleich zur Kontrolle (K); LK – Lymphknoten, KG – Körpergewicht

	Min	25% Perzentile	Median	75% Perzentile	Max	Mittelwert	Standard- abweichung
IL-1- RA	0.003	0.007	0.009	0.011	0.014	0.009	0.002
K	0.006	0.008	0.009	0.012	0.015	0.010	0.002

Tab. 8.10 Splenomegalie (Milz-Gewicht/KG) bei Therapie mit IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1-RA) im Vergleich zur Kontrolle (K); KG – Körpergewicht

	Min	25% Perzentile	Median	75% Perzentile	Max	Mittelwert	Standard- abweichung
IL-1- RA	0.00	0.03	0.25	0.60	2.90	0.47	0.80
K	0.00	0.00	0.20	0.40	2.30	0.40	0.59

Tab. 8.11 Apoptoserate bei Therapie mit IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1-RA) im Vergleich zur Kontrolle (K) mit TUNEL-Assa

### Tabellen zu Kapitel 4.1.3 Spezifität und Wirkmechanismus der Caspase-1 Hemmung

	Min	25% Perzentile	Median	75% Perzentile	Max	Mittelwert	Standard- abweichung
IL18 CI	0.00	0.00	116.10	215.80	227.60	113.60	91.47
IL18 K	31.30	167.70	270.20	413.80	495.70	278.50	144.2
IFN- $\gamma$ CI	33.30	60.40	71.30	87.90	95.50	71.30	18.60
IFN- $\gamma$ K	41.80	64.50	122.00	255.00	332.00	155.40	106.80
IL1 $\beta$ CI	51.00	102.40	137.00	169.20	240.10	137.20	52.50
IL1 $\beta$ K	54.70	147.70	196.70	350.30	432.40	238.60	120.10
TNF $\alpha$ CI	41.00	53.00	85.80	94.90	97.90	76.50	21.60
TNF $\alpha$ K	25.60	39.60	86.10	146.70	202.50	92.50	59.60
IL12 CI	45.70	85.40	143.40	161.70	225.70	134.30	67.80
IL12 K	72.00	107.80	217.60	297.10	437.60	219.80	112.50

Tab. 8.12: Serum-ELISA: Konzentration von IL-18, IFN $\gamma$  und IL-1 $\beta$  sowie TNF  $\alpha$  und IL-12 nach Therapie mit Caspase-1 Hemmung (CI) im Vergleich zur Kontrollgruppe (K)



**Tabellen zu Kapitel 4.1.5. Caspase-1 vermittelte Aktivierung von Leukozytenpopulationen und Induktion von Zytokinen**

	Min	25% Perzentile	Median	75% Perzentile	Max	Mittelwert	Standardabweichung
gl. CI	5.60	7.70	10.30	14.10	15.00	10.85	3.15
gl. K	15.30	16.68	17.45	23.50	23.50	19.40	3.56
int. CI	14.40	17.00	19.50	20.60	21.80	18.75	2.31
int. K	23.80	28.58	31.85	34.13	35.40	31.27	3.63
pv. CI	8.00	8.20	10.00	12.00	17.00	10.92	3.28
pv. K	14.00	14.95	21.80	24.80	27.60	20.52	5.22

Tab. 8. 13 Hemmung der intrarenalen Leukozyten (F4/80) nach Caspase-1 Inhibition (CI) im Vergleich zur Kontrollgruppe (K). Immunhistochemische Detektion der Leukozyten-Populationen auf glomerulärer (gl), interstitieller (int) und perivaskulärer (pv) Ebene.

	Min	25% Perzentile	Median	75% Perzentile	Max	Mittelwert	Standardabweichung
gl. CI	4.90	6.80	8.00	10.00	11.60	8.32	2.09
gl. K	14.40	15.00	20.10	23.83	24.50	19.55	4.55
int. CI	4.40	6.30	8.90	13.60	23.00	10.67	5.57
int. K	23.20	23.58	24.40	26.55	29.80	25.25	2.06
pv. CI	7.00	10.80	13.00	17.00	22.60	14.04	4.61
pv. K	24.20	26.45	28.60	30.00	31.00	28.08	2.23

Tab. 8. 14 Hemmung der intrarenalen Leukozyten (CD4) nach Caspase-1 Inhibition (CI) im Vergleich zur Kontrollgruppe (K). Immunhistochemische Detektion der Leukozyten-Populationen auf glomerulärer (gl), interstitieller (int) und perivaskulärer (pv) Ebene.

	Min	25% Perzentile	Median	75% Perzentile	Max	Mittelwert	Standard- abweichung
gl. CI	1.90	2.20	2.40	4.20	5.20	3.14	1.12
gl. K	2.40	3.60	7.00	8.65	11.10	6.61	3.01
int. CI	2.50	3.20	3.90	6.30	6.80	4.46	1.63
int. K	4.70	5.95	8.15	12.40	13.80	8.80	3.26
pv. CI	3.80	4.00	5.30	7.00	9.00	5.60	1.76
pv. K	5.00	7.60	9.00	9.25	9.60	8.37	1.42

Tab. 8. 15 Hemmung der intrarenalen Leukozyten (CD8) nach Caspase-1 Inhibition (CI) im Vergleich zur Kontrollgruppe (K). Immunhistochemische Detektion der Leukozyten-Populationen auf glomerulärer (gl), interstitieller (int) und perivaskulärer (pv) Ebene.

	Min	25% Perzentile	Median	75% Perzentile	Max	Mittelwert	Standard- abweichung
gl. CI	0.50	1.00	1.40	1.50	1.80	1.26	0.40
gl. K	1.80	1.95	2.50	3.30	3.90	2.63	0.78
int. CI	0.60	1.20	1.80	2.10	4.00	1.86	0.88
int. K	1.60	2.68	4.05	6.70	7.00	4.43	2.03
pv. CI	6.70	7.40	10.50	12.20	12.60	9.86	2.28
pv. K	14.00	17.35	24.60	28.60	30.20	22.70	6.11

Tab. 8. 16 Hemmung der intrarenalen Leukozyten (B220) nach Caspase-1 Inhibition (CI) im Vergleich zur Kontrollgruppe (K). Immunhistochemische Detektion der Leukozyten-Populationen auf glomerulärer (gl), interstitieller (int) und perivaskulärer (pv) Ebene.