

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

Die Bedeutung von PTP ζ
in der Pathogenese des systemischen Lupus erythematodes

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

Vorgelegt von

Martin Nickeleit
aus Erfurt

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

12. Juli 2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung und Zielsetzung.....	1
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Systemischer Lupus erythematoses.....	3
2.1.1 Epidemiologie	3
2.1.2 Symptomatik und Diagnostik	4
2.1.3 Verlaufs- und Sonderformen.....	10
2.2 Organmanifestationen	12
2.2.1 Nierenbeteiligung.....	13
2.2.2 Weitere klinische Manifestationsformen	16
2.3 Ätiologie und Pathogenese.....	19
2.3.1 Ätiologie und Pathogenese des SLE	19
2.3.2 Spezielle Pathogenese der Lupusnephritis	21
2.4 PTP ζ und systemischer Lupus erythematoses.....	23
2.4.1 PTP ζ – Funktion und Struktur.....	23
2.4.2 PTP ζ im Lupus-Mausmodell	24
2.5 Behandlungsstrategien	26
2.5.1 Pharmakotherapie	27
2.5.2 Nicht-pharmakologische, präventive und supportive Maßnahmen....	31
2.6 Prognose	33
2.7 Lupus-Mausmodell	33
2.7.1 MRL/ <i>lpr</i> -Mausstamm	34
2.7.2 Haltung der Versuchstiere	34
3 Material.....	36
3.1 Laborgeräte	36
3.2 Verbrauchsartikel.....	37
3.3 Chemikalien	38
3.4 Lösungen und Puffer	39
3.4.1 Fertiglösungen	39
3.4.2 Stammlösungen.....	39

3.4.3	Arbeitslösungen	40
3.5	Antikörper	42
3.6	Kulturmedien und Zusätze	42
3.7	Reagenzien-Kits	43
3.8	Software.....	43
4	Methoden	44
4.1	Zellbiologische Methoden	44
4.1.1	Gewinnung von humanen Proben	44
4.1.2	Gewinnung von murinen Proben	44
4.1.3	Isolation von mononukleären Zellen und Neutrophilen aus peripherem Blut	45
4.1.4	Zellzahlbestimmung.....	46
4.1.5	Isolation von murinen Milzzellen.....	47
4.1.6	Isolation von murinen Knochenmarkszellen	47
4.1.7	Anreicherung von Immunzellsubpopulationen durch magnetische Zellseparation (MACS)	48
4.1.7.1	Positive Selektion von humanen T- und B-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten	49
4.1.7.2	Negative Selektion von murinen naiven B-Lymphozyten ...	50
4.1.7.3	Negative Selektion von murinen Monozyten aus Knochenmarkszellen	51
4.1.8	<i>In-Vitro</i> -Differenzierung und Isolation von Makrophagen	51
4.2	Analytische Methoden	52
4.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Protein Assay....	52
4.2.2	Western Blot	52
4.2.2.1	Herstellung der Polyacrylamid-Gele für die SDS-PAGE	53
4.2.2.2	Vorbereitung der Proben	53
4.2.2.3	Auftrennung des Proteingemisches mittels Gel- Elektrophorese	54
4.2.2.4	Transfer der Proteine auf eine Membran	54
4.2.2.5	Ladekontrolle.....	55
4.2.2.6	Membranfärbung	55
4.2.2.7	Proteindetektion	56
4.2.2.8	Chemolumineszenz und Bildentwicklung	57
4.2.2.9	Datenanalyse	58

5	Ergebnisse	59
5.1	PTP ζ -Expression in humanen Immunzellen im Western Blot.....	59
5.2	Veränderung der PTP ζ -Expression in humanen Immunzellen	60
5.3	PTP ζ -Expression in murinen Immunzellen im Western Blot.....	65
5.4	Korrelation der PTP ζ -Expression mit der Krankheitsaktivität im Mausmodell	66
6	Diskussion	69
6.1	Stellenwert des MRL/ <i>lpr</i> -Mausmodells	69
6.2	PTP ζ -Expressionsanalyse in der Maus und im Menschen.....	70
6.3	Grenzen der experimentellen Umsetzung	75
6.4	Ausblick	75
7	Zusammenfassung	77
8	Literaturverzeichnis	78
9	Danksagung	IX
10	Lebenslauf	X

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AA	Acrylamid
a β 2-GPI	Anti- β 2-Glykoprotein 1
Abb.	Abbildung(en)
ACK	Ammoniumchlorid-Kalium
aCL	Anti-Cardiolipin
ACLE	Akut kutaner Lupus erythematodes
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AIHA	Autoimmunhämolytische Anämie
Ak	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
aPL	Anti-Phospholipid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AZA	Azathioprin
BAFF	B-Zell-aktivierender Faktor
BLyS	B-Lymphozyten-Stimulator
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CCLE	Chronisch kutaner Lupus erythematodes
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CLE	Kutaner Lupus erythematodes
cm	Zentimeter
CSF-1	<i>Colony-stimulating factor 1</i>
d	dezi-
Da	Dalton
ddH ₂ O	Zweifach destilliertes Wasser
DDT	Dithiothreitol
DILE	Medikamenten-induzierter Lupus erythematodes
DLE	Diskoider Lupus erythematodes
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dsDNS	Doppelstrang-DNS

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENA	Extrahierbare nukleäre Antikörper
Et al.	<i>et alii</i>
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
G	Gauge
g	Gramm
h	Stunde(n)
HCQ	Hydroxychloroquin
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
ICLE	Intermittierend kutaner Lupus erythematoses
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
I/R	Ischämie/Reperfusion
k	kilo-
Kap.	Kapitel
Konz.	Konzentration
l	Liter
LA	Lupus-Antikoagulans
LN	Lupusnephritis
lpr	Lymphoproliferation
m	milli-
μ	mikro-
M	Molar
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MRL	<i>Murphy Roths Large</i>
MTX	Methotrexat
n	nano-
NLE	Neonataler Lupus erythematoses
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBLs	Periphere Blutleukozyten
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

pH	<i>Pondus hydrogenii</i>
PTP(s)	Protein-Tyrosin-Phosphatase(n)
RIPA-Puffer	Radio-Immunpräzipitationsassay-Puffer
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RTX	Rituximab
s.	siehe
SCLE	Subakut kutaner Lupus erythematoses
sec	Sekunde(n)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
sog.	so genannte
Tab.	Tabelle(n)
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TBS/T	TBS mit Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEZ	Tubulusepithelzellen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
O/N	<i>Over night</i>
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Chemische Elemente wurden mit den definierten Buchstaben abgekürzt. Bei einigen Bezeichnungen wurden die englischen Fachtermini beibehalten, weil in der deutschsprachigen Fachliteratur eine Übersetzung dieser Begriffe unüblich oder unzureichend ist.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Schematischer Aufbau von PTP ζ im Menschen	24
Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Interaktion von CSF-1 und IL-34 mit ausgewählten Rezeptoren	26
Abb. 4-1: Mausalter zum Zeitpunkt der Probengewinnung	45
Abb. 4-2: Auftrennung der Zellsuspension mittels Dichtegradientenzentrifugation ...	46
Abb. 4-3: Ausgewählte Immunzellen und ihre spezifischen Oberflächenmoleküle ...	48
Abb. 4-4: Schematische Darstellung der in-vitro-Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen	52
Abb. 5-1: PTP ζ -Expression in humanen Immunzellpopulationen auf Proteinebene.....	59
Abb. 5-2: PTP ζ -Expression in humanen PBLs	61
Abb. 5-3: PTP ζ -Expression in humanen T-Zellen	61
Abb. 5-4: PTP ζ -Expression in humanen B-Zellen	62
Abb. 5-5: PTP ζ -Expression in humanen Monozyten	63
Abb. 5-6: PTP ζ -Expression in humanen Makrophagen.....	64
Abb. 5-7: PTP ζ -Expression in humanen Granulozyten	64
Abb. 5-8: PTP ζ -Expression in murinen Immunzellpopulationen.....	66
Abb. 5-9: PTP ζ -Expression in murinen T-Zellen	67
Abb. 5-10: PTP ζ -Expression in murinen B-Zellen	67
Abb. 5-11: PTP ζ -Expression in murinen Monozyten	68

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Mögliche klinische Symptome beim SLE	4
Tab. 2-2: Prävalenz und Bedeutung von Autoantikörpern beim SLE	6
Tab. 2-3: ACR-Klassifikationskriterien für die Diagnose des SLE	7
Tab. 2-4: EULAR-Klassifikationskriterien für die Diagnose des SLE.....	9
Tab. 2-5: WHO-Klassifikation der Lupusnephritis.....	15
Tab. 2-6: Aktivitäts- und Chronizitätsindex bei Lupusnephritis.....	16
Tab. 2-7: SASKIA-Basismaßnahmen	27
Tab. 4-1: Volumina für die magnetische Zellseparation von humanen T- und B- Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten.....	50
Tab. 4-2: Volumina für die magnetische Zellseparation von murinen T- Lymphozyten.....	50
Tab. 4-3: Volumina für die magnetische Zellseparation von murinen B- Lymphozyten.....	50
Tab. 4-4: Volumina für die magnetische Zellseparation von murinen Monozyten.....	51
Tab. 4-5: Zusammensetzung des Trenngels	53
Tab. 4-6: Zusammensetzung des Sammelgels	53
Tab. 4-7: Herstellung der Primärantikörperlösung.....	57
Tab. 4-8: Herstellung der Sekundärantikörperlösung	57

1 Einleitung und Zielsetzung

Beim systemischen Lupus erythematoses (SLE) handelt es sich um eine chronische, entzündliche Fehlregulation des Immunsystems mit einer komplexen Ätiologie und Pathogenese, die bis heute nicht gänzlich verstanden ist. Sie basiert im Wesentlichen auf einer Fehlfunktion des Immunsystems, durch die körpereigene Komponenten als fremde Antigene erkannt werden. Autoantikörper und Immunkomplexablagerungen triggern dann eine systemische Entzündung. Das Zusammenspiel von genetischen und umweltbedingten Faktoren führt in Kombination mit der unterschiedlichen Empfindlichkeit der einzelnen Organe zu einem variablen klinischen Erscheinungsbild. Dieses kann von einer moderaten Krankheitsaktivität bis hin zu einer rasch progredienten, potenziell lebensbedrohlichen Erkrankung reichen. Das weibliche Geschlecht ist hierbei deutlich häufiger betroffen. Bei einem Großteil der Patienten tritt eine renale Organbeteiligung im Sinne einer Lupusnephritis auf, die einen entscheidenden Beitrag zur erhöhten Morbidität und Mortalität von SLE-Patienten liefert. Selbst unter optimaler Therapie entwickelt etwa ein Viertel der Patienten mit Lupusnephritis eine dialysepflichtige Niereninsuffizienz. Die aktuelle Standardtherapie umfasst verschiedene Substanzgruppen, von denen die meisten unspezifisch, nebenwirkungsreich und teilweise sogar toxisch sind. In den vergangenen Jahrzehnten gab es kaum nennenswerte Neuzulassungen, die als spezifische Therapeutika Einzug in den klinischen Alltag gefunden haben. Daher besteht ein enormer Bedarf, auf Grundlage des stetig wachsenden Wissens um immunologische Zusammenhänge, neue, zielgerichtete und verträgliche Therapiestrategien zu erschließen, die eine auf den Patienten zugeschnittene, individualisierte Behandlung ermöglichen. Hierfür ist die Identifikation neuer therapeutischer Angriffspunkte nötig, die an der Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses und der Lupusnephritis beteiligt sind.

Von zentraler Bedeutung bei der Entstehung der Lupusnephritis sind Immunzellen, vor allem Monozyten und Makrophagen, die eine destruoierende, entzündliche Reaktion hervorrufen können und mit Tubulusepithelzellen interagieren. Das Ausmaß der Entzündung im renalen Interstitium ist ein entscheidender Prädiktor für das klinische Outcome bei SLE-Patienten mit chronischer Nierenerkrankung. Die genannten Zellen exprimieren im Rahmen der Entzündungsreaktion CSF-1 und IL-34, zwei Chemokine und Überlebensfaktoren für Monozyten und Makrophagen. Sowohl CSF-1 als auch IL-

34 beeinflussen Monozyten und Makrophagen, indem sie mit dem CSF-1-Rezeptor interagieren. Es konnte kürzlich ein weiterer Rezeptor identifiziert werden, der auch von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird und an welchen IL-34, aber nicht CSF-1 bindet: PTP ζ . Hierbei handelt es sich um eine Rezeptor-ähnliche Protein-Tyrosin-Phosphatase. Daher liegt dieser Arbeit die Frage zugrunde, ob PTP ζ insbesondere bei renaler Beteiligung als ein Schlüsselmolekül infrage kommt. Mithilfe analytischer Verfahren soll das Expressionsmuster von PTP ζ identifiziert werden. Dazu wird im ersten Schritt dessen Vorkommen in Leukozytenpopulationen von MRL/lpr-Mäusen (einem Mausmodell für die Untersuchung der Lupusnephritis) unterschiedlicher Altersstufen mittels Western Blot untersucht. Anschließend soll quantifiziert werden, ob es im Mausmodell zu einer Änderung der PTP ζ -Expression in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität kommt. Ein weiteres Ziel ist es zu überprüfen, ob die aus dem Mausmodell gewonnen Erkenntnisse auf den Menschen übertragbar sind. Als Vergleich dient die Identifikation der PTP ζ -Expression in Leukozytenpopulationen bei Patienten mit SLE und bioptisch gesicherter Lupusnephritis und bei gesunden Kontrollen. Diese grundlegenden Erkenntnisse um PTP ζ können die Möglichkeit bieten, Hinweise für eine spezifische Therapieoption für den systemischen Lupus erythematodes oder die Lupusnephritis aufzudecken, beispielsweise im Rahmen einer medikamentösen Blockade von PTP ζ oder dessen Liganden.

Ausschließlich zum Zweck der besseren Lesbarkeit wird auf die geschlechtsspezifische Schreibweise verzichtet. Alle personenbezogenen Bezeichnungen in dieser Dissertation sind selbstverständlich geschlechtsneutral zu verstehen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Systemischer Lupus erythematodes

Der systemische Lupus erythematodes ist eine komplexe Autoimmunerkrankung mit multifaktorieller Genese und vielfältigen klinischen Manifestationen. Herausragendes Merkmal ist die Produktion von Autoantikörpern, die gegen Kernantigene körpereigener Zellen gerichtet sind und zur Bildung von Immunkomplexen führen, die wiederum eine Gewebeentzündung und eine Zerstörung in verschiedenen Organen, einschließlich der Nieren, induzieren können (1).

2.1.1 Epidemiologie

Grundsätzlich kann ein systemischer Lupus erythematodes bei jedem Menschen auftreten. Bei Betrachtung des Alters, des Geschlechts und der ethnischen Zugehörigkeit der Betroffenen zeichnet sich jedoch ab, dass sich bestimmte epidemiologische Untergruppen im Hinblick auf die Inzidenz, die Prävalenz und die Krankheitsausprägung von der Allgemeinbevölkerung unterscheiden. Außerdem spielen geographische Aspekte eine Rolle, aus denen sich, bezogen auf Inzidenz und Prävalenz, regionale Unterschiede ergeben. Dies erlaubt die Annahme von genetischen und umweltbedingten Krankheitsauslösern (2). Mit Rückblick auf die vergangenen 40 Jahre des 20. Jahrhunderts hat sich die Inzidenz von SLE nahezu verdreifacht, wobei sich die Überlebensrate signifikant verbessert hat (3). Diese Befunde sind wahrscheinlich auf eine Kombination aus verbesserter Erkennung milder Erkrankungen und besseren Therapieoptionen zurückzuführen. Der systemische Lupus erythematodes tritt mit einer Geschlechtspräferenz auf, wobei Frauen unabhängig von der Altersklasse bevorzugt betroffen sind (4). Innerhalb des weiblichen Geschlechts können Inzidenz und Prävalenz mitunter stark zwischen den Ethnien variieren. Dies zeigen beispielhaft Daten aus den USA. Die in einer Untersuchung ermittelten Prävalenzraten pro 100.000 schwanken zwischen 164 bei weißen und 406 bei afroamerikanischen Frauen (5). Die meisten Neuerkrankungen finden sich bei Frauen durchschnittlich in einem Alter zwischen 15 und 44 Jahren mit der höchsten Prävalenz bei 45- bis 64-Jährigen (6). Zwar sind Männer und Kinder im Allgemeinen seltener betroffen, jedoch verläuft der systemische Lupus erythematodes in beiden Fällen tendenziell schwerer (2, 7). Aus einer Datenerhebung in Deutschland von 2002 geht eine Gesamtprävalenz von 36,7 Fällen pro 100.000 Einwohner mit

einem Verhältnis zwischen Männern und Frauen von etwa 1:4 im Altersdurchschnitt hervor (8). Im Vergleich zu anderen ethnischen Gruppen leiden Europäer und ihre Nachkommen seltener an einem SLE und die Erkrankung verläuft in der Regel milder (2). In Europa beträgt die Inzidenzrate von SLE in der Gesamtbevölkerung 3,3 bis 4,8 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr (9).

2.1.2 Symptomatik und Diagnostik

Die Bandbreite von klinischen Symptomen reicht von leichten konstitutionellen Symptomen bis zu aggressiven Verläufen mit multiplem Organbefall. Darüber hinaus kann die Krankheitsaktivität stark schwanken, wobei sich bei den meisten Betroffenen Krankheitsschübe und Remissionsperioden abwechseln. Die am häufigsten berichteten Symptomen sind isoliert betrachtet unspezifischer Natur (s. Tab. 2-1). Was eine eindeutige Diagnosestellung erschwert, ist einerseits das Fehlen von obligaten Symptomen und andererseits die unterschiedliche Kombination von Symptomen. Daher ist ein interdisziplinäres Vorgehen gefragt. Aus der Zusammenschau von klinischem Bild und der Laborkonstellation ergeben sich weiterführende Hinweise.

Symptom	Häufigkeit
Arthralgien	85 %
Allgemeinsymptome	84 %
Hautveränderungen	81 %
Nierenbefunde	77 %
Arthritis	63 %
Raynaud-Syndrom	58 %
ZNS-Symptome	54 %
Schleimhautveränderungen	54 %
Gastrointestinale Beschwerden	47 %

Tab. 2-1: Mögliche klinische Symptome beim SLE

Die Tabelle zeigt einen Ausschnitt möglicher Symptome, die im Verlauf des systemischen Lupus erythematoses auftreten können, sortiert nach ihrer Häufigkeit. Modifiziert nach Fischer-Betz et al. (10).

Um ein Krankheitsbild definieren und behandeln zu können, ist die Erfüllung von krankheitstypischen Kriterien notwendig. Eine Fehldiagnose kann im Fall des potenziell lebensbedrohlichen systemischen Lupus erythematoses starke negative Auswirkungen auf die Patientengesundheit haben, unter anderem durch eine unangemessene Behandlung mit nebenwirkungsreichen Medikamenten (11). Im

Gegensatz dazu können auch Verzögerungen einer notwendigen Therapie irreversible Schäden hervorrufen. Allem voran stehen die sorgfältige Erhebung der Anamnese, einschließlich der Medikamentenanamnese, sowie eine vollständige körperliche Untersuchung. Zusätzlich fließen Labortests und mögliche Differenzialdiagnosen in die Bewertung ein. In diesem Zusammenhang hat sich die Bestimmung der Nierenretentionsparameter zusammen mit einer Urinanalyse einschließlich Urinsediment als sinnvoll erwiesen. Ergänzt wird diese Untersuchung um einen Antikörpersuchtest auf antinukleäre Antikörper (ANA). Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von Antikörpern, die gegen Zellkernantigene gerichtet sind (s. Tab. 2-2). Das Vorhandensein dieser Autoantikörper ist ein typisches Merkmal mehrerer Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Der Befund fällt bei 98 % der SLE-Patienten positiv aus (12). Auch bei großen Teilen der Allgemeinbevölkerung konnten ANA nachgewiesen werden, wodurch dieser Parameter vergleichsweise unspezifisch ist (13). Ein positives Screening erfordert eine weitere Differenzierung der Autoantikörperspezifität. Weitere Untersuchungen, wie eine Bildgebung oder zusätzliche Laborparameter können notwendig sein, wenn dies durch Symptome oder klinische Befunde angezeigt ist.

Antikörper	Prävalenz	Klinische Bedeutung
ANA	98 %	Bester Screening-Test, mehrfach negative Tests machen einen SLE unwahrscheinlich
Anti-dsDNS	70 %	Hohe Titer sind SLE-spezifisch und korrelieren bei einigen Patienten mit der Krankheitsaktivität
ENA		
Anti-Sm	25 %	Spezifisch für SLE, keine definierte klinische Korrelation, häufiger bei Afroamerikanern und Asiaten als bei Kaukasiern
Anti-Ro	30 %	Unspezifisch für SLE, assoziiert mit anderen Lupus-Formen, wie ACLE oder NLE, Vermindertes Risiko für Nephritis
Anti-La	10 %	Normalerweise mit Anti-Ro assoziiert, Vermindertes Risiko für Nephritis
Anti-Histon	70 %	Häufiger bei Arzneimittel-induziertem Lupus als bei SLE
aPL	50 %	Prädisposition für Thrombophilie, Thrombopenie und Aborte

Tab. 2-2: Prävalenz und Bedeutung von Autoantikörpern beim SLE

Die Tabelle zeigt einen Auszug möglicher Autoantikörper, die im Rahmen der SLE-Diagnostik laborchemisch bestimmt werden und so eine Verdachtsdiagnose untermauern können. Modifiziert nach Müller-Ladner (12).

Ein weit verbreitetes Klassifikationssystem zur Diagnose des systemischen Lupus erythematoses basiert auf den Kriterien des *American College of Rheumatology* (ACR) in der 1997 revidierten Fassung (14). Hierbei werden klinische und laborchemische Komponenten berücksichtigt, jedoch ohne gesonderte Gewichtung (s. Tab. 2-3). Vier oder mehr der insgesamt elf Kriterien müssen während eines beliebigen Beobachtungszeitraumes (gleichzeitig oder seriell) erfüllt sein, um formal die Diagnose SLE zu stellen.

Kriterium	Definition
1. Schmetterlingserythem	Flaches oder erhabenes Erythem, das symmetrisch über Nasenrücken, Jochbein- und Wangenregion und unter Aussparung der Nasolabialfalten verläuft
2. Diskoider Lupus	Erythematöse Flecken mit adhärenter Keratose, (in älteren Läsionen) atrophe Narben
3. Photosensibilität	Hautausschlag, der als Folge einer ungewöhnlichen Reaktion auf Sonnenlicht auftritt, in der Anamnese oder im Verlauf
4. Schleimhautulzerationen	meist schmerzlose Ulzerationen im Mund- und Nasen-Rachen-Raum
5. Nicht-erosive Arthritis	Befall von mindestens zwei peripheren Gelenken, in Kombination mit Schmerzen, Schwellung oder Erguss
6. Serositis	Pleuritis, nachgewiesen durch pleuritische Schmerzen in der Anamnese, Pleurareiben oder Pleuraerguss <u>oder</u> Perikarditis mit dokumentierten Reibegeräuschen, Perikarderguss oder elektrokardiografischem Befund
7. Nierenfunktionsstörung	anhaltende Proteinurie von $\geq 0,5$ g/d <u>oder</u> Zylindrurie <u>oder</u> Hämaturie (Erythrozyt- oder Hämoglobinurie)
8. ZNS-Beteiligung	Krampfanfälle <u>oder</u> Psychosen, die weder durch Medikamente noch durch Stoffwechselstörungen erklärbar sind
9. hämatologische Befunde	Hämolytische Anämie mit Retikulozytose <u>oder</u> 2-malige Leukopenie $< 4.000/\mu\text{l}$ <u>oder</u> 2-malige Lymphopenie $< 1.500/\mu\text{l}$ <u>oder</u> Thrombopenie $< 100.000/\mu\text{l}$, die nicht durch Medikamente erklärbar ist
10. Immunologische Befunde	dsDNS-Ak <u>oder</u> Sm-Ak <u>oder</u> Anti-Phospholipid-Ak
11. ANA	Nachweis eines abnormalen ANA-Titers in der Immunfluoreszenz oder in einem äquivalenten Test zu einem beliebigen Zeitpunkt, der nicht durch Arzneimittel erklärbar ist

Tab. 2-3: ACR-Klassifikationskriterien für die Diagnose des SLE

Die Tabelle zeigt das ACR-Klassifikationssystem von 1982 unter Berücksichtigung der Revision von 1997 (14, 15). Für die Diagnose eines SLE müssen mindestens vier der elf Kriterien gleichzeitig oder seriell vorliegen.

Im Jahr 2018 wurden beim Jahreskongress der EULAR (*European League Against Rheumatism*) neue Klassifikationskriterien für den SLE von einer großen internationalen Expertengruppe vorgestellt (16, 17). Durch die Neuerungen soll zukünftig die diagnostische Sicherheit verbessert werden. Als Eingangskriterium gilt ein Antikörpersuchtest, der bei einem ANA-Titer $\geq 1:80$ im Serum in der HEp-2-Immunfluoreszenz als positiv zu bewerten ist. Die Entscheidung erfolgt dann anhand der 21 charakteristischen Kriterien, die in sieben klinische und drei immunologische Domänen gegliedert sind (s. Tab. 2-4). Innerhalb dieser Domänen werden die Kriterien durch Punktwerte unterschiedlich stark gewichtet. Bei mindestens zehn Punkten kann die Diagnose SLE gestellt werden. Im Vergleich zu den bereits etablierten ACR-Diagnosekriterien wiegt neuerdings eine bioptisch gesicherte Lupusnephritis schwerer und kann, in Abhängigkeit vom Schweregrad (Klasse III oder IV), als alleiniges SLE-Diagnosekriterium gelten.

Klinische Domänen und Kriterien		
konstitutionelle Symptome	Fieber	2
Haut	nicht vernarbende Alopezie <u>oder</u> orale Ulzera	2
	SCLE <u>oder</u> DLE	4
	ACLE	6
Arthritis	Synovitis in \geq zwei Gelenken <u>oder</u> Druckschmerz in \geq zwei Gelenken mit Morgensteife \geq 30 min	6
Neurologie	Delirium	2
	Psychose	3
	Anfälle	5
Serositis	Pleura- <u>oder</u> Perikarderguss	5
	Akute Perikarditis	6
Hämatologie	Leukopenie	3
	AIHA <u>oder</u> Thrombopenie	4
Nieren	Proteinurie \geq 0,5 g/24 h	4
	Klasse-II/V-Nephritis	8
	Klasse-III/IV-Nephritis	10
Immunologische Domänen und Kriterien		
aPL	aCL <u>oder</u> a β 2-GPI <u>oder</u> LA	2
Komplement	C3 <u>oder</u> C4 vermindert	3
	C3 <u>und</u> C4 vermindert	4
Hochspezifische Auto-Ak	Anti-Sm <u>oder</u> Anti-dsDNS	6

Tab. 2-4: EULAR-Klassifikationskriterien für die Diagnose des SLE

Die Tabelle zeigt die neuen EULAR-Einstufungskriterien von 2018 (18). Die Kriterien dürfen für die Punktevergabe nur berücksichtigt werden, wenn eine andere Ursache unwahrscheinlicher ist als ein SLE. Außerdem müssen die Kriterien nicht gleichzeitig auftreten. Es wird nur das am höchsten bewertete Kriterium einer Domäne in die Gesamtpunktzahl einbezogen.

Ein weiteres diagnostisches Hilfsmittel beim SLE ist ein Vergleich von Hautbiopsien befallener und klinisch unauffälliger Haut mittels Fluoreszenzmikroskopie. Dieser sogenannte Lupusbandtest ist bei SLE-Patienten sowohl in der läsionalen Haut und oft auch in der makroskopisch gesunden Haut positiv, nicht dagegen bei rein kutanen Formen (19). In der direkten Fluoreszenzmikroskopie finden sich bandförmige Ablagerungen von Immunkomplexen entlang der Basalmembran betroffener Haut. Um die Krankheitsaktivität und den Schaden anhand objektiver Kriterien abschätzen zu können, wurden in der Vergangenheit mehrere Scoring-Systeme etabliert (20). Mithilfe eines dieser standardisierten und validierten Instrumente wird eine jährliche Verlaufsbeurteilung empfohlen (21). Im Rahmen der Erprobung neuartiger Therapien dienen die Scores auch der Bewertung einer Verbesserung oder Verschlechterung der

Erkrankung (22). Neben dem in Deutschland üblichen ECLAM-Score (*European Consensus Lupus Activity Measurement*) von 1992 gibt es den 1986 entwickelten SLEDAI (*Systemic Lupus erythematoses Disease Activity Index*) (23-25). Beide Scores werden durch den Untersucher erhoben und messen anhand klinischer Befunde und Laborparameter irreversible Veränderungen, die nicht nur auf den SLE selbst zurückzuführen sind, sondern auch auf begleitende Erkrankungen. Hierfür wurden Deskriptoren definiert, die in Gruppen zusammengefasst und durch Punktwerte in ein Verhältnis gesetzt wurden.

2.1.3 Verlaufs- und Sonderformen

Neben dem systemischen Lupus erythematoses existieren weitere Lupusformen. Nachfolgend wird ein kurzer Überblick über die wesentlichen Verlaufsformen und typische Erkennungsmerkmale gegeben.

Kutaner Lupus erythematoses (CLE)

Die seit 2004 in Deutschland übliche Klassifikation des CLE differenziert vier Entitäten: den akuten kutanen Lupus erythematoses (ACLE), den subakuten kutanen Lupus erythematoses (SCLE), den chronisch-kutanen Lupus erythematoses (CCLE) und den intermittierenden kutanen Lupus erythematoses (ICLE) (26). Die Diagnose der verschiedenen Hauptformen basiert auf histologischen, klinischen, serologischen und genetischen Befunden. Eine Transformation in eine moderate Form des SLE ist prinzipiell bei jeder kutanen Verlaufsform möglich. Die Inzidenz von CLE liegt bei rund vier Betroffenen pro 100.000 Einwohnern und Jahr, basierend auf einer Studie mit über 1.000 Patienten (9). Ein ACLE manifestiert sich typischerweise ab dem 30. Lebensjahr und wird häufig mit einer hohen Krankheitsaktivität beim SLE in Verbindung gebracht (27). Der ACLE kann lokalisiert oder generalisiert auftreten. Inspektorisch bietet sich ein Schmetterlingserythem, das symmetrisch über den Nasenrücken und die Wangenregion verläuft und die Nasolabialfalten ausspart. Bei der generalisierten Form kann das gesamte Integument inklusive der Mundschleimhäute betroffen sein. Die Effloreszenzen heilen im Normalfall ohne Narbenbildung ab, allerdings ist eine vorübergehende Hyperpigmentierung möglich. Immunologisch finden sich bei über 80 % der ACLE-Patienten hohe ANA-Titer sowie eine hohe Inzidenz von Antikörpern gegen dsDNA und Anti-Sm-Antikörper (28). Der SCLE nimmt eine Mittelstellung zwischen CLE und SLE ein. Betroffen sind vor allem junge Frauen und Frauen

mittleren Alters (27). Bei der klinischen Untersuchung zeigen sich einzelne Plaques mit Schuppung und zentraler Ablassung, bis hin zu psoriasiformen Befallsmustern. Die SCLE-Läsionen treten symmetrisch insbesondere in Sonnenlicht-exponierten Arealen auf, wie Dekolté, oberer Rücken, Streckseite von Armen und Unterarmen. Das Gesicht und die Kopfhaut hingegen bleiben regelhaft verschont. Die kutanen Läsionen heilen ohne Narbenbildung ab. Patienten mit SCLE haben gewöhnlich leichte systemische Begleitsymptome, am häufigsten Arthritis und Myalgien, während schwere systemische Symptome selten auftreten (29). In etwa 80 % der Fälle finden sich ANA, Antikörper gegen dsDNS und Anti-Sm-Antikörper kommen selten bis gar nicht vor (28). Der CCLE beinhaltet drei weitere Subtypen: den diskoiden Lupus erythematoses (DLE), den Lupus erythematoses profundus und den Chilblain-Lupus erythematoses. Unter den verschiedenen Subtypen ist der DLE die häufigste Manifestation (30). Die lokalisierte Form tritt deutlich häufiger auf und betrifft die behaarte Kopfhaut und das Gesicht. Die disseminierte Form kann zusätzlich den oberen Körperstamm sowie die Arme einschließen. Pathognomonisch sind scheibenförmige, erythematöse und scharf begrenzte keratotische Plaques. Im Verlauf neigen die DLE-Plaques zu Vernarbung und trophischen Störungen. Auch die Haarfollikel werden irreversibel geschädigt, wodurch es zu diffus-vernarbendem Haarausfall im Bereich der behaarten Kopfhaut, der Augenbrauen und bei Männern im Bartbereich kommen kann. Serologisch weisen CCLE-Patienten im Vergleich zu anderen CLE-Subtypen eine geringere Inzidenz von ANA sowie Anti-dsDNS- und Anti-Sm-Antikörpern auf (28). Der Lupus erythematoses Tumidus (LET) wird zum ICLE gezählt. Während alle anderen Subtypen bevorzugt Frauen betreffen, tritt diese Form vermehrt bei Männern auf (30). Die Hauterscheinungen finden sich klassischerweise in lichtexponierten Arealen. LET-Läsionen sind Urtikaria-ähnliche, erythematöse Plaques mit glatter Oberfläche ohne Beteiligung der Epidermis. Wie der Name sagt, verläuft der ICLE wechselhaft mit der Möglichkeit einer spontanen Rückbildung ohne Pigmentierungsstörungen oder Narben.

Neonataler Lupus erythematoses (NLE)

Der neonatale Lupus erythematoses ist ein Krankheitsbild, das neugeborene Kinder in seltenen Fällen betreffen kann. Auslösende Faktoren sind die IgG-Autoantikörper Anti-Ro beziehungsweise Anti-La im mütterlichen Blutkreislauf, die über die Plazenta auf den Fötus übertragen werden (31). Dabei ist es unerheblich, ob die Mutter als Trägerin selbst an einer Autoimmunerkrankung wie SLE leidet oder klinisch völlig

gesund ist (32). Der NLE ist vor allem durch die Lupus-typischen kutanen Manifestationen geprägt. Hämatologische Komplikationen, wie hämolytische Anämie, Thrombopenie oder Leukopenie und eine Beteiligung des hepatobiliären Systems sind möglich, aber selten. Für gewöhnlich bilden sich diese Symptome in den ersten sechs Lebensmonaten parallel zum Abbau der maternalen Autoantikörper im Blutkreislauf des Kindes zurück (33). Eine gefürchtete und meist irreversible Komplikation ist der kongenitale AV-Block, der mit einer Prävalenz von 2 % auftritt (34). Im Falle eines kongenitalen AV-Blocks liegt die Letalität bei etwa 20 %; zwei Drittel der betroffenen Kinder sind auf einen permanenten Herzschrittmacher angewiesen (35).

Medikamenten-induzierter Lupus erythematodes (DILE)

Der Medikamenten-induzierte Lupus erythematodes ist ein Lupus-ähnliches Syndrom, das im zeitlichen Zusammenhang mit der Einnahme bestimmter Medikamente auftreten kann. Hierbei kommt es zu Symptomen, die an einen SLE erinnern, aber vergleichsweise mild ausgeprägt sind. Im Wesentlichen sind dies Arthralgien, Myalgien, Pleuritis und Fieber (36). Eine Reihe von Präparaten wird mit diesem Subtyp in Verbindung gebracht. Zu den Medikamenten mit dem höchsten Risiko zählen das Antiarrhythmikum Procainamid (15-20 %) und das Antihypertensivum Hydralazin (5-8 %) (37). Verschiedene Mechanismen zur Induktion eines DILE werden diskutiert. Im Labor können typischerweise ANA und Anti-Histon-Antikörper nachgewiesen werden, während Antikörper gegen dsDNS und ENA selten vorkommen (37). Diese Laborkonstellation kann bei der differentialdiagnostischen Abgrenzung zum klassischen SLE hilfreich sein, da im akuten Schub typischerweise Antikörper gegen dsDNS erhöht sind. In aller Regel ist ein DILE selbstlimitierend und es kommt zur vollständigen Rückbildung der Beschwerden nach Erkennen und Absetzen des ursächlichen Medikaments.

2.2 Organmanifestationen

Der systemische Lupus erythematodes kann jedes Organ betreffen, sodass das klinische Erscheinungsbild von Patient zu Patient sehr unterschiedlich ausfällt. Organmanifestationen beeinflussen die Prognose beim Lupus-Patienten in hohem Maße. Aus diesem Grund ist eine frühzeitige Erkennung entscheidend, um irreversible Schäden möglichst lange hinauszuzögern.

2.2.1 Nierenbeteiligung

Eine renale Beteiligung findet sich beim SLE häufig und wird in etwa der Hälfte der Fälle klinisch manifest (38). Etwa 10 % der Patienten mit Lupusnephritis entwickeln eine dialysepflichtige Niereninsuffizienz (38). Die Lupusnephritis ist ein typischer Vertreter einer Immunkomplexnephritis mit einem variablen klinischen Verlauf. So reichen die Befunde von einer asymptomatischen Proteinurie bis zur rasch progredienten Glomerulonephritis mit Ausfall der gesamten Nierenfunktion (39). Verglichen mit einer Pyelonephritis ist eine Glomerulonephritis nicht schmerzhaft, was die Gefahr einer verzögerten Diagnosestellung erhöhen kann (10). Eine perkutane Nierenbiopsie ist das Mittel der ersten Wahl, um die Art und das Ausmaß einer Nierenbeteiligung zu erfassen. Die klinischen und laborchemischen Befunde wie Serum-Kreatinin und Urinstatus lassen für sich betrachtet häufig keinen eindeutigen Schluss auf das histologische Ausmaß einer Nierenbeteiligung zu. Die Indikation für eine Nierenbiopsie gilt als gestellt, sobald sich beim Lupus-Patienten Anzeichen einer renalen Beteiligung finden (40, 41). Hierzu zählen eine reproduzierbare Proteinurie von $\geq 0,5$ g pro Tag, insbesondere bei gleichzeitiger glomerulärer (dysmorpher) Hämaturie. Anstelle der Proteinbestimmung im 24-Stunden-Sammelurin kann auch ein Protein-Kreatinin-Quotient $> 0,5$ im Spontanurin treten. Bei Nachweis einer Proteinurie von > 300 mg sollte eine Biopsie unverzüglich eingeleitet werden, da die zeitnahe Sicherung der Diagnose mit Einleitung einer adäquaten Therapie das renale Outcome nachweislich verbessert (42). Ein weit verbreitetes Klassifizierungssystem unterteilt die glomerulären Läsionen im Rahmen einer Lupusnephritis in verschiedene histologische Subtypen (s. Tab. 2-5) (43). Basierend auf dem Ergebnis des biopsisch gewonnenen Nierengewebes erfolgt die Einstufung in eine der sechs Klassen. Prognose und Behandlung variieren zwischen den einzelnen Subtypen. Offenbar sind bei bestimmten Klassen der Lupusnephritis Transformationen während eines Schubes in ein histologisches Muster höheren Grades nicht selten, was eine Wiederholung der Biopsie notwendig machen kann (44).

WHO-Klasse	Art der glomerulären Läsion	Häufigkeit
I	Minimale mesangiale Lupusnephritis Lichtmikroskopisch normale Glomeruli, jedoch mesangiale Akkumulation von Immunkomplexen in der Immunfluoreszenz	< 1 %
II	Mesangial-proliferative Lupusnephritis Lichtmikroskopisch rein mesangiale Hyperzellularität beliebigen Ausmaßes oder mesangiale Matrixausdehnung mit Ablagerung mesangialer Immunkomplexe Möglicherweise isolierte subepitheliale oder subendotheliale Immunkomplexe, lediglich mittels Immunfluoreszenz oder Elektronenmikroskopie nachweisbar	26 %
III	Fokale Lupusnephritis Aktive oder inaktive fokale, segmentale oder globale endo- oder extrakapilläre Glomerulonephritis, die < 50 % aller Glomeruli betrifft, typischerweise mit fokalen subendothelialen Immunkomplexen, mit oder ohne mesangiale Veränderungen - III (A) Aktive Läsionen: fokal-proliferative LN - III (A/C) Aktive und chronische Läsionen: fokal-proliferative und sklerosierende LN - III (C) Chronisch-inaktive Läsionen mit glomerulären Narben: fokal-sklerosierende LN	18 %
IV	Diffuse Lupusnephritis Aktive oder inaktive diffuse, segmentale oder globale endo- oder extrakapilläre Glomerulonephritis, die ≥ 50 % aller Glomeruli betrifft, typischerweise mit diffusen subendothelialen Immunkomplexen, mit oder ohne mesangiale Veränderungen. Unterteilung der Klasse in eine diffus-segmentale LN (IV-S), wenn ≥ 50 % aller Glomeruli segmentale Läsionen zeigen, und eine diffus-globale LN (IV-G), wenn ≥ 50 % aller Glomeruli globale Läsionen aufweisen. - IV-S (A) Aktive Läsionen: diffus-segmental proliferative LN - IV-G (A) Aktive Läsionen: diffus-global proliferative LN - IV-S (A/C) Aktive und chronische Läsionen: diffus-segmental proliferative und sklerosierende LN - IV-G (A/C) Aktive und chronische Läsionen: diffus-global proliferative und sklerosierende LN - IV-S (C) Chronisch-inaktive Läsionen mit Narben: diffus-segmental sklerosierende LN	38 %

	- IV-G (C) Chronisch-inaktive Läsionen mit Narben: diffus-global sklerosierende LN	
V	Membranöse Lupusnephritis Lichtmikroskopisch globale oder segmentale subepitheliale Immunkomplexe, immunfluoreszenzoptisch oder elektronenmikroskopisch sichtbar, mit oder ohne mesangiale Veränderungen A: Assoziiert mit einer LN der WHO-Klassen III oder IV B: bei fortgeschrittener Sklerose	16 %
VI	Fortgeschrittene sklerotische Lupusnephritis ≥ 90 % der Glomeruli sind global sklerosiert und ohne Restaktivität	2 %

Tab. 2-5: WHO-Klassifikation der Lupusnephritis

Die Eingruppierung erfolgt anhand morphologischer Kriterien. Die Tabelle zeigt die revidierte Fassung von 2004 mit den entsprechenden Häufigkeitsangaben (43, 45).

Definitionen

Diffus: Eine Läsion betrifft mehr als 50 % der Glomeruli.

Fokal: Eine Läsion betrifft weniger als 50 % der Glomeruli.

Global: Eine Läsion betrifft mehr als 50 % eines Glomerulum.

Segmental: Eine Läsion betrifft weniger als 50 % eines Glomerulum.

Nach Entnahme ist für eine verlässliche Analyse des Gewebes eine optimale Konservierung und Weiterverarbeitung erforderlich (43). Für einen repräsentativen Befund muss die Biopsie mindestens zehn Glomeruli enthalten. Zum vollständigen histopathologischen Befund gehört außerdem eine immunhistochemische Beurteilung von IgG, IgA und IgM sowie κ - und λ -Leichtketten und den Komplement-Komponenten C3 und C1q. Ein anderes, häufig verwendetes Instrument für die Lupusnephritis ist der Aktivitäts- und Chronizitätsindex (s. Tab. 2-6), bei dem der Schweregrad anhand lichtmikroskopischer Merkmale klassifiziert wird (46, 47). Hier haben neben den glomerulären Läsionen vor allem auch interstitielle Veränderungen einen Stellenwert. In den vergangenen Jahren hat sich gezeigt, dass insbesondere auch die tubulo-interstitielle Veränderung prognosebestimmend sind und nicht nur die glomerulären Läsionen.

Aktive Läsionen	Punkte	Chronische Läsionen	Punkte
Glomeruläre Veränderungen			
Zelluläre proliferative Veränderungen	0-3	Glomerulumsklerose	0-3
Fibrinoide Nekrosen, Karyorrhexis	0-6	Fibröse Halbmonde	0-3
Hyaline Thromben	0-3		
Zelluläre Halbmonde	0-6		
Leukozyteninfiltration	0-3		
Tubulo-interstitielle Veränderungen			
Mononukleäre Zellinfiltration	0-3	Tubuläre Atrophie	0-3
		Interstitielle Fibrose	0-3
Aktivitätsindex	0-24	Chronizitätsindex	0-12

Tab. 2-6: Aktivitäts- und Chronizitätsindex bei Lupusnephritis

Die Tabelle zeigt ein weiteres Instrument, um den Schweregrad der Lupusnephritis zu beschreiben (46, 47). Dabei spielen glomeruläre und tubulo-interstitielle Läsionen eine Rolle, die mithilfe der Lichtmikroskopie klassifiziert werden.

Aus den histopathologischen Befunden leitet sich das therapeutische Vorgehen ab. Im akuten Schub ist eine Remissionsinduktion innerhalb der ersten sechs Monate das Ziel, da dies für das renale Outcome prognostisch wegweisend ist (48, 49). Eine partielle Remission ist als Reduktion der Proteinurie um 50 % und ein Anstieg des Serum-Kreatinins von < 25 % definiert, eine vollständige Remission als Proteinurie < 0,33 g pro Tag und ein Serum-Kreatinin von < 1,4 mg/dl (50). Das periodische Screening auf eine Nierenbeteiligung mithilfe von Urinalysen und eine Abschätzung der glomerulären Filtrationsrate bilden eine wichtige Komponente der laufenden Behandlung von SLE-Patienten (40, 41). Im Fall einer terminalen Niereninsuffizienz sind prinzipiell alle Nierenersatzverfahren möglich, jedoch birgt die Peritonealdialyse bei Patienten unter immunsuppressiver Therapie ein erhöhtes Risiko für Infektionen (40).

2.2.2 Weitere klinische Manifestationsformen

Gefäße

Eine Variante der Gefäß-Affektion beim systemischen Lupus erythematoses sind multiple Vaskulitiden. Je nach Größe des betroffenen Gefäßes und des betroffenen Organs weisen Patienten verschiedene klinische Erscheinungen auf (51). Während die Beteiligung kleiner Gefäße vor allem an der Haut und den Fingern sichtbar wird, kann eine entzündliche Beteiligung mittlerer und großer Gefäße zu schweren viszeralen Komplikationen mit einer Minderperfusion lebensnotwendiger Organe

führen. Durch die hauptsächlich beim SLE vorkommenden Anti-Phospholipid-Antikörper kann das Krankheitsbild weiter verkompliziert werden. Daraus ergibt sich für Betroffene ein erhöhtes Risiko für arterielle und venöse Thromben, was wiederum die Raten von Aborten sowie zerebralen und kardialen Verschlussereignissen erhöht (52).

Haut

Die Haut ist nach Gelenkbeteiligung das am zweithäufigsten betroffene Organ beim systemischen Lupus erythematoses (53). Auf der Basis von histologischen Kriterien werden Lupus-spezifische von Lupus-unspezifischen Läsionen abgegrenzt (54). Die Lupus-spezifischen Läsionen werden als kutaner Lupus erythematoses in einem eigenständigen Krankheitsbild zusammengefasst (s. Kap. 2.1.3). Zu den Lupus-unspezifischen Läsionen zählen beispielsweise die diffuse, nicht-vernarbende Alopezie (sog. „Lupus-Haar“), periunguale Teleangiektasien und das vasospastische Raynaud-Phänomen. Diese Hautbefunde sprechen nicht spezifisch für einen SLE, ihr Auftreten ist allerdings häufig mit diesem assoziiert (55). Das für den SLE klassische Schmetterlingserythem tritt nur bei etwa einem Drittel der Betroffenen im Verlauf auf (56).

Muskulatur, Knochen und Gelenke

Eine Beteiligung des Stütz- und Bewegungssystems findet sich beim systemischen Lupus erythematoses recht häufig, was für die Betroffenen eine Einschränkung der Lebensqualität bedeutet. Bis zu 95 % der Betroffenen entwickeln im Verlauf der Erkrankung muskuloskelettale Symptome, wie Myalgien und Arthralgien, die nicht zwangsläufig von äußerlichen Auffälligkeiten begleitet sein müssen (57). Durch Beteiligung des Sehnen- und Bandapparates kann es, ähnlich wie bei der rheumatoiden Arthritis, zu einer Morgensteifigkeit und Gelenkdeformitäten kommen. Dies wird als Jaccoud-Arthropathie bezeichnet. Der Befall ist normalerweise symmetrisch und polyartikulär. Prädilektionsstellen sind die Knie- und Handgelenke sowie die proximalen Interphalangealgelenke. Durch zum Teil hohe Glukokortikoiddosen haben SLE-Patienten ein erhöhtes Risiko für avaskuläre Knochennekrosen, die am häufigsten an der Hüfte lokalisiert sind (58). Darüber hinaus kann es aus verschiedenen Gründen zum gesteigerten Verlust der Knochendichte

kommen, woraus sich beim SLE ein höheres Risiko für Osteoporose und atraumatische Frakturen ergibt.

Gastrointestinaltrakt

Für Funktionsstörungen des Magen-Darm-Traktes ist nicht allein der systemische Lupus erythematodes verantwortlich, auch Medikamentennebenwirkungen und Infektionen aufgrund einer Immunsuppression stellen in diesem Fall einen relevanten Aspekt dar. Gastrointestinale Beschwerden können relativ harmlos ausgeprägt sein und sich als Übelkeit, Erbrechen, Dysphagie oder unspezifische Abdominalschmerzen manifestieren, aber auch deutlich gefährlicher ablaufen, beispielsweise in Form einer Serositis, akuten Pankreatitis oder mesenterialen Vaskulitis (59). Infektionen mit opportunistischen Erregern wie Candida-Mykosen stellen bei Patienten unter immunsuppressiver Therapie ein allgemein bekanntes Problem dar. Durch den Einsatz von nicht-steroidalen Antiphlogistika in Verbindung mit Glukokortikoiden sind Ulzerationen der Magen- und Duodenalschleimhaut zu bedenken.

Herz-Kreislauf-System

Eine Lupus-typische Herzmanifestation ist die Perikarditis, die bei symptomatischem Verlauf durch einen substernalen Brustschmerz und ein Reibegeräusch bei der Auskultation charakterisiert ist. Diese tritt, wie andere Serositiden, in der Regel bei zeitgleicher aktiver Beteiligung anderer Organe auf (60). Weitere Komplikationen sind Erkrankungen der Herzklappen, des Myokards oder der Koronararterien. So ist ein häufig gesehener Befund die abakterielle Endokarditis der Mitralklappe, die nach ihrem Erstbeschreiber Libman-Sacks benannt wurde. Im Fall einer Myokarditis ist schnelles Handeln erforderlich, um einen irreversiblen Schaden und eine mögliche Herzinsuffizienz abzuwenden. Auf der Basis einer rasch fortschreitenden Arteriosklerose haben SLE-Patienten ein höheres Risiko für akute kardiovaskuläre Ereignisse bereits in jungen Jahren (61).

Atmungsorgane

Etwa die Hälfte der Lupus-Patienten leidet im Laufe der Erkrankung an einer Beteiligung der Lunge, die entweder durch den SLE selbst oder oft auch durch eine infektiöse Ursache infolge einer Therapie mit Immunsuppressiva entsteht (62). Erste Anzeichen einer Lungen- oder Pleuraaffektion können Husten, Dyspnoe und

pleuritische Schmerzen sein. Charakteristisch für den SLE ist eine Pleuritis mit oder ohne Erguss, die gleichzeitig ein Merkmal der ACR-Klassifikationskriterien ist (14). SLE-bedingte interstitielle Lungenerkrankungen, eine pulmonale Hypertonie oder diffuse alveoläre Blutungen treten seltener auf, können jedoch zu beträchtlichen Folgeschäden führen.

Nervensystem

Neurologische Symptome beim systemischen Lupus erythematodes sind vielfältig und können sowohl das zentrale als auch das periphere Nervensystem betreffen (63). Dabei ist es grundsätzlich schwierig zu differenzieren, ob die Symptome durch den SLE selbst oder andere Umstände verursacht werden. Betroffene berichten von kognitiven Defiziten mit Beeinträchtigung der geistigen Aktivitäten und Merkfähigkeit. Nicht selten sind Neuropathien der Hirnnerven und peripheren Nerven sowie Gesichtsfeldausfälle und Augenmuskellähmungen.

Speichel- und Tränendrüsen

Der systemische Lupus erythematodes besitzt in vielerlei Hinsicht eine enge Verwandtschaft zum Sjögren-Syndrom, das ebenfalls zu den Autoimmunerkrankungen zählt (64). Durch eine chronische Entzündungsreaktion exokriner Drüsen und deren sukzessiver Zerstörung kommt es beim Sjögren-Syndrom zu einem Beschwerdebild, das als Sicca-Symptomatik bezeichnet wird. Betroffene berichten klassischerweise von Mundtrockenheit, Schluckbeschwerden und trockenen Augen bis hin zur Keratokonjunktivitis sicca als Folge einer gestörten Speichel- und Tränenbildung.

2.3 Ätiologie und Pathogenese

2.3.1 Ätiologie und Pathogenese des SLE

Die multifaktorielle und komplexe Genese des SLE ist das Resultat einer Interaktion zwischen einer Vielzahl von endogenen und exogenen Faktoren (65). Im Detail sind die pathophysiologischen Vorgänge noch unvollständig geklärt und Gegenstand aktueller Forschung. Bei Autoimmunerkrankungen sind Mechanismen gestört, die das immunologische Gleichgewicht zwischen der Abwehr körperfremder Stoffe und der Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen regulieren. Es wird angenommen, dass der Verlust der Selbsttoleranz ein wesentlicher Mechanismus bei der Entstehung von

Autoimmunität ist. Ausschlaggebend hierfür scheint der Prozess der T-Lymphozytenreifung und -differenzierung im Thymus zu sein, bei dem normalerweise funktionale T-Zellen erhalten bleiben (positive Selektion) und T-Zellen mit einer hohen Affinität zu körpereigenen Antigenen in die Apoptose übergehen (negative Selektion) (66).

In der Vergangenheit wurden mehrere (Suszeptibilitäts-)Gene mit Polymorphismen oder Mutationen identifiziert, die für einen systemischen Lupus erythematoses prädisponieren (67). Hierzu gehören zum Beispiel genetische Varianten im MHC-System. In der Regel ist keine einzelne Genvariante ausschlaggebend, sondern die Kombination. Für einzelne ist zudem ein Einfluss epigenetischer Modifikationen beschrieben (68). MHC-Moleküle finden sich auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen. Diese sind unter bestimmten Voraussetzungen in der Lage, T-Zellen zu aktivieren. Polymorphismen in MHC-Genen sind daher mit dem Risiko einer fälschlichen Immunantwort auf Autoantigene verbunden.

Untersuchungen haben die Rolle von Typ-I-Interferon-regulierten Genen beim SLE aufgezeigt (69). Bei SLE-Patienten wurden erhöhte Level an Interferon- α festgestellt, die mit der Krankheitsaktivität und -schwere korrelieren (70).

Die Rolle von Autoantikörpern und Autoreaktivität zeigt sich auch am Beispiel des B-Zell-aktivierenden Faktors (BAFF). BAFF, auch B-Lymphozyten-Stimulator oder BLyS, ist ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Familie und bindet an drei Oberflächenrezeptoren von B-Lymphozyten (71). BAFF wird hauptsächlich von hämatopoietischen Zellen produziert, wie Makrophagen und dendritischen Zellen. Er reguliert das Überleben und die Differenzierung der B-Lymphozyten zu Autoantikörper-bildenden Plasmazellen und hemmt ferner deren Apoptose (72). Es konnte einerseits eine Korrelation des BAFF-Serumspiegels mit der Krankheitsaktivität gezeigt werden (73). Andererseits bedingte eine Senkung des BAFF-Spiegels unter anderem die Apoptose von autoreaktiven B-Zellen, wodurch konsekutiv die Produktion von Autoantikörpern verringert wurde (74).

Die erhöhte Inzidenz von SLE vor allem bei Frauen im gebärfähigen Alter legt einen modulierenden Einfluss von weiblichen Hormonen auf die dem SLE zugrundeliegende Immunreaktion nahe (75).

Auch umweltbedingte Einflüsse scheinen die Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses zu beeinflussen. Dazu zählen unter anderem verschiedene Viren und Mikroorganismen. Das Cytomegalie- und Epstein-Barr-Virus gehören zur Gruppe der humanen Herpesviren. Ein Großteil der Bevölkerung trägt Antikörper gegen diese Viren in sich. Diese finden sich bei Patienten mit SLE häufiger als bei gesunden Personen, weswegen eine Assoziation mit viralen Infektionen naheliegt (76). Dies beruht am wahrscheinlichsten auf einer Kreuzreaktion zwischen viralen und wirtseigenen Antigenen im Sinne eines molekularen Mimikry.

Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten ist auch immer wieder das humane Mikrobiom. Offenbar kann die Translokation von bestimmten Bakterien der physiologischen Darmflora in genetisch prädisponierten Individuen eine Autoimmunerkrankung anstoßen (77). Ultraviolette Strahlung wird als einer der relevanten Triggerfaktoren angesehen, die einen kutanen Lupus erythematoses auslösen und verschlechtern können (78). Des Weiteren ist in der Literatur auch ein Zusammenhang zwischen gegenwärtigem positivem Raucherstatus und dem Auftreten von SLE beschrieben, nicht jedoch bei ehemaligen Rauchern (79).

2.3.2 Spezielle Pathogenese der Lupusnephritis

Die Pathogenese der Lupusnephritis ist ein komplexes Wechselspiel zwischen extra- und intrarenalen Faktoren (80). Es gibt Belege dafür, dass eine fehlerhafte *Clearance* abgestorbener Zellen durch eine gestörte Apoptose oder Phagozytose zur Ausbildung einer Lupusnephritis beitragen können (81, 82). So werden die beim Zellzerfall freigesetzten Antigene durch eine intakte Immunabwehr für gewöhnlich rasch entsorgt. Beim SLE hingegen kommt es zur Präsentation von Kernantigenen gegenüber dem Immunsystem. Die nukleären Antigene führen zur Antikörperbildung und aktivieren das Komplementsystem. Die resultierende Immunkomplexe können sich in verschiedenen Geweben ablagern und ihrerseits eine Entzündungsreaktion initiieren oder unterhalten (67). In diesem Zusammenhang wird auch eine Rolle der Toll-like-Rezeptoren diskutiert (83). Diese sind Bestandteil der angeborenen Immunität. Die Komplexe aus Autoantikörpern und Nukleinsäuren werden vom Immunsystem wahrscheinlich mit opsonisierten Viren verwechselt und aktivieren dieses über virale Nukleinsäure-spezifische Toll-like-Rezeptoren.

Die intrarenale Pathogenese der Lupusnephritis umfasst die Mechanismen der Antikörperbildung und der zellulären Immunität. Erhöhte Konzentrationen von Anti-dsDNS gehen der Entwicklung einer Lupusnephritis häufig voraus und sind somit ein prädiktiver Biomarker (84).

In Versuchen an gentechnisch veränderten Mäusen, die spontan ein Lupus-ähnliches Syndrom ausbilden, konnte gezeigt werden, dass Zellen der myeloischen Reihe, insbesondere Makrophagen, sowie die vermehrte Expression verschiedener Mediatoren von zentraler Bedeutung sind (85). Es wird angenommen, dass Makrophagen und dendritische Zellen beim SLE ein verändertes Migrationsverhalten aufweisen, wodurch es zur Fehlverteilung in peripheren Geweben mit nachfolgender Immunreaktion kommen kann (86). Infiltrierende Makrophagen können einerseits zur Gewebereparatur beitragen, andererseits destruierend in die renale Immunantwort eingreifen (87, 88). CSF-1 ist der wichtigste Überlebens- und Wachstumsfaktor für Makrophagen, dessen Wirkung über den CSF-1-Rezeptor vermittelt wird (89). Die Fehlregulation von CSF-1 scheint maßgeblich an der Entstehung einer Lupusnephritis beteiligt zu sein (87, 90). Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des systemischen CSF-1-Spiegels das Auftreten von Lupusnephritis bei MRL/lpr-Mäusen beschleunigte, wohingegen ein CSF-1-Mangel die Mäuse vor einer Nierenerkrankung schützte (87). Außerdem konnte am Mausmodell gezeigt werden, dass CSF-1 die Reparatur in der akuten Phase einer Nierenschädigung fördert, beim chronischen Nierenschaden jedoch einen schädigenden Effekt zeigt (91). Auf Grundlage dieser im Mausmodell gewonnenen Daten wurde die CSF-1-Expression auch an humanen Kollektiven untersucht. Hier konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass die verstärkte Expression von CSF-1 im Serum oder Urin nicht nur mit der Krankheitsaktivität bei Lupusnephritis korrelierte, sondern auch der Beginn der Erkrankung anhand dieses Parameters vorhergesagt werden konnte, noch bevor herkömmliche Labormethoden anschlügen (92).

Mit IL-34 konnte ein weiterer Ligand am CSF-1-Rezeptor entdeckt werden (93). IL-34 spielt eine wesentliche Rolle beim Überleben von Zellen sowie deren Proliferation und Differenzierung, bei Zelladhäsion und -migration und bei der Zytokin- und Chemokin-Expression (94). IL-34 fördert die intrarenale Proliferation destruktiver Makrophagen. Es gibt Erkenntnisse, die darauf hindeuten, dass IL-34 eine Zunahme von Monozyten im Knochenmark fördert, die wiederum in die entzündete Niere rekrutiert werden und

anschließend zu einer Schädigung führen (91). In Untersuchungen am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass IL-34 und der IL-34-Rezeptor mit Fortschreiten der Lupusnephritis ansteigen, wohingegen sich das Fehlen von IL-34 bei IL-34-defizienten Mäusen als protektiver Faktor sowohl bei einer Lupusnephritis als auch bei einer systemischen Erkrankung erwies (95). Zusammenhänge mit IL-34 wurden auch beim Menschen beobachtet. Die Autoren konnten zeigen, dass die IL-34-Serumlevel bei Lupuspatienten erhöht waren und mit der Krankheitsaktivität korrelierten (96).

Aber auch residente Zellen, wie Tubulusepithelzellen, rücken näher in den Fokus. Untersuchungen konnten zeigen, dass Zytokine und Chemokine durch TEZ freigesetzt wurden (95, 97). Diese können weitere Effektorzellen in die Niere rekrutieren, die ihrerseits auch proinflammatorische Mediatoren freisetzen, was in einer sich selbst unterhaltenden Entzündungsreaktion mündet.

2.4 PTP ζ und systemischer Lupus erythematodes

Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) sind eine heterogene Gruppe von Enzymen, die sich in verschiedenen zellulären Kompartimenten befinden. Sie katalysieren die reversible Dephosphorylierung von Tyrosinresten in Proteinen. Das Wechselspiel aus Tyrosin-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung ist von essenzieller Bedeutung bei der An- und Abschaltung verschiedener Signalwege.

2.4.1 PTP ζ – Funktion und Struktur

Im menschlichen Genom wurden 107 PTPs identifiziert (98, 99). Diese werden anhand ihrer Substratspezifität in mehrere Klassen eingeteilt, unter denen die klassischen PTPs die größte darstellen. Aufgrund ihrer katalytischen Domänen konnten die klassischen humanen PTPs in 17 Gruppen unterteilt werden. Deren Vertreter gehören entweder den nicht-transmembranären oder den Rezeptor-ähnlichen PTPs an. Im Allgemeinen sind Protein-Tyrosin-Phosphatasen an der Kontrolle der Proliferation und Differenzierung von Zellen sowie an Migrations- und Adhäsionsvorgängen beteiligt (100-102). Darüber hinaus ist eine abnormale Signalgebung als Folge genetischer Mutationen oder veränderter Expressionsniveaus mit verschiedenen Erkrankungen, wie der Entstehung von Krebsleiden oder Diabetes mellitus, assoziiert (103, 104). Auch bei der systemischen Sklerose, die wie der systemische Lupus erythematodes zur Gruppe der Kollagenosen gehört, gibt es Hinweise, dass PTPs wichtige Vermittler

bei der Krankheitsentstehung sind (105). PTP ζ , ein Zelloberflächenrezeptor, wird im Gehirn besonders stark exprimiert (106). Dieser Rezeptor stellt ein Schlüsselement bei der Regulierung der neuronalen Entwicklung dar und wird hauptsächlich auf neuronalen Vorläuferzellen und Gliazellen exprimiert (107). PTP ζ gehört zur R5-Unterfamilie der humanen Protein-Tyrosin-Phosphatasen und ist durch eine extrazelluläre Carboanhydrase-Domäne und eine Fibronektin III-ähnliche Domäne gekennzeichnet (s. Abb. 2-1). PTP ζ ist mit Chondroitinsulfat-Seitenketten modifiziert, die für die hochaffine Bindung hemmender Liganden wie IL-34, den Wachstumsfaktor Pleiotrophin und das extrazelluläre Matrixprotein Tenascin erforderlich sind (108-110). Durch alternatives Spleißen existieren drei Isoformen von PTP ζ : Zwei transmembranäre Isoformen, die kürzere und die vollständige Rezeptorform, sowie eine lösliche Form (111). Diese werden während der Entwicklung unterschiedlich reguliert. Relativ konstante Mengen der PTP ζ -Kurzform wurden vom Embryonalstadium bis zum Erwachsenenalter beobachtet, während die beiden anderen Formen eher eine Rolle bei der frühen Entwicklung des Gehirns zu spielen scheinen (111).

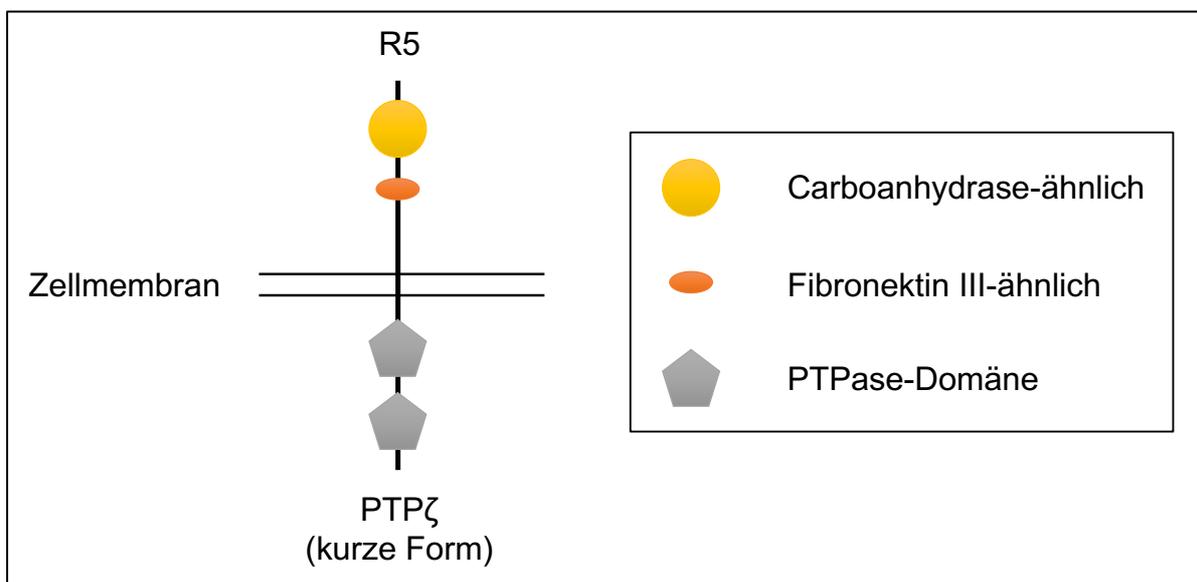


Abb. 2-1: Schematischer Aufbau von PTP ζ im Menschen

Zu den klassischen humanen Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) gehören 17 Unterfamilien, die in zwei Gruppen zusammengefasst werden, die nicht-transmembranären und die Rezeptor-ähnlichen PTPs. PTP ζ gehört zur R5-Unterfamilie und ist durch eine extrazelluläre Carboanhydrase-Domäne und eine Fibronektin III-ähnliche Domäne gekennzeichnet. Modifiziert nach Andersen et al. (98).

2.4.2 PTP ζ im Lupus-Mausmodell

Bei der Entstehung der Lupusnephritis nehmen Immunzellen und Autoantikörper eine entscheidende Rolle ein. Makrophagen kommt hierbei eine gesonderte Bedeutung zu.

Diese werden durch CSF-1 und IL-34, zwei Chemokine und Überlebensfaktoren, beeinflusst, indem sie mit dem CSF-1-Rezeptor interagieren (112). CSF-1- und IL-34-vermittelte Mechanismen beim SLE, insbesondere während einer Nierenentzündung, sind vielfach dokumentiert (87, 90, 97, 113). Im Mausmodell konnte mit PTP ζ kürzlich ein weiterer IL-34-Rezeptor identifiziert werden (s. Abb. 2-2) (114). Dieser alternative Rezeptor könnte potenziell zur Krankheitsentstehung des SLE und der Lupusnephritis beitragen. In einer Arbeit konnte gezeigt werden, dass PTP ζ von verschiedenen Zellen innerhalb und außerhalb der Niere exprimiert wurde (95). Die Autoren konnten einerseits belegen, dass PTP ζ -Transkripte und auch das intrarenale PTP ζ -Protein in Mäusen mit Lupusnephritis mit fortschreitender Erkrankung anstieg. Andererseits konnten sie PTP ζ auch auf renal infiltrierenden Leukozyten (T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen) feststellen. Darüber hinaus wurde PTP ζ in dieser Untersuchung auf T- und B-Zellen aus der Milz sowie auf Makrophagen aus dem Knochenmark bei Mäusen unterschiedlicher Altersstufen nachgewiesen.

Der Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R) ist ein Modell, um ein entzündliches Ereignis auf zellulärer und molekularer Ebene nachzustellen (115). Dabei wird eine passagere Minderperfusion von Organen zum Zeitpunkt Null mit anschließender Reoxygenierung herbeigeführt. Dies führt zum Absterben vitaler Zellen während der Reperfusion durch apoptotische Vorgänge (116). Während des I/R-induzierten Nierenschadens zeigte sich bei nicht-autoimmunen Mäusen eine ausgeprägte renale Expression von PTP ζ , hauptsächlich in den tubulären Epithelzellen (TEZ), die im zeitlichen Verlauf anstieg (91). Eine PTP ζ -Expression in TEZ zeigte sich auch bei MRL/lpr-Mäusen, die spontan eine Lupusnephritis ausbilden, aber auch in Nierenbiopsien von SLE-Patienten (95).

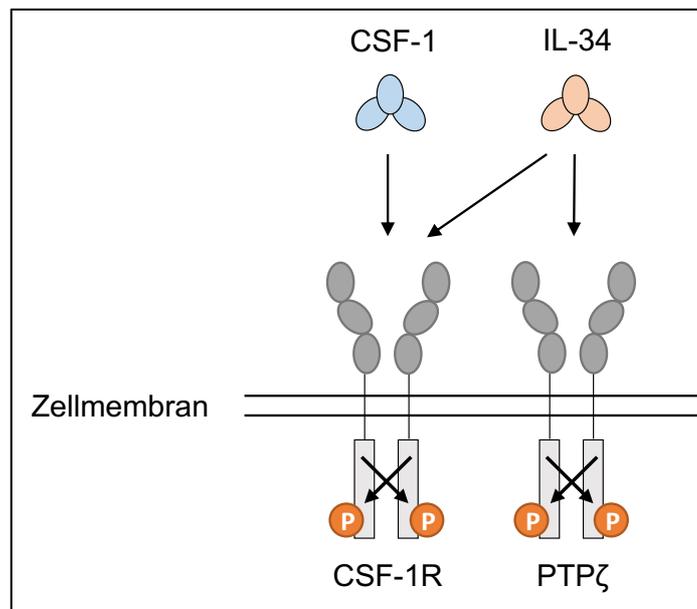


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Interaktion von CSF-1 und IL-34 mit ausgewählten Rezeptoren
 CSF-1 und IL-34 sind zwei Chemokine, die um die Bindung am CSF-1-Rezeptor (CSF-1R) konkurrieren und erwiesenermaßen einen Beitrag bei der Entstehung von SLE und der Lupusnephritis leisten. Mit PTPζ wurde ein weiterer IL-34-Rezeptor entdeckt, der potenziell eine Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen könnte. Eigene Abbildung mittels Microsoft PowerPoint.

2.5 Behandlungsstrategien

Für den systemischen Lupus erythematoses gibt es nach aktuellem Stand keine Heilungsmöglichkeit. Im Idealfall stellt sich unter Therapie eine langanhaltende vollständige Remission ein. Im Falle eines SLE ist Remission ein dauerhafter Zustand, der durch die Abwesenheit von Krankheitssymptomen und abnormalen Laborbefunden bezogen auf die Serologie charakterisiert ist (117). Die Therapieziele für Patienten mit SLE sind in der *Treat-to-target*-Leitlinie beschrieben und bestehen vornehmlich darin, akute Exazerbationen und Organschäden zu vermeiden, das Langzeitüberleben zu sichern bei möglichst geringer Krankheitsaktivität, die Toxizität der Medikamente niedrig zu halten und die Lebensqualität durch Reduktion der Beschwerden auf ein akzeptables Maß zu bringen (118, 119). Durch die klinische Inhomogenität des SLE ist der therapeutische Ansatz variabel. Es gibt jedoch einige allgemeine Prinzipien der medikamentösen Therapie, die für alle Betroffenen gleich sind. Diese werden unter dem Akronym SASKIA zusammengefasst (s. Tab. 2-7) (120). Ebenso ist die Behandlung von Komorbiditäten indiziert, wie beispielsweise eine adäquate Blutdruckeinstellung.

SLE	Maßnahme
Antimalariamittel	HCQ (200 mg pro Tag)
Sonnenschutz	LSF 50, Kleidung
Knochen	Vitamin D (20.000 I.E. pro Woche)
Impfungen	Standard und Influenza, Pneumokokken
Arteriosklerose	Risikofaktoren suchen und modifizieren

Tab. 2-7: SASKIA-Basismaßnahmen

Unter dem Akronym SASKIA werden allgemeine Prinzipien der medikamentösen Therapie zusammengefasst, die allen SLE-Patienten an die Hand gegeben werden sollten. I.E. = Internationale Einheiten, LSF = Lichtschutzfaktor. Nach Aringer et al. (120).

2.5.1 Pharmakotherapie

Die Auswahl der Pharmaka für den systemischen Lupus erythematodes erfolgt für jeden Patienten individuell und hängt von den vorherrschenden Symptomen, der Organbeteiligung, dem Therapieansprechen und der Krankheitsaktivität ab. Die Präferenzen des Patienten sind bei der SLE-Therapie ein zentraler Bestandteil. Daher sollten Betroffene aktiv in den Entscheidungsprozess im Sinne eines *shared decision-making* einbezogen werden (119). Nicht zuletzt sind auch mögliche Nebenwirkungen einzelner Präparate ein therapieentscheidendes Kriterium.

Antimalariamittel

In Deutschland sind die Wirkstoffe Hydroxychloroquin (HCQ) und Chloroquin für die Therapie zugelassen, wobei HCQ bevorzugt verwendet wird. Alle erwachsenen Lupus-Patienten sollen mit einem dieser Mittel behandelt werden, sofern keine Kontraindikation besteht (119, 121). Zur Linderung konstitutioneller Symptome sowie muskuloskelettaler und mukokutaner Manifestationen ohne schwerwiegende Organbeteiligung sind HCQ und Chloroquin Mittel der ersten Wahl. Darüber hinaus reduzieren Antimalariamittel langfristig Organschäden, fördern die Aufrechterhaltung einer SLE-Remission und verringern laut Daten aus randomisierten Studien die Schubhäufigkeit (121). Die positiven Wirkungen von Antimalariamitteln gehen noch weit darüber hinaus. In der Literatur wurden günstige Effekte auf den Lipid- und Glukosestoffwechsel beschrieben sowie eine Reduktion des Thrombose- und kardiovaskulären Risikos und eine verlängerte Lebenserwartung (121). Der genaue Mechanismus für diese Vielzahl von Wirkungen ist unbekannt. Auch für alle Patienten mit Lupusnephritis wird Hydroxychloroquin empfohlen (40). In einer Publikation wurde ein nephroprotektiver Effekt in Sinne einer verzögerten Nierenschädigung bei

Patienten mit LN beschrieben (122). Eine andere Studie kam zu dem Ergebnis, dass Patienten mit Lupusnephritis unter Antimalariamitteln im Verlauf seltener eine terminale Niereninsuffizienz entwickeln und weniger häufig versterben (123). Die beiden Wirkstoffe sind allgemein gut verträglich. Die am häufigsten auftretenden Nebenwirkungen sind vorübergehende gastrointestinale Beschwerden. Weiterhin wurde von Einlagerungen in die Hornhaut berichtet, die vor allem unter Chloroquin auftreten können (124). Bis Antimalariamittel ihre volle Wirksamkeit entfalten, können einige Monate vergehen. Stehen bei SLE-Patienten muskuloskelettale Symptome, wie Arthralgien oder Arthritiden im Vordergrund, bilden die nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAR) als entzündungshemmende und analgetische Medikamente eine sinnvolle Ergänzung. Neben den allgemeinen Risiken, die eine Therapie mit NSAR mit sich bringt, scheint speziell für Patienten mit einer Autoimmunerkrankung wie SLE ein zusätzliches Risiko für die Entwicklung einer NSAR-induzierten aseptischen Meningitis zu bestehen (125).

Glukokortikoide

Kortison und seine synthetisch hergestellten Abkömmlinge sind ein fester Bestandteil des Therapieregimes vieler Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Auch in der Behandlung des SLE hat sich diese Substanzklasse bewährt und bildet insbesondere im akuten Krankheitsschub einen unentbehrlichen Eckpfeiler. Der entzündungshemmende und immunsuppressive Effekt der Glukokortikoide wird über verschiedene Mechanismen vermittelt. Einerseits führt Kortison als intrazellulärer Transkriptionsfaktor zu einer gesteigerten Synthese antiinflammatorischer Proteine. Andererseits wird die Expression proinflammatorischer Proteine nach unten reguliert. Treten beim SLE-Patienten lediglich isolierte Hautveränderungen auf, ist eine topische Anwendung von Glukokortikoiden das Mittel der ersten Wahl (126). Im akuten Schub ohne Organbeteiligung und bei leichter bis mittelschwerer Organbeteiligung, zum Beispiel bei Befall der Gelenke oder Vorliegen einer Serositis, ist eine niedrig dosierte systemische Applikation von Glukokortikoiden in Kombination mit einem Antimalariamittel oder, sofern eine Kontraindikation besteht, als Monotherapie indiziert. Schwerwiegende Fälle mit Beteiligung lebensnotwendiger Organe erfordern eine hochdosierte intravenöse Kortison-Stoßtherapie, gegebenenfalls in Kombination mit einem Immunsuppressivum. Bei aktiver Organbeteiligung in Form einer prognostisch ungünstigen proliferativen Lupusnephritis der histologischen Klassen III bis IV hat sich eine intensive immunsuppressive Kombinationstherapie bewährt. Die

Induktion erfolgt nach *Euro-Lupus-Nephritis-Trial* mit hochdosierten Glukokortikoiden, zusammen mit dem Immunsuppressivum Cyclophosphamid (50). Im Anschluss wird eine Erhaltungstherapie eingeleitet, die mindestens drei Jahre fortgeführt werden sollte (119). Diese besteht typischerweise aus Azathioprin und einer niedrigen Prednisolon-Erhaltungsdosis. Generell sollte der Einsatz von Glukokortikoiden aufgrund des relevanten Nebenwirkungsprofils nur zeitlich begrenzt stattfinden. Zu den Langzeitfolgen können neben schlecht heilenden Wunden und einem arteriellen Hypertonus auch ein iatrogen induziertes Cushing-Syndrom gehören. Des Weiteren ist eine langfristige Kortison-Einnahme mit einem Risiko für einen Diabetes mellitus oder eine Osteoporose assoziiert.

Immunsuppressiva

Immunsuppressiva sind Medikamente, die die Aktivität des Immunsystems auf verschiedene Weise unterdrücken. Aus diesem Grund ist vor Beginn der Therapie ein Ausschluss von akuten und chronischen Infektionskrankheiten obligat. Die am weitesten verbreiteten Wirkstoffe sind Methotrexat (MTX), Azathioprin (AZA) und Mycophenolat-Mofetil (MMF). Alle Substanzen sind Inhibitoren der Zellproliferation, wodurch sie die fehlgeleitete Immunantwort beim SLE reduzieren können. MTX ist ein Folsäure-Analogon, das die Dihydrofolatreduktase kompetitiv hemmt und damit die Purin- und Pyrimidinbasensynthese blockiert. Die Anwendung erfolgt *off-label*. AZA und MMF hemmen als Purinbasenanaloga ebenfalls die Biosynthese von DNS-Bausteinen, indem sie als falsche Basen eingebaut werden und so zum programmierten Zelltod führen. Der Einsatz einer dieser drei Substanzen ist angezeigt, wenn SLE-Patienten ohne größere Organmanifestationen nicht auf die Basistherapie mit Antimalariamitteln ansprechen oder eine langfristige Reduktion der Glukokortikoide unter die Cushing-Schwellendosis nicht abzusehen ist (118). Für Methotrexat konnte ein positiver Einfluss auf Haut- und Gelenkmanifestationen nachgewiesen werden, was eine Einsparung von Glukokortikoiden ermöglicht (127). In der Schwangerschaft ist die Anwendung von Immunsuppressiva eingeschränkt. Eine nicht-proliferative Lupusnephritis der Klassen I und II bedarf im Normalfall keiner immunsuppressiven Therapie. Anders stellt sich hingegen die Situation bei einer proliferativen Lupusnephritis der Klassen III und IV dar. In diesem Fall erfolgt ein Standard-Induktionsschema, bei dem Glukokortikoide hochdosiert und ein Immunsuppressivum oder Biologikum kombiniert verabreicht werden. Hierbei kommt unter anderem der Wirkstoff Cyclophosphamid zum Einsatz. Häufiger als CYC findet mittlerweile jedoch

MMF Verwendung in der Induktions- und Erhaltungstherapie. CYC führt zu Inter-Strang-Quervernetzungen von DNS-Basen mit konsekutiver Hemmung der Replikation und Transkription, was letztlich einen programmierten Zelltod zur Folge hat. Im Anschluss an die Induktionstherapie erfolgt ein Wechsel zur mehrjährigen Erhaltungstherapie. Unter einer immunsuppressiven Therapie ist mit Kurz- und Langzeitnebenwirkungen der eingesetzten Medikamente zu rechnen. SLE-Betroffene berichten unter anderem von Übelkeit, Erbrechen und Fatigue. Außerdem können häufiger Erosionen der Mundschleimhaut auftreten. Wesentlich gefährlicher ist eine Myelosuppression mit nachfolgender Anämie, erhöhter Infektanfälligkeit und Fieber.

Biologika

Das erste und aktuell einzige zugelassene Biologikum in der SLE-Therapie ist Belimumab (128, 129). Hierbei handelt es sich um einen humanen monoklonalen Antikörper, der selektiv den löslichen B-Lymphozyten-Stimulator (BLyS) inhibiert und somit dessen Bindung an verschiedene Oberflächenrezeptoren von B-Lymphozyten verhindert (130). Eine Senkung des BLyS-Spiegels führt unter anderem zur Apoptose von autoreaktiven B-Zellen, wodurch konsekutiv die Produktion von Autoantikörpern verringert wird (74). Vor allem sind hiervon B-Zellen im Frühstadium in der Peripherie betroffen, nicht aber Knochenmarksplasmazellen oder Gedächtniszellen (131). Belimumab ist seit 2011 eine zusätzliche therapeutische Option bei erwachsenen Patienten mit klinisch und serologisch aktivem SLE, bei denen trotz einer individuell angepassten Standardtherapie kein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden kann (132). Die Ergebnisse einer *Post-hoc*-Untersuchung der Belimumab-Studien deuten darauf hin, dass der Wirkstoff seinen größten therapeutischen Effekt bei Patienten mit hoher Krankheitsaktivität (hohe Anti-dsDNS-Titer, niedrige Komplementspiegel) zeigt (133). Belimumab gilt allgemein als gut verträglich. Die Latenzzeit bis zum Wirkeintritt kann mehrere Monate betragen. Der Nutzen von Belimumab für die Behandlung einer aktiven LN wurde in einer 2020 abgeschlossenen Zulassungsstudie überprüft und in der Folge wurde Belimumab als Partner in der Induktions- und Erhaltungstherapie zugelassen (134). In dieser Studie zeigten Patienten, die neben einer Standardtherapie Belimumab erhielten, ein wirksameres renales Ansprechen als bei alleiniger Standardtherapie. Einen anderen Angriffspunkt nutzt Rituximab (RTX), ein chimärer monoklonaler Antikörper. Im Unterschied zu Belimumab wirkt Rituximab nicht auf das BLyS-System, sondern bindet gezielt an das B-Lymphozyten-Oberflächenantigen CD20, was eine vorübergehende Eliminierung peripherer B-Zellen

durch Apoptose und antikörper-abhängige Zytotoxizität zur Folge hat. Rituximab wird seit mehreren Jahrzehnten in der Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen eingesetzt, weswegen eine solide Evidenz bezüglich Sicherheit und Wirksamkeit vorhanden ist (135). Eine positive Beeinflussung der aktiven rheumatoiden Arthritis durch RTX konnte im Rahmen von groß angelegten, Placebo-kontrollierten Studien bereits nachgewiesen werden, weshalb es seit 2006 für diese Indikation zugelassen ist (136, 137). In mehreren unkontrollierten Beobachtungsstudien wurde auch bei SLE-Patienten mit oder ohne LN, die auf die Standardbehandlung nicht angesprochen haben, über ein positives Risiko-Nutzen-Verhältnis von Rituximab berichtet (138). Die zur Überprüfung eines kausalen Zusammenhangs entwickelten randomisierten, kontrollierten Studien konnten beide aus unterschiedlichen Gründen ihre primären Endpunkte nicht erreichen (139, 140). Hier ergibt sich die Frage, ob die Endpunkte klinischer Studien bei Vorliegen einer Lupusnephritis wirklich ein Ansprechen abbilden. Selten bis gar nicht findet sich eine Kombination aus Nierenbiopsie, der Nierenfunktion und einer Proteinurie als Kriterium des Ansprechens. Die Proteinurie allein spiegelt jedoch nicht in allen Fällen objektivierbar das Ansprechen auf eine antientzündliche Therapie wider, da chronisch veränderte Bereiche weiterhin eine Proteinurie unterhalten können. Obwohl aktiv entzündliche Bereiche der Niere unter Umständen optimal auf eine Therapie ansprechen, wird dies folglich durch eine alleinige Messung einer Proteinurie unterschätzt. Somit ist hinsichtlich zukünftiger Endpunktstudien sicherlich ein Umdenken bei Vorliegen einer Lupusnephritis in Erwägung zu ziehen. In der Praxis wird RTX deshalb *off-label* bei sonst therapierefraktärem systemischem Lupus erythematodes eingesetzt, weil Untersuchungen wiederkehrend zeigten, dass ein Teil der Patienten im Sinne einer niedrigeren Krankheitsaktivität oder einer Verringerung der Glukokortikoid-Dosis von einer Behandlung mit Rituximab profitierte (141).

2.5.2 Nicht-pharmakologische, präventive und supportive Maßnahmen

Bei der Behandlung eines systemischen Lupus erythematodes gibt es neben den medikamentösen auch eine Reihe von nicht-medikamentösen und vorbeugenden Maßnahmen, die als sinnvoll erachtet werden und daher einen Platz im individuellen Therapiekonzept eines jeden Betroffenen haben sollten.

Sonnenschutz

SLE-Patienten sollten die Einwirkung von direkter und indirekter ultravioletter Strahlung (UV-Strahlung) meiden, weil hierdurch systemische Manifestationen provoziert oder verstärkt werden können (142). Aus diesem Grund wird zu Sonnenschutzmitteln mit UV-A- und UV-B-Filter sowie hohem Lichtschutzfaktor geraten. Der notwendige Hautschutz birgt das Risiko in sich, im Laufe der Erkrankung eine Osteoporose zu entwickeln. In diesem Fall ist die Substitution von Vitamin D zu erwägen.

Körperliche Aktivität

Körperliche Inaktivität durch Schmerzen führt zum Verlust der sportlichen Ausdauer, zu einem schnellen Abbau von Muskelmasse und zur Demineralisierung der Knochen. Dies wiederum kann bei SLE-Patienten ein Gefühl der Ermüdung hervorrufen. Dem kann mit isometrischen aeroben Übungen begegnet werden. Aus einer Metaanalyse geht hervor, dass therapeutisches Training bei SLE-Patienten die körperliche Fitness steigern und die Müdigkeit reduzieren kann (143). Weitere Vorteile sind eine Verbesserung der kardiorespiratorischen Kapazität, der Lebensqualität und eine positive Auswirkung auf Depressivität.

Impfungen

Nicht selten sind SLE-Betroffene zur Einnahme von Immunsuppressiva gezwungen, um die Symptomausprägung zu kontrollieren. Durch diese Medikamente werden weite Teile der Immunabwehr unterdrückt. Da hieraus eine gesteigerte Anfälligkeit für Infektionen resultiert, wird bei allen Patienten unter Immunsuppression eine regelmäßige Kontrolle des Impfstatus sowie eine Auffrischung nach den Richtlinien der Ständigen Impfkommission (STIKO) empfohlen (144). Insbesondere sind die Impfungen gegen Pneumokokken und Influenza von Bedeutung, da diese Erkrankungen bei SLE-Patienten unter Umständen einen tödlichen Verlauf annehmen können. Die Impfprävention erfolgt im besten Fall vor Einleitung einer immunsuppressiven Therapie.

Behandlung von Komorbiditäten

Patienten mit SLE leiden häufig unter Begleiterkrankungen, welche die Prognose zusätzlich ungünstig beeinflussen können. Daher wird empfohlen, prädisponierende Risikofaktoren zu reduzieren und bereits bestehende Komorbiditäten zu behandeln (118, 119). Vor allem das kardiovaskuläre Risiko kann durch allgemeine Maßnahmen wie, einer Reduktion von Übergewicht, einer Raucherentwöhnung und einer optimalen Kontrolle des Bluthochdrucks modifiziert werden.

2.6 Prognose

Seit Mitte des 20. Jahrhunderts hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate von SLE-Patienten deutlich verbessert, von etwa 50 % in den fünfziger Jahren auf über 90 % seit den neunziger Jahren (1, 3). Die Verbesserung des Überlebens ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf mehrere Faktoren zurückzuführen, darunter die allgemeinen Verbesserungen in der medizinischen Versorgung, die Verfügbarkeit von Antibiotika und gut etablierte Nierenersatzverfahren, in Verbindung mit dem gezielten Einsatz von Antimalariamitteln, Glukokortikoiden und Immunsuppressiva (1). Dieser Verbesserung steht eine überproportional hohe Sterblichkeitsrate unter Lupus-Patienten im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung gegenüber (145). Als Haupttodesursachen treten bei SLE-Patienten Infektionen infolge einer Immunsuppression, kardiovaskuläre Komplikationen und die terminale Niereninsuffizienz in den Vordergrund (146).

2.7 Lupus-Mausmodell

Tiermodelle sind ein nützliches Instrument, um die pathophysiologischen Vorgänge, die dem systemischen Lupus erythematodes zugrunde liegen, zu untersuchen, zu verstehen und Behandlungsoptionen zu identifizieren. In der Vergangenheit wurden diverse Mausmodelle etabliert, die eine Lupus-ähnliche systemische Autoimmunität aufweisen und dadurch verschiedene Merkmale des SLE-Phänotyps präsentieren (147). Hierbei sind Modelle zu unterscheiden, die entweder spontan oder induziert ein SLE-ähnliches Syndrom ausbilden. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl an genetisch veränderten Mäusen. Die folgende Beschreibung beschränkt sich auf die in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere. Alle Untersuchungen wurden an Mäusen des Stammes *Murphy Roths Large* (MRL) durchgeführt. MRL wurde aus mehreren Kreuzungen von Inzuchtstämmen entwickelt und besitzt einen komplexen genetischen Hintergrund (148). Die Tierversuche waren gemäß § 8 Absatz 1 Tierschutzgesetz

(TierSchG) genehmigt (Tierversuchsantrag G17-074). Die Versuchstiere wurden von der Firma *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor) bezogen.

2.7.1 MRL/*lpr*-Mausstamm

Der ursprüngliche MRL-Mausstamm (Wildtyp) ist gekennzeichnet durch die Fähigkeit, Gewebe und komplexe Organstrukturen regenerieren zu können (149). Darüber hinaus entwickeln MRL-Mäuse nach etwa zehn Monaten ein vergleichsweise mildes SLE-ähnliches Syndrom, unter anderem mit einer Lymphadenopathie, einer Akkumulation von doppelt negativen T-Zellen und zirkulierenden Autoantikörpern (150-152). MRL/*lpr* ist ein Substamm, der als klassisches Lupus-Mausmodell gilt. Dieser weist zusätzlich eine autosomale Mutation auf, die als Lymphoproliferation (*lpr*) bezeichnet wird. Die *lpr*-Mutation wurde später als Mutation im *Fas*-Gen identifiziert, das für einen Transmembranrezeptor kodiert (153, 154). Dieser molekulare Schalter transduziert apoptotische Signale in verschiedenen Zellen, einschließlich Immunzellen. Das System aus *Fas*-Ligand und dessen Rezeptor spielt eine herausragende Rolle bei der Kontrolle des Immunsystems und der Erhaltung der Selbsttoleranz (155). Es sorgt unter anderem im Prozess der Differenzierung und Reifung von T-Lymphozyten im Thymus für den programmierten Zelltod autoreaktiver T-Zellen (156). In *Fas*-defizienten Mäusen hingegen bleibt eine Negativ-Selektion aus und es kommt zur Ansiedelung einer Vielzahl von autoreaktiven T-Lymphozyten (151). Ähnlich zum SLE beim Menschen entwickeln weibliche MRL/*lpr*-Mäuse eine frühzeitigere und stärker ausgeprägte Erkrankung (157). Innerhalb weniger Lebensmonate können hohe ANA-Spiegel und eine frühe Nierenbeteiligung nachgewiesen werden, was zu großen Mengen zirkulierender Immunkomplexe und einer hohen Mortalität von 100 % nach neun Monaten führt (147).

2.7.2 Haltung der Versuchstiere

Die Mäuse werden in den Mausställen der Universitätsmedizin Mainz gezüchtet und gehalten. In den Zuchträumen herrschen künstliche Beleuchtung (abwechselnde Hell- und Dunkelphase von jeweils zwölf Stunden) und standardisierte klimatische Bedingungen. Um die Wahrscheinlichkeit einer Infektion der Versuchstiere mit pathogenen Keimen möglichst gering zu halten, gelten im Tierzuchtbereich besondere hygienische Anforderungen. Tierpfleger und Experimentatoren dürfen den geschützten Bereich nur nach Desinfektion von Händen und Schuhen mit einer

speziellen Schutzausrüstung betreten, bestehend aus Kopfbedeckung, Mundschutz, Kittel, Überschuhen und Einmal-Handschuhen. Die Haltung der Mäuse erfolgt in Filter-Top-Käfigen. Diese bestehen aus einer Kunststoffschale mit herausnehmbarem Metallgitter, die mit einem speziellen Deckel, der eine Ventilation der Käfige erlaubt, verschlossen ist. Der ständige Zugang zu Standardfutter und einer Tränke war gewährleistet. Der Boden der Käfige wurde einige Zentimeter hoch mit einem Weichholzeinstreu aus Fichten- und Tannenholz ausgelegt. Zusätzlich wurde den Tieren Käfigzubehör, wie Nestmaterial und Röhren, zur Verfügung gestellt, um natürliches Verhalten zu fördern. Pro Käfig werden Gruppen mit maximal fünf Exemplaren getrennt nach Alter und Geschlecht gehalten. Die Versuchstiere wurden in den Räumlichkeiten der TARC (*Translational Animal Research Center*) gehalten.

3 Material

3.1 Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller	Sitz
Brutschrank	Heracell 150i	Thermo Scientific™	Schwerte
Detektionsgerät	ChemiDoc™ XRS	Bio-Rad®	München
Elektrophoresezelle	Tetra Cell	Bio-Rad®	München
Gel-Kassetten	Mini Gel Holder Cassette	Bio-Rad®	München
Halterung	Mini Trans-Blot Central Core	Bio-Rad®	München
Kippschüttler	Rocker 3D B	IKA Labortechnik	Staufen
Kühlakku	Blue Cooling Unit	Bio-Rad®	München
MACS-Magnetstand	MultiStand	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
MACS-Separatoren	MidiMACS™ (LS)	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
Magnetrührer	REC-G	IKA Labortechnik	Staufen
Microplate Reader	Appliskan® 2001	Thermo Scientific™	Schwerte
Mikroskop	TMS-F	Nikon	Tokio, Japan
Netzteil	PowerPac™ Universal	Bio-Rad®	München
pH-Meter	inoLab pH Level 1	WTW	Weilheim
Pipetten	Multipette® M4 Research® plus 10 100 1000	Eppendorf	Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann	Eberstadt
Puffertank	Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad®	München
Rollenmischer	RM5	Hartenstein	Würzburg
Sicherheitswerkbank	MSC 1.8	Thermo Scientific™	Schwerte
Thermomischer	Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg
Vibrationsmischer	Vortex-Genie™ 2	Thermo Scientific™	Schwerte
Waagen	L610 BP121S	Sartorius	Göttingen

MATERIAL

Wasserbad	WNB 7	Memmert	Schwabach
Zentrifugen	5417R	Eppendorf	Hamburg
	Multifuge™ X3R	Thermo Scientific™	Schwerte
Zählkammer	Neubauer	Laboroptik	Lancing, UK
0,01 mm, 0,0025 mm ²			

3.2 Verbrauchsartikel

Artikel	Katalog-Nr.	Hersteller	Sitz
Alufolie	AA76.1	Carl Roth®	Karlsruhe
Combitips, unsteril		Eppendorf	Hamburg
2,5 ml (50 µl)	0030089448		
5 ml (100 µl)	0030089456		
10 ml (200 µl)	0030089464		
Einmalspritzen, 5 ml	309050	Becton Dickinson	New Jersey, USA
Foam Pads	1703933	Bio-Rad®	München
Handschuhe, Größe L	L951.1	Carl Roth®	Karlsruhe
Kanülen, 26G	303800	Becton Dickinson	New Jersey, USA
Mikrotiterplatten, unsteril	9018	Corning	Kennebunk, USA
Multiwellplatten, steril		Greiner Bio-One	Frickenhausen
6 Well	657160		
12 Well	665180		
Nitrozellulosemembran	10600001	GE Healthcare	Solingen
Overheadfolie	157013200	Soennecken	Overath
Pipettenspitzen		Sarstedt	Nümbrecht
20 µl	70.3020.020		
200 µl	70.3030.020		
1000 µl	70.3050.020		
Plate Sealers	DY992	R&D Systems®	Minneapolis, USA
Reagiergefäße		Sarstedt	Nümbrecht
0,5 ml	72.704		
1,5 ml	72.706		
2 ml	72.695		
Röhrchen		Greiner Bio-One	Frickenhausen
15 ml	188271		
50 ml	227261		
S-Monovette® 3K EDTA	02.1066.001	Sarstedt	Nümbrecht
Serologische Pipetten, steril		Greiner Bio-One	Frickenhausen

MATERIAL

2,5 ml	710180		
5 ml	606180		
10 ml	607180		
25 ml	760180		
50 ml	768180		
Skalpelle	02.001.40.011	pfm medical	Köln
Thick Blot Filter Paper 7,5 x 10 cm	1703932	Bio-Rad®	München
Trennsäulen	130-042-401	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
Zellkulturschalen, steril		Greiner Bio-One	Frickenhausen
6 cm	628160		
10 cm	664160		
Zellsiebe		Greiner Bio-One	Frickenhausen
40 µm	542040		
70 µm	542070		
100 µm	542000		

3.3 Chemikalien

Bezeichnung	Katalog-Nr.	Hersteller	Sitz
Acrylamidlösung	3029.1	Carl Roth®	Karlsruhe
Ammoniumchlorid	101145	Merck	Darmstadt
Ammoniumperoxo- disulfat	1012010500	Merck	Darmstadt
BSA	11930	Serva	Heidelberg
Deoxycholsäure- Natriumsalz	D6750	Sigma-Aldrich®	Steinheim
EDTA	E5134	Sigma-Aldrich®	Steinheim
Ethanol	9065.2	Carl Roth®	Karlsruhe
Glycin	3908.2	Carl Roth®	Karlsruhe
Kaliumbocarbonat	P748.1	Carl Roth®	Karlsruhe
Magermilchpulver	A0830	AppliChem	Darmstadt
Methanol	8388.6	Carl Roth®	Karlsruhe
Natriumchlorid	3957.2	Carl Roth®	Karlsruhe
Natriumhydroxid	6771.1	Carl Roth®	Karlsruhe
PBS	BS.L 182-10	Bio&SELL	Feucht
Propanol	6752	Carl Roth®	Karlsruhe

MATERIAL

Salzsäure 32 %	100319	Merck	Darmstadt
SDS	CN30.3	Carl Roth®	Karlsruhe
TEMED	A1148	AppliChem	Darmstadt
TRIS	4855.2	Carl Roth®	Karlsruhe

3.4 Lösungen und Puffer

3.4.1 Fertiglösungen

Bezeichnung	Katalog-Nr.	Hersteller	Sitz
Ampuwa® Spüllösung	1088811	Fresenius Kabi	Bad Homburg
Histopaque®-1077	10771	Sigma-Aldrich®	Steinheim
Histopaque®-1119	11191	Sigma-Aldrich®	Steinheim
Laemmli Sample Buffer (4x)	161-0747	Bio-Rad®	München
Nonidet® P40	7768	Carl Roth®	Karlsruhe
PageRuler™ Plus Prestained	26619	Thermo Scientific™	Schwerte
Protein Ladder, 10 bis 250 kDa			
Phosphatase-Inhibitor		Sigma-Aldrich®	Steinheim
Cocktail 2	P5726		
Cocktail 3	P0044		
Ponceau S-Lösung	P7170	Sigma-Aldrich®	Steinheim
Terralin® liquid	102001	Schülke & Mayr	Norderstedt
Tween® 20	P1379	Sigma-Aldrich®	Steinheim

3.4.2 Stammlösungen

2x RIPA-Puffer

10 ml	TRIS-HCl (pH 8,0)
1,75 g	NaCl
2 %	Nonidet® P40
0,2 %	SDS
1 %	Deoxycholsäure-Natriumsalz
100 ml	ddH ₂ O

MATERIAL

10x Elektrophoresepuffer (pH 8,7)

30,0 g	TRIS
144,0 g	Glycin
10,0 g	SDS
1 l	ddH ₂ O

10x Blotpuffer (pH 8,3)

30,0 g	TRIS
144,0 g	Glycin
1 l	ddH ₂ O

10x TBS (pH 7,5)

60,5 g	TRIS
87,6 g	NaCl
1 l	ddH ₂ O

Einstellung mit 5 M HCl auf den erforderlichen pH-Wert.

5x PBS

1x	PBS-Trockensubstanz
2 l	ddH ₂ O

3.4.3 Arbeitslösungen

ACK-Lyse-Puffer (pH 7,2-7,4)

8,29 g	Ammoniumchlorid
1 g	Kaliumbicarbonat
37,2 mg	EDTA
1000 ml	ddH ₂ O

Einstellung mit 5 M HCl auf den erforderlichen pH-Wert.

Für die Anwendung in der Zellkultur steril filtrieren.

MATERIAL

MACS-Puffer

50 ml	PBS (steril)
2 mM	EDTA
1 %	Plasma (hitzeinaktiviert)/Fötale Kälberserum

Waschmedium

500 ml	PBS (steril)
1 mM	EDTA

1x RIPA-Puffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor

500 µl	2x RIPA-Puffer
40 µl	25x Protease-Inhibitor
10 µl	100x Phosphatase-Inhibitor je Cocktail 2 und 3
440 µl	ddH ₂ O

Trenngelpuffer 1,5 M TRIS (pH 8,8)

18,17 g	TRIS
100 ml	H ₂ O

Einstellung mit 5 M HCl auf den erforderlichen pH-Wert.

Sammelgelpuffer 0,5 M TRIS (pH 6,8)

6,06 g	TRIS
100 ml	H ₂ O

Einstellung mit 5 M HCl auf den erforderlichen pH-Wert.

1x Elektrophoresepuffer

100 ml	10x Elektrophoresepuffer
900 ml	ddH ₂ O

1x Blotpuffer

100 ml	10x Blotpuffer
200 ml	Methanol
700 ml	ddH ₂ O

MATERIAL

1x TBS/T

100 ml	10x TBS
900 ml	ddH ₂ O
500 µl	Tween [®] 20

Verdünnungspuffer

5 g	Magermilchpulver
100 ml	1x TBS/T

3.5 Antikörper

Primäre Antikörper

Substrat	Wirtsspezies	Katalog-Nr.	Hersteller	Sitz
β-Actin	<i>rabbit</i>	4970S	Cell Signaling [®]	Massachusetts, USA
PTPζ	<i>rat</i>	MAB2688	R&D Systems [®]	Minneapolis, USA
	<i>mouse</i>	2B49	DSHB	Iowa, USA

Sekundäre Antikörper

Substrat	Wirtsspezies	Katalog-Nr.	Hersteller	Sitz
<i>anti-mouse</i>	<i>horse</i>	7076S	Cell Signaling [®]	Massachusetts, USA
<i>anti-rabbit</i>	<i>goat</i>	7074S	Cell Signaling [®]	Massachusetts, USA
<i>anti-rat</i>	<i>goat</i>	7077S	Cell Signaling [®]	Massachusetts, USA

3.6 Kulturmedien und Zusätze

Bezeichnung	Katalog-Nr.	Hersteller	Sitz
DMEM + GlutaMAX™	31966	Life Technologies	Paisley, UK
Dulbecco's PBS (1x)	D8537	Sigma-Aldrich [®]	Steinheim
Fötale Kälberserum	P30-8500	PAN-Biotech	Aidenbach
Penicillin/Streptomycin (10.000 units/ml/10 mg/ml)	P0781	Sigma-Aldrich [®]	Steinheim
Rekombinantes CSF-1	300-25	PeptoTech	Hamburg

RPMI 1640 + GlutaMAX™	FG1385	Sigma-Aldrich®	Steinheim
-----------------------	--------	----------------	-----------

3.7 Reagenzien-Kits

Bezeichnung	Katalog-Nr.	Hersteller	Sitz
B Cell Isolation Kit mouse	130-090-862	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
Invitrogen™ MagniSort™ Mouse CD3 Positive Selection Kit	8802-6840- 74	Thermo Scientific™	Schwerte
MicroBeads, human		Miltenyi Biotec	Bergisch
CD3	130-050-101		Gladbach
CD14	130-050-201		
CD19	130-050-301		
CD66b	130-104-913		
Monocyte Isolation Kit (BM) mouse	130-100-629	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	23225	Thermo Scientific™	Schwerte
WesternBright Chemolumineszenz Substrat Quantum	541015	Biozym®	Hessisch Oldendorf

3.8 Software

Bezeichnung	Hersteller	Sitz
Excel	Microsoft	Washington, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.	San Diego, USA
Image Lab™	Bio-Rad®	München
PowerPoint	Microsoft	Washington, USA
Quantity One®	Bio-Rad®	München
Skant™	Thermo Scientific™	Schwerte

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung und Differenzierung der humanen und murinen Zellen erfolgte grundsätzlich bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Um das Risiko einer Kontamination der Zellkulturen möglichst gering zu halten, fanden die folgenden Arbeitsschritte unter aseptischen Bedingungen, mit sterilen Materialien in einer Sicherheitswerkbank statt.

4.1.1 Gewinnung von humanen Proben

Für die humanen Proben wurden per Zufall vier Lupus-Patienten mit bioptisch gesicherter Lupusnephritis aus der SLE-Ambulanz der Universitätsmedizin Mainz rekrutiert, die mindestens vier der elf ACR-Diagnosekriterien erfüllten und ihr Einverständnis erklärt hatten (s. Kap. 2.1.2). Im Durchschnitt waren die Erkrankten zum Zeitpunkt der Probenentnahme 43 ± 14 Jahre alt. Als Vergleichsgruppe wurden vier Freiwillige auf Gesundheit geprüft, wobei Nierenerkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie zuvor ausgeschlossen wurden. Der Altersdurchschnitt in dieser Gruppe betrug 26 ± 3 Jahre. In gängiger Punktionschnik wurden von jedem Probanden fünf EDTA-Röhrchen mit jeweils 9 ml venösem Blut entnommen. Die Bearbeitung der Blutproben erfolgte taggleich. Die Verwendung der Proben wurde vom Ständigen Ausschuss für klinische Studien der Johannes Gutenberg-Universität Mainz im Einklang mit der Deklaration von Helsinki geprüft und genehmigt (Ethikantrag 2019-14659_1).

4.1.2 Gewinnung von murinen Proben

Alle verwendeten Organe beziehungsweise Gewebe und die daraus generierten Zellen stammten aus MRL/lpr-Mäusen unterschiedlicher Altersstufen. Die Mäuse wurden durch eine fachkundige Person nach Vorschrift zunächst mittels CO₂-Inhalation narkotisiert und im Anschluss durch rasche Luxation der Halswirbelsäule getötet. Nach dem sicheren Eintritt des Todes wurde das Fell bauchseitig entfernt, die Haut desinfiziert und die beiden Nieren, die Milz sowie die großen Röhrenknochen über einen Bauchschnitt entnommen. Die Nieren wurden kryokonserviert. Die Milzen und die Röhrenknochen wurden direkt weiterverarbeitet. Die jungen Versuchstiere waren zum Zeitpunkt der Probengewinnung etwa eineinhalb Monate alt, die reiferen

Tiere waren zwischen vier und fünf Monaten alt (s. Abb. 4-1). Es handelte sich fast ausschließlich um Weibchen.

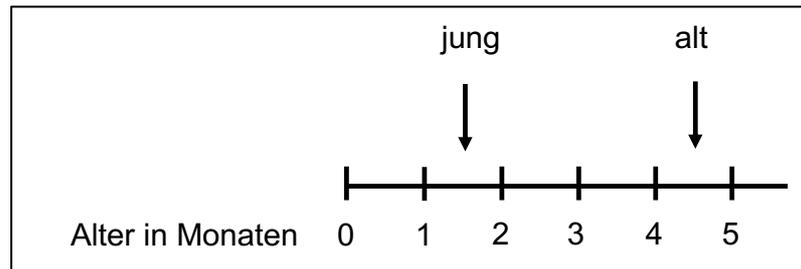


Abb. 4-1: Mausalter zum Zeitpunkt der Probengewinnung
Eigene Darstellung mittels Microsoft PowerPoint.

4.1.3 Isolation von mononukleären Zellen und Neutrophilen aus peripherem Blut

Die Isolation von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) erfolgte aus EDTA-Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation. Bei dieser Technik wurde die aufzutrennende Zellsuspension über ein geeignetes Separationsmedium geschichtet und anschließend bis zur Einstellung des Sedimentationsgleichgewichtes zentrifugiert. Die Separationsmedien bildeten einen abgestuften Dichtegradienten. Folglich wurden die unterschiedlichen Zellen entsprechend ihrer spezifischen Dichte fraktioniert (s. Abb. 4-2). Hierfür wurden die 45 ml Blut pro Probe zuerst mit Waschmedium auf ein Volumen von 50 ml gebracht. Daraufhin wurden für jede Probe in zwei 50 ml-Röhrchen je 10 ml des ersten Separationsmediums (Histopaque®-1119) vorgelegt und dieses anschließend mit dem zweiten Separationsmedium (Histopaque®-1077) überschichtet. Darüber wurde zu gleichen Teilen die Probe gegeben. Im folgenden 20-minütigen Zentrifugationsschritt (Multifuge™ X3R) reicherten sich die mononukleären Zellen als milchig-weißer Ring in der Interphase zwischen Blutplasma und dem oberen Separationsmedium an (2.500 rpm, RT, ohne Bremse). Die Granulozyten konzentrierten sich zwischen den beiden Separationsmedien. Für den MACS-Puffer wurden von jeder Probe 10 ml Plasma abgenommen, welches in einem neuen Röhrchen bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert wurde. Die in der Interphase befindliche Fraktion aus T-Zellen, B-Zellen und Monozyten wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt. Um die gewonnenen Zellen von Resten der Separationsmedien und verbliebenen Thrombozyten zu befreien, erfolgten mehrere Waschschrte. Dazu wurde die Zellsuspension mit Waschmedium auf 50 ml aufgefüllt, invertiert, für 5 min

bei 4°C und 1.500 rpm zentrifugiert (Multifuge™ X3R) und der Überstand verworfen. Die Prozedur wurde wiederholt, bis der Überstand vollständig klar war. Im Verlauf wurden gleichartige Proben zusammengeführt. Die nachfolgende Behandlung jeder Probe mit 5 ml ACK-Lyse-Puffer für insgesamt 5 min diente der Eliminierung vorhandener Erythrozyten. Mit den Granulozyten wurde gleichermaßen verfahren. Zur Vorbereitung der magnetischen Zellseparation wurden die Zellen ausgezählt und das PBMC-Gemisch in drei gleich große Portionen aufgeteilt.

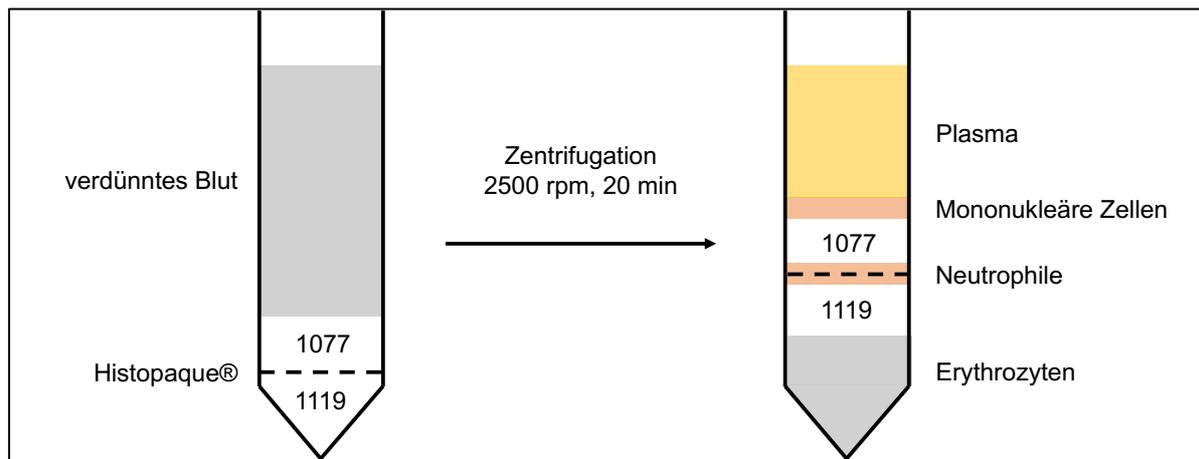


Abb. 4-2: Auftrennung der Zellsuspension mittels Dichtegradientenzentrifugation
Eigene Darstellung mittels Microsoft PowerPoint.

4.1.4 Zellzahlbestimmung

In sämtlichen Teilversuchen dieser Arbeit erfolgte die Ermittlung der Zellzahl konventionell mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurde die Zellsuspension vor der Auszählung durchmischt und im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. Nachdem die Zählkammer ordnungsgemäß zusammengesetzt war, wurden 10 µl der verdünnten Suspension entnommen und in die Zählkammer pipettiert. Der nächste Schritt bestand im Auszählen der Zellen in den vier großen Eckquadranten. Nach folgender Formel wurde die Anzahl der Zellen pro Milliliter berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl pro Großquadrat}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} \times \text{Kammerfaktor} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Für die folgenden Arbeitsschritte wurden die Zellen nach der Auszählung für 5 min bei 1.500 rpm und RT abzentrifugiert (Multifuge™ X3R).

4.1.5 Isolation von murinen Milzzellen

In diesem Schritt wurden die Milzzellen junger Mäuse jeweils komplett für die nachfolgende Zellseparation verwendet, um eine ausreichend große Ausbeute aus den kleinen Organen zu erzielen. Die Milzzellen der älteren Mäuse wurden nach der Zählung in zwei gleich große Fraktionen aufgeteilt und getrennt weiterverarbeitet. Das Milzgewebe wurde zu Beginn mit dem Kolben einer Einmalspritze durch ein 70 µm-Zellsieb gedrückt, das mit PBS gespült wurde, und in einem 50 ml-Röhrchen aufgefangen. Rote Blutzellen konnten durch eine Behandlung mit 5 ml ACK-Lyse-Puffer für 5 min bei RT lysiert werden. Das Abstoppen erfolgte durch Auffüllen der Einzelzellsuspension mit PBS auf 50 ml. Bei der anschließenden Zentrifugation mit 1.500 rpm für 5 min bei RT (Multifuge™ X3R) bildeten die Milzzellen ein Pellet, das, nachdem der Überstand verworfen wurde, zur Zellzahlbestimmung in 10 ml PBS aufgenommen wurde. Bis zur weiteren Verarbeitung lagerten die Proben auf Eis.

4.1.6 Isolation von murinen Knochenmarkszellen

Zur Gewinnung von Knochenmarkszellen wurden den Versuchstieren die großen Röhrenknochen (Humerus, Radius, Femur und Tibia) entnommen. Im Anschluss wurden diese weitestgehend von Muskel- und Sehnenresten befreit und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis in RPMI gelagert. Die Knochen wurden nach einer einminütigen Behandlung mit 70 %igem Ethanol in PBS überführt. Im nächsten Schritt wurde mit einer Schere das distale und proximale Ende der Knochen knapp unterhalb der Epiphyse entfernt. Mithilfe einer RPMI-befüllten Spritze und einer aufgesetzten 26G-Kanüle wurde der Knochenschaft durchgespült und das Medium mit den Knochenmarkszellen in einem 50 ml-Röhrchen aufgefangen. Es folgte eine Zentrifugation für 7 min mit 1.200 rpm bei RT (Multifuge™ X3R). Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in RPMI mit Zusatz aufgenommen. Die Zellsuspension wurde zur Entfernung möglicher Knochensplitter durch ein 100 µm-Zellsieb gefiltert. Die Zentrifugation erfolgte wie zuvor beschrieben. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zur Zellzahlbestimmung in 10 ml DMEM aufgenommen. Die gewonnene Zellsuspension diente als Grundlage der Monozyten-Isolation.

4.1.7 Anreicherung von Immunzellsubpopulationen durch magnetische Zellseparation (MACS)

Immunzellen bilden in Abhängigkeit von ihrem Subtyp und Differenzierungsgrad charakteristische Oberflächenmarker, sog. *Cluster of differentiation*, aus (abgekürzt CD) (s. Abb. 4-3). Dies kann zur Separation von Zellpopulationen genutzt werden. Die magnetische Zellseparation (MACS) ist eine Methode, bei der Antikörper, die an Magnetbeads gekoppelt und gegen zelltypische Oberflächenmoleküle gerichtet sind, eingesetzt werden. Die auf diese Weise magnetisch markierten Zellen werden auf eine Säule pipettiert, die in einem Magnetfeld platziert wird. Hierbei ist eine Positiv- von einer Negativ-Selektion zu unterscheiden. Im ersten Fall werden die gesuchten Zellen magnetisch markiert, sodass diese zunächst in der Trennsäule verbleiben. Später werden diese nach Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld mithilfe eines geeigneten Puffers eluiert. Im zweiten Fall werden hingegen die irrelevanten Zellen an magnetische Beads gekoppelt, sodass sich die gewünschten Zellen bereits im ersten Durchlauf befinden.

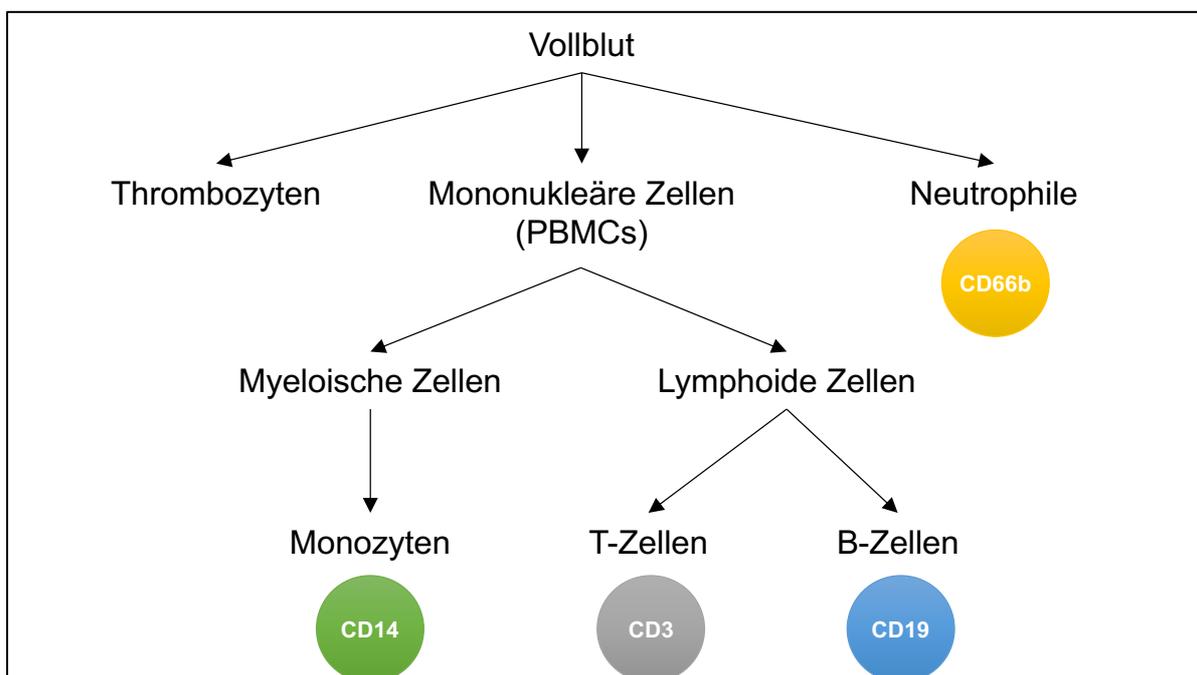


Abb. 4-3: Ausgewählte Immunzellen und ihre spezifischen Oberflächenmoleküle
Eigene Darstellung mittels Microsoft PowerPoint.

4.1.7.1 Positive Selektion von humanen T- und B-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten

Um CD3⁺ T-Lymphozyten, CD19⁺ B-Lymphozyten, CD14⁺ Monozyten und CD66b⁺ Granulozyten aus den Zellsuspensionen zu isolieren, kamen *MicroBeads* gegen das jeweilige Epitop zum Einsatz. Das Zellpellet wurde zuerst in einem 50 ml-Röhrchen in MACS-Puffer aufgenommen (s. Tab. 4-1). Zur homogenen Zellsuspension wurden die *MicroBeads* pipettiert und der Ansatz anschließend gut durchmischt (s. ebenda). Die Inkubation verlief unter regelmäßigem Schwenken für 30 min bei 4°C. Darauf folgte die Zentrifugation der mit Waschpuffer auf 5 ml aufgefüllten Probenröhrchen für 5 min bei 1.500 rpm und RT (Multifuge™ X3R). Nach Abnehmen und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet erneut in MACS-Puffer resuspendiert. Die Zell-Bead-Mischung wurde anschließend auf die Trennsäule (im Magneten) gegeben, nachdem diese mit 5 ml MACS-Puffer vorgespült wurde. Nach zweimaligem Nachspülen mit jeweils 5 ml MACS-Puffer wurden die Trennsäulen aus dem Magneten entfernt und auf ein 15 ml-Röhrchen gesetzt, um die gewünschten Zellen zu eluieren. Die Trennsäulen wurden mit 5 ml MACS-Puffer aufgefüllt. Mithilfe eines Kolbens konnten die Zellen aus der Säule gedrückt und aufgefangen werden. Die Zellsuspension wurde abschließend für 5 min bei 1.500 rpm und RT (Multifuge™ X3R) zentrifugiert, das entstandene Zellpellet in 100-200 µl 1x RIPA-Puffer aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die Monozyten wurden zuvor für die spätere Differenzierung zu Makrophagen in zwei gleich große Fraktionen aufgeteilt. Herstellerbedingt war bei den murinen T-Lymphozyten ein Zwischenschritt erforderlich. Bevor die Zellen mit den *Beads* behandelt werden konnten, wurden sie in Puffer aufgenommen, ein Antikörper zugesetzt und die Probe wurde unter mehrmaligem Schwenken für 10 min bei RT inkubiert (s. Tab. 4-2). Am Ende der Inkubationszeit wurde das Gemisch auf 5 ml mit MACS-Puffer aufgefüllt und wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Nachdem das Zellpellet in frischem MACS-Puffer resuspendiert wurde, kamen die *MicroBeads* mit einem anschließenden Inkubationsschritt von 10 min bei RT hinzu (s. ebenda). Die Auftrennung auf der Säule verlief identisch.

Substrat	Vol. MACS-Puffer (pro $1 \cdot 10^7$ Zellen)	Vol. <i>MicroBeads</i> (pro $1 \cdot 10^7$ Zellen)
CD3	80 μ l	20 μ l
CD14	80 μ l	20 μ l
CD19	80 μ l	20 μ l
CD66b	80 μ l	20 μ l

Tab. 4-1: Volumina für die magnetische Zellseparation von humanen T- und B-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten

Substrat	Vol. MACS-Puffer (pro $1 \cdot 10^7$ Zellen)	Vol. Ak (pro $1 \cdot 10^7$ Zellen)	Vol. <i>MicroBeads</i> (pro $1 \cdot 10^7$ Zellen)
CD3	100 μ l	20 μ l	20 μ l

Tab. 4-2: Volumina für die magnetische Zellseparation von murinen T-Lymphozyten

4.1.7.2 Negative Selektion von murinen naiven B-Lymphozyten

Zuerst wurde das Zellpellet in einem 50 ml-Röhrchen in MACS-Puffer resuspendiert (s. Tab. 4-3). Der homogenen Zellsuspension wurde anschließend der biotinylierte Antikörper zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug 10 min auf Eis. Der Mischung wurde ein weiteres Mal MACS-Puffer zugesetzt und dann wurden die Anti-Biotin-*MicroBeads* zugegeben (s. ebenda). Es erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt unter regelmäßigem Aufschütteln der Probe für 20 min auf Eis. Gegen Ende der Inkubationszeit wurde die Trennsäule (im Magneten) mit 4 ml MACS-Puffer gespült und der Zell-Bead-Mischung wurden weitere 2 ml MACS-Puffer zugesetzt. Die Mischung wurde auf die Trennsäule pipettiert und einmal mit 5 ml MACS-Puffer nachgespült. Das Röhrchen mit den aufgefangenen naiven B-Zellen wurde danach 5 min bei 1.500 rpm und RT zentrifugiert (Multifuge™ X3R). Die Zellen wurden in 100-200 μ l des 1x RIPA-Puffer-Gemischs resuspendiert, nachdem der Überstand entfernt wurde. Die Suspension lagerte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C . Die in der Trennsäule zurückgehaltenen Zellen wurden verworfen.

Substrat	Vol. MACS-Puffer (pro $1 \cdot 10^7$ Zellen)	Vol. Ak (pro $1 \cdot 10^7$ Zellen)	Vol. <i>MicroBeads</i> (pro $1 \cdot 10^7$ Zellen)
CD19	40 μ l	10 μ l	20 μ l

Tab. 4-3: Volumina für die magnetische Zellseparation von murinen B-Lymphozyten

4.1.7.3 Negative Selektion von murinen Monozyten aus Knochenmarkszellen

Die Zellen wurden in einem 50 ml-Röhrchen in MACS-Puffer resuspendiert (s. Tab. 4-4). Anschließend wurden 25 µl der FcR-Blocklösung und der biotinylierte Antikörper zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug 10 min auf Eis. Danach wurden die Proben mit 10 ml MACS-Puffer aufgefüllt und für 5 min bei 1.500 rpm und RT zentrifugiert (Multifuge™ X3R). Das Pellet wurde in frischen Puffer aufgenommen, sodass dann die *MicroBeads* zugesetzt werden konnten. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 20 min auf Eis. Die Auftrennung auf der Säule und die nachfolgende Konservierung der Proben verlief wie unter Kap. 4.1.7.1 beschrieben. Die Monozyten wurden für die spätere Differenzierung zu Makrophagen in zwei gleich große Fraktionen aufgeteilt.

Substrat	Vol. MACS-Puffer (pro $5 \cdot 10^7$ Zellen)	Vol. Ak (pro $5 \cdot 10^7$ Zellen)	Vol. MicroBeads (pro $5 \cdot 10^7$ Zellen)
CD14	175 µl	50 µl	100 µl

Tab. 4-4: Volumina für die magnetische Zellseparation von murinen Monozyten

4.1.8 In-Vitro-Differenzierung und Isolation von Makrophagen

Nach Isolation und Aufreinigung der Monozyten wurden diese in 4 ml Differenzierungsmedium aufgenommen, auf einer unbeschichteten Petrischale ausgebracht und für sieben Tage im Brutschrank kultiviert (s. Abb. 4-4). Durch Zusetzen von löslichem CSF-1 (10 ng/ml) konnte eine Differenzierung in Makrophagen erreicht werden. Der Mediumwechsel erfolgte nach vier Tagen. Diesem ging eine optische Kontrolle der Zellviabilität unter dem Mikroskop voraus. Das verbrauchte Medium wurde abgenommen und durch frisches Differenzierungsmedium ersetzt. Am letzten Tag wurde der Überstand mit den nicht-adhären Zellen jeder Petrischale abgenommen und bei 1.500 rpm und RT für 5 min zentrifugiert (Multifuge™ X3R). Das entstandene Zellpellet wurde in etwa 100 µl 1x RIPA-Puffer aufgenommen und auf Eis zwischengelagert. Die adhären Zellen konnten durch Zugabe von 100 µl 1x RIPA-Puffer und mechanisch mit einer Pipettenspitze abgelöst werden. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurde der Überstand der Petrischalen abgenommen und mit der entsprechenden Probe auf Eis zusammengeführt. Die homogene Zellsuspension wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C kryokonserviert.

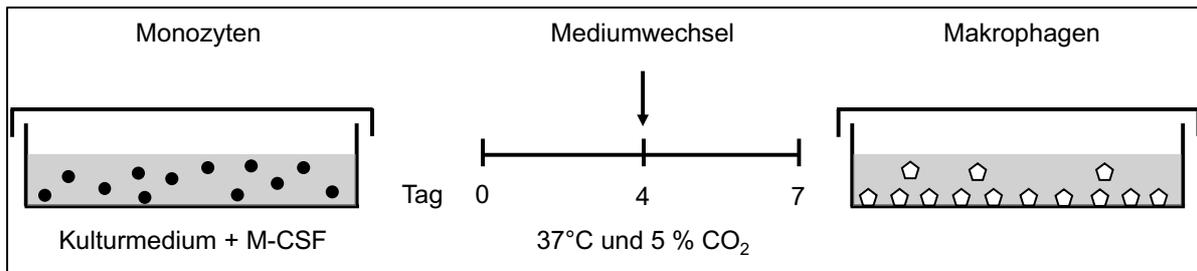


Abb. 4-4: Schematische Darstellung der in-vitro-Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen
Eigene Darstellung mittels Microsoft PowerPoint.

4.2 Analytische Methoden

4.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Protein Assay

Der Proteingehalt der Proben wurde kolorimetrisch mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™) bestimmt. Das Prinzip basiert auf der Reduktion von zweiwertigen Kupferionen in alkalischem Milieu, die in Anwesenheit von Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden (158). Zum Vergleich wurde den Proben ein Proteinstandard bestehend aus BSA-Lösungen in serieller Verdünnung gegenübergestellt. In eine 96-Well-Platte wurden zunächst 25 µl der Standards und eine negative Blindprobe jeweils in Doppelbestimmung pipettiert, gefolgt von je 5 µl der zu untersuchenden Proben. Die Proben wurden mit 20 µl 1x RIPA-Puffer auf ein Volumen von 25 µl gebracht. Pro Well wurden anschließend 200 µl des *work reagent* zugesetzt, wobei Stammlösung B zuvor in Stammlösung A im Verhältnis von 1:50 zu verdünnen war. Die Platte wurde mit einem *Plate Sealer* abgedeckt und für 30 min bei 37°C auf dem Thermomischer (Eppendorf Thermomixer comfort) inkubiert. Nachdem die Platte auf RT abgekühlt war, wurde die Absorption photometrisch bei 550 nm im *Microplate Reader* (Appliskan®) gemessen.

4.2.2 Western Blot

Der Western Blot ist eine Nachweismethode, die auf der Erkennung des Zielproteins durch einen spezifischen Antikörper beruht (159). Hierbei wird das zu analysierende Probengemisch vorher mithilfe einer SDS-PAGE entsprechend der Molekülmasse aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (160) und das Zielprotein nach Behandlung mit einem spezifischen primären und sekundären Antikörper via Chemolumineszenz in einem geeigneten Detektionssystem nachgewiesen (161).

4.2.2.1 Herstellung der Polyacrylamid-Gele für die SDS-PAGE

In Vorbereitung der SDS-PAGE wurden zu Beginn Polyacrylamid-Gele gegossen. Sammel- und Trenngel unterschieden sich in ihrer Acrylamid-Konzentration, wodurch deren Porengröße variiert wurde. Um mögliche Rückstände am Bio-Rad® Equipment zu entfernen, erfolgte zunächst eine gründliche Reinigung mit 70 %igem Ethanol. Danach wurden *Spacer* und *Short Plate* in den Gel-Gießrahmen gemäß Herstelleranleitung eingespannt. Die zur Herstellung benötigten Reagenzien wurden nacheinander in getrennte 50 ml-Röhrchen pipettiert und invertiert (s. Tab. 4-5 und Tab. 4-6). Nun konnte die Trenngellösung zügig zwischen die Glasplatten pipettiert werden.

30 % AA	1,5 M TRIS	ddH ₂ O	10 % SDS	10 % APS	TEMED
2,7 ml	2,5 ml	4,6 ml	100 µl	100 µl	8 µl

Tab. 4-5: Zusammensetzung des Trenngels
Es wurde ein 8 %iges Acrylamid-Trenngel verwendet.

Das Trenngel wurde mit ddH₂O überschichtet, um einen geraden Abschluss zu erreichen. Die Polymerisationszeit der Gele betrug etwa eine halbe Stunde. Danach konnte das ddH₂O abgekippt und über das Trenngel die Sammelgellösung pipettiert werden. Im letzten Schritt wurde ein Kamm für die Probenaschen zwischen *Spacer* und *Short Plate* blasenfrei eingesetzt. Dieser erzeugte Geltaschen für insgesamt zehn Proben.

30 % AA	0,5 M TRIS	ddH ₂ O	10 % SDS	10 % APS	TEMED
600 µl	375 µl	1,95 ml	30 µl	30 µl	5 µl

Tab. 4-6: Zusammensetzung des Sammelgels
Es wurde ein 6 %iges Acrylamid-Sammelgel verwendet.

4.2.2.2 Vorbereitung der Proben

Die zu untersuchenden Proben bestanden aus Zellsuspensionen, die zuvor mittels Zellseparation generiert wurden. Die in den Schritten zuvor kryokonservierten Proben wurden aufgetaut. Während der 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Lysate regelmäßig geschüttelt (Vortex-Genie™ 2). Anschließend wurden sie in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C für 15 min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R). Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und erneut durchmischt. Das Sediment wurde

verworfen. In einem Zwischenschritt erfolgte die Bestimmung des Proteingehaltes. Dadurch konnte für jede der zu analysierenden Proben die Auftragskonzentration berechnet werden. Nach Zugabe des SDS-haltigen Auftragspuffers (Bio-Rad® Laemmli Sample Buffer (4x)) und 1 mM DDT zur Reduktion von Disulfidbrückenbindungen erfolgte bei 95°C die Denaturierung und Linearisierung der Proteine im Thermomischer (Eppendorf Thermomixer comfort) für 10 min.

4.2.2.3 Auftrennung des Proteingemisches mittels Gel-Elektrophorese

Der Auftrennung nach der Molekülmasse diente eine SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE). Dafür wurden die Proben in Anwesenheit von SDS und DDT hitzedenaturiert, wobei die Proteine eine negative Gesamtladung erhielten und im elektrischen Feld ausschließlich nach ihrem spezifischen Molekulargewicht (in kDa) aufgetrennt wurden (162). Im ersten Schritt wurde die Gekassette nach Herstellerangabe in die Elektrophoreseapparatur (Bio-Rad®) eingebaut. Die Elektrodenkammer wurde mit 1x Elektrophoresepuffer befüllt. Der Probenauftrag erfolgte, nachdem die Kämme für die Probenaschen aus dem auspolymerisierten Gel entfernt wurden. Der Gellauf wurde mit 90 V gestartet (Bio-Rad® PowerPac™ Universal), bis die Lauffront das Trenngel erreichte. Anschließend wurde auf 130 V erhöht. Neben den zu untersuchenden Proben wurden ein Marker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder) und eine Positivkontrolle aufgetragen. Die Elektrophorese wurde abgestoppt, als sich die Lauffront wenige Millimeter vor dem unteren Ende der Glasplatten befand. Nach beendeter SDS-PAGE wurde das Gel aus der Apparatur entfernt, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel bis zum folgenden Schritt in Blotpuffer inkubiert.

4.2.2.4 Transfer der Proteine auf eine Membran

Die Blot-Apparatur der Firma Bio-Rad® wurde nach Anleitung des Herstellers aufgestellt. Zuvor wurden die Nitrozellulosemembranen, die Filterpapiere und die Schwammtücher für 30 min in 1x Blotpuffer bei 4°C inkubiert. Der Aufbau des *Blotting-Sandwich* erfolgte nach folgendem Schema:

(+)-Pol	Kunststoffgitter
	Schwammtuch
	Filterpapier
	Nitrozellulosemembran (0,2 µm)
	Gel
	Filterpapier
	Schwammtuch
(-)-Pol	Kunststoffgitter

Die Entfernung möglicher Luftblasen zwischen Gel und Membran gelang durch mehrmaliges Ausrollen mit einem Röhrchen. Danach wurde das *Blotting-Sandwich* zusammengepresst, wobei die Gitter miteinander verriegelt und die Gel-Kassetten in die entsprechenden Halteschienen im Puffertank eingesetzt wurden. Anschließend wurde der Puffertank der Blot-Apparatur mit 1x Blotpuffer (4°C) bis zur Markierung befüllt. Die *Blotting*-Dauer betrug 1 h und 45 min bei 100 V (Bio-Rad® PowerPac™ Universal) auf Eis. Nach etwa der Hälfte der Zeit wurde das Kühlaggregat gewechselt, um entstehende Reaktionswärme abzufangen.

4.2.2.5 Ladekontrolle

Als Ladekontrolle bezeichnet man Proteine, die konstitutiv, das heißt unabhängig von Zelltyp und Differenzierungsstadium, exprimiert werden. Dies soll gewährleisten, dass der Transfer der Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf die Nitrozellulosemembran gleichmäßig abläuft. In dieser Arbeit wurde β -Actin als Ladekontrolle eingesetzt. β -Actin ist ein 43 kDa schweres Protein, das bei einer Vielzahl von physiologischen Zellfunktionen eine Rolle spielt, wie zum Beispiel bei der Zytokinese und der Mitose.

4.2.2.6 Membranfärbung

Nach dem *Wetblot* erfolgte eine temporäre Anfärbung aller auf der Membran befindlichen Proteine mittels Ponceau-Rot. Diese erlaubte eine Überprüfung der Vollständigkeit des Transfers nach dem Blot-Vorgang (163). Gleichzeitig diente sie der Fixierung der Proteine auf der Nitrozellulosemembran durch die enthaltene Trichloressigsäure (164). Die Membranen wurden hierfür 5 min bei RT in 35 ml Ponceau S-Fertiglösung kontinuierlich geschwenkt. Durch anschließendes Schwenken in ddH₂O für 1 min konnten diese von überschüssiger Färbelösung befreit

werden. Danach wurden mit dem ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad®) und der Software Quantity One® (Bio-Rad®) Aufnahmen von den feuchten Membranen angefertigt und als TIF-Datei gespeichert. Auf diese Art konnten die gemessenen Proteinkonzentrationen der Zielproteine beim folgenden spezifischen Nachweis mit dem Gesamtproteingehalt verglichen werden. Abschließend erfolgte das Waschen in ddH₂O bis zur vollständigen Entfernung der Rotfärbung.

4.2.2.7 Proteindetektion

Die Proteindetektion erfolgte mittels Primär- und Sekundärantikörpern in einem mehrstufigen Prozess. Nach diesem Prinzip bindet der Primärantikörper an die Zielstruktur auf der Nitrozellulosemembran. Der Sekundärantikörper (HRP-gekoppelt) erkennt wiederum den Primärantikörper. Durch die HRP-Aktivität des Zweitantikörpers wird das Substrat der Entwicklerlösung enzymatisch umgesetzt. Dieser Vorgang kann nach Anregung mit ultraviolettem Licht detektiert werden. Um überschüssige Proteinbindestellen auf den Membranen abzusättigen und dadurch unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden sie vor der Antikörperinkubation für 1 h bei RT auf dem Plattformschüttler (Heidolph Duomax 2030) mit einem Gemisch aus 1x TBS/T und 5 % Milchpulver behandelt.

Primärantikörper

Pro Membran wurden 5 ml Verdünnungspuffer in einem 50 ml-Röhrchen vorgelegt und dazu das entsprechende Volumen Primärantikörper pipettiert (s. Tab. 4-7). Daraufhin erfolgte die Inkubation der Membranen im Röhrchen bei 4°C O/N auf dem Rollenmischer (RM5). Es folgten mehrere Schritte, um das überschüssige Primärantikörpergemisch abzuwaschen: zweimal 10 min und zweimal 3 min in jeweils 30 ml 1x TBS/T auf dem Plattformschüttler (Heidolph Duomax 2030).

METHODEN

Substrat	Wirtsspezies	Konz.	Verdünnungspuffer
PTP ζ human	<i>rat</i>	1:400	5 % Milchpulver in 1x TBS/T
PTP ζ murin	<i>mouse</i>	1:400	5 % Milchpulver in 1x TBS/T
β -Actin	<i>rabbit</i>	1:5.000	5 % Milchpulver in 1x TBS/T

Tab. 4-7: Herstellung der Primärantikörperlösung

Sekundärantikörper

Der Sekundärantikörper ist gegen die Wirtsspezies des Primärantikörpers gerichtet (s. Tab. 4-8). Die Herstellung der Sekundärantikörperlösung und das Waschen der Membranen erfolgte wie oben beschrieben. Die Membranen wurden in einem neuen 50 ml-Röhrchen mit dem Sekundärantikörpergemisch für 1 h bei RT auf dem Rollenmischer (RM5) behandelt.

Substrat	Wirtsspezies	Konz.	Verdünnungspuffer
<i>anti-rat</i>	<i>goat</i>	1:5.000	5 % Milchpulver in 1x TBS/T
<i>anti-mouse</i>	<i>horse</i>	1:5.000	5 % Milchpulver in 1x TBS/T
<i>anti-rabbit</i>	<i>goat</i>	1:5.000	5 % Milchpulver in 1x TBS/T

Tab. 4-8: Herstellung der Sekundärantikörperlösung

4.2.2.8 Chemolumineszenz und Bildentwicklung

Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgten mehrere Waschschritte. Die feuchten Membranen wurden aus der Inkubationsschale entnommen und auf einer transparenten Folie platziert. Überschüssige Waschlösung konnte durch das Anlegen eines Zellstofftuches an den Kanten der Membran ablaufen. Im folgenden Arbeitsgang wurden die beiden Lösungen des Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific™) im gleichen Verhältnis miteinander vermischt (jeweils 500 μ l) und das gesamte Volumen auf die Membran pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 min bei RT wurde die übrige Entwicklerlösung über eine Kante mit einem Zellstofftuch aufgefangen und die Membran mit einer zweiten OHP-Folie luftblasenfrei abgedeckt. In Vorbereitung der Bildentwicklung wurden zunächst einige Einstellungen am Detektionsgerät ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad®) optimiert (Zoom, Fokus, Blende). Zum

Nachweis des Antikörpers gegen PTP ζ wurden die Membranen insgesamt 720 sec belichtet, wobei durch die Software Quantity One[®] (Bio-Rad[®]) in 120 sec-Schritten ein digitales Foto aufgenommen wurde. Zur Detektion der Referenzproteine erfolgte die Belichtung für insgesamt 360 sec. Alle 60 sec wurde ein Foto gespeichert.

4.2.2.9 Datenanalyse

Die quantitative Analyse der Western Blots erfolgte mithilfe der Software Image Lab[™] (Bio-Rad[®]). Dazu wurden die im vorherigen Schritt generierten Blot-Aufnahmen in das Programm importiert. Über die entsprechenden Werkzeuge wurden die Spuren und die interessierenden Banden definiert. Die Bandenintensität wurde densitometrisch ermittelt. Die Zahlenwerte wurden in einer Excel-Tabelle zusammengestellt und für die weitere Betrachtung exportiert. Zur Ermittlung der Gesamtproteinmenge wurde die Ponceau-Färbung herangezogen. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). Über die Software wurden die Maßzahlen (Mittelwert, Standardfehler) berechnet. Für die Analyse wurde die relative Expression bezogen auf die Gesamtproteinmenge sowie bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe betrachtet. Die statistische Testung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test, bei dem ein Signifikanzniveau von 5 % ($p=0,05$) angesetzt wurde.

5 Ergebnisse

5.1 PTP ζ -Expression in humanen Immunzellen im Western Blot

Um eine mögliche Rolle von PTP ζ in der Pathogenese des SLE zu untersuchen, ist es erforderlich, die Zelltypen zu identifizieren, die PTP ζ exprimieren. Hierfür wurde zunächst die Expression des Rezeptors auf humanen Immunzellen in einer qualitativen Analyse untersucht. Als Stichprobe diente das untersuchte Kollektiv aus SLE-Patienten und eine gesunde Vergleichsgruppe von jeweils vier Probanden. Hierzu wurden humane PBMCs aus EDTA-Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Anschließend wurden T-Zellen, B-Zellen und Monozyten aus den PBMCs durch magnetische Zellseparation (MACS) angereichert. Makrophagen wurden aus den Monozyten *in vitro* ausdifferenziert (sieben Tage, 10 ng/ml CSF-1). Die Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert. Das Proteingemisch der jeweiligen Zellisolate wurde anhand des Molekulargewichts in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Membran geblottet. PTP ζ und β -Actin wurden mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Die PTP ζ -Expression wurde relativ zur gesunden Kontrollgruppe angegeben. Die Gesamtproteinmenge wurde mittels Ponceau S-Färbung quantifiziert (Daten nicht gezeigt). Für die Western Blot-Analyse wurden 20 μ g verwendet. Die Ergebnisse nach Western Blotting sind in Abb. 5-1 dargestellt.

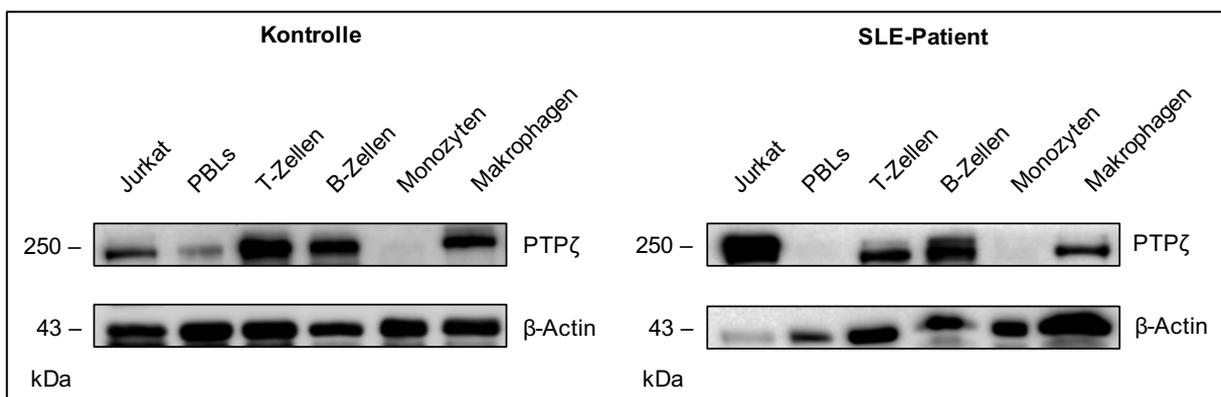


Abb. 5-1: PTP ζ -Expression in humanen Immunzellpopulationen auf Proteinebene

Aufgetragen sind jeweils die Zellpopulationen aus einer Patientenprobe. PTP ζ und β -Actin wurden durch Antikörper nachgewiesen. Die Proteinmenge betrug 20 μ g. Es wurde aus jeder Versuchsgruppe ein Exemplar zur repräsentativen Darstellung der Ergebnisse ausgewählt. β -Actin diente als Ladekontrolle, Jurkat-Zellen als Positivkontrolle. Links: Kontrollgruppe, rechts: Studienpopulation (SLE-Patienten).

Aufgrund der detektierten Banden bei 250 kDa in Abb. 5-1 ist davon auszugehen, dass PTP ζ in humanen Individuen sowohl in Immunzellen gesunder Probanden als auch in denen von SLE-Patienten exprimiert wurde. Dabei konnte PTP ζ in allen untersuchten

Subgruppen nachgewiesen werden. Ein deutlich positives Signal fand sich bei T- und B-Zellen sowie bei Makrophagen. Schwach-positive Signale wurden bei PBLs und Monozyten detektiert. Ein ähnliches Schema konnte in allen Western Blots der beiden Vergleichsgruppen nachgewiesen werden. In der humanen Versuchsreihe dienten Jurkat-Zellen als Positivkontrolle.

5.2 Veränderung der PTP ζ -Expression in humanen Immunzellen

Im zweiten Schritt galt es, die einzelnen Immunzellpopulationen zu betrachten, um mögliche Unterschiede zwischen den untersuchten Kollektiven hinsichtlich des PTP ζ -Expressionsmusters zu quantifizieren. Hierzu dienten Western Blot-Analysen. Die Ergebnisse sind in den Abb. 5-2 bis Abb. 5-6 dargestellt. Die Isolation von humanen Granulozyten wurde nach anfänglichen Versuchen nicht fortgeführt, da sich in dieser Subgruppe keine quantifizierbaren Signale detektieren ließen. Die β -Actin-Banden zeigten innerhalb der betrachteten Zelllinien trotz normierter Proteinmenge über alle Proben hinweg Intensitätsunterschiede. Dies legte den Schluss nahe, dass β -Actin nicht konstant exprimiert wurde. Bei näherer Betrachtung des SLE-Kollektivs fiel auf, dass zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine erhöhte Krankheitsaktivität mit einer entsprechenden medikamentösen Therapie vorlag. So fanden sich bei allen Patienten Immunsuppressiva, wie Azathioprin, Methotrexat oder Mycophenolat-Mofetil. Dies ließ über einen zytoreduktiven Effekt eine verminderte β -Actin-Expression vermuten.

PBLs

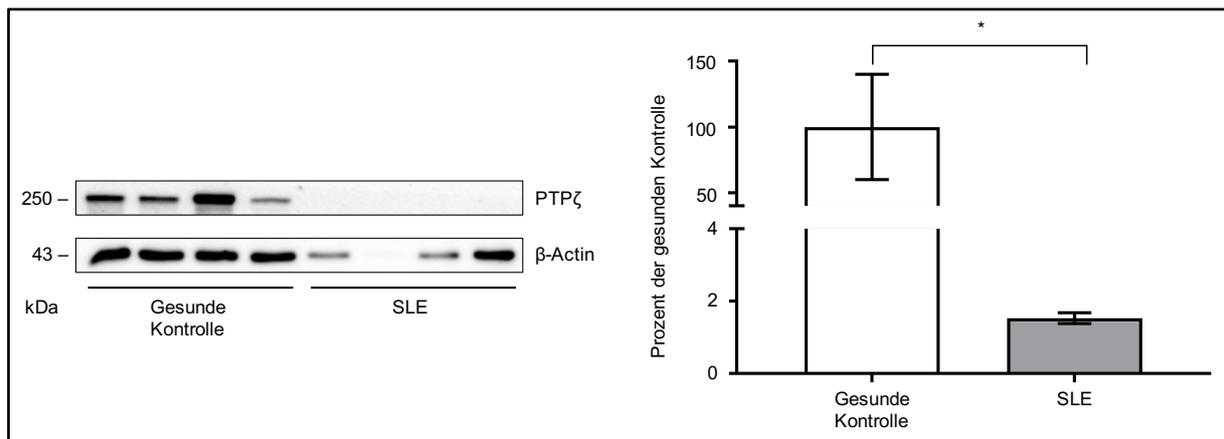


Abb. 5-2: PTPζ-Expression in humanen PBLs

PBLs wurden aus EDTA-Blut mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation isoliert und in RIPA-Puffer lysiert. PTPζ und β-Actin wurden durch Antikörper nachgewiesen. Das Gesamtprotein wurde mittels Ponceau S-Färbung quantifiziert (Daten nicht gezeigt). Die aufgetragene Proteinmenge betrug 20 µg. Links: Qualitative Ergebnisse im Western Blot. Rechts: Graphische Darstellung der quantitativen Analyse. Die PTPζ-Expression wurde auf die Kontrollgruppe normiert (relative PTPζ-Expression). Eine Säule repräsentiert den Mittelwert mit Standardfehler. Die statistische Testung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (* $p < 0,05$). $n = 4$ pro Gruppe.

In humanen PBLs wurde PTPζ anhand einer Bande bei 250 kDa in allen untersuchten Proben nachgewiesen, wobei die Zellen der gesunden Kontrollgruppe eine stärkere Proteinexpression aufzeigen (s. Abb. 5-2). Die statistische Auswertung ergab bezogen auf die relative PTPζ-Expression einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der gesunden Kontrollgruppe ($n = 4$) und der Studienpopulation ($n = 4$).

T-Zellen

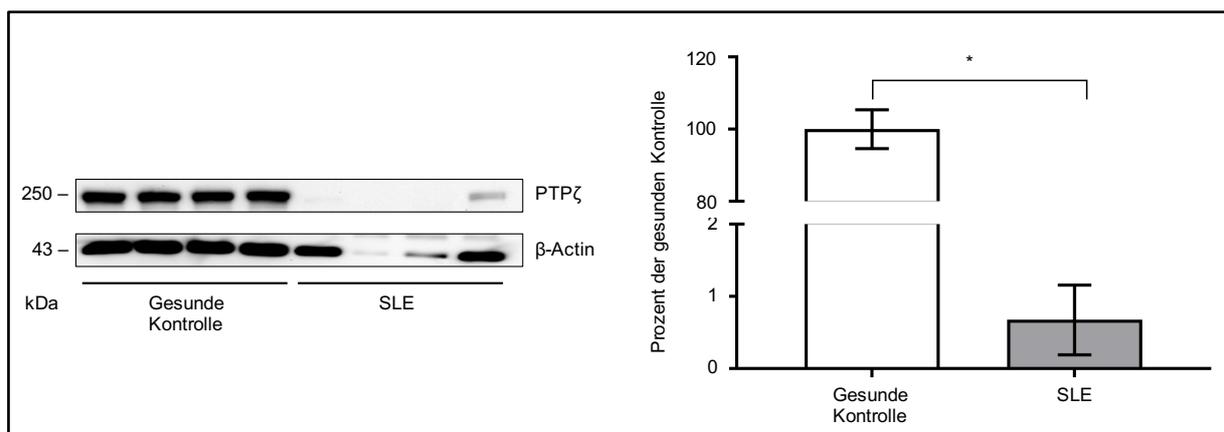


Abb. 5-3: PTPζ-Expression in humanen T-Zellen

T-Zellen wurden aus PBMCs mithilfe magnetischer Zellseparation (MACS) angereichert und in RIPA-Puffer lysiert. PTPζ und β-Actin wurden durch Antikörper nachgewiesen. Das Gesamtprotein wurde mittels Ponceau S-Färbung quantifiziert (Daten nicht gezeigt). Die aufgetragene Proteinmenge betrug 20 µg. Links: Qualitative Ergebnisse im Western Blot. Rechts: Graphische Darstellung der quantitativen Analyse. Die PTPζ-Expression wurde auf die Kontrollgruppe normiert (relative PTPζ-Expression). Eine Säule repräsentiert den Mittelwert mit Standardfehler. Die statistische Testung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (* $p < 0,05$). $n = 4$ pro Gruppe.

Die T-Zellen zeigten eine PTP ζ -Expression bei 250 kDa (s. Abb. 5-3), wobei die Expressionswerte in der gesunden Vergleichsgruppe höher ausgeprägt waren. Die statistische Testung ergab einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen dem Patientenkollektiv im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

B-Zellen

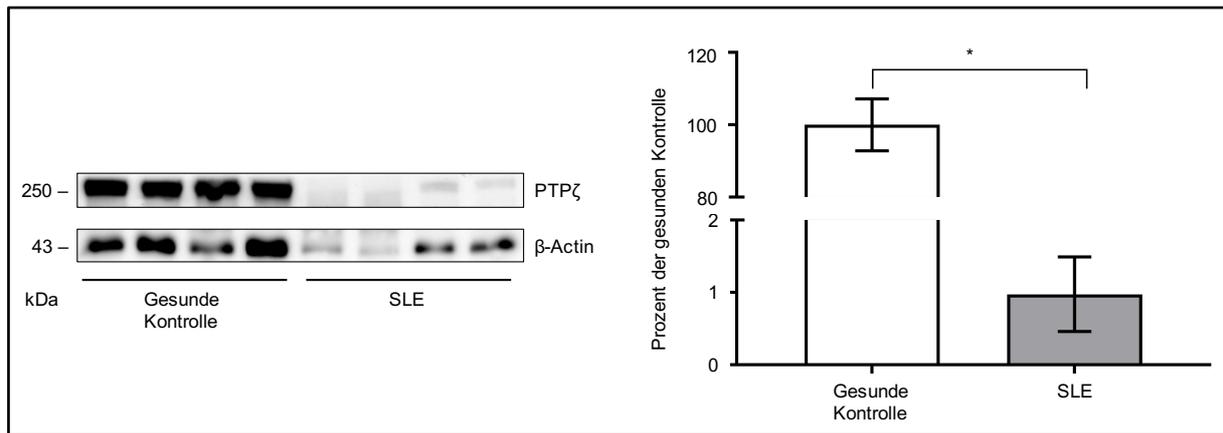


Abb. 5-4: PTP ζ -Expression in humanen B-Zellen

B-Zellen wurden aus PBMCs mithilfe magnetischer Zellseparation (MACS) angereichert und in RIPA-Puffer lysiert. PTP ζ und β -Actin wurden durch Antikörper nachgewiesen. Das Gesamtprotein wurde mittels Ponceau S-Färbung quantifiziert (Daten nicht gezeigt). Die aufgetragene Proteinmenge betrug 20 μ g. Links: Qualitative Ergebnisse im Western Blot. Rechts: Graphische Darstellung der quantitativen Analyse. Die PTP ζ -Expression wurde auf die Kontrollgruppe normiert (relative PTP ζ -Expression). Eine Säule repräsentiert den Mittelwert mit Standardfehler. Die statistische Testung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (* $p < 0,05$). $n = 4$ pro Gruppe.

In der humanen B-Zellfraktion fand sich bei allen Proben eine PTP ζ entsprechende Bande mit einem Molekulargewicht von 250 kDa (s. Abb. 5-4). Im Fall der vier SLE-Patienten war diese gering ausgeprägt, vergleichbar mit den Untersuchungen von T-Zellen. Die statistische Betrachtung ergab bezogen auf die relative PTP ζ -Expression einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen beiden Gruppen.

Monozyten

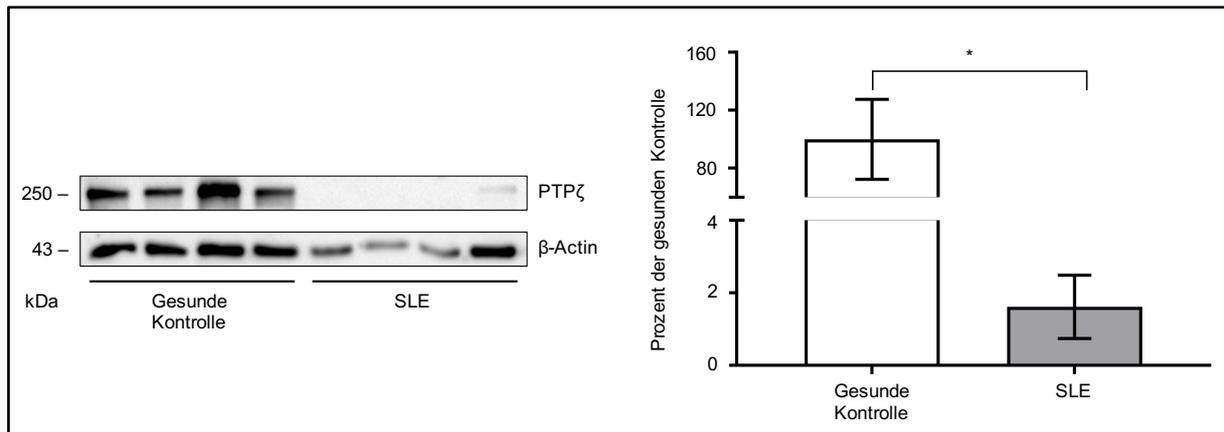


Abb. 5-5: PTPζ-Expression in humanen Monozyten

Monozyten wurden aus PBMCs mithilfe magnetischer Zellseparation (MACS) angereichert und in RIPA-Puffer lysiert. PTPζ und β-Actin wurden durch Antikörper nachgewiesen. Das Gesamtprotein wurde mittels Ponceau S-Färbung quantifiziert (Daten nicht gezeigt). Die aufgetragene Proteinmenge betrug 20 µg. Links: Qualitative Ergebnisse im Western Blot. Rechts: Graphische Darstellung der quantitativen Analyse. Die PTPζ-Expression wurde auf die Kontrollgruppe normiert (relative PTPζ-Expression). Eine Säule repräsentiert den Mittelwert mit Standardfehler. Die statistische Testung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (* $p < 0,05$). $n = 4$ pro Gruppe.

Auch in humanen Monozyten war eine Bande bei 250 kDa in allen untersuchten Proben detektierbar, jedoch mit unterschiedlicher Intensität zwischen den beiden Gruppen (s. Abb. 5-5). Die statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test ergab einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der gesunden Kontrollgruppe und der Studienpopulation.

Makrophagen

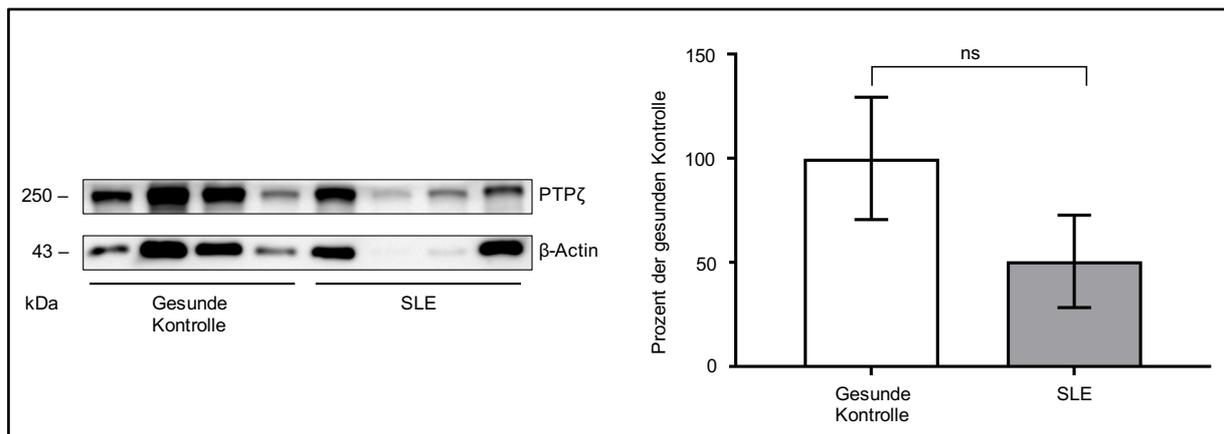


Abb. 5-6: PTPζ-Expression in humanen Makrophagen

Makrophagen wurden aus Monozyten *in vitro* ausdifferenziert (sieben Tage, 10 ng/ml CSF-1) und in RIPA-Puffer lysiert. PTPζ und β-Actin wurden durch Antikörper nachgewiesen. Das Gesamtprotein wurde mittels Ponceau S-Färbung quantifiziert (Daten nicht gezeigt). Die aufgetragene Proteinmenge betrug 20 µg. Links: Qualitative Ergebnisse im Western Blot. Rechts: Graphische Darstellung der quantitativen Analyse. Die PTPζ-Expression wurde auf die Kontrollgruppe normiert (relative PTPζ-Expression). Eine Säule repräsentiert den Mittelwert mit Standardfehler. Die statistische Testung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (ns = nicht signifikant). n=4 pro Gruppe.

Bei humanen Makrophagen kam in allen Spuren eine deutliche PTPζ-Bande bei 250 kDa zum Vorschein (s. Abb. 5-6). In der statistischen Betrachtung bestand zwischen den beiden Gruppen jedoch lediglich ein numerischer Unterschied (keine Signifikanz).

Granulozyten

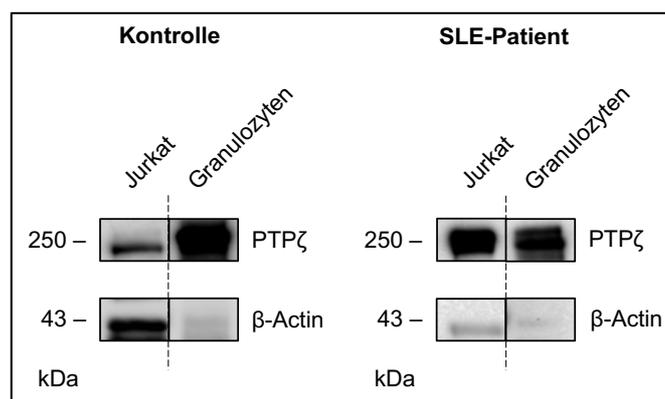


Abb. 5-7: PTPζ-Expression in humanen Granulozyten

Granulozyten wurden aus EDTA-Blut mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation isoliert, mittels magnetischer Zellseparation (MACS) angereichert und anschließend in RIPA-Puffer lysiert. PTPζ und β-Actin wurden durch Antikörper nachgewiesen. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 20 µg. Darstellung der qualitativen Ergebnisse im Western Blot (exemplarisch). β-Actin diente als Ladekontrolle, Jurkat-Zellen als Positivkontrolle. Links: Kontrollgruppe, rechts: Studienpopulation (SLE-Patienten).

Für humane Granulozyten konnten trotz mehrerer Durchläufe mit Variation der Bedingungen (Gewebehomogenisierung, Antikörperkonzentration) keine reproduzierbaren Signale erzeugt werden. Hierfür könnten autolytische Prozesse beziehungsweise Stress während der Zellisolation verantwortlich sein, die den Abbau von PTP ζ bedingen. In einem Übersichts-Blot zu Beginn der Versuchsreihe konnten dennoch einmalig deutliche Banden für PTP ζ bei humanen Granulozyten festgehalten werden (s. Abb. 5-7).

5.3 PTP ζ -Expression in murinen Immunzellen im Western Blot

Im Lupus-Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass der PTP ζ -Ligand IL-34 in MRL/lpr-Mäusen einen krankheitsfördernden Effekt hat (95). Um die Bedeutung von PTP ζ als Rezeptor in der Pathogenese des SLE zu untersuchen, wurde dessen Expression auf murinen Immunzellen untersucht. Es wurden Mäuse aus dem MRL/lpr-Mausstamm unterschiedlicher Altersstufen gegenübergestellt. Diese zeigen mit zunehmendem Alter ein Fortschreiten der Krankheitsaktivität. Dies wiederum erlaubt eine vergleichende Analyse der PTP ζ -Expression vor dem Hintergrund einer fortschreitenden Erkrankung im Mausmodell. Hierzu wurden T-Zellen und B-Zellen aus der Milz und Monozyten aus dem Knochenmark isoliert und durch magnetische Zellseparation (MACS) angereichert. Makrophagen wurden aus den Monozyten *in vitro* ausdifferenziert (sieben Tage, 10 ng/ml CSF-1). Die Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert. Das Proteingemisch der jeweiligen Zellisolate wurde anhand des Molekulargewichts in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Membran geblottet. PTP ζ und β -Actin wurden mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Die PTP ζ -Expression wurde relativ zur Referenzgruppe angegeben. Die Gesamtproteinmenge wurde mittels Ponceau S-Färbung quantifiziert (Daten nicht gezeigt). Für die Western Blot-Analyse wurden 40 μ g verwendet. Die qualitativen Ergebnisse nach Western Blotting sind in Abb. 5-8 dargestellt.

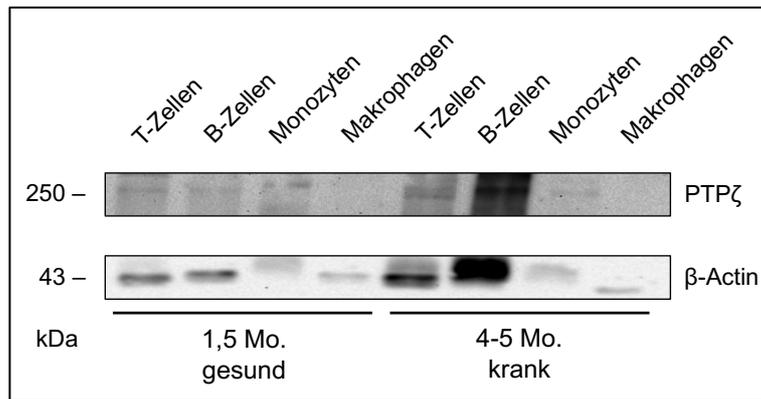


Abb. 5-8: PTP ζ -Expression in murinen Immunzellpopulationen

Aufgetragen sind jeweils die Zellpopulationen aus einer Maus. PTP ζ und β -Actin wurden durch Antikörper nachgewiesen. Die Proteinmenge betrug 40 μ g. Es wurde aus jeder Versuchsgruppe ein Exemplar zur repräsentativen Darstellung der Ergebnisse ausgewählt. β -Actin diente als Ladekontrolle, murines Hirn-Lysat als Positivkontrolle. Links: junges Versuchstier (vor Auftreten der Symptomatik, Referenzgruppe), rechts: reiferes Versuchstier (mit deutlicher Symptomatik).

Im Mausmodell konnte PTP ζ nicht in allen untersuchten Subgruppen nachgewiesen werden (s. Abb. 5-8). Ein positives Signal (250 kDa-Bande) fand sich bei T- und B-Zellen sowie bei Monozyten. Im Unterschied zum Menschen konnte PTP ζ in den murinen Makrophagen nicht detektiert werden. Dies traf sowohl auf junge als auch auf reifere Versuchstiere zu. Murines Hirn-Lysat diente als Positivkontrolle.

5.4 Korrelation der PTP ζ -Expression mit der Krankheitsaktivität im Mausmodell

Im Folgenden wurden T-Zellen, B-Zellen und Monozyten mittels Western Blot-Analyse dahingehend überprüft, ob die PTP ζ -Expression mit zunehmendem Alter hoch- oder herunterreguliert wird. Hierbei stellten die jungen Versuchstiere jeweils die Referenzgruppe dar. Die Ergebnisse sind in den Abb. 5-9 bis Abb. 5-11 dargestellt.

T-Zellen

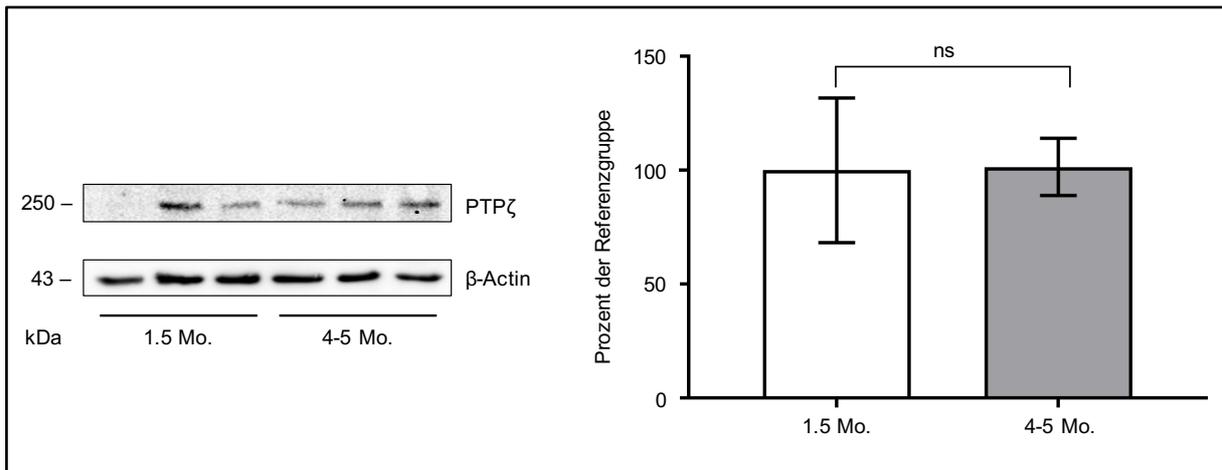


Abb. 5-9: PTPζ-Expression in murinen T-Zellen

T-Zellen wurden aus der Mausmilz isoliert, mithilfe magnetischer Zellseparation (MACS) angereichert und in RIPA-Puffer lysiert. PTPζ und β-Actin wurden durch Antikörper nachgewiesen. Das Gesamtprotein wurde mittels Ponceau S-Färbung quantifiziert (Daten nicht gezeigt). Die aufgetragene Proteinmenge betrug 40 µg. Links: Qualitative Ergebnisse im Western Blot. Rechts: Graphische Darstellung der quantitativen Analyse. Die PTPζ-Expression wurde auf die Referenzgruppe normiert (relative PTPζ-Expression). Eine Säule repräsentiert den Mittelwert mit Standardfehler. Die statistische Testung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (ns = nicht signifikant). n=3 pro Gruppe.

Im Vergleich von jungen und reifen Versuchstieren (je n=3) zeigte sich bei T-Zellen in beiden Gruppen eine PTPζ-Bande um 250 kDa (s. Abb. 5-9). In der statistischen Betrachtung ergab sich kein signifikanter Unterschied.

B-Zellen

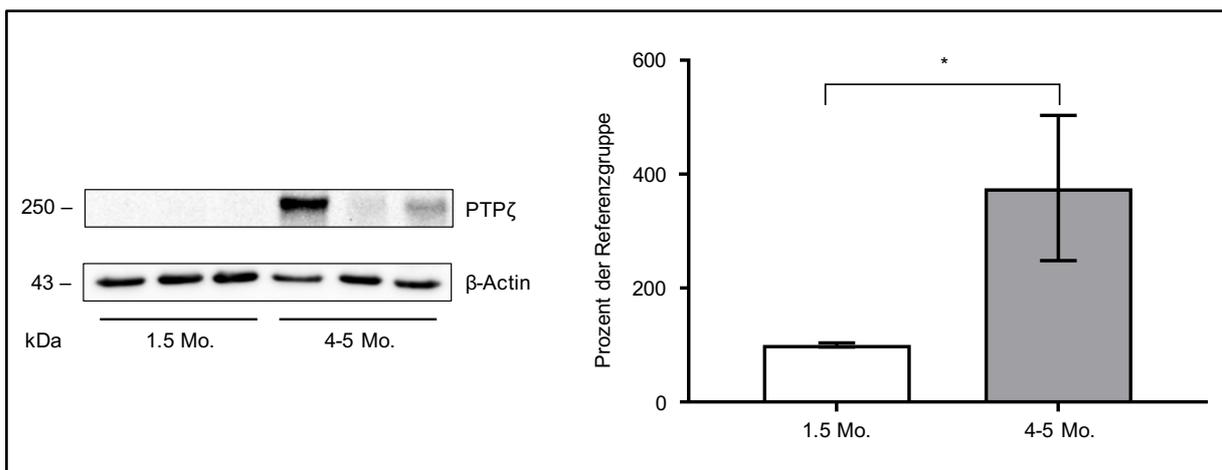


Abb. 5-10: PTPζ-Expression in murinen B-Zellen

B-Zellen wurden aus der Mausmilz isoliert, mithilfe magnetischer Zellseparation (MACS) angereichert und in RIPA-Puffer lysiert. PTPζ und β-Actin wurden durch Antikörper nachgewiesen. Das Gesamtprotein wurde mittels Ponceau S-Färbung quantifiziert (Daten nicht gezeigt). Die aufgetragene Proteinmenge betrug 40 µg. Links: Qualitative Ergebnisse im Western Blot. Rechts: Graphische Darstellung der quantitativen Analyse. Die PTPζ-Expression wurde auf die Referenzgruppe normiert (relative PTPζ-Expression). Eine Säule repräsentiert den Mittelwert mit Standardfehler. Die statistische Testung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (* p<0,05). n=5 pro Gruppe.

In der murinen B-Zellfraktion zeigte sich bei allen Proben eine schwach ausgeprägte, PTP ζ entsprechende Bande mit einem Molekulargewicht um 250 kDa (s. Abb. 5-10). Die statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test ergab einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den untersuchten Mausgruppen. Dies erlaubt die Annahme, dass PTP ζ in murinen B-Zellen mit zunehmender Krankheitsaktivität vermehrt exprimiert wird.

Monozyten

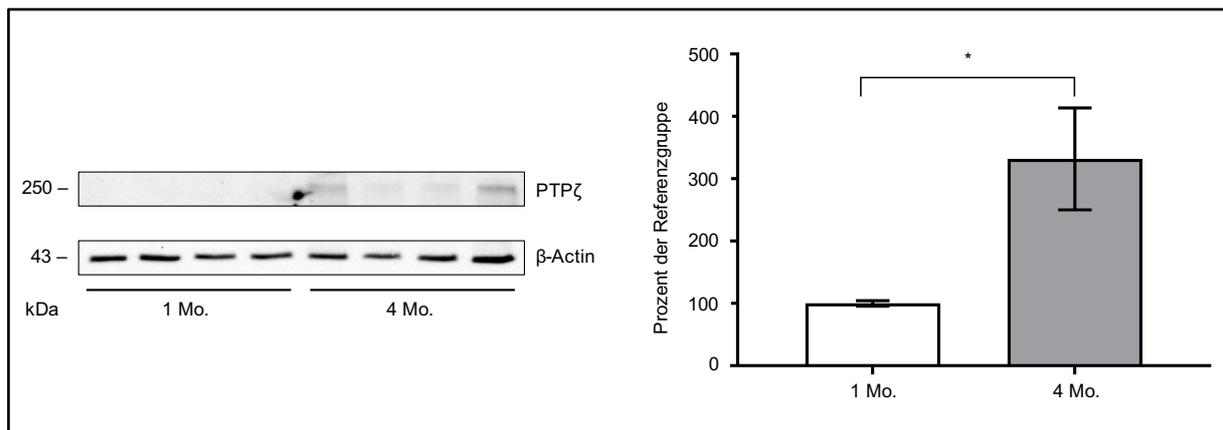


Abb. 5-11: PTP ζ -Expression in murinen Monozyten

Monozyten wurden aus dem Knochenmark isoliert, mithilfe magnetischer Zellseparation (MACS) angereichert und in RIPA-Puffer lysiert. PTP ζ und β -Actin wurden durch Antikörper nachgewiesen. Das Gesamtprotein wurde mittels Ponceau S-Färbung quantifiziert (Daten nicht gezeigt). Die aufgetragene Proteinmenge betrug 40 μ g. Links: Qualitative Ergebnisse im Western Blot. Rechts: Graphische Darstellung der quantitativen Analyse. Die PTP ζ -Expression wurde auf die Referenzgruppe normiert (relative PTP ζ -Expression). Eine Säule repräsentiert den Mittelwert mit Standardfehler. Die statistische Testung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (* $p < 0,05$). $n = 4$ pro Gruppe.

In murinen Monozyten war PTP ζ anhand einer Bande bei 250 kDa in allen untersuchten Proben nachweisbar, wobei die Bandenintensität vergleichsweise schwach ausgeprägt war (s. Abb. 5-11). Die statistische Auswertung ergab bezogen auf die relative PTP ζ -Expression einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den jungen ($n = 4$) und den reiferen Versuchstieren ($n = 4$). Demnach ist davon auszugehen, dass die PTP ζ -Expression in murinen Monozyten hochreguliert ist.

Makrophagen

Wie nach den Versuchen eingangs zu erwarten war, stellte sich im Western Blot (mit Ausnahme der Positivkontrolle) bei keiner der Proben eine verwertbare Bande um 250 kDa dar (Daten nicht gezeigt). Die Expression von PTP ζ konnte in diesem Fall nicht nachgewiesen werden.

6 Diskussion

Die theoretische Vorstellung einer Beteiligung von PTP ζ in der Pathogenese des SLE stammt ursprünglich aus dem Mausmodell. Die Frage nach dem Vorkommen von PTP ζ und möglichen Änderungen des Expressionsmusters in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität konnte bisher nicht hinreichend geklärt werden. Die vorliegende Arbeit zielte darauf ab, die potenzielle pathogenetische Rolle von PTP ζ beim systemischen Lupus erythematodes in Grundzügen zu untersuchen. Hierzu wurde zuerst die Expression des Rezeptors auf humanen und murinen Immunzellen in einer qualitativen Analyse mittels Western Blot betrachtet. Um Unterschiede zwischen den Kollektiven hinsichtlich des PTP ζ -Expressionsmusters zu quantifizieren, wurden anschließend Mäuse unterschiedlicher Altersstufen untersucht. Darüber hinaus wurde die PTP ζ -Expression bei SLE-Patienten und gesunden Kontrollpersonen verglichen, um eine mögliche Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf den Menschen zu prüfen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PTP ζ im MRL//*pr*-Mausmodell von T- und B-Zellen sowie von Monozyten bei Mäusen unterschiedlicher Altersstufen stabil exprimiert wurde. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass PTP ζ während des altersabhängigen Fortschreitens der Lupusnephritis von B-Zellen und Knochenmarksmonozyten verstärkt exprimiert wurde. In humanen Leukozytenpopulationen konnte PTP ζ bei PBLs, bei T- und B-Zellen sowie bei Monozyten und Makrophagen sowohl bei SLE-Patienten als auch bei gesunden Probanden nachgewiesen werden. Die PTP ζ -Expression bei SLE-Patienten unter Immunsuppression war verglichen mit gesunden Probanden erniedrigt. Diese Ergebnisse stützen die Annahme von PTP ζ als mögliches therapeutisches Target.

6.1 Stellenwert des MRL//*pr*-Mausmodells

Das Mausmodell gilt als anerkannte Methode, um die pathophysiologischen Prozesse der Lupusentstehung zu analysieren. Hierfür stehen zahlreiche Modelle zur Verfügung (147). Ein klassisches Modell ist der MRL//*pr*-Mausstamm. Dieses Modell zeichnet sich durch die spontane Ausbildung eines SLE-ähnlichen Phänotyps aus. Die Mäuse zeigen eine Lymphadenopathie, eine Produktion von Autoantikörpern und können eine Lupusnephritis ausbilden (165). Dies sind klinische Ausprägungen, die prinzipiell auch beim menschlichen SLE zu beobachten sind. Darüber hinaus kann das Mausmodell Humanstudien ergänzen. So ist es beispielsweise unverzichtbar, potenzielle

Therapieansätze vor der klinischen Prüfung am Mausmodell zu überprüfen. Ein herausragendes Beispiel, das den Weg vom Mausmodell über klinische Studien, bis hin zur Zulassung für die SLE-Behandlung bewältigt hat, ist das Medikament Belimumab. Belimumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der gegen den B-Zell-Aktivierungsfaktor (BAFF) gerichtet ist (130). BAFF reguliert wiederum das Überleben von B-Zellen (72). Es konnte aufgezeigt werden, dass zu Lupus neigende Mäuse und SLE-Patienten erhöhte BAFF-Spiegel aufwiesen (73). Die therapeutische Adressierung von BAFF im MRL/lpr-Mausmodell war letztendlich wirksam bei der Verringerung der Symptome und ebnete den Weg für klinische Studien (166). Dieses Beispiel veranschaulicht deutlich, dass die Nähe zum Menschen und damit eine gewisse Vergleichbarkeit prinzipiell gegeben ist. Jedoch finden sich auch Limitationen des Mausmodells. SLE zeichnet sich durch seine komplexe Natur aus, die beim Menschen prinzipiell jedes Organsystem betreffende Krankheitssymptome auslösen kann. Im MRL/lpr-Mausmodell kommt es hingegen hauptsächlich zur Ausbildung einer Lupusnephritis, wodurch die Komplexität des menschlichen Lupus nicht abgebildet werden kann (147). Um der Vielfalt der klinischen Symptome gerecht zu werden, sollten gerade bei therapeutischen Ansätzen verschiedene Mausmodelle Berücksichtigung finden. Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse sind bezogen auf das MRL/lpr-Mausmodell. Daher ist es notwendig, die PTP ζ -Expression in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium auch an anderen Lupus-Mausmodellen zu überprüfen. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Aussagekraft der Untersuchungen in dieser Arbeit und die generelle Übertragbarkeit auf den Menschen begrenzt sind. Für den speziellen Fall der Lupusnephritis hingegen können die vorliegenden Ergebnisse nützliche Hinweise und Ansatzpunkte darstellen.

6.2 PTP ζ -Expressionsanalyse in der Maus und im Menschen

Um die pathogenetische Funktion von PTP ζ zu untersuchen, ist es zwingend erforderlich, die Zelltypen zu identifizieren, die PTP ζ exprimieren. In I/R-Versuchen an nicht-autoimmunen Mäusen konnte eine PTP ζ -Expression in TEZ nachgewiesen werden, die im zeitlichen Verlauf der Nierenschädigung hochreguliert wurde (91). TEZ setzen Chemokine und profibrotische Stoffe frei, die das Fortschreiten einer Nierenschädigung begünstigen. Untersuchungen am MRL/lpr-Mausmodell konnten belegen, dass PTP ζ bei drei Monate alten Mäusen von renal infiltrierenden Leukozyten (T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen) exprimiert wurde (95). Darüber hinaus wurde

PTP ζ auf T- und B-Zellen aus der Milz sowie auf Monozyten aus dem Knochenmark bei MRL/lpr Mäusen im Alter von vier Monaten detektiert. In Korrelation hierzu konnte in eigenen Untersuchungen an MRL/lpr-Mäusen beobachtet werden, dass PTP ζ sowohl in jungen (etwa einen Monat alt) als auch in reifen Tieren (vier bis fünf Monate alt) von T-Zellen und B-Zellen aus der Milz sowie von Knochenmarksmonozyten exprimiert wurde (vgl. Kap. 5.3). Anders als erwartet war PTP ζ in murinen *in-vitro*-Makrophagen mittels Western Blot nicht nachweisbar.

Quantitative Unterschiede im PTP ζ -Expressionsverhalten bei Mäusen unterschiedlicher Altersstufen wurden bisher nur für die Niere und für die Milz beschrieben, jedoch nicht für die einzelnen Immunzellpopulationen (95). Um festzustellen, ob die PTP ζ -Expression mit Fortschreiten der Krankheitsaktivität zunimmt und ob PTP ζ damit ein potenzielles Schlüsselmolekül in der Pathogenese des SLE darstellt, wurden Mäuse unterschiedlicher Altersstufen untersucht. Hierbei stellten die jungen Versuchstiere jeweils die Referenzgruppe dar. In der vorliegenden Arbeit konnte quantitativ gezeigt werden, dass PTP ζ in murinen B-Zellen und Monozyten mit zunehmendem Alter der Mäuse signifikant hochreguliert wurde (vgl. Kap. 5.4). Für T-Zellen blieb diese Untersuchung ohne Signifikanz. Makrophagen konnten bei fehlendem Nachweis von PTP ζ nicht näher betrachtet werden.

Die weibliche MRL/lpr-Maus entwickelt etwa ab einem Alter von drei Monaten Krankheitssymptome mit einer frühen Nierenbeteiligung, was zu einer hohen Mortalität von 100 % nach neun Monaten führt (147, 157). Ältere Mäuse (vier bis fünf Monate) wiesen verglichen mit jungen Mäusen (etwa ein Monat) eine erhöhte PTP ζ -Expression auf. Dies erlaubt die Annahme, dass PTP ζ in den entsprechenden Zellen mit zunehmender Krankheitsaktivität hochreguliert wurde. Hieraus ergeben sich Hinweise auf einen möglichen krankheitsfördernden Effekt von PTP ζ im Mausversuch. Um diese Hypothese weiter zu verfolgen, wäre zukünftig die Untersuchung an PTP ζ -Knock-out-Mäusen mit dem genetischen Hintergrund der MRL-Mäuse sinnvoll. Dadurch könnte überprüft werden, wie sich das Fehlen von PTP ζ auf die Krankheitsaktivität auswirkt. Analoge Versuche hierzu hat es bereits gegeben. Unter anderem konnte für das Zytokin IL-34 gezeigt werden, dass dieses bei Mäusen mit Lupusnephritis mit steigender Krankheitsaktivität vermehrt exprimiert wurde (95). Spannenderweise stellte sich dem gegenüber das Fehlen von IL-34 bei IL-34-defizienten Mäusen als protektiv heraus.

Das Vorhandensein von PTP ζ in Leukozytenpopulationen von SLE-Patienten und gesunden Probanden wurde in der Literatur beschrieben (95). Diese Ergebnisse waren durch eigene Versuche reproduzierbar. In dieser Arbeit konnten in Zellen des peripheren Blutes positive Signale für PTP ζ bei T- und B-Zellen sowie bei PBLs, Monozyten und, im Gegensatz zum Mausversuch, auch bei *in-vitro*-Makrophagen gefunden werden (vgl. Kap. 5.1). Dies betraf sowohl die Gruppe der SLE-Patienten als auch die gesunde Vergleichsgruppe. Somit wird PTP ζ in Mäusen und in Patienten mit Lupusnephritis in ähnlicher Weise exprimiert. Darüber hinaus wurde eine Expression von PTP ζ auch bei TEZ in Biopsieproben von SLE-Patienten mit Lupusnephritis berichtet (95). Möglicherweise ist die Expression abhängig von Manifestationsort und Krankheitsaktivität.

Um zu testen, ob sich die im Mausversuch erzielten Ergebnisse auf den menschlichen Lupus übertragen lassen, wurde untersucht, ob PTP ζ bei Patienten mit Lupusnephritis ebenfalls hochreguliert ist. Verglichen mit den gesunden Probanden wurde im SLE-Kollektiv jedoch bezüglich der PBLs, der T- und B-Zellen sowie der Monozyten eine signifikant geringere PTP ζ -Expression festgestellt (vgl. Kap. 5.2). Für Makrophagen bestand kein signifikanter Unterschied. Dies deutete zunächst darauf hin, dass PTP ζ im humanen SLE keine pathogenesefördernde Rolle spielt. Bei näherer Betrachtung der SLE-Patienten fiel jedoch auf, dass zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine immunsuppressive Therapie vorlag. So fanden sich beispielsweise Azathioprin, Methotrexat oder Mycophenolat-Mofetil in der Medikation. Diese Medikamente sind potente Hemmstoffe der Zellproliferation, wodurch sie bekanntermaßen die fehlgeleitete Immunantwort beim SLE günstig beeinflussen können. Es ist zu diskutieren, ob dieser allgemeine zytoreduktive Effekt einen Einfluss auf die verminderte PTP ζ -Expression hat. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der klinischen Krankheitsaktivität und der PTP ζ -Expression herzustellen, wären Untersuchungen bei therapienaiven Patienten oder bei Patienten mit Erstdiagnose erforderlich. Für den Fall, dass so eine Korrelation experimentell gelingt, wäre in der Folge interessant zu überprüfen, ob die Serumlevel von zirkulierendem PTP ζ in Bezug zur Krankheitsaktivität von SLE-Patienten stehen und ob sich hieraus ein möglicher diagnostischer oder prognostischer Marker ergibt. Die Identifizierung von Biomarkern, die eine angemessene Vorhersage des Ansprechens auf eine Therapie ermöglichen würden, ist nach wie vor sehr wichtig. Ein solcher Zusammenhang konnte bereits für Anti-dsDNS-Antikörper und CSF-1-Serumlevel eindrücklich gezeigt werden (84, 92).

Insbesondere die verstärkte Expression von CSF-1 korrelierte nicht nur mit der Krankheitsaktivität, sondern konnte auch den Beginn der Erkrankung bei Lupusnephritis vorhersagen, noch bevor herkömmliche Labormethoden anschlugen.

Von Bedeutung ist insbesondere die Erkenntnis, dass B-Zellen in Mäusen mit fortschreitender Erkrankung eine gesteigerte PTP ζ -Expression aufweisen. Welche pathogenetische Rolle B-Zellen beim SLE spielen, konnte eindrucksvoll am Beispiel von BAFF, einem Überlebensfaktor für B-Zellen, gezeigt werden (167). Naive B-Zellen, die in Gegenwart von T-Zellen auf Antigene treffen, werden bekanntermaßen aktiviert, proliferieren und differenzieren sich zu Plasmazellen, die wiederum Antikörper produzieren. Über eine gezielte Senkung des BAFF-Spiegels konnte eine B-Zell-Depletion erreicht werden, wodurch die Produktion von Autoantikörpern konsekutiv verringert wurde (74). Das ist insofern interessant, als dass die Lupusnephritis eine Immunkomplexnephritis ist. IL-34 ist ein PTP ζ -Ligand (114). In Untersuchungen an IL-34-defizienten MRL//*pr*-Mäusen konnten Anhaltspunkte dafür gefunden werden, dass im Vergleich zum MRL//*pr*-Wildtyp weniger proliferierende B-Zellen in der Niere und in der Milz vorhanden sind (95). Aus den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen ergibt sich die Überlegung, ob PTP ζ -vermittelte Signale die B-Zell-Aktivität beeinflussen könnten. Auch eine direkte Stimulation der Autoantikörperbildung über die Aktivierung von PTP ζ ist denkbar.

Neben einer gesteigerten PTP ζ -Expression bei B-Zellen im MRL//*pr*-Mausmodell konnte dieser Zusammenhang auch für Knochenmarksmonozyten gezeigt werden. Monozyten sind Vorläuferzellen von Makrophagen. Bei murinen Makrophagen konnte PTP ζ altersunabhängig in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise wird über PTP ζ die Proliferation von Monozyten aus dem Knochenmark begünstigt. Monozyten könnten anschließend in den Kreislauf gelangen und so in periphere Gewebe einwandern. Eine gesteigerte Migration unter dem Einfluss von IL-34 wurde bereits für Makrophagen und indirekt für Monozyten beschrieben (91). Das heißt über PTP ζ könnte es zwar zu einem größeren Angebot an myeloischen Zellen im Kreislauf oder zur Migration von Monozyten kommen, für Makrophagen scheint PTP ζ hingegen keinen relevanten Effekt zu haben.

IL-34-vermittelte Effekte beim SLE und speziell bei der Lupusnephritis wurden mehrfach berichtet (91, 95). So konnte beispielsweise im Mausmodell gezeigt werden,

dass IL-34 und seine Rezeptoren mit zunehmender Erkrankung hochreguliert wurden, wohingegen bei IL-34-defizienten Mäusen die Lupusnephritis unterdrückt schien. IL-34 bindet an den IL-34-Rezeptor sowie einen kürzlich entdeckten weiteren Rezeptor: PTP ζ (114). Dass auch PTP ζ eine potenzielle Rolle spielen könnte, konnte in dieser Arbeit durch eine gesteigerte PTP ζ -Expression bei B-Zellen und Monozyten im Mausmodell gezeigt werden. Welche der krankheitsfördernden Effekte beim SLE, die durch IL-34 vermittelt werden, auf den IL-34-Rezeptor oder PTP ζ zurückgehen, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Ein Punkt, der die Überprüfung einer möglichen Funktion von PTP ζ bei der SLE-Entstehung jedoch verkompliziert, ist Folgender: Der extrazelluläre Anteil von PTP ζ hat eine komplexe Struktur mit mehreren Domänen, die mit einer Vielzahl von Liganden interagieren (168). Diese Liganden umfassen neben IL-34 beispielsweise auch das extrazelluläre Matrixprotein Tenascin, Pleiotrophin, ein Heparin-bindender Wachstumsfaktor und Midkine (108, 109). Anhand der Rezeptormodifikation durch Pleiotrophin konnte beispielhaft veranschaulicht werden, dass die Phosphatase-Aktivität von PTP ζ mehreren Einflüssen unterliegt (110). Es konnte beobachtet werden, dass die Aktivierung von PTP ζ durch IL-34 zu einer Hemmung der Proliferation in spezifischen zellulären Zielen wie Glioblastomzellen führte (114). In diesem Zusammenhang ist auch eine IL-34-vermittelte Schutzwirkung über PTP ζ denkbar. Der Rezeptor wurde im Mausmodell bei fortschreitender Erkrankung bei B-Zellen und Monozyten hochreguliert. Aus anderen Untersuchungen ist bekannt, dass auch IL-34 als proinflammatorischer Botenstoff bei Zunahme der Krankheitsaktivität ansteigt (95). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine IL-34-Rezeptor-unabhängige Wirkung von IL-34 über PTP ζ bei der Bewertung von IL-34 in der Krankheitsentstehung berücksichtigt werden sollte. Darüber hinaus interagieren Proteine, die mit PTP ζ interagieren, auch mit anderen Molekülen. Es ist vorstellbar, dass die Interaktionen zwischen Rezeptor und Liganden hierdurch moduliert werden.

Bisher sind drei Isoformen von PTP ζ bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen. Im Rattenhirn konnte ein Zusammenhang zwischen der zeitlichen Entwicklung und den davon abhängigen PTP ζ -Expressionsniveaus der einzelnen Isoformen gezeigt werden (111). Untersuchungen an der Niere fehlen bisher. Gewebespezifische Spleißvarianten und eine damit verbundene Beeinflussung der LN-Pathogenese sind denkbar. Darüber hinaus gibt es Berichte über funktionelle

Unterschiede zwischen den beiden transmembranösen Isoformen in der Neurogenese (169). Auch hier gibt es aktuell keine vergleichbaren Daten für die Niere.

6.3 Grenzen der experimentellen Umsetzung

Die experimentelle Bearbeitung der ursprünglichen Fragestellungen war mit limitierenden Faktoren behaftet, die die Gesamtaussagekraft der vorliegenden Untersuchungsergebnisse beeinflussen können. Dies wird beispielsweise am Stichprobenumfang deutlich. Um signifikante Ergebnisse zu erzielen, sind sehr große Stichproben erforderlich. Insbesondere in Humanstudien müssen hierzu bei der Probandenauswahl auch extrinsische Faktoren Berücksichtigung finden, wie etwa der Lebensstil oder die klinische Vorgeschichte. Jedoch ist hervorzuheben, dass das Alter der in dieser Arbeit untersuchten Studienpopulation im Grundsatz das typische Patientenalter abbildete. Denn Studiendaten aus Deutschland konnten zeigen, dass Frauen der Altersgruppe 45 bis 54 die zweitgrößte geschlechtsspezifische SLE-Prävalenz aufweisen (8). Das Ziel zukünftiger Untersuchungen könnte sein, ein heterogeneres Studienkollektiv zu betrachten, das zum einen eine größere Altersspanne, zum anderen auch männliche Probanden umfasst. Gleichermaßen war in dieser Arbeit die Anzahl an Versuchstieren begrenzt. Dies hatte bei der quantitativen Analyse zum Teil erhebliche Schwankungen der Standardabweichung zur Folge. Unter diesem Gesichtspunkt war eine Beurteilung der absoluten PTP ζ -Expression weder möglich noch sinnvoll. Abgesehen vom geringen Stichprobenumfang existieren zudem aktuell auch keine Studiendaten, die festlegen, bei welchem Messergebnis möglicherweise ein pathologischer Befund vorliegt. Trotz dessen zeichnete sich bei Betrachtung der relativen PTP ζ -Expression in einigen Versuchen ein deutlicher Trend ab. Hierdurch konnten die gewonnenen Erkenntnisse vergleichend dargestellt werden. Ein weiterer, bedeutungsvoller Punkt war die fehlende Spezifität der eingesetzten Antikörper. Die Primärantikörper für die Proteindetektion von PTP ζ waren nicht spezifisch für eine Spezies.

6.4 Ausblick

Derzeit reichen die SLE-Therapien von Antimalariamitteln, die bei allen SLE-Patienten empfohlen werden, über nicht-steroidale Antiphlogistika, Glukokortikoide (manchmal zusätzlich zu konventionellen Immunsuppressiva, bis hin zu Biologika wie Belimumab oder Rituximab (*off-label*). Das Interesse an gezielten Behandlungsoptionen mit

besserer Verträglichkeit könnte kaum größer sein. Derzeit befinden sich einige Wirkstoffkandidaten in der klinischen Entwicklung (170). Diese zielen unter anderem auf entzündliche Zytokine, Chemokine oder deren Rezeptoren, auf B-Zellen oder Plasmazellen, auf intrazelluläre Signalwege oder auf verschiedene andere Targets ab. Um die funktionelle Rolle von PTP ζ und der entsprechenden Signalwege differenzierter zu betrachten, könnten Untersuchungen an PTP ζ -*Knock-out*-Mäusen mit MRL/*lpr*-Hintergrund oder die Inhibition von PTP ζ durch einen neutralisierenden Antikörper interessante Ansatzpunkte sein. Darüber hinaus gilt es die Expression anderer PTP ζ -Liganden im Menschen zu untersuchen, zum Beispiel anhand von Stimulationsversuchen. Sofern PTP ζ zukünftig als therapeutischer Angriffspunkt infrage kommt, wirft dies die Frage nach potenziellen Interaktionen in anderen Teilen des menschlichen Organismus auf. PTP ζ stellt ein Kernelement bei der Regulierung der neuronalen Entwicklung dar und kommt in seiner Funktion im Gehirn auf der Oberfläche neuraler Vorläufer- und Gliazellen vor (106, 107). Es ist denkbar, dass die Blockade von PTP ζ mit verschiedenen Abnormitäten einhergehen könnte.

7 Zusammenfassung

Der systemische Lupus erythematoses ist eine multifaktorielle Autoimmunerkrankung mit einem heterogenen klinischen Erscheinungsbild. In der Mehrzahl sind Frauen betroffen. Neben genetischen und umweltbedingten Einflussfaktoren greifen in der Pathogenese eine Vielzahl von zellulären und humoralen Mechanismen ineinander. Die aktuellen Therapieansätze sind jedoch weitestgehend unspezifisch, teilweise sogar toxisch. Hieraus ergibt sich der dringende Bedarf, neuartige und verträgliche Therapien zu entwickeln. Von zentraler Bedeutung hierfür ist die Identifikation geeigneter molekularer Angriffspunkte, die bei der Entstehung des systemischen Lupus erythematoses eine Rolle spielen. CSF-1- und IL-34-vermittelte Mechanismen sind beim SLE, insbesondere während einer Nierenentzündung, vielfach dokumentiert. Im Mausmodell konnte mit PTP ζ ein weiterer IL-34-Rezeptor identifiziert werden. Dies legte die Vermutung nahe, dass PTP ζ möglicherweise als Schlüsselmolekül bei der Lupusentstehung infrage kommt. Um die potenzielle Rolle von PTP ζ zu untersuchen war es erforderlich, die Zelltypen zu identifizieren, die PTP ζ exprimieren. Mithilfe eines zuverlässigen und reproduzierbaren Lupus-Mausmodells, dem MRL/lpr-Mausstamm, konnte mittels Western Blot festgestellt werden, dass PTP ζ von T- und B-Zellen sowie von Monozyten bei Mäusen unterschiedlicher Altersstufen stabil exprimiert wurde. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass PTP ζ während des altersabhängigen Fortschreitens der Lupusnephritis von B-Zellen und Knochenmarksmonozyten verstärkt exprimiert wurde. Diese Ergebnisse stützen die Annahme von PTP ζ als mögliches Schlüsselmolekül in der Pathogenese des SLE beziehungsweise der Lupusnephritis im Mausmodell. In einem Kollektiv aus SLE-Patienten mit Lupusnephritis und gesunden Probanden konnte PTP ζ bei PBLs, bei T- und B-Zellen sowie bei Monozyten und Makrophagen nachgewiesen werden. Die PTP ζ -Expression in allen Leukozytenpopulationen war bei SLE-Patienten unter Immunsuppression, verglichen mit gesunden Probanden, erniedrigt. Ob PTP ζ beim Menschen einen krankheitsfördernden Effekt hat, bleibt trotz der gewonnenen Erkenntnisse offen.

8 Literaturverzeichnis

1. Pons-Estel GJ, Alarcon GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2010;39(4):257-68.
2. Borchers AT, Naguwa SM, Shoenfeld Y, Gershwin ME. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews*. 2010;9(5):A277-87.
3. Uramoto KM, Michet CJ, Jr., Thumboo J, Sunku J, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis and rheumatism*. 1999;42(1):46-50.
4. Rees F, Doherty M, Grainge MJ, Lanyon P, Zhang W. The worldwide incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: a systematic review of epidemiological studies. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2017;56(11):1945-61.
5. Chakravarty EF, Bush TM, Manzi S, Clarke AE, Ward MM. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(6):2092-4.
6. Siegel M, Lee SL. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 1973;3(1):1-54.
7. Lu LJ, Wallace DJ, Ishimori ML, Scofield RH, Weisman MH. Review: Male systemic lupus erythematosus: a review of sex disparities in this disease. *Lupus*. 2010;19(2):119-29.
8. 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. *Lupus*. 2014;23(13):1407-11.
9. Kunz M. Lupus erythematosus. Part I: epidemiology, genetics and immunology. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*. 2013;11(8):709-19; quiz 20, -20; quiz 21.
10. Fischer-Betz R, Schneider M. Systemischer Lupus erythematosus. In: Hettkenkofer HJ, Schneider M, Braun J, editors. *Rheumatologie: Diagnostik - Klinik - Therapie*. 6. vollst. überarb. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme; 2015. p. 216-29.
11. Narain S, Richards HB, Satoh M, Sarmiento M, Davidson R, Shuster J, et al. Diagnostic accuracy for lupus and other systemic autoimmune diseases in the community setting. *Archives of internal medicine*. 2004;164(22):2435-41.
12. Müller-Ladner U. Systemischer Lupus erythematosus. In: Suttorp N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M, editors. *Harrisons Innere Medizin, Band 2. Deutsche Ausgabe*, 19. Aufl. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag; 2016. p. 2611-22.
13. Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis and rheumatism*. 1997;40(9):1601-11.
14. Hochberg MC. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. 1997;40(9):1725-.

15. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 1982;25(11):1271-7.
16. Aringer M, Dorner T, Leuchten N, Johnson SR. Toward new criteria for systemic lupus erythematosus—a standpoint. *Lupus*. 2016;25(8):805-11.
17. Tedeschi SK, Johnson SR, Boumpas D, Daikh D, Dorner T, Jayne D, et al. Developing and Refining New Candidate Criteria for Systemic Lupus Erythematosus Classification: An International Collaboration. *Arthritis care & research*. 2018;70(4):571-81.
18. Specker C, Bitsch T. Kollagenosen. In: Bitsch T, editor. *Klinikleitfaden Rheumatologie*. 4. Aufl. ed. München: Elsevier; 2018. p. 278-307.
19. Harrist TJ, Mihm MC, Jr. The specificity and clinical usefulness of the lupus band test. *Arthritis and rheumatism*. 1980;23(4):479-90.
20. Ward MM, Marx AS, Barry NN. Comparison of the validity and sensitivity to change of 5 activity indices in systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*. 2000;27(3):664-70.
21. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 1996;39(3):363-9.
22. Castrejon I, Tani C Fau - Jolly M, Jolly M Fau - Huang A, Huang A Fau - Mosca M, Mosca M. Indices to assess patients with systemic lupus erythematosus in clinical trials, long-term observational studies, and clinical care. (0392-856X (Print)).
23. Bencivelli W, Vitali C, Isenberg DA, Smolen JS, Snaith ML, Sciuto M, et al. Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. III. Development of a computerised clinical chart and its application to the comparison of different indices of disease activity. The European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE. *Clinical and experimental rheumatology*. 1992;10(5):549-54.
24. Vitali C, Bencivelli W, Isenberg DA, Smolen JS, Snaith ML, Sciuto M, et al. Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. II. Identification of the variables indicative of disease activity and their use in the development of an activity score. The European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE. *Clinical and experimental rheumatology*. 1992;10(5):541-7.
25. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis and rheumatism*. 1992;35(6):630-40.
26. Kuhn A, Ruzicka T. Classification of Cutaneous Lupus Erythematosus. In: Kuhn A, Lehmann P, Ruzicka T, editors. *Cutaneous Lupus Erythematosus*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2005. p. 53-7.
27. Okon LG, Werth VP. Cutaneous lupus erythematosus: diagnosis and treatment. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2013;27(3):391-404.
28. Szczech J, Rutka M, Samotij D, Zalewska A, Reich A. Clinical characteristics of cutaneous lupus erythematosus. *Postepy dermatologii i alergologii*. 2016;33(1):13-7.

29. Sontheimer RD. Subacute cutaneous lupus erythematosus. *Clinics in dermatology*. 1985;3(3):58-68.
30. Kuhn A, Sticherling M, Bonsmann G. Clinical manifestations of cutaneous lupus erythematosus. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*. 2007;5(12):1124-37.
31. Lee LA. The clinical spectrum of neonatal lupus. *Archives of dermatological research*. 2009;301(1):107-10.
32. Wisuthsarewong W, Soongswang J, Chantorn R. Neonatal lupus erythematosus: clinical character, investigation, and outcome. *Pediatric dermatology*. 2011;28(2):115-21.
33. Tincani A, Nuzzo M, Motta M, Zatti S, Lojacono A, Faden D. Autoimmunity and pregnancy: autoantibodies and pregnancy in rheumatic diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1069:346-52.
34. Brucato A, Cimaz R, Caporali R, Ramoni V, Buyon J. Pregnancy outcomes in patients with autoimmune diseases and anti-Ro/SSA antibodies. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2011;40(1):27-41.
35. Buyon JP, Hiebert R, Copel J, Craft J, Friedman D, Katholi M, et al. Autoimmune-associated congenital heart block: demographics, mortality, morbidity and recurrence rates obtained from a national neonatal lupus registry. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998;31(7):1658-66.
36. Hess E. Drug-Related Lupus. 1988;318(22):1460-2.
37. Vedove CD, Del Giglio M, Schena D, Girolomoni G. Drug-induced lupus erythematosus. *Archives of dermatological research*. 2009;301(1):99-105.
38. Almaani S, Meara A, Rovin BH. Update on Lupus Nephritis. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2017;12(5):825-35.
39. Cameron JS. Lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 1999;10(2):413-24.
40. Bertsias GK, Tektonidou M, Amoura Z, Aringer M, Bajema I, Berden JH, et al. Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012;71(11):1771-82.
41. Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, Wallace WD, Daikh DI, Fitzgerald JD, et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis care & research*. 2012;64(6):797-808.
42. Faurischou M, Starklint H, Halberg P, Jacobsen S. Prognostic factors in lupus nephritis: diagnostic and therapeutic delay increases the risk of terminal renal failure. *The Journal of rheumatology*. 2006;33(8):1563-9.
43. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2004;15(2):241-50.
44. Narvaez J, Ricse M, Goma M, Mitjavila F, Fulladosa X, Capdevila O, et al. The value of repeat biopsy in lupus nephritis flares. *Medicine*. 2017;96(24):e7099.

45. Pollak VE, Kant KS, Hariharan S. Diffuse and focal proliferative lupus nephritis: treatment approaches and results. *Nephron*. 1991;59(2):177-93.
46. Austin HA, 3rd, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TA, Kullick ME, Klippel JH, et al. Prognostic factors in lupus nephritis. Contribution of renal histologic data. *The American journal of medicine*. 1983;75(3):382-91.
47. Austin HA, 3rd, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TT, Balow JE. Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney international*. 1984;25(4):689-95.
48. Chen YE, Korbet SM, Katz RS, Schwartz MM, Lewis EJ. Value of a complete or partial remission in severe lupus nephritis. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008;3(1):46-53.
49. Houssiau FA, Vasconcelos C, D'Cruz D, Sebastiani GD, de Ramon Garrido E, Danieli MG, et al. The 10-year follow-up data of the Euro-Lupus Nephritis Trial comparing low-dose and high-dose intravenous cyclophosphamide. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(1):61-4.
50. Houssiau FA, Vasconcelos C, D'Cruz D, Sebastiani GD, Garrido Ed Ede R, Danieli MG, et al. Immunosuppressive therapy in lupus nephritis: the Euro-Lupus Nephritis Trial, a randomized trial of low-dose versus high-dose intravenous cyclophosphamide. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(8):2121-31.
51. Barile-Fabris L, Hernandez-Cabrera MF, Barragan-Garfias JA. Vasculitis in systemic lupus erythematosus. *Current rheumatology reports*. 2014;16(9):440.
52. Pons-Estel GJ, Andreoli L, Scanzi F, Cervera R, Tincani A. The antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of autoimmunity*. 2017;76:10-20.
53. Obermoser G, Sontheimer RD, Zelger B. Overview of common, rare and atypical manifestations of cutaneous lupus erythematosus and histopathological correlates. *Lupus*. 2010;19(9):1050-70.
54. Gilliam JN, Sontheimer RD. Distinctive cutaneous subsets in the spectrum of lupus erythematosus. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1981;4(4):471-5.
55. Provost TT. Nonspecific Cutaneous Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. In: Kuhn A, Lehmann P, Ruzicka T, editors. *Cutaneous Lupus Erythematosus*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 93-106.
56. Fischer-Betz R, Herzer P, Schneider M. Systemischer Lupus erythematosus. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*. 2005;130(43):2451-8.
57. Mahmoud K, Zayat A, Vital EM. Musculoskeletal manifestations of systemic lupus erythematosus. *Current opinion in rheumatology*. 2017;29(5):486-92.
58. Abeles M, Urman JD, Rothfield NF. Aseptic necrosis of bone in systemic lupus erythematosus. Relationship to corticosteroid therapy. *Archives of internal medicine*. 1978;138(5):750-4.
59. Sultan SM, Ioannou Y, Isenberg DA. A review of gastrointestinal manifestations of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford, England)*. 1999;38(10):917-32.
60. Man BL, Mok CC. Serositis related to systemic lupus erythematosus: prevalence and outcome. *Lupus*. 2005;14(10):822-6.

61. Schoenfeld SR, Kasturi S, Costenbader KH. The epidemiology of atherosclerotic cardiovascular disease among patients with SLE: a systematic review. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2013;43(1):77-95.
62. Mittoo S, Fell CD. Pulmonary manifestations of systemic lupus erythematosus. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2014;35(2):249-54.
63. Bougea A, Anagnostou E, Konstantinos G, George P, Triantafyllou N, Kararizou E. A Systematic Review of Peripheral and Central Nervous System Involvement of Rheumatoid Arthritis, Systemic Lupus Erythematosus, Primary Sjogren's Syndrome, and Associated Immunological Profiles. *International journal of chronic diseases*. 2015;2015:910352.
64. Theander E, Jacobsson LT. Relationship of Sjogren's syndrome to other connective tissue and autoimmune disorders. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2008;34(4):935-47, viii-ix.
65. Wahren-Herlenius M, Dorner T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *Lancet (London, England)*. 2013;382(9894):819-31.
66. Theofilopoulos AN. The basis of autoimmunity: Part I. Mechanisms of aberrant self-recognition. *Immunology today*. 1995;16(2):90-8.
67. Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine*. 2008;358(9):929-39.
68. Patel DR, Richardson BC. Dissecting complex epigenetic alterations in human lupus. *Arthritis research & therapy*. 2013;15(1):201.
69. Rönnblom L, Eloranta ML. The interferon signature in autoimmune diseases. *Current opinion in rheumatology*. 2013;25(2):248-53.
70. Rönnblom L, Pascual V. The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells. *Lupus*. 2008;17(5):394-9.
71. Moore PA, Belvedere O, Orr A, Pieri K, LaFleur DW, Feng P, et al. BLYS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science (New York, NY)*. 1999;285(5425):260-3.
72. Cancro MP, D'Cruz DP, Khamashta MA. The role of B lymphocyte stimulator (BLYS) in systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(5):1066-73.
73. Petri M, Stohl W, Chatham W, McCune WJ, Chevrier M, Ryel J, et al. Association of plasma B lymphocyte stimulator levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(8):2453-9.
74. Isenberg DA. Treating patients with lupus with B-cell depletion. *Lupus*. 2008;17(5):400-4.
75. McMurray RW, May W. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(8):2100-10.
76. Illescas-Montes R, Corona-Castro CC, Melguizo-Rodriguez L, Ruiz C, Costela-Ruiz VJ. Infectious processes and systemic lupus erythematosus. *Immunology*. 2019.
77. Manfredo Vieira S, Hiltensperger M, Kumar V, Zegarra-Ruiz D, Dehner C, Khan N, et al. Translocation of a gut pathobiont drives autoimmunity in mice and humans. *Science (New York, NY)*. 2018;359(6380):1156-61.

78. Menke J, Hsu MY, Byrne KT, Lucas JA, Rabacal WA, Croker BP, et al. Sunlight triggers cutaneous lupus through a CSF-1-dependent mechanism in MRL-Fas(lpr) mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;181(10):7367-79.
79. Costenbader KH, Kim DJ, Peerzada J, Lockman S, Nobles-Knight D, Petri M, et al. Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(3):849-57.
80. Lech M, Anders HJ. The pathogenesis of lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2013;24(9):1357-66.
81. Muñoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nature reviews Rheumatology*. 2010;6(5):280-9.
82. Tsokos GC, Lo MS, Costa Reis P, Sullivan KE. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nature reviews Rheumatology*. 2016;12(12):716-30.
83. Devarapu SK, Anders HJ. Toll-like receptors in lupus nephritis. *Journal of biomedical science*. 2018;25(1):35.
84. Giles BM, Boackle SA. Linking complement and anti-dsDNA antibodies in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Immunol Res*. 2013;55(1-3):10-21.
85. Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(11):3522-30.
86. Gerl V, Lischka A, Panne D, Grossmann P, Berthold R, Hoyer BF, et al. Blood dendritic cells in systemic lupus erythematosus exhibit altered activation state and chemokine receptor function. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(7):1370-7.
87. Menke J, Rabacal WA, Byrne KT, Iwata Y, Schwartz MM, Stanley ER, et al. Circulating CSF-1 promotes monocyte and macrophage phenotypes that enhance lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2009;20(12):2581-92.
88. Menke J, Iwata Y, Rabacal WA, Basu R, Yeung YG, Humphreys BD, et al. CSF-1 signals directly to renal tubular epithelial cells to mediate repair in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(8):2330-42.
89. Pixley FJ, Stanley ER. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends in cell biology*. 2004;14(11):628-38.
90. Menke J, Iwata Y, Rabacal WA, Basu R, Stanley ER, Kelley VR. Distinct roles of CSF-1 isoforms in lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(10):1821-33.
91. Baek JH, Zeng R, Weinmann-Menke J, Valerius MT, Wada Y, Ajay AK, et al. IL-34 mediates acute kidney injury and worsens subsequent chronic kidney disease. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(8):3198-214.
92. Menke J, Amann K, Cavagna L, Blettner M, Weinmann A, Schwarting A, et al. Colony-stimulating factor-1: a potential biomarker for lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2015;26(2):379-89.

93. Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, Huang M, Bosch E, et al. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science (New York, NY)*. 2008;320(5877):807-11.
94. Baghdadi M, Umeyama Y, Hama N, Kobayashi T, Han N, Wada H, et al. Interleukin-34, a comprehensive review. *Journal of leukocyte biology*. 2018;104(5):931-51.
95. Wada Y, Gonzalez-Sanchez HM, Weinmann-Menke J, Iwata Y, Ajay AK, Meineck M, et al. IL-34-Dependent Intrarenal and Systemic Mechanisms Promote Lupus Nephritis in MRL-Fas(lpr) Mice. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2019;30(2):244-59.
96. Xie HH, Shen H, Zhang L, Cui MY, Xia LP, Lu J. Elevated Serum Interleukin-34 Level in Patients with Systemic Lupus Erythematosus Is Associated with Disease Activity. *Scientific reports*. 2018;8(1):3462.
97. Iwata Y, Bostrom EA, Menke J, Rabacal WA, Morel L, Wada T, et al. Aberrant macrophages mediate defective kidney repair that triggers nephritis in lupus-susceptible mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;188(9):4568-80.
98. Andersen JN, Mortensen OH, Peters GH, Drake PG, Iversen LF, Olsen OH, et al. Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(21):7117-36.
99. Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. 2004;117(6):699-711.
100. Larsen M, Tremblay ML, Yamada KM. Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4(9):700-11.
101. Stoker AW. Protein tyrosine phosphatases and signalling. *The Journal of endocrinology*. 2005;185(1):19-33.
102. Li L, Dixon JE. Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases. *Seminars in immunology*. 2000;12(1):75-84.
103. Ostman A, Hellberg C, Bohmer FD. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(4):307-20.
104. den Hertog J. Regulation of protein phosphatases in disease and behaviour. *EMBO reports*. 2003;4(11):1027-32.
105. Sacchetti C, Bottini N. Protein Tyrosine Phosphatases in Systemic Sclerosis: Potential Pathogenic Players and Therapeutic Targets. *Current rheumatology reports*. 2017;19(5):28.
106. Krueger NX, Saito H. A human transmembrane protein-tyrosine-phosphatase, PTP zeta, is expressed in brain and has an N-terminal receptor domain homologous to carbonic anhydrases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(16):7417-21.
107. Ensslen-Craig SE, Brady-Kalnay SM. Receptor protein tyrosine phosphatases regulate neural development and axon guidance. *Developmental biology*. 2004;275(1):12-22.
108. Sorrelle N, Dominguez ATA, Brekken RA. From top to bottom: midkine and pleiotrophin as emerging players in immune regulation. *Journal of leukocyte biology*. 2017;102(2):277-86.

109. Barnea G, Grumet M, Milev P, Silvennoinen O, Levy JB, Sap J, et al. Receptor tyrosine phosphatase beta is expressed in the form of proteoglycan and binds to the extracellular matrix protein tenascin. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(20):14349-52.
110. Kuboyama K, Fujikawa A, Suzuki R, Tanga N, Noda M. Role of Chondroitin Sulfate (CS) Modification in the Regulation of Protein-tyrosine Phosphatase Receptor Type Z (PTPRZ) Activity: PLEIOTROPHIN-PTPRZ-A SIGNALING IS INVOLVED IN OLIGODENDROCYTE DIFFERENTIATION. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(35):18117-28.
111. Nishiwaki T, Maeda N, Noda M. Characterization and developmental regulation of proteoglycan-type protein tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta isoforms. *J Biochem*. 1998;123(3):458-67.
112. Wei S, Nandi S, Chitu V, Yeung YG, Yu W, Huang M, et al. Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *Journal of leukocyte biology*. 2010;88(3):495-505.
113. Bloom RD, Florquin S, Singer GG, Brennan DC, Kelley VR. Colony stimulating factor-1 in the induction of lupus nephritis. *Kidney international*. 1993;43(5):1000-9.
114. Nandi S, Cioce M, Yeung YG, Nieves E, Tesfa L, Lin H, et al. Receptor-type protein-tyrosine phosphatase zeta is a functional receptor for interleukin-34. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(30):21972-86.
115. Hesketh EE, Czopek A, Clay M, Borthwick G, Ferenbach D, Kluth D, et al. Renal ischaemia reperfusion injury: a mouse model of injury and regeneration. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2014(88).
116. Vajdovich P. Free radicals and antioxidants in inflammatory processes and ischemia-reperfusion injury. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 2008;38(1):31-123, v.
117. van Vollenhoven R, Voskuyl A, Bertsias G, Aranow C, Aringer M, Arnaud L, et al. A framework for remission in SLE: consensus findings from a large international task force on definitions of remission in SLE (DORIS). *Annals of the rheumatic diseases*. 2017;76(3):554-61.
118. Bertsias G, Ioannidis JP, Boletis J, Bombardieri S, Cervera R, Dostal C, et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008;67(2):195-205.
119. van Vollenhoven RF, Mosca M, Bertsias G, Isenberg D, Kuhn A, Lerstrom K, et al. Treat-to-target in systemic lupus erythematosus: recommendations from an international task force. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73(6):958-67.
120. Aringer M, Schneider M. Recipes systemic lupus erythematosus. *Z Rheumatol*. 2014;73(6):496-500.
121. Ruiz-Irastorza G, Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Khamashta MA. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(1):20-8.
122. Pons-Estel GJ, Alarcon GS, McGwin G, Jr., Danila MI, Zhang J, Bastian HM, et al. Protective effect of hydroxychloroquine on renal damage in patients with lupus

- nephritis: LXV, data from a multiethnic US cohort. *Arthritis and rheumatism*. 2009;61(6):830-9.
123. Siso A, Ramos-Casals M, Bove A, Brito-Zeron P, Soria N, Munoz S, et al. Previous antimalarial therapy in patients diagnosed with lupus nephritis: influence on outcomes and survival. *Lupus*. 2008;17(4):281-8.
124. Rynes RI, Bernstein HN. Ophthalmologic safety profile of antimalarial drugs. *Lupus*. 1993;2 Suppl 1:S17-9.
125. Rodriguez SC, Olguin AM, Miralles CP, Viladrich PF. Characteristics of meningitis caused by Ibuprofen: report of 2 cases with recurrent episodes and review of the literature. *Medicine*. 2006;85(4):214-20.
126. Fachgesellschaften AdWM. Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG): Kutaner Lupus Erythematodes 2008 [28.02.2019]. Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/013-060_abgelaufen.pdf.
127. Carneiro JR, Sato EI. Double blind, randomized, placebo controlled clinical trial of methotrexate in systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*. 1999;26(6):1275-9.
128. Furie R, Petri M, Zamani O, Cervera R, Wallace DJ, Tegzova D, et al. A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(12):3918-30.
129. Navarra SV, Guzman RM, Gallacher AE, Hall S, Levy RA, Jimenez RE, et al. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*. 2011;377(9767):721-31.
130. Baker KP, Edwards BM, Main SH, Choi GH, Wager RE, Halpern WG, et al. Generation and characterization of LymphoStat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(11):3253-65.
131. Levine MH, Haberman AM, Sant'Angelo DB, Hannum LG, Cancro MP, Janeway CA, Jr., et al. A B-cell receptor-specific selection step governs immature to mature B cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(6):2743-8.
132. Fischer-Betz R, Schneider M. [Recommendation for use of belimumab for systemic lupus erythematosus]. *Z Rheumatol*. 2013;72(5):462-7.
133. van Vollenhoven RF, Petri MA, Cervera R, Roth DA, Ji BN, Kleoudis CS, et al. Belimumab in the treatment of systemic lupus erythematosus: high disease activity predictors of response. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012;71(8):1343-9.
134. Furie R, Rovin BH, Houssiau F, Malvar A, Teng YKO, Contreras G, et al. Two-Year, Randomized, Controlled Trial of Belimumab in Lupus Nephritis. *The New England journal of medicine*. 2020;383(12):1117-28.
135. Plosker GL, Figgitt DP. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs*. 2003;63(8):803-43.
136. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor

- therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(9):2793-806.
137. Buch MH, Smolen JS, Betteridge N, Breedveld FC, Burmester G, Dorner T, et al. Updated consensus statement on the use of rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(6):909-20.
138. Beckwith H, Lightstone L. Rituximab in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nephron Clinical practice*. 2014;128(3-4):250-4.
139. Merrill JT, Neuwelt CM, Wallace DJ, Shanahan JC, Latinis KM, Oates JC, et al. Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(1):222-33.
140. Rovin BH, Furie R, Latinis K, Looney RJ, Fervenza FC, Sanchez-Guerrero J, et al. Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(4):1215-26.
141. McCarthy EM, Sutton E, Nesbit S, White J, Parker B, Jayne D, et al. Short-term efficacy and safety of rituximab therapy in refractory systemic lupus erythematosus: results from the British Isles Lupus Assessment Group Biologics Register. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2018;57(3):470-9.
142. Lehmann P, Homey B. Clinic and pathophysiology of photosensitivity in lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews*. 2009;8(6):456-61.
143. O'Dwyer T, Durcan L, Wilson F. Exercise and physical activity in systemic lupus erythematosus: A systematic review with meta-analyses. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2017;47(2):204-15.
144. Fiehn C, Herzer P, Holle J, Iking-Konert C, Krause A, Krüger K, et al. Klug entscheiden: . . . in der Rheumatologie. *Dtsch Arztebl International*. 2016;113(24):1154-6.
145. Singh RR, Yen EY. SLE mortality remains disproportionately high, despite improvements over the last decade. *Lupus*. 2018;27(10):1577-81.
146. Yurkovich M, Vostretsova K, Chen W, Avina-Zubieta JA. Overall and cause-specific mortality in patients with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis care & research*. 2014;66(4):608-16.
147. Perry D, Sang A, Yin Y, Zheng YY, Morel L. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011;2011:271694.
148. Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Advances in immunology*. 1985;37:269-390.
149. Heber-Katz E, Lefterovich JM, Bedelbaeva K, Gourevitch D. Spallanzani's mouse: a model of restoration and regeneration. *Current topics in microbiology and immunology*. 2004;280:165-89.
150. Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, McConahey PJ, et al. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *The Journal of experimental medicine*. 1978;148(5):1198-215.

151. Rodriguez-Rodriguez N, Apostolidis SA, Fitzgerald L, Meehan BS, Corbett AJ, Martin-Villa JM, et al. Pro-inflammatory self-reactive T cells are found within murine TCR-alpha-beta(+) CD4(-) CD8(-) PD-1(+) cells. *European journal of immunology*. 2016;46(6):1383-91.
152. Cohen PL, Eisenberg RA. Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annual review of immunology*. 1991;9:243-69.
153. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*. 1992;356(6367):314-7.
154. Nagata S. Mutations in the Fas antigen gene in lpr mice. *Seminars in immunology*. 1994;6(1):3-8.
155. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*. 2009;30(2):180-92.
156. Takaba H, Takayanagi H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends in immunology*. 2017;38(11):805-16.
157. Kolaja GJ, Fast PE. Renal lesions in MRL mice. *Veterinary pathology*. 1982;19(6):663-8.
158. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. 1985;150(1):76-85.
159. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry*. 1981;112(2):195-203.
160. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(9):4350-4.
161. Egger D, Bienz K. Protein (western) blotting. *Molecular biotechnology*. 1994;1(3):289-305.
162. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
163. Romero-Calvo I, Ocon B, Martinez-Moya P, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Analytical biochemistry*. 2010;401(2):318-20.
164. Koontz L. TCA precipitation. *Methods in enzymology*. 2014;541:3-10.
165. Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Etiopathogenesis of murine SLE. *Immunological reviews*. 1981;55:179-216.
166. Liu W, Szalai A, Zhao L, Liu D, Martin F, Kimberly RP, et al. Control of spontaneous B lymphocyte autoimmunity with adenovirus-encoded soluble TACI. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(6):1884-96.
167. Möckel T, Basta F, Weinmann-Menke J, Schwarting A. B cell activating factor (BAFF): Structure, functions, autoimmunity and clinical implications in Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Autoimmunity reviews*. 2021;20(2):102736.

168. Peles E, Schlessinger J, Grumet M. Multi-ligand interactions with receptor-like protein tyrosine phosphatase beta: implications for intercellular signaling. *Trends in biochemical sciences*. 1998;23(4):121-4.
169. Asai H, Yokoyama S, Morita S, Maeda N, Miyata S. Functional difference of receptor-type protein tyrosine phosphatase zeta/beta isoforms in neurogenesis of hippocampal neurons. *Neuroscience*. 2009;164(3):1020-30.
170. Klavdianou K, Lazarini A, Fanouriakis A. Targeted Biologic Therapy for Systemic Lupus Erythematosus: Emerging Pathways and Drug Pipeline. *BioDrugs*. 2020;34(2):133-47.

9 Danksagung

10 Lebenslauf