

**Aus dem**  
**Nephrologischen Zentrum**  
**Medizinische Klinik und Poliklinik IV**  
**der Ludwig-Maximilians-Universität München**  
Vorstand: Herr Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Untersuchungen zur Rolle von Cathepsin S beim  
experimentellen und humanen  
Systemischen Lupus Erythematodes**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Maia Lucia Tatò  
aus München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Jörg Christoph Prinz

Prof. Dr. Uwe Heemann

Dr. Dirk Baumjohann

Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:

Dr. rer. hum. biol. Santhosh Kumar Vankayala Ramaiah

PD Dr. rer. hum. biol. Maciej Lech

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 10.01.2019

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2014 bis August 2015 am Nephrologischen Zentrum der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt.

(Direktor: Herr Prof. Dr. med. Martin Reincke)

Förderung:

Die vorliegende Arbeit wurde durch das Programm Förderung für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Ludwig-Maximilians-Universität unter der Leitung von Prof. Dr. med. Thomas Gudermann gefördert.

Aus der Promotion ging folgende Originalarbeit als Veröffentlichung hervor:

Tato M, Kumar SV, Liu Y, Mulay SR, Moll S, Popper B, Eberhard JN, Thomasova D, Rufer AC, Gruner S, Haap W, Hartmann G, Anders HJ. Cathepsin S inhibition combines control of systemic and peripheral pathomechanisms of autoimmune tissue injury. *Sci Rep.* 2017 Jun 5;7(1):2775. doi: 10.1038/s41598-017-01894-y.

Die Arbeit wurde präsentiert:

als Poster im Rahmen des International Society of Nephrology (ISN) Nexus Symposium in Berlin (14. – 17. April 2016). Kongressabstract:

Kumar VR S, Tato M, Liu Y, Mulay RS, Gruber S, Haap W, Hartmann G, Anders HJ. Cathepsin-S inhibition has a dual therapeutic effect on the systemic and peripheral pathomechanisms of lupus nephritis, *Kidney International Reports*, Volume 1, Issue 4, Supplement, November 2016, Page S17.

Erklärung:

Die hier aufgeführten Methoden habe ich alle bis auf die folgenden alleine oder unter Anleitung durchgeführt:

1. Sowohl die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Präparate, als auch die Elektronenmikroskopie wurden von Bastian Popper von der Abteilung für Anatomie und Zellbiologie, Biomedizinisches Zentrum, Ludwig-Maximilians-Universität, Planegg-Martinsried, Deutschland durchgeführt.
2. Die histologischen und immunhistologischen Färbungen wurden von Dan Draganovici und Janina Mandelbaum, Medizinisch-Technische-Assistenten unseres Labors, angefertigt.
3. Die Transfektionen der glomerulären Endothelzellen wurden von Dr. rer. hum. biol. Santhosh Kumar Vankayala Ramaiah, Postdoktorand und Mitbetreuer dieser Arbeit, durchgeführt.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Der systemische Lupus erythematodes (SLE) .....	1
1.1.1	Epidemiologie .....	1
1.1.2	Klinisches Bild.....	2
1.1.3	Lupusnephritis.....	5
1.1.4	Kardiovaskuläre Komplikationen.....	8
1.2	Therapie des SLEs .....	9
1.2.1	Mycophenolat-Mofetil.....	10
1.2.2	Nebenwirkungen herkömmlicher Therapieschemata .....	10
1.2.3	Neuere Entwicklung und Forschung .....	11
1.3	Pathomechanismus des SLEs.....	12
1.3.1	Prädisponierende Faktoren.....	12
1.3.2	Entwicklung der Autoimmunität.....	13
1.3.3	Organschädigung.....	18
1.4	Tiermodell.....	20
1.5	Cathepsin S.....	21
1.6	Forschungshypothese .....	32
2	Material und Methoden .....	34
2.1	Material.....	34
2.2	Methoden .....	42
2.2.1	Tierversuche .....	42
2.2.2	Tierhaltung.....	43
2.2.3	Urin- und Blutabnahme .....	43
2.2.4	Organentnahme .....	45
2.2.5	Durchflusszytometrie .....	45
2.2.6	Histologische Untersuchung .....	47
2.2.7	Untersuchung der Autoantikörper-Produktion und Nierenfunktion .....	50

2.2.8	Zellkultur .....	53
2.2.9	Messung der Cathepsin S-Konzentration .....	57
2.2.10	Messung der mRNA Expression mittels Real-Time PCR.....	58
2.2.11	Statistische Auswertung.....	61
3	Ergebnisse .....	62
3.1	Cathepsin S-Inhibition im Tiermodell des SLEs.....	62
3.1.1	Charakteristika der Interventionsgruppen in Tierstudie I.....	62
3.1.2	Systemische Autoimmunität bei Cathepsin S-Inhibition .....	63
3.1.3	Weniger Nierenschäden unter Cathepsin S-Inhibitor-Therapie.....	68
3.1.4	Cat S-Inhibition dämpft die intrarenale Entzündung.....	73
3.2	Zirkulierendes Cathepsin S schädigt glomeruläre Endothelzellen.....	79
3.3	Extrazelluläres Cathepsin S beim SLE des Menschen.....	82
4	Diskussion.....	86
4.1	Cathepsin S-Inhibition schützt vor Autoimmunität und ihren Folgen.....	86
4.2	Cathepsin S-Inhibition schützt vor Endothelschäden beim SLE .....	93
4.3	Der therapeutische Effekt von Mykophenolat-Mofetil versus RO5459072...	98
4.4	Limitationen und Ausblick.....	100
5	Zusammenfassung.....	102
6	Abkürzungsverzeichnis .....	104
7	Literaturverzeichnis .....	106
8	Danksagung.....	122

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Immunkomplex-Ablagerungen bei der Lupusnephritis.....	8
Abbildung 2: Entwicklung der Autoimmunität beim SLE. ....	16
Abbildung 3: Entstehung eines Peptid-MH II-Komplexes. ....	27
Abbildung 4: Spaltung der <i>invariant chain</i> . ....	27
Abbildung 5: PAR2-Aktivierung durch Trypsin.....	29
Abbildung 6: Inhibition der Spaltung der <i>invariant chain</i> . ....	33
Abbildung 7: Inhibition des extrazellulären Cathepsin S.....	33
Abbildung 8: Tierfutter. ....	42
Abbildung 9: Tierstudie I, zeitlicher Ablauf.....	44
Abbildung 10: Isolation von mononukleären Zellen. ....	56
Abbildung 11: Körpergewicht und Futterkonsum. ....	62
Abbildung 12: Kaplan-Meier-Überlebenskurve. ....	63
Abbildung 13: Suppression von Immunzellpopulationen in der Milz. ....	64
Abbildung 14: Durchflusszytometrische Gating-Strategien, Milz. ....	65
Abbildung 15: Senkung der Antikörperspiegel in Blutplasma. ....	66
Abbildung 16: Senkung der Autoantikörper in Blutplasma.....	67
Abbildung 17: Weniger Gewebeschäden.....	70
Abbildung 18: Protektion vaskulärer Endothelzellen.....	71
Abbildung 19: Erhalt der Nierenfunktion. ....	72
Abbildung 20: Intrarenale Entzündung: Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle. ....	74
Abbildung 21: Intrarenale Entzündung: Phagozyten.....	76
Abbildung 22: Intrarenale Entzündung: T-Zellen. ....	77
Abbildung 23: Durchflusszytometrische Gating-Strategien, Niere. ....	78
Abbildung 24: PAR2-Aktivierung durch Cat S schädigt Endothelzellen <i>in-vitro</i> . ....	80
Abbildung 25: Endothelzellschäden durch Cathepsin S in MRL-(FAS)lpr-Mäusen... ..	81
Abbildung 26: Erhöhte Cathepsin S-Blutplasmakonzentration bei SLE-Patienten....	82
Abbildung 27: Neutrophile Granulozyten und mononukleäre Zellen schütten Cathepsin S aus. ....	85
Abbildung 28: Graphische Zusammenfassung. ....	103
Tabelle 1: ACR-Kriterien.....	4
Tabelle 2: ISN/RPS Klassifikation der Lupusnephritis. ....	6
Tabelle 3: Aktivitäts- und Chronizitäts-Index.....	48

Tabelle 4: Primer-Sequenzen.....	60
Tabelle 5: Charakteristika der Probanden. ....	83

## 1 Einleitung

### 1.1 Der systemische Lupus erythematoses (SLE)

Der SLE ist eine potentiell tödliche Autoimmunkrankheit, die zu den Kollagenosen gezählt wird. Er ist gekennzeichnet durch die Produktion von pathogenen Autoantikörpern gegen Zellkernbestandteile wie Nukleinsäuren. Die dadurch hervorgerufene Entzündung kann zu Gewebeschäden in prinzipiell jedem Organsystem führen<sup>1</sup>.

Über die Jahrhunderte wurde die Krankheit „Lupus“ immer wieder in historischen Schriften genannt. So sprach Herbenius von Tours bereits im 10. Jahrhundert von der Krankheit „Lupus“<sup>2</sup>. Es dauerte jedoch noch fast 1.000 Jahre bis die Erkrankung als „Lupus erythematoses“ (franz.: *Lupus erythemateux*) von dem französischen Dermatologen Beitt im 19. Jahrhundert klassifiziert wurde.<sup>2,3</sup>

#### 1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland lag die Prävalenz des SLEs im Jahr 2002 bei 36,7 Fällen pro 100.000 Einwohner<sup>4</sup>. Im weltweiten Vergleich ist die Erkrankung damit in Deutschland eher selten<sup>5</sup>. In Puerto Rico wurde zum Beispiel eine Prävalenz von 159 Fällen pro 100.000 Einwohner festgestellt<sup>6</sup>. Epidemiologische Studien zeigen, dass Frauen deutlich häufiger betroffen sind als Männer (Verhältnis Frauen zu Männer 9:1) und, dass in gewissen Ethnien, hier sind insbesondere Afro-Amerikaner zu nennen, SLE häufiger vorkommt, als in anderen Ethnien, wie zum Beispiel bei Kaukasiern<sup>4,5,7-14</sup>.

Die Krankheit manifestiert sich meist im gebärfähigen Alter<sup>15</sup>. Es handelt sich demnach überwiegend um junge Patienten, die am Anfang ihres erwachsenen und beruflichen Lebens stehen. SLE-Patienten haben in allen Aspekten eine deutlich niedrigere gesundheitsbezogene Lebensqualität als vergleichbare gesunde Individuen<sup>16</sup>. Dies kommt unter anderem auch daher, dass viele dieser jungen Patienten aufgrund der durch den SLE verursachten Morbidität und vergesellschafteten Komorbiditäten schon wenige Jahre nach Diagnosestellung ihren Beruf nicht mehr ausüben können<sup>17-24</sup>. Dieser Arbeitsausfall trägt zu den erheblichen indirekten Kosten bei, die durch den SLE für die Gesellschaft entstehen. Davon zu unterscheiden sind direkte Kosten, unter anderem verursacht durch Medikamente, Arztbesuche und diagnostische Tests, die

sich für einen SLE-Patienten in Deutschland auf durchschnittlich über 3.000 € im Jahr belaufen<sup>25</sup>.

Das Überleben mit SLE verbesserte sich seit Mitte der 1950er Jahre stetig. Seit den 90er Jahren blieben die Überlebensraten jedoch relativ konstant. In Wohlstandsländern lagen die fünf-, zehn- und 15-Jahresüberlebensraten zwischen 2008 und 2016 bei 95%, 89% und 82%<sup>26</sup>. Hierbei wurde über die Zeit eine Veränderung in der Häufigkeitsverteilung der einzelnen Todesursachen festgestellt. Während bis zu den 90er Jahren die Patienten überwiegend an primären Folgen des SLEs starben, gewinnen seit der Jahrtausendwende Infektionen und kardiovaskuläre Erkrankungen mehr und mehr an Bedeutung<sup>26</sup>. Zur Einschätzung der individuellen Prognose müssen das Befallsmuster und das Ausmaß der jeweiligen Organschäden berücksichtigt werden<sup>27</sup>. So gilt die Lupusnephritis (LN) als eine, vor allem in Bezug auf die Mortalität, besonders schwerwiegende, und gleichzeitig häufige Manifestation des SLEs<sup>28,29</sup>. Es wurde beobachtet, dass die Lebenserwartung von SLE-Patienten mit einer Nierenschädigung um 24 Jahre niedriger ist als die der Normalbevölkerung<sup>30</sup>.

### 1.1.2 Klinisches Bild

Der Verlauf des SLEs ist durch Krankheitsschübe und Remissionsphasen geprägt<sup>1</sup>. Da prinzipiell jedes Organsystem geschädigt werden kann, ist das klinische Erscheinungsbild sehr variabel. Deshalb wird die Erkrankung auch oft als Chamäleon der Medizin bezeichnet<sup>31</sup>. Zu Beginn der Erkrankung sind unspezifische Allgemeinsymptome wie Fieber (29%) oder Gewichtsverlust (13%) häufig. Außerdem weisen 67% der Patienten Arthralgien oder eine Arthritis auf. Viele Patienten leiden auch unter kutanen Manifestationen wie einer Alopezie (20%), einer Photosensitivität (25%) und einem Schmetterlingserythem (24%)<sup>32</sup>.

Während zu Beginn der Erkrankung die oben genannten Symptome bei den meisten Patienten im Vordergrund stehen, kommt es mit zunehmender Krankheitsdauer häufig zu einer Schädigung verschiedener Organsysteme. Außerdem nimmt die Häufigkeit der einzelnen Manifestationen zu. So tritt im Verlauf der Erkrankung bei 58% der Patienten Fieber, bei 27% Gewichtsverlust und bei 30% eine arterielle Hypertonie auf. Über 90% leiden an Arthralgien und Arthritiden, und 90% weisen pathologische Hautveränderungen auf. Die häufigste pulmonale Manifestation ist die Pleuritis und betrifft 22% der Patienten. Zu den häufigsten kardiovaskulären Manifestationen zählen

## Einleitung

die Perikarditis (17%) und die Venenthrombose (6%). Eine persistierende Proteinurie oder zelluläre Zylinder im Urinsediment kommen bei 46% der Patienten vor, während als neuropsychiatrische Manifestation Krampfanfälle (8%) oder Psychosen (4%) im Vordergrund stehen. Bis zu 10% der Patienten präsentieren sich ophthalmologisch und HNO-ärztlich mit den Symptomen eines Sicca-Syndroms. Viele Patienten leiden auch an hämatologischen Komplikationen. 59% haben eine Leukopenie, 19% eine Thrombozytopenie und 12% eine hämolytische Anämie<sup>32</sup>.

Aufgrund dieser oft unspezifischen Symptome und der hohen Variabilität, mit der diese Symptome auftreten, ist die Diagnosestellung oft schwierig.

### ***Diagnosestellung und Klassifikation***

Die Diagnosestellung erfolgt unter anderem analog zu den 1997 überarbeiteten *American College of Rheumatology* (ACR)-Klassifikationskriterien<sup>33</sup>. Diese berücksichtigen klinische Symptome, sowie serologische Parameter. Um die Diagnose SLE zu stellen, müssen mindestens vier der elf Kriterien erfüllt sein (Tabelle 1).

2012 wurde die neue *Systemic Lupus International Collaborating Clinics*(SLICC)-Klassifikation entwickelt, die in mehreren Studien für sensitiver als die ACR-Klassifikation befunden wurde, während die Spezifität niedriger zu sein scheint<sup>34-36</sup>. Nach der neuen Klassifikation kann der SLE auf zwei Arten klassifiziert werden. Einmal müssen mindestens vier der nun 17 Kriterien vorliegen, von denen mindestens eines ein klinisches und eines ein immunologisches Kriterium sein muss. Die Voraussetzungen für einen SLE werden jedoch auch erfüllt, wenn als einzige klinische Manifestation eine bioptisch gesicherte LN zusammen mit SLE-typischen Antikörpern nachweisbar sind<sup>36</sup>. Dies führt dazu, dass vor allem Patienten mit einer LN in der SLICC-Klassifikation besser erfasst werden als mit den ACR-Kriterien, wodurch ihnen frühzeitig der Zugang zu aggressiven Therapieschemata und zu klinischen Studien ermöglicht wird<sup>34</sup>.

## Einleitung

**Tabelle 1: ACR-Kriterien.**

<b>Kriterium</b>	<b>Definition</b>
Schmetterlingserythem	Erythem im Nasen-Wangen-Bereich mit typischer Aussparung der Nasolabialfalten
Diskoider Lupus erythematoses	Diskoide erythematöse Plaques, die unter Ausbildung einer zentralen Atrophie narbig abheilen
Photosensitivität	Auf Sonnenlicht anamnestisch oder vom Arzt selbst beobachtete über die Norm empfindlich reagierende Haut mit Ausbildung eines Hautausschlages
Orale Ulzera	Meist schmerzlose, orale oder nasopharyngeale Schleimhautulzera
Arthritis	Nicht-erosive Arthritis von zwei oder mehr peripheren Gelenken mit Schmerz, Schwellung oder Erguss
Serositis	Pleuritis oder Perikarditis
Nephritis	Persistierende Proteinurie > 0,5 g/d, oder zelluläre Zylinder im Urinsediment (Erythrozyten-, Hämoglobin-, tubuläre oder gemischte Zylinder)
Neurologische Störungen	Zerebraler Krampfanfall oder Psychose, ohne dass andere prädisponierende Faktoren (zum Beispiel metabolische- oder Elektrolytentgleisungen, bestimmte Medikamente/Drogen) vorliegen
Hämatologische Störungen	Hämolytische Anämie, Leukopenie (< 4.000/µl in mindestens zwei Untersuchungen), Lymphopenie (< 1.500/µl in mindestens zwei Untersuchungen) oder Thrombozytopenie (< 100.000/µl ohne, dass disponierende Medikamente eingenommen wurden)
Immunologische Befunde	Nachweis von Antikörpern gegen Doppelstrang-DNA, Smith-Antigen, oder Phospholipid, letzteres basierend auf abnormen anti-Kardiolipin-Antikörpertitern in Serum oder einem positiven Testbefund auf Lupus-Antikoagulanz oder einer falsch-positiven Luesreaktion für > 6 Monate
Antinukleäre Antikörper	Erhöhte Antikörpertiter, ohne dass zuvor Medikamente eingenommen wurden, die einen medikamenten-induzierten Lupus verursachen

ACR = American College of Rheumatology; mindestens vier der elf Kriterien müssen vorliegen um die Diagnose systemischer Lupus erythematoses stellen zu können, DNA = Desoxyribonukleinsäure [modifiziert nach Hochberg *et al.* und Tan *et al.*<sup>33,37</sup>].

### **Sonderformen und spezielle Herausforderungen**

Neben den typischen Manifestationen des SLEs treten oftmals zusätzlich Symptome auf, die eher mit anderen Erkrankungen vereinbar sind. Sind diese aus dem rheumatischen Formenkreis, wie die rheumatoide Arthritis oder andere Kollagenosen, wird dies als Overlap-Syndrom bezeichnet<sup>38</sup>. Auch das Antiphospholipid-Syndrom mit seinen charakteristischen Antikörpern (Lupus-Antikoagulanz-Antikörper, anti-Kardiolipin-Antikörper, anti- $\beta$ -2-Glykoprotein-I-Antikörper) tritt häufig bei SLE-Patienten auf. Es präsentiert sich typischerweise mit dem rezidivierenden Auftreten von venösen und arteriellen Thrombosen<sup>39-42</sup>. Insbesondere in der Schwangerschaft ist das Antiphospholipid-Syndrom ein Risikofaktor sowohl für die Mutter als auch für den Fetus<sup>39</sup>.

Generell gelten Schwangerschaften von SLE-Patientinnen als Risiko-Schwangerschaften. Häufige Schwangerschaftskomplikationen sind Aborte, Frühgeburten, eine intrauterine Wachstumsretardierung des Fetus und Präeklampsien. Darüber hinaus kommt es in der Schwangerschaft gehäuft zu Krankheitsschüben<sup>15</sup>.

Eine in der Regel etwas milder verlaufende Form des SLEs ist der medikamenten-induzierte SLE. Er ist gekennzeichnet durch das Vorkommen von anti-Histon-Antikörpern. Es gibt über 100 Medikamente, die mit einem medikamenten-induzierten Lupus in Verbindung gebracht werden. Ein besonders hohes Risiko weisen hierbei Hydralazin und Procainamid auf. Nach Absetzen des auslösenden Medikaments bildet sich die Erkrankung vollständig zurück<sup>43,44</sup>.

### **1.1.3 Lupusnephritis**

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der LN als Manifestation des SLEs. Bei der LN handelt es sich um eine Immunkomplex-Glomerulonephritis, die sich je nach Art, Verteilung und Ausdehnung der Läsionen unterschiedlich präsentiert.

Die Einteilung in sechs verschiedene Klassen erfolgt über die histologische Auswertung von Nierenbiopsaten anhand der 2003 überarbeiteten Fassung der Klassifikation für LN von der *International Society of Nephrology* und der *Renal Pathology Society* (ISN/RPS) (Tabelle 2)<sup>45</sup>.

## Einleitung

**Tabelle 2: ISN/RPS Klassifikation der Lupusnephritis.**

Klasse	Definition
I	Minimale mesangiale Lupusnephritis: Immunkomplex-Ablagerungen sind nur immunfluoreszenzmikroskopisch sichtbar.
II	Mesangiale proliferative Lupusnephritis: im Lichtmikroskop sichtbare, auf das Mesangium beschränkte Hyperzellularität und Immunkomplex-Ablagerungen.
III	Fokale Lupusnephritis: endo- oder extrakapilläre Glomerulonephritis in < 50% der Glomeruli mit subendothelialen Immunkomplex-Ablagerungen mit/ohne mesangialer Beteiligung. Man unterscheidet III (A) mit aktiven Läsionen, III (A/C) mit aktiven und chronischen Läsionen und III (C) mit chronischen Läsionen.
IV	Diffuse Lupusnephritis: wie III, aber mit Beteiligung von > 50% der Glomeruli. Man unterscheidet zusätzlich zwischen einer segmentalen (IV-S; Läsionen sind auf < 50% des Glomerulums beschränkt) und einer globalen (IV-G; Läsionen betreffen > 50% des Glomerulums) Ausprägung.
V	Membranöse Lupusnephritis: subepitheliale Immunkomplex-Ablagerungen mit/ohne mesangialer Beteiligung. Häufig finden sich Sklerosen.
VI	Fortgeschritten-sklerosierte Lupusnephritis: globale Sklerose von > 90% der Glomeruli, die klinisch oder pathologisch auf eine Lupusnephritis zurückzuführen sind, aber aktuell keine Anzeichen für eine aktive Schädigung zeigen.

ISN/RPS = *International Society of Nephrology/Renal Pathology Society* [modifiziert nach Weening *et al.*<sup>45</sup>].

Die Klassen I und II der LN sind durch ein mesangiales Schädigungsmuster gekennzeichnet. Hierbei kommt es zu einer mesangialen Hyperzellularität und Akkumulation der Matrix verursacht durch Ablagerungen von Immunkomplexen im Mesangium. Klinisch äußert sich diese Art der Schädigung typischer Weise mit einer Mikrohämaturie, subnephrotischer Proteinurie und einer normalen bis leicht eingeschränkten glomerulären Filtrationsrate (GFR)<sup>45</sup>.

Bei den Klassen III und IV handelt es sich um endo- und extrakapilläre Glomerulonephritiden. Endokapilläre Glomerulonephritiden weisen ein endotheliales Schädigungsmuster mit subendothelialen Immunkomplex-Ablagerungen auf. Diese Schädigungsform hat einen exsudativen Charakter und äußert sich mit Endothelzellschäden, einer endokapillären Proliferation und der Einwanderung von Leukozyten. Persistierende Läsionen können zu chronischen Veränderungen führen. Häufig kommt es zusätzlich zu einer mesangialen Proliferation und der Bildung von zellulären Halbmonden. Diese mesangiokapilläre Form der LN wird vor allem bei bereits chronifizierten Glomerulonephritiden beobachtet. Klinisch präsentiert sich das

## Einleitung

endotheliale Schädigungsmuster mit einer Hämaturie, einer leichten bis moderaten Proteinurie und einem akuten GFR-Abfall<sup>45</sup>.

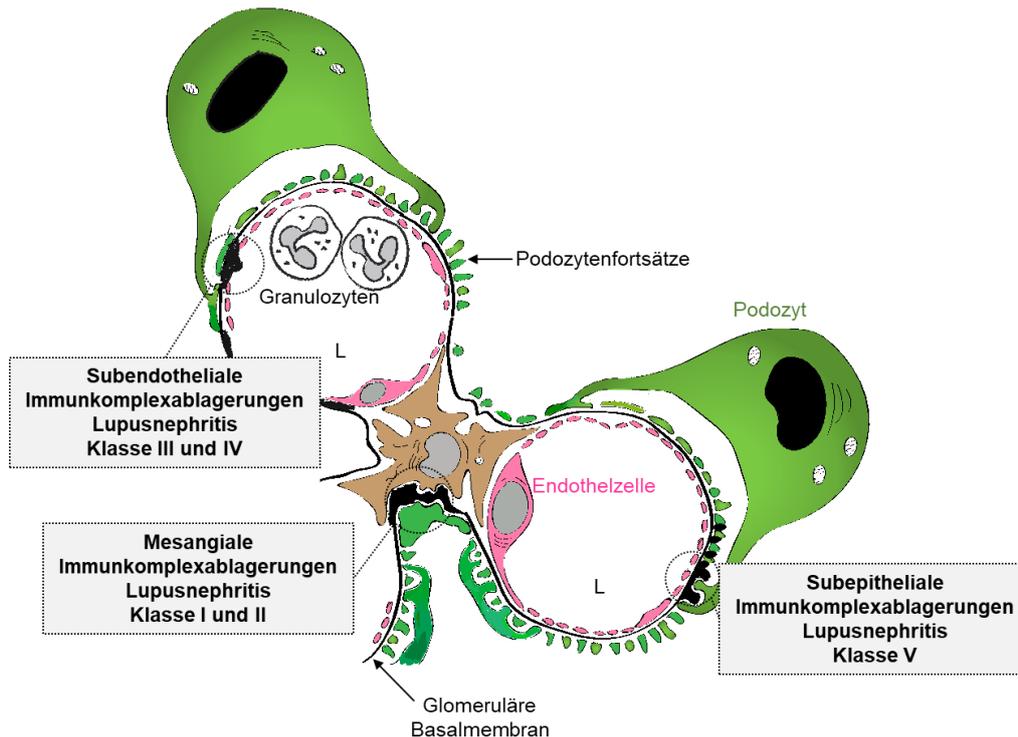
Die Klasse V der LN ist als membranöse Glomerulonephritis definiert. Hier liegt ein epitheliales Schädigungsmuster mit subepithelialen Immunkomplex-Ablagerungen vor, was zu einer Schädigung der Podozyten führt. Oft kommt es zur Bildung von Sklerosen. Die Klasse V der LN kann gleichzeitig mit der Klasse III oder IV auftreten. In der Diagnose werden dann beide Klassen angegeben. Für diese Schädigungsform ist ein nephrotisches Syndrom typisch. Die GFR bleibt zumeist erhalten oder verringert sich im Verlauf<sup>45</sup>.

Bei der Klasse VI handelt es sich um die chronische Form der LN mit einer Sklerosierung von  $\geq 90\%$  der Glomeruli, ohne dass aktive Krankheitszeichen vorliegen (Abbildung 1)<sup>45</sup>.

Auch wenn diese genannten Schädigungsmuster typische klinische Manifestationen aufweisen, ist eine sichere Einteilung anhand von klinischen Parametern nicht möglich. Deshalb sollte immer, sofern keine Kontraindikationen vorliegen, zur Diagnosestellung, Therapieplanung und Einschätzung der Prognose vor Therapiebeginn die Niere biopsiert werden<sup>46</sup>.

Dies ermöglicht auch eine Abgrenzung zu anderen möglicherweise zugrundeliegenden Ursachen, wie zum Beispiel die Antiphospholipid-Syndrom-assoziierte Nephropathie, deren charakteristische Läsionen bei 20 – 30% der SLE-Patienten zu finden sind<sup>47-49</sup>.

## Einleitung



### Abbildung 1: Immunkomplex-Ablagerungen bei der Lupusnephritis.

Schematische Darstellung von Kapillarschlingen eines Glomerulums mit für die Lupusnephritis typischen Immunkomplex-Ablagerungen. L = Lumen. (Diese Abbildung wurde freundlicher Weise von Prof. Dr. H. J. Anders und Priv.-Doz. Dr. M. Lech zur Verfügung gestellt).

### 1.1.4 Kardiovaskuläre Komplikationen

Wie bereits unter Abschnitt 1.1.1 erwähnt, stellen kardiovaskuläre Erkrankungen eine große Herausforderung beim Management des SLEs dar. Die Häufigkeit einen Herzinfarkt zu erleiden, ist bei SLE-Patienten im Vergleich zu der Normalbevölkerung stark erhöht<sup>50</sup>. Selbst nach Berücksichtigung der klassischen Framingham-Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit, bleibt dieses Risiko für SLE-Patienten um mehr als das Siebenfache erhöht<sup>51</sup>. Die endotheliale Dysfunktion gilt als Vorstufe der Atherosklerose und ist ein prädiktiver Faktor für kardiovaskuläre Komplikationen<sup>52,53</sup>. Ein vermehrtes Vorkommen an endothelialen Dysfunktionen wurde in mehreren Studien bei SLE-Patienten festgestellt, selbst wenn die Patienten ansonsten ein geringes kardiovaskuläres Risikoprofil aufwiesen<sup>54,55</sup>. Die genaue Ursache dafür ist noch nicht ausreichend verstanden, doch wird ein Zusammenspiel aus klassischen Risikofaktoren und Faktoren, die auf den SLE zurückzuführen sind, wie ablaufende Entzündungsprozesse, eine Dysregulation des Immunsystems, eine renale Beteiligung und der therapeutische Einsatz von Glukokortikoiden vermutet<sup>54</sup>.

### 1.2 Therapie des SLEs

Der SLE ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht heilbar<sup>56</sup>. Die Ziele der Therapie bestehen darin, eine Remission der Erkrankung zu erreichen, Krankheitsschübe zu vermeiden, Organfunktionen zu erhalten und die Lebensqualität zu verbessern<sup>46,57</sup>. Als allgemeine Maßnahmen werden Gewichtskontrolle, sportliche Aktivität und Einstellen des Zigarettenkonsums empfohlen<sup>27</sup>. Ein konsequenter Lichtschutz auch unter Verwendung von Sonnencreme wirkt sich positiv auf die Entstehung von Hautläsionen aus<sup>58</sup>. Die weitere Therapie orientiert sich maßgeblich an der klinischen Ausprägung und Schwere der Organmanifestationen.

Medikamentös kommen bei milden Formen Antimalariamittel wie Hydroxychloroquin, nichtsteroidale Antiphlogistika und/oder Glukokortikoide zum Einsatz. In Ausnahmefällen, bei schweren refraktären Verläufen, können auch Immunsuppressiva wie Azathioprin oder Methotrexat gegeben werden<sup>27</sup>. Seit dem Jahr 2011 ist der anti-CD257-Antikörper (*cluster of Differentiation 257*; CD257) Belimumab zur Behandlung des SLEs zugelassen. Er kann verabreicht werden, wenn Patienten trotz Standardtherapie eine hohe Krankheitsaktivität aufweisen<sup>56,59</sup>.

Besteht eine Beteiligung des zentralen Nervensystems oder der Niere müssen, je nach Art und Ausprägung, aggressivere Therapieschemata angewendet werden. Bei der LN richtet sich die Therapie nach der histologisch ermittelten Klasse (siehe Tabelle 2). Eine Basismedikation mit Hydroxychloroquin wird dabei in allen Klassen empfohlen. Liegt eine LN der Klasse I oder II vor, werden zusätzlich niedrig bis moderat dosierte Glukokortikoide und in Ausnahmefällen Immunsuppressiva gegeben<sup>46</sup>. Die Therapie der LN ab Klasse III gliedert sich in eine Induktions- und eine Erhaltungsphase. In beiden Abschnitten ist eine Therapie mit Mycophenolat-Mofetil (MMF) Mittel der ersten Wahl. Auf eine zusätzliche Steroidgabe kann in der Regel nicht verzichtet werden, wobei eine intravenöse Pulstherapie mit Methylprednisolon zur Senkung des kumulativen Steroidbedarfs empfohlen wird. Alternativ kann zur Induktion auch intravenös Cyclophosphamid und zur Erhaltung Azathioprin als Erstlinientherapie gegeben werden<sup>46,60-62</sup>. Bei refraktären Verläufen kann eine Therapie mit Calcineurin-Inhibitoren oder dem anti-CD20-Antikörper Rituximab versucht werden<sup>59,60,62</sup>. Trotz Therapie kommt es bei 4 – 20% der LN-Patienten zu einer terminalen Niereninsuffizienz oder Verdoppelung des Serum-Kreatinins<sup>63,64</sup>. In diesen Fällen muss oft als Ultima Ratio eine Nierenersatztherapie in Form von Dialyse oder einer Nierentransplantation durchgeführt werden.

### 1.2.1 Mycophenolat-Mofetil

MMF ist ein Immunsuppressivum mit einer guten oralen Bioverfügbarkeit, das breite Anwendung in der Transplantationsmedizin findet. Es ist die Prodrug des aktiven Metaboliten Mycophenolsäure, einem Inhibitor der Inosin-5'-Monophosphat-Dehydrogenase. Dieses Enzym katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der De-novo-Guanosin-Nukleotid-Synthese und ist daher sehr wichtig für die Zellproliferation<sup>65</sup>. Einerseits kommt die immunsuppressive Wirkung der Mycophenolsäure dadurch zustande, dass die Lymphozytenbildung stark von der De-novo-Synthese der Guanosin-Nukleotide abhängig ist. Andererseits inhibiert Mycophenolsäure die Inosin-5'-Monophosphat-Dehydrogenase Typ II, den Isotyp, der in aktivierten B- und T-Lymphozyten exprimiert wird, mit einer besonders hohen Potenz<sup>65-67</sup>. Zusätzlich zu der immunsuppressiven Wirkung schützt MMF vor lokalen gewebeschädigenden Prozessen, indem es die Zytokin-induzierte Produktion von Stickstoffmonoxid inhibiert, das am Pathomechanismus der Organschädigung bei Nephropathien beteiligt ist<sup>68,69</sup>.

Die Empfehlung MMF zur Behandlung der LN einzusetzen, stützt sich vor allem auf die Ergebnisse von zwei großen randomisierten Studien, der Aspreva Lupus Management Studie und der MAINTAIN Nephritis Studie. In der Aspreva Lupus Management Studie wurde eine Gleichwertigkeit der Effektivität von MMF und intravenösem Cyclophosphamid als Induktionstherapie festgestellt und in der Anschlussstudie zur Ermittlung der Erhaltungstherapie eine Überlegenheit von MMF gegenüber Azathioprin beobachtet<sup>70,71</sup>. In der Aspreva Lupus Management Studie fiel auch auf, dass vor allem LN-Patienten afro-amerikanischer oder hispanischer Abstammung von einer Induktionstherapie mit MMF profitieren<sup>70</sup>. Auch in der MAINTAIN Nephritis Studie wurde MMF mit Azathioprin als Erhaltungstherapie verglichen. Hier wurde jedoch kein Unterschied in der Effektivität der beiden Medikamente festgestellt<sup>72</sup>. Dies konnte auch in der histologischen Auswertung bestätigt werden<sup>73</sup>.

### 1.2.2 Nebenwirkungen herkömmlicher Therapieschemata

Die zur Therapie des SLE verwendeten Substanzen sind sehr nebenwirkungsreich. Vor allem die breit eingesetzten Glukokortikoide stellen durch ihre zahlreichen unerwünschten Wirkungen ein bis heute ungelöstes Problem der SLE-Therapie dar<sup>74</sup>. So tragen sie unter anderem zu dem bei SLE-Patienten ohnehin

## Einleitung

erhöhtem kardiovaskulären Risiko bei<sup>75</sup>. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen Gewichtszunahme, die Entwicklung einer Glukoseintoleranz bis hin zum manifesten Diabetes mellitus, Osteoporose, Hautatrophie, psychische Beschwerden wie eine Depression, ophthalmologische Komplikationen wie Katarakt und Glaukom und Infektionen, die bisweilen fulminant verlaufen<sup>76-78</sup>. Das Auftreten der Nebenwirkungen ist dosisabhängig und nimmt mit Höhe der Dosis und Länge der Einnahmedauer zu. Doch können auch schon bei niedrigen Dosierungen (< 7,5 mg/d Prednisolon) Nebenwirkungen vorkommen<sup>79,80</sup>.

Infektionen sind ein generelles Problem bei immunsuppressiven Therapien. Auf sie ist ein Teil der Todesfälle bei SLE-Patienten zurückzuführen<sup>81</sup>. Auch zeigen Langzeitstudien, dass nach immunsuppressiven Therapien, zum Beispiel mit Cyclophosphamid, Neoplasien vermehrt auftreten<sup>82</sup>. Cyclophosphamid ist zudem ausgesprochen gonadotoxisch<sup>83</sup>.

Diese häufigen und schwerwiegenden Nebenwirkungen der zur Therapie des SLE eingesetzten Medikamente mit ihrer breiten Immunsuppression und bisweilen hohen Toxizität verdeutlichen die Notwendigkeit für die Entwicklung von neuen spezifischen und gut verträglichen Medikamenten.

### 1.2.3 Neuere Entwicklung und Forschung

Obwohl viel an neuen Therapien für den SLE geforscht wird, gab es seit 1959 nur ein Medikament, nämlich Belimumab, das von der *Food and Drug Administration* für die SLE-Therapie zugelassen wurde. Einer der Gründe hierfür wird in der Heterogenität der Erkrankung und der dadurch erschwerten Definition geeigneter Studienendpunkte gesehen<sup>84</sup>. Einen Lösungsansatz bietet die personalisierte Medizin, also eine Art der Therapie- und Studienplanung basierend auf individuellen molekularen Charakteristika der Patienten<sup>85</sup>.

Bei der aktuellen Medikamentenentwicklung liegt der Fokus vor allem auf den sogenannten „*Targeted Therapies*“. Hierbei handelt es sich um Therapien, die gezielt in den Pathomechanismus des SLEs eingreifen. Die hierfür identifizierten Zielstrukturen sind unter anderem B-Zellen, Zytokine wie Typ-I Interferone, regulatorische T-Zellen, Ko-Stimulatoren wie das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Protein 4 und das Komplement C5<sup>56</sup>.

### 1.3 Pathomechanismus des SLEs

Der Pathomechanismus des SLEs besteht aus einem komplexen Zusammenspiel aus genetischen Faktoren, Umweltfaktoren und immunologischen Defekten und ist noch nicht vollständig verstanden<sup>86</sup>.

#### 1.3.1 Prädisponierende Faktoren

Durch genomweite Assoziationsstudien wurden über 50 Gene identifiziert, die mit dem SLE assoziiert sind<sup>87</sup>. Überwiegend handelt es sich hierbei um Genvarianten, deren einzelner Effekt gering ist, doch treten mehrere dieser Genvarianten zusammen auf, ergibt dies eine Empfänglichkeit für die Entstehung eines SLEs<sup>1</sup>. Diese Gene sind vor allem für die Clearance von apoptotischen Zellen und Immunkomplexen, die Aktivierung von Toll-Like-Rezeptoren (TLR), die Typ-I Interferon- und *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF-κB)-Signalwege und die Funktionen der T- und B-Zellen mitverantwortlich<sup>88</sup>. Mit zu den stärksten prädisponierenden Faktoren für den SLE, zählen Defekte der Bestandteile des Komplementsystems, wie C1q oder C4. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass es auf dem Boden dieser Defekte zum einen zu einer gestörten Clearance von apoptotischen Zellen und Immunkomplexen kommt. Zum anderen tragen diese Defekte durch eine beeinträchtigte Elimination von selbst-reaktiven B-Zellen zu dem Toleranzverlust gegenüber körpereigenen Antigenen dieser Zellen bei<sup>89</sup>.

Zusätzlich zu der genetischen Prädisposition können auch gewisse Umweltfaktoren zu der Entstehung eines SLEs beitragen. So wurden unter anderem Rauchen, virale Infekte, zum Beispiel mit dem Epstein-Barr Virus und die Exposition zu Silicatstäuben mit einem erhöhten Risiko für einen SLE in Zusammenhang gebracht<sup>90-92</sup>.

Eine Verbindung zwischen Umwelt und Genetik bildet die Epigenetik. Über Mechanismen, die Einfluss auf die Expression eines Gens nehmen, wie zum Beispiel Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*; DNA)-Methylierung, ist die Epigenetik an der Entwicklung eines SLEs beteiligt<sup>93</sup>. Unterstützt wird diese Annahme unter anderem dadurch, dass festgestellt wurde, dass gewisse DNA-Abschnitte bei Patienten mit einem aktiven SLE im Vergleich zu gesunden Probanden hypomethyliert sind, wie zum Beispiel T-Zellen-DNA<sup>94</sup>. Auch der durch Hydralazin und Prokainamid induzierte SLE scheint zumindest teilweise darauf zurückzuführen zu sein, dass diese Medikamente DNA-Methylierungen inhibieren<sup>95</sup>.

## Einleitung

Ein weiterer prädisponierender Faktor für den SLE stellt das weiblich Geschlecht dar. Hierfür werden verschiedene Ursachen verantwortlich gemacht. Zum einen geht man davon aus, dass Sexualhormone, wie Östrogen, durch ihre immunstimulierende Wirkung einen Einfluss auf die Entwicklung und Aktivität der Erkrankung haben<sup>96</sup>. Zum anderen führt das X-Chromosom, mit den auf ihm befindlichen Genen, zu einer erhöhten Empfänglichkeit für die Entstehung eines SLEs. So weisen Männer mit einem Klinefelter-Syndrom, die also einen Karyotyp mit 47, XXY haben, ein deutlich erhöhtes Risiko auf an einem SLE zu erkranken<sup>97</sup>.

### 1.3.2 Entwicklung der Autoimmunität

Sowohl das angeborene, innate Immunsystem, als auch das adaptive Immunsystem weisen mehrere Veränderungen bei SLE-Patienten auf, die schließlich zu einem Verlust der Selbst-Toleranz, der Produktion von Autoantikörpern und letzten Endes zu Organschäden führen (Abbildung 2).

#### ***Innates Immunsystem***

Man geht davon aus, dass ein Überangebot an Kernmaterial, durch ein erhöhtes Vorkommen an apoptotischen und nekrotischen Zellen bei gleichzeitig gestörter Clearance, eine B-Zell-Aktivierung mit nachfolgender Produktion von Antikörpern gegen Zellkernbestandteile (antinukleäre-Antikörper; ANA), verursacht<sup>98</sup>. Zu den zugrundeliegenden Mechanismen, die die Clearance beeinträchtigen, zählen unter anderem Defekte bei der Phagozytose<sup>99</sup>, Veränderungen einiger Zelloberflächenproteine, wie Rezeptortyrosinkinasen<sup>100</sup>, und eine gestörte Opsonierung von apoptotischen Zellen durch zum Beispiel einem Mangel an C-reaktiven Protein oder an Bestandteilen des Komplementsystems<sup>101,102</sup>.

Zu dem Überangebot an Kernmaterial tragen neben apoptotischen und nekrotischen Zellen auch neutrophile Granulozyten bei. Durch ihre Fähigkeit *extracellular traps* (NETs) zu bilden, setzen neutrophile Granulozyten Kernmaterial frei<sup>103</sup>. NETs dienen eigentlich der antimikrobiellen Abwehr und entstehen durch eine spezielle Form des Zelltodes, der NETose<sup>104</sup>. Sie enthalten unter anderem DNA, Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*; RNA), Histone und antimikrobielle Peptide wie LL37. Es wurde beobachtet, dass NETs bei SLE-Patienten vermehrt gebildet werden<sup>103</sup>. Zeitgleich ist ihr Abbau gestört<sup>105</sup>. Neben dem freiwerdenden Kernmaterial sind auch weitere Bestandteil der NETs, hier ist vor allem LL37 zu nennen, am Pathomechanismus des

## Einleitung

SLEs beteiligt. Denn LL37 verhindert einerseits den Abbau von freier DNA und, indem es Komplexe mit freier DNA bildet, aktiviert es andererseits plasmazytoide dendritische Zellen zur Ausschüttung von Typ-I Interferonen<sup>103</sup>. Ein weiteres Protein, das im Zuge der NETose frei wird, ist das *High-Mobility-Group-Protein B1*. Dieses Protein kommt für gewöhnlich im Zellkern vor, wo es an Chromatin gebunden ist. Bei Verlust der Integrität der Zellmembran gelangt es nach extrazellulär, wo es eine stark proinflammatorische Wirkung hat<sup>106,107</sup>.

Das Überangebot an freiem Kernmaterial führt zu einer Bildung von Immunkomplexen, die Nukleinsäuren enthalten. Diese Immunkomplexe führen ebenfalls zu einer Stimulation der plasmazytoiden dendritischen Zellen, so dass sie Typ-I Interferone produzieren<sup>108,109</sup>.

SLE-Patienten weisen häufig hohe Werte an Typ-I Interferonen auf, was sich auch in der Interferon-Signatur der Genexpression in Blutzellen von SLE-Patienten widerspiegelt<sup>110,111</sup>. Typ-I Interferon gilt als wichtiger Mediator in der Entstehung des SLEs, denn es regt seinerseits wiederum neutrophile Granulozyten zur Durchführung der NETose an<sup>103</sup>, fördert die Differenzierung von Monozyten zu myeloiden dendritischen Zellen<sup>112</sup> und induziert die Expression von TLR7 in B-Zellen und in myeloiden dendritischen Zellen<sup>113,114</sup>. Zudem führt Interferon- $\alpha$  zu Endothelzellschäden und trägt so zu einer akzelerierten Atherosklerose bei SLE-Patienten bei<sup>115</sup>.

TLR7 und TLR9 sind Rezeptoren, die unter anderem durch Nukleinsäuren aktiviert werden und eine proinflammatorische Wirkung haben<sup>116</sup>. Das Überangebot an apoptotischem und nekrotischem Material führt in innatem Immunzellen zu einer Aktivierung von TLR7 und TLR9. Je nach Zelltyp führt dies zur Aktivierung verschiedener proinflammatorischer Signalwege und zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Typ-I Interferonen oder dem *B cell activating factor*<sup>1</sup>.

In Antigen-präsentierenden Zellen, wie zum Beispiel dendritischen Zellen, führt das Kernmaterial aufgrund seiner Ähnlichkeit zu viralen Partikeln über TLR7 zu einer pseudoantiviralen Immunantwort und so zu einer Aktivierung dieser Zellen. Die körpereigenen Zellkernbestandteile, die von den Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und via des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse II (*Major Histocompatibility Complex II*; MHC II) an der Zelloberfläche

präsentiert werden, besitzen durch diese Aktivierung das Potential T-Zellen des adaptiven Immunsystems zur klonalen Expansion anzuregen<sup>117-119</sup>.

### ***Adaptives Immunsystem***

Damit es zu einer Aktivierung und klonalen Expansion von B- und T-Zellen durch körpereigenes Material kommen kann, muss ein Verlust der Selbst-Toleranz in diesen Zellen stattfinden. Ständig entstehen im Zuge der somatischen Rekombination auch selbstreaktive B- und T-Zellen. Das Immunsystem hat deshalb zahlreiche Mechanismen und Checkpoints entwickelt, um eine Ausselektion der selbstreaktiven Zellen zu garantieren<sup>120</sup>.

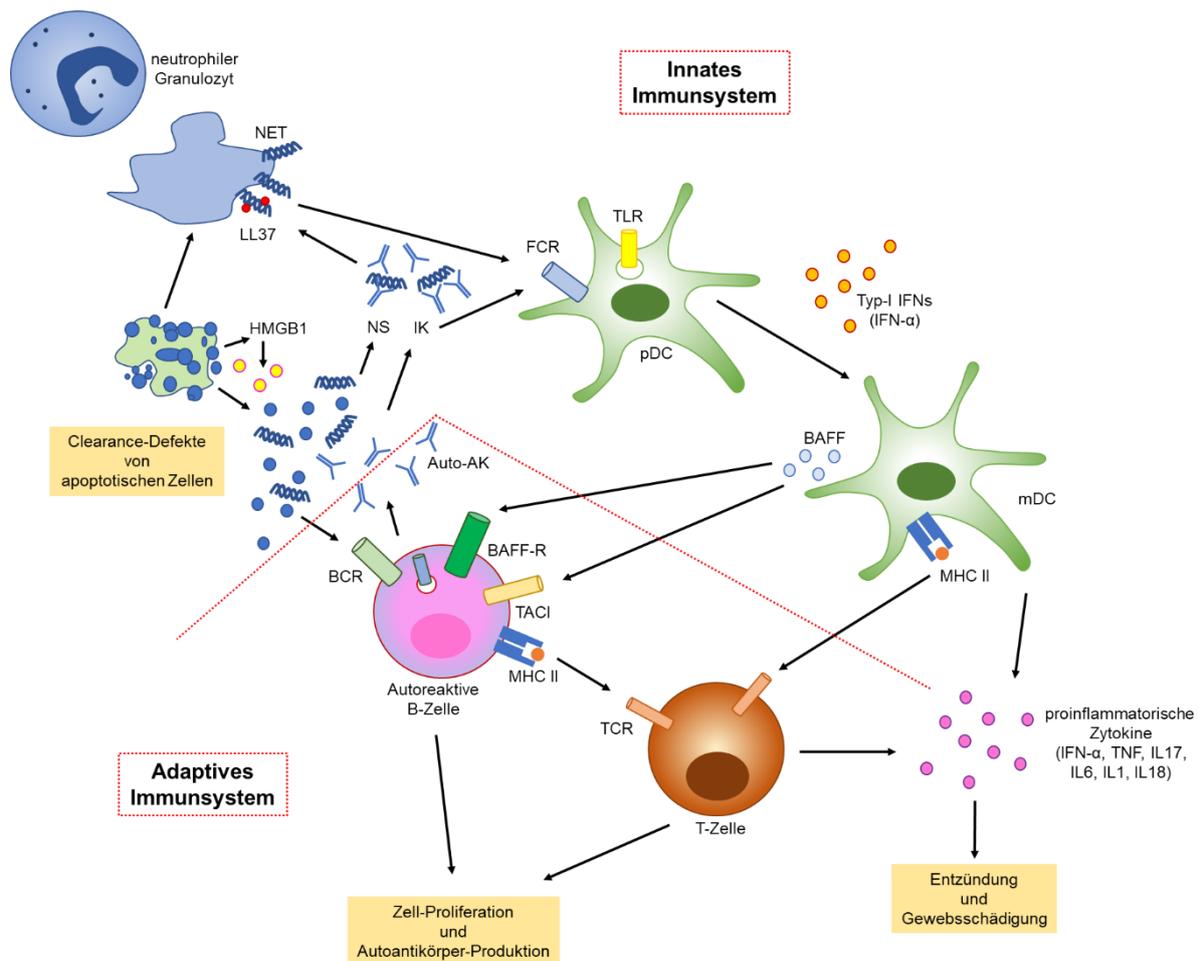
Man vermutet, dass der Verlust der Selbst-Toleranz in T-Zellen unter anderem durch eine aberrante Antigenpräsentation durch MHC II zustande kommt<sup>1</sup>. Gewisse Haplotypen der HLA (Humanes Leukozyten Antigen)-Gene (HLA beim Menschen entspricht dem murinen MHC) stellen besondere Risikoallele für die Entstehung eines SLEs dar<sup>121</sup>. Außerdem ist in dendritischen Zellen von Lupus-Patienten die Genexpression der HLA-D Region hochreguliert<sup>122</sup>. Eine weitere Ursache für den Toleranzverlust der T-Zellen sieht man in einer Dysfunktion von regulatorischen T-Zellen<sup>123</sup>. Bei SLE-Patienten besteht eine Dysbalance zwischen regulatorischen T-Zellen und Effektor-T-Zellen, wie folliculären T-Helfer-Zellen und den T-Helfer17-Zellen, wobei die Effektor-T-Zellen überwiegen<sup>124</sup>. Durch die therapeutische Applikation von Interleukin 2 kann dies korrigiert und die Krankheitsaktivität gesenkt werden<sup>124</sup>.

Zusätzlich zum Toleranzverlust weisen T-Zellen von SLE-Patienten verschiedene Auffälligkeiten auf, wie beispielsweise eine Überexpression des Ko-Stimulator-CD40-Ligands und des Adhäsionsmoleküls CD44, und einen veränderten T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplex<sup>125</sup>.

Auch B-Zellen verlieren ihre Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen. Hierfür wird ein Zusammenspiel aus mehreren verschiedenen Mechanismen verantwortlich gemacht. So wurden zum Beispiel Defekte in mehreren frühen Checkpoints der B-Zell-Selektion entdeckt<sup>126</sup>. Des Weiteren scheinen erhöhte Werte des *B cell activating factors* im Serum von SLE-Patienten<sup>127</sup> und Defekte der Anergie bei naiven B-Zellen<sup>128</sup> zu dem Verlust der Selbst-Toleranz beizutragen. Ein großer Anteil der autoreaktiven B-Zellen entstehen aber auch durch Hypermutation in Keimzentren sekundär lymphatischer Organe<sup>129</sup>.

## Einleitung

Hierbei kommt den folliculären T-Helfer-Zellen eine besondere Bedeutung zu<sup>130</sup>. Antigen-präsentierende Zellen, die zuvor durch Kernmaterial über TLR7 aktiviert wurden, fördern die Differenzierung von antigenspezifischen folliculären T-Helfer-Zellen<sup>130</sup>. Diese wiederum helfen bei der Differenzierung der für dieses Antigen spezifischen B-Zellen zu Plasmazellen und hoch-affinen Gedächtniszellen und sie unterstützen den Immunklassenwechsel, was zu einer Produktion von hohen Mengen an Autoantikörpern führt<sup>130-132</sup>.



**Abbildung 2: Entwicklung der Autoimmunität beim SLE [modifiziert nach Liu *et al.*].**

Ein erhöhtes Anfallen an immunstimulierendem Kernmaterial führt über Antigen-präsentierende Zellen, wie dendritische Zellen, zu einer Triggerung des adaptiven Immunsystems und der sukzessiven Produktion autoantigen-spezifischer T-Zellen und autoantigen-spezifischer Antikörper. Auto-AK = Autoantikörper; BAFF = *B Cell activating factor*; BAFF-R = *B Cell activating factor-Receptor*; BCR = B-Zell-Rezeptor; FCR = Fc-Rezeptor; HMBG1 = *High-Mobility-Group-Protein B1*; IFN- $\alpha$  = Interferon- $\alpha$ ; IK = Immunkomplex; IL1/6/17/18 = Interleukin 1/6/17/18; mDC = myeloide dendritische Zelle; MHC II = *Major Histocompatibility Complex II*; NET = *extracellular trap*; NS = Nukleinsäure; pDC = plasmazytoide dendritische Zelle, TACI = *Transmembrane activator and CAML interactor*; TCR = T-Zell-Rezeptor; TNF = Tumornekrosefaktor; Typ I IFNs = Typ I Interferone

### **Antikörper**

Autoantikörper gegen Kernmaterial sind charakteristisch für den SLE. Insbesondere sind hier Antikörper gegen Doppelstrang-DNA (anti-Doppelstrang-DNA-Antikörper; anti-dsDNA-Antikörper) oder anti-Smith-Antikörper, die gegen *small nuclear ribonucleoprotein particles* gerichtet sind, zu nennen<sup>133</sup>.

Follikuläre B-Zellen sind in den Follikeln sekundär lymphatischer Organe angesiedelt. Sie bilden die größte Gruppe der B-Zellen. Damit aus naiven follikulären B-Zellen antikörpersezernierende Plasmazellen werden, muss eine Stimulation sowohl mit einem Antigen, das an den B-Zell-Rezeptor bindet, als auch mit einer Antigen-spezifischen T-Zelle stattfinden. Nach der Stimulation gibt es zwei unterschiedliche Mechanismen, die ablaufen. Einmal differenzieren die aktivierten B-Zellen zu B-Lymphoblasten. Diese teilen sich und können einen Immunklassenwechsel durchlaufen. Auch ein geringes Maß an somatischer Hypermutation findet hier statt. Anschließend differenzieren sie zu kurzlebigen Plasmablasten. Diese Plasmablasten sezernieren Antikörper, die eine niedrige Affinität aufweisen. Sie sind jedoch ein wichtiger Bestandteil der frühen Immunabwehr<sup>134,135</sup>.

Der zweite Mechanismus findet in den Keimzentren statt, die sich im Zentrum der Follikel in sekundär lymphatischen Organen bilden. In diesen Keimzentren kommt es zu einer starken Proliferation und somatischen Hypermutation der aktivierten B-Zellen. Hierdurch werden Gedächtniszellen oder langlebige Plasmazellen gebildet, die große Mengen an hoch-affinen Antikörpern sezernieren<sup>134</sup>.

Bei einer humoralen Immunantwort steigen IgM-Antikörper (Immunglobulin M; IgM) als erstes im Serum an, bis es verzögert nach einem abgelaufenen Immunklassenwechsel vermehrt zu der Produktion von IgGs (Immunglobulin G; IgG), IgAs (Immunglobulin A; IgA) und IgEs (Immunglobulin E; IgE) kommt. Der Immunklassenwechsel von IgM zu IgG ist ein wichtiger Schritt bei der Entstehung von Autoimmunerkrankheiten<sup>136</sup>.

Antinukleäre Antikörper sind zu einem Großteil IgG-Antikörper. Vor allem anti-dsDNA-IgGs korrelieren stark mit der Aktivität des SLEs. Hierbei handelt es sich überwiegend um IgGs der Unterklassen IgG1 und IgG3<sup>133</sup>. Es gibt insgesamt vier IgG-Unterklassen (IgG1 – 4). IgG1-Antikörper machen den größten Anteil der IgG-Antikörper aus, gefolgt von IgG2-Antikörpern. Die Antigene, die die Bildung von IgG1- und IgG3-Antikörpern triggern, sind Proteine, während IgG2-Antikörper vermehrt nach einer Exposition zu Lipopolysacchariden und Glykolipiden gebildet werden. IgG4-Antikörper sind typisch

## Einleitung

für eine chronische Antigenexposition wie sie zum Beispiel bei einer Allergie oder einem Parasitenbefall vorkommt<sup>137</sup>.

Ein entscheidender Unterschied zwischen den IgG-Subklassen ist, dass vor allem IgG1- und IgG3-Antikörper das Komplementsystem aktivieren können, während dies IgG2-Antikörper nur in hoher Konzentration und IgG4-Antikörper gar nicht vermögen. Auch die Fähigkeit verschiedene Immunzellen zu aktivieren und so eine Zellvermittelte Immunantwort auszulösen ist bei IgG1- und IgG3-Antikörpern am ausgeprägtesten. Sie binden verschiedene Fcγ-Rezeptoren auf Monozyten, neutrophilen Granulozyten und natürlichen Killerzellen, während IgG2- und IgG4-Antikörper jeweils nur mit einem Fcγ-Rezeptor deutlich interagieren. Bei IgG2-Antikörpern ist dies der Fcγ-Rezeptor IIA-H131, der auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten vorkommt und bei IgG4-Antikörpern ist dies der Fcγ-Rezeptor I, der von Monozyten und aktivierten neutrophilen Granulozyten exprimiert wird<sup>137</sup>.

Im Gegensatz zu anti-dsDNA-Antikörpern der Klasse IgG, korreliert beim SLE die Höhe der IgM-Antikörpertiter nicht mit der Krankheitsaktivität<sup>133</sup>.

IgM-Antikörper sind besonders, da sie den größten Anteil der natürlichen Antikörper bilden<sup>138</sup>. Natürliche Antikörper werden von B1-Zellen produziert, ohne dass eine Exposition zu dem spezifischen Antigen vorausgegangen ist und bilden so einen sofortigen Schutz sowohl vor viralen<sup>139</sup>, als auch vor bakteriellen<sup>140</sup> Pathogenen. B1-Zellen kommen überwiegend im Peritoneum, dem Pleuraspalt und Schleimhäuten vor, also Orte, die potenziell großen Mengen an Pathogenen aus der Umwelt ausgesetzt sind. Deshalb ist hier eine schnelle Immunantwort entscheidend<sup>134</sup>. Zudem geht man davon aus, dass natürliche IgM-Antikörper vor der Entstehung von Autoimmunerkrankungen schützen, indem sie zum Beispiel an körpereigenes antigenes Material binden und so zu dessen Beseitigung über die Aktivierung des Komplementsystems beitragen<sup>141,142</sup>.

### 1.3.3 Organschädigung

Autoantikörper sind auf verschiedene Weise an den Prozessen der Gewebeschädigung bis hin zum Funktionsverlust des Organs beteiligt<sup>98</sup>. In der Niere zum Beispiel lagern sie sich als Immunkomplexe in verschiedenen Bereichen des Glomerulums ab. Lange Zeit nahm man an, dass die Ablagerungen durch zirkulierende Immunkomplexe entstehen, die sich außerhalb der Niere bilden und sich dann passiv im Gewebe absetzen. Heute geht man jedoch davon aus, dass sich die

## Einleitung

Immunkomplexe erst im Organ selbst bilden, indem Lupus-typische Antikörper, wie anti-dsDNA-Antikörper, Antigene in der Niere erkennen und an diese binden<sup>143,144</sup>. So gibt es beispielsweise anti-dsDNA-Antikörper, die mit Annexin II auf Mesangiumzellen reagieren<sup>145</sup> oder welche, die an Nukleosomen binden<sup>146</sup>. Kernmaterial kommt aufgrund der gestörten Apoptose- und Clearance-Mechanismen beim SLE in großer Menge vor und unterhält die Autoimmunreaktion, indem es einerseits eine Zielstruktur für Autoantikörper darstellen und andererseits, von dendritischen Zellen aufgenommen und prozessiert, selbstreaktive T- und B-Zellen aktiviert<sup>146</sup>. Die Immunkomplex-Ablagerungen führen dazu, dass renale Zellen und Komplementfaktoren aktiviert werden, wodurch es zu einer Ausschüttung von proinflammatorischen Entzündungsmediatoren und einer direkten Gewebeschädigung kommt<sup>147,148</sup>. Diese Prozesse haben die Folge, dass Entzündungszellen wie Leukozyten und dendritische Zellen in das Gewebe einwandern. Dadurch wird die Entzündungsreaktion nochmals verstärkt und es entsteht ein *Circulus vitiosus*, wodurch Gewebeschäden sowie reaktive Umbauprozesse weiter vorangetrieben werden<sup>149</sup>. Welche Zellen geschädigt werden, hängt ganz davon ab, an welcher Stelle sich die Immunkomplexe ablagern. Mesangiale Ablagerungen (LN Klasse I und II) führen zu einer Schädigung der Mesangiumzellen, während subendotheliale Ablagerungen (LN Klasse III und IV) eine Schädigung der Endothelzellen und der glomerulären Basalmembran bewirken. Anders als in den LN Klassen I und II ist in den Klassen III und IV das Risiko hoch, dass es zu einer sekundären Schädigung von Podozyten und einer Ausdehnung der Läsionen auf über 50% des Glomerulums kommt, zwei wichtige Mechanismen, die der Entstehung von Sklerosen und der Chronifizierung der LN zugrunde liegen. Subepitheliale Ablagerung (LN Klasse V) schädigen Podozyten. Auch in dieser Klasse der LN ist das Risiko einer Chronifizierung hoch (siehe Abschnitt 1.1.3 und Abbildung 1)<sup>143</sup>. Eine weitere Lokalisation für Immunkomplex-Ablagerungen ist die tubuläre Basalmembran. Diese Ablagerungen sind stark mit dem Auftreten von tertiär lymphatisches Gewebe im renalen Interstitium assoziiert. Das tertiär lymphatische Gewebe besteht aus T- und B-Zellaggregaten oder Keimzentren mit Infiltraten von follikulären dendritischen Zellen<sup>150</sup>.

Auch an der Schädigung anderer Organe, wie zum Beispiel des zentralen Nervensystems, sind Autoantikörper beteiligt. Hier sind unter anderem Antikörper gegen den N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor<sup>151</sup> und gegen das ribosomale P-Protein<sup>152</sup>

zu nennen, die direkt das Gewebe schädigen können. Antiphospholipid-Antikörper können ebenfalls bei der Entstehung von neuropsychiatrischen Syndromen von Bedeutung sein, da es durch sie unter anderem vermehrt zu Schlaganfällen mit nachfolgendem Gewebsuntergang kommen kann<sup>153</sup>.

### 1.4 Tiermodell

In dieser Arbeit wurden *Murphy Roths Large/lymphoproliferative* (MRL-(Fas)lpr)-Mäuse als Tiermodell für den SLE verwendet. MRL-(Fas)lpr-Mäuse entwickeln spontan einen SLE-ähnlichen Phänotyp mit einer massiven Lymphadenopathie und Splenomegalie, sowie einer Glomerulonephritis, Dermatitis und Polyarthrit. Außerdem lassen sich im Serum hohe ANA-Titer und deren SLE-typische Unterformen anti-dsDNA-, anti-SSA(Ro)- und anti-SSB(La)-Antikörper nachweisen<sup>154</sup>.

Die Glomerulonephritis ist gekennzeichnet durch mesangiale und subendotheliale Komplement C3- und Immunglobulin-Ablagerungen und zeigt das Bild einer subakuten proliferativen Glomerulonephritis mit einer Proliferation der Endothel- und Mesangiumzellen, sowie einer Verdickung der Basalmembran und der Kapillarschlingen<sup>154,155</sup>. Erste Immunglobulin-Ablagerungen können ab einem Alter von 2 Monaten beobachtet werden und eine Proteinurie tritt in der Regel mit etwa 3 Monaten auf<sup>155</sup>. Für MRL-(Fas)lpr-Mäuse ist eine 50%ige Mortalität nach 5 – 6 Monaten beschrieben, wobei die Glomerulonephritis die Haupttodesursache darstellt. Weibliche Mäuse sterben etwas früher als männliche<sup>155,156</sup>.

MRL-Mäuse entstanden durch das Kreuzen der Mauslinien LG, AKR, C3H und C57BL/6<sup>156</sup> und entwickeln ein mildes autoimmunes Syndrom<sup>155</sup>. Durch weiteres Kreuzen der MRL-Mäuse kam es im Verlauf zu einer sogenannten lpr-Mutation im Fas-Gen<sup>157</sup>. Der Fas-Rezeptor induziert Apoptose und unterstützt auf diese Weise die negative Selektion selbst-reaktiver B- und T-Zellen<sup>158,159</sup>. Durch die lpr-Mutation ist die Expression des Fas-Gens gestört, und es kommt zu einer Lymphoproliferation mit einer besonderen Expansion doppelt-negativer CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>B220<sup>+</sup> T-Zellen<sup>154,160</sup>. Auch beim Menschen wurde eine Assoziation zwischen gewissen Fas-Gen-Polymorphismen und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines SLEs festgestellt<sup>161</sup>. Ein entscheidender Unterschied zwischen dem humanen SLE und dem autoimmunen Syndrom bei MRL-(Fas)lpr-Mäusen ist jedoch, dass Typ-I Interferone in

dem Pathomechanismus der murinen Form keine größere Bedeutung zuzukommen scheint<sup>162</sup>.

All dies und der vergleichsweise rasche und schwerwiegende Krankheitsverlauf machen MRL-(Fas)lpr-Mäuse zu einem geeigneten Modell um neue Therapien für den SLE *in-vivo* zu testen und deren Effektivität auf Autoantikörperproduktion und Endorganschäden, wie die LN, zu evaluieren<sup>162,163</sup>.

### 1.5 Cathepsin S

Cathepsin S (Cat S) ist eine Protease. Der Name Cathepsin leitet sich von dem griechischen Wort *καθελειν* ab und bedeutet „verdauen“. Es gibt insgesamt 15 humane Cathepsine, die man nach ihrem aktiven Zentrum in Serin-, Aspartat- oder Cysteinproteasen unterteilt, wobei Cat S der letzteren Gruppe angehört<sup>164,165</sup>.

Die unterschiedlichen Funktionen von Cat S sind im Detail noch nicht vollständig bekannt. Was man weiß, ist, dass Cat S in den Lysosomen/Endosomen Antigen-präsentierender Zellen wie B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen vorkommt und dort eine entscheidende Rolle bei der MHC II-vermittelten Antigenpräsentation spielt<sup>166</sup>.

Cat S ist im Gegensatz zu anderen Cathepsinen auch bei neutralem pH sowohl stabil als auch aktiv, was verdeutlicht, dass Cat S auch extrazelluläre Funktionen erfüllt<sup>167,168</sup>. Zu den extrazellulären Substraten von Cat S zählen Kollagen und Elastin<sup>169,170</sup>, das junctionale Adhäsionsmolekül-B<sup>171</sup>, der sekretorische Leukozyten-Protease-Inhibitor<sup>172</sup>, und der Protease-aktivierte Rezeptor-2 (PAR2)<sup>173</sup>.

Die Rolle, die Cat S im Pathomechanismus verschiedener Krankheiten einnimmt, und ob sich Cat S als Zielstruktur für eine therapeutische Intervention oder als Biomarker eignet, ist Bestandteil aktueller Forschung. Zu den Krankheiten, die hierbei im Fokus stehen, zählen mehrere Karzinome, zystische Fibrose, kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus, Adipositas, Schmerz, allergisch-entzündliche Erkrankungen und verschiedene Autoimmunkrankheiten<sup>164</sup>. Anzumerken ist auch, dass Cat S<sup>-/-</sup>-Mäuse keine Entwicklungs- und Fertilitätsstörungen aufweisen<sup>174</sup>.

Riese *et al.* veröffentlichten 1998 die ersten *in-vivo* Versuche in denen eine Cat S-Inhibition als möglicher Therapieansatz für autoimmune und allergische Erkrankungen untersucht wurde. Dafür testeten sie den spezifischen Cat S-Inhibitor Morpholin Urea–Leucin–Homophenylalanin–Vinylsulfone–Phenyl (LHVS) in zwei verschiedenen Modellen für Ovalbumin-induzierte Immunität an C57BL/6-Wildtyp-Mäusen. Zwei

## Einleitung

Wochen nach der Immunisierung wurde in der Therapiegruppe im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen eine signifikante Suppression der humoralen Immunantwort mit niedrigeren Ovalbumin-spezifischen IgG- und IgM-Antikörpertitern im Serum beobachtet. Auch gesamt-IgE-Serumkonzentrationen wurden durch die Cat S-Inhibition gesenkt. Die verbesserten Serumkonzentrationen der Antikörper korrelierten mit einem Rückgang der organspezifischen Entzündung mit weniger perivaskulärem entzündlichen Infiltrat in der Lunge und einer geringeren Anzahl an eosinophilen Granulozyten im Bronchial-Sekret<sup>175</sup>.

Auch in anderen autoimmunen Modellen, in denen die Blockade von Cat S als möglicher Therapieansatz getestet wurden, wurden vielversprechende Ergebnisse erzielt. Hierzu zählt unter anderem das Sjögren-Syndrom. Saegusa *et al.* stellten fest, dass beim experimentellen Sjögren-Syndrom die Aktivität von Cat S in Speicheldrüsen, regionalen Lymphknoten und der Milz erhöht ist. In einer anschließenden Tierstudie wurde der spezifische Cat S-Inhibitor Clik60 NFS/sdl-Mäusen, die spontan ein Sjögren-Syndrom entwickeln, über einen Zeitraum von 3 Wochen gegeben. Nach abgeschlossener Therapie zeigte sich, dass bei den behandelten Tieren verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren die antigenspezifische T-Zell-Immunantwort deutlich geringer ausfiel und CD4<sup>+</sup> T-Zellen weniger Aktivierungsmarker exprimierten. Zusätzlich schützte die Cat S-Inhibitor-Therapie erfolgreich vor einer Schädigung und einem Funktionsverlust der Speichel- und Tränendrüsen<sup>176</sup>. Weitere Arbeiten zu diesem Thema stammen von Yang *et al.*, Baugh *et al.* und Rupanagudi *et al.* Yang *et al.* beschäftigten sich hierbei mit der experimentellen autoimmunen Myasthenia gravis. In diesem Modell werden Mäuse mit Acetylcholin-Rezeptoren, die aus dem kalifornischen Zitterrochen *torpedo californica* isoliert werden, immunisiert. Daraufhin bilden die Tiere Antikörper gegen Acetylcholin-Rezeptoren und entwickeln ein Syndrom, das der Myasthenia gravis beim Menschen ähnelt. Yang *et al.* immunisierten für ihre Versuche Cat S<sup>-/-</sup>- und C57BL/6-Mäuse. Nach der Immunisierung fiel in zwei unabhängigen Experimenten auf, dass Cat S<sup>-/-</sup>-Mäuse vor der Entstehung einer klinisch manifesten experimentellen autoimmunen Myasthenia gravis weitestgehend geschützt waren (es erkrankten 17% beziehungsweise 10% der Cat S<sup>-/-</sup>- versus 75% beziehungsweise 80% der C57BL/6-Mäuse). Außerdem war bei den Cat S<sup>-/-</sup>-Mäusen der Krankheitsbeginn verzögert und der Verlauf milder. Auch wiesen die Cat S<sup>-/-</sup>-Mäuse mehr funktionale Acetylcholin-Rezeptoren auf. Die Anzahl war vergleichbar mit der von nicht-immunisierten

## Einleitung

Kontrollmäusen. Serologische Untersuchungen zeigten, dass Antikörperkonzentrationen gegen den Acetylcholin-Rezeptor bei den Cat S<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant niedriger waren, als bei den C57BL/6-Mäusen<sup>177</sup>. Baugh *et al.* untersuchten die therapeutische Wirkung des spezifischen Cat S-Inhibitors CSI-75 in zwei autoimmunen Mausmodellen, deren Pathomechanismus T-Helfer1- und T-Helfer17-Zell-vermittelte Immunreaktionen zugrunde liegen. Das eine Modell war die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, ein Mausmodell der Multiplen Sklerose. Bei dem zweiten Modell handelte es sich um ein Kollagen-induziertes Arthritis-Modell. In dem Modell der Multiplen Sklerose führte die Cat S-Inhibitor-Therapie zu einer Verzögerung des Krankheitsprogresses mit signifikant niedrigeren IgG2a-Antikörpertitern. Doch nach 3 Wochen Therapie war dieser Effekt nicht mehr messbar und es konnte kein signifikanter Unterschied mehr zwischen Tieren, die den Cat S-Inhibitor erhalten hatten, und unbehandelten Kontrolltieren festgestellt werden. Bei dem Kollagen-induzierten Arthritis-Modell wurde ein gutes Ansprechen auf die Cat S-Inhibitor-Therapie beobachtet mit einer 50%igen Reduktion des Krankheits-Scores<sup>178</sup>. Für die vorliegende Arbeit ist die Arbeit von Rupanagudi *et al.* aus unserem Labor besonders relevant. In MRL-(Fas)lpr-Mäusen zeigten Rupanagudi *et al.*, dass es durch die Inhibition von Cat S mit RO5461111 zu einer deutlichen Reduktion von Parametern der systemischen Autoimmunität und zu einem Aufhalten der Nierenschädigung kam. In einem weiteren Experiment fanden sie, dass Cat S-messenger RNA (mRNA)-Expression in der Milz und den Nieren von MRL-(Fas)lpr-Mäusen mit zunehmendem Alter, also mit dem Krankheitsprogress, anstieg. Als Lokalisation des Cat S wurden sowohl in der Milz als auch in der Niere myeloide Antigen-präsentierende Zellen und speziell in der Niere dendritische Zellen in tertiär lymphatischem Gewebe und Epithelzellen des proximalen Tubulus identifiziert<sup>179</sup>. In Keimzentren von lymphatischem Gewebe konnten sie unter Cat S-Inhibition eine Störung der speziellen Architektur feststellen, was mit den Ergebnissen anderer Studien vereinbar war<sup>174,177,179</sup>. Ihre Daten, sowie die Daten der anderen oben genannten Arbeiten wiesen darauf hin, dass der wahrscheinliche Grund für die verminderte Krankheitsaktivität in den getesteten Modellen eine gestörte MHC II-Antigenpräsentation war<sup>175-179</sup>. Dies spiegelte sich auch in einer verminderten Aktivierung CD4<sup>+</sup> T-Zellen wider. Auffallend war auch, dass die MHC I-vermittelte Aktivierung CD8<sup>+</sup> T-Zellen von der Cat S-Blockade unbeeinträchtigt blieb, was darauf hindeutet, dass Cat S bei der *Major Histocompatibility Complex I* (MHC I)-vermittelten

## Einleitung

Antigenpräsentation, die zum Beispiel bei der antiviralen Immunabwehr entscheidend ist, eine untergeordnete Rolle spielt<sup>179</sup>. Eine Beteiligung von Cat S an einer speziellen Form der MHC I-vermittelten Antigenpräsentation ist bekannt, nämlich bei der Antigenpeptid-Transporter-unabhängigen Form der Kreuzpräsentation<sup>180</sup>.

2017 wurden die ersten Studien zu Cat S-Inhibition beim Menschen veröffentlicht. In eine Studie wurde *in-vitro* gezeigt, dass Cat S-Inhibition mit dem spezifischen Cat S-Inhibitor RO5459072 in Makrophagen und mononukleären Zellen (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*; PBMCs), die aus dem Blut von SLE-Patienten isoliert wurden, zu einer unterdrückten Immunantwort mit einer reduzierten Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen führt<sup>181</sup>. In einer zweiten Studie wurde der gleiche Cat S-Inhibitor *in-vivo* bei gesunden Probanden getestet. Der Cat S-Inhibitor wurde von allen Testpersonen gut vertragen. Zudem kam es durch die Cat S-Inhibition zu einer verringerten Expression von MHC II auf der Zelloberfläche von B-Zellen<sup>182</sup>.

### ***Die Rolle von Cathepsin S bei der MHC II-Antigenpräsentation***

MHC II wird in der Regel von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert<sup>183</sup>. Antigenes Material, das von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen und in Endosomen/Lysosomen prozessiert wurde, wird von MHC II an der Zelloberfläche antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert. Die T-Zellen werden durch die Interaktion mit dem Peptid-MHC II-Komplex aktiviert und differenzieren zu T-Helferzellen, was eine humorale Immunantwort gegen das spezifische Antigen triggert<sup>184</sup>.

MHC II ist ein Heterodimer bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette. Im endoplasmatischen Retikulum bindet die *invariant chain* (Ii) an den neu-synthetisierten MHC II. Die Bindung mit der Ii erfüllt drei wichtige Funktionen. Zum einen unterstützt sie die richtige Proteinfaltung des MHC II. Zum anderen dirigiert sie den MHC II in die endosomalen/lysosomalen Kompartimente der Antigenprozessierung. Und schließlich verhindert sie, indem sie die Peptidbindungsgrube besetzt, eine frühzeitige Bindung des MHC II mit Peptiden<sup>184</sup>.

Die Ii-MHC II-Komplexe gelangen über den endosomalen Weg in die späten endosomalen/lysosomalen Kompartimente, die reich an antigenen Peptiden sind und einen stark sauren pH aufweisen. Dort führt das saure Milieu zu einer Aktivierung der Cathepsine, die die Ii schrittweise proteolytisch spalten. Am Ende dieses Prozesses bleibt nur noch das *class II-associated invariant chain peptide* (CLIP) in der

## Einleitung

Peptidbindungsgrube des MHC II zurück. Erst nach der Entfernung dieses letzten Fragmentes der Ii durch das dem MHC II ähnliche Molekül H2-M (entspricht dem humanen HLA-DM) kann ein antigenes Peptid an MHC II binden. Daraufhin wird der Peptid-MHC II-Komplex zu der Plasmamembran der Zelle transportiert, wo das Peptid den CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert wird (Abbildung 3)<sup>184,185</sup>.

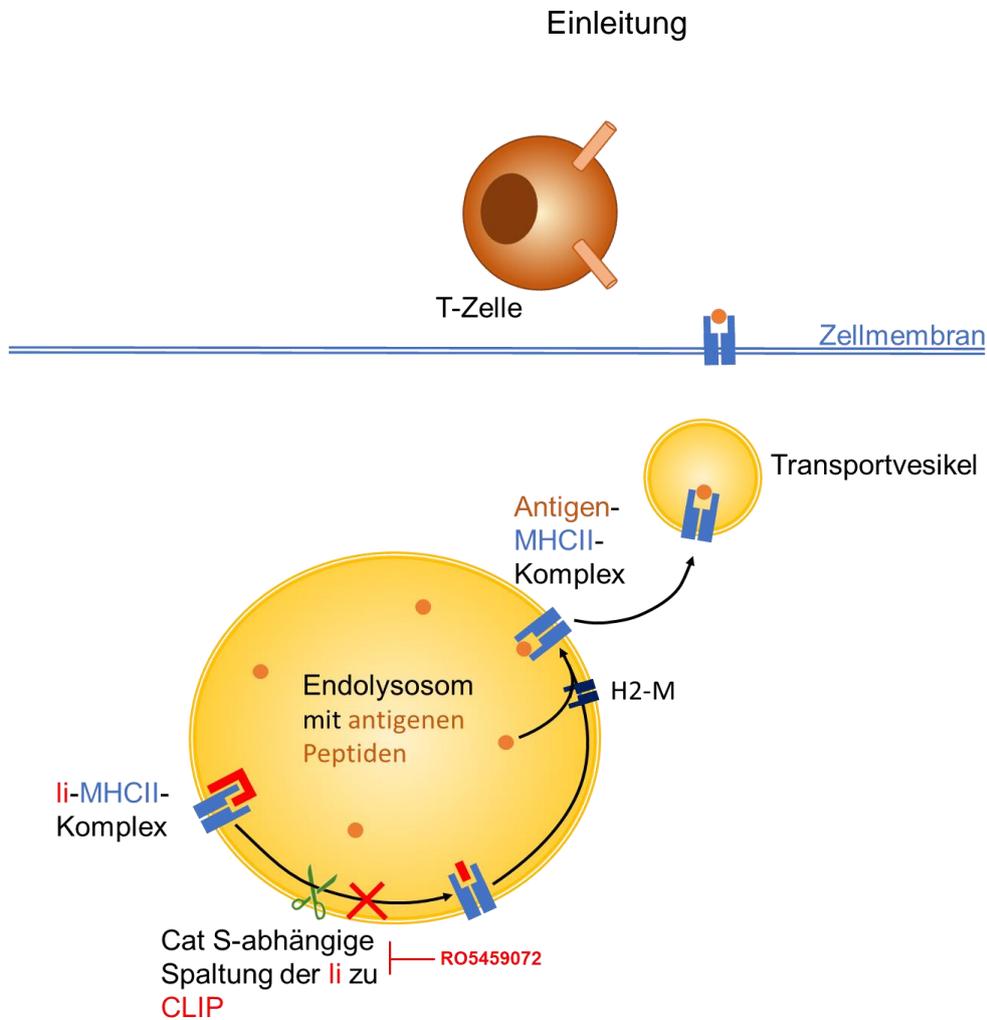
Der dafür essenzielle Schritt, in dem das Fragment Iip10 (*invariant chain p 10*; Iip10) der Ii zu CLIP gespalten wird, wird vornehmlich durch Cat S katalysiert (Abbildung 4)<sup>174,186,187</sup>. Vor allem B-Zellen und myeloide dendritische Zellen sind hierbei auf Cat S angewiesen<sup>182</sup>, während in Makrophagen die Funktion von Cat S bei der Spaltung von Iip10 zu CLIP auch von den Cathepsinen L und F übernommen werden kann<sup>188,189</sup>. Werden Makrophagen mit dem proinflammatorischen Zytokin IFN- $\gamma$  stimuliert, kommt es jedoch zu einer Hochregulation von Cat S, bei gleichzeitiger Runterregulation von Cathepsin L<sup>190</sup>. Die Induktion von Cat S durch IFN- $\gamma$  ist nicht auf Makrophagen beschränkt<sup>191</sup>.

Aufgrund der eingeschränkten Antigenpräsentation müsste man annehmen, dass Cat S<sup>-/-</sup>-Mäuse Defekte der CD4<sup>+</sup> T-Zellreifung, die im Thymus abläuft, aufweisen. Dies ist aber nicht der Fall. Shi *et al.* fanden, dass Cat S<sup>-/-</sup>-Mäuse eine normale Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz und in Lymphknoten haben und Lymphozyten sich normal entwickeln<sup>174</sup>. Es wird angenommen, dass dies daran liegt, dass es zell- und gewebsspezifische Unterschiede der Proteasen gibt, die an der Ii-Prozessierung beteiligt sind. So ist in humanen kortikalen Thymusepithelzellen Cathepsin V hauptverantwortlich für die Ii-Prozessierung<sup>192</sup>, während bei der Maus in diesen Zellen die Funktion überwiegend von Cathepsin L übernommen wird. Dies hat die Folge, dass Cathepsin L<sup>-/-</sup>-Mäuse eine stark verminderte Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Zellen aufweisen<sup>193</sup>.

Neben der Schlüsselfunktion, die Cat S bei der Spaltung der Ii einnimmt, ist Cat S auch an der Prozessierung von Antigenen beteiligt, wenn gleich in einer untergeordneten Rolle<sup>185</sup>. Wo dies jedoch relevant scheint, ist im Thymus. In humanen myeloiden dendritischen Zelle ist Cat S die Protease, die für die Prozessierung der Autoantigene im Zuge der negativen Selektion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen hauptverantwortlich ist. Die durch Cat S-Spaltung entstandenen Epitope werden den CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert und solche, welche das Epitop erkennen, also autoreaktiv sind, gehen unter. Es konnte gezeigt werden, dass Cat S einige klinisch sehr relevante Autoantigene wie Proinsulin (Diabetes mellitus) oder das basische Myelinprotein (Multiple Sklerose) so spaltet, dass das präsentierte Epitop das Autoantigen nicht richtig abbildet. Dadurch können

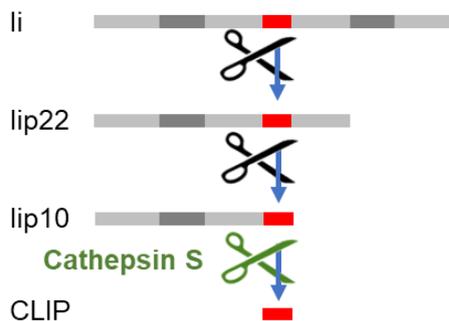
## Einleitung

autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegen diese Antigene der negativen Selektion entkommen. Auf diese Weise fördert Cat S die Entstehung von Autoimmunkrankheiten<sup>194</sup>.



**Abbildung 3: Entstehung eines Peptid-MH II-Komplexes [modifiziert nach Theron *et al.*<sup>182</sup> und Roche *et al.*<sup>184</sup>].**

Vereinfachte, schematische Darstellung des Mechanismus zur Beladung eines *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II)-Moleküls mit einem Peptid im Endolysosom. Die *invariant chain* (Ii) (rot) wird in mehreren Schritten durch Proteasen gespalten (grüne Schere), so dass nur noch das *class II-associated invariant chain peptide* (CLIP) in der Peptidbindungsgrube des MHC II (blau) verbleibt. H2-M (schwarz) entfernt CLIP, und gibt so die Peptidbindungsgrube des MHC II für die Bindung mit einem antigenen Peptid (braun) frei. Das mit einem Peptid beladene MHC II wird an die Zelloberfläche transportiert, wo das Peptid CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert wird.



**Abbildung 4: Spaltung der *invariant chain* [mod. nach Theron *et al.*<sup>182</sup>].**

Detaillierte, schematische Darstellung der Spaltung der *invariant chain* (Ii). Die Ii wird in mehreren Schritten durch verschiedene Proteasen gespalten. Für die Spaltung von *invariant chain p 10* (lip10) zum *class II-associated invariant chain peptide* (CLIP) ist vornehmlich Cathepsin S (Cat S) verantwortlich.

### ***Cathepsin S und der Protease-aktivierte Rezeptor-2***

Es sind insgesamt vier Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR1 – 4) bekannt. Bei den PARs handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die durch eine proteolytische Spaltung des N-Terminus aktiviert werden. Durch die proteolytische Spaltung wird ein an den Rezeptor gebundener Ligand frei, wodurch eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt wird<sup>195</sup>. Die Signalkaskade, die durch einen PAR ausgelöst wird, kann je nach Ligand und je nach Zelltyp, auf dem der Rezeptor exprimiert ist, variieren. Das führt dazu, dass die Aktivierung eines PARs unterschiedliche und sogar gegensätzliche Wirkungen haben kann<sup>196,197</sup>, was als „funktionelle Selektivität“ oder auch „*biased Agonism*“ bezeichnet wird<sup>198</sup>.

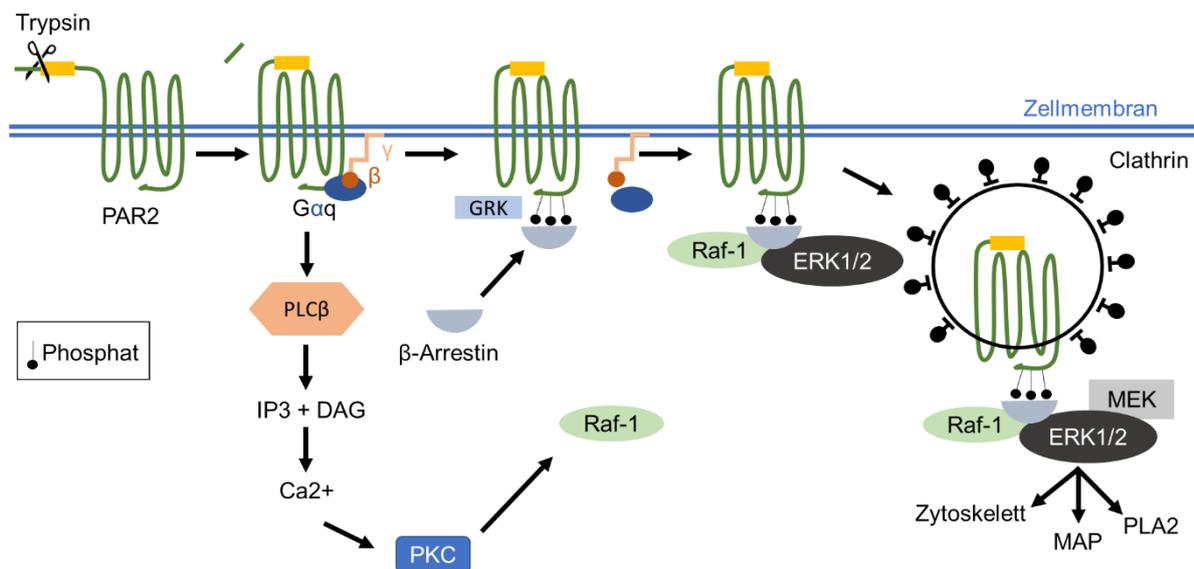
Der Rezeptor PAR2 wird auf Endothelzellen, Epithelzellen, glatten Muskelzellen, Immunzellen und sensorischen Neuronen exprimiert<sup>195,199</sup> und kommt vor allem in der Niere, der Leber, dem Pankreas und dem Darm vor<sup>200,201</sup>. Typischerweise wird dieser Rezeptor durch verschiedene Serinproteasen wie Trypsin<sup>202</sup>, Tryptase<sup>203</sup>, Koagulationsfaktoren (VIIa und Xa)<sup>204</sup> und Kallikrein<sup>205</sup> aktiviert.

Trypsin spaltet den N-Terminus von PAR2 an der Stelle R<sup>36</sup> ↓ S<sup>37</sup>, was den Liganden <sup>37</sup>SLIGKV (beim Menschen; bei der Maus SLIGRL) freigibt<sup>200,202</sup>. Der Ligand kann als freies Peptid auch ohne Beisein einer Protease den Rezeptor aktivieren. Bindet <sup>37</sup>SLIGKV an den Rezeptor, ändert dieser seine Konformation und es kommt zu einer Kopplung mit der Gαq-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins. Dies führt zu einer Aktivierung der Phospholipase Cβ und der Bildung von Inositoltriphosphat und Diacylglycerin, mit anschließender Freisetzung von intrazellulärem Kalzium und einer Aktivierung der Proteinkinase C. Diese wiederum aktiviert Raf 1. Um die Kopplung mit dem G-Protein aufzuheben, wird der Rezeptor durch G-Protein-Rezeptor-Kinasen phosphoryliert und es kommt zu einer Assoziation des Rezeptors mit β-Arrestin. β-Arrestin ist ein wichtiger Mediator der Clathrin-vermittelten Endozytose von PAR2, was zu einer Desensibilisierung und schließlich zu einem Abbau des Rezeptors in Lysosomen führt. Zusätzlich ist β-Arrestin an der Aktivierung der *extracellular signal-regulated* Kinasen 1/2 beteiligt. Die *extracellular signal-regulated* Kinasen 1/2 bilden mit Raf 1, dem an β-Arrestin gebundenen Rezeptor und weiteren Bestandteilen des *mitogen-activated* Protein-Kinase-Signalweges einen Komplex. Der Komplex bewirkt, dass die *extracellular signal-regulated* Kinasen 1/2 im Zytosol verbleiben und nicht in den Zellkern verlagert werden. Für die Bildung des Komplexes ist β-Arrestin essentiell. Im Zytosol phosphorylieren die aktivierten *extracellular signal-regulated* Kinasen 1/2

## Einleitung

unter anderem Proteine des Zytoskelettes, Mikrotubuli-assoziierte Proteine oder die Phospholipase A<sub>2</sub> (Abbildung 5)<sup>173,200,206-211</sup>.

Alternativ kann die Spaltung von PAR2 durch Trypsin zum Beispiel in Keratinozyten auch zu einer Kopplung des Rezeptors mit Gas und der Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat, sowie zu einer Kopplung mit Ga12/13 und einer Aktivierung der Rho-Kinase führen<sup>209,212</sup>. Auch eine Wirkung von Trypsin-vermittelter-PAR2-Aktivierung über Gai/Gao ist beschrieben<sup>213</sup>.



**Abbildung 5: PAR2-Aktivierung durch Trypsin [mod. nach DeFea *et al.*<sup>206</sup>].**

Schematische Darstellung des Signalweges, der durch eine Aktivierung des Protease-aktivierte Rezeptors-2 (PAR2) durch die Serinprotease Trypsin typischerweise in Gang gesetzt wird. Nach der Spaltung des Rezeptors durch Trypsin, kommt es zu einer Kopplung des Rezeptors mit einem heterotrimeren G-Protein bestehend aus einer Gαq-Untereinheit und den β- und γ-Untereinheiten. Dadurch wird eine Signalkaskade getriggert: Es kommt zur Aktivierung der Phospholipase Cβ (PLCβ), der Bildung von Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG), der Freisetzung von intrazellulärem Kalzium, der Aktivierung der Proteinkinase C und der Aktivierung von Raf 1. Außerdem phosphorylieren G-Protein-Rezeptor-Kinasen (GRK) PAR2 und es kommt zu einer Assoziation des Rezeptors mit β-Arrestin. Durch die Phosphorylierung des Rezeptors wird die Kopplung mit dem G-Protein aufgehoben. Raf 1 und β-Arrestin bilden anschließend einen Komplex mit *extracellular signal-regulated* Kinasen 1/2 (ERK1/2). Die Assoziation des Rezeptors mit β-Arrestin führt auch dazu, dass eine Clathrin-vermittelte Endozytose des Rezeptors erfolgt. Die aktivierten ERK1/2 im Komplex mit dem an β-Arrestin gebundenen Rezeptor, Raf 1 und Bestandteilen des *mitogen-activated* Protein-Kinase-Weges wie die *mitogen-activated* Protein-Kinase-Kinase 1 (MEK) wiederum phosphorylieren Proteine des Zytoskelettes, Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP) oder die Phospholipase A<sub>2</sub>.

## Einleitung

Cat S zählt zu den sogenannten *biased* Agonisten von PAR2<sup>173,214,215</sup>. *Biased* Agonisten spalten den Rezeptor nicht an der für Serinproteasen wie Trypsin typischen Stelle R<sup>36</sup> ↓ S<sup>37</sup>, was dazu führt, dass eine Aktivierung durch eine solche Protease eine andere Reaktion hervorruft, als die Aktivierung durch Trypsin<sup>209</sup>.

Auf PAR2-transfektierten-HeLa-Zellen (menschliche Zellen eines Zervixkarzinoms) und normalen humanen epidermalen Keratinozyten wurde die Stelle G<sup>41</sup> ↓ K<sup>42</sup> als Spaltstelle identifiziert, über die Cat S PAR2 aktiviert. Die Spaltung an dieser Stelle gibt den Ligand <sup>42</sup>KVDGTS frei. Die Aktivierung von PAR2 sowohl durch Cat S als auch durch das Hexapeptid KVDGTS bewirkte eine intrazelluläre Kalzium-Erhöhung. Außerdem wurde eine Akkumulation von Inositolphosphat, einem Metaboliten von Inositoltriphosphat, und eine Induktion der phosphorylierten Proteinkinase C in PAR2-transfektierten HeLa-Zellen sowohl durch Cat S als auch durch KVDGTS festgestellt. Da der gemessene Effekt auf die Phosphorylierung der Proteinkinase C nach Rezeptoraktivierung durch Cat S oder KVDGTS deutlich ausgeprägter war, als durch den Trypsin-Liganden SLIGRL, vermuteten die Autoren, dass hier verschiedene Signalwege ablaufen<sup>173</sup>.

Zhao *et al.* entdeckten noch eine weitere Spaltstelle. In humanen embryonalen Nierenzellen und in mit einem Ratten-Sarkom-Virus transformierten Nieren-Epithelzellen zeigten sie, dass Cat S PAR2 aktiviert, indem es den Rezeptor bei E<sup>56</sup> ↓ T<sup>57</sup> spaltet. Daraufhin wurde eine Kopplung des Rezeptors mit Gas und nicht, wie bei der Trypsin-vermittelten Aktivierung mit Gαq beobachtet, mit der Folge, dass die Wirkung nicht über die *extracellular signal-regulated* Kinasen 1/2 erfolgte, sondern über cyclisches Adenosinmonophosphat und die Phosphokinase A. Zudem kam es weder zu einer Assoziation mit β-Arrestin, noch zu einer Endozytose des Rezeptors. Ein Kalzium-Anstieg konnte zwar sowohl nach einer Trypsin-vermittelten Aktivierung von PAR2, als auch nach einer Cat S-vermittelten Aktivierung in den Zellen gemessen werden, doch war der Anstieg beim Ersteren deutlich ausgeprägter. Weitere Versuche legten nahe, dass der Kalzium-Anstieg im Falle der Cat S-vermittelten Aktivierung nicht auf einer Freisetzung von intrazellulärem Kalzium basierte, wie bei Trypsin, sondern auf einem Einstrom von extrazellulärem Kalzium über Transiente-Rezeptor-Potential-Vanilloid-4-Kanäle<sup>214</sup>.

E<sup>56</sup> ↓ T<sup>57</sup> liegt proximal der Spaltstelle von Trypsin, mit der Konsequenz, dass eine vorangegangene Aktivierung von PAR2 durch Cat S eine nachfolgende Aktivierung durch Trypsin verhindert<sup>214</sup>. Die gleiche Beobachtung wurde bei der Aktivierung des

## Einleitung

Rezeptors durch die Granulozyten-Elastase, einem weiteren sogenannten *biased* Agonisten von PAR2, gemacht. Auch Cathepsin G spaltet PAR2 proximal von R<sup>36</sup> ↓ S<sup>37</sup> und verhindert so ebenfalls eine nachfolgende Aktivierung des Rezeptors durch Trypsin. Anders als bei den oben genannten Proteasen, führt die Spaltung durch Cathepsin G jedoch nicht zu einer Rezeptoraktivierung<sup>216</sup>.

Bei Mäusen verursacht eine intraplantare Injektion von Cat S eine Entzündungsreaktion mit lokaler Schwellung und Schmerz, sowie eine Hyperalgesie. Diese Reaktion kann sowohl durch eine Deletion oder pharmakologischen Inhibition von PAR2 als auch durch die Blockade von Bestandteilen des Signalweges, wie eine Inhibition von cyclischem Adenosinmonophosphat oder eine Deletion von Transiente-Rezeptor-Potential-Vanilloid-4-Kanälen, abgeschwächt werden<sup>199,214</sup>. Unsere Arbeitsgruppe wies noch eine weitere Wirkung der Cat S-vermittelten PAR2-Aktivierung nach. Wir konnten zeigen, dass diese direkt zu Endothelzellschäden und zu einer endothelialen Permeabilitätserhöhung führt und so zu der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion beiträgt. Die Blockade von Cat S mit dem spezifischen Cat S-Inhibitor RO5461111 in einem diabetischen Mausmodell hatte zudem einen protektiven Effekt im Hinblick auf die Ausbildung einer diabetischen Nephro- und Retinopathie, zwei wichtige Manifestationen der diabetischen Mikroangiopathie<sup>215</sup>. Endothelzellen exprimieren sowohl PAR1 als auch PAR2. Die Aktivierung der PARs auf diesen Zellen kann eine proinflammatorische Zellantwort mit Induktion von proinflammatorischen Zytokinen bewirken<sup>217-219</sup>. Außerdem führen Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$ , Interleukin 1 $\alpha$  und Lipopolysacharid (LPS) zu einer Hochregulation von PAR2 auf Endothelzellen<sup>220</sup>. Ein protektiver Effekt auf Endothelzellen durch PAR-Aktivierung ist jedoch ebenfalls beschrieben. Dieser kann durch Ko-Aktivierungen anderer Oberflächenrezeptoren wie dem endothelialen Protein C-Rezeptor oder einem noch unbekanntem FaktorX/Xa-Rezeptor und durch eine Transaktivierung von PAR2 über PAR1 zustande kommen<sup>197,221-223</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass die Endothel-protective Wirkung der PAR-Aktivierung über eine Kopplung mit Gai und einer Aktivierung von Rac1 zustande kommt, während der Endothel-schädigende Signalweg über G $\alpha$ 12/13 und einer Aktivierung von RhoA und NF- $\kappa$ B abläuft<sup>221,223</sup>.

### 1.6 Forschungshypothese

Die Protease Cat S stellt aus mehreren Gründen eine sehr interessante Zielstruktur für die Therapie des SLEs dar. Einer dieser Gründe ist, dass die Inhibition von Cat S wahrscheinlich nur wenige Nebenwirkungen verursacht. Dies liegt zum einen daran, dass die Expression dieser Protease überwiegend auf Antigen-präsentierende Zellen beschränkt ist, weshalb breite, unspezifische und deshalb unerwünschte Reaktionen anderer Zellen nicht zu erwarten sind<sup>164</sup>. Zum anderen scheint eine Cat S-Blockade spezifisch die Achse der humoralen Immunabwehr zu supprimieren, die über MHC II und die darüber aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wirkt, während die Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die überwiegend über MHC I abläuft, vermutlich nur zu einem geringen Teil beeinträchtigt wird<sup>179,180</sup>.

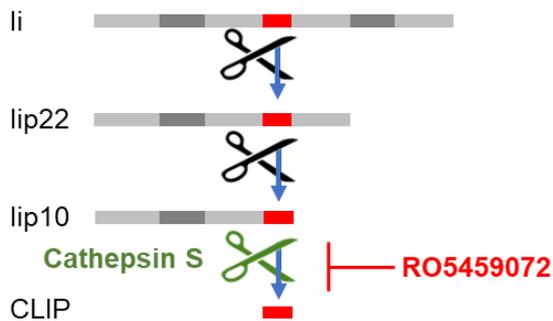
Ein weiterer Grund, warum Cat S als Zielstruktur so interessant ist, ist, dass die Blockade von Cat S, wahrscheinlich aufgrund der gestörten Antigenpräsentation durch MHC II, zu einer Reduktion der systemischen Autoimmunität in MRL-(Fas)lpr-Mäusen führt (Abbildung 6)<sup>179</sup>.

Und der dritte Grund ist, dass, wie wir in einer früheren Arbeit in einem Tiermodell des Diabetes mellitus festgestellt haben, dass Cat S über PAR2 direkt an der Entstehung endothelialer Dysfunktionen beteiligt ist, und dass durch eine pharmakologische Cat S-Inhibition Endothelschäden verhindert werden können (Abbildung 7)<sup>215</sup>. Wir nahmen an, dass sich dieser Mechanismus auch auf den SLE übertragen lassen würde.

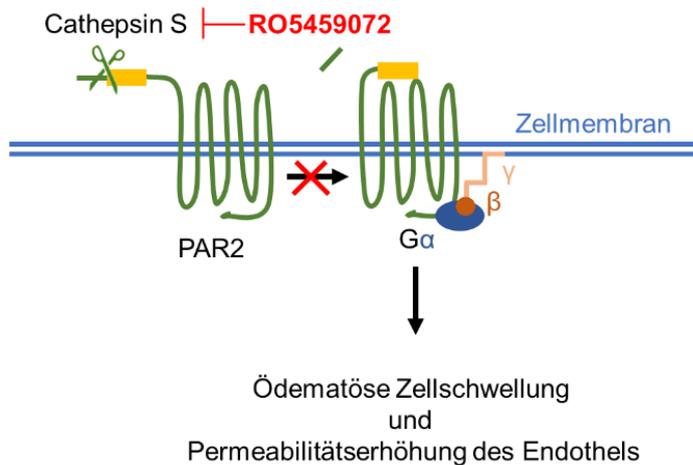
Daraus ergab sich als unsere Hypothese, dass die pharmakologische Inhibition von Cat S einen dualen therapeutischen Effekt beim SLE hat, nämlich zum einen die Suppression der MHC II-abhängigen systemischen Autoimmunität und zum anderen einen Schutz des peripheren Gewebes vor vaskulären Schäden.

Deshalb vermuteten wir, dass eine Cat S-Blockade mit dem spezifischen Cat S-Inhibitor RO5459072 eine zur Standardtherapie mit MMF zumindest gleichwertige, wenn nicht sogar überlegene Therapieoption für den SLE darstellt.

## Einleitung



**Abbildung 6: Inhibition der Spaltung der *invariant chain* [mod. nach Theron *et al.*<sup>182</sup>].**  
Der Inhibitor RO5459072 blockiert Cathepsin S mit einer hohen Spezifität, was die Spaltung von lip10 zu CLIP blockiert.



**Abbildung 7: Inhibition des extrazellulären Cathepsin S.**

Extrazelluläres Cathepsin S aktiviert den Protease-aktivierter Rezeptor-2 (PAR2) auf Endothelzellen und führt so zu einer Permeabilitätserhöhung des Endothels. Auf diese Weise fördert Cathepsin S die Entstehung der endothelialen Dysfunktion. PAR2 ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der, nachdem sein Ligand durch proteolytische Spaltung frei gelegt wurde, mit der  $\alpha$ -Untereinheit eines G-Proteins koppelt, woraufhin eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird. Welche Signalkaskade Cathepsin S in Endothelzellen über PAR2 triggert, ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht bekannt. RO5459072 ist ein spezifischer Cathepsin S-Inhibitor.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### Tierversuche

##### *Versuchstiere*

50 ♀ MRL-(Fas)lpr-Mäuse (4 Wochen) Harlan Winkelmann,  
Borchen, Deutschland

12 ♀ MRL-(Fas)lpr-Mäuse (7 Wochen) Harlan Winkelmann,  
Borchen, Deutschland

##### *Medikamente und Tierfutter*

PAR2-Inhibitor GB83 Axon Medchem, Groningen, Niederlande

Rekombinantes Cathepsin S Hoffmann La Roche, Basel, Schweiz

Tierfutter (Vehikel) Ssniff, Soest, Deutschland

Tierfutter (Interventionsgruppen): Hoffmann La Roche, Basel, Schweiz

- 100 mg/kg Mycophenolat-Mofetil
- 30 mg/kg RO5459072
- 10 mg/kg RO5459072
- 3 mg/kg RO5459072

#### Geräte

##### *Durchflusszytometer*

FacsCalibur™ Durchflusszytometer BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

##### *ELISA*

ELISA-Lesegerät Tecan, GENios Plus Tecan, Crailsheim, Deutschland

ELISA-Platten-Spüler ELx50 BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland

##### *Histologie*

Leica DC 300F Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Leica DMRBE Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Mikrotom HM 340E Microm, Walldorf, Deutschland

Olympus BX50 Olympus, Hamburg, Deutschland

### ***Pipetten und Pipettierhilfen***

Easypet <sup>®</sup>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipette <sup>®</sup> Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetman <sup>®</sup> P	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipetus <sup>®</sup>	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Research Pro	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Research <sup>®</sup> Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

### ***Real-Time PCR***

LightCycler 480 PCR-Gerät	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
---------------------------	--

### ***Waagen***

Waage BP 110S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Waage Mettler PJ 3000	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland

### ***Zellkultur***

AMAXA Nukleofektor <sup>™</sup> IIb	Lonza, Basel, Schweiz
Scepter <sup>™</sup> -Zellzähler	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Sterilwerkbank Class II, Typ A/B3	Baker Company, Sanford, ME, USA
Zellinkubator Type B5060 EC-CO <sub>2</sub>	Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland

### ***Zentrifugen***

Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### ***Sonstige Geräte***

Homogenisator Ultra Turrax T25	IKA GmbH, Staufen, Deutschland
NanoDrop <sup>™</sup> Spectrophotometer	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
pH-Meter WTW	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

## Material und Methoden

Vortex Genie 2™	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasserbad HI1210	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

### **Chemikalien und Tests**

#### ***Basischemikalien***

Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serum-Albumin	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Calbiochem, San Diego, USA
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Diethylpyrocarbonat	Fluka, Buchs, Schweiz
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

#### ***Durchflusszytometrie***

DNAse-I	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Kollagenase	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

#### ***Histologie***

ABC Substrat-Puffer	Vector, Burlingame, CA, USA
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München, Deutschland
Antigen-Demaskierungslösung	Vector, Burlingame, CA, USA
Avidin	Vector, Burlingame, CA, USA
Biotin	Vector, Burlingame, CA, USA
Diaminobenzidin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

## Material und Methoden

Dinatriumtetraborat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eindeckmedium mit DAPI	Vector, Burlingame, CA, USA
Eineckmedium	Vector, Burlingame, CA, USA
Eosin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fixierlösung	Acquascience, Uckfield, UK
Formaldehyd	Shandon, Cambridge, UK
Formalin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Gold-Chlorid-Lösung	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methylgrün	Fluka, Buchs, Schweiz
Paraffin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Periodsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salpetersäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schiff-Reagenz	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Thiosemicarbazid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

### ***ANA-indirekte-Immunfluoreszenz-Färbung***

Kallestad™ Hep-2 Cell Line Slide	Bio-Rad Laboratories, Radmond, WA, USA
Ziege anti-Maus IgG-FITC	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

### ***Antikörper-ELISA***

Murine Doppelstrang-DNA	Metabion, Martinsried, Deutschland
Poly-L-Lysin	Trevigen, Gaithersburg, MD, USA
Schwefelsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SSC-Puffer	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
TMB-Substrat Reagenzset	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

### ***Antikörper-ELISA-Sets***

Maus IgG	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA
Maus IgG1	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA

## Material und Methoden

Maus IgG2a	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA
Maus IgG2b	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA
Maus IgM	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA

### ***Nierenfunktionsanalyse***

Albustix	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Creatinine FS Kit	DiaSys Diagnostic Systems, Hozheim Deutschland
Maus Albumin ELISA-Set	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA
Urea FS Kit	DiaSys Diagnostic Systems, Hozheim Deutschland

### ***Zellkultur***

Cathepsin S-ELISA	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
CpG-DNA	Invivogen, San Diego, CA, USA
Dextran	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dulbecco's PBS (1x)	PAN Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Fetales Kälberserum	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
FITC-anti-Cathepsin S	Abcam, Cambridge, UK
FSLLRY-Amide	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA
Humanes IFN- $\gamma$	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
humanes TNF- $\alpha$	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Imiquimod	Invivogen, San Diego, CA, USA
Lipopolysaccharid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Lymphoprep™-Trennlösung	Stemcell Technologies, Köln, Deutschland
Murines IFN- $\gamma$	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAN Laboratories, GmbH, Cölbe, Deutschland
Phorbol-12-myristat-13-acetat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
RPMI-1640 Medium	GIBCO/Invitrogen, Paisley, Scotland, UK
scrambled siRNA (Cat. 4390843)	Ambion, Darmstadt, Deutschland
siRNA für PAR2 (Cat. AM16708)	Ambion, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA (1x)	PAN Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland

## Material und Methoden

### ***RNA-Isolation***

PureLink® RNA Mini Kit	Ambion, Darmstadt, Deutschland
RNAlater®	Ambion, Darmstadt, Deutschland
RNAse-freies DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

### ***cDNA-Synthese***

5x First Strand-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid	Ambion, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTPs)	GE Healthcare, München, Deutschland
Hexanucleotid-Mix	Roche, Mannheim, Deutschland
RNAasin	Promega, Mannheim, Deutschland
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### ***Real-Time PCR***

10x-Taq-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PCR-Optimierungsreagenz	Bitop AG, Witten, Deutschland
PCR-Primer	Metabion, Martinsried, Deutschland
SYBRgreen I	Fluka/Sigma, München, Deutschland
Taq-Polymerase	New England BioLabs, Ipswich, USA

### **Antikörper**

#### ***FACS-Antikörper (alle Antikörper sind gegen Maus-Antigen gerichtet)***

anti-CD103-APC	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-CD11b-APC	BD Bioscience, San Diego, CA, USA
anti-CD11b-PE	BD Bioscience, San Diego, CA, USA
anti-CD11c-PE	BD Bioscience, San Diego, CA, USA
anti-CD138-APC	BD Bioscience, San Diego, CA, USA
anti-CD3e-FITC	BD Bioscience, San Diego, CA, USA
anti-CD45-PE	BD Bioscience, San Diego, CA, USA
anti-CD4-APC	BD Bioscience, San Diego, CA, USA
anti-CD86-FITC	BD Bioscience, San Diego, CA, USA
anti-CD8a-PerCP	BD Bioscience, San Diego, CA, USA

## Material und Methoden

anti-F480-APC	Bio-Rad, Raleigh, NC, USA
anti-k Light Chain-PE	BD Bioscience, San Diego, CA, USA
anti-Ly6c-FITC	BD Bioscience, San Diego, CA, USA
anti-MHC-II-FITC	eBioscience, San Diego, CA, USA
FITC-Annexin V/Propidiumiodid	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

### ***Antikörper für Immunhistologie (alle Antikörper sind gegen Maus-Antigen gerichtet)***

anti-CD3	Abcam, Cambridge, UK
anti-CD31	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
anti-Komplement C3c	Biotyl Ltd, Cambridge, UK
anti-nephrin	Acris Antibodies, San Diego, CA, USA
anti-WT1	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA

### **Sonstiges**

12-Kammer-Platte	Ibidi, Martinsried, Deutschland
8-Kammer- $\mu$ -Objektträger	Ibidi, Martinsried, Deutschland
96-Kammer-Nunc-Maxisorp <sup>®</sup> -Platte	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Blaubrand <sup>®</sup> Mikropipetten 20 $\mu$ l	Brand Wertheim, Deutschland
Einbettkassetten	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Eppendorf-Röhrchen (1,5 und 2 ml)	TPP, Trasadingen, Schweiz
FACS-Röhrchen	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Falcon-Röhrchen (15 und 50 ml)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Filter	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Kanülen	BD, Drogheda, Irland
LightCycler 480 Multivellplatte 96	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland/ Greiner Bio-One, Frickenhausen
S-Monovette <sup>®</sup> 9ml Lithium-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen	BD GmbH, Heidelberg, Deutschland
Super Frost <sup>®</sup> Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Zellkulturtestplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz

## Material und Methoden

### **Computersoftware**

Acrobat Writer	Adobe Systems, Dublin, Ireland
CellQuest	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Endnote x8	Thomson-Reuters, New York, NY, USA
ImageJ	Rasband, W.S., U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
Office 2016	Microsoft, Rodmond, WA, USA
QWin	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Windows 10	Microsoft, Rodmond, WA, USA
GraphPad Prism (Version 5)	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tierversuche

#### *Tierstudie I*

Ziel der Tierstudie I war die Testung der therapeutischen Wirkung des hochspezifischen Cat S-Inhibitors RO5459072 gegen das bekannt wirkungsvolle Medikament MMF<sup>62,224,225</sup> und gegen eine unbehandelte Kontrollgruppe (Vehikel) bei weiblichen MRL-(Fas)lpr-Mäusen über einen Zeitraum von 8 Wochen.

4-Wochen-alte, weibliche MRL-(Fas)lpr-Mäuse wurden von Harlan Winkelmann bezogen. Ab einem Alter von 8 Wochen wurde wöchentlich der Urin der Mäuse stichprobenartig auf Albumin mittels Albustix getestet. Eine signifikante Proteinurie zeigte sich mit 11 Wochen. Daraufhin wurden die Mäuse in fünf verschiedene Interventionsgruppen eingeteilt (n = 10 pro Gruppe), die ab diesem Zeitpunkt spezielles Tierfutter erhielten. Drei Gruppen bekamen Futter, das mit unterschiedlichen Dosierungen (3 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg) des Cat S-Inhibitors RO5459072 versetzt war, eine Gruppe erhielt Futter mit MMF (100 mg/kg)<sup>225,226</sup> und eine weitere Gruppe, Vehikel, wurde als Kontrollgruppe mit normalem Tierfutter gefüttert (Abbildung 8). Verzehr und Körpergewicht wurden wöchentlich gemessen ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen aufzuweisen. Der durchschnittliche Futterverbrauch betrug 0,12 g/gKG. Nach 8 Wochen Therapie wurde der Versuch terminiert, und Nieren und Milz aller Tiere wurden zu weiteren Analysen konserviert. Während der Versuchszeit wurde regelmäßig nach einem festen Protokoll Blut und Urin abgenommen (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 8: Tierfutter.**

Von links nach rechts: 100 mg/kg MMF, 30 mg/kg RO5459072, 10 mg/kg RO5459072, 3 mg/kg RO5459072, normales Tierfutter.

### **Tierstudie II**

Ziel der Tierstudie II war die Untersuchung der schädigenden Wirkung von Cat S auf glomeruläre Endothelzellen in einem *in-vivo*-SLE-Modell. Hierfür wurden 7-Wochen-alte, weibliche MRL-(Fas)lpr-Mäuse in vier verschiedene Gruppen (n = 3 pro Gruppe) randomisiert. Ab einem Alter von 8 Wochen bekamen drei der vier Gruppen 10 µg rekombinantes, steriles Cat S (in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (*phosphate-buffered saline*; PBS)) intravenös injiziert. Eine dieser Gruppen war zuvor eine Woche lang mit 30 mg/kg RO5459072 behandelt worden, während eine andere Gruppe vorab insgesamt vier intraperitoneale Injektionen des PAR2-Inhibitors GB83 (10 mg/kg) erhalten hatte. Der Bestand von GB83 wurde in Dimethylsulfoxid gelöst und anschließend mit PBS verdünnt. Die dritte Gruppe erhielt neben den Cat S-Injektionen keine Behandlung. Eine vierte Gruppe bekam mit 8 Wochen einzig eine Injektion mit 100 µg sterilem PBS. Daraus ergaben sich die folgenden Versuchsgruppen: die Negativkontrollgruppe PBS, die Positivkontrollgruppe Cat S und die beiden Interventionsgruppen Cat S + RO5459072 und Cat S + GB83. Urinproben wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden gesammelt und auf das Auftreten einer Albuminurie untersucht. Nach Versuchsende wurden die Nieren der Mäuse entnommen und zur elektronenmikroskopischen Analyse an Bastian Popper von der Abteilung für Anatomie und Zellbiologie, Biomedizinisches Zentrum, Ludwig-Maximilians-Universität, Planegg-Martinsried, Deutschland, gesendet.

### **2.2.2 Tierhaltung**

Die Mäuse wurden unter spezifisch Pathogen-freien Bedingungen mit maximal fünf Mäusen pro Käfig in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Käfige waren mit Einstreu, Nestwatte, einem Haus aus rotem Plexiglas, einem Sterilfilterdeckel und jederzeit frei zugänglichem Trinkwasser und Futter ausgestattet. Alle aufgelisteten Bestandteile wurden zuvor autoklaviert und mindestens einmal die Woche gewechselt. Bei der Durchführung der Versuche wurde das deutsche Tierschutzgesetz befolgt und alle experimentellen Interventionen waren durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

### **2.2.3 Urin- und Blutabnahme**

In Tierstudie I wurden Blut und Urin jeweils in einem Alter von 11, 13, 15, 17 und 19 Wochen abgenommen. Blutentnahmen sind mit einem Abfall der

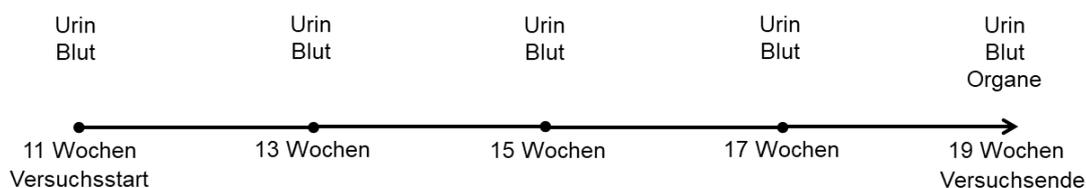
## Material und Methoden

Hämoglobinkonzentration, erhöhten Stresshormon-Werten, sowie einer Abnahme des Körpergewichtes, Reduktion der Futteraufnahme und Verhaltensänderungen verbunden<sup>227,228</sup>. Um diesen Effekt auf die Versuchstiere so gering wie möglich zu halten, wurde zu den Abnahmezeitpunkten 13 und 17 Wochen Blut und Urin nur von jeweils der Hälfte einer Gruppe (n = 5 pro Gruppe) abgenommen, während an den anderen Zeitpunkten die Abnahmen an allen Tieren erfolgte (n = 8 – 10 pro Gruppe) (Abbildung 9).

In Tierstudie II wurde Urin kurz vor der Injektion, zum Zeitpunkt 0, und nach 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h und 24 h von allen Versuchstieren (n = 3 pro Gruppe) gesammelt.

Unter leichtem Massieren der Blase wurde der Urin, der im Nackengriff befindlichen Maus, mit einem Eppendorf-Röhrchen aufgefangen und bei – 20°C bis zum Zeitpunkt der Analyse gelagert.

Die Blutentnahme erfolgte über die *Vena facialis*. Während sich die Mäuse in einer Isofluran-Narkose befanden, wurde die Vene mit einer feinen Lanzette punktiert und es wurden ca. 150 – 200 µl Blut abgenommen. Das Blut wurde in ein Eppendorf-Röhrchen, in dem sich 10 µl Ethylendiamintetraacetat (EDTA) befanden, gefüllt. Zur Gewinnung des Blutplasmas wurde anschließend das EDTA-Vollblut mit 8.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, das Blutplasma, wurde abpipettiert und bei – 20°C bis zum Zeitpunkt der Analyse gelagert.



### Abbildung 9: Tierstudie I, zeitlicher Ablauf.

Ab einem Alter von 11 Wochen wurde mit der Therapie der MRL-(Fas)lpr Mäuse begonnen. Alle 2 Wochen erfolgte eine Blut- und eine Urinentnahme. Nach 8 Wochen wurde der Versuch terminiert und Blut, Urin und Organe wurden für weitere Analysen konserviert.

### 2.2.4 Organentnahme

Organe wurden von allen Versuchstieren entnommen. Für die Organentnahme wurden die 19 Wochen alten MRL-(Fas)lpr-Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurde die Maus auf einer desinfizierten Unterlage befestigt und mit Alkohol (70%) besprüht. Beide Nieren und die Milz wurden mit sterilem OP-Besteck entnommen und anschließend gewogen. Danach wurde jeweils die Organkapsel der Niere entfernt und eine Niere eines jeden Tieres wurde gedrittelt. Die andere Niere wurde im Ganzen belassen. Die Milz wurde erst halbiert und anschließend wurde eine der beiden Hälften in drei gleich große Teile geteilt. Die Konservierung der Organteile erfolgte je nach geplanter Analyse unterschiedlich und wird in den einzelnen Abschnitten näher behandelt.

### 2.2.5 Durchflusszytometrie

Einzelne Zellpopulationen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Direkt nach der Organentnahme wurde von jedem Tier eine ganze Niere in 2 ml eines Kollagenase-Puffers (100 mg Kollagenase in 50 ml PBS und 20 µl/ml Desoxyribonuklease (DNase)-I) auf eine 12-Kammer-Platte platziert. Anschließend wurden die Nieren mit dem Stempel einer 1 ml Spritze zerstoßen und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Eine Einzelzellsuspension wurde erreicht, indem das Nierengewebe je fünf Mal durch eine 22 G und eine 27 G Kanülen gespült wurde. Anschließend wurde die Suspension durch einen 30 µm Filter in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen gefüllt. Zum Waschen der Zellen wurde 10 ml PBS hinzugegeben, anschließend gevortext und mit 1.500 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zum Sediment wurden 2 ml *fluorescence-activated cell sorting* (FACS)-Puffer (PBS, 0.2% Bovines Serum-Albumin (BSA), 0.1% Natriumazid) hinzugefügt und gevortext.

Auch die Isolation der Einzelzellen der Milz erfolgte direkt nach Organentnahme. Eine halbe Milz wurde in 2 ml PBS auf eine 12-Kammer-Platte gegeben. Danach wurde die Milz zerstoßen und durch einen 30 µm Filter in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen übertragen um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Nachdem gevortext wurde, erfolgte eine Zentrifugation mit 1.500 rpm bei 4°C für 5 Minuten und der Überstand wurde verworfen. Um die roten Blutzellen zu lysieren wurden für 10 Minuten 2 ml eines Lysepuffer (8,4 g NH<sub>4</sub>Cl in 1.000 ml H<sub>2</sub>O) zu den Zellen hinzugegeben. Die Reaktion wurde durch das Hinzufügen von 8 ml eiskaltem PBS beendet. Anschließend wurde

## Material und Methoden

gevoertext und mit 1.500 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zum Sediment wurden 2 ml FACS-Puffer gegeben und anschließend gevortext.

Sowohl die Zellen der Niere, als auch die Zellen der Milz wurden mit den unter Abschnitt 2.1 aufgelisteten FACS-Antikörpern nach Herstellerangaben gefärbt. Nach einer Inkubationszeit in Dunkelheit von 45 Minuten bei 4°C, wurde mit 2 ml PBS gewaschen, gevortext und mit 1.500 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 300 ml FACS-Puffer suspendiert. Folgende Antikörperkombinationen wurden zur Charakterisierung der Milzzellen herangezogen: CD11c<sup>+</sup>/F480<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> (Antigen-präsentierende Zellen), CD138<sup>+</sup>/κ-Light chain (Plasmazellen). In der Niere waren es: CD11c<sup>+</sup>/F480<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup>/F480<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> (Makrophagen), CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly6c<sup>+</sup> (dendritische Zellen), CD11b<sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> (Phagozyten), CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> und CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> (T-Zellen).

In einem weiteren Experiment wurden abgelöste glomeruläre Endothelzellen mit Annexin V/Propidiumiodid (PI) gefärbt um nekrotische Zellen (Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) zu identifizieren<sup>229</sup>. Die Färbung der Zellen erfolgte nach Herstellerangaben. Anschließend wurden die Zellpopulationen mittels des FACSCalibur Durchflusszytometers und der CellQuest Software analysiert.

### 2.2.6 Histologische Untersuchung

Von allen Versuchstieren wurde je das mittlere Drittel einer Niere für histologische Untersuchungen in 4% Formalin fixiert. Die Fixierung erfolgte über Nacht in sorgfältig beschrifteten Einbettkassetten, um die genaue Zuordnung des Organs zu gewährleisten. Danach wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet und 4 µm dicke Gewebsschnitte angefertigt. Anschließend wurden die Gewebsschnitte auf Ammoniumpersulfat-beschichteten Objektträgern getrocknet. Vor einer Färbung wurden die Gewebsschnitte mit Xylol entparaffiniert, und mittels einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

#### ***Perjodsäure-Schiff-Reaktion***

Die Färbung mit Perjodsäure-Schiff-Reaktion (*periodic acid-Schiff*, PAS) erfolgte nach standardisierten Protokollen. In Kürze, nachdem die Gewebsschnitte rehydriert wurden, wurden sie mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend für 5 Minuten in 0,5% Perjodsäure gegeben. Nach einem erneuten Waschschrift mit destilliertem Wasser wurden die Gewebsschnitte für 5 Minuten in Schiff-Reagenz gegeben. Danach wurde mit 37°C warmen Leitungswasser gewaschen und mit Hämatoxylin für 2 Minuten gegengefärbt. Anschließend wurde entwässert und unter Verwendung eines Eindeckmediums eingedeckelt.

Anhand der Färbung konnte die Schwere der Nierenschädigung analog zur diffus-proliferativen LN beim Menschen eingeschätzt werden. Die Auswertung erfolgte verblindet. Hierfür wurden Aktivität und Chronizität der LN für alle Versuchstiere anhand von errechneten Indices bewertet<sup>230</sup>. Für beide Indices wurden charakteristische Läsionen hinsichtlich ihrer Ausprägung mit einer Zahl zwischen 0 und 3 (0 = nicht vorhanden, 1 = mild, 2 = moderat, 3 = ausgeprägt) versehen. Die Läsionen charakteristisch für eine aktive LN waren: glomeruläre Zellproliferation, Leukozyten-Exsudation, Karyorrhesis oder fibrinoide Nekrosen, zelluläre Halbmonde, hyaline Ablagerungen und interstitielle Inflammation.

Da zelluläre Halbmonde und Karyorrhesis/fibrinoide Nekrosen als besonders schwerwiegend einzuschätzen sind, wurden diese Läsionen jeweils doppelt gewertet. Maximal konnte beim Aktivitäts-Index eine Punktzahl von 24 erreicht werden.

Der Chronizitäts-Index wurde durch die Bewertung folgender Läsionen berechnet: glomeruläre Sklerose, fibröse Halbmonde, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose. Hier ergab sich eine maximale Punktzahl von 12 (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Aktivitäts- und Chronizitäts-Index.**

Aktivitäts-Index		Chronizitäts-Index	
Glomeruläre Zellproliferation	< 25% = 1P 25 – 50% = 2P > 50% = 3P	Glomeruläre Sklerose	< 25% = 1P 25 – 50% = 2P > 50% = 3P
Leukozyten-Exsudation	Mild = 1P Moderat = 2P Ausgeprägt = 3P	Fibrinöse Halbmonde	< 25% = 1P 25 – 50% = 2P > 50% = 3P
Karyorrhesis/fibrinoide Nekrosen (x2)	< 25% = 1P 25 – 50% = 2P > 50% = 3P	Tubuläre Atrophie	Mild = 1P Moderat = 2P Ausgeprägt = 3P
Zelluläre Halbmonde (x2)	< 25% = 1P 25 – 50% = 2P > 50% = 3P	Interstitielle Fibrose	Mild = 1P Moderat = 2P Ausgeprägt = 3P
Hyaline Ablagerungen	Mild = 1P Moderat = 2P Ausgeprägt = 3P		
Interstitielle Inflammation	Mild = 1P Moderat = 2P Ausgeprägt = 3P		

Aktivitäts- und Chronizitäts-Indices für die diffus-proliferative Lupusnephritis<sup>230</sup>. Maximale Punktzahl des Aktivitäts-Indexes = 24 Punkte; maximale Punktzahl des Chronizitäts-Indexes = 12 Punkte; P = Punkt.

### ***Methenamin-Silber-Färbung***

Um chronische Nierenschäden besser darzustellen, wurden Gewebsschnitte von Nieren aller Tiere mit der Methenamin-Silber-Färbung nach gängigen Protokollen gefärbt. Hierfür wurden die Gewebsschnitte für 15 Minuten in Perjodsäure und danach für 5 Minuten in 0,5% Thiosemicarbazid gegeben. Anschließend kamen die Gewebsschnitte für 10 min in eine Silberlösung (55 ml 3% Methenamin, 2,8 ml 5% Silbernitrat, 6,6 ml 6% Dinatriumtetraborat). Als nächstes wurden die Schnitte kurz in warmes Wasser getaucht und dann in eine Gold-Chlorid-Lösung gegeben. Nachdem die Schnitte eine Minute lang in einer Lösung aus 10 ml Salpetersäure, 5 ml 37% Formaldehyd und 485 ml destilliertem Wasser waren, wurden sie fixiert und erst mit Hämatoxylin und dann mit Eosin gefärbt und anschließend mit einer Alkoholreihe (Xylol) entwässert und eingedeckelt. Zwischen den Schritten wurde jeweils mit destilliertem- oder Leitungswasser gewaschen.

Die Auswertung erfolgte verblindet anhand eines semiquantitativen Scores. Je 10 Glomeruli eines jeden Gewebsschnittes wurden hinsichtlich ihrer strukturellen Integrität untersucht und von 0 (kein Schaden) bis 3 (ausgeprägte Schäden) bewertet.

### ***Immunfärbungen***

Für Immunfärbungen wurde, nachdem die Gewebsschnitte rehydriert wurden, die endogene Peroxidase mittels Wasserstoffperoxid und Methanol blockiert und anschließend mit PBS gewaschen. Danach wurde das Antigen demaskiert, indem die Gewebsschnitte in eine Mischung aus Antigen-demaskierungs-Lösung und destilliertem Wasser getaucht und für 10 Minuten in einer Mikrowelle gekocht wurden. Nachdem die Gewebsschnitte auf Zimmertemperatur abgekühlt waren, wurde erneut mit PBS gewaschen. Um endogenes Biotin zu blockieren, wurden die Gewebsschnitte erst zusammen mit Avidin und dann mit Biotin inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen.

Danach wurden die unter Abschnitt 2.1 aufgelisteten Antikörper für Immunhistologie zum Färben der Gewebsschnitte nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden folgende Strukturen angefärbt: C3c für Komplementablagerungen, CD3 für T-Zellen, CD31 zur Bewertung der Integrität der glomerulären Blutgefäße und Wilms Tumor 1 (WT1)/nephrin für Podozyten.

In Kürze, die Gewebsschnitte wurden für die C3c- und CD3-Färbung erst mit einem primären Antikörper inkubiert, danach mit PBS gewaschen und dann mit einem biotenyliertem sekundären Antikörper inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten mit einem ABC-Substrat-Puffer wurde mit Methylgrün gegengefärbt. Direkt danach wurde mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entfärbt, mit Xylol entwässert und schließlich eingedeckelt.

Bei den CD31- und WT1/nephrin-Färbungen handelt es sich um Immunfluoreszenz-Färbungen. Hier war jeweils der sekundäre Antikörper mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt.

Die C3c-Färbung, sowie die Färbung mit CD31 wurden jeweils mit Hilfe der ImageJ-Software ausgewertet, indem positiv-gefärbte Flächen durch die gesamte Fläche des Glomerulums geteilt wurden. Auf diese Weise wurden für die C3c-Färbung jeweils zehn Glomeruli und für die CD31 Färbung jeweils fünf Glomeruli pro Gewebsschnitt ausgewertet. In WT1/nephrin- und CD3-Färbungen wurden die positiven Zellen pro Glomerulum gezählt. Für die Auswertung der CD3 und der WT1/nephrin Färbungen wurden jeweils 15 Glomeruli pro Gewebsschnitt untersucht.

Alle immunhistologischen Auswertungen wurden verblindet durchgeführt.

### ***Elektronenmikroskopie***

Die Elektronenmikroskopie wurde von Bastian Popper von der Abteilung für Anatomie und Zellbiologie, Biomedizinisches Zentrum, Ludwig-Maximilians-Universität, Planegg-Martinsried, Deutschland, durchgeführt. Hierfür wurden die murinen Nieren aus der Tierstudie II in 2% Paraformaldehyd/2% Glutaraldehyd und 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) für 24 Stunden fixiert und anschließend mit 1,0 M Natriumphosphatpuffer und destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde das Gewebe in Phosphat-Kakodylat-gepuffertem 2% Osmiumtetroxid für 1 h postfixiert und mittels einer Alkoholreihe dehydriert. Das Einbetten erfolgte in Embed-812 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Aus den eingebetteten Gewebsschnitten wurden ~ 90 nm dicke Schnitte angefertigt und mit Uranylacetat und mit Bleicitrat nach Venable und Coggeshall gefärbt. Die Elektronenmikroskopie erfolgte mit einem 1200EX Elektronenmikroskop (JEO, Tokyo, Japan).

### **2.2.7 Untersuchung der Autoantikörper-Produktion und Nierenfunktion**

#### ***ANA-Diagnostik mittels indirekter Immunfluoreszenz***

Die indirekte Immunfluoreszenz wird als semiquantitatives Nachweisverfahren von ANAs eingesetzt. Erstbeschreiber dieser Technik waren Weller und Coons. Hierzu werden mit HEp-2-Zellen (humane Epitheliumzellen Typ 2 eines Larynxkarzinoms) beschichtete Objektträger verwendet. Das Prinzip der Technik besteht darin, dass ANAs, soweit sie im Testserum oder -plasma vorhanden sind, einen stabilen Antigen-Antikörper Komplex mit Zellkernbestandteilen der HEp-2-Zellen bilden. Diese Antigen-Antikörperkomplexe können wiederum mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC) gekoppelten anti-humanen Antikörpern gefärbt werden. Im Fluoreszenzmikroskop können auf diese Weise semiquantitative Rückschlüsse auf die Konzentration der ANAs in der Probe getroffen werden, und es können weiterhin auch verschiedene ANA-Spezifitäten unter Berücksichtigung des spezifischen Fluoreszenzmusters unterschieden werden.

Da bei MRL-(Fas)lpr-Mäusen eine hohe Plasmakonzentration der ANAs zu erwarten ist, wurde das Plasma im Verhältnis 1:200 mit PBS verdünnt. Anschließend wurden je 25 µl der Plasmaprobe auf mit HEp-2-Zellen beschichtete Objektträger gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit einer Spritzflasche mit PBS abgespült und, um

## Material und Methoden

unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, 10 Minuten lang mit PBS in einem Coplin Glas gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Objektträger drei Mal in destilliertes Wasser getaucht. Überschüssige Flüssigkeit wurde durch leichtes, seitliches Klopfen auf ein Papiertuch entfernt. 200 µl des Fluoreszenz-Antikörpers (Ziege anti-Maus IgG-FITC) wurden auf je einen Objektträger gegeben und für 30 Minuten in einer Feuchtkammer in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde, wie oben beschrieben, erst mit PBS abgespült und dann gewaschen. Nachdem der Objektträger in destilliertes Wasser getaucht wurde und die überschüssige Flüssigkeit entfernt wurde, wurden 4 – 5 Tropfen Eindeckmedium mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) entlang der Mittellinie des Objektträgers aufgetragen. Das Deckglas wurde vorsichtig, unter Vermeiden von Luft einschließen, auf den Objektträger platziert. Anschließend wurden die Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop angesehen und repräsentative Fotos angefertigt.

### ***Autoantikörper-Konzentrationsmessungen mittels ELISA***

Plasmakonzentrationen von IgM, IgG, IgG1, IgG2a und IgG2b wurden mittels kommerziell erhältlicher enzymgekoppelter Immunoabsorptionstests (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, ELISA) gemessen.

Erst wurden Kammern von 96-Kammer-Platten mit 100 µl eines Beschichtungspuffers (*coating buffer*) (0,05 M Carbonat-Bicarbonat, pH 9,6) mit dem jeweiligen, spezifischen Antikörper (*capture antibody*) gefüllt und über Nacht bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit einer Waschlösung (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 8,0) unter Verwendung eines ELISA-Platten-Spülers gewaschen, so dass nur fest haftende Antikörper in den Kammern zurückblieben. Anschließend wurden unspezifische Bindestellen mittels einer *Blocking Solution* (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% BSA) blockiert. Die Platten wurden für 30 Minuten mit der *Blocking Solution* bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten erneut gewaschen und je 100 µl verdünnter Plasmaproben (1:1.000 bis 1:100.000 Verdünnung) in die Kammern pipettiert. 16 Kammern auf jeder Platte wurden mit einem mitgelieferten Standard aus aufgereinigten anti-Maus-Antikörpern (IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b) in bekannten Konzentrationen gefüllt. Zur Verdünnung wurde jeweils eine Verdünnungslösung aus 50 mM Tris, 0,14 M Natriumchlorid, 1% BSA und 0,05% Tween 20 verwendet. Nach einer Inkubation von 60 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Kammern erneut gewaschen und anschließend für weitere 60 Minuten mit

## Material und Methoden

einem HRP (*horseradish peroxidase*; HRP) -Detektionsantikörper inkubiert. Danach wurde wieder gewaschen und eine 1:1 Mischung aus Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in die Kammern gegeben. TMB wird unter Beisein der HRP zu 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidindiimin oxidiert. Dies bewirkt eine konzentrationsabhängige Blaufärbung. Die Reaktion verlief in Dunkelheit und wurde mit Schwefelsäure gestoppt. Anschließend wurde die Absorption bei 450 nm mittels eines ELISA-Platten-Lesegeräts gemessen. Anhand des Standards, konnte mittels einer Standardkurve die Konzentration der restlichen Proben berechnet werden.

Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen von anti-dsDNA-IgG und anti-sDNA-IgM erfolgte ebenfalls mittels ELISA. Der einzige Unterschied war, dass zum Beschichten (*coating*) die Kammern erst mit Poly-L-Lysin (1:1 Verdünnung mit PBS) für zwei Stunden inkubiert wurden. Nachdem gewaschen wurde, wurde statt des *capture antibody* 1 µg/ml Mausschwanz-Doppelstrang-DNA in SSC Puffer (1X) (*saline-sodium citrate*; SSC) in die Kammern gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Kammern, die jeweils für den Standard vorgesehen waren, wurden ausgespart und stattdessen mit dem jeweiligen *capture antibody* beschichtet. Für den Standard wurden aufgereinigte anti-Maus-IgG beziehungsweise -IgM verwendet.

### **Untersuchung der Nierenfunktion**

Als Indikator für die Nierenfunktion wurden der Albumin-Kreatinin-Quotient im Urin und die Harnstoffkonzentration im Blutplasma bestimmt. Albuminkonzentrationen wurden mittels kommerziell erhältlicher ELISA-Sets im Mausurin gemessen. Der Test erfolgte analog zu den oben beschriebenen ELISAs.

Die Harnkonzentration ist von vielen verschiedenen Faktoren abhängig und unterliegt großen natürlichen Schwankungen, was dazu führt, dass gemessene Absolutwerte im Urin nur eingeschränkt vergleichbar sind. Kreatinin wird von der Niere frei filtriert und kaum rückresorbiert, so dass Kreatininkonzentrationen im Urin als ein Maß für die Urinkonzentration herangezogen werden können. Der Albumin-Kreatinin-Quotient gibt demnach einen Wert an, der unabhängig von individuellen Harnkonzentrations-Schwankungen ist.

Die Messung des Kreatinins im Urin basierte auf der enzymatischen Reaktion nach Jaffe und wurde mittels des kommerziell erhältlichen Creatinine FS Kits angefertigt. Hierfür wurde der Mausurin erst 1:10 in Wasser verdünnt. Je 10 µl des verdünnten Urins wurden anschließend auf eine 96-Kammer-Platte pipettiert. 16 Kammern wurden

## Material und Methoden

ausgespart und mit einem mitgelieferten Standard in absteigenden Konzentrationen (4, 3, 2, 1 mg/dl) gefüllt. Nachdem Reagenz 1 (0,2 mol/L Natriumhydroxid) und Reagenz 2 (20 mmol/L Pikrinsäure) miteinander im Verhältnis 1:4 vermischt wurden, wurden je 200 µl in die Kammern zu den Proben und dem Standard hinzugefügt. Dies löste den Start der enzymatischen Reaktion aus. Nach 1 Minute wurde der Absorptionskoeffizient bei 492 nm mit einem ELISA-Platten-Lesegerät gemessen.

Die Reaktion zur Messung der Harnstoffkonzentration erfolgte mittels einer enzymatischen Reaktion unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Urea FS Kits. Erst wurde eine Verdünnungsreihe (50, 100, 150, 200, 250 mg/dl) auf eine 96-Kammer-Platte unter Verwendung des mitgelieferten Standards angefertigt. Zusätzlich wurden je 2 µl Blutplasma auf die 96-Kammer-Platte pipettiert. Anschließend wurden Reagenz 1 (150 mmol/L TRIS, 9 mmol/L 2-Oxoglutarat, 0,75 mmol/L Adenosindiphosphat,  $\geq 7$  kU/L Urease,  $\geq 1$  kU/L Glutamatdehydrogenase) und Reagenz 2 (1,3 mmol/L der reduzierten Form des Nicotinamidadenindinukleotids) aus dem Kit im Verhältnis 4:1 vermischt. Je 200 µl wurden zum Starten der Reaktion in die mit Standard und Blutplasmaproben gefüllten Kammern pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 Minute erfolgte die Messung des Absorptionskoeffizienten bei 360 nm mit einem ELISA-Platten-Lesegerät.

### 2.2.8 Zellkultur

Für Zellkulturversuche wurden Zellen aus menschlichem Blut isoliert, oder murine Zelllinien verwendet. Alle Blutproben wurden von gesunden Spendern entnommen. Die Spender waren vor der Blutentnahme aufgeklärt worden und hatten ihre schriftliche Einwilligung entsprechend der Ethikordnung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität in München gegeben. Für die Blutentnahme wurden S-Monovette® 9 ml Lithium-Heparin Röhrchen verwendet.

### **Glomeruläre Endothelzellen**

Mittels Transfektion wurde *small interfering RNA* (siRNA) für PAR2 in das Genom glomerulärer Maus-Endothelzellen eingebracht. Das Ziel der Transfektion war es, dass die Expression von PAR2 unterdrückt wurde, man also eine Blockade von PAR2 erhielt. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich eine „*scrambled*“ siRNA eingebracht, durch die keine PAR2-Blockade entstand.

## Material und Methoden

Die Transfektionen erfolgten nach einem etablierten Protokoll<sup>231</sup>. Hierfür wurden etwa 2 Millionen glomeruläre Maus-Endothelzellen in 1 M Nukleofektionspuffer (5 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 120 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2, 50 mM Mannitol) suspendiert. In den Nukleofektionspuffer wurden bei einer Gruppe siRNA für PAR2 (2.000 ng), bei der anderen Gruppe „*scrambled*“ siRNA hinzugegeben. Um die siRNA einzuschleusen, wurde die Zellmembran mittels eines Lonza Nukleofektors (Programm V-001 für Endothelzellen) vorübergehend permeabel gemacht. Dies wird als Elektroporation bezeichnet. Die Effizienz wurde anschließend mittels einer quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*real-time polymerase chain reaction*; *Real-Time PCR*) gemessen. Direkt im Anschluss wurden die Zellen in frisches *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) Medium versetzt mit 1% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin gegeben. Etwa 1 Millionen Zellen pro Kammer wurden auf einer 12-Kammer-Platte über Nacht kultiviert, so dass sie an den Kammern anhafteten. Vor der Stimulation wurden die Zellen für zwei Stunden in frisches, inkomplettes RPMI Medium gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 20 Stunden mit 0,5 µg/ml LPS oder 1000 IU IFN-γ in Kombination mit 1 µg oder 2 µg Cat S stimuliert. Eine Gruppe glomerulärer Endothelzellen wurde nicht transfektiert, sondern erhielt eine Prästimulation (30 Minuten vor der Stimulation) mit dem PAR2-Inhibitor FSLLRY-Amid. Die Stimulation erfolgte auf die gleiche Weise, wie bei den transfektierten Zellen. Sowohl von den transfektierten Zellen, als auch von den prästimulierten Zellen, wurde je eine Gruppe nicht stimuliert und diente so als Kontrollgruppe (Medium). Mit einem automatischen Zellzähler wurden von der Kammer abgelöste Zellen gezählt. Zusätzlich wurden die Zellen mit Annexin V/PI gefärbt und nekrotische Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie identifiziert.

### **Neutrophile Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten wurden aus menschlichem Blut mit einer Dextran-Sedimentation gefolgt von einer Dichtegradientenzentrifugation isoliert<sup>232,233</sup>. 7 ml Blut wurden zu 7 ml 1,25% Dextran mit einem Molekulargewicht von 450 K – 650 K gegeben und für eine Stunde bei 4°C stehen gelassen. Dieser Schritt diente dazu, dass sich die roten Blutzellen absenkten und sich eine weißlich-gelbliche Schicht mit Leukozyten bildete. Diese leukozytenreiche Schicht wurde entnommen und in ein frisches Falcon-Röhrchen gefüllt. Um die Zellen zu waschen, wurde eiskaltes PBS hinzugefügt und mit 1.300 rpm für 6 Minuten zentrifugiert. Das Sediment

## Material und Methoden

wurde resuspendiert und die übrigen roten Blutzellen wurden lysiert, indem die Zellen vorsichtig mit 12 ml eiskaltem destilliertem Wasser für 20 Sekunden vermischt wurden. Um die Tonizität beizubehalten wurden 1,8% Natriumchlorid-Lösung hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, indem für 10 Minuten mit 1.500 rpm zentrifugiert wurde. Danach wurden die Zellen in 2,5 ml PBS resuspendiert. Die Isolation der neutrophilen Granulozyten erfolgte mit einer Dichte-Zentrifugation mit Lymphoprep™-Trennlösung (Dichte 1,077 g/ml). Hierfür wurden die Zellen vorsichtig auf die Trennlösung geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte mit 1.500 rpm für 30 Minuten ohne Bremse. Danach wurden die Zellen abpipettiert, mit PBS gewaschen und in inkomplettem RPMI Medium resuspendiert. Neutrophile Granulozyten ( $0,5 \times 10^6$  und  $5 \times 10^6$  pro Kammer) wurden in RPMI Medium auf 8-Kammer- $\mu$ -Objektträger oder 12-Kammer-Platten gegeben und für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C und einem atmosphärischen Kohlenstoffdioxidgehalt von 5% ruhen gelassen. Die Zellen wurden für 3 Stunden mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (25 nM), IFN- $\gamma$  (1000 IU/ml), Imiquimod (5  $\mu$ g/ml), Cytosinphosphatidylguanin-DNA (CpG-DNA) (25  $\mu$ g/ml), oder TNF- $\alpha$  (200 nM) stimuliert. Eine Gruppe wurde nicht stimuliert und als Kontrollgruppe (Medium) verwendet. Danach wurden die Zellkulturüberstände der 12-Kammer-Platten abpipettiert und bei – 20°C bis zur Bestimmung der Cat S-Konzentration mittels ELISA aufbewahrt. Die Zellen auf den 8-Kammer- $\mu$ -Objektträgern wurden in Aceton fixiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit FITC-anti-Cat S und DAPI nach Herstellerangaben gefärbt, mit einem Fluoreszenzmikroskop angesehen und repräsentative Fotos angefertigt.

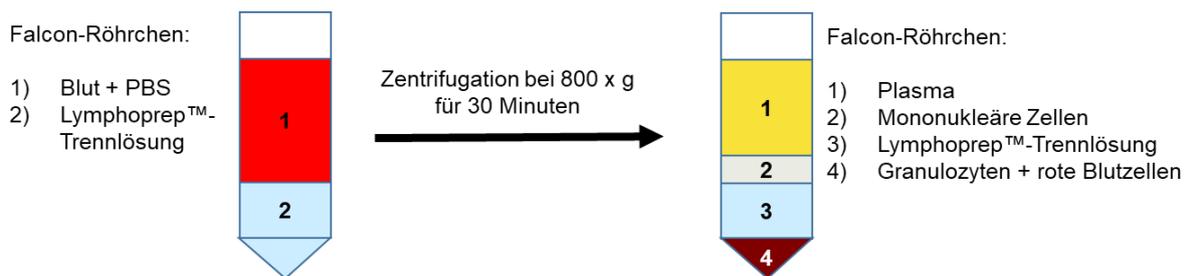
### ***Mononukleäre Zellen aus dem Blut***

Die Isolation von PBMCs aus Vollblut mittels einer Dichtegradientenzentrifugation wurde erstmals von Boyum beschrieben<sup>233</sup>. Das Blut wurde 1:1 mit PBS verdünnt. Lymphoprep™-Trennlösung wurde in ein Falcon-Röhrchen gefüllt und das verdünnte Blut wurde vorsichtig auf die Lymphoprep™-Trennlösung pipettiert. Bei diesem Schritt wurde sorgfältig darauf geachtet, dass sich das Blut nicht mit der Lymphoprep™-Trennlösung vermischt. Anschließend wurde 30 Minuten lang bei 800 x g bei Raumtemperatur ohne Bremsen zentrifugiert (Abbildung 10).

Die oberste Schicht, die Plasmaschicht, wurde abpipettiert und verworfen, so dass die Schicht mit PBMCs frei lag. Diese Schicht wurde vorsichtig entnommen und mit RPMI

## Material und Methoden

Medium gewaschen.  $0,5 \times 10^6$  und  $1 \times 10^6$  Zellen wurden pro Kammer auf 8-Kammer- $\mu$ -Objektträgern und 12-Kammer-Platten gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten im Brutschrank bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  und einem atmosphärischem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5% ruhen gelassen. Die Stimulation erfolgte mit 1.000 IU/ml IFN- $\gamma$ , 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Imiquimod, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CpG-DNA und 200 nM TNF- $\alpha$ . Nach 2 Stunden wurde der Zellkulturüberstand aus den 12-Kammer-Platten abpipettiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zum Durchführen eines Cat S-ELISAs aufbewahrt. Die Zellen auf den 8-Kammer- $\mu$ -Objektträgern wurden mit FITC-anti-Cat S und DAPI gefärbt und anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Für die Präsentation in dieser Arbeit wurden repräsentative Fotos angefertigt.



### Abbildung 10: Isolation von mononukleären Zellen.

Mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (*phosphate-buffered saline*; PBS) verdünntes Blut wird auf eine Lymphoprep™-Trennlösung pipettiert, ohne dass sich die beiden Phasen dabei vermischen. Durch Zentrifugation trennen sich die einzelnen Blutbestandteile gemäß ihrer Dichte auf und es entsteht eine typische Schichtung.

### 2.2.9 Messung der Cathepsin S-Konzentration

Cat S-Konzentrationen wurden mittels ELISA in den Zellkulturüberständen stimulierter neutrophiler Granulozyten und PBMCs und in menschlichem Blutplasma gemessen. Die Blutplasmaproben stammten von Lupus-Patienten, die in der Münchner Kohorte für aktive SLE-Patienten gelistet sind und von gesunden Probanden. Alle Testpersonen waren vor der Blutentnahme aufgeklärt worden und hatten ihre schriftliche Einwilligung entsprechend der Ethikordnung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität in München gegeben.

Die Messungen erfolgten mittels eines kommerziell erhältlichen Tests, der nach Herstellerangaben verwendet wurde. 96-Kammer-Platten wurden mit einem in PBS verdünnten spezifische Antikörper (*capture antibody*) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit einer Waschlösung (0,05% Tween 20 in PBS, pH 7,2 – 7,4) mit Hilfe eines ELISA-Platten-Spülers gewaschen und mit 300 µl pro Kammer Verdünnungslösung (1% BSA in PBS, pH 7,2 – 7,4) geblockt. Nach 30 Minuten wurden die Platten erneut gewaschen und 100 µl der verdünnten Zellkulturüberstände (1:50 Verdünnung) oder der verdünnten Blutplasmaproben (1:250 Verdünnung) wurden in die Kammern pipettiert. 16 Kammern wurden mit einem Standard, dessen unterschiedliche Konzentrationen bekannt waren, gefüllt. Zwei Stunden später wurden die Platten gewaschen und 100 µl des verdünnten Detektionsantikörpers wurden hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurden die Platten gewaschen und 100 µl verdünnter Streptavidin-HRP wurden in die Kammern pipettiert. Nach 20 Minuten wurden die Platten gewaschen und 100 µl einer Substrat-Lösung (1:1 Mischung aus *Color Reagent A* (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und *Color Reagent B* (Tetramethylbenzidin)) wurden hinzugegeben. Die Reaktion wurde mit 50 µl Schwefelsäure gestoppt und die Absorption wurde mit einem ELISA-Platten-Lesegerät bei 450 nm gemessen. Anhand des Standards konnten die Cat S-Konzentrationen berechnet werden.

### 2.2.10 Messung der mRNA Expression mittels Real-Time PCR

#### ***RNA-Isolation***

Ein Drittel einer Niere von jeder Maus wurde in Eppendorf-Röhrchen, die mit RNA-later® gefüllt waren, bei –20°C bis zur Isolation der RNA aufbewahrt. Die Isolation der RNA erfolgte mit dem PureLink RNA Mini Kit.

Hierfür wurde das Nierengewebe bei Raumtemperatur langsam aufgetaut. Als das Gewebe vollständig aufgetaut war, wurde ein kleines Gewebstück abgeschnitten und in 600 µl Lyse-Puffer mit 1% β-Mercapto-Ethanol mit einem Homogenisator Ultra Turrax T25 homogenisiert (30 – 40 Sekunden). Anschließend wurde alles mit 6000 – 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (~ 550 µl) wurden in ein frisches Eppendorf-Röhrchen gefüllt und 1:1 mit 70% Ethanol vermischt. 700 µl davon wurden in ein spezielles Sammelröhrchen, das mit einem herausnehmbaren Einsatz mit einer Silica-Membran als Boden ausgestattet war, gefüllt. Die Membran diente zum Auffangen der RNA, während die Flüssigkeit durch sie hindurch in das Sammelröhrchen fließen konnte. Hierfür wurde für 15 Sekunden mit 11.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, indem der Einsatz vorübergehend herausgenommen wurde. Die Zentrifugation wurde auf gleiche Weise mit dem Rest der Probe wiederholt. Danach wurde mit 350 µl Wasch-Puffer I gewaschen. Zum Waschen wurde für 15 Sekunden mit 1.100 rpm zentrifugiert und der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurden 80 µl DNase-Mixtur (10 µl DNase, 70 µl Reaktions-Puffer) in den Einsatz pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut mit 350 µl Wasch-Puffer I, wie oben beschrieben, gewaschen. Der Einsatz wurde in ein frisches Sammelröhrchen platziert und mit jeweils 500 µl Wasch-Puffer II insgesamt zwei Mal gewaschen. Danach wurde der Einsatz wiederum in ein frisches Sammelröhrchen gegeben und zum Trocknen für 1 Minute mit 1.100 rpm zentrifugiert. Der Einsatz wurde anschließend in ein RNase-freies Eppendorf-Röhrchen platziert. 35 µl RNase-freies Wasser wurden auf die Membran pipettiert. Danach wurde für 1 Minute mit 1.100 rpm zentrifugiert. Durch das Hinzufügen von Wasser wurde die RNA aus der Silica-Membran eluiert und von dem Eppendorf-Röhrchen aufgefangen.

Mittels optischer Dichtemessung wurde die Qualität und die Konzentration der isolierten RNA gemessen. Hierfür wurde je 1 µl der RNA-Probe auf einen NanoDrop™ pipettiert und die Absorption bei 260 nm und bei 280 nm gemessen. Aus den

Messwerten wurde der optische-Dichte-Quotient berechnet. Für weiterführende Experimente wurden nur RNA-Proben verwendet, deren optische-Dichte-Quotient über 1,8 lag.

### ***cDNA-Synthese***

Als nächstes wurde die isolierte RNA in *complementary* (c)DNA umgeschrieben. Hierfür wurde die RNA mit Wasser verdünnt, so dass eine Konzentration von 2 µg/30 µl entstand. Anschließend wurden 13,9 µl Mastermix (9 µl 5 x *First Strand* Puffer, 1 µl 25 mM Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP)-Mixtur, 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT), 1 µl 40 U/µl Ribonuklease-Inhibitor (RNasin), 0,5 µl Hexanukleotide, 0,5 µl lineares Acrylamid, 1 µl SuperScript™ II Reverse Transkriptase (RT)) hinzugefügt. Für Kontrollproben (RT<sup>-</sup>) wurde ein Mastermix verwendet, der mit 1 µl Wasser anstelle von 1 µl Superscript zubereitet worden war. Anschließend wurden die Proben in einem Thermoschüttler erst für 1,5 Stunden bei 42°C und anschließend für weitere 5 Minuten bei 95°C inkubiert.

### ***Real-Time PCR***

*Messenger* (m)RNA-Expression verschiedener Gene wurde mittels einer *Real-Time* PCR gemessen<sup>234</sup>. Hierfür wurden die cDNA Proben 1:10 mit RNase freiem Wasser verdünnt. 2 µl der verdünnten cDNA wurden mit je 18 µl SYBR Green-Mastermix auf eine 96-Kammer-PCR-Platte pipettiert. Der Mastermix bestand aus 10 µl 2X SYBR Green-Mix (10 ml 2X SYBR Green-Mix: 2 ml 10 x-Taq-Puffer, 150 µl dNTPs, 4 ml PCR-Optimizer, 200 µl BSA (20 mg/ml), 40 µl SYBR Green, 2,4 ml MgCl<sub>2</sub>, 1,21 ml H<sub>2</sub>O), 0,6 µl Vorwärts-Primer, 0,6 µl Rückwärts-Primer, 0,16 µl Taq-Polymerase und 6,64 µl destilliertem Wasser. SYBR Green interkaliert beim Amplifizieren mit der Doppelstrang-DNA und steigert dabei sein Fluoreszenzsignal, so dass es als Marker diente. Die Primer waren in ihrer Sequenz jeweils spezifisch für das zu untersuchende Gen. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer-Sequenzen sind in Tabelle 4 aufgelistet. Darunter ist auch ein sogenanntes *housekeeper* Gen (18s). Dieses *housekeeper* Gen diente als endogene Kontrolle, da es konstitutiv exprimiert wird, was genutzt wird, um Schwankungen der RNA-Konzentrationen zwischen den Proben rechnerisch auszugleichen. Negative Kontrollen bestanden zum einen aus Wasser, zum anderen aus den RT<sup>-</sup>-Proben, die während der cDNA-Synthese ohne RT zubereitet wurden. Anschließend wurden die Kammern der Platte mit einer

## Material und Methoden

Plastikfolie abgeschlossen und die Platte wurde kurz zentrifugiert, damit sich die Flüssigkeit auf den Grund der Kammern absetzte.

Die *Real-Time* PCR wurde mit einem LightCycler480® durchgeführt, auf dem das *SYBR Green Dye detection system* benutzt wurde. Ein PCR-Zyklus bestand aus einer Denaturierungsphase (95°C), einer *Annealing*-Phase (60°C) und einer Amplifikationsphase (72°C). Insgesamt fanden 45 Zyklen statt. Um unspezifische Produkte und Primer-Dimere zu erkennen wurden die Schmelz-Kurven von jeder Probe analysiert.

Die Auswertung erfolgte mittels der *comparative threshold cycle*-Methode (K. Livak 1997)<sup>235</sup>. Die *cycle threshold* beschreibt die Zykluszahl, bei der das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Ergebnisse werden als Verhältnis aus dem *cycle threshold*-Wert des untersuchten Gens und dem *cycle threshold*-Wert des *housekeeper* Gens angegeben.

**Tabelle 4: Primer-Sequenzen.**

Gen	Sequenz
18s	Vorwärts: GCAATTATCCCCATGAACG Rückwärts: AGGGCCTCACTAAACCATCC
CCL2	Vorwärts: CCTGCTGTTACAGTTGCC Rückwärts: ATTGGGATCATCTTGCTGGT
CCL5	Vorwärts: CCACTTCTTCTCTGGGTTGG Rückwärts: GTGCCACGTCAAGGAGTAT
CXCL2	Vorwärts: CGGTCAAAAAGTTTGCCTTG Rückwärts: TCCAGGTCAGTTAGCCTTGC
IL6	Vorwärts: TGATGCACTTGCAGAAAACA Rückwärts: ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC
IFN-γ	Vorwärts: ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT Rückwärts: TGAGCTCATTGAATGCTTGG
TNF-α	Vorwärts: AGCCTCTTCTCATTCCCTGCT Rückwärts: TAGACAAGGTACAACCCATCGG
VCAM-1	Vorwärts: GCTATGAGGATGGAAGACTCTGG Rückwärts: ACTTGTGCAGCCACCTGAGATC
ICAM-1	Vorwärts: GTCACCGTTGTGATCCCTG Rückwärts: AACAGTTCACCTGCACGGAC
SDF-1	Vorwärts: GCGCTCTGCATCAGTGAC Rückwärts: TTTCAGATGCTTGACGTTGG

### 2.2.11 Statistische Auswertung

Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM (*standard error of the mean*) dargestellt. Eine einfache Varianzanalyse (*One-Way ANOVA*) gefolgt von *Dunnett's multiple comparison* Test als Post-hoc-Test wurde angewendet, um signifikante Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen zu ermitteln. Für die Auswertung der Tierstudie I wurden erst alle Daten mittels des Kolmogorov-Smirnov Tests auf Normalverteilung getestet. Daten, die normal verteilt waren, wurden anschließend mit einer *One-Way ANOVA* gefolgt von *Dunnett's multiple comparison* Test analysiert. Für Daten, die keine Normalverteilung zeigten, wurden die Kruskal-Wallis Varianzanalyse gefolgt von *Dunn's multiple comparison* Test als Post-hoc-Test benutzt. Ein *student's t-Tests* wurde verwendet um zwei Gruppen miteinander zu vergleichen. Auf diese Weise wurden Daten des Endzeitpunkts (19 Wochen) mit den jeweiligen Basiswerten (11 Wochen) verglichen.

Zur Auswertung der Messergebnisse in den Blutplasmaproben der SLE-Patienten und der gesunden Kontrollen wurde erst mittels des D'Agostino-Pearson-Tests auf Normalverteilung getestet. Danach wurde ein nicht-parametrischer *student's t-Tests* zum Vergleich der Cat S-Konzentrationen benutzt. Korrelationen zwischen Cat S-Plasmakonzentrationen und SLEDAI (*SLE disease activity index*; SLEDAI) oder SLICC-Schädigungs-Index wurden mit der nicht-parametrischen Rangkorrelation nach Spearman untersucht.

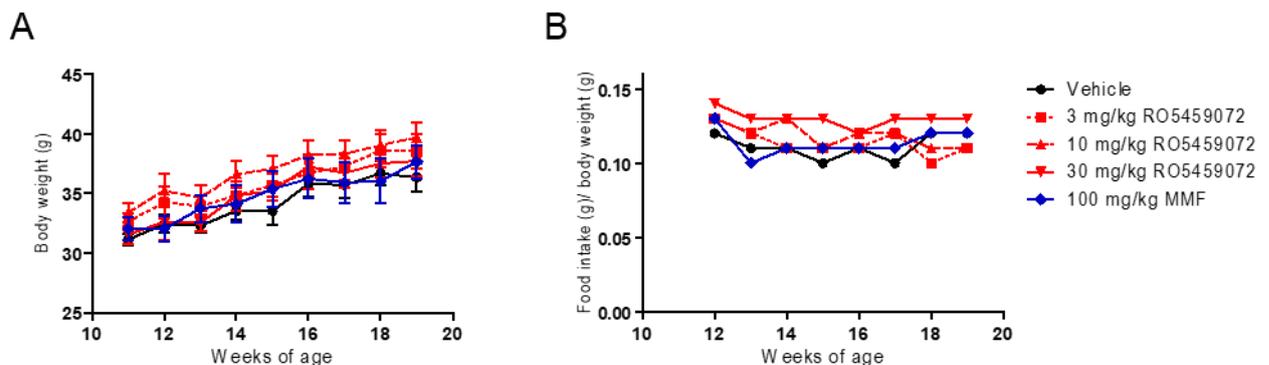
$P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle statistischen Analysen wurden mit der GraphPad Prism Software (Version 5) durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Cathepsin S-Inhibition im Tiermodell des SLEs

##### 3.1.1 Charakteristika der Interventionsgruppen in Tierstudie I

In die fünf Interventionsgruppen (Vehikel, 3 mg/kg RO5459072, 10 mg/kg RO5459072, 30 mg/kg RO5459072 und 100 mg/kg MMF) wurden je zehn weibliche MRL-(Fas)lpr-Mäuse randomisiert. Alle Mäuse waren zu dem Zeitpunkt der Randomisierung 11 Wochen alt. Die Aufnahme der Medikamente erfolgte oral über das Tierfutter. Der Futterkonsum wurde wöchentlich gemessen und betrug durchschnittlich 0,12 g/gKG, ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen aufzuweisen. In allen Gruppen wurde eine Zunahme des Körpergewichts über den Zeitraum der Studie festgestellt. Auch hier gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 11).

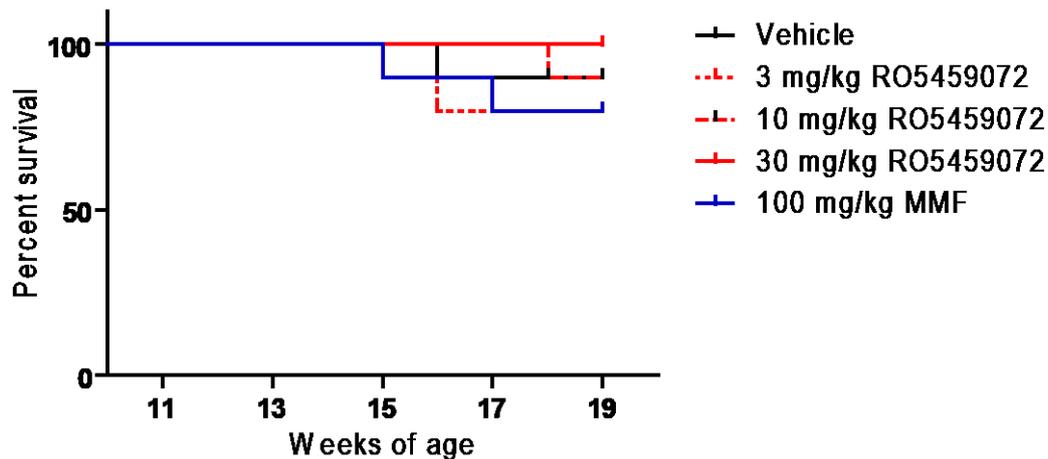


**Abbildung 11: Körpergewicht und Futterkonsum.**

(A) Das Körpergewicht aller Mäuse wurde wöchentlich über die gesamte Versuchszeit gewogen. Zu keinem Zeitpunkt traten signifikante Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen auf. Auch der Futterkonsum (B) wurde wöchentlich bestimmt und wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n = 8 bis 10 Tiere pro Interventionsgruppe).

## Ergebnisse

In dieser Studie wurde aufgrund des Auftretens von Belastungskriterien gemäß des deutschen Tierschutzgesetzes der Versuch für insgesamt sechs Tiere vorzeitig terminiert (Abbildung 12). Daraus ergab sich, dass am Ende der Studie unterschiedliche Gruppenstärken der einzelnen Gruppen bestanden. Die Cat S-Hochdosis-Therapiegruppe (30 mg/kg RO5459072) war die einzige Gruppe, die keine frühzeitigen Ausfälle zu verzeichnen hatte.



**Abbildung 12: Kaplan-Meier-Überlebenskurve.**

In einem Alter von 11 Wochen wurden MRL-(Fas)lpr-Mäuse ( $n = 10 \pm 100\%$ ) in fünf Interventionsgruppen randomisiert. Die Studie lief über einen Zeitraum von 8 Wochen. Zum definierten Endzeitpunkt waren die Mäuse 19 Wochen alt. Zum Endzeitpunkt wiesen die einzelnen Gruppen folgende Gruppenstärken auf: Vehikel  $n = 9$ , 3 mg/kg RO5459072  $n = 8$ , 10 mg/kg RO5459072  $n = 9$ , 30 mg/kg RO5459072  $n = 10$ , 100 mg/kg MMF  $n = 8$ .

### 3.1.2 Systemische Autoimmunität bei Cathepsin S-Inhibition

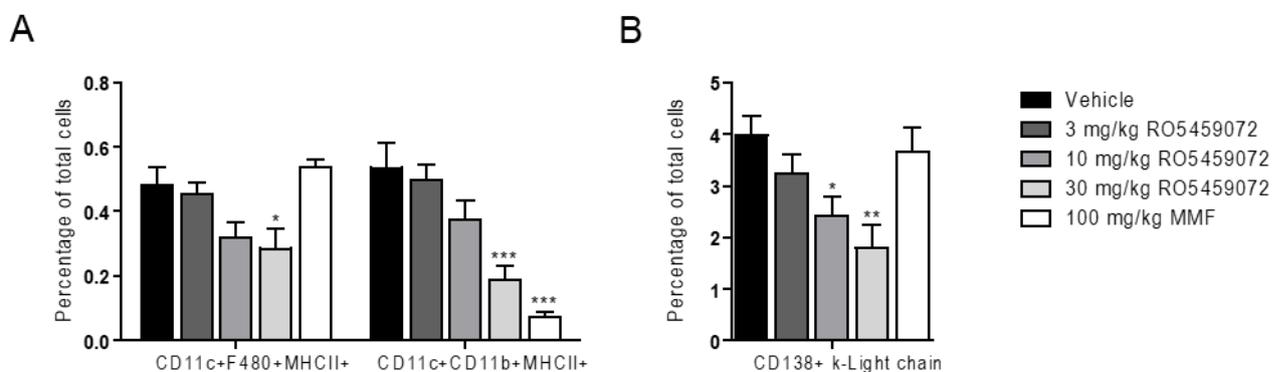
Sekundär lymphatische Organe wie die Milz bilden einen Ort der Interaktion zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Antigen-präsentierende Zellen, die zuvor mit einem „fremden“ Antigen in Kontakt gekommen sind, wandern in die Milz und in Lymphknoten ein und führen dort zu einer Aktivierung spezifischer T- und B-Lymphozyten<sup>236</sup>. Die Größe der Immunzellpopulationen in der Milz gibt demnach Auskunft über die systemische Aktivität einer Immunreaktion. Außerdem sind erhöhte Antikörperkonzentrationen und das Auftreten von ANAs ein charakteristisches Merkmal des SLE, sowohl beim Menschen, als auch bei der MRL-(Fas)lpr-Maus, und tragen maßgeblich zur systemischen Aktivität der Autoimmunkrankheit bei.

Um in dieser Arbeit die Wirkung der acht-wöchigen Cat S-Inhibitor- und der MMF-Therapie auf die systemische Autoimmunität zu beurteilen, wurden Immunzellpopulationen in der Milz aller Versuchstiere mittels Durchflusszytometrie

## Ergebnisse

bestimmt und deren prozentualer Anteil mit dem der unbehandelten Vehikel-Gruppe verglichen. Zusätzlich wurden Blutplasmaspiegel der folgenden Antikörperklassen jeweils mit spezifischen ELISAs gemessen: gesamt-IgM und gesamt-IgG, die IgG-Isotypen IgG1, IgG2a und IgG2b, und anti-dsDNA-IgM und -IgG. anti-dsDNA-Antikörper sind eine Unterform der ANAs und gelten als spezifisch für den SLE. ANAs wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz in Blutplasmaproben (Verdünnung 1:200) nach 8 Wochen Therapie dargestellt.

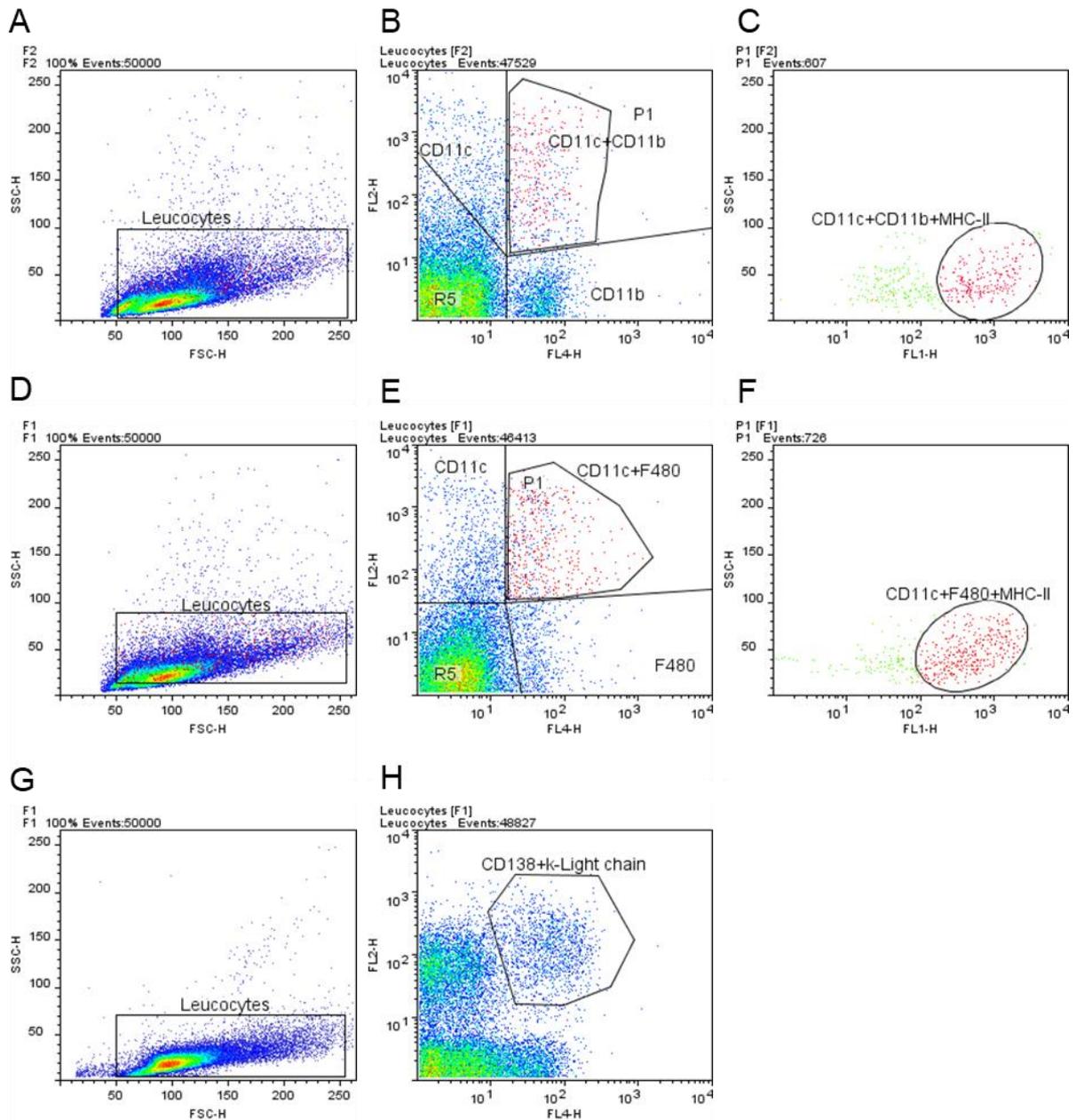
Nach der Cat S-Inhibitor-Therapie zeigte sich sowohl eine signifikant geringere Anzahl an CD11c<sup>+</sup>/F480<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>, als auch an CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> Antigen-präsentierenden Zellen. Außerdem wurden durch die Cat S-Inhibition die für die Antikörpersekretion verantwortlichen Plasmazellen (CD138<sup>+</sup>/k-Light chain) signifikant supprimiert (Abbildung 13). Der Effekt der Cat S-Inhibitor-Therapie auf Immunzellpopulationen in der Milz war streng dosisabhängig. Im Unterschied dazu wurden durch MMF-Therapie CD11c/CD11b<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> Antigen-präsentierende Zellen signifikant gesenkt, nicht aber CD11c<sup>+</sup>/F480<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> Antigen-präsentierende Zellen und Plasmazellen. Gating-Strategien sind in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 13: Suppression von Immunzellpopulationen in der Milz.**

Mittels Durchflusszytometrie wurden Zellpopulationen von aktivierten (MHCII<sup>+</sup>) Antigen-präsentierenden Zellen (A) und Plasmazellen (B) in Zellsuspensionen identifiziert, die aus der Milz isoliert wurden. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n = 8 bis 10 Tiere pro Interventionsgruppe). \*p < 0,05, \*\*p < 0,001, \*\*\*p < 0,0001 versus Vehikel.

## Ergebnisse



**Abbildung 14: Durchflusszytometrische Gating-Strategien, Milz.**

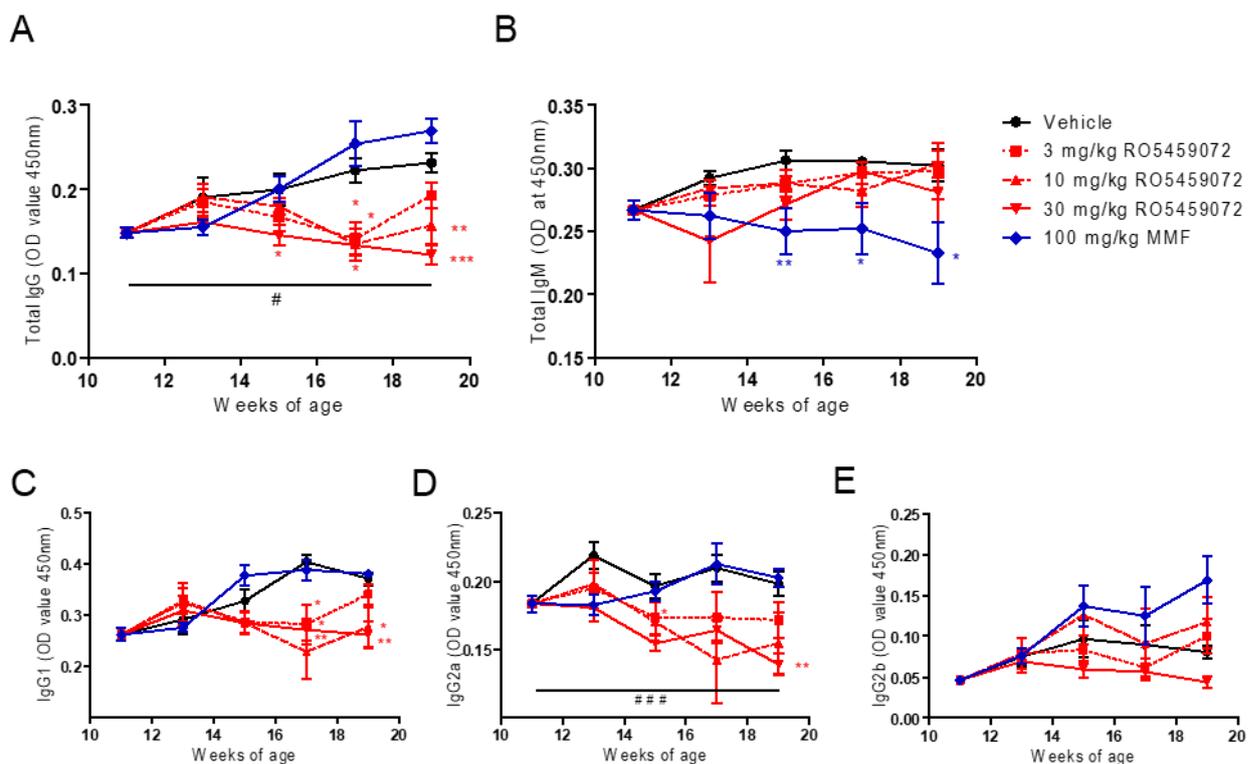
Gating-Strategien für Immunzellpopulationen in der Milz. (A – F) Antigen-präsentierende Zellen, (G – H) Plasmazellen.

Während Antikörperspiegel der unbehandelten Vehikel-Gruppe mit zunehmendem Alter der MRL-(Fas)Ipr-Mäuse stetig anstiegen, blieb dieser Anstieg für gesamt-IgG-, IgG1- und IgG2a-Antikörper unter Cat S-Inhibition aus (Abbildung 15). Gesamt-IgG- und IgG2a-Antikörperspiegel sanken sogar signifikant unterhalb des Ausgangswertes. Auch hier ist eine weitestgehend dosisabhängige Wirkung der Cat S-Inhibitor-Therapie zu beobachten. MMF-Therapie hingegen zeigte keine Suppression der IgG-Antikörper.

## Ergebnisse

Auf IgG2b-Antikörperspiegel hatten weder MFF-Therapie noch die Therapie mit RO5459072 einen signifikanten Effekt.

Anders verhielt es sich mit IgM-Antikörpern. Hier führte Cat S-Inhibition nicht zu einer Senkung der IgM-Antikörper, während die MMF-Therapiegruppe ab 4 Wochen Therapie signifikant niedrigere Antikörperspiegel aufwies, als die Vehikel-Gruppe (Abbildung 15B).



### Abbildung 15: Senkung der Antikörperspiegel in Blutplasma.

Blutplasmaspiegel von gesamt-IgG (A) und gesamt-IgM (B), sowie von IgG1 (C), IgG2a (D) und IgG2b (E) wurden über die gesamte Versuchszeit alle 14 Tage mittels ELISA bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n = 8 bis 10 Tiere pro Interventionsgruppe, außer zu den Zeitpunkten 13 Wochen und 17 Wochen, da n = 5). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 versus Vehikel. #p < 0,05, ###p < 0,001 Basiswert versus Woche 19.

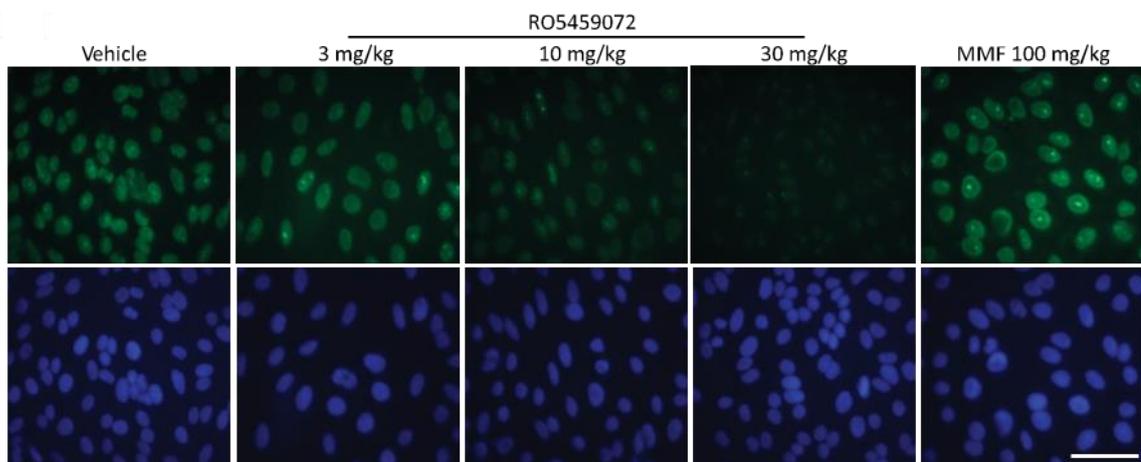
Abbildung 16A zeigt repräsentative Bilder der indirekten Immunfluoreszenz für ANAs. Hier fiel auf, dass es nach der Cat S-Inhibitor-Therapie zu einer dosisabhängigen Verringerung der Fluoreszenz kam (obere Reihe). MMF-Therapie zeigte auch hier keinen Unterschied zu Vehikel. Um sicher zu stellen, dass die Abstufungen in der Fluoreszenz durch niedrigere Antikörperkonzentrationen und nicht etwa durch ein Fehlen an Zellkernen zustande kamen, wurden die Zellkerne zusätzlich mit DAPI angefärbt. Hier zeigte sich für alle Proben eine einheitlich starke Färbung (untere Reihe). Das homogene Fluoreszenzmuster der ANA-Färbung ließ vermuten, dass es sich um anti-dsDNA-Antikörper handelte. Plasmaspiegel von anti-dsDNA-IgG und -IgM wurden zusätzlich mittels ELISA bestimmt (Abbildung 16B, C). Therapie mit 30 mg/kg

## Ergebnisse

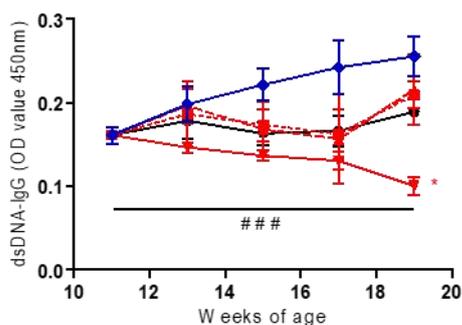
RO5459072 führte zu einer signifikanten Suppression der anti-dsDNA-IgGs sowohl im Vergleich zu Vehikel, als auch im Vergleich zum Basiswert, während MMF-Therapie abermals keinen senkenden Effekt aufwies. Analog zu den gesamt-IgM-Spiegeln, wurden auch anti-dsDNA-IgM nicht durch Cat S-Inhibition beeinflusst.

Durch Ablagerungen in der Niere als Immunkomplexe spielen anti-dsDNA-Antikörper eine wichtige Rolle in der Entstehung der LN<sup>237</sup>. Deshalb wurde als nächstes untersucht, ob die gemessenen Konzentrationsabfälle der zirkulierenden IgG-Antikörper auch einen Rückgang der Gewebeschäden in der Niere zur Folge hatten.

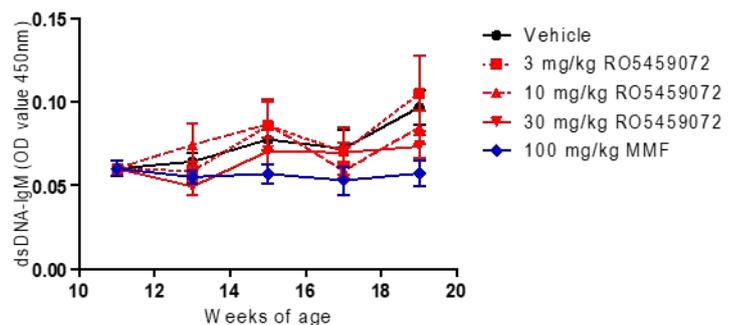
A



B



C



### Abbildung 16: Senkung der Autoantikörper in Blutplasma.

Antinukleäre Antikörper wurden in Blutplasmaproben 19 Wochen alter MRL-(Fas)lpr-Mäuse mittels indirekter Immunfluoreszenz auf mit Hep-2-Zellen beschichteten Objektträgern dargestellt (A, obere Reihe zeigt repräsentative Fotos, Maßstab 25  $\mu$ m). Die Plasmaproben wurden 1:200 verdünnt. Das homogene Fluoreszenzmuster deutet darauf hin, dass es sich um Antikörper gegen Doppelstrang-DNA (dsDNA) handelte. Zellkerne der Hep-2-Zellen wurden zusätzlich mit DAPI anfärbt (A, untere Reihe). Blutplasmaspiegel von anti-dsDNA-IgG (B) und anti-dsDNA-IgM (C) wurden alle 14 Wochen mittels ELISA bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n = 8 bis 10 Tiere pro Interventionsgruppe, außer zu den Zeitpunkten 13 Wochen und 17 Wochen, da n = 5). \*p < 0,05, versus Vehikel. ###p < 0,001 Basiswert versus Woche 19.

### 3.1.3 Weniger Nierenschäden unter Cathepsin S-Inhibitor-Therapie

MRL-(Fas)lpr-Mäuse bilden eine Immunkomplex-Glomerulonephritis ähnlich einer LN aus. Zirkulierende Antikörper, vorrangig gegen Nukleosomen und gegen Doppelstrang-DNA, bilden Immunkomplexe, die sich in der Niere zusammen mit Komplement ablagern. Dies bewirkt entzündliche und zytotoxische Reaktionen in der Niere, die zu schweren Gewebeschäden bis hin zu einem Funktionsverlust des Organs führen können<sup>45,149</sup>.

Nieren aller Versuchstiere wurden nach abgeschlossener Therapie mit dem Cat S-Inhibitor RO5459072 oder mit MMF zur histologischen und immunhistologischen Auswertung gefärbt.

Anhand der mit PAS-Reaktion gefärbten Gewebsschnitte wurde die Aktivität und die Chronizität der Glomerulonephritis beurteilt. Komplementablagerungen wurden mittels C3c-Komplementfärbung immunhistochemisch dargestellt. Mit Silber können die glomeruläre Basalmembran, die Kapillarwand, mesangiale Zellen und sklerotische Läsionen angefärbt werden, was eine detaillierte Analyse der strukturellen und sklerotischen Läsionen ermöglicht<sup>238</sup>. Die Färbung des auf Endothelzellen vorkommendem CD31 lässt eine Beurteilung der vaskulären Integrität zu.

Um die Organfunktion einzuschätzen, wurden die Harnstoffkonzentration im Blutplasma als Indikator für die Entgiftungsfähigkeit der Niere und das Auftreten einer Proteinurie (Albumin-Kreatinin-Quotient) als Hinweis auf eine gestörte Filtrationsbarriere bestimmt. Bei einer gesunden Niere kann das Protein Albumin nicht durch die von Podozytenfortsätzen gebildete Schlitzmembran in den Urin übertreten. Das Vorkommen von Albumin in Urin ist demnach ein Indikator für Schäden der von Podozyten gebildeten Filtrationsbarriere. Albumin wurde mittels ELISA im Urin der Versuchstiere gemessen, während Kreatinin und Harnstoff mit speziellen Kits in Urin beziehungsweise Blutplasma bestimmt wurden. Zusätzlich wurden Podozyten mit WT1/Nephrin in Nierengewebsschnitten aller Tiere angefärbt und deren Anzahl pro Glomerulum gezählt.

Nach Therapie mit RO5459072 kam es zu einer, im Vergleich zu Vehikel, dosisabhängigen Senkung des Aktivitäts- und des Chronizitäts-Indexes für diffus-proliferative Glomerulonephritis (Abbildung 17A links, B, D). Mit einer Dosis von 30 mg/kg war der Abfall signifikant. Diese Beobachtung spiegelte sich auch in einer signifikanten Reduktion der C3c-Komplementablagerungen nach Therapie mit 30 mg/kg Cat S-Inhibitor wider (Abbildung 17C). In der Silberfärbung wurden

## Ergebnisse

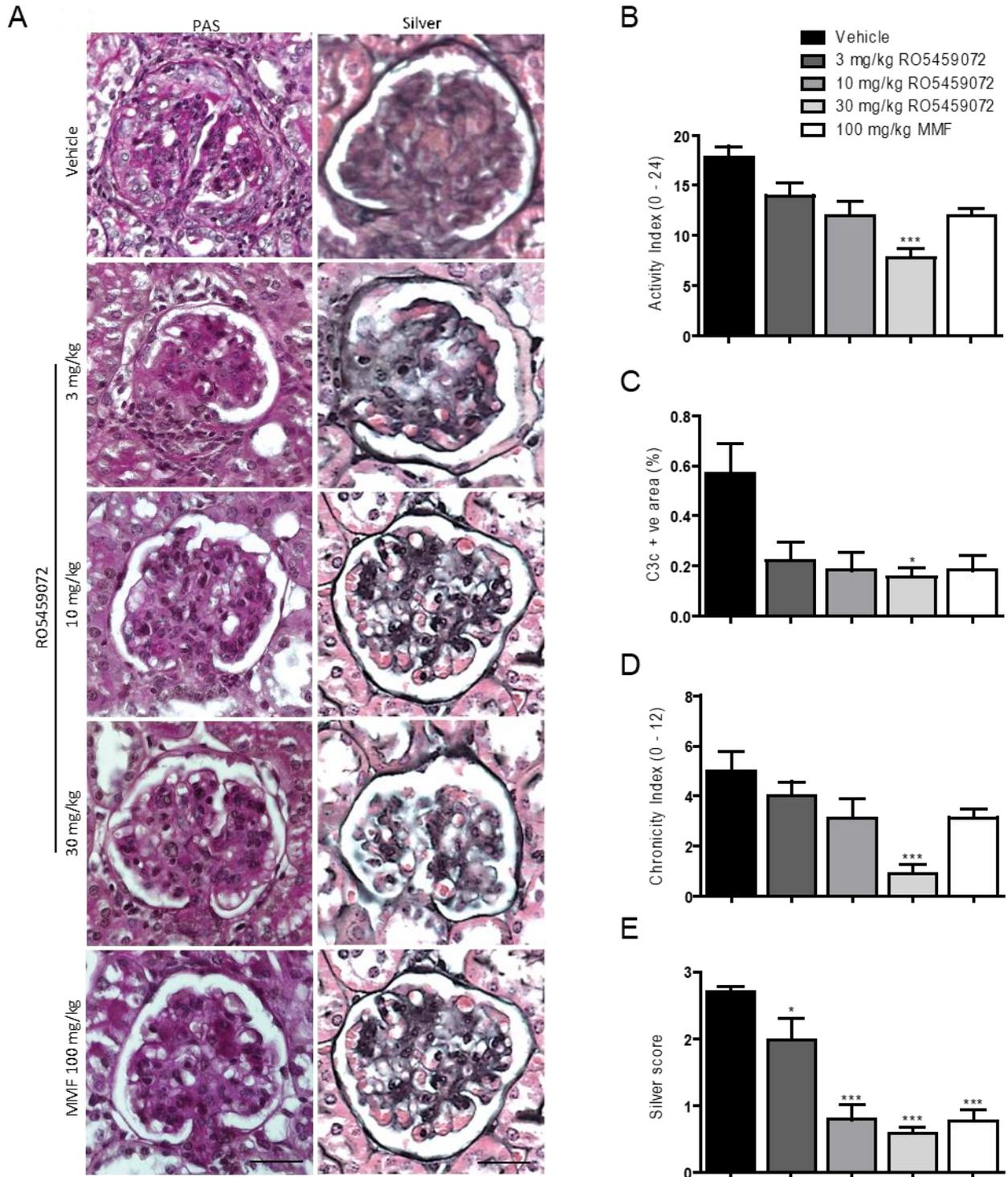
signifikant niedrigere Scores für glomeruläre Schäden in allen Cat S-Inhibitor-Therapiegruppen und in der MMF-Therapiegruppe erreicht (Abbildung 17A rechts, E). Die Integrität des vaskulären Endothels zeigte eine dosisabhängige Erhöhung (Abbildung 18). Signifikant war diese Erhöhung im Vergleich zu Vehikel für die Therapie mit 10 und mit 30 mg/kg RO5459072 und mit MMF.

Dieser protektive Effekt den man bei Endothelzellen sah, konnte auch bei Podozyten beobachtet werden. Mit Cat S-Inhibitor- (10 mg/kg und 30 mg/kg) und MMF-Therapie wiesen die Gewebsschnitte signifikant mehr Podozyten auf, als ohne Therapie (Abbildung 19A, B). Die Proteinurie nahm in der Vehikel-Gruppe über die Versuchszeit zu. In den Therapiegruppen blieb dieser Anstieg aus und unter 30 mg/kg RO5459072 sank der Albumin-Kreatinin-Quotient signifikant unterhalb des Ausgangswertes. Auch für die Harnstoffkonzentration im Blutplasma konnten in allen Therapiegruppen signifikant geringere Werte im Vergleich zu Vehikel gemessen werden (Abbildung 19C, D).

Insgesamt wiesen die Mäuse mit beiden Therapien deutlich weniger Gewebeschäden und eine bessere Organfunktion auf. Hochdosiertes RO5459072 zeigte jedoch konstant bessere Messwerte als MMF. Besonders deutlich war dies in der Suppression von Krankheitsaktivität und -chronizität, sowie in der Senkung des Albumin-Kreatinin-Quotienten.

Die verbesserte Organfunktion und Morphologie waren wahrscheinlich auf eine Dämpfung der Entzündungsreaktion in der Niere zurückzuführen. Deshalb wurde als nächstes die intrarenale Entzündung untersucht.

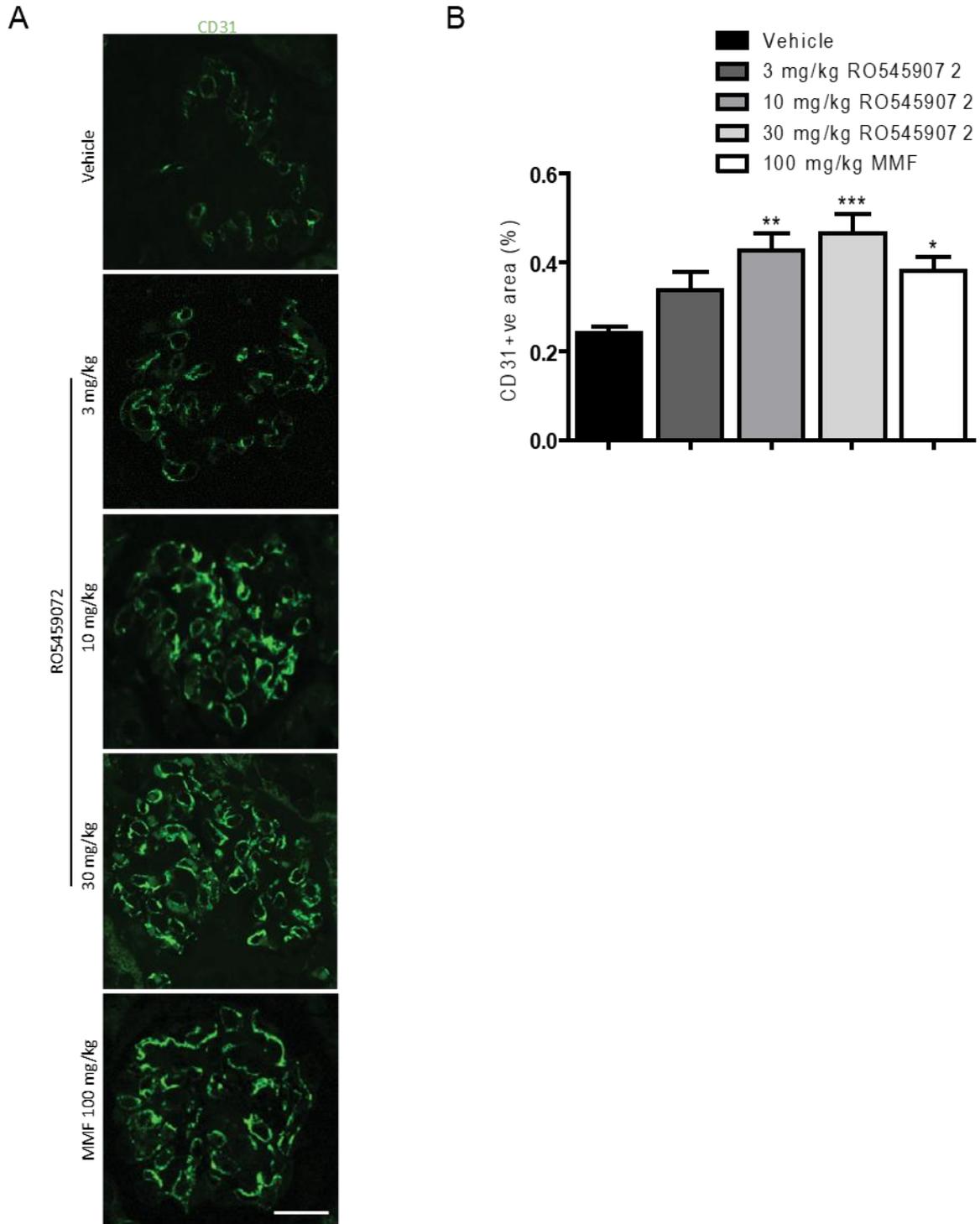
## Ergebnisse



### Abbildung 17: Weniger Gewebeschäden.

Gewebsschnitte von Nieren aller Versuchstiere wurden nach Beendigung der Therapie mit Perjodsäure-Schiff (PAS) Reaktion (A links) und Silber (A rechts) gefärbt (repräsentative Fotos bei einer originalen Vergrößerung von x 400, Maßstab 25 µm). Die Aktivität der Glomerulonephritis wurde anhand des Aktivitäts-Indexes (B), der auf der Auswertung der PAS-Färbungen beruhte, und der Menge an abgelagertem Komplement C3c (C, keine Fotos aufgeführt), das mittels eines anti-C3c-Antikörpers immunhistochemisch dargestellt worden war, beurteilt. Chronische Schäden wurden in der PAS-Färbung durch die Bildung eines Chronizitäts-Indexes (D) und in der Silberfärbung (E) bewertet. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt (n = 8 bis 10 Tiere pro Interventionsgruppe). \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001 versus Vehikel.

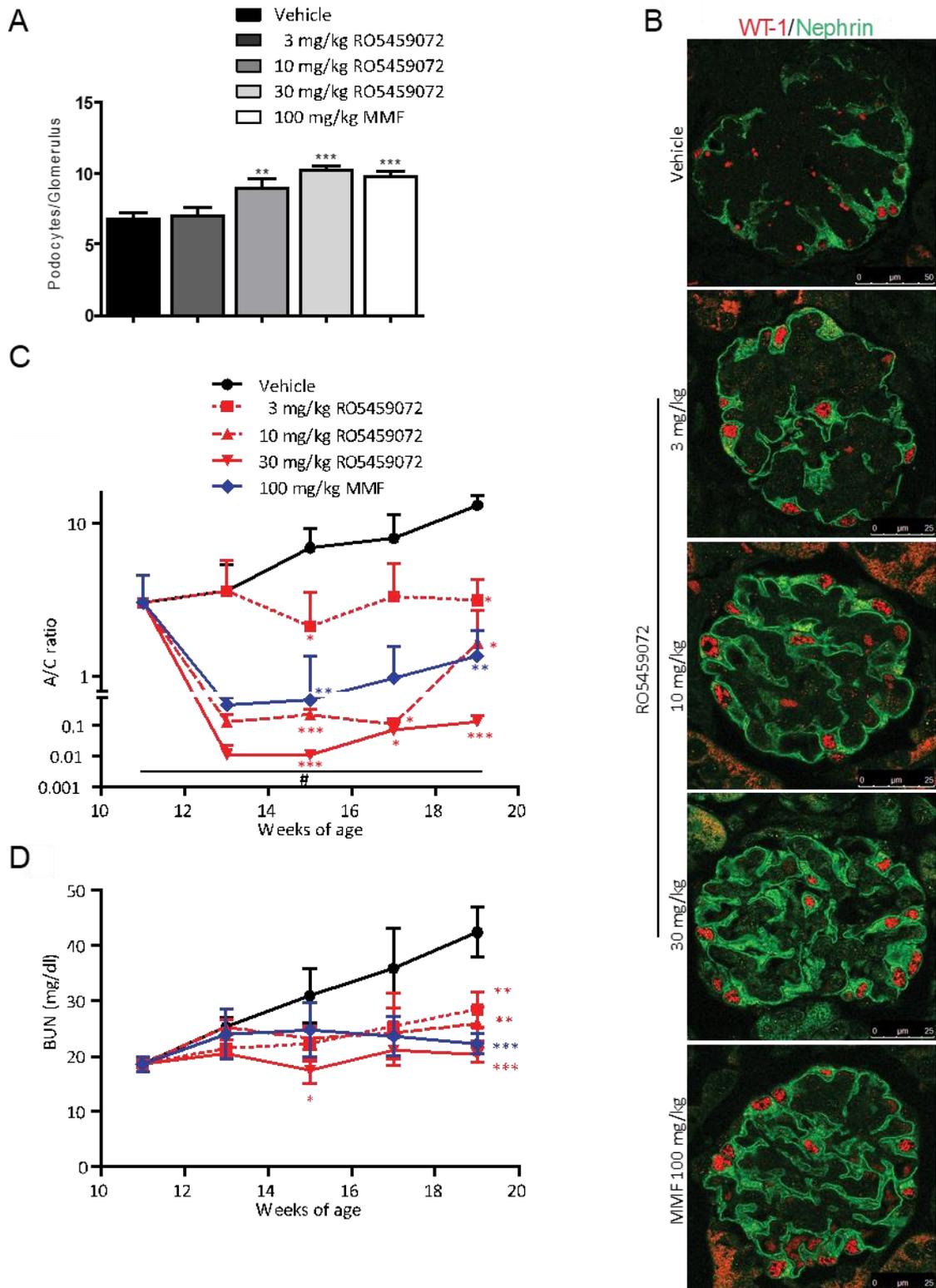
## Ergebnisse



### Abbildung 18: Protektion vaskulärer Endothelzellen.

(A) zeigt repräsentative Fotos von Glomeruli in der immunhistochemischen Färbung mit einem fluoreszenzgekoppelten Antikörper für CD31 (originale Vergrößerung von x 400, Maßstab 25  $\mu$ m). Färbungen wurden von Nierengewebschnitten aller Versuchstiere angefertigt und die quantitative Analyse (B) erfolgte mit Hilfe der ImageJ Software. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n = 8 bis 10 Tiere pro Interventionsgruppe). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 versus Vehikel.

## Ergebnisse



### Abbildung 19: Erhalt der Nierenfunktion.

Die Anzahl der Podozyten, die mit WT1/Nephryn angefärbt waren, wurden pro Glomerulum (A) in Gewebsschnitten von Nieren aller Tiere gezählt. (B, repräsentative Fotos bei einer originalen Vergrößerung von x 400, Maßstab 25  $\mu$ m) Der Albumin-Kreatinin-Quotient (engl. *Albumin/Creatinine*; A/C) (C) wurde mittels ELISA (Albumin) und der enzymatischen Reaktion nach Jaffe (Kreatinin) im Urin alle 14 Tage bestimmt. Als Maß für die Entgiftungsfähigkeit der Niere wurde die Harnstoffkonzentration (engl.: *blood urea nitrogen*; BUN) (D) alle 14 Tage im Blutplasma gemessen. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n = 8 bis 10 Tiere pro Interventionsgruppe, außer zu den Zeitpunkten 13 Wochen und 17 Wochen, da n = 5). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 versus Vehikel. #p < 0,05 Basiswert versus Woche 19.

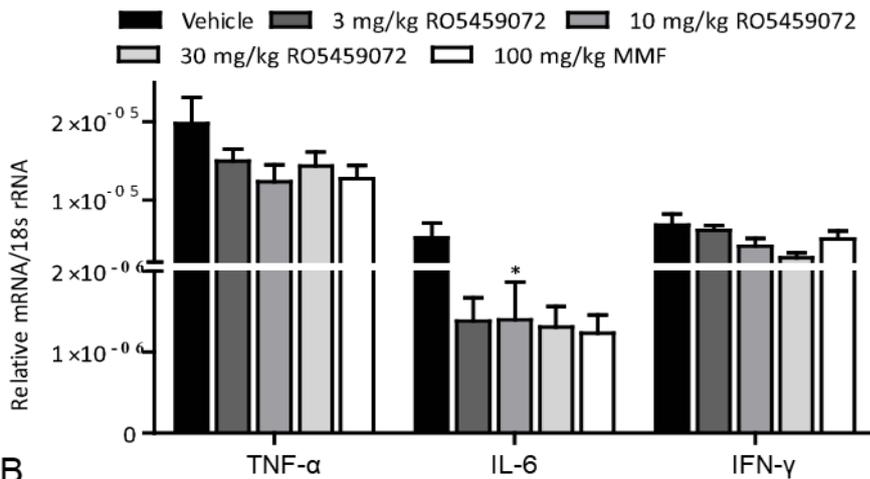
### 3.1.4 Cat S-Inhibition dämpft die intrarenale Entzündung

Bei einer Entzündung kommt es lokal zu einer vermehrten Ausschüttung von bestimmten inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, was zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen und zur Regulierung von Entzündungsprozessen führt. Adhäsionsmoleküle wie *vascular cell adhesion molecule 1* und *Intercellular adhesion molecule 1* spielen eine wichtige Rolle bei der Einwanderung von Immunzellen in das entzündete Gewebe und werden im Zuge einer Entzündungsreaktion vermehrt auf Endothelzellen von Blutgefäßen exprimiert<sup>117</sup>. Immunzellen, die in Gewebsentzündungen involviert sind, sind unter anderem Phagozyten zu denen Makrophagen und dendritische Zellen zählen, und T-Zellen. In dieser Arbeit wurden die Genexpressionen von Zytokinen (TNF- $\alpha$ , Interleukin 6, IFN- $\gamma$ ), Chemokinen (CC-Chemokinligand 2, CC-Chemokinligand 5, *C-X-C motif Ligand 2*, *stromal cell-derived factor 1*) und Adhäsionsmolekülen (*vascular cell adhesion molecule 1*, *Intercellular adhesion molecule 1*) mittels *Real-Time* PCR in Nierengewebe gemessen. Es wurde vermutet, dass die Genexpression dieser Proteine aufgrund der verminderten Bildung und Sekretion während der durch die Therapie unterdrückten Entzündung abfällt. Die renalen Immunzellpopulationen wurden mittels Durchflusszytometrie aus isolierten Nierenzellen bestimmt. T-Zellen wurden zusätzlich in Nierengewebsschnitten immunhistochemisch mit einem anti-Maus-CD3-Antikörper angefärbt. In allen Experimenten wurden Gewebeproben von allen Versuchstieren untersucht.

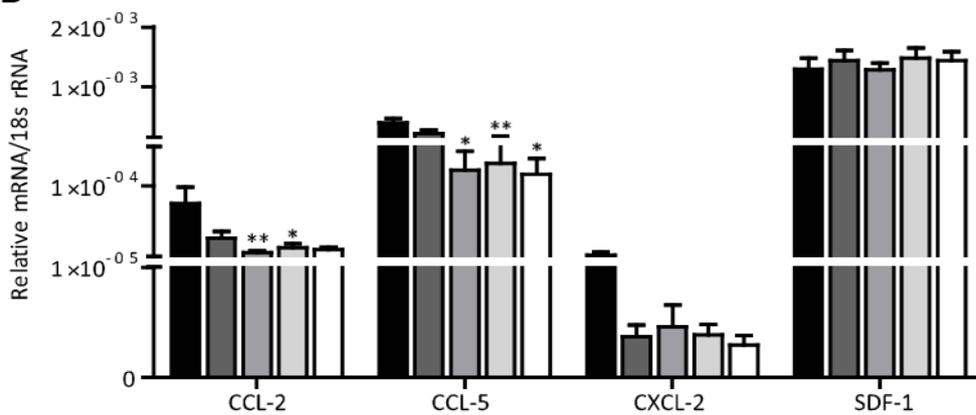
Auf die Genexpression von TNF- $\alpha$ , Interleukin 6 und IFN- $\gamma$  hatte weder die Therapie mit MMF, noch mit dem Cat S-Inhibitor RO5459072 einen deutlichen Effekt. Einzig IL6 war in der 10 mg/kg RO5459072-Gruppe im Vergleich zu Vehikel signifikant supprimiert (Abbildung 20A). Anders verhielt es sich mit der Genexpression von Chemokinen. Hier konnte eine signifikante Reduktion von CC-Chemokinligand 2 nach RO5459072-Therapie und von CC-Chemokinligand 5 sowohl nach RO5459072- (10 mg/kg und 30 mg/kg), als auch nach MMF-Therapie beobachtet werden (Abbildung 20B). Auch auf die Adhäsionsmoleküle hatte sowohl Cat S-Inhibition als auch MMF-Therapie eine deutlich suppressive Wirkung. Die Genexpression von *vascular cell adhesion molecule 1* wies in allen Therapiegruppen signifikant niedrigere Werte auf als Vehikel, während die Messwerte für *Intercellular adhesion molecule 1* in allen Therapiegruppen außer der Gruppe mit der niedrigdosierten Cat S-Inhibitor-Therapie (3 mg/kg RO5459072) eine signifikante Reduktion zeigten (Abbildung 20C).

## Ergebnisse

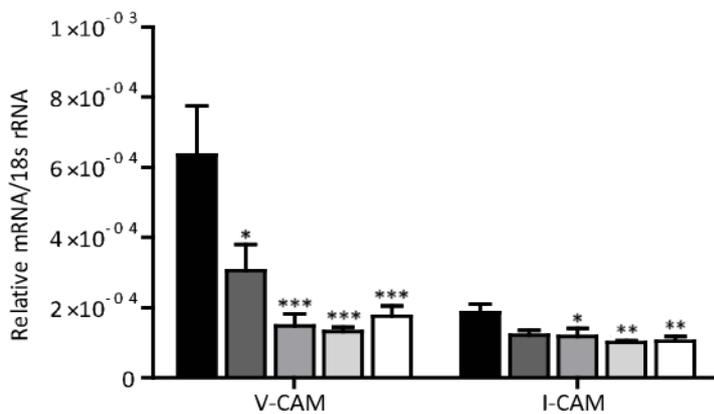
A



B



C



### Abbildung 20: Intrarenale Entzündung: Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle.

Mittels *Real-Time* PCR wurde in Nierengewebe aller Versuchstiere die Genexpression von Zytokinen (A), Chemokinen (B) und Adhäsionsmolekülen (C) gemessen. Folgende Moleküle wurden bestimmt: die Zytokine Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), die Chemokine CC-Chemokinligand 2 (CCL-2), CC-Chemokinligand 5 (CCL-5), *C-X-C motif Ligand 2* (CXCL-2) und *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) und die Adhäsionsmoleküle *vascular cell adhesion molecule 1* (V-CAM) und *intercellular adhesion molecule 1* (I-CAM). Als *housekeeper* Gen wurde 18s verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels der *comparative threshold cycle*-Methode. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt ( $n = 8$  bis 10 Tiere pro Interventionsgruppe). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  versus Vehikel.

## Ergebnisse

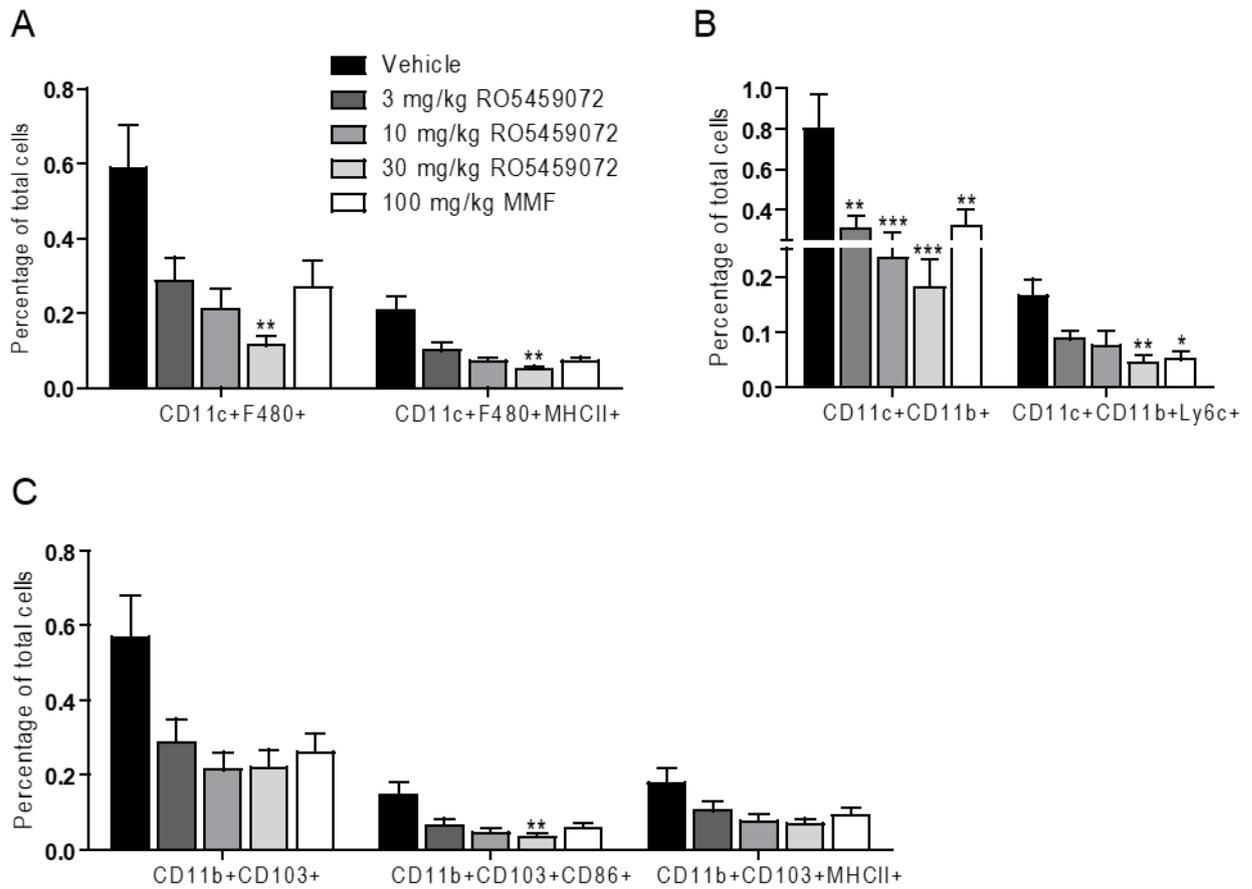
Von den intrarenalen Phagozyten konnten mit MMF-Therapie nur CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly6c<sup>+</sup> dendritische Zellen im Vergleich zu Vehikel supprimiert werden. Auch die Therapie mit RO5459072 führte zu einer signifikanten Reduktion der dendritischen Zellen. Alle Cat S-Inhibitor-Therapiegruppen wiesen eine geringere Anzahl der renalen CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> Population dendritischer Zellen auf, während die Population der CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly6c<sup>+</sup> inflammatorischen dendritischen Zellen nur durch die hochdosierte (30 mg/kg) Cat S-Inhibitor-Therapie signifikant verringert wurden (Abbildung 21B). Anders als mit MMF-Therapie, waren nach hochdosierter Cat S-Inhibition zusätzlich CD11c<sup>+</sup>/F480<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup>/F480<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> Makrophagen-Populationen im Vergleich zu Vehikel signifikant kleiner (Abbildung 21A). Auch CD11b<sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup> Phagozyten, die den für die T-Zell-Aktivierung wichtigen Rezeptor CD86 aufwiesen, wurden in der 30 mg/kg RO5459072-Therapiegruppe signifikant supprimiert. Auf die CD11b<sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> Phagozyten hatte weder MMF-Therapie, noch die Therapie mit RO5459072 einen signifikanten Effekt (Abbildung 21C).

Deutlicher war die suppressive Wirkung beider Therapien auf T-Zell-Populationen. In Nieren von Tieren, die mit dem Cat S-Inhibitor (10 mg/kg und 30 mg/kg) behandelt worden waren, wurden signifikant weniger CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> T-Zellen gemessen als in der unbehandelten Vehikel-Gruppe. Für die CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>), die doppeltnegativen T-Zellen (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) und die CD4<sup>+</sup> T-Zellen (CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>) wurde diese Reduktion sowohl mit der Cat S-Inhibitor-Therapie als auch mit der MMF-Therapie beobachtet (Abbildung 22C). Gating-Strategien sind in Abbildung 23 dargestellt.

Die durchflusszytometrisch festgestellte Verringerung der T-Zellen konnte in immunhistochemisch gefärbten Gewebsschnitten bestätigt werden. Hier zeigten sich signifikant weniger T-Zellen pro Glomerulum in allen Cat S-Inhibitor-Therapiegruppen und in der MMF-Therapiegruppe (Abbildung 22A, B). Wie zuvor bei den Messungen der systemischen Marker und den Untersuchungen der Organschäden und -funktion bereits beobachtet, war auch auf die renalen Immunzellpopulationen der gemessene Effekt der Cat S-Inhibitor-Therapie mit RO5459072 dosisabhängig.

Insgesamt war die Suppression der Entzündung unter der Therapie mit RO5459072 in etwa vergleichbar, mit der unter MMF-Therapie.

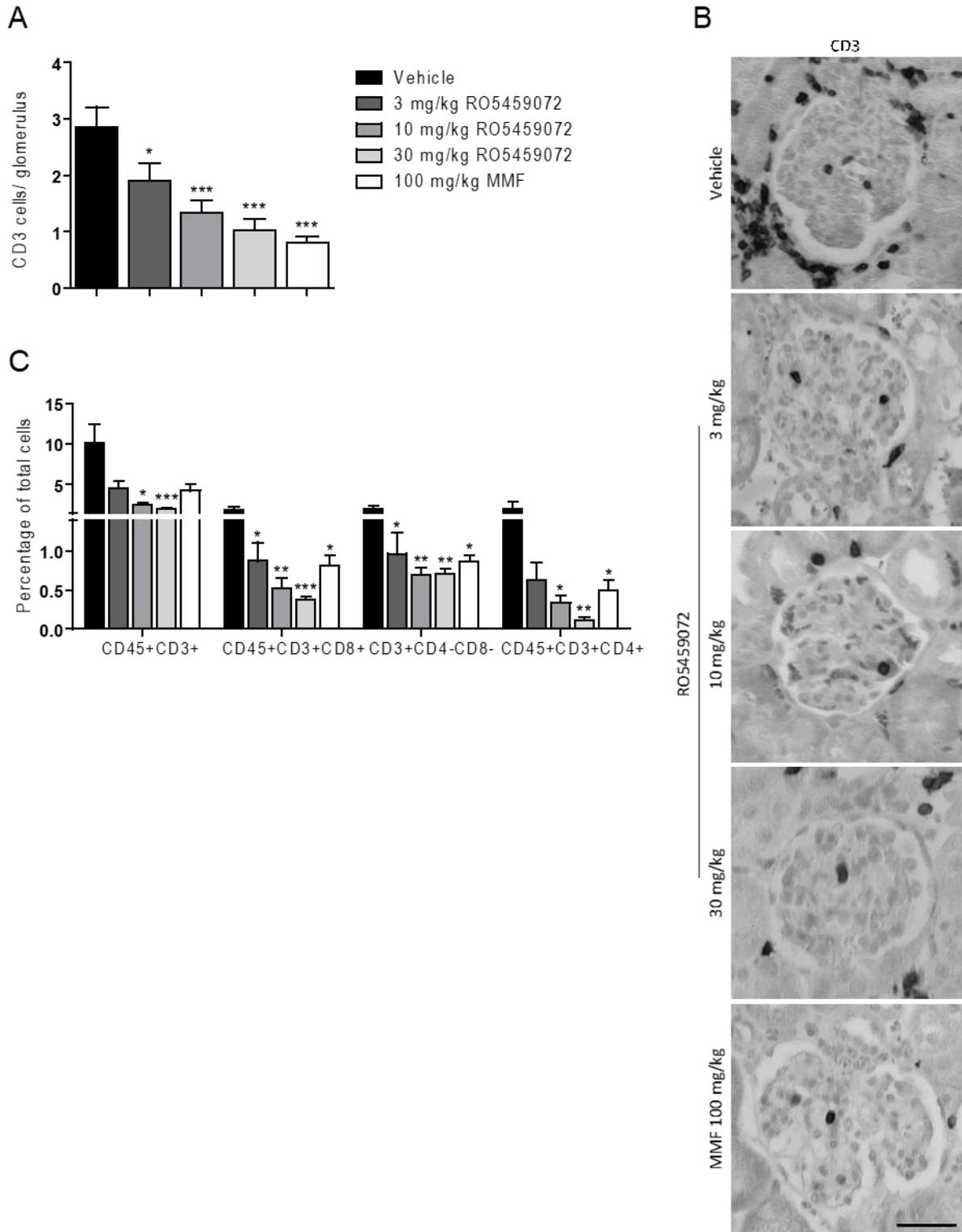
## Ergebnisse



### Abbildung 21: Intrarenale Entzündung: Phagozyten.

Von jedem Tier wurde eine ganze Niere zu einer Zellsuspension verarbeitet und mittels eines Durchflusszytometers wurde die Größe intrarenaler Immunzellpopulationen bestimmt. Es wurden Makrophagen (A), dendritische Zellen (B) und Phagozyten allgemein (C) untersucht. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n = 8 bis 10 Tiere pro Interventionsgruppe). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 versus Vehikel.

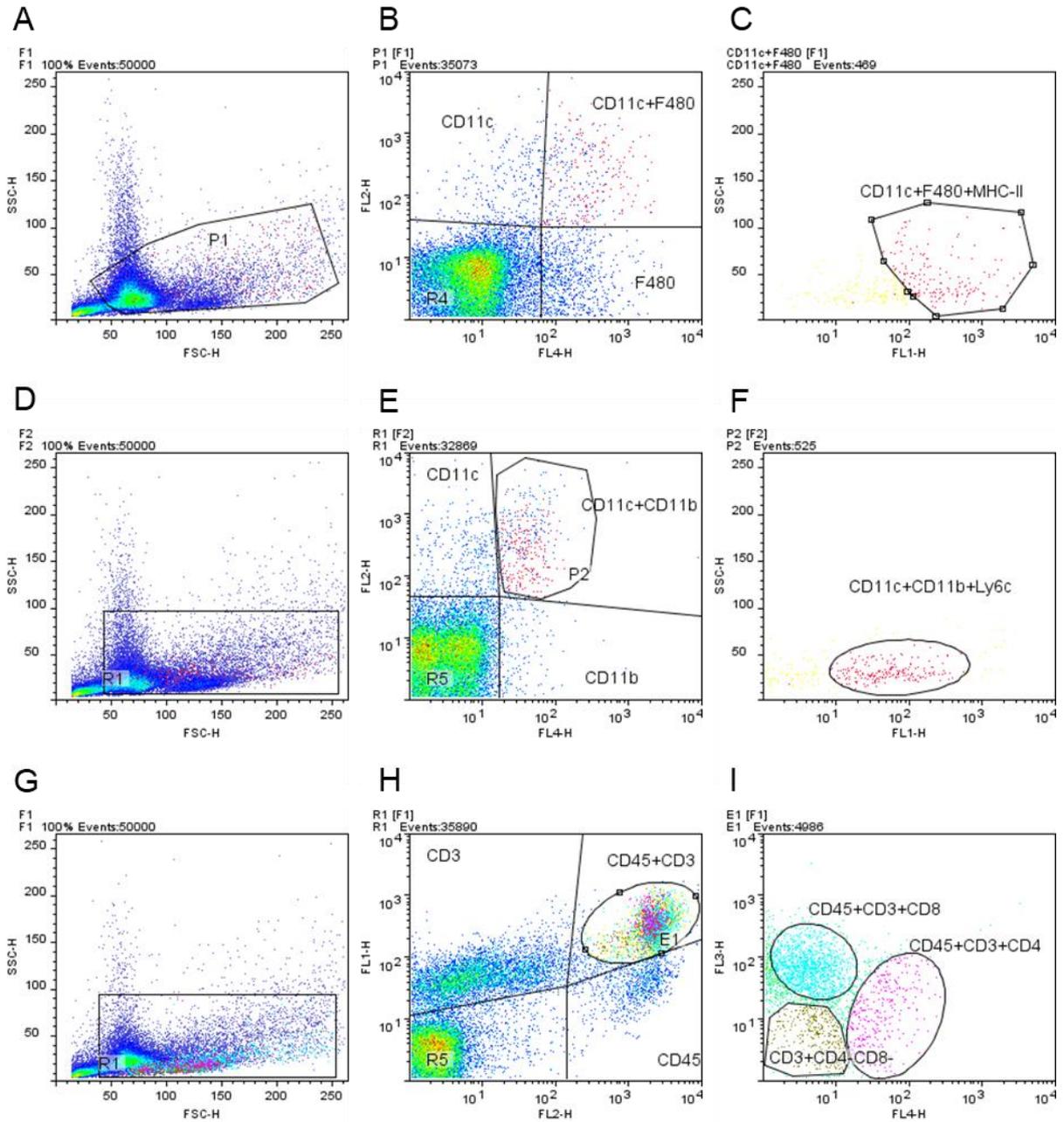
## Ergebnisse



### Abbildung 22: Intrarenale Entzündung: T-Zellen.

T-Zellen wurden in Gewebsschnitten der Niere mit einem Antikörper gegen CD3 immunhistochemisch angefärbt. Die Anzahl der CD3<sup>+</sup> Zellen pro Glomerulum wurden in Gewebsschnitten aller Tiere gezählt (A). Repräsentative Fotos sind in (B) aufgeführt (originale Vergrößerung von x 400, Maßstab 25 µm). Zusätzlich wurden T-Zellpopulationsgrößen mittels eines Durchflusszytometers in Zellsuspensionen aus Nieren aller Tiere gemessen (C). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt (n = 8 bis 10 Tiere pro Interventionsgruppe). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 versus Vehikel.

# Ergebnisse



**Abbildung 23: Durchflusszytometrische Gating-Strategien, Niere.**

Gating-Strategien für intrarenale Immunzellpopulationen. (A – C) Makrophagen, (D – F) dendritische Zellen, (G – I) T-Zellen.

### 3.2 Zirkulierendes Cathepsin S schädigt glomeruläre Endothelzellen

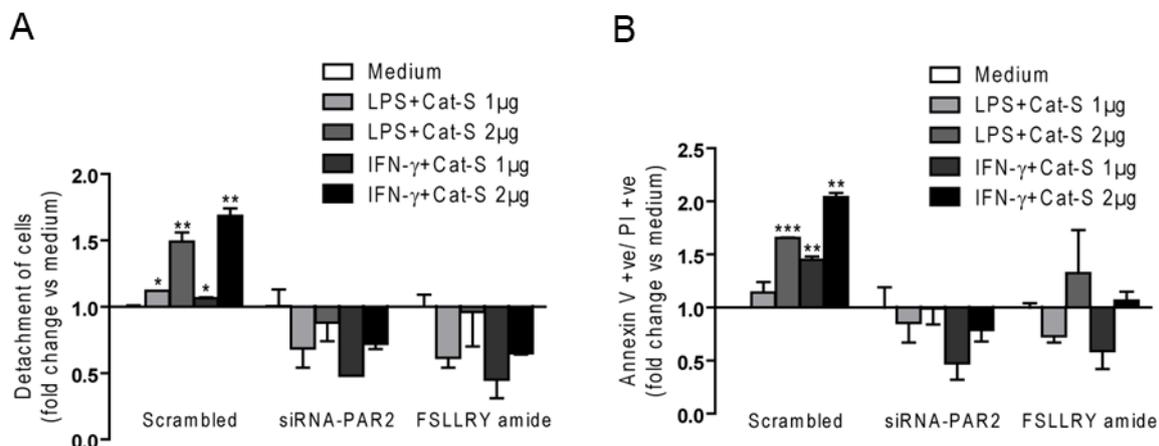
Die Hypothese war, dass die Inhibition von Cat S durch RO5459072 nicht nur über die Störung der intrazellulären Prozesse, die an der MHC II-vermittelten Antigenpräsentation in Antigen-präsentierenden Zellen beteiligt sind, therapeutisch auf die LN wirkt, sondern auch durch eine Blockade des extrazellulären Cat S und dessen Aktivierung von PAR2<sup>173,214,215</sup>. Um dies zu untersuchen, wurde erst getestet, ob extrazelluläres Cat S schädigend über PAR2 auf glomeruläre Endothelzellen in einem Lupus-Modell wirkt. Dafür wurden glomeruläre Endothelzellen kultiviert, deren PAR2 entweder mittels einer PAR2-spezifischen siRNA, oder mit dem PAR2 Antagonisten FSLLRY Amid blockiert wurde. Für eine Gruppe glomerulärer Endothelzellen wurde eine spezifische „*scrambled*“ siRNA verwendet, die nicht zu einer Blockade von PAR2 führte, und so als Negativkontrolle diente. Die glomerulären Endothelzellen wurden mit rekombinantem Cat S in zwei unterschiedlichen Konzentrationen in Kombination mit LPS oder mit IFN- $\gamma$  stimuliert. LPS ist ein TLR4-Agonist und verursacht eine starke Entzündungsreaktion<sup>239-241</sup>, weshalb die Stimulation mit LPS hier als Positivkontrolle diente. Die Stimulation mit IFN- $\gamma$ , das bei SLE sowohl beim Menschen, als auch im Tiermodell erhöht ist und auch an dem Pathomechanismus der Krankheit beteiligt ist<sup>242-245</sup>, stellte ein stark vereinfachtes SLE-Modell dar.

Intakte glomeruläre Endothelzellen haften fest an dem Boden der Kammern, auf denen sie kultiviert werden. Geschädigte glomeruläre Endothelzellen lösen sich von dem Boden der Kammer ab. Abgelöste Zellen wurden in dieser Arbeit im Überstand mittels eines automatischen Zellzählers gezählt, mit Annexin V/PI angefärbt und mit einem Durchflusszytometer analysiert. Annexin V bindet den normalerweise intrazellulär vorkommenden Zellmembranbaustein Phosphatidylserin. Dieses wird während des Zelltodes nach extrazellulär verlagert, wo es durch Annexin V angefärbt werden kann. PI färbt intrazelluläre Bestandteile an, die erst durch einen Verlust der Integrität der Zellmembran für den autofluoreszierenden Farbstoff erreichbar werden. Diese Technik wird demnach herangezogen, um nekrotische Zellen durchflusszytometrisch zu identifizieren<sup>229</sup>.

In der Negativkontrollgruppe führte die Stimulation mit Cat S in Kombination mit LPS oder IFN- $\gamma$  zu einem signifikanten Anstieg von abgelösten und nekrotischen Zellen. Zu beachten ist, dass durch die Erhöhung der Cat S-Konzentration bei gleichbleibender LPS- beziehungsweise IFN- $\gamma$ -Konzentration es zu einem deutlichen Anstieg der abgelösten und nekrotischen Zellen kam. In den Gruppen, deren PAR2 zuvor mittels

## Ergebnisse

spezifischer siRNA oder FSLRY Amid blockiert worden war, blieb dieser Anstieg vollständig aus (Abbildung 24).



**Abbildung 24: PAR2-Aktivierung durch Cat S schädigt Endothelzellen *in-vitro*.**

Protease-aktivierter Rezeptor(PAR)-2 wurde in murinen glomerulären Endothelzellen mittels PAR2 spezifischer siRNA oder dem PAR2 Antagonisten FSLRY Amid blockiert. Bei „scrambled“ siRNA handelt es sich um eine Kontroll-siRNA, die nicht zu einer Blockade von PAR2 führte. Die Zellen wurden zudem mit 1 oder 2 µg Cathepsin S (Cat S) in Kombination mit Lipopolisacchariden (LPS) oder Interferon-γ (IFN-γ) stimuliert. Nach 20 Stunden wurden vom Kammerboden abgelöste Zellen mit einem automatischen Zellzähler im Zellkulturüberstand gezählt (A). Mittels eines Durchflusszytometers konnten diese Zellen als Annexin V<sup>+</sup>/Propidiumiodid (PI)<sup>+</sup> nekrotische Zellen identifiziert werden (B). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 versus Medium.

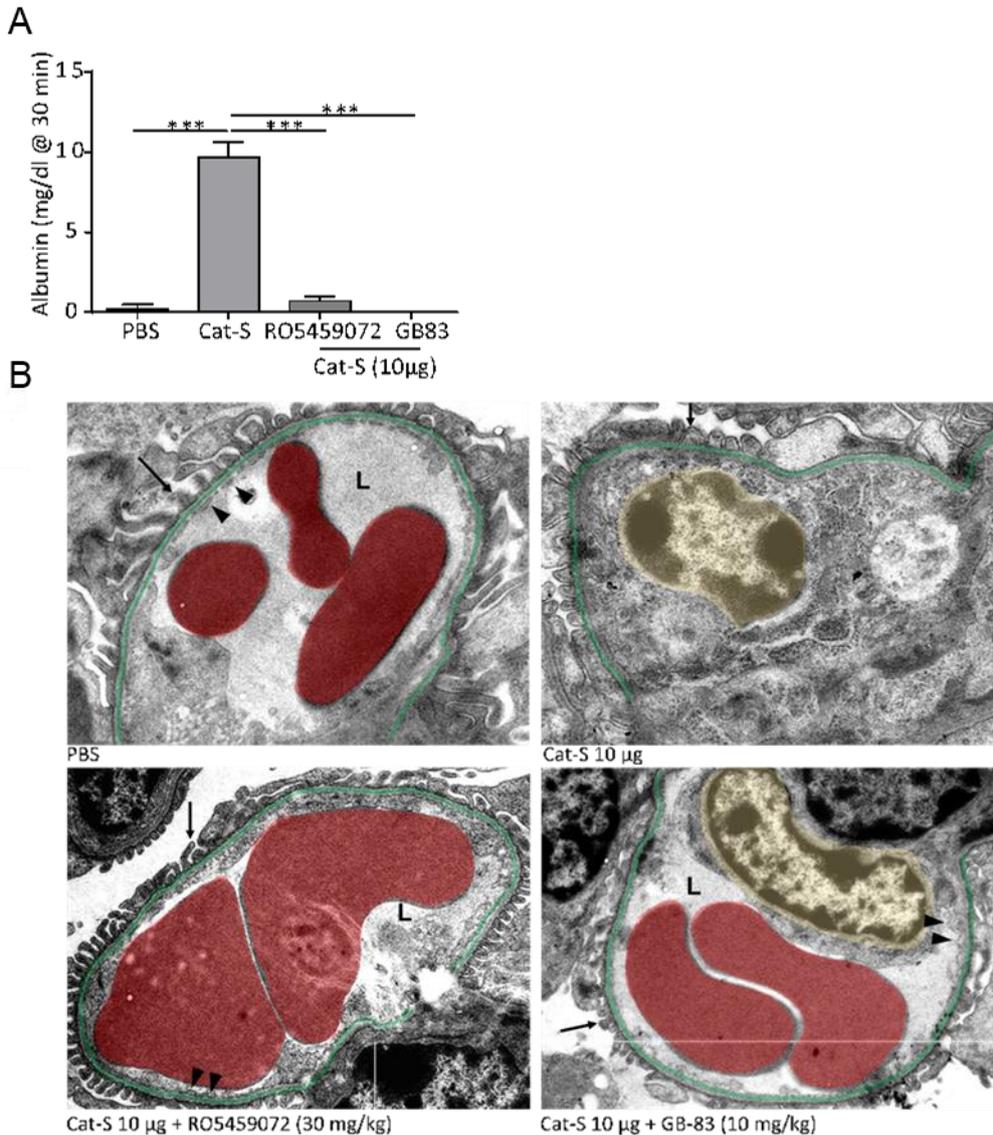
Als nächstes wurde getestet, ob die Ergebnisse des Zellkulturversuches auf ein *in-vivo*-SLE-Mausmodell übertragbar wären und ob der Cat S-Inhibitor RO5459072 einen unterdrückenden Effekt auf diese PAR2 vermittelte Endothelzellschädigung hätte. Hierfür wurden 8 Wochen alten MRL-(Fas)lpr-Mäuse rekombinantes Cat S injiziert. Mit 8 Wochen haben MRL-(Fas)lpr-Mäuse in der Regel noch keine Proteinurie entwickelt<sup>155</sup>. Nach der Injektion wurden über 24 Stunden Urinproben gesammelt. In den Urinproben wurde Albumin mittels ELISA bestimmt. Nach 24 Stunden wurden die Nieren aller Tiere entnommen und elektronenmikroskopisch untersucht. Zwei der drei Gruppen, die eine Cat S-Injektion erhalten hatten, waren zuvor entweder mit 30 mg/kg RO5459072 oder dem PAR2-Inhibitor GB83 vorbehandelt worden. Als Negativkontrolle diente eine Gruppe, die statt der Cat S-Injektion eine Injektion mit sterilem PBS bekommen hatte, um auszuschließen, dass mögliche Schäden nicht durch eine Reaktion auf die Injektion selbst verursacht wurden und um zu zeigen, dass die MRL-(Fas)lpr-Mäuse nicht vorher schon eine Proteinurie entwickelt hatten.

30 Minuten nach der Cat S-Injektion wiesen die Mäuse ohne zusätzliche Vorbehandlung eine signifikante Proteinurie auf (Abbildung 25A). Nach 24 Stunden war in dieser Gruppe eine diffuse Schwellung des Endothelzellzytoplasmas der glomerulären Kapillaren sichtbar, was zu einer partiellen Verlegung des Kapillar-

## Ergebnisse

Lumens führte. Außerdem verloren die Endothelzellen ihre typische Fenestrierung. Podozyten hingegen behielten ihre Ultrastruktur bei (Abbildung 25B).

In den mit RO5459072 oder GB83 vorbehandelten Gruppen, kam es weder zu einer signifikanten Proteinurie, noch zu ausgeprägten Endothelzellschäden.



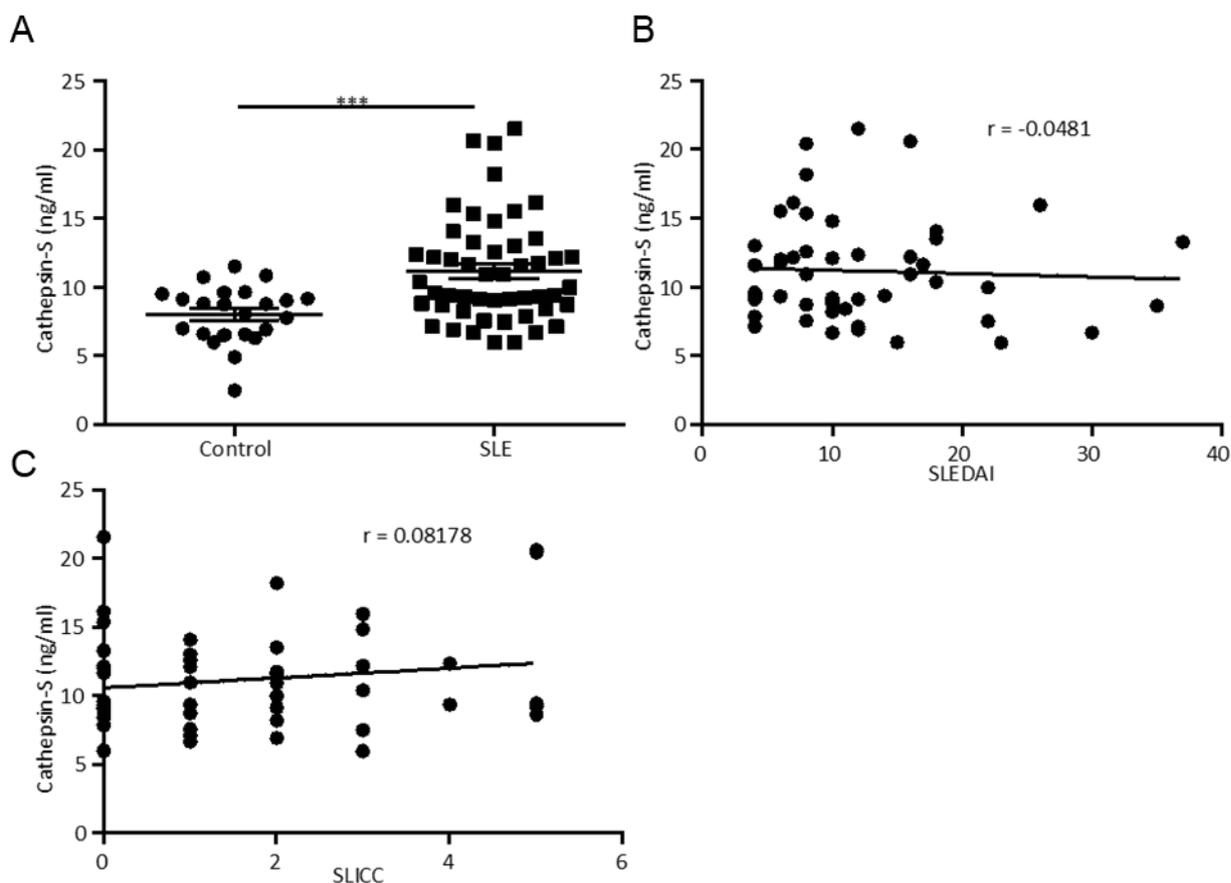
### Abbildung 25: Endothelzellschäden durch Cathepsin S in MRL-(FAS)lpr-Mäusen.

Nicht-nephritischen MRL-(Fas)lpr-Mäusen wurde Cathepsin S (Cat S) oder Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (*phosphate-buffered saline*; PBS) (Negativkontrolle) intravenös injiziert. Eine Gruppe erhielt nur die Cat S-Injektion, während zwei weitere Gruppen, denen Cat S injiziert wurde, mit 30 mg/kg RO5459072 oder mit dem Protease-aktivierter Rezeptor(PAR)-2-Inhibitor GB83 vorbehandelt worden waren. Albumin wurde mittels ELISA im Urin aller Mäuse gemessen (A). Nach 24 Stunden wurden die Nieren aller Versuchstiere entnommen und die Ultrastruktur der glomerulären Kapillaren wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Repräsentative Bilder sind in (B) aufgeführt. In den Gruppen PBS, Cat S + RO5459072 und Cat S + GB83 ist die Blut-Harnschanke bestehend aus Podozytenfortsätzen (Pfeil), dem fenestriertem Kapillarendothel (Pfeilspitze) und der gemeinsamen Basalmembran (grün) deutlich zu erkennen. In dem Lumen (L) der Kapillarschlinge befinden sich mehrere Erythrozyten (rot). Auf dem Foto der Cat S + GB83-Gruppe ist der Zellkern (gelb) der Endothelzelle von einem dünnen Zytoplasmasaum umgeben. Auf dem Foto der Cat S-Gruppe ist das Zytoplasma um den Zellkern diffus geschwollen. Das Lumen der Kapillarschlinge ist dadurch verlegt. Es lässt sich kein fenestriertes Endothel abgrenzen. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n = 3 pro Interventionsgruppe). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 versus Cat S-Gruppe.

### 3.3 Extrazelluläres Cathepsin S beim SLE des Menschen

Das Konzept, dass extrazelluläres Cat S an der vaskulären Schädigung beim SLE beteiligt ist, setzt voraus, dass Cat S-Blutplasmakonzentrationen bei SLE-Patienten erhöht sind. Deshalb wurden Cat S-Konzentrationen mittels ELISA in Blutplasmaproben von SLE-Patienten und von gesunden Probanden gemessen und miteinander verglichen. Charakteristika der Testpersonen sind in Tabelle 5 aufgelistet. Außerdem wurde für alle SLE-Patienten der Krankheitsaktivitäts-Index SLEDAI<sup>246,247</sup> und der SLICC-Schädigungs-Index<sup>248</sup> bestimmt.

Die Messungen ergaben, dass SLE-Patienten signifikant höhere Werte für Cat S im Blutplasma aufwiesen, als die gesunden Probanden. Die Höhe der Cat S-Werte korrelierte aber weder mit dem Aktivitäts-Index SLEDAI noch mit dem SLICC-Schädigungs-Index (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Erhöhte Cathepsin S-Blutplasmakonzentration bei SLE-Patienten.**

Cat S-Konzentrationen in Blutplasma von Patienten mit systemischen Lupus erythematodes (SLE) aus der Münchner Kohorte für aktive SLE-Patienten und von gesunden Probanden wurden mittels ELISA gemessen (A) und hinsichtlich einer Korrelation zwischen der Höhe der Cat S-Werte und der Höhe des Aktivitäts-Indexes SLEDAI (*SLE disease activity index*) (B) oder des SLICC (*Systemic Lupus International Collaborating Clinics*)-Schädigungs-Indexes (C) untersucht. Die Charakteristika der SLE-Patienten und der gesunden Probanden sind in Tabelle 5 aufgelistet. \*\*\*p < 0,001 versus gesunde Probanden.

## Ergebnisse

**Tabelle 5: Charakteristika der Probanden.**

	Gesunde Kontrollen, n = 23	SLE, n = 50
Weiblich, n (%)	12 (74)	41 (82)
Alter (Jahre)	42,3 ± 5,6	45,8 ± 1,8
SLEDAI-Score > 4, n (%)	-	50 (100)
SLICC-/ACR-Schädigungs-Index >1, n (%)	-	33 (66)
Leukopenie, n (%)	-	14 (28)
Thrombozytopenie, n (%)	-	14 (28)
Fatigue, n (%)	-	39 (78)
Arthralgie, n (%)	-	45 (90)
Jaccoud-Arthropathie, n (%)	-	20 (49)
Schmetterlingserythem, n (%)	-	34 (68)
Perikarditis, n (%)	-	13 (26)
Pleuritis, n (%)	-	14 (28)
Venenthrombose, n (%)	-	10 (20)
Lupusnephritis	-	24 (48)
ISN/RPS Klasse I, n (% aller Lupusnephritis-Patienten)	-	1 (4)
ISN/RPS Klasse II, n (% aller Lupusnephritis-Patienten)	-	4 (17)
ISN/RPS Klasse III, n (% aller Lupusnephritis-Patienten)	-	5 (21)
ISN/RPS Klasse IV, n (% aller Lupusnephritis-Patienten)	-	14 (58)
Chronische Niereninsuffizienz (CKD), n (%)	-	28 (56)
CKD 1, n (% aller CKD-Patienten)	-	19 (68)
CKD 2, n (% aller CKD-Patienten)	-	1 (4)
CKD 3, n (% aller CKD-Patienten)	-	5 (17)
CKD 4, n (% aller CKD-Patienten)	-	2 (7)
CKD 5, n (% aller CKD-Patienten)	-	1, (4)
Hämolytische Anämie, n (%)	-	10 (20)
Antinukleäre Antikörper, n (%)	-	47 (94)
Anti-dsDNA-IgG, n (%)	-	31 (62)

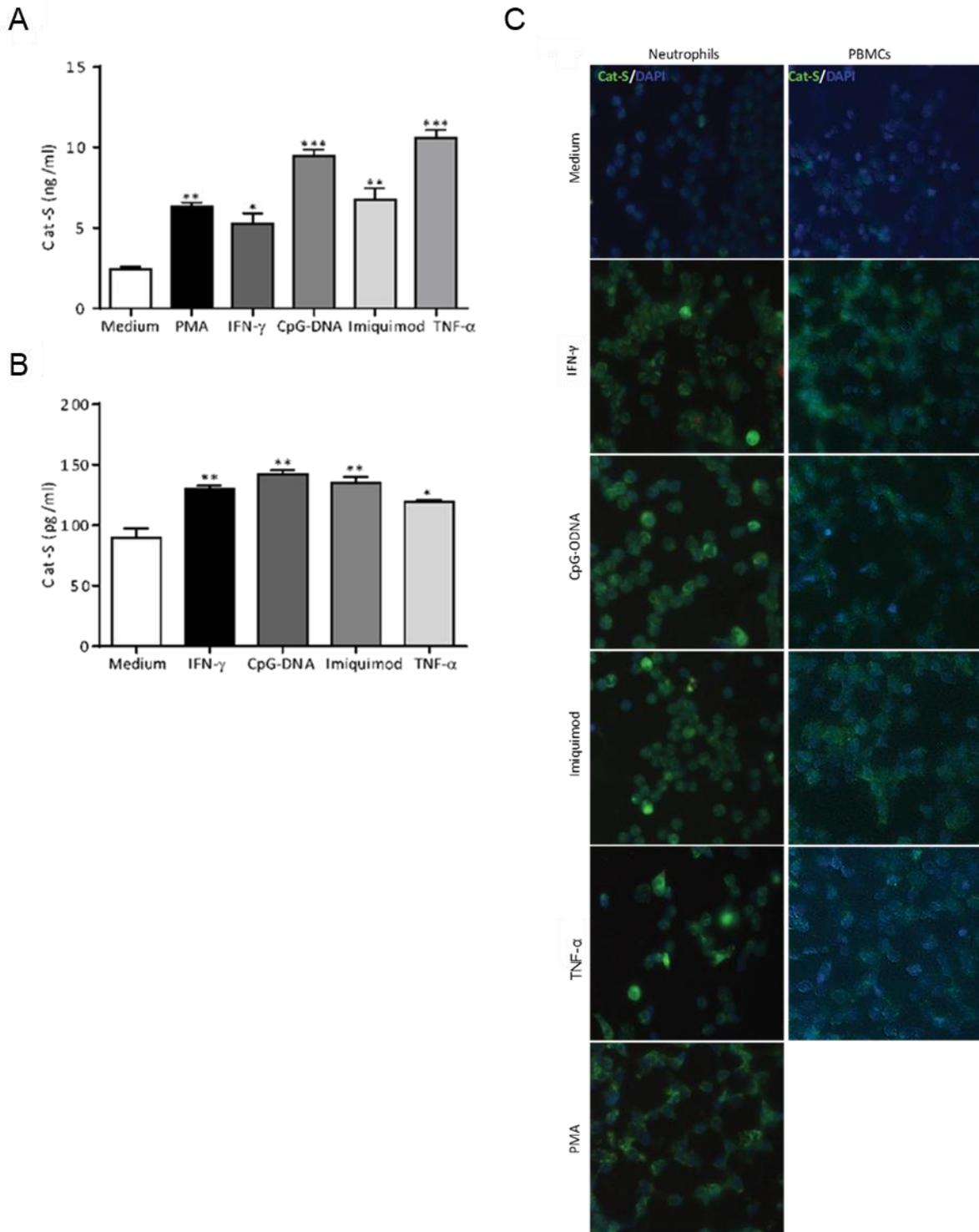
SLEDAI = *SLE disease activity index*, Score von 0 bis 105; SLICC/ACR = *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology*; ISN/RPS = *International Society of Nephrology/Renal Pathology Society*. Arbeitsgruppe zur Klassifikation der Glomerulonephritis beim SLE (2003)<sup>45</sup>; Klasse I = Minimale mesangiale Lupusnephritis; Klasse II = Mesangiale proliferative Lupusnephritis; Klasse III = Fokale Lupusnephritis; Klasse IV = Diffuse Lupusnephritis; Chronische Niereninsuffizienz (CKD) = chronische Nierenerkrankung mit einer glomerulären Filtrationsrate (GFR) < 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> und/oder erhöhten Markern für Nierenschaden über mindestens 3 Monate; Stadien der CKD anhand der GFR (ml/min/1,73 m<sup>2</sup>) nach internationalen Leitlinien<sup>249</sup>, CKD 1 = GFR ≥ 90, CKD 2 = GFR 60 – 89, CKD 3 = GFR 30 – 59, CKD 4 = GFR 15 – 29, CKD 5 = GFR < 15.

## Ergebnisse

Um die Frage zu adressieren, woher dieser Anstieg des extrazellulären Cat S bei SLE-Patienten kommt, wurden Cat S-Konzentrationen mittels ELISA in Zellkulturüberständen von stimulierten neutrophilen Granulozyten und PBMCs gemessen. Zusätzlich wurden in einem weiteren Experiment neutrophile Granulozyten und PBMCs nach der Stimulation fixiert und mit DAPI und einem fluoreszenzgekoppeltem anti-Cat S-Antikörper gefärbt. Es wird davon ausgegangen, dass neutrophile Granulozyten, vor allem aufgrund ihrer Fähigkeit NETs zu bilden, eine bedeutende Rolle im Pathomechanismus des SLEs spielen<sup>250</sup>. Die Stimulation der neutrophilen Granulozyten und PBMCs erfolgte jeweils mit IFN- $\gamma$ , CpG-DNA, Imiquimod, TNF- $\alpha$ , und PMA (nur neutrophile Granulozyten). Es ist bekannt, dass PMA neutrophile Granulozyten zur Ausbildung von NETs anregt<sup>251</sup>. Die mit PMA stimulierten neutrophilen Granulozyten dienten demnach als Positivkontrolle, während die unstimulierte Medium-Gruppe, die Negativkontrolle darstellte. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TLR7 und TLR9 einen entscheidenden Einfluss auf den Pathomechanismus der LN haben<sup>242-245,252-258</sup>. TLR7 und TLR9 wurden in dieser Arbeit durch die Liganden Imiquimod und CpG-DNA aktiviert. Die Stimulation mit diesen Molekülen hatte demnach in dieser Arbeit die Funktion, den Pathomechanismus der LN auf eine stark vereinfachte Art zu simulieren.

In den Zellkulturüberständen sowohl von neutrophilen Granulozyten als auch von PBMCs waren nach der Stimulation in allen Gruppen signifikant höhere Cat S-Konzentrationen messbar. Auch in der Fluoreszenzmikroskopie wurde durch die Stimulation der Zellen eine deutliche Induktion von Cat S sichtbar (Abbildung 27).

## Ergebnisse



### Abbildung 27: Neutrophile Granulozyten und mononukleäre Zellen schütten Cathepsin S aus.

Neutrophile Granulozyten (A) und mononukleäre Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*; PBMCs) (B) wurden aus menschlichem Blut gesunder Spender isoliert und mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), dem Toll-Like-Rezeptor 9-Liganden Cytosinphosphatidylguanin (CpG)-DNA, dem Toll-Like-Rezeptor 7-Liganden Imiquimod und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) stimuliert. Anschließend wurde die Cathepsin (Cat) S-Konzentration in den Zellkulturüberständen mittels ELISA gemessen. Außerdem wurden zu fixierten neutrophilen Granulozyten (C links) und PBMCs (C rechts), die zuvor wie in (A) und (B) stimuliert worden waren, ein FITC-gekoppeltem Antikörper gegen Cat S (grünes Signal) und DAPI (blaues Signal), das Zellkerne anfärbt, gegeben. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  versus Medium.

### 4 Diskussion

Unsere Hypothese bestand aus drei Teilen, nämlich, dass die pharmakologische Inhibition von Cat S mit dem spezifischen Cat S-Inhibitor RO5459072 beim SLE a) die systemische Autoimmunität supprimiert und so vor SLE-typischen Organschäden schützt, dass sie b) über einen zweiten Mechanismus zusätzlich einen Schutz des peripheren Gewebes vor vaskulären Schäden bietet und, dass sie c) eine Therapieoption darstellt, die zur Standardtherapie mit MMF mindestens gleichwertig ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen alle drei Annahmen im Mausmodell. Durch die Cat S-Inhibition kam es zu einer deutlichen Suppression der Marker systemischer Autoimmunität, insbesondere der anti-dsDNA-IgG-Antikörper. Der Effekt, den RO5459072 auf Serummarker zeigte, spiegelte sich auch in einem verbesserten Erhalt der Morphologie und der Funktion der Niere wider. In Bezug auf den vaskuloprotektiven Effekt der Cat S-Inhibition (Annahme b) konnten wir sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* zeigen, dass extrazelluläres Cat S glomeruläre Endothelzellen schädigt und, dass diese Schädigung durch RO5459072 verhindert werden kann. Als Source des extrazellulären Cat S identifizierten wir PBMCs und neutrophile Granulozyten. Außerdem konnten wir feststellen, dass bei SLE-Patienten Cat S-Plasmakonzentrationen höher sind, als bei gesunden Testpersonen. Um Punkt c) zu beantworten, wurde RO5459072 nicht nur gegen Vehikel, sondern auch gegen MMF getestet. In keiner Auswertung wurden unter der Hochdosis-Cat S-Inhibitor-Therapie signifikant schlechtere Ergebnisse erzielt, als unter MMF-Therapie. In einigen Aspekten schnitt RO5459072 sogar besser ab als MMF. Im Folgenden werden diese Punkte nun unter Berücksichtigung der aktuellen Studienlage im Detail diskutiert.

#### 4.1 Cathepsin S-Inhibition schützt vor Autoimmunität und ihren Folgen

Unsere Arbeit schließt sich einer Reihe von Arbeiten an, in denen Cat S-Inhibitoren mit therapeutischer Zielsetzung in Tiermodellen für autoimmune Syndrome getestet wurden<sup>175-179</sup>. Ganz überwiegend zeigen Arbeiten zu diesem Thema, dass die Cat S-Inhibition zu einer abgeschwächten systemischen Immunreaktion mit niedrigen Serum-Konzentrationen an Antikörpern und proinflammatorischen Zytokinen, sowie einer gedämpften T-Zell-Immunantwort führte. Auch konnten weniger Organläsionen und eine verbesserte Organfunktion in diesen Arbeiten sowie in unserer Arbeit beobachtet werden<sup>175-179</sup>.

## Diskussion

Im experimentellen Sjögren-Syndrom zum Beispiel hatten Mäuse, die eine dreiwöchige Cat S-Inhibitor-Therapie erhalten hatten, weniger autoimmune Läsionen in den *Glandulae lacrimalis, parotis* und *submandibularis*. Außerdem waren Tränen- und Speichelvolumina der behandelten Tiere größer, als die der unbehandelten Tiere, was verdeutlicht, dass die Cat S-Inhibitor-Therapie auch zu einem Funktionserhalt der Drüsen beigetragen hatte<sup>176</sup>. In einer anderen Arbeit zur experimentellen autoimmunen Myasthenia gravis wiesen Cat S<sup>-/-</sup>-Mäuse nach Induktion des Krankheitsmodells signifikant mehr funktionale Acetylcholin-Rezeptoren auf, als Wildtyp-Kontrollmäuse<sup>177</sup>. In einer weiteren Studie, in der Cat S-Inhibition in einem Mausmodell der Ovalbumin-induzierten allergischen pulmonalen Entzündung getestet wurde, kam es durch die Therapie zu deutlich weniger perivaskulärem entzündlichen Infiltrat in der Lunge<sup>175</sup> und in einem Modell der Kollagen-induzierten Arthritis bewirkte eine Hochdosis-Cat S-Inhibitor-Therapie einen verbesserten Erhalt der Knochenstruktur<sup>178</sup>. In der Arbeit von Rupanagudi *et al.*, in der ebenfalls MRL-(Fas)lpr-Mäuse als Modell für einen SLE verwendet wurden, wurden wie in der vorliegenden Arbeit, nach abgeschlossener Cat S-Inhibitor-Therapie in der histologischen Auswertung der Niere signifikant niedrigere Aktivitäts- und Chronizitäts-Indizes und weniger C3c-Ablagerungen verglichen mit unbehandelten Kontrollmäusen beobachtet. In der Arbeit von Rupanagudi *et al.* stabilisierte sich zudem die Nierenfunktion über den Verlauf der Therapie mit RO5461111<sup>179</sup>. In unserer Arbeit stabilisierte sich die Nierenfunktion nicht nur, der Albumin-Kreatinin-Quotient sank unter der Hochdosis-Cat S-Inhibitor-Therapie signifikant unter den Ausgangswert, der bei Therapiestart gemessen wurde. Dies deutet darauf hin, dass die Therapie mit RO5459072 nicht nur ein Voranschreiten des Nierenfunktionsverlustes verhindert, sondern auch, wenn sie frühzeitig begonnen wird, zu einer Umkehr des Gewebsschadens führt. Um dies weiter zu verifizieren testete unsere Arbeitsgruppe den therapeutischen Effekt von RO5459072 bei MRL-(Fas)lpr-Mäusen, die bereits an einer fortgeschrittenen LN litten. In dieser Arbeit gaben wir 15 Wochen alten, und damit schwer kranken MRL-(Fas)lpr-Mäusen über 4 Wochen 30 mg/kg RO5459072. Die Therapie zeigte ein gutes Ansprechen auf Antikörpertiter und die Nierenfunktion stabilisierte sich. Verglichen mit dem Ausgangswert verbesserte sie sich aber nicht. In der histologischen Auswertung kam es nur zu einer Reduktion der morphologischen Zeichen der Krankheitsaktivität, nicht aber der chronischen Nierenschäden<sup>259</sup>. Damit gilt für die Therapie der LN mit RO5459072, was generell für die Therapie einer chronischen Nierenerkrankung gilt,

## Diskussion

ob autoimmuner oder nicht-autoimmuner Genese: Je früher mit der Therapie begonnen wird, desto besser<sup>260</sup>. Rupanagudi *et al.* hatten zusätzlich zu der Niere auch die Lunge auf SLE-typische Läsionen untersucht. Auch hier fanden sie, dass Mäuse, die den Cat S-Inhibitor erhalten hatten, weniger Läsionen aufwiesen, als die unbehandelten Kontrolltiere<sup>179</sup>. Das einzige Mausmodell, in dem die Cat S-Inhibitor-Therapie langfristig zu keiner Verbesserung führte, war ein Mausmodell für Multiple Sklerose. Hier wurde zwar anfangs eine Verzögerung des Krankheitsprogresses beobachtet, doch war dieser Effekt nach 3 Wochen Cat S-Inhibitor-Therapie nicht mehr nachweisbar. Die Autoren vermuteten, dass dies daran lag, dass neben CD4<sup>+</sup> T-Zellen in diesem Mausmodell auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die Pathologie verantwortlich sind. Aufgrund der Rolle, die Cat S speziell in der MHC II-vermittelten Antigenpräsentation spielt, werden CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht durch eine Cat S-Inhibition beeinflusst, was in diesem Fall wahrscheinlich dazu geführt hat, dass die Krankheit weiter voran schreiten konnte<sup>178</sup>.

Auch wenn die oben genannten Arbeiten in ihrer Kernaussage sehr einheitlich sind, gibt es doch erhebliche Unterschiede zwischen ihnen. Diese bestehen vor allem in einer sehr unterschiedlichen Wirkung, die die Cat S-Inhibition auf einzelne Antikörperklassen in den verschiedenen Tiermodellen zeigte. In unserer Arbeit und in der Arbeit von Rupanagudi *et al.* wurden durch die Cat S-Inhibition sehr spezifisch nur IgG-Antikörper gesenkt. Im Detail waren dies gesamt-IgG-, IgG1-, IgG2a- und anti-dsDNA-IgG-Antikörper. Unverändert blieb in unserer Arbeit die Serumkonzentration von IgG2b-Antikörpern. In der Arbeit von Rupanagudi *et al.* wurde zwar nach 4 Wochen Therapie eine signifikante Reduktion der IgG2b-Antikörperkonzentrationen beobachtet, doch war dieser Effekt nach 8 Wochen Therapie aufgehoben. Verglichen mit anderen Antikörperklassen war der Effekt auf IgG2b-Antikörper also auch hier eher schwach. Serumkonzentrationen von IgG3-Antikörpern wurden in unserer Arbeit nicht gemessen, doch wurde in der Arbeit von Rupanagudi *et al.* keine Suppression dieser Antikörper beobachtet. Besonders hervorzuheben ist, dass in keiner der beiden Arbeiten Antikörper der Klasse IgM, die für eine frühe Immunabwehr essenziell sind, supprimiert wurden<sup>179</sup>. Im Gegensatz dazu wiesen Cat S<sup>-/-</sup>-Mäuse mit experimenteller autoimmuner Myasthenia gravis deutlich niedrigere Antikörperkonzentrationen der Klassen IgG1, IgG2b, IgG2c und IgM auf<sup>177</sup>. Riese *et al.* hatten in Ovalbumin-induzierten entzündlichen Mausmodellen ebenfalls zusätzlich zu einer Suppression der IgG- auch eine Suppression der IgM- und der IgE-Antikörperkonzentrationen

## Diskussion

gemessen<sup>175</sup>. Bei experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis wurden durch die Cat S-Inhibitor-Therapie selektiv nur IgG2a-Antikörper supprimiert, während IgG1-Antikörperkonzentrationen unbeeinflusst blieben<sup>178</sup> und bei der Kollagen-induzierten Arthritis hatte die Cat S-Inhibition überhaupt keine Wirkung auf Antikörper-Serumkonzentrationen. Gemessen wurden hier gesamt-IgG-, IgG1 und IgG2a-Antikörperkonzentrationen<sup>178</sup>.

Die große Übereinstimmung zwischen unserer Arbeit und der von Rupanagudi *et al.* auf der einen Seite und die deutlichen Unterschiede zu den anderen Arbeiten auf der anderen Seite, lassen vermuten, dass das jeweilige autoimmune Syndrom eine große Rolle dabei spielt, welche Antikörperklassen supprimiert werden. Eine Parallele zwischen unserer Arbeit und den oben genannten Arbeiten lässt sich jedoch auch in diesem Bereich ziehen. Überwiegend zeigen die Ergebnisse der Arbeiten nämlich, dass durch Cat S-Inhibition/-Defizienz sehr selektiv nur einzelne Antikörperklassen supprimiert werden. Eine Ursache für diese Selektivität ist vermutlich eine unter Cat S-Inhibition/-Defizienz mehrfach beobachtete Störung der strukturellen Organisation der Keimzentren in lymphatisches Gewebe und ein dadurch beeinträchtigter Antikörperklassenwechsel<sup>174,178,179</sup>. Shi *et al.* untersuchten, ob es bei Cat S<sup>-/-</sup>- und Cat S<sup>+/+</sup>-Mäusen Unterschiede zwischen den Antikörperprofilen gibt, die im Zuge einer Immunantwort nach Immunisierung mit verschiedenen Antigenen entstehen. In dieser Arbeit wurden deutliche Einschränkungen in der Bildung von IgG-Antikörpern, insbesondere der Unterklassen IgG1, IgG2a und IgG3 bei Cat S<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtet, während der Anstieg von IgM-Antikörperkonzentrationen durch die Cat S-Defizienz unbeeinträchtigt blieb. Auch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen IgE-Antikörperkonzentrationen bei Cat S<sup>-/-</sup>- und Cat S<sup>+/+</sup>-Mäusen in einem Ovalbumin-induzierten Modell der allergischen pulmonalen Entzündung festgestellt werden. Demnach haben Cat S<sup>-/-</sup>-Mäuse die Fähigkeit dazu, IgE-Antikörper, die erst spät bei einer humoralen Immunantwort durch einen Antikörperklassenwechsel entstehen, zu produzieren. Dies bedeutet, dass der Antikörperklassenwechsel bei diesen Mäusen zwar beeinträchtigt sein kann, er aber nicht generell gestört ist. Die Diskrepanz zwischen ihren Ergebnissen und den Ergebnissen von Riese *et al.*, die, wie oben bereits beschrieben, in dem gleichen Mausmodell der allergischen pulmonalen Entzündung eine signifikante Reduktion der IgE-Antikörperkonzentrationen gemessen hatten, erklärten sich Shi *et al.* damit, dass wahrscheinlich bei Cat S<sup>-/-</sup>-Mäusen die Funktion von Cat S zum Teil durch Cathepsin L in Antigen-präsentierenden Zellen der

## Diskussion

Lunge übernommen werden kann. Dies hatte ihrer Meinung nach dazu geführt, dass in ihren Versuchen die IgE-Antikörperkonzentrationen ungehindert ansteigen konnten. Der Cat S-Inhibitor LHVS, der in der Arbeit von Riese *et al.* verwendet wurde, ist zwar ziemlich spezifisch für Cat S, doch inhibiert er zu einem gewissen Teil auch Cathepsin L. Deshalb konnte hier die Funktion von Cat S nicht von Cathepsin L übernommen werden und folglich stiegen IgE-Antikörperkonzentration im Serum nicht an<sup>174</sup>.

Dass in unserer Arbeit sowie in der Arbeit von Rupanagudi *et al.* kein Effekt der Cat S-Inhibitor-Therapie auf IgM-Antikörperkonzentrationen beobachtet wurde, könnte zusätzlich damit in Zusammenhang stehen, dass ein Teil der IgM-Antikörper als natürliche Antikörper vorkommen. Diese Antikörper werden wahrscheinlich nicht durch eine Cat S-Blockade beeinflusst, da ihre Bildung unabhängig von einer vorangegangenen Antigenpräsentation ist<sup>261</sup>.

Warum ist diese Selektivität, die die Cat S-Inhibitor-Therapie auf Antikörperklassen zeigt, relevant? Boes *et al.* fanden, dass in einem Sepsis-Mausmodell innerhalb der ersten 32 Stunden Mäuse mit einer IgM-Defizienz zu 70% starben, während über den gleichen Zeitraum nur 20% der Kontrollmäuse ohne IgM-Defizienz starben<sup>140</sup>. Wir glauben deshalb, dass, obwohl eine Therapie des SLEs mit einem Cat S-Inhibitor zu einer eingeschränkten Immunabwehr mit deutlich supprimierten IgG-Antikörperkonzentration führt, ein gewisser Schutz vor Infektionen unter Therapie durch die nicht-supprimierten IgM-Antikörper erhalten bleibt.

Man geht davon aus, dass die Beobachtungen in den oben genannten Arbeiten auf einer durch Cat S-Inhibition verursachten Störung der MHC II-vermittelten Antigenpräsentation beruhen<sup>175-179</sup>. Villadangos *et al.* stellten jedoch *in-vitro* fest, dass das Ausmaß mit dem eine Cat S-Blockade die MHC II-Antigenpräsentation beeinträchtigt, vom jeweiligen MHC-Haplotyp abhängt. Die Versuche wurden in Splenozyten von Mäusen mit den H-2 Haplotypen b, d, k, s und u durchgeführt. In diesen Zellen wurde gemessen, wie stark die Bildung von SDS-stabilen Komplexen durch eine Cat S-Inhibition mit LHVS gestört wird. SDS-stabile Komplexe stellen MHC II-Komplexe dar, die mit einem Peptid beladen sind. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten, dass eine Cat S-Inhibition in Zellen mit dem MHC-Haplotyp k oder s kaum einen Einfluss auf die Anzahl der gebildeten SDS-stabilen Komplexe hatte. Im Gegensatz dazu wurde bei den anderen Haplotypen eine deutliche Reduktion der

## Diskussion

SDS-stabilen Komplexe unter Cat S-Inhibition gemessen. Dabei war der Effekt bei H-2<sup>b/d</sup>-Splenozyten ausgeprägter als bei H-2<sup>u</sup>-Splenozyten.

Die Autoren vermuteten, dass diese Unterschiede am ehesten dadurch zu erklären sind, dass in H-2<sup>k/s</sup>-Splenozyten aus einem MHC II-lip10-Komplex eventuell direkt ein MHC II-Peptid-Komplex gebildet werden kann, ohne dass lip10 vorher zu CLIP, welches anschließend von H2-M entfernt werden kann, degradiert werden muss. Dem zugrunde könnte ihrer Meinung nach zum Beispiel eine niedrigere Affinität von lip10 zu MHC II des Haplotyps I-A<sup>k</sup> oder I-A<sup>s</sup> sein, so dass lip10 spontan von der MHC II-Peptid-Bindungsgrube dissoziiert und diese für das antigene Peptid frei gibt<sup>187</sup>.

In den meisten oben beschriebenen Arbeiten wurden entweder Mäuse mit einem genetischen C57BL/6-Hintergrund oder NFS/sld-Mäuse verwendet<sup>175-178</sup>, die den MHC II-Haplotyp I-A<sup>b</sup> oder I-A<sup>q</sup> haben<sup>262</sup>. Hier gibt es also keinen Widerspruch zwischen der Annahme, dass der therapeutische Effekt der Cat S-Inhibition/-Defizienz durch eine gestörte MHC II-vermittelte Antigenpräsentation zustande kommt, und den Ergebnissen von Villadangos *et al.*

MRL-(Fas)lpr-Mäuse jedoch haben den Haplotyp H-2<sup>k156</sup>. Dies würde bedeuten, dass eine Cat S-Inhibitor-Therapie in diesen Mäusen eigentlich gar keine Wirkung zeigen dürfte. Doch sowohl wir als auch Rupanagudi *et al.* hatten reproduzierbar einen starken therapeutischen Effekt der Cat S-Inhibition bei MRL-(Fas)lpr-Mäusen festgestellt. Außerdem konnten wir in der vorliegenden Arbeit eine klare dosisabhängige Wirkung der Cat S-Inhibitor-Therapie beobachten. Dies unterstützt zusätzlich die Annahme, dass Cat S eine spezifische Rolle im Pathomechanismus des SLEs in MRL-(Fas)lpr-Mäusen spielt, welche gezielt durch eine Cat S-Inhibition beeinträchtigt werden kann.

Wie also kann man diesen Effekt in MRL-(Fas)lpr-Mäusen erklären? Mit Gewissheit können wir diese Frage zum aktuellen Zeitpunkt nicht beantworten. Es gibt mehrere Aspekte unserer Ergebnisse und derer von Rupanagudi *et al.*, die sich am ehesten mit einer gestörten MHC II-vermittelten Antigenpräsentation als zugrunde liegenden Mechanismus erklären lassen.

Vor allem wäre hier zu nennen, dass es in der Arbeit von Rupanagudi *et al.* unter der Therapie mit RO5461111 zu einer spezifischen Unterdrückung der Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, bei unbeeinträchtiger Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen kam. Und auch der oben beschriebene Effekt auf die einzelnen Antikörperklassen und die

## Diskussion

Suppression der Immunzellpopulationen in der Milz lassen sich am besten über diesen Wirkmechanismus erklären.

Rupanagudi *et al.* hatten festgestellt, dass es unter Therapie mit RO5461111 zu einer deutlichen Anreicherung von lip10 in Milzgewebe der MRL-(Fas)lpr-Mäuse kam. Die Messung einer Akkumulation des Cat S-Substrates lip10 in murinen Splenozyten ist eine allgemein verwendete Methode um eine durch Cat S-Blockade oder -Defizienz beeinträchtigte MHC II-Antigenpräsentation nachzuweisen<sup>174,178</sup>. Eine Akkumulation von lip10 ist jedoch durchaus mit den Ergebnissen von Villadangos *et al.* vereinbar, denn sie bedeutet lediglich, dass Cat S blockiert ist und lip10 nicht zu CLIP abgebaut wird. Sie sagt jedoch nichts darüber aus, wie viele MHC II-Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Im Gegenteil, man hat herausgefunden, dass die Menge an akkumuliertem lip10 nur schwach mit der Menge an auf der Zelloberfläche exprimierten MHC II korreliert<sup>182</sup>.

Nochmals hervorzuheben ist jedoch, dass es sich bei den Versuchen von Villadangos *et al.* um *in-vitro* Versuch handelt. Es kann sein, dass obwohl *in-vitro* kein Effekt messbar war, es in einem komplexen *in-vivo*-System, wie der MRL-(Fas)lpr-Maus, dennoch zu einer signifikanten Wirkung kommt. Beim Menschen konnten bis jetzt keine HLA-Haplotyp-abhängigen Unterschiede zwischen einzelnen Probanden in Bezug auf das Ansprechen von RO5459072 beobachtet werden. Da aber die Zahl der untersuchten Probanden sehr gering war, können aus diesen ersten Analysen noch keine endgültigen Schlüsse diesbezüglich gezogen werden<sup>182</sup>.

Demnach bleibt es umstritten, ob die *in-vivo* reproduzierbar gemessene Reduktion der systemischen Marker für Autoimmunität in MRL-(Fas)lpr-Mäusen unter Cat S-Inhibition auf eine gestörte MHC II-Antigenpräsentation zurückzuführen ist, oder ob hierfür doch ein anderer, noch unbekannter Mechanismus verantwortlich ist. Dennoch scheint uns dieser Mechanismus zum aktuellen Zeitpunkt am wahrscheinlichsten. Für die Verbesserungen des SLEs auf Organebene, konnten wir in der vorliegenden Arbeit noch einen zweiten Mechanismus identifizieren, auf dem im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird.

#### 4.2 Cathepsin S-Inhibition schützt vor Endothelschäden beim SLE

In einer früheren Arbeit konnten wir zeigen, dass beim Diabetes mellitus extrazelluläres Cat S über eine Aktivierung von PAR2 glomeruläre Endothelzellen schädigt und, dass eine pharmakologische Cat S-Inhibition diese Endothelschädigung verhindert<sup>215</sup>. Wir sind die ersten, die dies nun auch für den experimentellen SLE berichten.

Überwiegend wird die Cat S-vermittelte PAR2-Aktivierung mit neuropathischer und viszeraler Nozizeption in Verbindung gebracht. So wurde in einer Arbeit beobachtet, dass Cat S im Lumen des Colons bei einer Colitis im Mausmodell zu einer Verstärkung der Darmmotilität und -dehnung sowie zu einer Hyperexzitabilität der Nozizeptoren führte<sup>263</sup>. In weiteren Arbeiten wurde gezeigt, dass die Injektion von Cat S in die Pfote eines Nagetiers lokal zu einer Entzündung und Hyperalgesie führt<sup>199,214</sup>. Zudem unterdrückte eine Prämedikation mit einem Cat S-Inhibitor in einem Mausmodell eine Formalin-induzierte PAR2-vermittelte Hyperalgesie und die Ausbildung eines lokalen Ödems. Das zeigt, dass für die Nozizeption nicht nur exogen zugeführtes, sondern auch endogenes Cat S von Bedeutung ist<sup>214</sup>.

In einigen Arbeiten wurde zudem untersucht, an welcher Stelle Cat S PAR2 spaltet und welche Signalkaskade anschließend durch Cat S in Gang gesetzt wird<sup>173,214</sup>. Weder in unserer Arbeit noch in der Arbeit von Kumar *et al.* führten wir Versuche zu diesem Thema durch. Wir können daher keine Aussage darüber treffen, über welche Signalkaskade eine Cat S-vermittelte PAR2-Aktivierung in Endothelzellen zu einer Zellschädigung führt. Zhao *et al.* fanden heraus, dass es sich bei Cat S um einen sogenannten *biased* Agonisten von PAR2 handelt, und, dass sich die intrazellulären Abläufe, die durch die Cat S-vermittelte PAR2-Aktivierung getriggert werden, maßgeblich von denen unterscheiden, die durch eine Trypsin-vermittelte PAR2-Aktivierung ablaufen. So beobachteten Zhao *et al.*, dass die Aktivierung von PAR2 durch Cat S ausschließlich eine Kopplung des Rezeptors mit Gas und einer nachfolgenden Bildung von zyklischen Adenosinmonophosphat bewirkte. Diese Selektivität der Cat S-vermittelten PAR2-Aktivierung überraschte die Autoren. Sie hatten erwartet, dass Cat S, so wie es für *biased* Agonisten eigentlich üblich ist, auch die gängigen Signalkaskaden, die durch Serinproteasen wie Trypsin in Gang gesetzt werden, auslösen würde, nur mit einer anderen Potenz als Trypsin. Ein weiterer Unterschied war, dass eine Cat S-vermittelte Aktivierung von PAR2 weder zu einer Assoziation des Rezeptors mit  $\beta$ -Arrestin noch zu einer Endozytose des Rezeptors

fürhte<sup>214</sup>. Dieses Phänomen wurde ebenfalls bei einer Aktivierung von PAR2 durch die Granulozyten-Elastase, einem weiteren *biased* Agonisten von PAR2, beobachtet<sup>216</sup>. Zhao *et al.* vermuteten, dass es aus diesem Grund bei einer Aktivierung von PAR2 durch Cat S zu einem anhaltenden Signal kommen würde, da  $\beta$ -Arrestin in essenzieller Funktion an der Desensibilisierung und an dem Abbau des Rezeptors beteiligt ist<sup>214</sup>. Eine weitere Gemeinsamkeit der beiden *biased* Agonisten Cat S und Granulozyten-Elastase ist, dass sie PAR2 so spalten, dass die Spaltstelle von Trypsin abgetrennt wird und eine nachfolgende Aktivierung von PAR2 durch Trypsin nicht mehr möglich ist<sup>214,216</sup>. Zhao *et al.* hatten für ihre Versuche humane embryonale Nierenzellen und Nieren-Epithelzellen, die mit einem Ratten-Sarkom-Virus transformiert wurden, verwendet<sup>214</sup>. Da die Signalkaskade, die durch einen PAR getriggert wird, sowohl von der aktivierenden Protease abhängt, als auch von der Zelle, auf der der PAR exprimiert ist<sup>196,197</sup>, können wir nicht sagen, ob die oben genannten Beobachtungen auch auf Endothelzellen übertragbar sind.

Auch andere Proteasen können über eine Aktivierung von auf Endothelzellen exprimierten PAR2 unter gewissen Bedingungen zu Endothelschäden führen. Hier wurde eine Kopplung des Rezeptors mit G $\alpha$ 12/13 und eine Aktivierung von RhoA und NF- $\kappa$ B beobachtet<sup>221,223</sup>.

Zusätzlich konnten wir in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass SLE-Patienten verglichen mit gesunden Testpersonen erhöhte Cat S-Plasmakonzentrationen aufwiesen. Die Höhe der Cat S-Konzentration korrelierte jedoch nicht mit der Krankheitsaktivität. Dieses Phänomen wurde auch in einer Studie über Cat S-Plasmakonzentrationen bei rheumatoider Arthritis beobachtet. Bei diesen Arthritis-Patienten war die Cat S-Plasmakonzentration ebenfalls erhöht, ohne dass die Höhe mit der Krankheitsaktivität korrelierte<sup>264</sup>. Ein Erklärungsansatz für die fehlende Korrelation zwischen der Cat S-Plasmakonzentration und der Krankheitsaktivität ist, dass in diesen Autoimmunkrankheiten die Schwelle zur Induktion des Cat S möglicherweise so niedrig ist, dass die Werte auch bei geringer Krankheitsaktivität rasch ansteigen, so dass eine weitere Zunahme an Krankheitsaktivität keine weitere Erhöhung der Plasmakonzentration verursacht. Es gibt aber auch eine Arbeit zum SLE, in der kein signifikanter Unterschied zwischen den Cat S-Plasmakonzentrationen von SLE-Patienten und von gesunden Probanden festgestellt wurde. In dieser Arbeit bestand lediglich eine statistische Assoziation zwischen hohen Cat S-Werten und dem Vorliegen einer Beteiligung des zentralen Nervensystems<sup>265</sup>. Die Aussagekraft

## Diskussion

erhöhter Cat S-Plasmakonzentrationen bei SLE-Patienten ist demnach umstritten. Möglicherweise hatte jedoch der höhere Anteil an LN-Patienten in unserer Kohorte (48% vs. 37%) einen Einfluss darauf, dass wir in unserer Arbeit signifikant erhöhte Cat S-Plasmakonzentrationen messen konnten, denn das Auftreten der LN gilt, genau wie das Auftreten einer Beteiligung des zentralen Nervensystems als prognostisch ungünstig<sup>266</sup>. Nicht auf den SLE bezogen, sondern generell besteht eine Assoziation zwischen hohen Serum-Cat S-Konzentrationen und einer erhöhten Mortalität<sup>267</sup>. Außerdem korrelieren Cat S-Serumkonzentrationen mit der Schwere einer chronischen Niereninsuffizienz und der GFR (negative Korrelation)<sup>268</sup>, so dass in einer Kohorte mit mehr LN-Patienten höhere Cat S-Serumkonzentrationen zu erwarten sind. Da jedoch sowohl unsere Kohorte mit 50 SLE-Patienten, als auch die Kohorte von Zhang *et al.* mit 90 SLE-Patienten relativ klein waren, kann dies erst durch größere Studien mit mehr eingeschlossenen Patienten abschließend geklärt werden.

Als Quelle für das extrazelluläre Cat S beim SLE identifizierten wir PBMCs und speziell neutrophile Granulozyten. Wir konnten zeigen, dass diese Zellen Cat S ausschütten, wenn sie mit den für den Pathomechanismus des SLEs wichtigen proinflammatorischen Zytokinen IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  oder mit den TLR7- und TLR9-Liganden Imiquimod und CpG-DNA stimuliert werden.

Auch die PAR2-Expression wird auf Endothelzellen im Beisein von proinflammatorischen Zytokinen hochreguliert<sup>220,269</sup>. Bei mehreren entzündlichen Krankheiten konnte eine Hochregulation der PAR2-Expression beobachtet werden. Hierzu zählen unter anderem die adjuvante Monarthritis<sup>270</sup> und die Cyclophosphamid-induzierte Zystitis<sup>271</sup> im Tiermodell und beim Menschen die atopische Dermatitis<sup>272</sup> und der Morbus Crohn<sup>216</sup>. Demnach führt das entzündliche Milieu, das beim SLE vorherrscht, zu einer Induktion sowohl von Cat S, dem Rezeptoragonisten, als auch vermutlich von PAR2, dem Rezeptor, was wahrscheinlich eine Cat S-PAR2-vermittelte Endothelzellschädigung begünstigt. Deshalb glauben wir, dass beim Vorliegen eines SLEs der Einfluss dieses Mechanismus der Endothelzellschädigung für die Entstehung von vaskulären Schäden an Relevanz zunimmt.

In der vorliegenden Arbeit haben wir unsere Analysen auf glomeruläre Endothelzellen beschränkt. Dennoch gehen wir davon aus, dass die hier gemachten Beobachtungen für Endothelzellen des gesamten Gefäßsystems gelten. Gestützt wird diese Annahme darauf, dass in der Arbeit von Kumar *et al.* im diabetischen Mausmodell eine Cat S- und eine PAR2-Inhibition nicht nur vor der Entstehung einer diabetischen

## Diskussion

Nephropathie schützen, sondern auch vor der Entstehung einer diabetischen Retinopathie, einer weiteren klinischen Manifestation der diabetischen Mikroangiopathie. Zudem wurde in dieser Arbeit in einem weiteren *in-vivo*-Experiment ein protektiver Effekt der Cat S-Inhibition und PAR2-Inhibition/-Defizienz auf das vaskuläre Endothel auch in Gefäßen des *Musculus cremaster* beobachtet<sup>215</sup>. Zusammengenommen zeigt dies, dass die endothelzellschädigende Wirkung von Cat S nicht auf glomeruläre Endothelzellen beschränkt ist, sondern systemisch abläuft. Ein weit verbreiteter Ansatz ist, dass Cat S über seine elastolytischen und kollagenolytischen Eigenschaften eine wichtige Rolle bei der Entstehung von atherosklerotischen Läsionen spielt<sup>170,273</sup>. Kumar *et al.* waren die ersten, die eine Cat S-vermittelte Aktivierung von PAR2 auf Endothelzellen als einen zusätzlichen Mechanismus im Diabetes mellitus identifizierten, über den Cat S an der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion, einer Vorstufe der Atherosklerose, beteiligt ist<sup>215</sup>. Es ist jedoch anzunehmen, dass ein gemäßigter Ablauf der Cat S-PAR2-vermittelten Erhöhung der Permeabilität des Endothels auch eine für den Organismus vorteilhafte Funktion erfüllt. Chin *et al.* hatten herausgefunden, dass mehrere von neutrophilen Granulozyten ausgeschüttete Serin-Proteasen über die Aktivierung von PAR2 und PAR1 zu einer Permeabilitäts-Erhöhung des Epithels führen und dass dies die transepitheliale Migration der neutrophilen Granulozyten erleichtert<sup>274</sup>. Da, wie wir gezeigt haben, Cat S eine Protease ist, die im Rahmen einer Entzündung ebenfalls von neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet wird, hat die in unserer Arbeit und in der Arbeit von Kumar *et al.* beobachtete Cat S-PAR2-vermittelte Erhöhung der Permeabilität des Endothels vermutlich eine entsprechende Funktion, nämlich dass bei einer Entzündung Entzündungszellen leichter aus den Blutgefäßen in das Gewebe übertreten können. Doch genau dies gilt es bei Autoimmunkrankheiten wie dem SLE, wo die Einwanderung von Immunzellen in das Gewebe ein zentraler Bestandteil der Abläufe ist, die zu Gewebeschäden führen, zu verhindern. Die Blockade dieses endothelschädigenden Mechanismus durch einen Cat S-Inhibitor hat demnach wahrscheinlich zwei positive Effekte. Zum einen bietet sie einen gewissen Schutz vor der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion und zum anderen erschwert sie die Migration von Entzündungszellen in das Gewebe. In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass in den Nieren der Tiere, die den Cat S-Inhibitor erhalten hatten, die vaskuläre Integrität deutlich besser war, als in den Nieren von Tieren aus der Vehikel-

## Diskussion

Gruppe. Gleichzeitig wiesen die Nieren weniger Immunzell-Infiltrate auf. Unsere Ergebnisse wären demnach vereinbar mit einer solchen Annahme.

Doch gibt es auch Punkte, die Zweifel an der Gültigkeit der hier beschriebenen Theorie aufwerfen. So führten wir ein *in-vivo*-Experiment durch, in dem exogenes Cat S MRL-(Fas)lpr-Mäusen injiziert wurde. Der Vorteil des exogenen Cat S war, dass eine klare Ursachen-Wirkungs-Beziehung hergestellt werden konnte. Ein Nachteil war jedoch, dass man aus der vorliegenden Arbeit allein nicht mit Sicherheit darauf schließen kann, ob endogenes Cat S ebenfalls zu relevanten Endothelschäden führen würde. In der Arbeit von Kumar *et al.* wurde jedoch ein Versuch durchgeführt, in dem diese Frage explizit adressiert wurde. In einer intravitalen Mikroskopie von Blutgefäßen im *Musculus cremaster* wurde 30 Minuten nach einer chirurgisch-gesetzten Ischämie beobachtet, dass sowohl eine Cat S-Inhibition als auch eine PAR2-Inhibition und -Deletion sich positiv auf den Erhalt der Integrität des vaskulären Endothels auswirkten<sup>215</sup>. Dies bedeutet, dass man davon ausgehen kann, dass endogenes Cat S, das in diesem Fall im Rahmen der Ischämie freigesetzt wurde, durch eine Aktivierung von PAR2 Endothelzellen in einem relevanten Ausmaß schädigt.

Ein weiterer strittiger Punkt ist, dass zirkulierendes Cat S nur zu einem geringen Prozentsatz (0,4 – 1,1%) im Plasma enzymatisch aktiv ist. Der größte Teil des Cat S kommt im Plasma an Cystatin C gebunden vor<sup>275</sup>. Cystatin C ist ein endogener Inhibitor von Cat S. Die Funktion der endogenen Protease-Inhibitoren ist, den Organismus vor einer Digestion durch aktive zirkulierende Proteasen zu schützen<sup>276</sup>. Man geht davon aus, dass Cat S in der Niere von Immunzellen wie CD68<sup>+</sup> Makrophagen ausgeschüttet wird<sup>179,215</sup>. Cystatin C auf der anderen Seite konnte in gesunden menschlichen Nieren nur in Tubulusepithelzellen nachgewiesen werden<sup>215</sup>. *Microarray*-Analysen durchgeführt in Nierenbiopsaten von Diabetes-Patienten und gesunden Probanden zeigten, dass beim Vorliegen einer diabetischen Nephropathie Cat S mRNA-Expression um das Zwei- bis Dreifache höher ist, während kein Unterschied der Cystatin C mRNA-Expression zwischen Biopsaten von gesunden Probanden oder von Diabetes-Patienten festgestellt wurde<sup>215</sup>. Diese Ergebnisse sind in einer Linie mit Beobachtungen, die in atherosklerotischen Plaques und in abdominalen Aortenaneurysmen gemacht wurden. Hier wurde nämlich festgestellt, dass in atherosklerotischen Plaques und in der Wand von abdominalen Aortenaneurysmen die Cat S-Expression höher ist als in unbeschädigten Bereichen der Gefäßwand, bei gleichzeitig erniedrigter Expression von Cystatin C in diesen

Abschnitten. Außerdem besteht eine negative Korrelation zwischen dem Durchmesser eines abdominellen Aortenaneurysmas und Cystatin C-Serumkonzentrationen. *In-vitro* wurde eine Induktion von Cat S-mRNA in vaskulären glatten Muskelzellen durch eine Stimulation mit IFN- $\gamma$  beobachtet. Vaskuläre glatte Muskelzellen exprimieren unter physiologischen Bedingungen auch Cystatin C. Die Stimulation dieser Zellen mit IFN- $\gamma$  zeigte aber keinen Effekt auf die mRNA-Expression von Cystatin C in diesen Zellen<sup>277</sup>. Dies bedeutet, dass unter gewissen Bedingungen eine lokale Dysbalance zwischen Cat S und Cystatin C entsteht, mit der Folge, dass Cat S an dieser Stelle proteolytisch aktiv ist. Wir vermuten, dass dies auch der Grund dafür ist, dass das exogen zugefügte Cat S in unserem *in-vivo*-Experiment nicht komplett nach der Injektion durch Cystatin C neutralisiert wurde, sondern lokal an der Niere zu einer Schädigung der Endothelzellen führte. Die Inhibition durch zirkulierendes Cystatin C ist aber wahrscheinlich auch dafür verantwortlich, dass der Effekt des Cat S *in-vivo* nicht so ausgeprägt war wie *in-vitro*. Hier verursachte Cat S eine Nekrose der glomerulären Endothelzellen.

### **4.3 Der therapeutische Effekt von Mykophenolat-Mofetil versus RO5459072**

Ein weiterer Aspekt der Cat S-Inhibitor-Therapie, den wir in dieser Arbeit untersuchten, war die therapeutische Effektivität von RO5459072 im Vergleich zu dem Standard-Medikament MMF. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die hier verwendete Dosis von 100 mg/kg MMF eine wirkungsvolle Therapie des SLEs und der LN in MRL-(Fas)lpr-Mäusen darstellt<sup>225,226</sup>. Auch in der vorliegenden Arbeit erwies sich MMF als ein potentes Therapeutikum. Die Nierenfunktion stabilisierte sich unter MMF-Therapie. Der Albumin-Kreatinin-Quotient sank aber nicht unter den Ausgangswert, wie es unter der Therapie mit 30 mg/kg RO5459072 beobachtet wurde. Dies bedeutet, dass obwohl beide Therapien zur gleichen Zeit begonnen wurden, nur die Cat S-Inhibitor-Therapie eine wirkliche Verbesserung der Gewebeschädigung bewirkte, während die MMF-Therapie lediglich einen Progress der Nierenschädigung verhinderte. Dies wurde auch in der histologischen Auswertung sichtbar. Einzig unter der Hochdosis-Cat S-Inhibitor-Therapie wurden signifikant niedrigere Aktivitäts- und Chronizitäts-Indices der LN festgestellt. Zudem wiesen nur Nieren von Tieren, die 30 mg/kg RO5459072 erhalten hatten, eine signifikante Reduktion der Makrophagen-Infiltration auf. Vermutlich ist der oben beschriebene duale Wirkmechanismus, in dem das Gewebe zum einen durch eine Suppression der systemischen Autoimmunität und

## Diskussion

zum anderen durch eine verbesserte vaskuläre Integrität geschützt wird, ursächlich für diesen ausgeprägten Effekt, den die Cat S-Inhibitor-Therapie auf die LN zeigte.

Überraschend war in unserer Arbeit, dass die MMF-Therapie nicht zu einer signifikanten Suppression der IgG-Antikörper führte. Hier erwies sich die Therapie mit RO5459072 der Therapie mit MMF als deutlich überlegen. Vor allem die Serumkonzentrationen von anti-dsDNA-IgG-Antikörpern konnten unter der 30 mg/kg-RO5459072-Therapie unterhalb des Ausgangswertes gesenkt werden, während MMF-Therapie auf diesen pathologischen Autoantikörper keinen Effekt zeigte. Auch die Antikörper-produzierenden Plasmazellen wurden durch die MMF-Therapie in unserer Arbeit nicht gesenkt.

Wir hatten erwartet, dass MMF als ein Immunsuppressivum eine deutliche Suppression der IgG-Antikörper bewirken würde. Dieser Annahme lag zugrunde, dass in einer anderen Arbeit festgestellt wurde, dass MMF bei einer Dosierung von 100 mg/kg anti-dsDNA-IgG-, IgG2a- und IgG3-Antikörperkonzentrationen in MRL-(Fas)lpr-Mäusen signifikant reduziert. Bemerkenswert ist jedoch, dass auch in dieser Arbeit MMF keinen Effekt auf IgG1-Antikörperkonzentrationen zeigte. Außerdem wurde in dieser Arbeit deutlich früher mit der Therapie begonnen, als in unserer Arbeit, nämlich bereits in einem Alter von 7 Wochen<sup>225</sup>. Wiederum in einer anderen Arbeit, in der aber eine niedrigere MMF-Dosis verwendet wurde, nämlich 90 mg/kg, wurde keine Reduktion der IgG-Antikörperkonzentrationen im Plasma bei MRL-(Fas)lpr-Mäusen beobachtet. In dieser Arbeit waren die Mäuse bei Therapie-Start 8 Wochen alt. Wie in unserer Arbeit, kam es trotz unveränderter Antikörpertiter zu einer Verbesserung der LN<sup>224</sup>. Die Datenlage zu diesem Thema ist demnach heterogen.

Im Gegensatz dazu waren die Plasmakonzentrationen von gesamt-IgM-Antikörpern in unserer Arbeit unter MMF-Therapie signifikant erniedrigt. Wir nehmen daher an, dass der Schutz, den natürliche IgM-Antikörper in der frühen Immunabwehr bieten und der vermutlich bei einer Cat S-Inhibitor-Therapie des SLEs erhalten bleibt, unter MMF-Therapie eingeschränkt ist.

In den meisten Auswertungen gab es aber keine signifikanten Unterschiede zwischen der therapeutischen Wirkung von MMF und von RO5459072. Es zeichnete sich aber ein Trend dahingehen ab, dass die Hochdosis-Cat S-Inhibitor-Therapie der MMF-Therapie leicht überlegen war, besonders zeigten dies die oben aufgeführten Punkte.

### 4.4 Limitationen und Ausblick

Diese Arbeit weist einige Limitationen auf, die ihre Aussagekraft einschränken. Als Erstes wäre zu nennen, dass die Gruppengrößen relativ klein waren. Einzelnen Ausreißern in den Messwerten kam daher eine überproportionale statistische Bedeutung zu. Auch dass mehrere Mäuse über den Verlauf der Studie ausgeschlossen werden mussten und so die jeweils kränksten Tiere nicht mehr in der Auswertung berücksichtigt werden konnten, dürfte zu einer gewissen Verzerrung der Ergebnisse geführt haben. Vor allem in der MMF-Therapiegruppe, in der zwei Mäuse unter Therapie ausgeschlossen wurden, dürfte dies einen verbessernden Effekt auf das Endergebnis gehabt haben. Die einzige Gruppe die von dieser Verzerrung ausgenommen war, war die Interventionsgruppe, die 30 mg/kg RO5459072 erhalten hatte, denn hier kam es zu keinen frühzeitigen Ausfällen. Aber dies dürfte, wenn überhaupt, dazu geführt haben, dass die Unterschiede zwischen der therapeutischen Wirkung von RO5459072 und von MMF eher unterschätzt, als überschätzt wurden. Darüber hinaus wurden die Hauptaussagen der Arbeit durch die Messung einer Vielzahl von Parametern mittels unterschiedlicher Methoden bestätigt. Dadurch verlieren einzelne stark abweichende Messwerte an Einfluss auf das Gesamtergebnis. Eine weitere Limitation dieser Studie ist, dass die Medikamente über das Futter appliziert wurden. Dadurch ist es nicht möglich 100%ig sicher zu stellen, dass jedes Versuchstier täglich die genau beabsichtigte Menge an Medikament aufnimmt. In unserer Arbeit wurden aber stabile Plasmaspiegel des Cat S-Inhibitors über den gesamten Zeitraum der Studie gemessen<sup>259</sup>. Die Messungen der RO5459072-Plasmaspiegel wurden von Mitarbeitern von Hoffmann La Roche in Basel, in der Schweiz, durchgeführt.

Bei der Interpretation dieser Arbeit muss zudem berücksichtigt werden, dass die *in-vivo*-Versuche an MRL-(Fas)lpr-Mäusen durchgeführt wurden, deren autoimmunes Syndrom dem humanen SLE zwar ähnelt, aber doch entscheidende Unterschiede aufweist, wie zum Beispiel die untergeordnete Rolle, die Typ-I Interferone im Pathomechanismus des autoimmunen Syndroms der MRL-(Fas)lpr-Mäuse spielen<sup>162</sup>. Der Stellenwert von Mausmodellen in der Entwicklung neuer Therapiekonzepte wird diskutiert<sup>278,279</sup>. Besonders in der Forschung zu neuen SLE-Therapien konnten klinische Studien beim Menschen die hohen Erwartungen, die vielversprechende Ergebnisse von Mausstudien geweckt hatten, nicht erfüllen<sup>280</sup>. Aber es wurden auch viele Gemeinsamkeiten zwischen Menschen und Mäusen festgestellt. So wurde

## Diskussion

gezeigt, dass es eine hohe Übereinstimmung der Gen-Expressions-Muster bei verschiedenen entzündlichen Zuständen wie Sepsis, Trauma oder Verbrennungen beim Menschen und bei der Maus gibt<sup>279</sup>.

Auch die *in-vitro*-Versuche weisen Limitationen auf. Die stark vereinfachten Modelle, die in dieser Arbeit verwendet wurden, um Aspekte des Pathomechanismus zu simulieren, spiegeln nicht die komplexen Vorgänge, die in einem Organismus ablaufen adäquat wider und müssen daher als Annäherungsmodelle verstanden werden.

Insgesamt können *in-vitro*-Versuche und Tierstudien klinische Studien beim Menschen nicht ersetzen, sondern geben erste Anhaltspunkte, auf denen weitere Studien aufgebaut werden. Der Cat S-Inhibitor RO5459072 wird bereits in klinischen Studien im Sjögren Syndrom getestet (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02701985>; Stand 19.04.2018). Um die therapeutischen Möglichkeiten von RO5459072 im SLE zu testen, müssen auch hier klinische Studien folgen.

### 5 Zusammenfassung

Der SLE ist eine potentiell tödlich verlaufende Autoimmunerkrankung. Besonders ungünstig auf die Prognose wirken sich das Auftreten einer Nierenbeteiligung in Form einer LN und eine hohe Rate sowohl an kardiovaskulären Ereignissen als auch an schweren Infektionen aus. Zur Therapie müssen oft über längere Zeit nebenwirkungsreiche Immunsuppressiva eingesetzt werden.

Die Cystin-Protease Cat S katalysiert in Endolysosomen einen entscheidenden Schritt der HLA-Antigenpräsentation (bei der Maus MHC II), einen wichtigen Bestandteil des Pathomechanismus von Autoimmunkrankheiten wie dem SLE. Auch extrazellulär erfüllt Cat S verschiedene Funktionen. So aktiviert es den unter anderem auf Endothelzellen exprimierten PAR2, was eine Schädigung dieser Zellen verursacht.

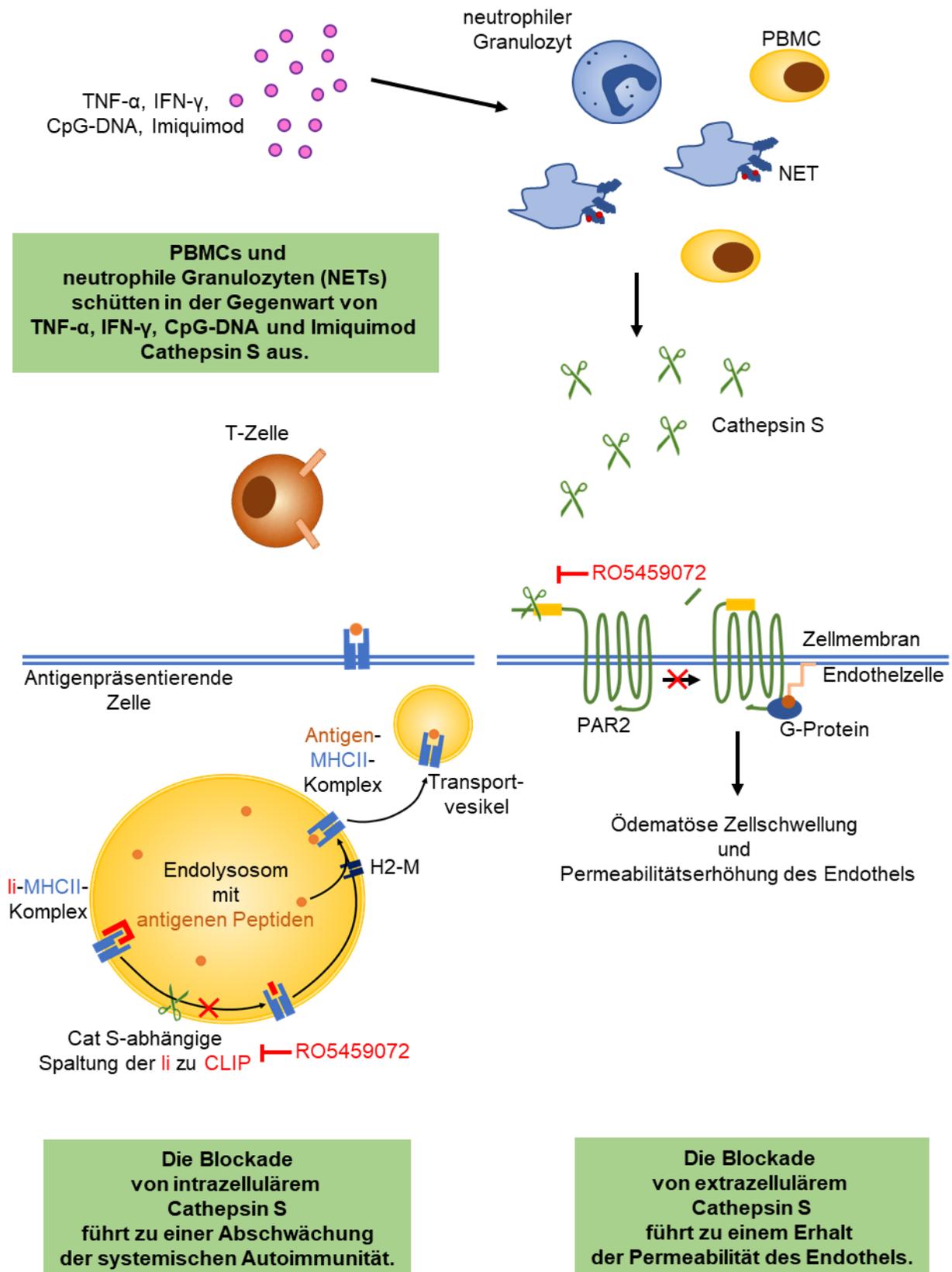
Wir vermuteten daher, dass der Cat S-Inhibitor RO5459072 im experimentellen SLE einen dualen therapeutischen Effekt haben würde, nämlich zum einen, dass es durch eine Hemmung der MHC II-Antigenpräsentation zu einer Abschwächung der systemischen Autoimmunität kommen würde und zum anderen, dass die Gefäße in entzündlich veränderten Organen durch eine Hemmung des extrazellulären Cat S vor dem PAR2-vermittelten Endothelzellschaden geschützt wären.

Wir fanden, dass Cat S-Plasmakonzentrationen bei SLE-Patienten höher waren als bei gesunden Testpersonen und identifizierten als dessen Quelle PBMCs und neutrophile Granulozyten. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass extrazelluläres Cat S eine relevante Endothelzellschädigung durch PAR2 in SLE-Modellen verursacht, was durch die Gabe von RO5459072 verhindert werden konnte.

Unter einer acht-wöchigen Therapie mit RO5459072 kam es in nephritischen MRL-(Fas)pr-Mäusen zu einer Suppression der Autoantikörpertiter, und splenischer Immunzellpopulationen, beides Indikatoren einer verminderten systemischen Autoimmunität. Anders als unter der Therapie mit dem Standardtherapeutikum MMF kam es unter RO5459072 jedoch nicht zu einer Suppression der für die frühe Immunabwehr wichtigen IgM-Antikörper. Außerdem zeigten histologische Auswertungen der Niere eine gut erhaltene Integrität des Gefäßendothels, mit einer reduzierten inflammatorischen Organschädigung und erhaltenen Organfunktion (Abbildung 28).

Daraus schließen wir, dass die Cat S-Inhibition ein vielversprechender Ansatz zur Therapie des SLEs ist, denn sie kombiniert die Suppression der systemischen Autoimmunität mit einem vasoprotektiven und antiinflammatorischen Effekt.

## Zusammenfassung



**Abbildung 28: Graphische Zusammenfassung.**

Diese Abbildung fasst die, durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zusammen. CLIP = *class II-associated invariant chain peptide*; CpG-DNA = Cytosinphosphatidylguanin-DNA; Ii = *invariant chain*; MHC II = *Major Histocompatibility Complex II*; NETs = *extracellular traps*; PAR2 = *Protease-aktivierte Rezeptor-2*; PBMCs = *Peripheral Blood Mononuclear Cells*;

## Abkürzungsverzeichnis

### 6 Abkürzungsverzeichnis

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ANA	antinukleäre Antikörper
Anti-dsDNA-Antikörper	anti-Doppelstrang-DNA-Antikörper
BSA	bovines Serumalbumin
Cat S	Cathepsin S
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CLIP	<i>class II-associated invariant chain peptide</i>
CpG-DNA	Cytosinphosphatidylguanin-Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked-Immunsorbent Assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
Hep-2-Zellen	humane Epitheliumzellen Typ 2 eines Larynxkarzinoms
HLA	humanes Leukocytenantigen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IgA/E/G/M	Immunglobulin A/E/G/M
ISN	<i>International Society of Nephrology</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Li	<i>invariant chain</i>
Lip10	<i>invariant chain p 10</i>
LN	Lupusnephritis
LPS	Lipopolysaccharid
MHC I	<i>Major Histocompatibility Complex I</i>
MHC II	<i>Major Histocompatibility Complex II</i>
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MRL-(Fas)lpr	<i>Murphy Roths Large/lymphoproliferativ</i>
mRNA	messenger Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )

## Abkürzungsverzeichnis

LHVS	Morpholin Urea-Leucin-Homophenylalanin-Venylsulfone-Phenyl
NET	<i>Neutrophil Extracellular trap</i>
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
PAR (1 – 4)	Protease-aktivierter Rezeptore (1 – 4)
PAS	Perjodsäure-Schiff ( <i>periodic acid Schiff</i> )
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung ( <i>phosphate-bufferedsaline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PI	Propidiumiodid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAsin	Ribonuklease-Inhibitor
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RPS	<i>Renal Pathology Society</i>
RT	reverse Transkriptase
SEM	Standardfehler des Mittelwerts ( <i>standard error of the mean</i> )
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SLEDAI	<i>SLE disease activity index</i>
SLICC	<i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics</i>
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor
WT1	Wilms Tumor 1

**7 Literaturverzeichnis**

1. Liu, Z. & Davidson, A. Taming lupus-a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nature medicine* **18**, 871-882 (2012).
2. Wallace, D.J. & Lyon, I. Pierre Cazenave and the first detailed modern description of lupus erythematosus. *Seminars in arthritis and rheumatism* **28**, 305-313 (1999).
3. Smith, C.D. & Cyr, M. The history of lupus erythematosus. From Hippocrates to Osler. *Rheumatic diseases clinics of North America* **14**, 1-14 (1988).
4. Brinks, R., *et al.* Age-specific prevalence of diagnosed systemic lupus erythematosus in Germany 2002 and projection to 2030. *Lupus* **23**, 1407-1411 (2014).
5. Lewis, M.J. & Jawad, A.S. The effect of ethnicity and genetic ancestry on the epidemiology, clinical features and outcome of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* **56**, i67-i77 (2017).
6. Molina, M.J., *et al.* Prevalence of systemic lupus erythematosus and associated comorbidities in Puerto Rico. *J Clin Rheumatol* **13**, 202-204 (2007).
7. Hochberg, M.C. The incidence of systemic lupus erythematosus in Baltimore, Maryland, 1970-1977. *Arthritis and rheumatism* **28**, 80-86 (1985).
8. Chakravarty, E.F., Bush, T.M., Manzi, S., Clarke, A.E. & Ward, M.M. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis and rheumatism* **56**, 2092-2094 (2007).
9. Johnson, A.E., Gordon, C., Palmer, R.G. & Bacon, P.A. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis and rheumatism* **38**, 551-558 (1995).
10. Lim, S.S., *et al.* The incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus, 2002-2004: The Georgia Lupus Registry. *Arthritis & rheumatology* **66**, 357-368 (2014).
11. Somers, E.C., *et al.* Population-based incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: the Michigan Lupus Epidemiology and Surveillance program. *Arthritis & rheumatology* **66**, 369-378 (2014).
12. McCarty, D.J., *et al.* Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis and rheumatism* **38**, 1260-1270 (1995).
13. Hopkinson, N.D., Doherty, M. & Powell, R.J. Clinical features and race-specific incidence/prevalence rates of systemic lupus erythematosus in a geographically complete cohort of patients. *Annals of the rheumatic diseases* **53**, 675-680 (1994).
14. McMurray, R.W. & May, W. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis and rheumatism* **48**, 2100-2110 (2003).
15. de Jesus, G.R., *et al.* Understanding and Managing Pregnancy in Patients with Lupus. *Autoimmune Dis* **2015**, 943490 (2015).
16. Schmeding, A. & Schneider, M. Fatigue, health-related quality of life and other patient-reported outcomes in systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **27**, 363-375 (2013).
17. Drenkard, C., *et al.* Burden of systemic lupus erythematosus on employment and work productivity: data from a large cohort in the southeastern United States. *Arthritis Care Res (Hoboken)* **66**, 878-887 (2014).
18. Al Dhanhani, A.M., Gignac, M.A., Su, J. & Fortin, P.R. Work disability in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* **61**, 378-385 (2009).

## Literaturverzeichnis

19. Yelin, E., *et al.* Work dynamics among persons with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* **57**, 56-63 (2007).
20. Bertoli, A.M., Fernandez, M., Alarcon, G.S., Vila, L.M. & Reveille, J.D. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort LUMINA (XLI): factors predictive of self-reported work disability. *Annals of the rheumatic diseases* **66**, 12-17 (2007).
21. Zhu, T.Y., Tam, L.S. & Li, E.K. Labour and non-labour market productivity in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* **51**, 284-292 (2012).
22. Yelin, E., *et al.* Work loss and work entry among persons with systemic lupus erythematosus: comparisons with a national matched sample. *Arthritis and rheumatism* **61**, 247-258 (2009).
23. Mok, C.C., Cheung, M.Y., Ho, L.Y., Yu, K.L. & To, C.H. Risk and predictors of work disability in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* **17**, 1103-1107 (2008).
24. Scofield, L., Reinlib, L., Alarcon, G.S. & Cooper, G.S. Employment and disability issues in systemic lupus erythematosus: a review. *Arthritis and rheumatism* **59**, 1475-1479 (2008).
25. Huscher, D., *et al.* Cost of illness in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis and systemic lupus erythematosus in Germany. *Annals of the rheumatic diseases* **65**, 1175-1183 (2006).
26. Tektonidou, M.G., Lewandowski, L.B., Hu, J., Dasgupta, A. & Ward, M.M. Survival in adults and children with systemic lupus erythematosus: a systematic review and Bayesian meta-analysis of studies from 1950 to 2016. *Annals of the rheumatic diseases* (2017).
27. Bertsias, G., *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* **67**, 195-205 (2008).
28. Mok, C.C. Understanding lupus nephritis: diagnosis, management, and treatment options. *Int J Womens Health* **4**, 213-222 (2012).
29. Danila, M.I., *et al.* Renal damage is the most important predictor of mortality within the damage index: data from LUMINA LXIV, a multiethnic US cohort. *Rheumatology (Oxford)* **48**, 542-545 (2009).
30. Mok, C.C., Kwok, R.C. & Yip, P.S. Effect of renal disease on the standardized mortality ratio and life expectancy of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* **65**, 2154-2160 (2013).
31. Carter, E.E., Barr, S.G. & Clarke, A.E. The global burden of SLE: prevalence, health disparities and socioeconomic impact. *Nature reviews. Rheumatology* **12**, 605-620 (2016).
32. Pons-Estel, B.A., *et al.* The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus: ethnic and disease heterogeneity among "Hispanics". *Medicine (Baltimore)* **83**, 1-17 (2004).
33. Hochberg, M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* **40**, 1725 (1997).
34. Pons-Estel, G.J., *et al.* The American College of Rheumatology and the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus in two multiethnic cohorts: a commentary. *Lupus* **23**, 3-9 (2014).

35. Ighe, A., Dahlstrom, O., Skogh, T. & Sjowall, C. Application of the 2012 Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria to patients in a regional Swedish systemic lupus erythematosus register. *Arthritis Res Ther* **17**, 3 (2015).
36. Petri, M., *et al.* Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* **64**, 2677-2686 (2012).
37. Tan, E.M., *et al.* The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* **25**, 1271-1277 (1982).
38. Iaccarino, L., *et al.* Overlap connective tissue disease syndromes. *Autoimmun Rev* **12**, 363-373 (2013).
39. Chaturvedi, S. & McCrae, K.R. Diagnosis and management of the antiphospholipid syndrome. *Blood Reviews* (2017).
40. Cervera, R., *et al.* Antiphospholipid syndrome: Clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis & Rheumatism* **46**, 1019-1027 (2002).
41. Merkel, P.A., *et al.* The prevalence and clinical associations of anticardiolipin antibodies in a large inception cohort of patients with connective tissue diseases. *The American journal of medicine* **101**, 576-583 (1996).
42. Levine, J.S., Branch, D.W. & Rauch, J. The antiphospholipid syndrome. *The New England journal of medicine* **346**, 752-763 (2002).
43. Borchers, A.T., Keen, C.L. & Gershwin, M.E. Drug-Induced Lupus. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1108**, 166-182 (2007).
44. Xiao, X. & Chang, C. Diagnosis and classification of drug-induced autoimmunity (DIA). *Journal of autoimmunity* **48-49**, 66-72 (2014).
45. Weening, J.J. The Classification of Glomerulonephritis in Systemic Lupus Erythematosus Revisited. *Journal of the American Society of Nephrology* **15**, 241-250 (2004).
46. Bertsias, G.K., *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* **71**, 1771-1782 (2012).
47. Cheunsuchon, B., Rungkaew, P., Chawanasuntorapoj, R., Pattaragarn, A. & Parichatikanond, P. Prevalence and clinicopathologic findings of antiphospholipid syndrome nephropathy in Thai systemic lupus erythematosus patients who underwent renal biopsies. *Nephrology (Carlton)* **12**, 474-480 (2007).
48. Tektonidou, M.G., Sotsiou, F., Nakopoulou, L., Vlachoyiannopoulos, P.G. & Moutsopoulos, H.M. Antiphospholipid syndrome nephropathy in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibodies: prevalence, clinical associations, and long-term outcome. *Arthritis and rheumatism* **50**, 2569-2579 (2004).
49. Daugas, E., *et al.* Antiphospholipid syndrome nephropathy in systemic lupus erythematosus. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **13**, 42-52 (2002).
50. Manzi, S., *et al.* Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study. *American journal of epidemiology* **145**, 408-415 (1997).

51. Esdaile, J.M., *et al.* Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* **44**, 2331-2337 (2001).
52. Inoue, T. & Node, K. Vascular failure: A new clinical entity for vascular disease. *Journal of hypertension* **24**, 2121-2130 (2006).
53. Halcox, J.P.J., *et al.* Prognostic Value of Coronary Vascular Endothelial Dysfunction. *Circulation* **106**, 653-658 (2002).
54. Mak, A., *et al.* Endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus - a case-control study and an updated meta-analysis and meta-regression. *Scientific reports* **7**, 7320 (2017).
55. El-Magadmi, M., *et al.* Systemic lupus erythematosus: an independent risk factor for endothelial dysfunction in women. *Circulation* **110**, 399-404 (2004).
56. Davis, L.S. & Reimold, A.M. Research and therapeutics-traditional and emerging therapies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* **56**, i100-i113 (2017).
57. van Vollenhoven, R., *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* **76**, 554-561 (2017).
58. Stege, H., Budde, M.A., Grether-Beck, S. & Krutmann, J. Evaluation of the capacity of sunscreens to photoprotect lupus erythematosus patients by employing the photoprovocation test. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* **16**, 256-259 (2000).
59. Kleinmann, J.F., *et al.* International and multidisciplinary expert recommendations for the use of biologics in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* **16**, 650-657 (2017).
60. Radhakrishnan, J. & Cattran, D.C. The KDIGO practice guideline on glomerulonephritis: reading between the (guide)lines--application to the individual patient. *Kidney international* **82**, 840-856 (2012).
61. Hahn, B.H., *et al.* American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* **64**, 797-808 (2012).
62. Kuhn, A., *et al.* The Diagnosis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Deutsches Arzteblatt international* **112**, 423-432 (2015).
63. Gergianaki, I., *et al.* Epidemiology and burden of systemic lupus erythematosus in a Southern European population: data from the community-based lupus registry of Crete, Greece. *Annals of the rheumatic diseases* (2017).
64. Contreras, G., *et al.* Outcomes in African Americans and Hispanics with lupus nephritis. *Kidney international* **69**, 1846-1851 (2006).
65. Allison, A.C. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus* **14 Suppl 1**, s2-8 (2005).
66. Carr, S.F., Papp, E., Wu, J.C. & Natsumeda, Y. Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *J Biol Chem* **268**, 27286-27290 (1993).
67. Nagai, M., Natsumeda, Y. & Weber, G. Proliferation-linked regulation of type II IMP dehydrogenase gene in human normal lymphocytes and HL-60 leukemic cells. *Cancer research* **52**, 258-261 (1992).
68. Senda, M., DeLustro, B., Eugui, E. & Natsumeda, Y. Mycophenolic acid, an inhibitor of IMP dehydrogenase that is also an immunosuppressive agent, suppresses the cytokine-induced nitric oxide production in mouse and rat vascular endothelial cells. *Transplantation* **60**, 1143-1148 (1995).
69. Sugimoto, H., Shikata, K., Wada, J., Horiuchi, S. & Makino, H. Advanced glycation end products-cytokine-nitric oxide sequence pathway in the

- development of diabetic nephropathy: aminoguanidine ameliorates the overexpression of tumour necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase in diabetic rat glomeruli. *Diabetologia* **42**, 878-886 (1999).
70. Isenberg, D., *et al.* Influence of race/ethnicity on response to lupus nephritis treatment: the ALMS study. *Rheumatology (Oxford)* **49**, 128-140 (2010).
  71. Dooley, M.A., *et al.* Mycophenolate versus azathioprine as maintenance therapy for lupus nephritis. *The New England journal of medicine* **365**, 1886-1895 (2011).
  72. Houssiau, F.A., *et al.* Azathioprine versus mycophenolate mofetil for long-term immunosuppression in lupus nephritis: results from the MAINTAIN Nephritis Trial. *Annals of the rheumatic diseases* **69**, 2083-2089 (2010).
  73. Stoenoiu, M.S., *et al.* Repeat kidney biopsies fail to detect differences between azathioprine and mycophenolate mofetil maintenance therapy for lupus nephritis: data from the MAINTAIN Nephritis Trial. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **27**, 1924-1930 (2012).
  74. Apostolopoulos, D. & Morand, E.F. It hasn't gone away: the problem of glucocorticoid use in lupus remains. *Rheumatology (Oxford)* **56**, i114-i122 (2017).
  75. Wei, L., MacDonald, T.M. & Walker, B.R. Taking glucocorticoids by prescription is associated with subsequent cardiovascular disease. *Annals of internal medicine* **141**, 764-770 (2004).
  76. Curtis, J.R., *et al.* Population-based assessment of adverse events associated with long-term glucocorticoid use. *Arthritis and rheumatism* **55**, 420-426 (2006).
  77. Fardet, L., *et al.* Corticosteroid-induced clinical adverse events: frequency, risk factors and patient's opinion. *Br J Dermatol* **157**, 142-148 (2007).
  78. Zonana-Nacach, A., Barr, S.G., Magder, L.S. & Petri, M. Damage in systemic lupus erythematosus and its association with corticosteroids. *Arthritis & Rheumatism* **43**, 1801-1808 (2000).
  79. Huscher, D., *et al.* Dose-related patterns of glucocorticoid-induced side effects. *Annals of the rheumatic diseases* **68**, 1119-1124 (2009).
  80. Kavanaugh, A. & Wells, A.F. Benefits and risks of low-dose glucocorticoid treatment in the patient with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **53**, 1742-1751 (2014).
  81. Bernatsky, S., *et al.* Mortality in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* **54**, 2550-2557 (2006).
  82. Radis, C.D., *et al.* Effects of cyclophosphamide on the development of malignancy and on long-term survival of patients with rheumatoid arthritis. A 20-year followup study. *Arthritis and rheumatism* **38**, 1120-1127 (1995).
  83. Palmer, S.C., *et al.* Induction and Maintenance Immunosuppression Treatment of Proliferative Lupus Nephritis: A Network Meta-analysis of Randomized Trials. *Am J Kidney Dis* **70**, 324-336 (2017).
  84. Wallace, D.J. The evolution of drug discovery in systemic lupus erythematosus. *Nature reviews. Rheumatology* **11**, 616-620 (2015).
  85. Banchereau, R., *et al.* Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks that Stratify Lupus Patients. *Cell* **165**, 551-565 (2016).
  86. Belot, A. & Cimaz, R. Monogenic forms of systemic lupus erythematosus: new insights into SLE pathogenesis. *Pediatric rheumatology online journal* **10**, 21 (2012).

87. Mohan, C. & Putterman, C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nature reviews. Nephrology* **11**, 329-341 (2015).
88. Dai, C., *et al.* Genetics of systemic lupus erythematosus: immune responses and end organ resistance to damage. *Curr Opin Immunol* **31**, 87-96 (2014).
89. Manderson, A.P., Botto, M. & Walport, M.J. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* **22**, 431-456 (2004).
90. Bates, M.A., *et al.* Silica Triggers Inflammation and Ectopic Lymphoid Neogenesis in the Lungs in Parallel with Accelerated Onset of Systemic Autoimmunity and Glomerulonephritis in the Lupus-Prone NZBWF1 Mouse. *PLoS one* **10**, e0125481 (2015).
91. Costenbader, K.H., *et al.* Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Arthritis and rheumatism* **50**, 849-857 (2004).
92. Draborg, A.H., Duus, K. & Houen, G. Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol* **2012**, 370516 (2012).
93. Tsokos, G.C. Systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine* **365**, 2110-2121 (2011).
94. Richardson, B., *et al.* Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **33**, 1665-1673 (1990).
95. Cornacchia, E., *et al.* Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity. *Journal of immunology* **140**, 2197-2200 (1988).
96. Rubtsov, A.V., Rubtsova, K., Kappler, J.W. & Marrack, P. Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity. *Autoimmun Rev* **9**, 494-498 (2010).
97. Scofield, R.H., *et al.* Klinefelter's syndrome (47,XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: support for the notion of a gene-dose effect from the X chromosome. *Arthritis and rheumatism* **58**, 2511-2517 (2008).
98. Zharkova, O., *et al.* Pathways leading to an immunological disease: systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* **56**, i55-i66 (2017).
99. Svensson, B.O. Serum factors causing impaired macrophage function in systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* **4**, 145-150 (1975).
100. Rahman, Z.S., Shao, W.H., Khan, T.N., Zhen, Y. & Cohen, P.L. Impaired apoptotic cell clearance in the germinal center by Mer-deficient tingible body macrophages leads to enhanced antibody-forming cell and germinal center responses. *Journal of immunology* **185**, 5859-5868 (2010).
101. Gaip, U.S., *et al.* Complement binding is an early feature of necrotic and a rather late event during apoptotic cell death. *Cell death and differentiation* **8**, 327-334 (2001).
102. Janko, C., *et al.* CRP/anti-CRP antibodies assembly on the surfaces of cell remnants switches their phagocytic clearance toward inflammation. *Front Immunol* **2**, 70 (2011).
103. Lande, R., *et al.* Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* **3**, 73ra19 (2011).
104. Brinkmann, V., *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* **303**, 1532-1535 (2004).
105. Leffler, J., *et al.* A subset of patients with systemic lupus erythematosus fails to degrade DNA from multiple clinically relevant sources. *Arthritis Res Ther* **17**, 205 (2015).

106. Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M.E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**, 191-195 (2002).
107. Kaplan, M.J. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. *Nature reviews. Rheumatology* **7**, 691-699 (2011).
108. Caielli, S., *et al.* Oxidized mitochondrial nucleoids released by neutrophils drive type I interferon production in human lupus. *The Journal of experimental medicine* **213**, 697-713 (2016).
109. Gilliet, M., Cao, W. & Liu, Y.J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nature reviews. Immunology* **8**, 594-606 (2008).
110. Preble, O.T., Black, R.J., Friedman, R.M., Klippel, J.H. & Vilcek, J. Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon. *Science* **216**, 429-431 (1982).
111. Bennett, L., *et al.* Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *The Journal of experimental medicine* **197**, 711-723 (2003).
112. Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V. & Banchereau, J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* **294**, 1540-1543 (2001).
113. Bekeredjian-Ding, I.B., *et al.* Plasmacytoid Dendritic Cells Control TLR7 Sensitivity of Naive B Cells via Type I IFN. *The Journal of Immunology* **174**, 4043-4050 (2005).
114. Celhar, T., *et al.* RNA sensing by conventional dendritic cells is central to the development of lupus nephritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E6195-6204 (2015).
115. Thacker, S.G., *et al.* The detrimental effects of IFN-alpha on vasculogenesis in lupus are mediated by repression of IL-1 pathways: potential role in atherogenesis and renal vascular rarefaction. *Journal of immunology* **185**, 4457-4469 (2010).
116. Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**, 637-650 (2011).
117. Kulkarni, O.P. & Anders, H.J. Lupus nephritis. How latest insights into its pathogenesis promote novel therapies. *Curr Opin Rheumatol* **24**, 457-465 (2012).
118. Migliorini, A. & Anders, H.J. A novel pathogenetic concept-antiviral immunity in lupus nephritis. *Nature reviews. Nephrology* **8**, 183-189 (2012).
119. Teichmann, L.L., *et al.* Dendritic cells in lupus are not required for activation of T and B cells but promote their expansion, resulting in tissue damage. *Immunity* **33**, 967-978 (2010).
120. Goodnow, C.C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B. & Vinuesa, C.G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* **435**, 590-597 (2005).
121. International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus, G., *et al.* Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet* **40**, 204-210 (2008).
122. Raj, P., *et al.* Regulatory polymorphisms modulate the expression of HLA class II molecules and promote autoimmunity. *Elife* **5**(2016).
123. Ohl, K. & Tenbrock, K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *European journal of immunology* **45**, 344-355 (2015).

124. He, J., *et al.* Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4(+) T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *Nature medicine* **22**, 991-993 (2016).
125. Moulton, V.R. & Tsokos, G.C. T cell signaling abnormalities contribute to aberrant immune cell function and autoimmunity. *The Journal of clinical investigation* **125**, 2220-2227 (2015).
126. Yurasov, S., *et al.* Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *The Journal of experimental medicine* **201**, 703-711 (2005).
127. Mackay, F. & Mackay, C.R. The role of BAFF in B-cell maturation, T-cell activation and autoimmunity. *Trends in Immunology* **23**, 113-115 (2002).
128. Malkiel, S., *et al.* Checkpoints for Autoreactive B Cells in the Peripheral Blood of Lupus Patients Assessed by Flow Cytometry. *Arthritis & rheumatology* **68**, 2210-2220 (2016).
129. Woods, M., Zou, Y.R. & Davidson, A. Defects in Germinal Center Selection in SLE. *Front Immunol* **6**, 425 (2015).
130. Blanco, P., Ueno, H. & Schmitt, N. T follicular helper (Tfh) cells in lupus: Activation and involvement in SLE pathogenesis. *European journal of immunology* **46**, 281-290 (2016).
131. Herber, D., *et al.* IL-21 Has a Pathogenic Role in a Lupus-Prone Mouse Model and Its Blockade with IL-21R.Fc Reduces Disease Progression. *The Journal of Immunology* **178**, 3822-3830 (2007).
132. Kurosaki, T., Kometani, K. & Ise, W. Memory B cells. *Nature reviews. Immunology* **15**, 149-159 (2015).
133. Marks, S.D. & Tullus, K. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Pediatr Nephrol* **27**, 1855-1868 (2012).
134. Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M. & Corcoran, L.M. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature reviews. Immunology* **15**, 160-171 (2015).
135. De Silva, N.S. & Klein, U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nature reviews. Immunology* **15**, 137-148 (2015).
136. Boes, M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Molecular immunology* **37**, 1141-1149 (2000).
137. Valenzuela, N.M. & Schaub, S. The Biology of IgG Subclasses and Their Clinical Relevance to Transplantation. *Transplantation* **102**, S7-S13 (2018).
138. Avrameas, S. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunology today* **12**, 154-159 (1991).
139. Ochsenbein, A.F., *et al.* Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* **286**, 2156-2159 (1999).
140. Boes, M., Prodeus, A.P., Schmidt, T., Carroll, M.C. & Chen, J. A Critical Role of Natural Immunoglobulin M in Immediate Defense Against Systemic Bacterial Infection. *The Journal of experimental medicine* **188**, 2381-2386 (1998).
141. Gronwall, C. & Silverman, G.J. Natural IgM: beneficial autoantibodies for the control of inflammatory and autoimmune disease. *J Clin Immunol* **34 Suppl 1**, S12-21 (2014).
142. Wang, H., Coligan, J.E. & Morse, H.C., 3rd. Emerging Functions of Natural IgM and Its Fc Receptor FcMR in Immune Homeostasis. *Front Immunol* **7**, 99 (2016).
143. Anders, H.J. & Rovin, B. A pathophysiology-based approach to the diagnosis and treatment of lupus nephritis. *Kidney international* **90**, 493-501 (2016).

144. Kurts, C., Panzer, U., Anders, H.J. & Rees, A.J. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nature reviews. Immunology* **13**, 738-753 (2013).
145. Yung, S., Cheung, K.F., Zhang, Q. & Chan, T.M. Anti-dsDNA antibodies bind to mesangial annexin II in lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **21**, 1912-1927 (2010).
146. Mortensen, E.S. & Rekvig, O.P. Nephritogenic potential of anti-DNA antibodies against necrotic nucleosomes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **20**, 696-704 (2009).
147. Sekine, H., *et al.* The benefit of targeted and selective inhibition of the alternative complement pathway for modulating autoimmunity and renal disease in MRL/lpr mice. *Arthritis and rheumatism* **63**, 1076-1085 (2011).
148. Lech, M. & Anders, H.J. The pathogenesis of lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **24**, 1357-1366 (2013).
149. Davidson, A. What is damaging the kidney in lupus nephritis? *Nature reviews. Rheumatology* **12**, 143-153 (2016).
150. Chang, A., *et al.* In situ B cell-mediated immune responses and tubulointerstitial inflammation in human lupus nephritis. *Journal of immunology* **186**, 1849-1860 (2011).
151. Kowal, C., *et al.* Human lupus autoantibodies against NMDA receptors mediate cognitive impairment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 19854-19859 (2006).
152. Bravo-Zehnder, M., *et al.* Anti-ribosomal P protein autoantibodies from patients with neuropsychiatric lupus impair memory in mice. *Arthritis & rheumatology* **67**, 204-214 (2015).
153. de Laat, B., Mertens, K. & de Groot, P.G. Mechanisms of disease: antiphospholipid antibodies-from clinical association to pathologic mechanism. *Nat Clin Pract Rheumatol* **4**, 192-199 (2008).
154. McGaha, T.L. & Madaio, M.P. Lupus nephritis: animal modeling of a complex disease syndrome pathology. *Drug Discovery Today: Disease Models* (2014).
155. Andrews, B.S., *et al.* Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *The Journal of experimental medicine* **148**, 1198-1215 (1978).
156. Theofilopoulos, A.N. & Dixon, F.J. Etiopathogenesis of murine SLE. *Immunological reviews* **55**, 179-216 (1981).
157. Adachi, M., Watanabe-Fukunaga, R. & Nagata, S. Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 1756-1760 (1993).
158. Goodnow, C.C. Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell* **130**, 25-35 (2007).
159. Itoh, N., *et al.* The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**, 233-243 (1991).
160. Zhou, T., Bluethmann, H., Eldridge, J., Berry, K. & Mountz, J.D. Origin of CD4-CD8-B220+ T cells in MRL-lpr/lpr mice. Clues from a T cell receptor beta transgenic mouse. *The Journal of Immunology* **150**, 3651-3667 (1993).
161. Moudi, B., Salimi, S., Farajian Mashhadi, F., Sandoughi, M. & Zakeri, Z. Association of FAS and FAS ligand genes polymorphism and risk of systemic lupus erythematosus. *ScientificWorldJournal* **2013**, 176741 (2013).

162. Celhar, T. & Fairhurst, A.M. Modelling clinical systemic lupus erythematosus: similarities, differences and success stories. *Rheumatology (Oxford)* **56**, i88-i99 (2017).
163. Li, W., Titov, A.A. & Morel, L. An update on lupus animal models. *Curr Opin Rheumatol* **29**, 434-441 (2017).
164. Wilkinson, R.D., Williams, R., Scott, C.J. & Burden, R.E. Cathepsin S: therapeutic, diagnostic and prognostic potential. *Biological chemistry* (2015).
165. Turk, V., *et al.* Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta* **1824**, 68-88 (2012).
166. Gupta, S., Singh, R.K., Dastidar, S. & Ray, A. Cysteine cathepsin S as an immunomodulatory target: present and future trends. *Expert Opin Ther Targets* **12**, 291-299 (2008).
167. Chapman, H.A., Riese, R.J. & Shi, G.P. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annual review of physiology* **59**, 63-88 (1997).
168. Jordans, S., *et al.* Monitoring compartment-specific substrate cleavage by cathepsins B, K, L, and S at physiological pH and redox conditions. *BMC Biochem* **10**, 23 (2009).
169. Sukhova, G.K., Shi, G.P., Simon, D.I., Chapman, H.A. & Libby, P. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *The Journal of clinical investigation* **102**, 576-583 (1998).
170. Liu, J., *et al.* Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1359-1366 (2004).
171. Sevenich, L., *et al.* Analysis of tumour- and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S. *Nature cell biology* **16**, 876-888 (2014).
172. Taggart, C.C., *et al.* Cathepsin B, L, and S cleave and inactivate secretory leucoprotease inhibitor. *J Biol Chem* **276**, 33345-33352 (2001).
173. Elmariah, S.B., Reddy, V.B. & Lerner, E.A. Cathepsin S signals via PAR2 and generates a novel tethered ligand receptor agonist. *PLoS one* **9**, e99702 (2014).
174. Shi, G.P., *et al.* Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* **10**, 197-206 (1999).
175. Riese, R.J., *et al.* Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *The Journal of clinical investigation* **101**, 2351-2363 (1998).
176. Saegusa, K., *et al.* Cathepsin S inhibitor prevents autoantigen presentation and autoimmunity. *Journal of Clinical Investigation* **110**, 361-369 (2002).
177. Yang, H., *et al.* Cathepsin S Is Required for Murine Autoimmune Myasthenia Gravis Pathogenesis. *The Journal of Immunology* **174**, 1729-1737 (2005).
178. Baugh, M., *et al.* Therapeutic dosing of an orally active, selective cathepsin S inhibitor suppresses disease in models of autoimmunity. *Journal of autoimmunity* **36**, 201-209 (2011).
179. Rupanagudi, K.V., *et al.* Cathepsin S inhibition suppresses systemic lupus erythematosus and lupus nephritis because cathepsin S is essential for MHC class II-mediated CD4 T cell and B cell priming. *Annals of the rheumatic diseases* **74**, 452-463 (2015).
180. Shen, L., Sigal, L.J., Boes, M. & Rock, K.L. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* **21**, 155-165 (2004).
181. Thanei, S., *et al.* Cathepsin S inhibition suppresses autoimmune-triggered inflammatory responses in macrophages. *Biochem Pharmacol* (2017).

182. Theron, M., *et al.* Pharmacodynamic Monitoring of RO5459072, a Small Molecule Inhibitor of Cathepsin S. *Frontiers in Immunology* **8**(2017).
183. Ting, J.P.-Y. & Trowsdale, J. Genetic Control of MHC Class II Expression. *Cell* **109**, S21-S33.
184. Roche, P.A. & Furuta, K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nature reviews. Immunology* **15**, 203-216 (2015).
185. Hsing, L.C. & Rudensky, A.Y. The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunological reviews* **207**, 229-241 (2005).
186. Riese, R.J., *et al.* Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* **4**, 357-366 (1996).
187. Villadangos, J.A., Riese, R.J., Peters, C., Chapman, H.A. & Ploegh, H.L. Degradation of Mouse Invariant Chain: Roles of Cathepsins S and D and the Influence of Major Histocompatibility Complex Polymorphism. *The Journal of experimental medicine* **186**, 549-560 (1997).
188. Shi, G.-P., *et al.* Role for Cathepsin F in Invariant Chain Processing and Major Histocompatibility Complex Class II Peptide Loading by Macrophages. *The Journal of experimental medicine* **191**, 1177-1186 (2000).
189. Nakagawa, T.Y., *et al.* Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* **10**, 207-217 (1999).
190. Beers, C., Honey, K., Fink, S., Forbush, K. & Rudensky, A. Differential Regulation of Cathepsin S and Cathepsin L in Interferon  $\gamma$ -treated Macrophages. *The Journal of experimental medicine* **197**, 169-179 (2003).
191. Storm van's Gravesande, K., *et al.* IFN Regulatory Factor-1 Regulates IFN-gamma-Dependent Cathepsin S Expression. *The Journal of Immunology* **168**, 4488-4494 (2002).
192. Tolosa, E., *et al.* Cathepsin V is involved in the degradation of invariant chain in human thymus and is overexpressed in myasthenia gravis. *The Journal of clinical investigation* **112**, 517-526 (2003).
193. Nakagawa, T., *et al.* Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* **280**, 450-453 (1998).
194. Stoeckle, C., *et al.* Cathepsin S dominates autoantigen processing in human thymic dendritic cells. *Journal of autoimmunity* **38**, 332-343 (2012).
195. Coughlin, S.R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **3**, 1800-1814 (2005).
196. Rezaie, A.R. Protease-activated receptor signalling by coagulation proteases in endothelial cells. *Thromb Haemost* **112**, 876-882 (2014).
197. Nieman, M.T. Protease-activated receptors in hemostasis. *Blood* **128**, 169-177 (2016).
198. Urban, J.D., *et al.* Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **320**, 1-13 (2007).
199. Lieu, T., *et al.* Antagonism of the proinflammatory and pronociceptive actions of canonical and biased agonists of protease-activated receptor-2. *Br J Pharmacol* **173**, 2752-2765 (2016).
200. Bohm, S.K., *et al.* Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochemical Journal* **314**, 1009-1016 (1996).

201. Nystedt, S., Emilsson, K., Larsson, A.K., Strombeck, B. & Sundelin, J. Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *European journal of biochemistry* **232**, 84-89 (1995).
202. Nystedt, S., Emilsson, K., Wahlestedt, C. & Sundelin, J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 9208-9212 (1994).
203. Molino, M., *et al.* Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem* **272**, 4043-4049 (1997).
204. Riewald, M. & Ruf, W. Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7742-7747 (2001).
205. Briot, A., *et al.* Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *The Journal of experimental medicine* **206**, 1135-1147 (2009).
206. DeFea, K.A., *et al.* beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *The Journal of cell biology* **148**, 1267-1281 (2000).
207. Dery, O., Thoma, M.S., Wong, H., Grady, E.F. & Bunnett, N.W. Trafficking of proteinase-activated receptor-2 and beta-arrestin-1 tagged with green fluorescent protein. beta-Arrestin-dependent endocytosis of a proteinase receptor. *J Biol Chem* **274**, 18524-18535 (1999).
208. Dery, O., Corvera, C.U., Steinhoff, M. & Bunnett, N.W. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *The American journal of physiology* **274**, C1429-1452 (1998).
209. Zhao, P., Metcalf, M. & Bunnett, N.W. Biased signaling of protease-activated receptors. *Front Endocrinol (Lausanne)* **5**, 67 (2014).
210. Stalheim, L., *et al.* Multiple independent functions of arrestins in the regulation of protease-activated receptor-2 signaling and trafficking. *Mol Pharmacol* **67**, 78-87 (2005).
211. Böhm, S.K., Grady, E.F. & Bunnett, N.W. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochemical Journal* **322**, 1-18 (1997).
212. Scott, G., *et al.* The proteinase-activated receptor-2 mediates phagocytosis in a Rho-dependent manner in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **121**, 529-541 (2003).
213. Ayoub, M.A. & Pin, J.P. Interaction of Protease-Activated Receptor 2 with G Proteins and beta-Arrestin 1 Studied by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**, 196 (2013).
214. Zhao, P., *et al.* Cathepsin S causes inflammatory pain via biased agonism of PAR2 and TRPV4. *J Biol Chem* **289**, 27215-27234 (2014).
215. Kumar Vr, S., *et al.* Cathepsin S Cleavage of Protease-Activated Receptor-2 on Endothelial Cells Promotes Microvascular Diabetes Complications. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **27**, 1635-1649 (2016).
216. Ramachandran, R., *et al.* Neutrophil elastase acts as a biased agonist for proteinase-activated receptor-2 (PAR2). *J Biol Chem* **286**, 24638-24648 (2011).
217. Krupiczajc, M.A., Scotton, C.J. & Chambers, R.C. Coagulation signalling following tissue injury: focus on the role of factor Xa. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1228-1237 (2008).
218. Daubie, V., *et al.* Factor Xa and thrombin evoke additive calcium and proinflammatory responses in endothelial cells subjected to coagulation. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 860-869 (2006).

219. Shimizu, T., *et al.* Macrophage migration inhibitory factor is induced by thrombin and factor Xa in endothelial cells. *J Biol Chem* **279**, 13729-13737 (2004).
220. Nystedt, S., Ramakrishnan, V. & Sundelin, J. The Proteinase-activated Receptor 2 Is Induced by Inflammatory Mediators in Human Endothelial Cells: COMPARISON WITH THE THROMBIN RECEPTOR. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 14910-14915 (1996).
221. Bae, J.S., Yang, L. & Rezaie, A.R. Factor X/Xa elicits protective signaling responses in endothelial cells directly via PAR-2 and indirectly via endothelial protein C receptor-dependent recruitment of PAR-1. *J Biol Chem* **285**, 34803-34812 (2010).
222. Feistritzer, C., Lenta, R. & Riewald, M. Protease-activated receptors-1 and -2 can mediate endothelial barrier protection: role in factor Xa signaling. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **3**, 2798-2805 (2005).
223. Kaneider, N.C., *et al.* 'Role reversal' for the receptor PAR1 in sepsis-induced vascular damage. *Nature immunology* **8**, 1303-1312 (2007).
224. Van Bruggen, M.C., Walgreen, B., Rijke, T.P. & Berden, J.H. Attenuation of murine lupus nephritis by mycophenolate mofetil. *Journal of the American Society of Nephrology* **9**, 1407-1415 (1998).
225. Jonsson, C.A., Svensson, L. & Carlsten, H. Beneficial effect of the inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor mycophenolate mofetil on survival and severity of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus (SLE)-prone MRL/lpr mice. *Clin Exp Immunol* **116**, 534-541 (1999).
226. Lui, S.L., *et al.* Effect of mycophenolate mofetil on severity of nephritis and nitric oxide production in lupus-prone MRL/lpr mice. *Lupus* **11**, 411-418 (2002).
227. Teilmann, A.C., *et al.* Physiological and pathological impact of blood sampling by retro-bulbar sinus puncture and facial vein phlebotomy in laboratory mice. *PLoS one* **9**, e113225 (2014).
228. Pfeil, R. Effects of repeated blood samplings on locomotor activity, evasion and wheel-running activity in mice. *Laboratory Animals* **22**, 46-50 (1988).
229. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* **184**, 39-51 (1995).
230. Austin, H.A., Muenz, L.R., Joyce, K.M., Antonovych, T.T. & Balow, J.E. Diffuse proliferative lupus nephritis: Identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney international* **25**, 689-695 (1984).
231. Jackel, C., *et al.* A vector platform for the rapid and efficient engineering of stable complex transgenes. *Scientific reports* **6**, 34365 (2016).
232. Craddock, P.R., Hammerschmidt, D., White, J.G., Dalmosso, A.P. & Jacob, H.S. Complement (C5-a)-induced granulocyte aggregation in vitro. A possible mechanism of complement-mediated leukostasis and leukopenia. *The Journal of clinical investigation* **60**, 260-264 (1977).
233. Boyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum* **97**, 77-89 (1968).
234. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. & Williams, P.M. Real time quantitative PCR. *Genome research* **6**, 986-994 (1996).
235. Winer, J., Jung, C.K., Shackel, I. & Williams, P.M. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for

- monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Analytical biochemistry* **270**, 41-49 (1999).
236. Yatim, K.M. & Lakkis, F.G. A brief journey through the immune system. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **10**, 1274-1281 (2015).
237. Alexander, T., Radbruch, A. & Hiepe, F. [Pathogenesis of systemic lupus erythematosus]. *Zeitschrift fur Rheumatologie* **74**, 183-190 (2015).
238. Turner, D.R. Advances in understanding the morphology of glomerular disease. *Journal of Clinical Pathology* **34**, 1207-1213 (1981).
239. Poltorak, A., *et al.* Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science* **282**, 2085-2088 (1998).
240. Pawar, R.D., *et al.* Bacterial lipopeptide triggers massive albuminuria in murine lupus nephritis by activating Toll-like receptor 2 at the glomerular filtration barrier. *Immunology* **128**, e206-221 (2009).
241. Hoshino, K., *et al.* Pillars Article: Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. *J. Immunol.* 1999. 162: 3749–3752. *The Journal of Immunology* **197**, 2563-2566 (2016).
242. Balomenos, D., Rumold, R. & Theofilopoulos, A.N. Interferon-gamma is required for lupus-like disease and lymphoaccumulation in MRL-lpr mice. *The Journal of clinical investigation* **101**, 364-371 (1998).
243. Guimaraes, P.M., *et al.* Cytokines in systemic lupus erythematosus: far beyond Th1/Th2 dualism lupus: cytokine profiles. *Immunol Cell Biol* (2017).
244. Lourenço, E.V. & Cava, A.L. Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus. *Current molecular medicine* **9**, 242-254 (2009).
245. Theofilopoulos, A.N., Koundouris, S., Kono, D.H. & Lawson, B.R. The role of IFN-gamma in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. *Arthritis Research* **3**, 136-141 (2001).
246. Bombardier, C., *et al.* Derivation of the sledai. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis & Rheumatism* **35**, 630-640 (1992).
247. Nossent, J.C. Course and prognostic value of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index in black Caribbean patients. *Seminars in arthritis and rheumatism* **23**, 16-21 (1993).
248. Gladman, D., *et al.* Systemic lupus international collaborative clinics: development of a damage index in systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology* **19**, 1820-1821 (1992).
249. Webster, A.C., Nagler, E.V., Morton, R.L. & Masson, P. Chronic Kidney Disease. *The Lancet* **389**, 1238-1252 (2017).
250. Bosch, X. Systemic Lupus Erythematosus and the Neutrophil. *New England Journal of Medicine* **365**, 758-760 (2011).
251. Desai, J., *et al.* PMA and crystal-induced neutrophil extracellular trap formation involves RIPK1-RIPK3-MLKL signaling. *European journal of immunology* **46**, 223-229 (2016).
252. Studnicka-Benke, A., Steiner, G., Petera, P. & Smolen, J.S. TUMOUR NECROSIS FACTOR ALPHA AND ITS SOLUBLE RECEPTORS PARALLEL CLINICAL DISEASE AND AUTOIMMUNE ACTIVITY IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS. *Rheumatology* **35**, 1067-1074 (1996).
253. Boswell, J.M., Yui, M.A., Burt, D.W. & Kelley, V.E. Increased tumor necrosis factor and IL-1 beta gene expression in the kidneys of mice with lupus nephritis. *The Journal of Immunology* **141**, 3050-3054 (1988).

254. Brennan, D.C., Yui, M.A., Wuthrich, R.P. & Kelley, V.E. Tumor necrosis factor and IL-1 in New Zealand Black/White mice. Enhanced gene expression and acceleration of renal injury. *The Journal of Immunology* **143**, 3470-3475 (1989).
255. Anders, H.J., *et al.* Activation of toll-like receptor-9 induces progression of renal disease in MRL-Fas(lpr) mice. *FASEB J* **18**, 534-536 (2004).
256. Patole, P.S., *et al.* Expression and regulation of Toll-like receptors in lupus-like immune complex glomerulonephritis of MRL-Fas(lpr) mice. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **21**, 3062-3073 (2006).
257. Pawar, R.D., *et al.* Ligands to nucleic acid-specific toll-like receptors and the onset of lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **17**, 3365-3373 (2006).
258. Pawar, R.D., *et al.* Toll-like receptor-7 modulates immune complex glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **17**, 141-149 (2006).
259. Tato, M., *et al.* Cathepsin S inhibition combines control of systemic and peripheral pathomechanisms of autoimmune tissue injury. *Scientific reports* **7**, 2775 (2017).
260. Gross, O., *et al.* Early angiotensin-converting enzyme inhibition in Alport syndrome delays renal failure and improves life expectancy. *Kidney international* **81**, 494-501 (2012).
261. Coutinho, A., Kazatchkine, M.D. & Avrameas, S. Natural autoantibodies. *Current Opinion in Immunology* **7**, 812-818 (1995).
262. Hayashi, Y., *et al.* Effector Mechanism of Experimental Autoimmune Sialadenitis in the Mouse Model for Primary Sjögren's Syndrome. *Cellular Immunology* **171**, 217-225 (1996).
263. Cattaruzza, F., *et al.* Cathepsin S is activated during colitis and causes visceral hyperalgesia by a PAR2-dependent mechanism in mice. *Gastroenterology* **141**, 1864-1874 e1861-1863 (2011).
264. Ruge, T., Sodergren, A., Wallberg-Jonsson, S., Larsson, A. & Arnlov, J. Circulating plasma levels of cathepsin S and L are not associated with disease severity in patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology* **43**, 371-373 (2014).
265. Zhang, T.P., *et al.* Plasma levels of adipokines in systemic lupus erythematosus patients. *Cytokine* **86**, 15-20 (2016).
266. Manger, K., *et al.* Definition of risk factors for death, end stage renal disease, and thromboembolic events in a monocentric cohort of 338 patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases* **61**, 1065-1070 (2002).
267. Jobs, E., *et al.* Association between serum cathepsin S and mortality in older adults. *Jama* **306**, 1113-1121 (2011).
268. Steubl, D., *et al.* Circulating cathepsin-S levels correlate with GFR decline and sTNFR1 and sTNFR2 levels in mice and humans. *Scientific reports* **7**, 43538 (2017).
269. Hamilton, J.R., Frauman, A.G. & Cocks, T.M. Increased expression of protease-activated receptor-2 (PAR2) and PAR4 in human coronary artery by inflammatory stimuli unveils endothelium-dependent relaxations to PAR2 and PAR4 agonists. *Circulation research* **89**, 92-98 (2001).
270. Ferrell, W.R., *et al.* Essential role for proteinase-activated receptor-2 in arthritis. *Journal of Clinical Investigation* **111**, 35-41 (2003).

## Literaturverzeichnis

271. Dattilio, A. & Vizzard, M.A. Up-regulation of protease activated receptors in bladder after cyclophosphamide induced cystitis and colocalization with capsaicin receptor (VR1) in bladder nerve fibers. *J Urol* **173**, 635-639 (2005).
272. Buddenkotte, J., *et al.* Agonists of proteinase-activated receptor-2 stimulate upregulation of intercellular cell adhesion molecule-1 in primary human keratinocytes via activation of NF-kappa B. *J Invest Dermatol* **124**, 38-45 (2005).
273. Aikawa, E., *et al.* Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease. *Circulation* **119**, 1785-1794 (2009).
274. Chin, A.C., Lee, W.Y., Nusrat, A., Vergnolle, N. & Parkos, C.A. Neutrophil-mediated Activation of Epithelial Protease-Activated Receptors-1 and -2 Regulates Barrier Function and Transepithelial Migration. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **181**, 5702-5710 (2008).
275. Cox, J.M., *et al.* Determination of cathepsin S abundance and activity in human plasma and implications for clinical investigation. *Analytical biochemistry* **430**, 130-137 (2012).
276. Turk, B., Turk, D. & Salvesen, G.S. Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Current pharmaceutical design* **8**, 1623-1637 (2002).
277. Shi, G.P., *et al.* Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *The Journal of clinical investigation* **104**, 1191-1197 (1999).
278. Seok, J., *et al.* Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 3507-3512 (2013).
279. Takao, K. & Miyakawa, T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2014).
280. Stohl, W. & Hilbert, D.M. The discovery and development of belimumab: the anti-BLyS-lupus connection. *Nat Biotechnol* **30**, 69-77 (2012).

### **8 Danksagung**

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Hans-Joachim Anders, der mich über die gesamte Zeit stets unterstützt und auf einzigartige Weise gefördert hat.

Außerdem gilt ein sehr großer Dank meinem Betreuer, Dr. rer. hum. biol Santhosh Kumar Vankayala Ramaiah, der mich in alle Methoden einarbeitete und im Notfall immer wusste, wie eine brenzlige Situation im Labor zu retten war.

Mein Dank geht auch an das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU und allen seinen Mitgliedern des Jahrgangs 2014 für die finanzielle Unterstützung und ausgezeichnete Förderung durch interessante Vorlesungen und Seminare.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen Laborkollegen für die freundschaftliche Zusammenarbeit danken. Insbesondere möchte ich hier PD Dr. rer. biol. hum. Maciej Lech, PD Dr. rer. biol. hum. Shrikant Mulay, M. Sc. Julian Marschner, Dr. Ph.D. Stefanie Steiger, PD Dr. med. Ph.D. Dana Thomasova, Dr. med. Marc Weidenbusch, M. Sc. Biotech. Yajuan Liu, Dr. rer. biol. hum. Simone Romoli, M. Sc. Biotech. Mohammad Mohsen Honarpisheh, Dr. med. Dr. med. univ. Alexander Holderied, Dr. Satish Kumar Devarapu, Dr. rer. biol. hum. Jyaysi Desai und Dr. med. vet. Kirstin Andersen nennen. Ein besonderer Dank geht auch an Janina Mandelbaum, Dan Draganovici, Nuru Eltrich und Ewa Radomska für die exzellente technische Unterstützung, sowie Narci Izidoro da Rocha für die Tierpflege.

Zuletzt möchte ich noch meiner Familie danken, die mir auf meinem Werdegang stets eine wichtige Stütze war, und deren Rat ich sehr schätze.

## Eidesstattliche Versicherung

Tatò, Maia Lucia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchungen zur Rolle von Cathepsin S beim  
experimentellen und humanen  
Systemischen Lupus Erythematodes

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 25.04.2018

Ort, Datum

---

Maia Lucia Tatò