

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Nephrologie

**Kostimulatorische Marker auf folliculären T-Helferzellen in Patienten mit  
systemischem Lupus erythematoses (SLE)**

Inaugural – Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Claudia Scharpenberg geb. Büsing  
aus Varel

2016

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. O. Witzke

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. U. Hillen

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Dezember 2017

**Inhalte dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:**

**C. Buesing**, S. Dolff, B. Wilde, A. Hörning, C. Specker, A. Kribben, O. Witzke (2012):

Analysis of costimulatory marker on follicular T-cells in systemic lupus erythematosus

Kongress für Nephrologie, 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 6.-9. Oktober 2012, Poster 375

**C. Scharpenberg**, S. Dolff, B. Wilde, A. Hörning, C. Specker, A. Kribben, O. Witzke (2015):

Zytokinexpression CD134<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bei Patienten mit systemischem Lupus Erythematoses

Der Internist, March 2015, Volume 56, Issue 1 Supplement, pp 1-71, Z082

**C. Scharpenberg**, B. Wilde, A. Kribben, O. Witzke, S. Dolff (2015):

Expression of costimulatory marker on CD134 and PD1 on T follicular helper cells (Tfh)

Clinical and Experimental Rheumatology, 33/3 may-june 2015 (Suppl. 90)

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 Klinik und Diagnose des SLE</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2 Pathogenese des SLE</b> .....	<b>8</b>
<b>1.3 Definition der folliculären T-Helferzelle (Tfh-Zelle)</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4 Folliculäre T-Helferzellen in Tiermodellen</b> .....	<b>13</b>
<b>1.5 Zielsetzung und Fragestellung</b> .....	<b>14</b>
<b>2 PATIENTEN UND METHODEN</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Untersuchungsmaterial</b> .....	<b>15</b>
2.1.1 Patientencharakteristika .....	15
2.1.2 Gesunde Probanden als Kontrolle.....	18
<b>2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3 Antikörper</b> .....	<b>19</b>
<b>2.4 Geräte</b> .....	<b>19</b>
<b>2.5 Immunphänotypisierung von Lymphozytenpopulationen mit Hilfe der Mehrfarben-Durchflusszytometrie</b> .....	<b>20</b>
2.5.1 Stimulation von heparinisiertem Vollblut.....	20
2.5.2 Markierung der Lymphozyten mit fluorochrom-gekoppelten Antikörpern .....	20
2.5.3 Erythrozytenlyse und Waschen der Zellsuspension .....	22
2.5.4 Messung im Durchflusszytometer und Datenauswertung .....	22
<b>2.6 Statistik</b> .....	<b>24</b>
<b>3 ERGEBNISSE</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1 Kostimulatorische Marker auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen</b> .....	<b>25</b>
3.1.1 CD134 auf unstimulierten CD4 <sup>+</sup> -Zellen .....	25
3.1.2 IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 in stimulierten CD134 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellen .....	27
3.1.3 CD134 auf unstimulierten CD8 <sup>+</sup> -Zellen .....	31
3.1.4 IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 in stimulierten CD134 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> -Zellen .....	33
3.1.5 PD1 auf unstimulierten CD4 <sup>+</sup> -Zellen.....	37
3.1.6 IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 in stimulierten CD4 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup> -Zellen.....	39
3.1.7 PD1 auf unstimulierten CD8 <sup>+</sup> -Zellen.....	43
3.1.8 IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 in stimulierten PD1 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> -Zellen.....	44

3.1.9 IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 in stimulierten CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen.....	46
3.1.10 IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 in stimulierten CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	48
3.1.11 Korrelation der prozentualen Expressionen mit der Krankheitsaktivität .....	50
3.1.12 Korrelation der prozentualen Expressionen mit den Serumkomplementspiegeln .....	52
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>54</b>
<b>4.2 PD1 als Marker für folliculäre T-Helferzellen .....</b>	<b>54</b>
<b>4.2 CD134 als Marker für folliculäre T-Helferzellen .....</b>	<b>54</b>
<b>4.3 Die Rolle der IL-21-Produktion von folliculären T-Helferzellen.....</b>	<b>56</b>
<b>4.4 Die Rolle der IL-22-Produktion von folliculären T-Helferzellen.....</b>	<b>59</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>61</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>62</b>
<b>7. DANKSAGUNG .....</b>	<b>75</b>
<b>8. ANHANG.....</b>	<b>76</b>
<b>8.1 Abbildungen .....</b>	<b>76</b>
<b>8.2 Tabellen .....</b>	<b>77</b>
<b>8.3 Abkürzungen .....</b>	<b>77</b>
<b>8.4 SLEDAI.....</b>	<b>79</b>
<b>9. LEBENS LAUF .....</b>	<b>80</b>

## **1 Einleitung**

Der systemische Lupus erythematodes (SLE) gehört zu den Autoimmunerkrankungen. Unter den Autoimmunerkrankungen wird der SLE zu den Kollagenosen gezählt. Im Rahmen dieser Erkrankung kann es zu verschiedenen Organmanifestationen kommen, die potentiell lebensbedrohlich sind, wie zum Beispiel die Lupusnephritis (LN). Trotz langer und intensiver Forschung ist die Pathogenese des SLE bisher nicht eindeutig geklärt. Die chronische Entzündung unterschiedlichster Gewebe scheint mit einer erhöhten Produktion von Autoantikörpern einher zu gehen, die im Gewebe binden und zu einer Autoimmunreaktion des Immunsystems führen.

### **1.1 Klinik und Diagnose des SLE**

Der SLE weist eine Prävalenz von etwa 37/100.000 Einwohner in Deutschland auf. Frauen, vor allem im gebärfähigen Alter, sind in Deutschland mindestens viermal so häufig betroffen wie Männer (Brinks et al. 2014). Durch eine frühere Diagnose und bessere Therapiemöglichkeiten hat die Morbidität und Mortalität der Erkrankung in den letzten Jahrzehnten signifikant abgenommen (Cervera et al. 2003). Trotzdem ist das Sterberisiko weiterhin zwei- bis vierfach erhöht gegenüber der Normalbevölkerung (Chehab et al. 2011).

Die Diagnose eines SLE wird stets in Zusammenschau der klinischen Befunde, unterstützt durch serologische Untersuchungen, gestellt und orientiert sich an den ACR-Kriterien. Diese Klassifikationskriterien wurden vom American College of Rheumatology (ACR) 1982 herausgegeben und 1997 nochmals modifiziert (Hochberg 1997) (Tabelle 1). Vier dieser elf Kriterien müssen für die Diagnose eines SLE erfüllt sein.

Die klinischen Manifestationen reichen von Allgemeinbeschwerden wie Fieber, Fatigue und Gewichtsverlust bis zu entzündlichen Veränderungen der Organsysteme (Fawzy et al. 2016). Am häufigsten sind der Bewegungsapparat mit Myositiden und Arthritiden sowie die Haut, zum Beispiel mit einem Schmetterlingserythem im Bereich des Gesichtes, betroffen (Fischer-Betz et al. 2005). Ungefähr die Hälfte der Patienten erfährt im Laufe der Erkrankung einen Befall der Niere in Form einer LN, die Morbidität und Mortalität entscheidend beeinflusst (Hanly et al.

2016). Hinweise auf den Nierenbefall können der Nachweis von Akanthozyten oder Erythrozytenzylindern im Urinsediment sowie eine Proteinurie sein. Die Sicherung der Diagnose erfolgt nach Möglichkeit über eine Nierenbiopsie (Aringer et al. 2016; Bertsias et al. 2012; Mahmood et al. 2016). Die LN zeigt mikroskopisch vielfältige glomeruläre Läsionen, die sich nach der WHO-Klassifikation in Klasse I-VI einteilen lassen (Weening et al. 2004). Die Manifestationen im kardiovaskulären System sind ebenfalls als Haupttodesursache für die SLE-Patienten bedeutsam (Chehab et al. 2011). Unter anderem kann es zu einer frühzeitigen Arteriosklerose, einer Perikarditis und Myokarditis kommen (Fischer-Betz et al. 2005). Wesentlich seltener sind eine pulmonale Beteiligung mit einer Pleuritis oder einer Lungenfibrose und Manifestationen im Bereich der Nervensystems wie kognitiven Einschränkungen, Psychosen oder periphere Neuropathien (Fischer-Betz et al. 2005).

Ergänzend erfolgt eine Labordiagnostik, die häufig Auffälligkeiten im Rahmen des SLE zeigt. Im Differenzialblutbild kann eine Verminderung der Zellreihen (Thrombozytopenie, Leukopenie, Lymphozytopenie, Anämie) zu sehen sein. Eine typische Befundkonstellation ist die Erhöhung der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) bei normwertigem oder lediglich diskret erhöhtem C-reaktiven Protein (CRP). Antikörper gegen nukleäre Antigene (ANA) sind in den meisten Fällen erhöht und lassen sich durch den ANA-Titer abbilden, der allerdings keine Rolle im Monitoring der Krankheitsaktivität spielt, sondern vornehmlich zur Stellung der Diagnose beiträgt. Anders verhält es sich mit den spezifischen Antikörpern gegen Doppelstrang-DNA (anti-dsDNA-Antikörper), deren Erhöhung in der Regel einem Schub der Erkrankung vorausgeht (Bootsma et al. 1996; Hahn 1998). Ein anderer Hinweis auf eine Aktivitätssteigerung stellt ein Komplementverbrauch der Komplementfaktoren C3 und C4 dar. Neben den anti-dsDNA-Antikörper sind die Antikörper gegen das Smith-Antigen (anti-Sm-Antikörper) ebenfalls spezifisch für den SLE. Sie gehören zu den extrahierbaren antinukleären Antikörpern (ENA-Antikörper), von denen im Rahmen des SLEs auch anti-Ro- und anti-C1q-Antikörper nachweisbar sein können. Auch die Antiphospholipid-Antikörper sind häufig positiv (Fischer-Betz et al. 2005; Garabet et al. 2016).

## 11 ACR-Kriterien

---

- Schmetterlingserythem
  - Diskoide Hautveränderungen
  - Photosensitivität
  - Orale Ulzerationen
  - Nicht-erosive Arthritis
  - Serositis (Perikarditis oder Pleuritis)
  - pathologische Nierenbefunde
  - Neurologische Erkrankungen (Psychosen, Krampfanfälle)
  - Hämatologische Erkrankungen: Hämolytische Anämie mit Retikulozyten oder Leukozytopenie  $< 4000/\mu\text{l}$  oder Lymphozytopenie  $< 1500/\mu\text{l}$  oder Thrombozytopenie  $< 100.000/\mu\text{l}$
  - immunologische Auffälligkeiten (Anti-Doppelstrang-DNA-, -Smith-, Antiphospholipidantikörper)
  - Antinukleäre Antikörper (ANA) in der Immunfluoreszenz
- 

**Tabelle 1: ACR-Kriterien.** 11 ACR-Kriterien (American Rheumatology Association/ American College of Rheumatology), die 1997 modifiziert wurden (Hochberg 1997).

### 1.2 Pathogenese des SLE

Die genauen Mechanismen bei der Entstehung eines SLE sind bis zum heutigen Zeitpunkt nicht bekannt. Eine Theorie sieht die nukleären Bestandteile apoptotischer Zellen im Mittelpunkt der Pathogenese. Durch das Freiwerden dieser Zellkernbestandteile werden sie für das Immunsystem als Antigene sichtbar und es kommt zur Autoantikörperbildung. Im Verlauf kann es durch die Formation mit den Antigenen zur Bildung von Immunkomplexen kommen. Diese Immunkomplexe induzieren möglicherweise direkt die Entzündung in den unterschiedlichen Gewe-



ben. So wurden sie etwa bei der LN gefunden. Darüber hinaus ist eine direkte Stimulation einer Zytokin-Antwort von dendritischen Zellen durch die nukleären Bestandteile beschrieben (Dye et al. 2013; Tsokos 2011). Die Produktion von Antikörpern ist B-Zell-abhängig. Daher sprach man zunächst von einer Erkrankung, die hauptsächlich durch eine gestörte B-Zell-Antwort und damit einhergehender Autoantikörperproduktion gekennzeichnet sei. Die Akkumulation dieser Autoantikörper induziere die Entzündung verschiedener Gewebe (Reichwald et al. 2014). Darauf folgende experimentelle Studien ergaben Hinweise, dass die T-Zellen maßgeblich für die verstärkte Produktion von Autoantikörpern durch die B-Zellen verantwortlich sein könnten, indem sie der B-Zelle zur Differenzierung, Proliferation und Reifung verhelfen (Shlomchik et al. 2001). So geht man von einer naiven T-Zelle aus, die sich nach Kontakt mit einer dendritischen Zelle in verschiedene Richtungen entwickeln kann (Abbildung 1). Der Kontakt wird vornehmlich durch den MHC/Antigen-Komplex der antigenpräsentierenden dendritischen Zelle und dem T-Zell-Rezeptor auf der naiven T-Zelle, aber in entscheidender Weise auch durch sogenannte kostimulatorische Moleküle, vermittelt (Finney et al. 2004). Diese beeinflussen die Differenzierung und somit die Funktion der T-Zelle in späteren Phasen (So et al. 2006). Neben gut charakterisierten kostimulatorischen Molekülen auf T-Zellen wie CD28 und CD152, die an CD80 und CD86 auf antigenpräsentierenden Zellen binden, gehören auch CD134 und PD1 zu diesen Molekülen (Watts et al. 1999).

Das Rezeptormolekül CD134 gehört zur Familie der tumor necrosis factor (TNF)-Rezeptoren und befindet sich membrangebunden vor allem auf aktivierten CD4<sup>+</sup>-Zellen. Der entsprechende Ligand CD134L ist auf antigenpräsentierenden Zellen zu finden (Weinberg 2002). Die Interaktion von CD134 und CD134L führt bei aktivierten T-Zellen dazu, dass sie nicht vom Immunsystem entfernt werden, sondern zu langlebigen T-Zellen (Memory-T-Zellen) werden. Eine erhöhte Langlebigkeit könnte zur Entwicklung einer Autoimmunerkrankung wie dem SLE beitragen (Weinberg et al. 2004). Durch die Bindung von CD134 an CD134L wird außerdem die Proliferation und die Differenzierung von B-Zellen verstärkt und damit auch eine erhöhte Antikörperbildung induziert (Manku et al. 2009). CD134<sup>+</sup>-Zellen wurden bereits bei Lupusnephritis in der Nierenbiopsie nachgewiesen (Dolff et al. 2010).

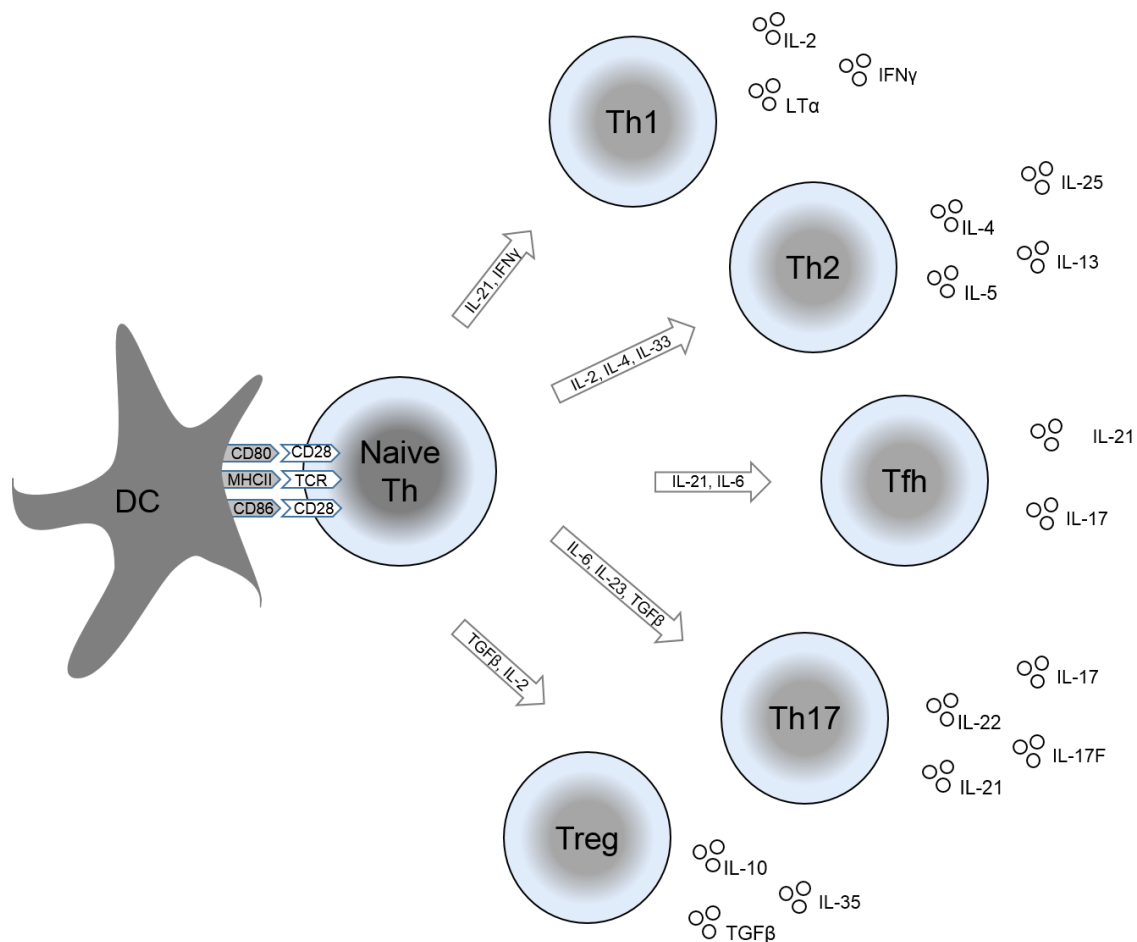
Ein wichtiges inhibitorisches kostimulatorisches Molekül ist der programmed death 1-Rezeptor (PD1-Rezeptor), der auf reifen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen, natürlichen Killerzellen, B-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen zu finden ist. Durch seine inhibitorische Funktion vermittelt er die Balance, die für eine erfolgreiche Immunantwort und gleichzeitige Selbsttoleranz gegenüber körpereigenen Strukturen erforderlich ist. PD1 interagiert mit zwei Liganden, PD-L1 und PD-L2. PD-L1 wird auf hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen, vor allem auf B-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und Mastzellen exprimiert. Der Ligand wird bei Aktivierung dieser Zellen hochreguliert (Francisco et al. 2010; Pedoeem et al. 2014). Für PD-L1 wurde eine erhöhte Expression auf Neutrophilen von SLE-Patienten sowie eine Korrelation der Expression mit der Krankheitsaktivität gefunden (Luo et al. 2016).

Ein wichtiger Pfad für die Krankheitsentstehung des SLE führt von der naiven T-Zelle zu einer folliculären T-Helferzelle, die im Lymphknoten mit den B-Zellen unter Mithilfe von IL-6, IL-21 und ICOS interagiert und damit die Autoantikörperproduktion induziert. Ein anderer wichtiger Pfad führt zu einer Th17-Zelle, die zu den Effektor-CD4-Zellen gehört. Sie greifen durch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie etwa IL-1, IL-6, IL-17 und IL-23 in die Entwicklung der naiven T-Zellen ein, indem sie beispielsweise die mitochondriale Nucleinsäure-Transkription (mRNA-Transkription) verschiedener Gene beeinflussen (Crotty 2014; K. M. Murphy et al. 2010).

Eine zentrale Rolle kommt dem Zytokin IL-21 zu, das die Interaktion zwischen T- und B-Zellen durch den IL-21-Rezeptor auf B-Zellen vermittelt. Die Expression des Rezeptors auf den B-Zellen erhöht sich mit der Reife und der Aktivität der Zelle (Jin et al. 2004). Die Kommunikation zwischen den folliculären T-Helferzellen und den B-Zellen wird neben IL-21/IL-21R über CD28/CD86, CD40/CD40L, ICOS/ICOSL und TCR/MHCII vermittelt und führt dazu, dass die B-Zellen sich zu Memory-B-Zellen und langlebigen Plasmazellen differenzieren. Dies geschieht durch die Aktivierung der JAK/STAT3-Signalkaskade, die zur Expression von den Transkriptionsfaktoren Blimp-1 (Differenzierung zur Memory-B-Zelle) und Bcl-6 (Differenzierung zur Plasmazelle) führen. Die Differenzierung in diese beiden Zelltypen steht im Gleichgewicht und wird durch einen negativen Feedbackmecha-

nismus reguliert (Deng et al. 2015). IL-21 reguliert darüber hinaus die Erzeugung von folliculären T-Helferzellen (Th-Zellen) in autokriner Weise (Vogelzang et al. 2008).

IL-22 ist ein anderes Zytokin, das durch eine proinflammatorische Wirkung eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und entzündlichen Erkrankungen spielt (Ikeuchi et al. 2005). Mehrere Zelltypen produzieren IL-22. Darunter sind Th22, Th1 und Th17-Zellen sowie natürliche Killerzellen zu nennen (Chung et al. 2006; Duhon et al. 2009; Liang et al. 2006; Trifari et al. 2009).



**Abbildung 1: T-Zelldifferenzierung.** Die Entwicklung verschiedener T-Zelltypen aus einer naiven T-Helferzelle (naive Th), nachdem diese Kontakt zu einer dendritischen Zelle hatte (DC), abhängig vom vorherrschenden Zytokinmilieu (Fazilleau et al. 2009; King et al. 2008)). IL = Interleukin. LT $\alpha$  = Lymphotoxin alpha. Tfh = folliculäre T-Helferzelle. TGF- $\beta$  = Transforming growth factor-beta. Treg = T-regulatorische Zelle.

### **1.3 Definition der folliculären T-Helferzelle (Tfh-Zelle)**

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sind Helferzellen und besitzen sowohl Effektor- als auch regulatorische Eigenschaften. Durch die regulatorische Funktion können sie die Immunantwort entweder in Richtung Entzündung oder Toleranz lenken. Bei Autoimmunerkrankungen ist die Balance zugunsten der Inflammation verschoben (Reichwald et al. 2014). Effektorzellen können anhand ihrer Leitzytokine (IFN $\gamma$ , IL-4, IL-17) in verschiedene Gruppen unterteilt werden (z.B. Th1-, Th2-, Th17-Zellen). Eine weitere, neu beschriebene T-Zellpopulation ist die folliculäre T-Helferzellpopulation, die in dieser Arbeit charakterisiert werden soll. Diese Zellen üben ihre Funktion in den Lymphfollikeln durch die Bildung der Keimzentrumsantwort aus, indem sie die Bildung von Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen fördern (Deenick et al. 2011). Das führt zu einer erhöhten klonalen Autoantikörperproduktion (Shlomchik et al. 2001) und daraus folgender Entzündung verschiedener Gewebe und Organe (Tsokos 2011). Die Expression vom Chemokin-Rezeptor 5 (CXCR5) auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ist dabei ein möglicher Marker zur Identifizierung der folliculären-T-Helferzellen (Crotty 2011). Xu et al. nutzten die Kombination aus CXCR5 und den T-Zell-Aktivierungsmarker ICOS (Inducible T-cell Costimulator), um die folliculären Helferzellen unter den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu identifizieren. Ma et al. wiesen bereits eine erhöhte folliculäre T-Helferzell-Population bei Patienten mit rheumatoider Arthritis nach (Ma et al. 2012). Der Gruppe um Xu gelang dies auch für Lupuspatienten. Darüber hinaus konnten sie eine Korrelation zwischen diesen Zellen und sowohl der Krankheitsaktivität mittels SLEDAI als auch der Antikörperproduktion zeigen. Es lässt sich der Schluss ziehen, dass die erhöhten Antikörpertiter in direktem Zusammenhang mit der erhöhten Frequenz der folliculären T-Helferzellen (Tfh-Zellen) stehen. Unterstützt wird diese Annahme durch einen Versuch derselben Arbeitsgruppe, in dem CD4<sup>+</sup>-Zellen aktiviert wurden, um sie zur Differenzierung zu Tfh-like-cells zu stimulieren. Diese Tfh-like-cells produzierten erheblich mehr IgG (Immunglobulin G). Zusätzlich produzierten diese Zellen von SLE-Patienten mehr IgG als von gesunden Kontrollen (Xu et al. 2015). Insgesamt könnten die folliculären T-Helferzellen ein mögliches Ziel für zukünftige Medikamente darstellen (Blanco et al. 2016).

#### 1.4 Follikuläre T-Helferzellen in Tiermodellen

Es wurden bereits verschieden Mausmodelle zur Erforschung des SLE entwickelt, die unter anderem Erkenntnisse über T-Helferzellen ermöglichen. Das MRL<sup>lpr/lpr</sup> FAS-deficient-Mausmodell entwickelt Lupus mit spontaner Ausbildung von Arthritiden aufgrund der Abwesenheit von FAS (Watanabe-Fukunaga et al. 1992). Da dieser Rezeptor bei Lupus-Patienten nicht fehlt, ist die Interpretation der Versuche begrenzt. In diesem Mausmodell konnte bewiesen werden, dass IL-21 eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Lupus hat. Es wurde gezeigt, dass sowohl die Autoantikörperproduktion als auch Proteinurie, glomeruläre IgG-Deposits, Hautveränderungen und Lymphadenopathie weniger häufig vorkommen als bei Kontrollmäusen, wenn der Rezeptor von IL-21 auf B-Zellen geblockt wird (Herber et al. 2007). Außerdem reduzierte sich die Anzahl an T-Lymphozyten der Milz und der veränderten B-Lymphozyten. Ähnliche Ergebnisse erbrachte das genetische Entfernen von IL-21R im BXSB-Yaa-Lupus-Mausmodell. Die BXSB-Yaa-Mäuse entwickeln besonders schwere Ausprägung des SLE durch eine Mutation auf dem Y-Chromosom mit lymphoide Hyperplasie, Monozytose, Hypergammaglobulinämie, und eine schwere immunkomplexvermittelte Glomerulonephritis (Bubier et al. 2009).

Allerdings bestätigen sich die Erkenntnisse aus Mausmodellen und Patientenstudien nicht immer gegenseitig, so dass die Funktion der folliculären T-Helferzellen in den beiden Spezies möglicherweise unterschiedlich bewertet werden müssen (Crotty 2014).

## **1.5 Zielsetzung und Fragestellung**

Ziel dieser Arbeit war es die IL-21-produzierenden folliculären T-Helferzellen bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses zu charakterisieren, indem die Expression von Oberflächenmolekülen (CD134, PD1) und intrazellulären Markern (IL-21, IL-22, IFN $\gamma$ ) bestimmt wurden.

Folgende Fragen wurden zu diesem Zweck untersucht:

1. Gibt es Unterschiede in der Expression dieser Oberflächenmarker und intrazellulärer Marker zwischen Patienten mit systemischem Lupus erythematoses und gesunden Kontrollen?
2. Ist die Expression der Oberflächenmarker und intrazellulären Marker abhängig von der Aktivität des systemischen Lupus erythematoses?
3. Ist die Expression der Oberflächenmarker und intrazellulären Marker abhängig vom Vorliegen einer Lupusnephritis?

## **2 Patienten und Methoden**

### **2.1 Untersuchungsmaterial**

#### **2.1.1 Patientencharakteristika**

In der vorliegenden Arbeit wurde heparinisiertes Blut von 39 Patienten mit SLE und 19 gesunden Kontrollen untersucht. Davon waren 36 Patienten weiblich und 3 Patienten männlich. Die Diagnose eines SLE wurde an Hand der ACR (Tabelle 1) gestellt, was voraussetzt, dass sie mindestens 4 der 11 Kriterien erfüllen (Hochberg 1997). Die Patienten wurden in der Ambulanz der Klinik für Nephrologie des Universitätsklinikums Essen (Prof. Dr. med. Kribben) und der Klinik für Klinische Immunologie und Rheumatologie der Kliniken Essen-Süd (Prof. Dr. med. Specker) behandelt. Zum Zeitpunkt des Einschlusses erhielten die Patienten eine Blutentnahme zur Bestimmung der Entzündungsparameter und der Nierenwerte sowie eine körperliche Untersuchung zur Bestimmung der Krankheitsaktivität durch den systemic lupus erythematosus disease activity index (SLEDAI) (Weening et al. 2004). Eine Genehmigung durch die Ethikkommission liegt vor (Nr. 05 -2803). Alle Patienten gaben ihr Einverständnis ab. Als Einschlusskriterien galten das Vorliegen eines SLE nach den ACR-Kriterien (Hochberg 1997) und Volljährigkeit. Ausschlusskriterien stellten eine Schwangerschaft, ein akuter oder chronischer Infekt sowie eine aktuelle Endoxanstoßtherapie oder Rituximabtherapie dar.

Das durchschnittliche Alter der Patienten lag bei  $40 \pm 14$  Jahren. Das Geschlechterverhältnis bei 12:1 (w:m). Die Krankheitsaktivität anhand des SLEDAI lag im Median bei zwei und hatte eine Verteilung von 0-28. Eine aktive Krankheit wurde als SLEDAI  $>4$  definiert. Patienten mit einem SLEDAI  $\leq 4$  wurden als inaktiv definiert (Wu et al. 2015). In der Kohorte zeigten nach dieser Definition sieben Patienten eine erhöhte Krankheitsaktivität. 13 Patienten hatten eine bioptisch gesicherte LN gemäß der WHO-Klassifikation (Weening et al. 2004). Der Serumkreatininwert von Patienten ohne Lupus-Nephritis lag bei einem Median von 0,82 mg/dl (0,40-2,10 mg/dl) und von Patienten mit Lupus-Nephritis bei 1,06 mg/dl (0,46–2,23 mg/dl). Außerdem wurden die Patienten hinsichtlich ihrer immunsuppressiven Therapie charakterisiert. Ein Patient erhielt keine Medikamente, 32 Patienten bekamen Glukokortikoide in einer medianen Dosis von 5 mg/Tag (2,5-60 mg/Tag). 17 Patienten wurden mit Hydroxychloroquin behandelt mit einer medianen Dosis

von 200 mg/Tag (200-400 mg/Tag) und zwei Patient mit Methotrexat (15 mg/Woche). Neun Patienten wurden mit Azathioprin therapiert, wobei die mediane Dosis 125 mg/Tag (25-250 mg/Tag) betrug. Mit Mycophenolatmofetil wurden 14 Patienten bei einer medianen Dosis von 1500 mg/Tag (360-2000 mg/Tag) behandelt. Mit Cyclophosphamid wurden vier Patienten behandelt. Die mediane Dosis betrug 200 mg/Tag (100-300 mg/Tag) (Tabelle 2).



	SLE-Patienten	Gesunde Kontrollen	p-Wert
<b>Anzahl</b>	39	19	
<b>Frauen/Männer</b>	12/1	18/1	n.s.
<b>Alter (Jahre, Mittelwert <math>\pm</math>SD)</b>	40 $\pm$ 14	36 $\pm$ 12	n.s.
<b>SLEDAI (Median (Bereich))</b>	2 (0-28)		
Aktive Patienten (SLEDAI >4)	7		
Inaktive Patienten (SLEDAI $\leq$ 4)	32		
<b>Lupusnephritis, n</b>	13		
Klasse II, n	2		
Klasse III, n	1		
Klasse IV, n	4		
Klasse V, n	6		
<b>Medikamentöse Behandlung</b>			
<b>Keine, n</b>	1	19	
<b>Prednisolon, n</b>	32		
<i>Mediane Dosis in mg/Tag</i>	5		
<i>(Bereich) in mg/d</i>	(2,5-60)		
<b>Hydroxychloroquin, n</b>	17		
<i>Mediane Dosis in mg/Tag</i>	200		
<i>(Bereich) in mg/Tag</i>	(200-400)		
<b>Methotrexat, n</b>	2		
<i>Mediane Dosis in mg/Woche</i>	15		
<i>(Bereich) in mg/Woche</i>	(15-15)		
<b>Azathioprin, n</b>	9		
<i>Mediane Dosis in mg/Tag</i>	125		
<i>(Bereich) in mg/Tag</i>	(25-250)		
<b>Mycophenolatmofetil, n</b>	14		
<i>Mediane Dosis in mg/Tag</i>	1500		
<i>(Bereich) in mg/Tag</i>	(360-2000)		
<b>Cyclophosphamid, n</b>	3		
<i>Mediane Dosis in mg/Tag</i>	200		
<i>(Bereich) in mg/Tag</i>	(100-300)		

**Tabelle 2: Patientencharakteristika.** Eine Übersicht der untersuchten Patienten und gesunden Kontrollen. Die Patienten wurden nach Aktivität mittels systemic lupus erythematosus disease activity index (SLEDAI), Lupusnephritis-Klasse und medikamentöser Behandlung charakterisiert. Die Medianwerte der Medikamentendosen beziehen sich lediglich auf die Patientenkohorte, die das jeweilige Medikament nahm. SD = Standardabweichung.

### 2.1.2 Gesunde Probanden als Kontrolle

Zum Vergleich wurde bei jeder Messung mindestens eine gesunde Kontrolle mitgeführt, insgesamt 19. Das Geschlechterverhältnis betrug 18:1 (w:m). Das durchschnittliche Alter betrug  $36 \pm 12$  Jahre. Hinsichtlich dieser Parameter gab es keinen signifikanten Unterschied zu den Patienten. Keine der Kontrollen nahm zum Zeitpunkt der Untersuchung eine immunsuppressive Therapie ein. Es lag zum Zeitpunkt der Blutentnahme klinisch und anamnestisch kein Infekt vor. Familienanamnestisch ließen sich keine immunologischen oder renalen Krankheitsbilder eruieren. Das Einverständnis aller Probanden liegt vor.

### 2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien / Verbrauchsmaterial	Hersteller
Aqua dest.	Millipore-Verfahren
Brefeldin A	Sigma
Calcium Ionophore	Sigma
DMSO	Zentralapotheke Essen Universitätsklinikum
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco®
Eppendorf epTIPS Standard/Bulk 0,1 – 10 µl	Eppendorf
Ethanol 70 %	Zentralapotheke Essen Universitätsklinikum
Fetal Calf Serum	Biowest
Fix and Perm® Cell Permeabilization Kit	Invitrogen™
FlowClean Cleaning Agent	Beckman Coulter
IsoFlow™ Sheath Fluid	Beckman Coulter
Peha-soft nitrile Fino Handschuhe	Hartmann
Phorbol 12-myristate 13-acetate = PMA	Sigma
Pipettenspitzen 1000 µl, blau	Sarstedt
Pipettenspitzen 200 µl, gelb	Sarstedt
RPMI Medium 1640 [+] L-Glutamine	Gibco®
Test Tubes	Beckman Coulter
Waste Container	Beckman Coulter

**Tabelle 3: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.** Eine Übersicht der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sowie des Herstellers.

## 2.3 Antikörper

Antikörper gegen	Klon	Ig-Subklasse	Hersteller
CD3	UCHT1	IgG1 kappa, mouse	Beckman Coulter
CD8	B9.11	IgG. Mouse	Beckman Coulter
IL-21	eBio3A3-N2	IgG1 kappa, human	eBioscience
IL-22	22URT1	IgG1, kappa, human	eBioscience
IFN $\gamma$	4S.B3	IgG1 kappa, mouse	eBioscience
CD279 (PD1)	PD1	IgG2b, mouse	Beckman Coulter
CD134	Ber-ACT35	IgG1, mouse	Beckman Coulter
IgG1 PE Isotypic Control	679.1Mc7	IgG1, mouse	Beckman Coulter

**Tabelle 4: Antikörper.** Eine Übersicht der verwendeten Antikörper. IFN $\gamma$  = Interferon-gamma. IL = Interleukin. PD1 = programmed death 1. IgG = Immunglobulin G.

## 2.4 Geräte

Instrumente / Geräte	Hersteller, Land
CO <sub>2</sub> Brutschrank HERAccl <sup>®</sup> 150	Thermo Scientific, USA
Computer von FACS-Maschine	Hewlett-Packard Company
Kaluza Flow Analysis Software 1.2	Beckman Coulter, USA
Navios FACS-Maschine	Beckman Coulter, USA
Navios Software	Beckman Coulter, USA
Pipette Eppendorf Reference <sup>®</sup> variabel 100-1000 $\mu$ l	Eppendorf, Deutschland
Pipette Eppendorf Research <sup>®</sup> 0,5-10 $\mu$ l	Eppendorf, Deutschland
Pipette Finnpipette <sup>®</sup> 20-200 $\mu$ l	Thermo Scientific, USA
Pipette Finnpipette <sup>®</sup> 5-40 $\mu$ l	Thermo Scientific, USA
Pipettenkarussell für 6 Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERAsafe <sup>®</sup> KS	Thermo Scientific, USA
Vakuum-Pumpe Nalgene	Thermo Scientific, USA
Zentrifuge Rotina 35 R	Hettich, Deutschland

**Tabelle 5: Instrumente und Geräte.** Die Übersicht der verwendeten Instrumente und Geräte sowie der Hersteller und des Herkunftslandes. USA = United States of America.

## **2.5 Immunphänotypisierung von Lymphozytenpopulationen mit Hilfe der Mehrfarben-Durchflusszytometrie**

### **2.5.1 Stimulation von heparinisiertem Vollblut**

Zunächst werden die Zellen *ex-vivo* in einem Vollblutansatz stimuliert. Die folgenden Schritte werden unter einer sterilen Werkbank vorgenommen, um eine Stimulation durch Verunreinigung zu vermeiden. 200 µl heparinisiertes Vollblut wurden mit der gleichen Menge Rosman Park Memorial Institute Lösung (RPMI)-1640 Medium versetzt. Calcium-Ionophore in DMSO (Dimethylsulfoxide) gelöst, wird in ein Verhältnis 20 µl Calcium-Ionophore in 880 µl RPMI-1640 gebracht. 2 µl in DMSO gelöstes PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) wird zu 2 ml RPMI-1640 gegeben. Die Hälfte der Röhrchen wird mit 32 µl des Calcium-Ionophore-Gemisches und 20 µl des PMA-Gemisches stimuliert. In einem Kontrollansatz werden 200 µl heparinisiertes Vollblut mit der gleichen Menge RPMI-1640 Medium ohne Hinzufügen der Stimuli versetzt. Sowohl bei dem stimulierten als auch dem unstimulierten Ansatz wird 4 µl Brefeldin A hinzugegeben, das im Wesentlichen die Sekretion von Proteinen verhindert, indem es den Golgi-Apparat blockiert. Anschließend inkubieren die Proben 4 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### **2.5.2 Markierung der Lymphozyten mit fluorchrom-gekoppelten Antikörpern**

Nach der Inkubation werden die Proben mit Waschpuffer bestehend aus FCS (Fetal Calf Serum) und PBS (phosphat buffered salin) in einer fünfprozentige Verdünnung gewaschen und 5 Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert, um anschließend mit den Oberflächenmarkern für 15 Minuten im dunklen Raum bei Raumtemperatur inkubiert zu werden. Die Antikörper sind fluorchrom-markiert und vortitriert. Sie werden in einer Menge von 2,5 bis 20 µl hinzugegeben.

Als Fluoreszinfarbstoffe kamen folgende zum Einsatz:

Fluoreszin Isothiocyanate (FITC)

Phycoerythrin (PE)

Peridiniumchlorophyll-Protein (PerCP)

Phycoerytherin-Cyanin7 (PC7)

Pacific Blue

Krome Orange

efluor660

Folgende Antikörperkombinationen wurden verwendet:

<b>a.</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
	<b>unstimuliert</b>	<b>unstimuliert</b>	<b>stimuliert</b>	<b>stimuliert</b>
	<b>Isotyp</b>	<b>Färbung</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Färbung</b>
<b>FITC</b>	IFN $\gamma$ (7,5 $\mu$ l)	IFN $\gamma$ (7,5 $\mu$ l)	IFN $\gamma$ (7,5 $\mu$ l)	IFN $\gamma$ (7,5 $\mu$ l)
<b>PE</b>	Isotyp (20 $\mu$ l)	CD134 (20 $\mu$ l)	Isotyp (20 $\mu$ l)	CD134 (20 $\mu$ l)
<b>efluor660</b>	IL-21 (5 $\mu$ l)	IL-21 (5 $\mu$ l)	IL-21 (5 $\mu$ l)	IL-21 (5 $\mu$ l)
<b>PC7</b>	Isotyp (20 $\mu$ l)	CD279 (20 $\mu$ l)	Isotyp (20 $\mu$ l)	CD279 (20 $\mu$ l)
<b>Pacific Blue</b>	CD8 (10 $\mu$ l)	CD8 (10 $\mu$ l)	CD8 (10 $\mu$ l)	CD8 (10 $\mu$ l)
<b>Krome Orange</b>	CD3 (10 $\mu$ l)	CD3 (10 $\mu$ l)	CD3 (10 $\mu$ l)	CD3 (10 $\mu$ l)

<b>b.</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
	<b>unstimuliert</b>	<b>unstimuliert</b>	<b>stimuliert</b>	<b>stimuliert</b>
	<b>Isotyp</b>	<b>Färbung</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Färbung</b>
<b>FITC</b>	IFN $\gamma$ (7,5 $\mu$ l)	IFN $\gamma$ (7,5 $\mu$ l)	IFN $\gamma$ (7,5 $\mu$ l)	IFN $\gamma$ (7,5 $\mu$ l)
<b>PE</b>	Isotyp (20 $\mu$ l)	CD134 (20 $\mu$ l)	Isotyp (20 $\mu$ l)	CD134 (20 $\mu$ l)
<b>efluor660</b>	IL-22 (5 $\mu$ l)	IL-22 (5 $\mu$ l)	IL-22 (5 $\mu$ l)	IL-22 (5 $\mu$ l)
<b>PC7</b>	Isotyp (20 $\mu$ l)	CD279 (20 $\mu$ l)	Isotyp (20 $\mu$ l)	CD279 (20 $\mu$ l)
<b>Pacific Blue</b>	CD8 (10 $\mu$ l)	CD8 (10 $\mu$ l)	CD8 (10 $\mu$ l)	CD8 (10 $\mu$ l)
<b>Krome Orange</b>	CD3 (10 $\mu$ l)	CD3 (10 $\mu$ l)	CD3 (10 $\mu$ l)	CD3 (10 $\mu$ l)

**Tabelle 6: Antikörperkombinationen mit IL-21 (a.) und mit IL-22 (b.).** Eine Übersicht der verwendeten Antikörperkombinationen im unstimulierten und stimulierten Versuchsansatz. IFN $\gamma$  = Interferon-gamma. IL = Interleukin. FITC = Fluoreszin Isothiocyanate. PC7 = Phycoerytherin-Cyanin7.

### **2.5.3 Erythrozytenlyse und Waschen der Zellsuspension**

Die Proben werden 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen mit Reagent A aus dem Fix and Perm<sup>®</sup> Cell Permeabilization Kit inkubiert und fixiert. Nach einem erneuten Waschschriff und einer erneuten Zentrifugation wird 100 µl des entsprechenden Reagent B aus demselben Kit zur Permeabilisation hinzugefügt. Die intrazellulären Marker IL-21, IL-22 und IFN $\gamma$  werden hinzugegeben und inkubieren 20 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur. Es schließt sich ein erneutes Waschen und Zentrifugieren an. Abschließend werden die Proben in 450 µl Waschlösung resuspendiert.

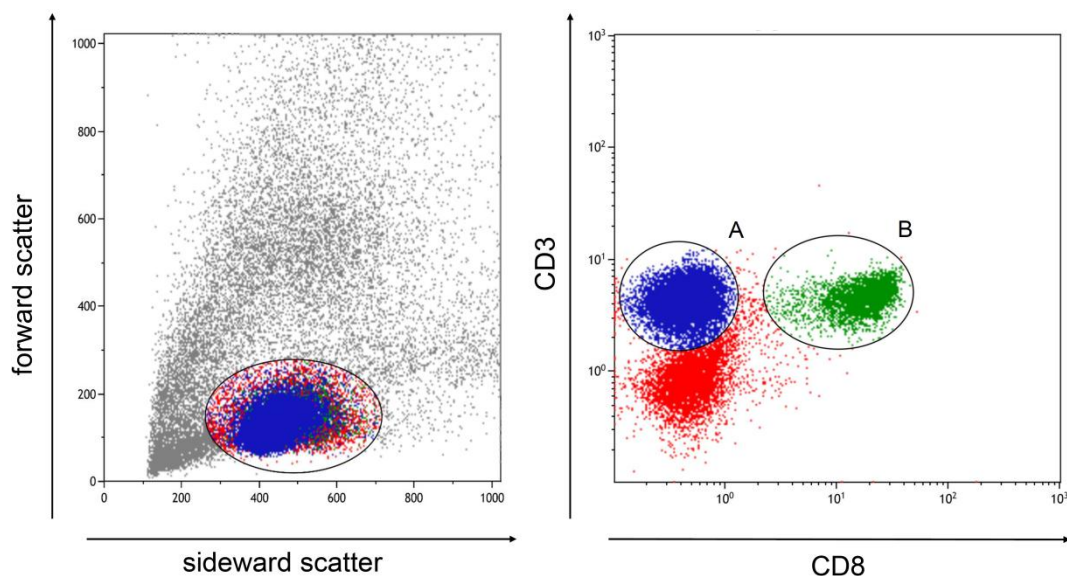
### **2.5.4 Messung im Durchflusszytometer und Datenauswertung**

Zellsuspensionen, mehrfach gefärbt durch Fluochrom-markierte monoklonale Antikörper, werden mittels Durchflusszytometrie gemessen. Bei jeder Messung werden mindestens 100.000 Zellen berücksichtigt.

Jede einzelne Zelle wird dabei detektiert, indem das Gemisch der markierten Zellen in einem wesentlich größeren Volumen einer Salzlösung mit einer Geschwindigkeit von bis zu 25.000 Zellen pro Sekunde durch eine Düse gepresst wird. Dadurch entsteht ein Flüssigkeitsstrahl, in dem die Zellen vereinzelt sind und einen bestimmten Abstand voneinander haben. Jeder Tropfen mit einer Zelle passiert nun im rechten Winkel einen Laser. Dabei werden zwei physikalische Messgrößen bestimmt. Der sogenannte „forward scatter“ (FSC) misst die Lichtstreuung in einem engen Winkel zum Laser und lässt grob gesagt Aussagen zur Größe der Zelle zu. Der „sideward scatter“ (SSC) misst basierend auf der komplexen Mehrfachstreuung durch intrazelluläre Kompartimente die Granularität und Binnenstruktur der Zellen. Allein durch diese beiden Parameter lassen sich anhand eines Histogramms verschiedene Zellpopulationen abgrenzen (Abbildung 2). Die Fluochrome auf den monoklonalen Antikörpern werden durch den Laser zur Fluoreszenz angeregt. Sie senden Fluoreszenzsignale aus, die in einem Winkel von 90° detektiert werden. Zur Trennung der Emissionsspektren der verschiedenen Farbstoffe sind ein Farbteilerspiefel und ein Bandpassfilter zwischengeschaltet. Mehrere Photomultiplier empfangen die Lichtsignale, die sich im Spektrum unterscheiden und wandeln sie in elektrische Signale um. Es gibt verschiedene Laser, die in verschiedenen Wellenlängen des Lichts arbeiten, indem sie verschiedene Anre-

gungswellenlängen für die Exzitation von Farbstoffen verwenden. Kombiniert man diese Laser miteinander, wie im Fall des Beckman Coulter Navios-Durchflusszytometer drei Laser, ist eine umfassende Messung der Zellen mit bis zu zehn Farben möglich. Dazu müssen vorher die geeigneten Antikörper mit den passenden Fluoreszenzfarben ausgewählt werden. Zu beachten ist, dass man in einer Messung Fluochrome auswählen sollte, die sich in ihren Anregungswellenlängen unterscheiden, da es sonst zu Überlagerungen kommt (K.M. Murphy et al. 2009).

Nach dem Messvorgang erhält man ein Standardpunktdiagramm, welches für jede Zelle, deren Fluoreszenz gemessen wurde, einen Punkt aufträgt. Die Achsen des Diagramms enthalten jeweils eine Markierung, z.B. CD3/CD8. So ergibt sich ein vierteiliges Bild, das man in Zellen, die CD3 positiv und CD8 positiv, CD3 negativ und CD8 positiv, CD3 positiv und CD8 negativ oder CD3 negativ und CD8 negativ sind, einteilen kann. So lassen sich verschiedene Populationen nach dem Phänotyp auftrennen (Sack et al. 2007).



**Abbildung 2: Quadrantenanalyse.** Im ersten Bild sind alle gemessenen Zellen aufgetrennt nach forward scatter und sideward scatter zu sehen. Im zweiten Bild die Auftrennung der Zellen in CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-T-Zellen (A), die auch CD4<sup>+</sup>-Zellen genannt werden und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (B), die auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen genannt werden.

## **2.6 Statistik**

Soweit nicht anders angegeben, sind die Werte als Mittelwerte  $\pm$ SD (Standardabweichung) angegeben.

Zur Überprüfung der Signifikanz dient der Mann-Whitney-U-Test. Er vergleicht die Übereinstimmung zweier Verteilungen und prüft, ob sie zur selben Grundgesamtheit zählen (Büning et al. 1994). Die Signifikanzgrenze wurde auf  $p=0,05$  festgesetzt.

Zur Prüfung einer Wechselbeziehung zweier gemessenen Variablen sowie der Stärke der Wechselbeziehung wurde die Korrelationsanalyse verwendet. Eine positive Korrelation bezeichnet eine Zunahme des einen Parameters während der andere zunimmt (Rowe et al. 2012). Die Signifikanzgrenze wurde hier ebenfalls auf  $p=0,05$  festgesetzt.

Zur graphischen Darstellung sowie zur statistischen Berechnung wurde die Software GraphPad Prism 6 verwendet.

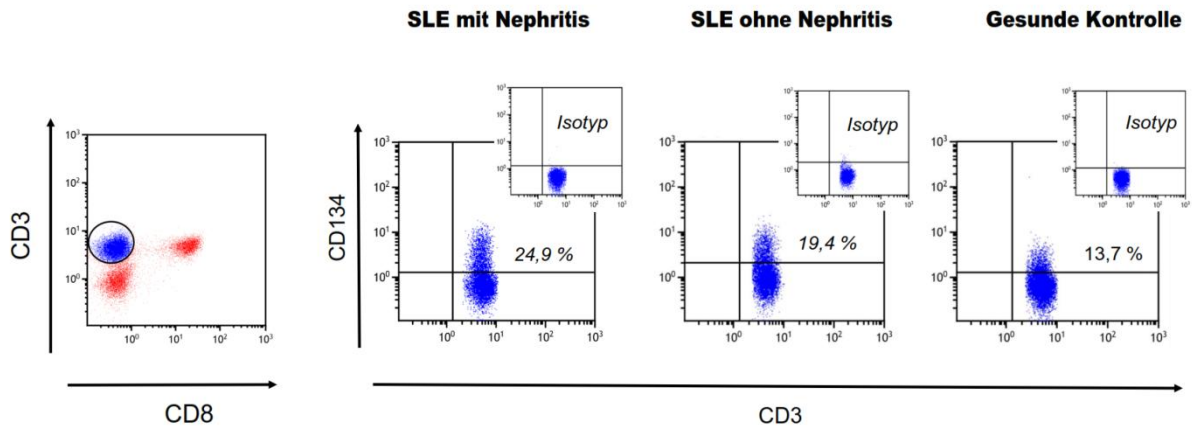


### **3 Ergebnisse**

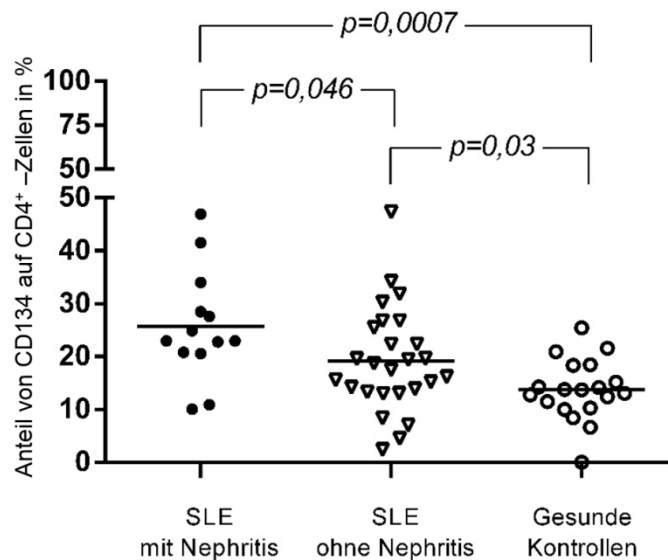
#### **3.1 Kostimulatorische Marker auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen**

##### **3.1.1 CD134 auf unstimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen**

Zunächst wurde die Expression des Aktivitätsparameters CD134 auf unstimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen untersucht. SLE Patienten zeigten eine signifikant erhöhte CD134-Expression auf CD4<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen (21,4 ±10,4 % vs. 13,7 ±5,8 %; p=0,002). Innerhalb der Patientengruppe konnte kein Unterschied zwischen aktiven und nicht aktiven SLE-Patienten gefunden werden (24,8 ±12,2 % vs. 20,6 ±10,1 %; p=0,42). Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den aktiven Patienten und den gesunden Kontrollen (24,8 ±12,2 % vs. 13,7 ±5,8 %; p=0,02) sowie zwischen den nicht aktiven Patienten und den gesunden Kontrollen (20,6 ±10,1 vs. 13,7 ±5,8 %; p=0,006). Der Unterschied zwischen Patienten mit einer gesicherten LN sowohl im Vergleich zu Patienten ohne LN (25,7 ±10,5 % vs. 19,2 ±9,9 %; p=0,046) als auch im Vergleich zu gesunden Kontrollen war signifikant im Hinblick auf die CD134-Expression auf CD4<sup>+</sup>-Zellen (25,7 ±10,5 % vs. 13,7 ±5,8 %; p=0,0007) (Abbildung 3 und Abbildung 4). Ebenfalls signifikant erhöht stellte sich der Unterschied zwischen Patienten ohne Nephritis und gesunden Kontrollen dar (19,2 ±9,9 % vs. 13,7 ±5,8 %; p=0,03).



**Abbildung 3: CD4<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten abhängig von der Nierenbeteiligung und bei gesunden Kontrollen.** Die exemplarischen Dotplots von CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen (= CD4<sup>+</sup>-Zellen) zeigen deren Expression vom Oberflächenmarker CD134 auf unstimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen mit der jeweiligen Isotyp-Kontrolle bei Patienten mit und ohne SLE-Nephritis verglichen mit gesunden Kontrollen. SLE = systemischer Lupus erythematodes.



**Abbildung 4: CD4<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten abhängig von der Nierenbeteiligung und bei gesunden Kontrollen.** Vergleich des Anteils von CD134<sup>+</sup>-Zellen an CD4<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten mit Lupusnephritis (n=13), Patienten ohne Lupusnephritis (n=26) und gesunden Kontrollen (n=19) untereinander. Die horizontalen Balken repräsentieren die Mittelwerte der prozentualen Anteile. SLE = systemischer Lupus erythematodes.

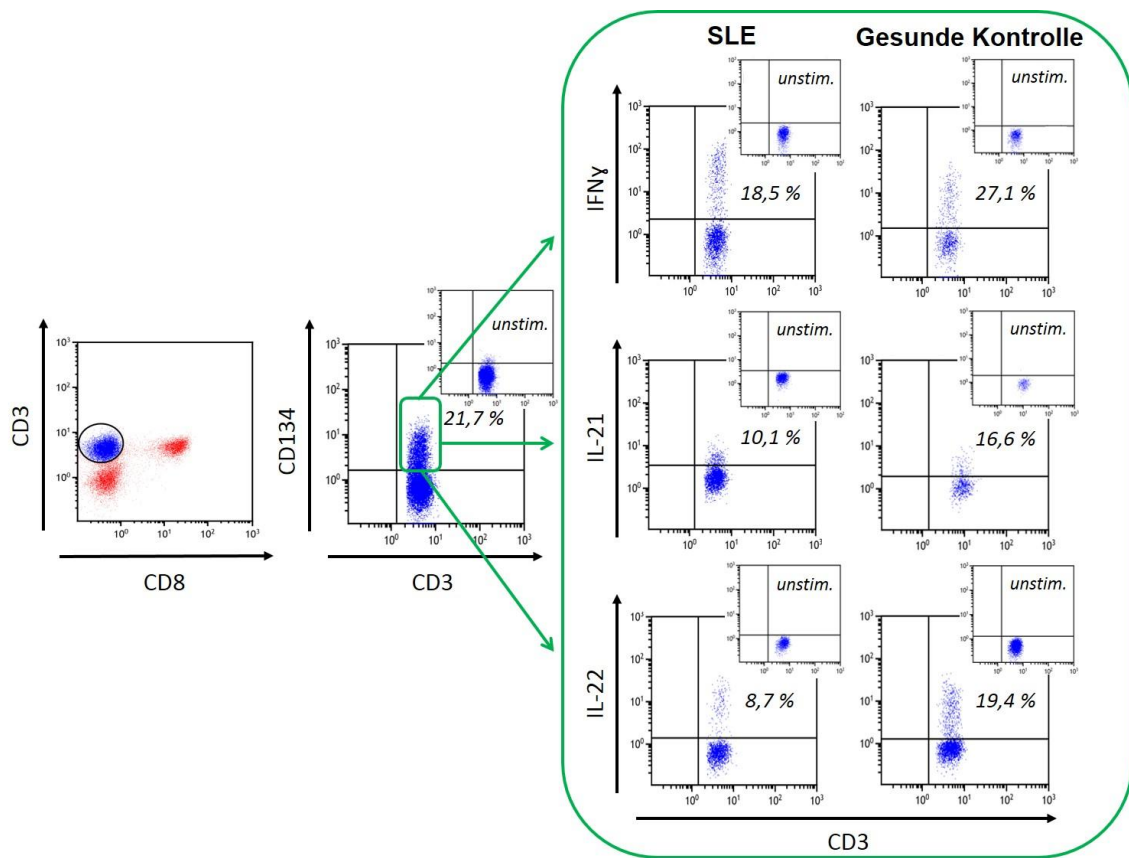
### 3.1.2 IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 in stimulierten CD134<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen

Es schloss sich die Untersuchung der intrazellulären Marker in CD134<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen im stimulierten Versuchsansatz an. Der Anteil von IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen, auch Th1-Zellen genannt, an CD134<sup>+</sup>-Zellen zeigte sich bei Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant niedriger (18,5  $\pm$ 11,5 % vs. 29,2  $\pm$ 19,4 %; p=0,02) (Abbildung 5 und Abbildung 6). Der Vergleich von aktiven Patienten mit inaktiven Patienten (16,8  $\pm$ 10,7 % vs. 18,8  $\pm$ 11,8 %; p=0,74) und gesunden Kontrollen ergab kein signifikantes Ergebnis (16,8  $\pm$ 10,7 % vs. 29,2  $\pm$ 19,4 %; p=0,08). Im Vergleich von nicht aktiven Patienten mit gesunden Kontrollen ergab sich ein signifikant niedrigeres Ergebnis (18,8  $\pm$ 11,8 % vs. 29,2  $\pm$ 19,3 %; p=0,04). Der Unterschied von Th1-Zellen an CD134<sup>+</sup>-Zellen war bei Patienten mit Nephritis verglichen mit Patienten ohne Nephritis (25,4  $\pm$ 11,4 % vs. 15,0  $\pm$ 10,1 %; p=0,007) und bei gesunden Kontrollen verglichen mit Patienten ohne Nephritis signifikant erhöht (29,2  $\pm$ 19,4 % vs. 15,0  $\pm$ 10,1 %; p=0,001). Bei Patienten mit Nephritis verglichen mit gesunden Kontrollen zeigte sich kein signifikantes Ergebnis (25,4  $\pm$ 11,4 % vs. 29,2  $\pm$ 19,4 %; p=0,99).

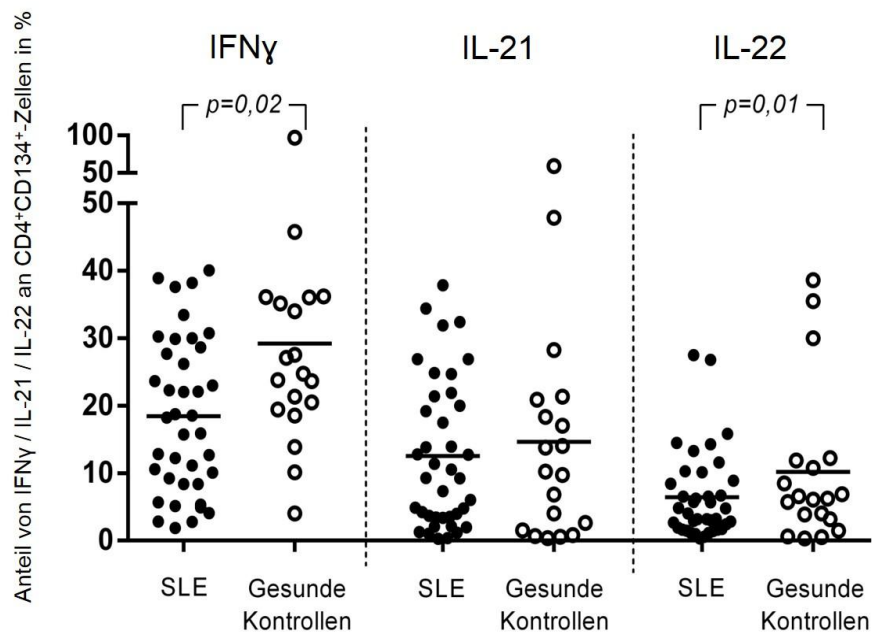
Der Anteil von IL-21-produzierenden Zellen, auch als Th21-Zellen bezeichnet, an CD134<sup>+</sup>-Zellen, war weder im Vergleich von SLE-Patienten zu gesunden Kontrollen (11,9  $\pm$ 11,2 % vs. 16,6  $\pm$ 19,0 %; p=0,73) (Abbildung 5 und Abbildung 6) noch von aktiven Patienten zu nicht aktiven Patienten (12,5  $\pm$ 9,1 % vs. 11,7  $\pm$ 11,7 %; p=0,63) und gesunden Kontrollen (12,5  $\pm$ 9,1 % vs. 16,6  $\pm$ 19,0 %; p=0,91) sowie nicht aktive Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen signifikant verändert (11,7  $\pm$ 11,7 % vs. 16,6  $\pm$ 19,0 %; p=0,65). Ebenfalls kein signifikantes Ergebnis zeigte sich bei Patienten mit Nephritis verglichen mit Patienten ohne Nephritis (12,5  $\pm$ 12,7 % vs. 11,6  $\pm$ 10,6 %; p=0,89) und mit gesunden Kontrollen (12,5  $\pm$ 12,7 % vs. 16,6  $\pm$ 19,0 %; p=0,75) sowie beim Vergleich von Patienten ohne Nephritis mit gesunden Kontrollen (11,6  $\pm$ 10,6 % vs. 16,6  $\pm$ 19,0 %; p=0,77).

Der Anteil von IL-22-produzierenden Zellen, auch Th22-Zellen genannt, an CD134<sup>+</sup>-Zellen war bei Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen (10,5  $\pm$ 9,0 % vs. 19,0  $\pm$ 11,8 %; p=0,01) (Abbildung 5 und Abbildung 6), aktiven Patienten verglichen sowohl mit nicht aktiven Patienten (8,0  $\pm$ 8,4 % vs. 10,9  $\pm$ 9,2 %; p=0,63) als auch mit gesunden Kontrollen (8,0  $\pm$ 8,4 % vs. 19,0  $\pm$ 11,8 %; p=0,06) signifikant

niedriger. Einen signifikanten Unterschied ergab der Vergleich von nicht aktiven Patienten und gesunden Kontrollen ( $10,9 \pm 9,2$  % vs.  $19,0 \pm 11,8$  %;  $p=0,02$ ). Die Ergebnisse der Patienten mit Nephritis verglichen mit denen der Patienten ohne Nephritis ( $13,5 \pm 9,7$  % vs.  $9,0 \pm 8,4$  %;  $p=0,19$ ) und mit gesunden Kontrollen zeigte kein signifikantes Ergebnis ( $13,5 \pm 9,7$  % vs.  $19,0 \pm 11,8$  %;  $p=0,13$ ). Es zeigte sich ein signifikantes Ergebnis bei Patienten ohne Nephritis im Vergleich mit gesunden Kontrollen ( $9,0 \pm 8,4$  % vs.  $19,0 \pm 11,8$  %;  $p=0,008$ ).



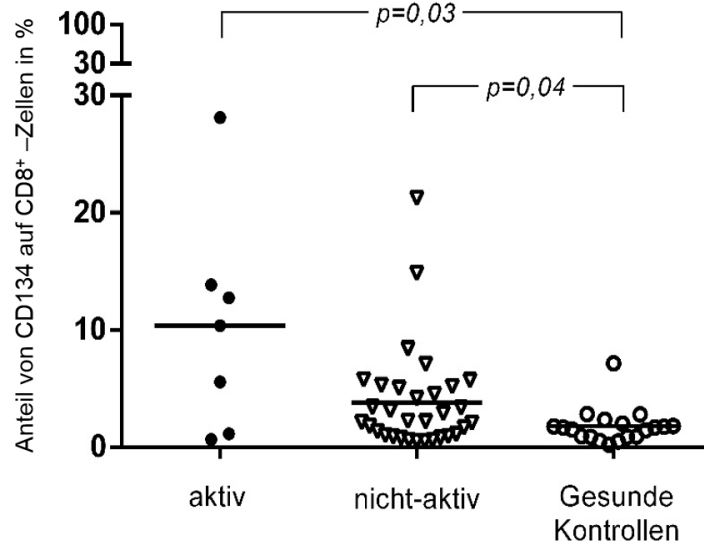
**Abbildung 5: Intrazelluläre Marker in CD4<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten und gesunden Kontrollen.** Die exemplarischen Dotplots zeigen die Expression von den intrazellulären Zytokinen IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 von CD4<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>-Zellen nach vierstündiger Stimulation mit Calcium-Ionophore und PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate), verglichen mit dem unstimulierten Ansatz. CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen wurden als CD4<sup>+</sup> definiert. CD134<sup>+</sup>-Zellen wurden durch den Vergleich mit dem Isotyp bestimmt. Repräsentative Ergebnisse werden für einen SLE-Patienten und eine gesunde Kontrolle gezeigt. SLE = systemischer Lupus erythematoses.



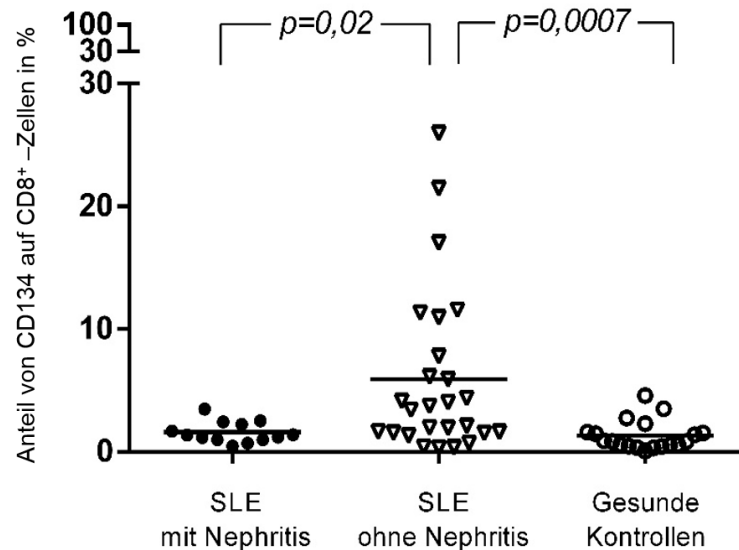
**Abbildung 6: Intrazelluläre Marker in CD4<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten und gesunden Kontrollen.** Expression von intrazellulären Markern IFN $\gamma$  für Th1-Zellen, IL-21 für Th21-Zellen und IL-22 für Th22-Zellen in CD4<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich von SLE-Patienten (n=39) und gesunden Kontrollen (n=19). Die horizontalen Balken repräsentieren die Mittelwerte der prozentualen Anteile. SLE = systemischer Lupus erythematodes.

### 3.1.3 CD134 auf unstimulierten CD8<sup>+</sup>-Zellen

Es folgte die Untersuchung des Aktivitätsmarkers auf unstimulierten CD8<sup>+</sup>-Zellen. SLE-Patienten zeigten eine signifikant erhöhte CD134-Expression auf CD8<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen (4,5 ±5,9 % vs. 1,3 ±1,2 %; p=0,003). Innerhalb der Patientengruppe konnte kein signifikanter Unterschied zwischen aktiven und nicht aktiven Patienten gefunden werden (7,2 ±7,3 % vs. 3,9 ±5,5 %; p=0,10) (Abbildung 7). Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den aktiven Patienten und den gesunden Kontrollen (7,2 ±7,3 % vs. 1,3 ±1,2 %; p=0,03) sowie zwischen den nicht aktiven Patienten und den gesunden Kontrollen (3,9 ±5,5 vs. 1,3 ±1,2 %; p=0,04). Der Unterschied zwischen Patienten mit einer gesicherten LN im Vergleich zu Patienten ohne LN (1,6 ±0,9 % vs. 5,9 ±6,7 %; p=0,02) und gesunde Kontrollen im Vergleich zu Patienten ohne LN war signifikant erniedrigt im Hinblick auf die CD134-Expression auf CD8<sup>+</sup>-Zellen (1,3 ±1,2 % vs. 5,9 ±6,7 %; p=0,0007) (Abbildung 8). Als nicht signifikant stellte sich der Unterschied zwischen Patienten mit Nephritis und gesunden Kontrollen dar (1,6 ±0,9 % vs. 1,3 ±1,2 %; p=0,19).



**Abbildung 7: CD8<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten abhängig von der Krankheitsaktivität und bei gesunden Kontrollen.** Vergleich des Anteils von CD134<sup>+</sup>-Zellen an CD8<sup>+</sup>-Zellen bei aktiven Patienten (n=7), nicht aktiven Patienten (n=32) und gesunden Kontrollen (n=19) untereinander. Die horizontalen Balken repräsentieren die Mittelwerte der prozentualen Anteile. SLE = systemischer Lupus erythematodes.



**Abbildung 8: CD8<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten abhängig von der Nierenbeteiligung und bei gesunden Kontrollen.** Vergleich des Anteils von CD134<sup>+</sup>-Zellen an CD8<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten mit Lupusnephritis (n=13), Patienten ohne Lupusnephritis (n=26) und gesunden Kontrollen (n=19) untereinander. Die horizontalen Balken repräsentieren die Mittelwerte der prozentualen Anteile. SLE = systemischer Lupus erythematodes.



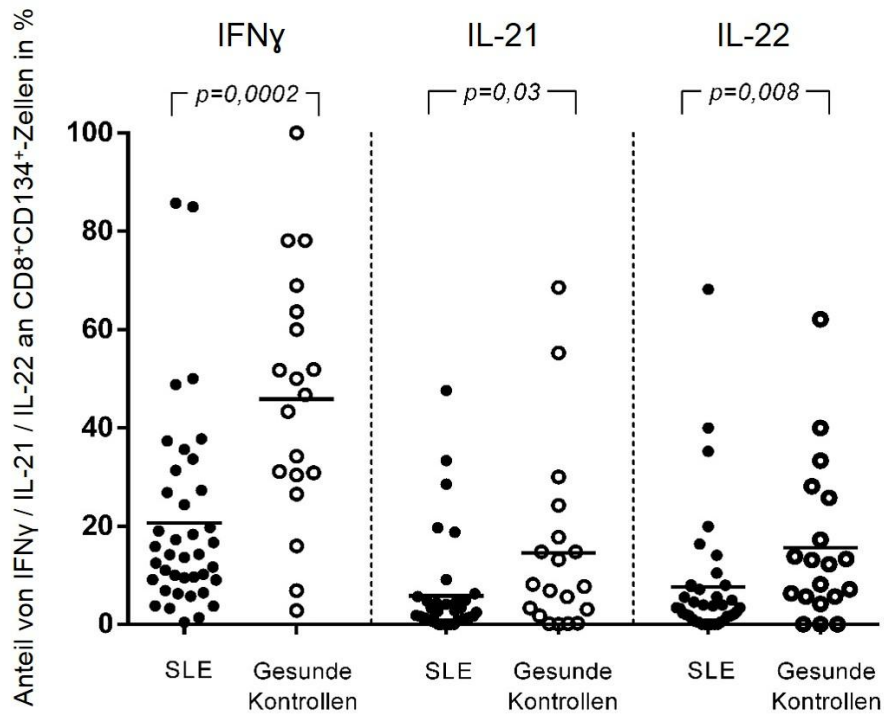
### 3.1.4 IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 in stimulierten CD134<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen

Die stimulierten CD8<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>-Zellen wurden hinsichtlich der intrazellulären Marker untersucht. Der Anteil von IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen an CD8<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>-Zellen zeigte sich bei Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant niedriger (20,6  $\pm$ 19,8 % vs. 45,9  $\pm$ 25,4 %; p=0,0002) (Abbildung 9). Die Vergleiche von gesunden Kontrollen mit inaktiven (45,9  $\pm$ 25,4 % vs. 21,9  $\pm$ 21,2 %; p=0,0006) und aktiven Patienten zeigten signifikant niedrigere Ergebnisse (45,9  $\pm$ 25,4 % vs. 14,5  $\pm$ 10,5; p=0,005). Im Vergleich von aktiven Patienten und nicht aktiven Patienten ergab sich kein signifikantes Ergebnis (14,5  $\pm$ 10,5 % vs. 21,9  $\pm$ 21,2 %; p=0,49) (Abbildung 10). Der Unterschied an CD8<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>-Zellen war bei Patienten mit Nephritis verglichen mit Patienten ohne Nephritis (24,8  $\pm$ 25,6 % vs. 13,5  $\pm$ 10,9 %; p=0,0009) und bei gesunden Kontrollen verglichen mit Patienten ohne Nephritis (45,9  $\pm$ 25,4 % vs. 13,5  $\pm$ 10,9 %; p=<0,0001) signifikant erhöht. Bei Patienten mit Nephritis verglichen mit gesunden Kontrollen zeigte sich kein signifikantes Ergebnis (35,9  $\pm$ 25,6 % vs. 45,9  $\pm$ 25,4 %; p=0,24).

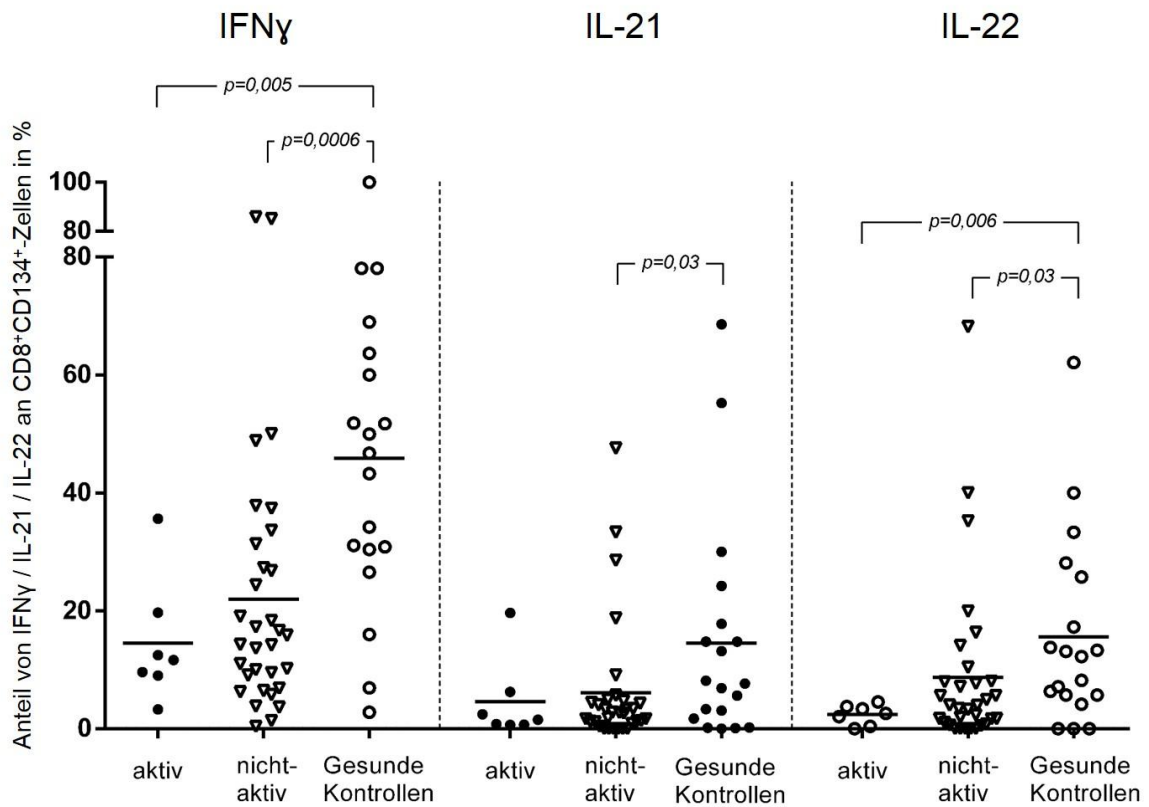
Der Anteil von IL-21-produzierenden Zellen an CD8<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>-Zellen war im Vergleich von SLE-Patienten zu gesunden Kontrollen (5,8  $\pm$ 10,2 % vs. 14,5  $\pm$ 18,9 %; p=0,03) (Abbildung 9) signifikant niedriger. Signifikant niedriger waren die Ergebnisse von nicht aktiven Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen (6,1  $\pm$ 10,8 % vs. 14,5  $\pm$ 18,9 %; p=0,03). Nicht signifikant waren die Vergleiche von aktiven zu nicht aktiven Patienten (4,6  $\pm$ 6,9 % vs. 6,1  $\pm$ 10,8 %; p=0,78) und von aktiven Patienten mit gesunden Kontrollen (4,6  $\pm$ 6,9 % vs. 14,5  $\pm$ 18,9 %; p=0,20) (Abbildung 10). Ebenfalls kein signifikantes Ergebnis zeigte sich bei Patienten mit Nephritis verglichen mit Patienten ohne Nephritis (4,7  $\pm$ 9,0 % vs. 6,4  $\pm$ 10,9 %; p=0,45) sowie beim Vergleich von Patienten ohne Nephritis mit gesunden Kontrollen (6,4  $\pm$ 10,9 % vs. 14,5  $\pm$ 18,9 %; p=0,08). Signifikant höher waren die Ergebnisse bei Patienten mit Nephritis verglichen mit gesunden Kontrollen (4,7  $\pm$ 9,0 % vs. 14,5  $\pm$ 18,9 %; p=0,03).

Der Anteil von IL-22-produzierenden Zellen an CD8<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>-Zellen war bei Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen (7,6  $\pm$ 13,3 % vs. 15,6  $\pm$ 16,0 %; p=0,008) (Abbildung 9), aktive Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen (2,4  $\pm$ 1,7 % vs. 15,6  $\pm$ 16,0 %; p=0,006) und nicht aktive Patienten verglichen mit gesunden

Kontrollen signifikant niedriger ( $8,7 \pm 14,4$  % vs.  $15,6 \pm 16,0$  %;  $p=0,03$ ). Kein signifikantes Ergebnis ergab der Vergleich von aktiven Patienten mit nicht aktiven Patienten ( $2,4 \pm 1,7$  % vs.  $8,7 \pm 14,4$  %;  $p=0,31$ ) (Abbildung 10). Die Ergebnisse der Patienten mit Nephritis verglichen mit denen der Patienten ohne Nephritis ( $4,3 \pm 5,0$  % vs.  $9,2 \pm 15,71$  %;  $p=0,39$ ) waren nicht signifikant unterschiedlich. Es zeigten sich signifikant niedrigere Ergebnisse bei Patienten ohne Nephritis im Vergleich mit gesunden Kontrollen ( $9,2 \pm 15,7$  % vs.  $15,6 \pm 16,0$  %;  $p=0,03$ ) und bei Patienten mit Nephritis verglichen mit gesunden Kontrollen ( $4,3 \pm 5,0$  % vs.  $15,6 \pm 16,0$  %;  $p=0,02$ ).



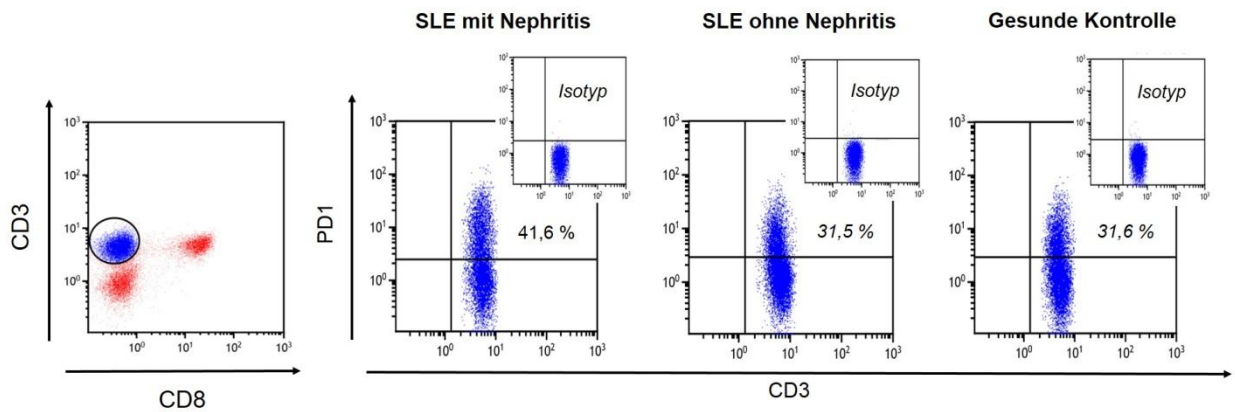
**Abbildung 9: Intrazelluläre Marker in CD8 $^+$ CD134 $^+$ -Zellen bei Patienten und gesunden Kontrollen.** Expression von intrazellulären Markern IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 in CD8 $^+$ CD134 $^+$ -Zellen im Vergleich von Lupuspatienten (n=39) und gesunden Kontrollen (n=19). Die horizontalen Balken repräsentieren die Mittelwerte der prozentualen Anteile. SLE = systemischer Lupus erythematoses.



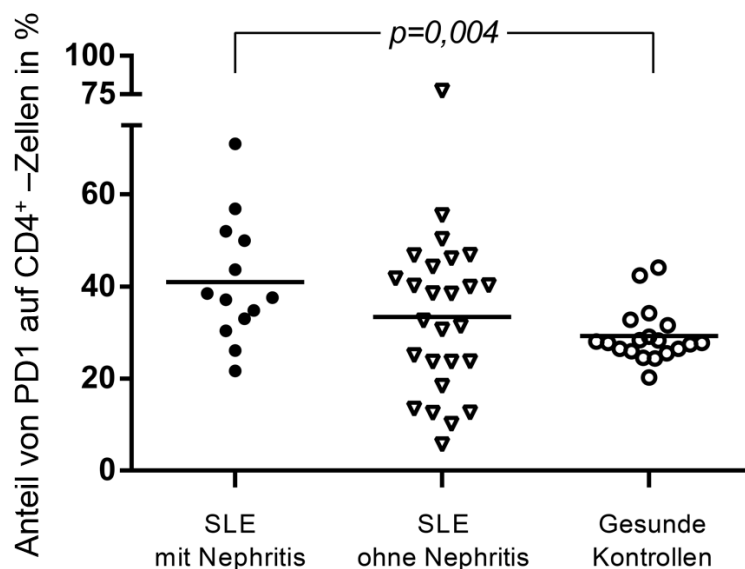
**Abbildung 10: Intrazelluläre Marker in CD8 $^{+}$ CD134 $^{+}$  bei Patienten abhängig von der Aktivität und bei gesunden Kontrollen.** Expression von intrazellulären Markern IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 in CD8 $^{+}$ CD134 $^{+}$ -Zellen im Vergleich von Lupuspatienten (n=39) und gesunden Kontrollen (n=19). Die horizontalen Balken repräsentieren die Mittelwerte der prozentualen Anteile. SLE = systemischer Lupus erythematodes.

### 3.1.5 PD1 auf unstimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen

Der andere Aktivitätsmarker PD1 wurde bezüglich seiner Expression auf unstimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen analysiert. Es lag kein signifikanter Unterschied in der PD1-Expression auf CD4<sup>+</sup>-Zellen SLE-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen ( $35,9 \pm 15,8$  % vs.  $29,2 \pm 5,8$  %,  $p=0,06$ ) vor. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen aktiven Patienten und nicht aktiven Patienten ( $38,2 \pm 23,3$  % vs.  $35,4 \pm 14,1$  %;  $p=>0,99$ ) sowie zu gesunden Kontrollen ( $38,2 \pm 23,3$  % vs.  $29,2 \pm 5,8$  %;  $p=0,73$ ). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei nicht aktiven Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen ( $35,4 \pm 14,1$  % vs.  $29,2 \pm 5,8$  %;  $p=0,04$ ). Die Expression von PD1 auf CD4<sup>+</sup>-Zellen war bei Patienten mit LN im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht ( $41,0 \pm 13,6$  % vs.  $29,2 \pm 5,8$  %;  $p=0,004$ ), im Vergleich zu Patienten ohne LN nicht ( $41,0 \pm 16,1$  % vs.  $33,4 \pm 16,4$  %;  $p=0,25$ ). Ein signifikanter Unterschied konnte beim Vergleich von Patienten ohne Nephritis mit gesunden Kontrollen nicht gefunden werden ( $33,4 \pm 16,4$  % vs.  $29,2 \pm 5,8$  %;  $p=0,4$ ) (Abbildung 11 und 12).



**Abbildung 11: CD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten abhängig von der Nierenbeteiligung und gesunden Kontrollen.** Die exemplarischen Dotplots von CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen (= CD4<sup>+</sup>-Zellen) zeigen deren Expression vom Oberflächenmarker PD1 auf unstimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen mit der jeweiligen Isotyp-Kontrolle bei Patienten mit und ohne SLE-Nephritis verglichen mit gesunden Kontrollen. SLE = systemischer Lupus erythematodes.



**Abbildung 12: CD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten abhängig von der Nierenbeteiligung und gesunden Kontrollen.** Vergleich des Anteils von PD1<sup>+</sup>-Zellen an CD4<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten mit Lupusnephritis (n=13), Patienten ohne Lupusnephritis (n=26) und gesunden Kontrollen (n=19) untereinander. Die horizontalen Balken repräsentieren die Mittelwerte der prozentualen Anteile. SLE = systemischer Lupus erythematodes

### 3.1.6 IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 in stimulierten CD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-Zellen

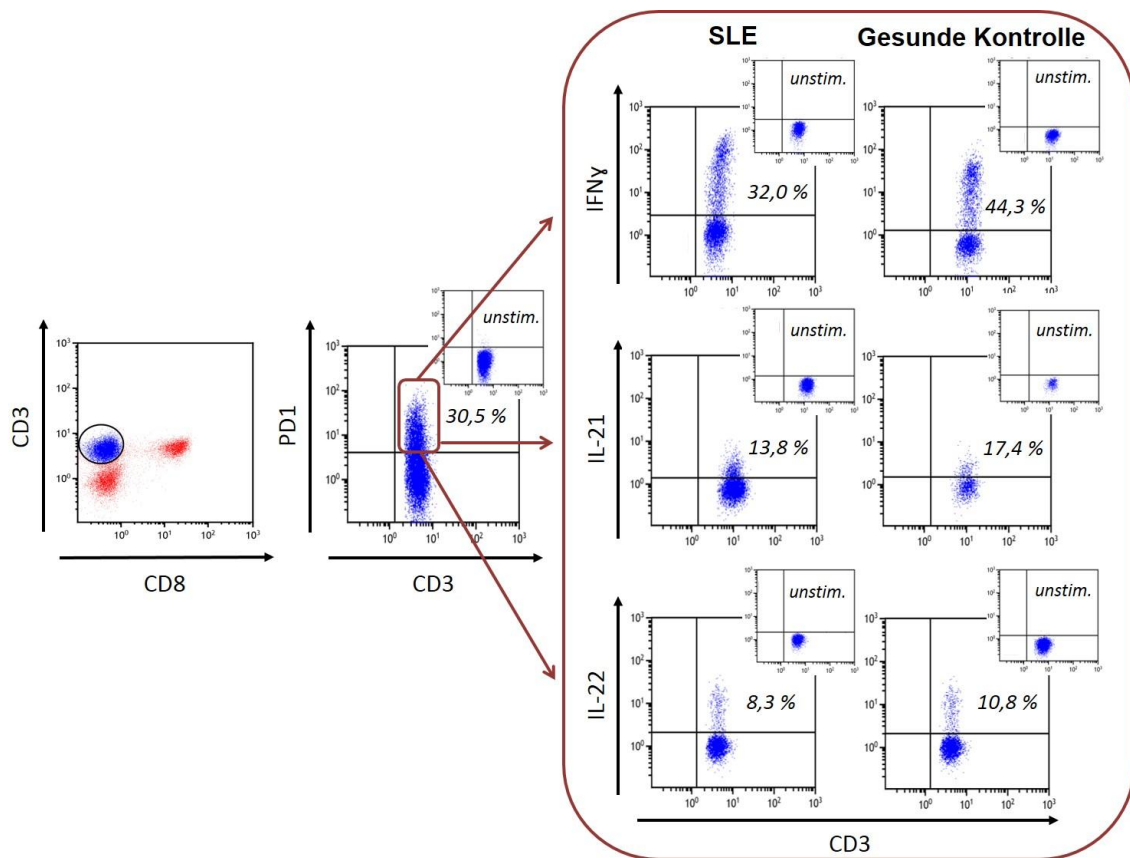
Auf die Analyse des Aktivitätsmarkers PD1 auf CD4<sup>+</sup>-Zellen folgte die Untersuchung der intrazellulären Marker in CD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-Zellen im stimulierten Ansatz. Der Anteil von IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen, auch Th1-Zellen genannt, an PD1<sup>+</sup>-Zellen zeigte sich bei Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen signifikant niedriger (31,8  $\pm$ 15,6 % vs. 41,7  $\pm$ 14,3 %; p=0,03) (Abbildung 13 und 14). Der Vergleich von aktiven Patienten mit inaktiven Patienten (38,0  $\pm$ 20,9 % vs. 30,4  $\pm$ 14,3 %; p=0,40) und mit gesunden Kontrollen ergab kein signifikantes Ergebnis (38,0  $\pm$ 20,9 % vs. 41,8  $\pm$ 14,3 %; p=0,75). Im Vergleich von nicht aktiven Patienten zu gesunden Kontrollen ergab sich ein signifikantes Ergebnis (30,4  $\pm$ 14,3 % vs. 41,7  $\pm$ 14,3 %; p=0,02). Der Unterschied von Th1-Zellen an PD1<sup>+</sup>-Zellen war bei Patienten mit Nephritis verglichen mit Patienten ohne Nephritis (36,1  $\pm$ 14,0 % vs. 29,6  $\pm$ 16,2 %; p=0,20) und verglichen mit gesunden Kontrollen nicht signifikant (36,1  $\pm$ 14,0 % vs. 41,8  $\pm$ 14,3 %; p=0,40). Bei Patienten ohne Nephritis, verglichen mit gesunden Kontrollen, zeigte sich ein signifikant niedrigeres Ergebnis (29,6  $\pm$ 16,2 % vs. 41,8  $\pm$ 14,3 %; p=0,02).

Der Anteil von IL-21-produzierenden Zellen, auch als Th21-Zellen bezeichnet, an PD1<sup>+</sup>-Zellen, war weder im Vergleich von SLE-Patienten zu gesunden Kontrollen (12,6  $\pm$ 11,0 % vs. 14,7  $\pm$ 16,2 %; p=0,91) (Abbildung 13 und 14) noch von aktiven zu nicht aktiven Patienten (14,5  $\pm$ 8,0 % vs. 12,11  $\pm$ 11,6 %; p=0,30) und zu gesunden Kontrollen (14,5  $\pm$ 8,0 % vs. 14,7  $\pm$ 16,2 %; p=0,53) sowie nicht aktive Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen signifikant verändert (12,11  $\pm$ 11,6 % vs. 14,7  $\pm$ 16,2 %; p=0,93). Ebenfalls zeigte sich bei Patienten mit Nephritis verglichen mit Patienten ohne Nephritis (11,6  $\pm$ 10,1 % vs. 13,0  $\pm$ 11,6 %; p=0,79) und mit gesunden Kontrollen (11,6  $\pm$ 10,1 % vs. 14,7  $\pm$ 16,2 %; p=0,98) und beim Vergleich von Patienten ohne Nephritis mit gesunden Kontrollen kein signifikantes Ergebnis (13,0  $\pm$ 11,6 % vs. 14,7  $\pm$ 16,2 %; p=0,87).

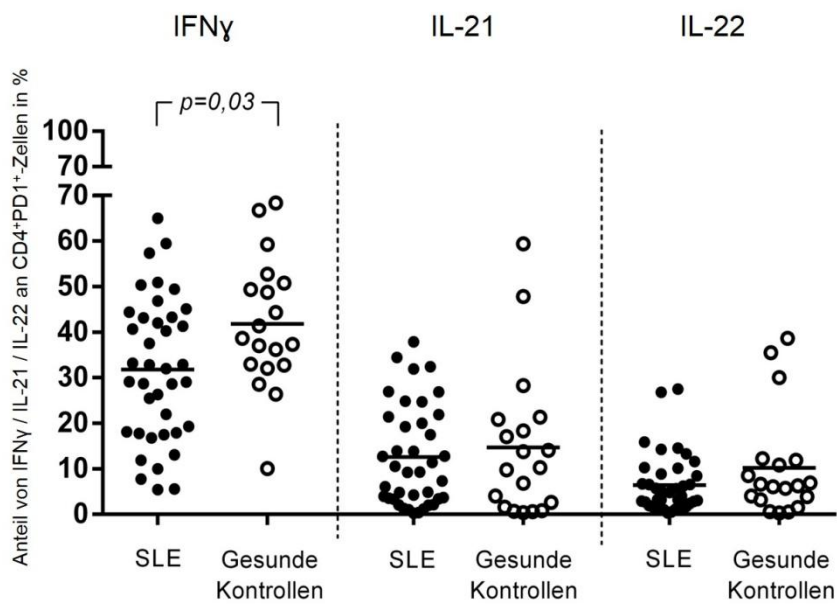
Der Anteil von IL-22-produzierenden Zellen, auch Th22-Zellen genannt, an PD1<sup>+</sup>-Zellen war bei Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen (6,4  $\pm$ 6,5 % vs. 10,2  $\pm$ 11,6 %; p=0,26) (Abbildung 13 und 14), aktive verglichen mit nicht aktiven Patienten (3,4  $\pm$ 2,6 % vs. 7,1  $\pm$ 6,8 %; p=0,17) und mit gesunden Kontrollen nicht signifikant verändert (3,4  $\pm$ 2,6 % vs. 10,2  $\pm$ 11,6 %; p=0,10). Kein signifikanter Unter-

schied ergab sich beim Vergleich von nicht aktiven Patienten zu gesunden Kontrollen ( $7,1 \pm 6,8$  % vs.  $10,2 \pm 11,6$  %;  $p=0,46$ ). Die Ergebnisse der Patienten mit Nephritis verglichen mit denen ohne Nephritis ( $7,0 \pm 4,9$  % vs.  $6,1 \pm 7,2$  %;  $p=0,24$ ) und verglichen mit gesunden Kontrollen ( $7,0 \pm 4,9$  % vs.  $10,2 \pm 11,6$  %;  $p=0,81$ ) sowie Patienten ohne Nephritis verglichen mit gesunden Kontrollen ( $6,1 \pm 7,2$  % vs.  $10,2 \pm 11,6$  %;  $p=0,16$ ) zeigten keine signifikanten Resultate.





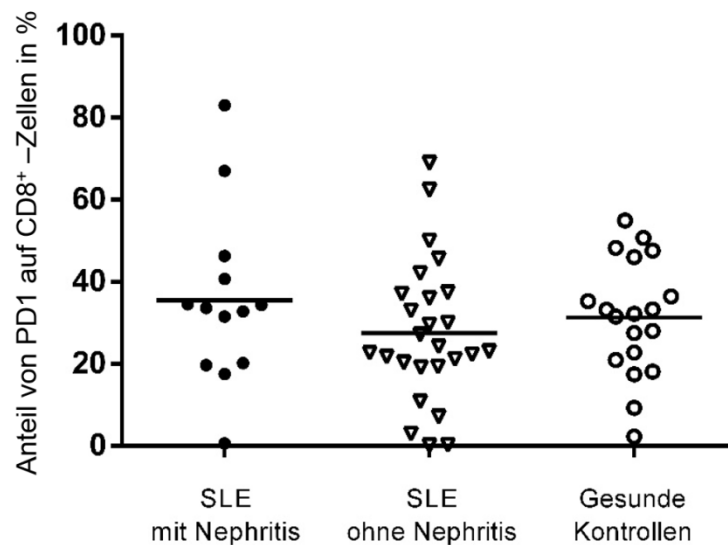
**Abbildung 13: Intrazelluläre Marker in CD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten und gesunden Kontrollen.** Die exemplarischen Dotplots zeigen die Expression von den intrazellulären Zytokinen IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 in CD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-Zellen nach vierstündiger Stimulation mit Calcium-Ionophore und PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) verglichen mit dem unstimulierten Ansatz. CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen wurden als CD4<sup>+</sup> definiert. PD1<sup>+</sup>-Zellen wurden durch den Vergleich mit dem Isotyp bestimmt. Repräsentative Ergebnisse wurden gezeigt für einen SLE-Patienten und eine gesunde Kontrolle. SLE = systemischer Lupus erythematoses.



**Abbildung 14: Intrazelluläre Marker in CD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten und gesunden Kontrollen.** Expression von intrazellulären Markern IFN $\gamma$  für Th1-Zellen, IL-21 für Th21-Zellen und IL-22 für Th22-Zellen auf CD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich von Lupuspatienten (n=39) und gesunden Kontrollen (n=19). Die horizontalen Balken repräsentieren die Mittelwerte der prozentualen Anteile. SLE = systemischer Lupus erythematoses.

### 3.1.7 PD1 auf unstimulierten CD8<sup>+</sup>-Zellen

Der Aktivitätsparameter PD1 wurde ebenfalls auf CD8<sup>+</sup>-Zellen untersucht. Es lag kein signifikanter Unterschied in der PD1-Expression auf CD8<sup>+</sup>-Zellen SLE-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen vor ( $30,2 \pm 18,8$  % vs.  $31,38 \pm 14,3$  %,  $p=0,59$ ). Ebenfalls bestand kein signifikanter Unterschied zwischen aktiven Patienten im Vergleich zu nicht aktiven Patienten ( $30,6 \pm 21,0$  % vs.  $30,1 \pm 18,7$  %;  $p=0,87$ ) und zu gesunden Kontrollen ( $30,6 \pm 21,0$  % vs.  $31,4 \pm 14,3$  %;  $p=0,79$ ) sowie auch kein signifikanter Unterschied bei nicht aktiven Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen ( $30,1 \pm 18,7$  % vs.  $31,4 \pm 14,3$  %;  $p=0,58$ ). Die Expression von PD1 auf CD8<sup>+</sup>-Zellen war bei Patienten mit LN im Vergleich zu gesunden Kontrollen nicht signifikant erhöht ( $35,6 \pm 21,3$  % vs.  $31,4 \pm 14,3$  %;  $p=0,73$ ); im Vergleich zu Patienten ohne LN ebenfalls nicht ( $35,6 \pm 21,3$  % vs.  $27,5 \pm 17,2$  %;  $p=0,31$ ). Ein signifikanter Unterschied konnte beim Vergleich von Patienten ohne Nephritis mit gesunden Kontrollen nicht gefunden werden ( $27,5 \pm 17,2$  % vs.  $31,4 \pm 14,3$  %;  $p=0,33$ ) (Abbildung 15).



**Abbildung 15: CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten abhängig von der Nierenbeteiligung und gesunden Kontrollen.** Vergleich des Anteils von PD1<sup>+</sup>-Zellen an CD8<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten mit Lupusnephritis (n=13), Patienten ohne Lupusnephritis (n=26) und gesunden Kontrollen (n=19) untereinander. Die horizontalen Balken repräsentieren die Mittelwerte der prozentualen Anteile. SLE = systemischer Lupus erythematodes.

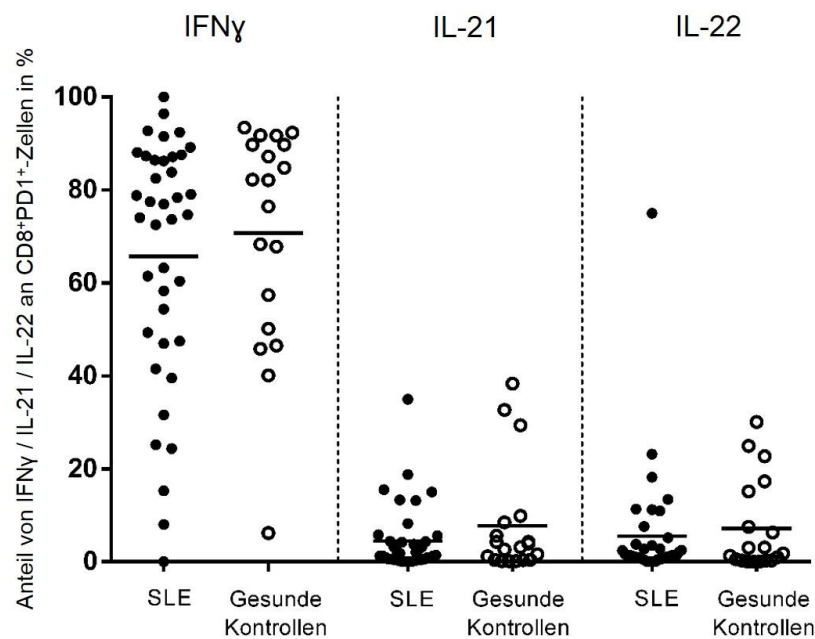
### 3.1.8 IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 in stimulierten PD1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen

Die CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-Zellen wurden hinsichtlich ihrer Expression dreier intrazellulärer Marker untersucht. Der Anteil von IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen an CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-Zellen zeigte sich bei Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nicht signifikant verändert (65,8  $\pm$ 26,3 % vs. 74,9  $\pm$ 18,2 %; p=0,24) (Abbildung 16). Der Vergleich von aktiven Patienten mit inaktiven Patienten (58,1  $\pm$ 31,0 % vs. 67,4  $\pm$ 25,4 %; p=0,40), aktiven Patienten mit gesunden Kontrollen (58,1  $\pm$ 31,0 % vs. 70,7  $\pm$ 23,9 %; p=0,17) und nicht aktiven Patienten mit gesunden Kontrollen (67,4  $\pm$ 25,4 % vs. 74,9  $\pm$ 18,2 %; p=0,37) ergab kein signifikantes Ergebnis. Der Unterschied von IFN $\gamma$  an CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-Zellen war bei Patienten mit Nephritis verglichen mit gesunden Kontrollen nicht signifikant (77,5  $\pm$ 14,1 % vs. 74,9  $\pm$ 18,2 %; p=0,84); ebenso verglichen mit Patienten ohne Nephritis (77,5  $\pm$ 14,1 % vs. 59,9  $\pm$ 29,2 %; p=0,08) und auch nicht bei Patienten ohne Nephritis verglichen mit gesunden Kontrollen (59,9  $\pm$ 29,2 % vs. 74,9  $\pm$ 18,2 %; p=0,01).

Der Anteil von IL-21-produzierenden Zellen an PD1<sup>+</sup>-Zellen, war weder im Vergleich von SLE-Patienten zu gesunden Kontrollen (4,5  $\pm$ 7,0 % vs. 5,7  $\pm$ 9,0 %; p=0,73) (Abbildung 16) noch von aktiven Patienten zu nicht aktiven Patienten (8,2  $\pm$ 12,9 % vs. 3,7  $\pm$ 4,9 %; p=0,76) und zu gesunden Kontrollen (8,2  $\pm$ 12,9 % vs. 5,7  $\pm$ 9,0 %; p=0,77) sowie nicht aktive Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen signifikant verändert (3,7  $\pm$ 4,9 % vs. 5,7  $\pm$ 9,0 %; p=0,61). Ebenfalls kein signifikantes Ergebnis zeigte sich bei Patienten mit Nephritis verglichen mit Patienten ohne Nephritis (3,9  $\pm$ 5,7 % vs. 4,8  $\pm$ 7,7 %; p=0,80) und Patienten ohne Nephritis verglichen mit gesunden Kontrollen (4,8  $\pm$ 7,7 % vs. 5,7  $\pm$ 9,0 %; p=0,88) sowie bei Patienten mit Nephritis im Vergleich zu gesunden Kontrollen (3,9  $\pm$ 5,7 % vs. 5,7  $\pm$ 9,0 %; p=0,59).

Der Anteil von IL-22-produzierenden Zellen an PD1<sup>+</sup>-Zellen war bei Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen (5,5  $\pm$ 12,6 % vs. 6,9  $\pm$ 9,9 %; p=0,90) (Abbildung 16), aktiven verglichen mit nicht aktiven Patienten (12,9  $\pm$ 27,6 % vs. 3,9  $\pm$ 5,6 %; p=0,65) und mit gesunden Kontrollen nicht signifikant verändert (12,9  $\pm$ 27,6 % vs. 6,9  $\pm$ 9,9 %; p=0,97). Ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich war der Vergleich von nicht aktiven Patienten und gesunden Kontrollen (3,9  $\pm$ 5,6 % vs. 6,9  $\pm$ 9,9 %; p=0,90). Die Ergebnisse der Patienten mit Nephritis verglichen mit denen der Pati-

enten ohne Nephritis ( $2,3 \pm 2,8 \%$  vs.  $7,1 \pm 15,1 \%$ ;  $p=0,76$ ) zeigte kein signifikantes Ergebnis. Ebenso ergab der Vergleich von Patienten mit Nephritis mit gesunden Kontrollen ( $2,3 \pm 2,8 \%$  vs.  $6,9 \pm 9,9 \%$ ;  $p=>0,99$ ) und der Vergleich von Patienten ohne Nephritis mit gesunden Kontrollen ( $7,1 \pm 15,1 \%$  vs.  $6,9 \pm 9,9 \%$ ;  $p=0,86$ ) keine signifikanten Ergebnisse.



**Abbildung 16: Intrazelluläre Marker in CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten und gesunden Kontrollen.** Expression von intrazellulären Markern IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 auf CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich von Lupuspatienten (n=39) und gesunden Kontrollen (n=19). Die horizontalen Balken repräsentieren die Mittelwerte der prozentualen Anteile. SLE = systemischer Lupus erythematoses.

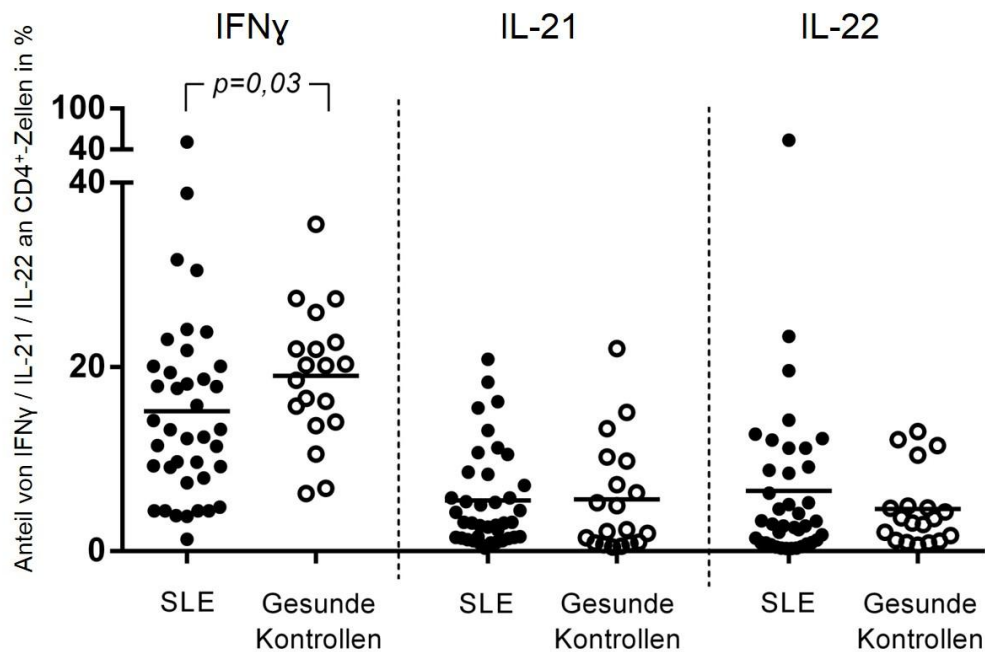
### 3.1.9 IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 in stimulierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen

Ergänzend erfolgte die Untersuchung der intrazellulären Marker in stimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen. Der Anteil von IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen, auch Th1-Zellen genannt, an CD4<sup>+</sup>-Zellen zeigte sich bei Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant niedriger (15,2  $\pm$ 10,4 % vs. 19,1  $\pm$ 7,3 %; p=0,03) (Abbildung 17). Der Vergleich von aktiven Patienten mit inaktiven Patienten (14,2  $\pm$ 9,9 % vs. 15,4  $\pm$ 10,6 %; p=0,84) und mit gesunden Kontrollen ergab keine signifikanten Ergebnisse (14,2  $\pm$ 9,9 % vs. 19,1  $\pm$ 7,3 %; p=0,16). Im Vergleich von nicht aktiven Patienten und gesunden Kontrollen ergab sich ein signifikantes Ergebnis (15,4  $\pm$ 10,6 % vs. 19,1  $\pm$ 7,3 %; p=0,04). Der Unterschied von Th1-Zellen an CD4<sup>+</sup>-Zellen war bei Patienten mit Nephritis verglichen mit Patienten ohne Nephritis (20,3  $\pm$ 11,7 % vs. 12,6  $\pm$ 8,8 %; p=0,02) und bei gesunden Kontrollen verglichen mit Patienten ohne Nephritis signifikant erhöht (19,1  $\pm$ 7,3 % vs. 12,6  $\pm$ 8,8 %; p=0,003). Bei Patienten mit Nephritis verglichen mit gesunden Kontrollen zeigte sich kein signifikantes Ergebnis (20,3  $\pm$ 11,7 % vs. 19,1  $\pm$ 7,3 %; p=0,93).

Der Anteil von IL-21-produzierenden Zellen, auch als Th21-Zellen bezeichnet, an CD4<sup>+</sup>-Zellen, war weder im Vergleich von SLE-Patienten zu gesunden Kontrollen (5,5  $\pm$ 5,3 % vs. 5,6  $\pm$ 6,0 %; p=0,55) (Abbildung 17) noch von aktiven Patienten zu nicht aktiven Patienten (5,3  $\pm$ 2,6 % vs. 5,6  $\pm$ 5,6 %; p=0,38) oder zu gesunden Kontrollen signifikant verändert (5,3  $\pm$ 2,6 % vs. 5,6  $\pm$ 6,0 %; p=0,50). Ebenfalls nicht signifikant verändert war der Vergleich von nicht aktiven Patienten zu gesunden Kontrollen (5,6  $\pm$ 5,8 % vs. 5,6  $\pm$ 6,0 %; p=0,65). Kein signifikantes Ergebnis zeigte sich bei Patienten mit Nephritis verglichen mit Patienten ohne Nephritis (5,2  $\pm$ 6,4 % vs. 5,6  $\pm$ 4,8 %; p=0,31) und mit gesunden Kontrollen (5,2  $\pm$ 6,4 % vs. 5,6  $\pm$ 6,0 %; p=0,90) sowie beim Vergleich von Patienten ohne Nephritis mit gesunden Kontrollen (5,6  $\pm$ 4,8 % vs. 5,6  $\pm$ 6,0 %; p=0,50).

Der Anteil von IL-22-produzierenden Zellen, auch Th22-Zellen genannt, an CD4<sup>+</sup>-Zellen zeigte bei Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen (6,5  $\pm$ 9,6 % vs. 4,6  $\pm$ 4,1 %; p=0,84) (Abbildung 17), aktiven Patienten verglichen mit nicht aktiven Patienten (4,9  $\pm$ 4,6 % vs. 6,9  $\pm$ 10,3 %; p=0,82) und mit gesunden Kontrollen (4,9  $\pm$ 4,6 % vs. 4,6  $\pm$ 4,1 %; p=0,97) sowie beim Vergleich von nicht aktiven Patienten mit gesunden Kontrollen keinen signifikanten Unterschied (6,9  $\pm$ 10,3 % vs. 4,6

$\pm 4,1$  %;  $p=0,82$ ). Die Ergebnisse der Patienten mit Nephritis, verglichen mit denen der Patienten ohne Nephritis ( $5,7 \pm 6,5$  % vs.  $6,7 \pm 10,7$  %;  $p=0,98$ ) und denen der gesunden Kontrollen, zeigte kein signifikantes Ergebnis ( $5,7 \pm 6,5$  % vs.  $4,6 \pm 4,1$  %;  $p=0,93$ ), ebenso wenig der Vergleich der Ergebnisse von Patienten ohne Nephritis und von gesunden Kontrollen ( $6,9 \pm 10,8$  % vs.  $4,6 \pm 4,1$  %;  $p=0,83$ ).



**Abbildung 17: Intrazelluläre Marker in CD4 $^{+}$ -Zellen bei Patienten und gesunden Kontrollen.** Expression von intrazellulären Markern IFN $\gamma$  für Th1-Zellen, IL-21 für Th21-Zellen und IL-22 für Th22-Zellen im Vergleich von Lupuspatienten ( $n=39$ ) und gesunden Kontrollen ( $n=19$ ). Die horizontalen Balken repräsentieren die Mittelwerte der prozentualen Anteile. SLE = systemischer Lupus erythematodes.

### 3.1.10 IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 in stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen

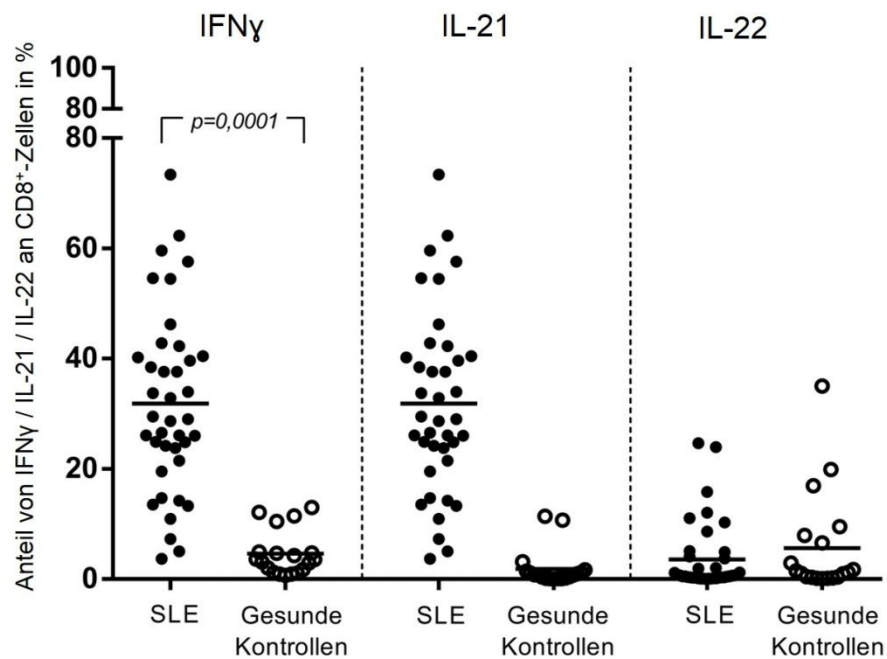
Die intrazellulären Marker wurden ebenfalls in stimulierten CD8<sup>+</sup>-Zellen analysiert. Der Anteil von IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen an CD8<sup>+</sup>-Zellen zeigte bei Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen einen signifikanten Unterschied (31,8  $\pm$ 16,5 % vs. 4,6  $\pm$ 4,1 %; p=0,0001) (Abbildung 18). Der Vergleich von aktiven Patienten mit inaktiven Patienten (35,2  $\pm$ 15,5 % vs. 31,1  $\pm$ 16,9 %; p=0,51) ergab kein signifikantes Ergebnis. Der Vergleich von aktiven Patienten mit gesunden Kontrollen ergab ein signifikantes Ergebnis (35,2  $\pm$ 15,5 % vs. 4,6  $\pm$ 4,1 %; p=<0,0001). Im Vergleich von nicht aktiven Patienten und gesunden Kontrollen ergab sich kein signifikantes Ergebnis (31,1  $\pm$ 16,9 % vs. 4,6  $\pm$ 4,1 %; p=<0,0001). Der Unterschied von IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen an CD8<sup>+</sup>-Zellen war bei Patienten mit Nephritis verglichen mit Patienten ohne Nephritis (37,2  $\pm$ 17,9 % vs. 29,1  $\pm$ 15,4 %; p=0,19) und mit gesunden Kontrollen (37,2  $\pm$ 17,9 % vs. 4,6  $\pm$ 4,1 %; p=<0,0001), ebenso wie bei Patienten ohne Nephritis verglichen mit gesunden Kontrollen nicht signifikant erhöht (29,1  $\pm$ 15,4 % vs. 4,6  $\pm$ 4,1 %; p=<0,0001).

Der Anteil von IL-21-produzierenden Zellen an CD8<sup>+</sup>-Zellen war weder im Vergleich von SLE-Patienten zu gesunden Kontrollen (1,6  $\pm$ 2,9 % vs. 1,9  $\pm$ 3,3 %; p=0,67) (Abbildung 18) noch von aktiven Patienten zu nicht aktiven Patienten (1,3  $\pm$ 1,0 % vs. 1,7  $\pm$ 3,1 %; p=0,66) und zu gesunden Kontrollen (1,3  $\pm$ 1,0 % vs. 1,9  $\pm$ 3,3 %; p=0,45) sowie von nicht aktiven Patienten zu gesunden Kontrollen signifikant verändert (1,7  $\pm$ 3,1 % vs. 1,9  $\pm$ 3,3 %; p=0,81). Ebenfalls kein signifikantes Ergebnis zeigte sich bei Patienten mit Nephritis verglichen mit Patienten ohne Nephritis (0,8  $\pm$ 0,9 % vs. 2,0  $\pm$ 3,4 %; p=0,12) und mit gesunden Kontrollen (0,8  $\pm$ 0,9 % vs. 1,9  $\pm$ 3,3 %; p=0,53) sowie beim Vergleich von Patienten ohne Nephritis mit gesunden Kontrollen (2,0  $\pm$ 3,4 % vs. 1,9  $\pm$ 3,3 %; p=0,32).

Der Anteil von IL-22-produzierenden Zellen an CD8<sup>+</sup>-Zellen zeigten bei Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen (3,6  $\pm$ 6,2 % vs. 5,6  $\pm$ 9,2 %; p=0,34) (Abbildung 18), aktiven Patienten verglichen mit nicht aktiven Patienten (4,1  $\pm$ 8,8 % vs. 3,5  $\pm$ 5,7 %; p=0,66) und mit gesunden Kontrollen (4,1  $\pm$ 8,8 % vs. 5,6  $\pm$ 9,2 %; p=0,79) sowie beim Vergleich von nicht aktiven Patienten mit gesunden Kontrollen keinen signifikanten Unterschied (3,5  $\pm$ 5,7 % vs. 5,6  $\pm$ 9,2 %; p=0,30). Der Vergleich der Patienten mit Nephritis mit den Patienten ohne Nephritis (3,2  $\pm$ 6,9 % vs.



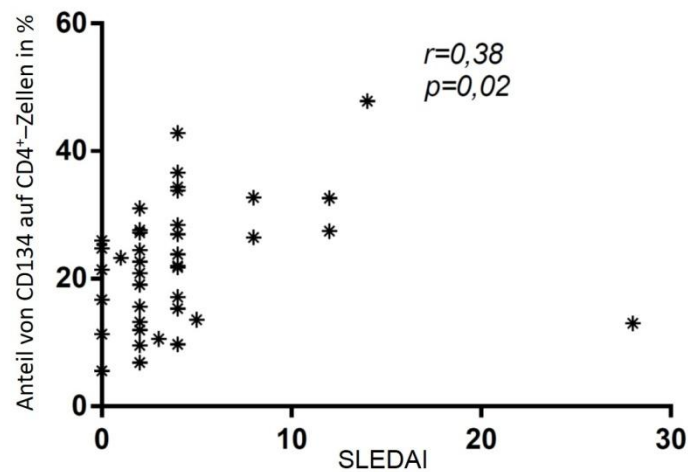
3,8 ±6,0 %; p=0,51) mit gesunden Kontrollen (3,2 ±6,9 % vs. 5,6 ±9,2 %; p=0,26) zeigte kein signifikantes Ergebnis; ebenso wenig der Vergleich von Patienten ohne Nephritis mit gesunden Kontrollen (3,8 ±6,0 % vs. 5,6 ±9,2%; p=0,53).



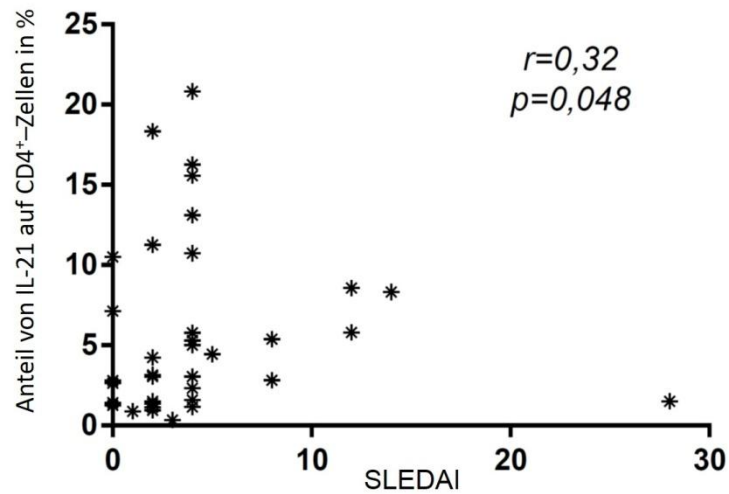
**Abbildung 18: Intrazelluläre Marker in CD8<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten und gesunden Kontrollen.** Expression von intrazellulären Markern IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 auf CD8<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich von Lupuspatienten (n=39) und gesunden Kontrollen (n=19). Die horizontalen Balken repräsentieren die Mittelwerte der prozentualen Anteile. SLE = systemischer Lupus erythematodes.

### 3.1.11 Korrelation der prozentualen Expressionen mit der Krankheitsaktivität

Bei der Korrelation der Krankheitsaktivität mittels SLEDAI mit dem Anteil der kostimulatorischen Marker auf CD4<sup>+</sup>-Zellen wurde ein signifikantes Ergebnis bei CD134 ( $r=0,38$ ;  $p=0,02$ ) (Abbildung 19) und IL-21 ( $r=0,32$ ;  $p=0,048$ ) gefunden (Abbildung 20). Die Korrelationen des SLEDAI mit den Markern PD1, IFN $\gamma$  und IL-22 auf CD4<sup>+</sup>-Zellen waren nicht signifikant. Ebenfalls nicht signifikant waren die Korrelationen mit den kostimulatorischen Markern IFN $\gamma$  und IL-22 auf CD134<sup>+</sup>-Zellen und IFN $\gamma$ , IL-21 und IL-22 auf PD1<sup>+</sup>-Zellen.

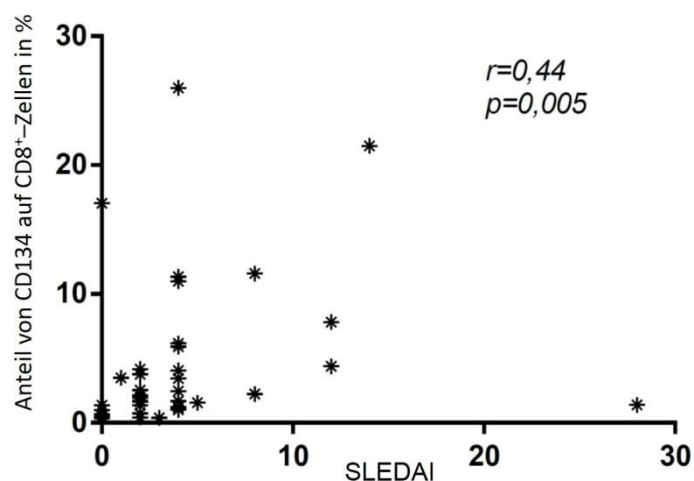


**Abbildung 19: Beziehung von CD4<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>-Zellen zur Krankheitsaktivität.** Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil von CD134 auf CD4<sup>+</sup>-Zellen mit dem SLEDAI als Krankheitsaktivitätsmarker (n=39). SLE = systemischer Lupus erythematodes.



**Abbildung 20: Beziehung von CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup>-Zellen zur Krankheitsaktivität.** Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil von IL-21 auf CD4<sup>+</sup>-Zellen mit dem SLEDAI als Krankheitsaktivitätsmarker (n=39). SLE = systemischer Lupus erythematoses.

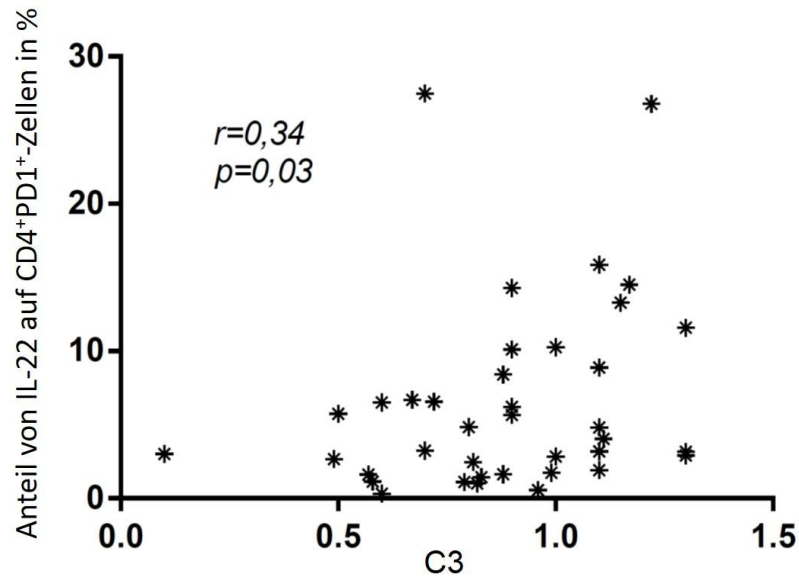
Eine positive Korrelation zeigte sich zwischen dem SLEDAI und dem kostimulatorischen Marker CD134 auf CD8<sup>+</sup>-Zellen ( $r=0,44$ ;  $p=0,005$ ) (Abbildung 21). Bei der Korrelation der anderen kostimulatorischen und intrazellulären Marker konnte keine Beziehung festgestellt werden.



**Abbildung 21: Beziehung von CD8<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>-Zellen zur Krankheitsaktivität.** Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil von CD134 auf CD8<sup>+</sup>-Zellen mit dem SLEDAI als Krankheitsaktivitätsmarker (n=39). SLE = systemischer Lupus erythematoses.

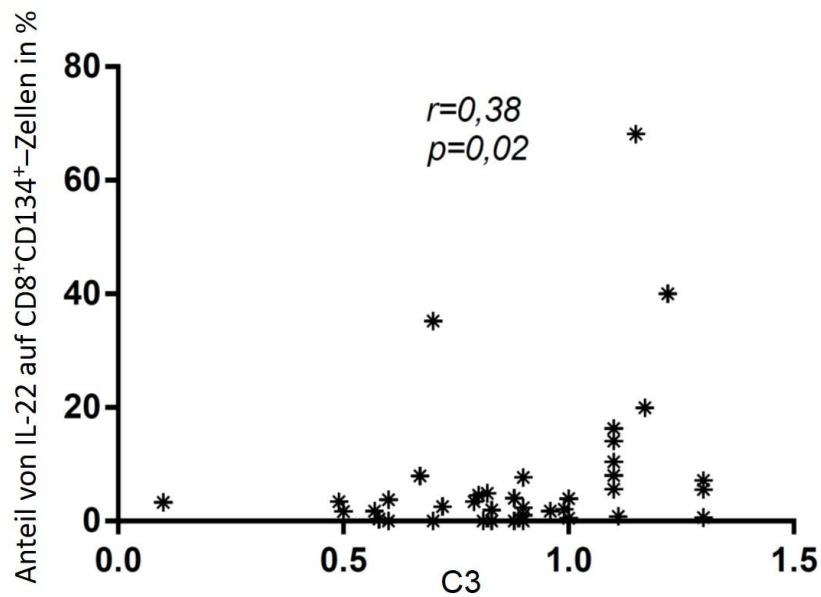
### 3.1.12 Korrelation der prozentualen Expressionen mit den Serumkomplementspiegeln

Bei den kostimulatorischen Markern auf CD4<sup>+</sup>-Zellen ergab sich eine positive Korrelation zwischen dem Serumkomplementspiegel von C3 und IL22 auf PD1<sup>+</sup>-Zellen ( $r=0,34$ ;  $p=0,03$ ) (Abbildung 22).

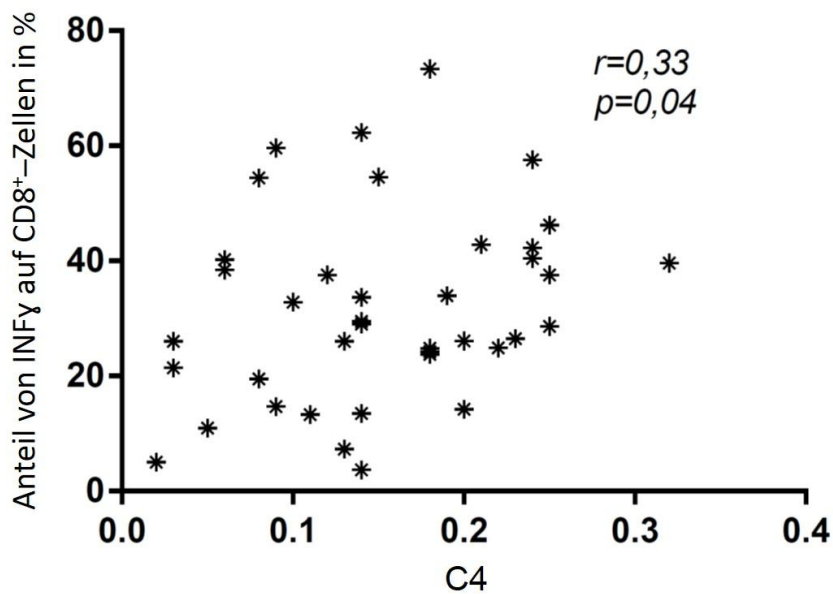


**Abbildung 22: Beziehung von CD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-Zellen zur C3-Konzentration.** Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil von IL-22 auf CD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-Zellen mit dem Komplementspiegel C3 (n=39). SLE = systemischer Lupus erythematodes.

Bei den kostimulatorischen Markern auf CD8<sup>+</sup>-Zellen ergab sich eine positive Korrelation zwischen dem Serumkomplementspiegel von C3 in g/l und IL-22 auf CD134<sup>+</sup>-Zellen ( $r=0,38$ ;  $p=0,02$ ) (Abbildung 23) und zwischen C4 und IFN $\gamma$  ( $r=0,33$ ;  $p=0,04$ ) (Abbildung 24).



**Abbildung 23: Beziehung von CD8<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup>-Zellen zum C3-Konzentration.** Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil von IL-22 auf CD8<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>-Zellen mit dem Komplementspiegel C3 in g/l (n=39). SLE = systemischer Lupus erythematodes.



**Abbildung 24: Beziehung von CD8<sup>+</sup>INF $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen zum C4-Konzentration.** Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil von INF $\gamma$  auf CD8<sup>+</sup>-Zellen mit dem Komplementspiegel C4 in g/l (n=39). SLE = systemischer Lupus erythematodes.

## 4. Diskussion

### 4.2 PD1 als Marker für folliculäre T-Helferzellen

Die Expression des Oberflächenmarkers PD1 auf CD4<sup>+</sup>-Zellen war in der vorliegenden Arbeit bei Patienten mit LN erhöht. Auch wenn die genaue Charakterisierung der folliculären T-Helferzellen uneinheitlich bleibt, wurde demonstriert, dass die Koexpression von CXCR5 mit ICOS und / oder PD1 eine geeignete Markerkombination ist, um folliculäre T-Helferzellen im Blut zu charakterisieren (Simpson et al. 2010). Onabajo et al. zeigten in ihrer Arbeit mit Rhesus Macaque Affen, dass PD1 auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen für diese Spezies ein passender Marker für folliculäre-T-Helferzellen im Lymphknoten darstellt. Sie konnten eine positive Assoziation zwischen CD4<sup>+</sup>PD1<sup>high</sup>-T-Zellen und Bcl6<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup>-B-Zellen nachweisen, so dass vermutet werden kann, dass diese Zellen im Lymphfollikel miteinander in Verbindung stehen. Darüber hinaus fanden sie eine 100-fach höhere Expression von CXCR5-mRNA in CD4<sup>+</sup>PD1<sup>high</sup>-T-Zellen im Vergleich zu CD4<sup>+</sup>-PD1<sup>-</sup>-T-Zellen, was darauf hindeutet, dass PD1 ein guter Marker für CXCR5<sup>+</sup>-Zellen und damit folliculäre T-Helferzellen ist (Onabajo et al. 2013). Auch auf den T-Zellen der Milz des BXD2-Mausmodells waren PD1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> signifikant höher exprimiert im Vergleich zu Kontrollmäusen (Kim et al. 2015).

Simpson et al. beschrieben zirkulierende T-Helferzellen, die von ihnen als CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>ICOS<sup>high</sup>PD1<sup>high</sup> charakterisiert wurden. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit fanden sie sich vor allem bei jenen SLE-Patienten mit hohen Antikörpertitern und Glomerulonephritiden als Endorgan-Schaden erhöht (Simpson et al. 2010). Ebenfalls eine erhöhte PD1 Expression fand die Gruppe um Choi in CXCR5<sup>high</sup>ICOS<sup>high</sup>-Zellen sowie zusätzlich eine positive Korrelation des Markers PD1 mit der Krankheitsaktivität (Choi et al. 2015). Diese Studie fand mit kaukasischen und nicht kaukasischen SLE-Patienten statt. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit, bekamen weniger Patienten eine zytotoxische Medikation und im Versuch wurden PBMCs verwendet anstatt Vollblut.

### 4.2 CD134 als Marker für folliculäre T-Helferzellen

In dieser Arbeit zeigte sich eine erhöhte Expression von CD134 auf CD4<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich von SLE-Patienten zu gesunden Kontrollen und von Patienten mit LN zu Patienten ohne LN. Darüber hinaus konnten vermehrt CD134-Moleküle auf der

Oberfläche der CD4<sup>+</sup>-Zellen sowohl bei aktiven und nicht aktiven Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen, als auch bei Patienten mit und ohne LN im Vergleich untereinander sowie zu gesunden Kontrollen, gefunden werden. Es zeigt sich eine positive Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und dem Anteil von CD134 auf CD4<sup>+</sup>-Zellen.

CD134, auch OX40 genannt, ist neben PD1 ein anderer kostimulatorischer Rezeptor, der zur Charakterisierung der follikulären T-Helferzellen herangezogen werden kann. Breitfeld et al. beschreiben eine erhöhte Expression zusammen mit den kostimulatorischen Molekülen wie CD40L, ICOS und PD1 und ein davon ausgehendes kostimulatorisches Signal, das zur Aktivierung der Antigenpräsentierenden B-Zelle führt (Breitfeld et al. 2000). CD134 ist vor allem auf kürzlich aktivierten T-Zellen zu finden (Salek-Ardakani et al. 2006) und wichtig für das Überleben dieser Zellen (Croft 2010). Die Expression bleibt auch noch sieben Tage nach Stimulation erhalten (Reichwald et al. 2014). Versuche von Boot et al. zeigen, dass die Blockade von CD134 zu einer Verbesserung der Arthritis in einem Rattenmodell für Rheumatoide Arthritis führt. Dass es sehr auf den Zeitpunkt und den Kontext der Aktivierung von CD134 ankommt, zeigt die Tatsache, dass die Aktivierung von CD134 früh nach einer viralen Infektion zum Stoppen der follikulären T-Helferzellendifferenzierung führt (Boot et al. 2005).

Die erhöhte Expression des Markers im Vergleich von SLE-Patienten zu gesunden Kontrollen und von Patienten mit LN zu Patienten ohne eine solche wurde ebenfalls von Patschan et al. beschrieben (Patschan et al. 2006). Die in dieser Arbeit gezeigten, darüber hinausgehenden erhöhten Expressionen bei aktiven Patienten und die Korrelation mit der Krankheitsaktivität lassen sich vermutlich durch eine größere Kohorte in der hier vorliegenden Arbeit erklären.

Die wichtige Rolle von CD134 zeigt die Arbeit von Jaquemin et al., in der eine starke Expression vom CD134-Liganden auf antigenpräsentierenden Zellen (APCs) vor allem in entzündetem Nierengewebe bei Patienten mit LN sowie in Hautproben und im Blut von SLE-Patienten bewiesen werden konnte. Die Abnahme des Liganden von CD134 auf APCs zeitgleich mit der Krankheitsaktivität nach Therapieeinleitung bei zunächst unbehandelten Patienten lässt vermuten, dass die

Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor eine entscheidende Rolle in der Pathogenese spielt. Gleichzeitig zeigte diese Arbeitsgruppe, dass der Signalweg über CD134 mehrere T-Helferzell-Gene (unter anderem CXCR5, BCL6, IL-21 und PD1) hochreguliert und damit zur Differenzierung von Tfh-like Zellen führt (Jacquemin et al. 2015).

#### **4.3 Die Rolle der IL-21-Produktion von folliculären T-Helferzellen**

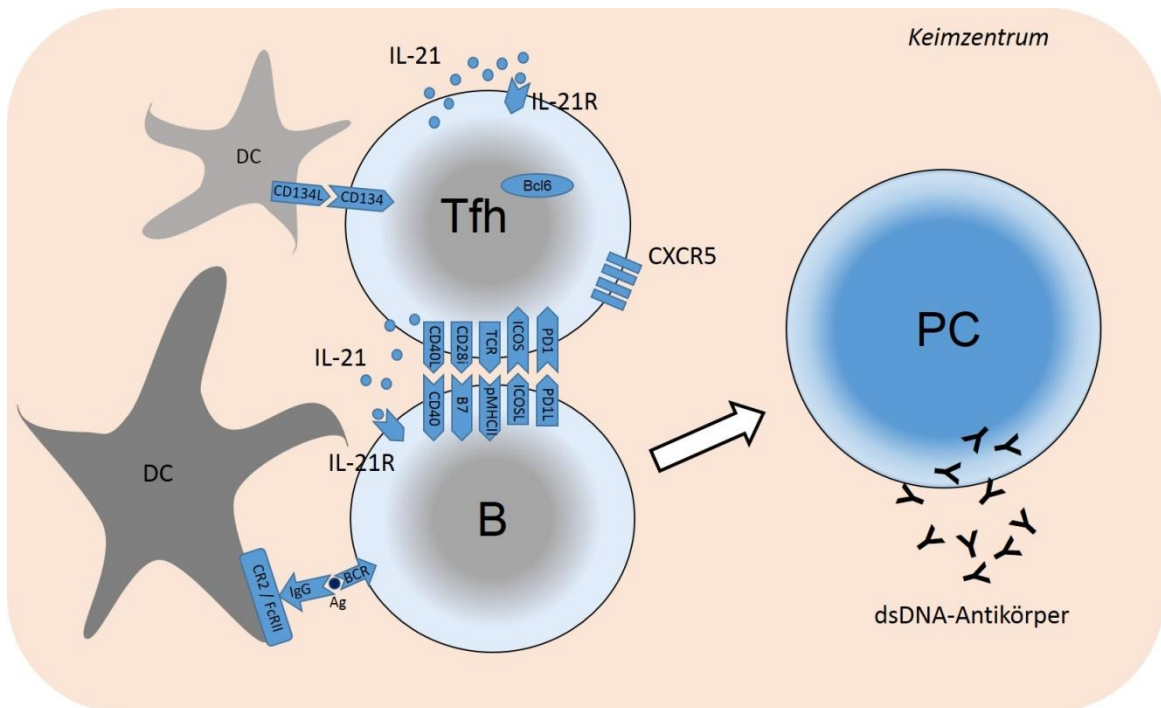
In dieser Arbeit wurden die folliculären T-Helferzellen mittels kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche (CD134 und PD1) in Kombination mit intrazellulären Markern weiter charakterisiert, um den Phänotyp näher beschreiben zu können. Dabei wurden sie zunächst als IL-21-produzierende Zellen definiert. Dong et al. beschreiben folliculäre T-Helferzellen als Zellen, die eine hohe Expression von Zelloberflächenmarkern wie CXCR5, PD1 und ICOS aufweisen und zusätzlich IL-21 produzieren (Dong et al. 2011). Diese IL-21 Produktion ist möglicherweise essentiell für das Wachstum, die Differenzierung und den Klassenwechsel der B-Zellen (Tangye et al. 2013).

CD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-Zellen und CD4<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit als aktivierte Zellen definiert, die Kontakt zu einer Antigen-präsentierenden Zelle hatten. Mit dem Ziel zwischen lediglich aktivierten und zirkulierenden folliculären T-Helfer-Zellen zu unterscheiden, wurde der Anteil an diesen aktivierten Zellen untersucht, die IL-21 exprimieren. Die Tatsache, dass keine erhöhten Anteile an stimulierten CD4<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup>- oder CD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup>-Zellen gezeigt werden konnten, ist nicht mit den bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigten höheren Anteilen an zirkulierenden folliculären T-Helferzellen in SLE-Patienten vereinbar (He et al. 2013; Simpson et al. 2010). Da allerdings ebenfalls keine erhöhten Anteile an CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup>-Zellen gezeigt werden konnten, wie etwa von Dolff et al. beschrieben (Dolff et al. 2011), könnte es an unterschiedlichen Patientengruppen liegen. Simpson et al. charakterisierten die Patienten in der genannten Arbeit anhand von Organmanifestationen im Rahmen des SLE und gaben die Medikation der Patienten nicht an. Sie fanden beispielsweise einen Zusammenhang zwischen biopsich gesicherten Lupusnephritiden und hohem Anteil von zirkulierenden folliculären T-Helferzellen, der in der vorliegenden Arbeit nicht nachvollzogen werden konnte. Die Medikation der Patienten in der Arbeit von Dolff et al. unterschied sich von der



hier vorliegenden dahingehend, dass lediglich 52% seiner Patienten immunsuppressive Therapie in Form von Azathioprin, MTX, Mycophenolatmofetil oder Cyclophosphamid erhielten und in dieser Arbeit 75 % der Patienten. Die restlichen Patienten waren entweder gar nicht medikamentös behandelt oder auf Hydroxychloroquin und / oder Prednisolon eingestellt. Dass die hier gezeigten Ergebnisse in eine ähnliche Richtung gehen könnten, wie jene von Dolff et al. 2011, zeigt die signifikante Korrelation der Krankheitsaktivität in Form des SLEDAs mit der IL-21-Expression auf CD4<sup>+</sup>-Zellen. Dolff et al. konnten signifikante Unterschiede zwischen aktiven und inaktiven verglichen mit gesunden Kontrollen nachweisen.

Zhang et al. zeigten, dass IL-21-mRNA von follikulären T-Helferzellen aus Tonsillengewebe von Lupuspatienten und von zirkulierenden follikulären T-Helferzellen gebildet wurde, jedoch nicht von nicht-follikulären T-Helferzellen. Sie zeigten eine signifikant höhere mRNA-Expression von IL-21<sup>+</sup>-Zellen bei Lupuspatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Zhang et al. 2015). Während sie eine Korrelation zwischen dem SLEDAI und den zirkulierenden follikulären T-Helferzellen feststellten, konnte in dieser vorliegenden Arbeit die Korrelation von SLEDAI und IL-21-positiven CD4<sup>+</sup>-Zellen gezeigt werden.



**Abbildung 25: Interaktion der follikulären T-Helferzelle mit der B-Zelle.** Darstellung der Beziehung zwischen follikulären T-Helferzellen und B-Zellen, die zur Umwandlung der B-Zelle in eine Plasmazelle und damit zur Bildung von Antikörpern führt. Kommt eine Tfh-Zelle mit einer dendritischen Zelle in Kontakt, die ihr ein Antigen präsentiert, so kann sie über diverse Kontaktmoleküle (Zytokine und membranständige Moleküle) eine Verbindung mit einer B-Zelle eingehen. Diese B-Zelle kann ebenfalls durch den Kontakt zu einer dendritischen Zelle aktiviert werden. Die Verbindung zwischen Tfh-Zelle und B-Zelle führt über verschiedene Mechanismen zur Umwandlung der B-Zelle in eine Plasmazellen, die Antikörper gegen das präsentierende Antigen bildet, in diesem Fall gegen Doppelstrang-DNA. Die Tfh-Zelle wiederum wird zu einer langlebigen T-Helferzelle (Tangye et al. 2013)). Ag = Antigen; B = B-Zelle; Bcl6 = B-cell lymphoma 6 protein; BCR = B-Zell-Rezeptor; CR2 / FcRII = Komplement-Rezeptor II / 40-kDa Fc gamma-Rezeptor; CXCR5 = Chemokinrezeptor 5; DC = dendritische Zelle; dsDNA-Antikörper = Antikörper gegen Doppelstrang-DNA, ICOS = Inducible T-cell Costimulator; ICOSL = Inducible T-cell Costimulator Ligand; IgG = Immunglobulin G; IL-21 = Interleukin-21; IL-21R = Interleukin-21-Rezeptor; PC = Plasmazelle; pMHCII = peptid major histocompatibility Cplex II; TCR = T-Zell-Rezeptor; Tfh = follikuläre T-Helferzelle.

#### **4.4 Die Rolle der IL-22-Produktion von folliculären T-Helferzellen**

Die vorliegende Arbeit konnte eine erniedrigte intrazelluläre IL-22-Expression von stimulierten CD134<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen nicht nur bei SLE-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen, sondern auch im Vergleich von aktiven zu nicht aktiven Patienten, zeigen.

IL-22 wurde als ein wichtiges erhöhtes Zytokin in anderen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, Morbus Crohn und Psoriasis beschrieben (Pan et al. 2013). Für die rheumatoide Arthritis wurde gezeigt, dass es direkt die Exazerbation der Krankheit vermitteln kann (Roeleveld et al. 2014). Für SLE jedoch zeigen sich widersprüchliche Daten. Während Zhao et al. erhöhte IL-22-Serumspiegel nachweisen konnte (Zhao et al. 2013), zeigten zwei Arbeitsgruppen erniedrigte Serumspiegel (Cheng et al. 2009) (Pan et al. 2009). Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob für IL-22 in verschiedenen Zellpopulationen eine veränderte intrazelluläre Expression vorliegt. Die gezeigten Daten bestätigen die Ergebnisse von Pan et al. und Cheng et al. (Cheng et al. 2009; Pan et al. 2009). Eine positive Korrelation zwischen dem SLEDAI und dem Serumspiegel von IL-22, wie bei Pan et al, konnte anhand der hier durchgeführten Methode nicht untermauert werden. Allerdings konnte eine positive Korrelation zwischen der IL-22-Produktion von stimulierten CD134<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen mit dem C3-Komplementspiegel gezeigt werden. Die Unterschiede könnten sich darin begründen, dass die Arbeitsgruppe um Pan eine größere Kohorte von 57 SLE-Patienten untersucht hat. Außerdem wurde dort die Plasmakonzentration gemessen, während in dieser Arbeit die für IL-22 positiven CD4<sup>+</sup>-Zellen gemessen wurden. Nicht zuletzt ist die hier vorliegende kaukasische und dort vorliegende chinesische Population zu erwähnen.

Die Arbeitsgruppe um Zhao untersuchte die Konzentrationen von IL-22 und die Häufigkeit von IL-22-produzierenden Zellen bei Patienten, die in den vorherigen sechs Monaten keine immunsuppressive Therapie erhalten hatten, vor und nach der Therapieeinleitung mit Glukokortikoiden, Cyclophosphamid und Hydroxychloroquin. Die Serumlevel von IL-22 und die IL-22<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen verringerten sich signifikant nach Therapiebeginn sowohl bei Patienten als auch bei den mitgeführten Kontrollen (Zhao et al. 2014). Diese widersprüchlichen Ergebnisse

wurden gleichermaßen in einer chinesischen Population gefunden. Der entscheidende Unterschied könnte sein, dass Zhao et al. nur Patienten untersuchten, die in den letzten 6 Monaten keine Therapie erhalten hatten. Der zweite Untersuchungszeitpunkt wurde 4 Wochen nach der Therapieeinleitung angesetzt. Die anderen Arbeitsgruppen untersuchten ein therapiertes Patientenkollektiv. Möglicherweise erniedrigt die immunregulatorische Therapie die IL-22-produzierenden Zellen und damit auch das Serumlevel von IL-22.

Insgesamt ist zu sagen, dass die Kohorte von 39 Patienten, die in dieser Arbeit untersucht wurde, eine vergleichsweise große Untersuchungsgruppe für die Erkrankung des SLE darstellt.

## 5. Zusammenfassung

Die Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses ist durch eine T-Zell-abhängige Autoantikörperproduktion durch Plasmazellen gekennzeichnet. Follikuläre T-Helferzellen induzieren über die Produktion von IL-21 die Bildung von Plasmazellen aus B-Zellen. Ziel dieser Arbeit war es, den Phänotyp der IL-21-produzierenden follikulären T-Helferzelle darzustellen. Dies erfolgte anhand kostimulatorischer Marker (CD134, PD1), die möglicherweise charakteristisch sind für follikuläre T-Helferzellen. Es stellten sich die Fragen, ob es Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Kontrollen in dieser Zellgruppe gibt und ob es Zellpopulationen gibt, die mit der Krankheitsaktivität oder einer Lupusnephritis assoziiert sind. Zur Beantwortung dieser Fragen wurde das periphere Blut von 39 Patienten sowie 19 gesunden Kontrollen *ex vivo* stimuliert und durchflusszytometrisch auf die Oberflächenmarker CD3, CD8, CD134 und PD1 sowie auf die intrazellulären Marker IL-21, IL-22 und IFN $\gamma$  untersucht.

Die Untersuchungen wiesen bei Patienten eine erhöhte Expression von CD134 auf CD4<sup>+</sup>-Zellen ( $p=0,002$ ) nach. Die Krankheitsaktivität korrelierte positiv zum Anteil von CD134 auf CD4<sup>+</sup>-Zellen ( $r=0,38$ ;  $p=0,02$ ). Bei Patienten war der Anteil IL-22-produzierender-Zellen an CD134<sup>+</sup>-Zellen signifikant niedriger als bei Gesunden ( $p=0,01$ ). Es wurde eine erhöhte Expression von PD1 auf CD4<sup>+</sup>-Zellen bei bestehender Nephritis im Vergleich zu Gesunden gefunden ( $p=0,004$ ). IFN $\gamma$  fand sich bei Patienten signifikant niedriger exprimiert in CD4<sup>+</sup>- und CD134<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen als bei Gesunden ( $p=0,03$ ;  $p=0,02$ ); ebenso bei Patienten mit Nephritis im Vergleich zu Patienten ohne ( $p=0,003$ ;  $p=0,007$ ). Die Krankheitsaktivität erwies sich zur IL-21-Expression auf CD4<sup>+</sup>-Zellen als positiv korrelierend ( $r=0,32$ ;  $p=0,048$ ).

Diese Arbeit zeigt, dass sich die Expressionen der Marker CD134 und PD1 auf T-Zellen zwischen Patienten und Gesunden sowie innerhalb der Patientengruppe prozentual unterscheiden. CD134 ist auf T-Zellen von Patienten signifikant höher exprimiert als bei Gesunden. Die PD1-Expression auf T-Zellen ist bei Patienten mit Nephritis höher als bei Gesunden.

Eine Definition der IL-21-produzierenden follikulären T-Helferzelle gelingt mit diesen Markern nicht, was zu der Annahme führt, dass der überwiegende Teil dieser Zellpopulation den Th1-Zellen, die IFN $\gamma$  produzieren, zuzuordnen ist.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Aringer, M., Schneider, M. (2016):

Systemic lupus erythematosus.

Dtsch Med Wochenschr. 141, 537-543

2. Bertsias, G. K., Tektonidou, M., Amoura, Z., Aringer, M., Bajema, I., Berden, J. H., Boletis, J., Cervera, R., Dorner, T., Doria, A., Ferrario, F., Floege, J., Houssiau, F. A., Ioannidis, J. P., Isenberg, D. A., Kallenberg, C. G., Lightstone, L., Marks, S. D., Martini, A., Moroni, G., Neumann, I., Praga, M., Schneider, M., Starra, A., Tesar, V., Vasconcelos, C., van Vollenhoven, R. F., Zakharova, H., Haubitz, M., Gordon, C., Jayne, D., Boumpas, D. T. (2012):

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.

Ann Rheum Dis. 71, 1771-1782

3. Blanco, P., Ueno, H., Schmitt, N. (2016):

T follicular helper (Tfh) cells in lupus: Activation and involvement in SLE pathogenesis.

Eur J Immunol. 46, 281-290

4. Boot, E. P., Koning, G. A., Storm, G., Wagenaar-Hilbers, J. P., van Eden, W., Everse, L. A., Wauben, M. H. (2005):

CD134 as target for specific drug delivery to auto-aggressive CD4+ T cells in adjuvant arthritis.

Arthritis Res Ther. 7, R604-615

5. Bootsma, H., Spronk, P. E., Hummel, E. J., de Boer, G., ter Borg, E. J., Limburg, P. C., Kallenberg, C. G. (1996):

Anti-double stranded DNA antibodies in systemic lupus erythematosus: detection and clinical relevance of IgM-class antibodies.

Scand J Rheumatol. 25, 352-359

6. Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., Forster, R. (2000):

Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production.

J Exp Med. 192, 1545-1552

7. Brinks, R., Fischer-Betz, R., Sander, O., Richter, J. G., Chehab, G., Schneider, M. (2014):

Age-specific prevalence of diagnosed systemic lupus erythematosus in Germany 2002 and projection to 2030.

Lupus. 23, 1407-1411

8. Bubier, J. A., Sproule, T. J., Foreman, O., Spolski, R., Shaffer, D. J., Morse, H. C., 3rd, Leonard, W. J., Roopenian, D. C. (2009):

A critical role for IL-21 receptor signaling in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus in BXSB-Yaa mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 106, 1518-1523

9. Büning, H., Trenkler, G. (1994):

Nichtparametrische statistische Methoden.

De Gruyter.

10. Cervera, R., Khamashta, M. A., Font, J., Sebastiani, G. D., Gil, A., Lavilla, P., Mejia, J. C., Aydintug, A. O., Chwalinska-Sadowska, H., de Ramon, E., Fernandez-Nebro, A., Galeazzi, M., Valen, M., Mathieu, A., Houssiau, F., Caro, N., Alba, P., Ramos-Casals, M., Ingelmo, M., Hughes, G. R. (2003):

Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients.

Medicine (Baltimore). 82, 299-308

11. Chehab, G., Fischer-Betz, R., Schneider, M. (2011):

Changes in mortality and morbidity in systemic lupus erythematosus.

Z Rheumatol. 70, 480-485

12. Cheng, F., Guo, Z., Xu, H., Yan, D., Li, Q. (2009):  
Decreased plasma IL22 levels, but not increased IL17 and IL23 levels, correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus.  
Ann Rheum Dis. 68, 604-606
13. Choi, J. Y., Hsi-enHo, J., Pasoto, S. G., Bunin, V., Kim, S., Carrasco, S., Borba, E. F., Goncalves, C. R., Costa, P. R., Kallas, E. G., Bonfa, E., Craft, J. (2015):  
Circulating follicular helper-like T cells in systemic lupus erythematosus: Association with disease activity.  
Arthritis Rheumatol.
14. Chung, Y., Yang, X., Chang, S. H., Ma, L., Tian, Q., Dong, C. (2006):  
Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes.  
Cell Res. 16, 902-907
15. Croft, M. (2010):  
Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134).  
Annu Rev Immunol. 28, 57-78
16. Crotty, S. (2011):  
Follicular helper CD4 T cells (TFH).  
Annu Rev Immunol. 29, 621-663
17. Crotty, S. (2014):  
T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease.  
Immunity. 41, 529-542
18. Deenick, E. K., Ma, C. S. (2011):  
The regulation and role of T follicular helper cells in immunity.  
Immunology. 134, 361-367



19. Deng, X., Yan, S., Wei, W. (2015):  
IL-21 acts as a promising therapeutic target in systemic lupus erythematosus by regulating plasma cell differentiation.  
Cell Mol Immunol. 12, 31-39
20. Dolff, S., Abdulahad, W. H., Westra, J., Doornbos-van der Meer, B., Limburg, P. C., Kallenberg, C. G., Bijl, M. (2011):  
Increase in IL-21 producing T-cells in patients with systemic lupus erythematosus.  
Arthritis Res Ther. 13, R157
21. Dolff, S., Quandt, D., Wilde, B., Feldkamp, T., Hua, F., Cai, X., Specker, C., Kribben, A., Kallenberg, C. G., Witzke, O. (2010):  
Increased expression of costimulatory markers CD134 and CD80 on interleukin-17 producing T cells in patients with systemic lupus erythematosus.  
Arthritis Res Ther. 12, R150
22. Dong, W., Zhu, P., Wang, Y., Wang, Z. (2011):  
Follicular helper T cells in systemic lupus erythematosus: a potential therapeutic target.  
Autoimmun Rev. 10, 299-304
23. Duhon, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. (2009):  
Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells.  
Nat Immunol. 10, 857-863
24. Dye, J. R., Ullal, A. J., Pisetsky, D. S. (2013):  
The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.  
Scand J Immunol. 78, 140-148
25. Fawzy, M., Edrees, A., Okasha, H., El Ashmaui, A., Ragab, G. (2016):  
Gastrointestinal manifestations in systemic lupus erythematosus.  
Lupus.

26. Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, L. J., McHeyzer-Williams, M. G. (2009):

Follicular helper T cells: lineage and location.

Immunity. 30, 324-335

27. Finney, H. M., Akbar, A. N., Lawson, A. D. (2004):

Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain.

J Immunol. 172, 104-113

28. Fischer-Betz, R., Herzer, P., Schneider, M. (2005):

Systemic lupus erythematosus.

Dtsch Med Wochenschr. 130, 2451-2458; quiz 2459-2460, 2461-2452

29. Francisco, L. M., Sage, P. T., Sharpe, A. H. (2010):

The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity.

Immunological Reviews. 236, 219-242

30. Garabet, L., Gilboe, I. M., Mowinckel, M. C., Flem Jacobsen, A., Mollnes, T. E., Sandset, P. M., Jacobsen, E. M. (2016):

Antiphospholipid antibodies are associated with low levels of complement C3 and C4 in patients with systemic lupus erythematosus.

Scand J Immunol.

31. Hahn, B. H. (1998):

Antibodies to DNA.

N Engl J Med. 338, 1359-1368

32. Hanly, J. G., O'Keeffe, A. G., Su, L., Urowitz, M. B., Romero-Diaz, J., Gordon, C., Bae, S. C., Bernatsky, S., Clarke, A. E., Wallace, D. J., Merrill, J. T., Isenberg, D. A., Rahman, A., Ginzler, E. M., Fortin, P., Gladman, D. D., Sanchez-Guerrero, J., Petri, M., Bruce, I. N., Dooley, M. A., Ramsey-Goldman, R., Aranow, C., Alarcon, G. S., Fessler, B. J., Steinsson, K., Nived, O., Sturfelt, G. K., Manzi, S., Khamashta, M. A., van Vollenhoven, R. F., Zoma, A. A., Ramos-Casals, M., Ruiz-Irastorza, G., Lim, S. S., Stoll, T., Inanc, M., Kalunian, K. C., Kamen, D. L., Maddison, P., Peschken, C. A., Jacobsen, S., Askanase, A., Theriault, C., Thompson, K., Farewell, V. (2016):

The frequency and outcome of lupus nephritis: results from an international inception cohort study.

Rheumatology (Oxford). 55, 252-262

33. He, J., Tsai, L. M., Leong, Y. A., Hu, X., Ma, C. S., Chevalier, N., Sun, X., Vandenberg, K., Rockman, S., Ding, Y., Zhu, L., Wei, W., Wang, C., Karnowski, A., Belz, G. T., Ghali, J. R., Cook, M. C., Riminton, D. S., Veillette, A., Schwartzberg, P. L., Mackay, F., Brink, R., Tangye, S. G., Vinuesa, C. G., Mackay, C. R., Li, Z., Yu, D. (2013):

Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5(+) CD4(+) T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure.

Immunity. 39, 770-781

34. Herber, D., Brown, T. P., Liang, S., Young, D. A., Collins, M., Dunussi-Joannopoulos, K. (2007):

IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression.

J Immunol. 178, 3822-3830

35. Hochberg, M. C. (1997):

Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.

Arthritis Rheum. 40, 1725

36. Ikeuchi, H., Kuroiwa, T., Hiramatsu, N., Kaneko, Y., Hiromura, K., Ueki, K., Nojima, Y. (2005):  
Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine.  
*Arthritis Rheum.* 52, 1037-1046
37. Jacquemin, C., Schmitt, N., Contin-Bordes, C., Liu, Y., Narayanan, P., Seneschal, J., Maurouard, T., Dougall, D., Davizon, E. S., Dumortier, H., Douchet, I., Raffray, L., Richez, C., Lazaro, E., Duffau, P., Truchetet, M. E., Khoryati, L., Mercie, P., Couzi, L., Merville, P., Schaeveerbeke, T., Viillard, J. F., Pellegrin, J. L., Moreau, J. F., Muller, S., Zurawski, S., Coffman, R. L., Pascual, V., Ueno, H., Blanco, P. (2015):  
OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response.  
*Immunity.* 42, 1159-1170
38. Jin, H., Carrio, R., Yu, A., Malek, T. R. (2004):  
Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis.  
*J Immunol.* 173, 657-665
39. Kim, Y. U., Lim, H., Jung, H. E., Wetsel, R. A., Chung, Y. (2015):  
Regulation of Autoimmune Germinal Center Reactions in Lupus-Prone BXD2 Mice by Follicular Helper T Cells.  
*PLoS One.* 10, e0120294
40. King, C., Tangye, S. G., Mackay, C. R. (2008):  
T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses.  
*Annu Rev Immunol.* 26, 741-766

41. Liang, S. C., Tan, X. Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., Fouser, L. A. (2006):  
Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides.  
J Exp Med. 203, 2271-2279
42. Luo, Q., Huang, Z., Ye, J., Deng, Y., Fang, L., Li, X., Guo, Y., Jiang, H., Ju, B., Huang, Q., Li, J. (2016):  
PD-L1-expressing neutrophils as a novel indicator to assess disease activity and severity of systemic lupus erythematosus.  
Arthritis Res Ther. 18, 47
43. Ma, J., Zhu, C., Ma, B., Tian, J., Baidoo, S. E., Mao, C., Wu, W., Chen, J., Tong, J., Yang, M., Jiao, Z., Xu, H., Lu, L., Wang, S. (2012):  
Increased frequency of circulating follicular helper T cells in patients with rheumatoid arthritis.  
Clin Dev Immunol. 2012, 827480
44. Mahmood, S. N., Mukhtar, K. N., Deen, S., Khan, F. N. (2016):  
Renal Biopsy: A much needed tool in patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE).  
Pak J Med Sci. 32, 70-74
45. Manku, H., Graham, D. S., Vyse, T. J. (2009):  
Association of the co-stimulator OX40L with systemic lupus erythematosus.  
J Mol Med (Berl). 87, 229-234
46. Murphy, K. M., Mahlke, K., Seidler, L., Travers, P., Haußer-Siller, I., Walport, M. (2009):  
Janeway Immunologie.  
Spektrum Akademischer Verlag.

47. Murphy, K. M., Stockinger, B. (2010):  
Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances.  
Nat Immunol. 11, 674-680
48. Onabajo, O. O., George, J., Lewis, M. G., Mattapallil, J. J. (2013):  
Rhesus macaque lymph node PD-1(hi)CD4+ T cells express high levels of CXCR5  
and IL-21 and display a CCR7(lo)ICOS+Bcl6+ T-follicular helper (Tfh) cell  
phenotype.  
PLoS One. 8, e59758
49. Pan, H. F., Li, X. P., Zheng, S. G., Ye, D. Q. (2013):  
Emerging role of interleukin-22 in autoimmune diseases.  
Cytokine Growth Factor Rev. 24, 51-57
50. Pan, H. F., Zhao, X. F., Yuan, H., Zhang, W. H., Li, X. P., Wang, G. H., Wu, G.  
C., Tang, X. W., Li, W. X., Li, L. H., Feng, J. B., Hu, C. S., Ye, D. Q. (2009):  
Decreased serum IL-22 levels in patients with systemic lupus erythematosus.  
Clin Chim Acta. 401, 179-180
51. Patschan, S., Dolff, S., Kribben, A., Durig, J., Patschan, D., Wilde, B., Specker,  
C., Philipp, T., Witzke, O. (2006):  
CD134 expression on CD4+ T cells is associated with nephritis and disease  
activity in patients with systemic lupus erythematosus.  
Clin Exp Immunol. 145, 235-242
52. Pedoeem, A., Azoulay-Alfaguter, I., Strazza, M., Silverman, G. J., Mor, A.  
(2014):  
Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity.  
Clin Immunol. 153, 145-152
53. Reichwald, K., Jorgensen, T. Z., Skov, S. (2014):  
TL1A increases expression of CD25, LFA-1, CD134 and CD154, and induces IL-  
22 and GM-CSF production from effector CD4 T-cells.  
PLoS One. 9, e105627

54. Roeleveld, D. M., Koenders, M. I. (2014):  
The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in Rheumatoid Arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy.  
Cytokine.
55. Rowe, P., Heinisch, C. (2012):  
Statistik für Mediziner und Pharmazeuten.  
Weinheim: Wiley-VCH.
56. Sack, U., Tarnok, A., Rothe, G. (2007):  
Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie ; 163 Tabellen.  
Basel: Karger.
57. Salek-Ardakani, S., Croft, M. (2006):  
Regulation of CD4 T cell memory by OX40 (CD134).  
Vaccine. 24, 872-883
58. Shlomchik, M. J., Craft, J. E., Mamula, M. J. (2001):  
From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease.  
Nat Rev Immunol. 1, 147-153
59. Simpson, N., Gatenby, P. A., Wilson, A., Malik, S., Fulcher, D. A., Tangye, S. G., Manku, H., Vyse, T. J., Roncador, G., Huttley, G. A., Goodnow, C. C., Vinuesa, C. G., Cook, M. C. (2010):  
Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus.  
Arthritis Rheum. 62, 234-244
60. So, T., Song, J., Sugie, K., Altman, A., Croft, M. (2006):  
Signals from OX40 regulate nuclear factor of activated T cells c1 and T cell helper 2 lineage commitment.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 103, 3740-3745

61. Tangye, S. G., Ma, C. S., Brink, R., Deenick, E. K. (2013):  
The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease.  
Nat Rev Immunol. 13, 412-426
62. Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K., Spits, H. (2009):  
Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells.  
Nat Immunol. 10, 864-871
63. Tsokos, G. C. (2011):  
Systemic Lupus Erythematosus.  
New England Journal of Medicine. 365, 2110-2121
64. Vogelzang, A., McGuire, H. M., Yu, D., Sprent, J., Mackay, C. R., King, C. (2008):  
A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells.  
Immunity. 29, 127-137
65. Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Nagata, S. (1992):  
Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis.  
Nature. 356, 314-317
66. Watts, T. H., DeBenedette, M. A. (1999):  
T cell co-stimulatory molecules other than CD28.  
Curr Opin Immunol. 11, 286-293
67. Weening, J. J., D'Agati, V. D., Schwartz, M. M., Seshan, S. V., Alpers, C. E., Appel, G. B., Balow, J. E., Bruijn, J. A., Cook, T., Ferrario, F., Fogo, A. B., Ginzler, E. M., Hebert, L., Hill, G., Hill, P., Jennette, J. C., Kong, N. C., Lesavre, P., Lockshin, M., Looi, L. M., Makino, H., Moura, L. A., Nagata, M., International Society of Nephrology Working Group on the Classification of Lupus, N., Renal Pathology Society Working Group on the Classification of Lupus, N. (2004):



The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited.  
Kidney Int. 65, 521-530

68. Weinberg, A. D. (2002):

OX40: targeted immunotherapy--implications for tempering autoimmunity and enhancing vaccines.

Trends Immunol. 23, 102-109

69. Weinberg, A. D., Evans, D. E., Thalhofer, C., Shi, T., Prell, R. A. (2004):

The generation of T cell memory: a review describing the molecular and cellular events following OX40 (CD134) engagement.

J Leukoc Biol. 75, 962-972

70. Wu, Y., Zhang, F., Ma, J., Zhang, X., Wu, L., Qu, B., Xia, S., Chen, S., Tang, Y., Shen, N. (2015):

Association of large intergenic noncoding RNA expression with disease activity and organ damage in systemic lupus erythematosus.

Arthritis Res Ther. 17, 131

71. Xu, H., Liu, J., Cui, X., Zuo, Y., Zhang, Z., Li, Y., Tao, R., Li, Y., Pang, J. (2015):

Increased frequency of circulating follicular helper T cells in lupus patients is associated with autoantibody production in a CD40L-dependent manner.

Cell Immunol. 295, 46-51

72. Zhang, X., Lindwall, E., Gauthier, C., Lyman, J., Spencer, N., Alarakhia, A., Fraser, A., Ing, S., Chen, M., Webb-Detiege, T., Zakem, J., Davis, W., Choi, Y. S., Quinet, R. (2015):

Circulating CXCR5+CD4+helper T cells in systemic lupus erythematosus patients share phenotypic properties with germinal center follicular helper T cells and promote antibody production.

Lupus.

73. Zhao, L., Jiang, Z., Jiang, Y., Ma, N., Wang, K., Zhang, Y.,Feng, L. (2013):  
IL-22+CD4+ T-cells in patients with active systemic lupus erythematosus.  
Exp Biol Med (Maywood). 238, 193-199

74. Zhao, L., Ma, H., Jiang, Z., Jiang, Y.,Ma, N. (2014):  
Immunoregulation therapy changes the frequency of interleukin (IL)-22+ CD4+ T  
cells in systemic lupus erythematosus patients.  
Clin Exp Immunol. 177, 212-218

## **7. Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Oliver Witzke für die Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie für die andauernde Diskussionsbereitschaft.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Sebastian Dolff danke ich für die ausdauernde Bereitschaft und Fähigkeit zur Motivation bei der Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. Andreas Kribben danke ich für seine fortwährende Unterstützung und Förderung der Untersuchungen.

Den Mitarbeitern der Klinik für Nephrologie und den Mitarbeitern im nephrologischen Labor gilt mein Dank für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Unterstützung.

Herrn Professor Dr. med. Christof Specker und den Mitarbeitern der Abteilung für Rheumatologie und Klinische Immunologie der Kliniken Essen Süd danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Martin Scharpenberg danke ich für die Beratung bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten.

Meinem Mann und meiner Familie danke ich ganz besonders für ihre uneingeschränkte Unterstützung während der Fertigstellung der Dissertation.

## 8. Anhang

### 8.1 Abbildungen

Abbildung 1	T-Zell-Differenzierung	Seite 11
Abbildung 2	Quadrantenanalyse	Seite 23
Abbildung 3	CD4 <sup>+</sup> CD134 <sup>+</sup> -Zellen bei Patienten abhängig von der Nierenbeteiligung und bei gesunden Kontrollen	Seite 26
Abbildung 4	CD4 <sup>+</sup> CD134 <sup>+</sup> -Zellen bei Patienten abhängig von der Nierenbeteiligung und bei gesunden Kontrollen	Seite 26
Abbildung 5	Intrazelluläre Marker in CD4 <sup>+</sup> CD134 <sup>+</sup> -Zellen bei Patienten und gesunden Kontrollen	Seite 29
Abbildung 6	Intrazelluläre Marker in CD4 <sup>+</sup> CD134 <sup>+</sup> -Zellen bei Patienten und gesunden Kontrollen	Seite 30
Abbildung 7	CD8 <sup>+</sup> CD134 <sup>+</sup> -Zellen bei Patienten abhängig von der Krankheitsaktivität und bei gesunden Kontrollen	Seite 32
Abbildung 8	CD8 <sup>+</sup> CD134 <sup>+</sup> -Zellen bei Patienten abhängig von der Krankheitsaktivität und bei gesunden Kontrollen	Seite 32
Abbildung 9	Intrazelluläre Marker in CD8 <sup>+</sup> CD134 <sup>+</sup> bei Patienten und gesunden Kontrollen	Seite 35
Abbildung 10	Intrazelluläre Marker in CD8 <sup>+</sup> CD134 <sup>+</sup> bei Patienten und gesunden Kontrollen	Seite 36
Abbildung 11	PD1 bei Patienten abhängig von der Nierenbeteiligung und gesunden Kontrollen	Seite 38
Abbildung 12	PD1 bei Patienten abhängig von der Nierenbeteiligung und gesunden Kontrollen	Seite 38
Abbildung 13	Intrazelluläre Marker in PD1 <sup>+</sup> -Zellen bei Patienten und gesunden Kontrollen	Seite 41
Abbildung 14	intrazelluläre Marker in CD4 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup> -Zellen bei Patienten und gesunden Kontrollen	Seite 42
Abbildung 15	CD8 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup> -Zellen bei Patienten abhängig von der Nierenbeteiligung und gesunden Kontrollen	Seite 43
Abbildung 16	Intrazelluläre Marker in CD8 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup> -Zellen bei Patienten und gesunden Kontrollen	Seite 45
Abbildung 17	intrazelluläre Marker in CD4 <sup>+</sup> -Zellen bei Patienten und gesunden Kontrollen	Seite 47
Abbildung 18	intrazelluläre Marker in CD8 <sup>+</sup> -Zellen bei Patienten und gesunden Kontrollen	Seite 49
Abbildung 19	Beziehung von CD4 <sup>+</sup> CD134 <sup>+</sup> -Zellen zur Krankheitsaktivität	Seite 50
Abbildung 20	Beziehung von CD4 <sup>+</sup> IL21 <sup>+</sup> -Zellen zur Krankheitsaktivität	Seite 51
Abbildung 21	Beziehung von CD8 <sup>+</sup> CD134 <sup>+</sup> -Zellen zur Krankheitsaktivität	Seite 51
Abbildung 22	Beziehung von CD4 <sup>+</sup> CD134 <sup>+</sup> -Zellen zur C3-Konzentration	Seite 52
Abbildung 23	Beziehung von CD8 <sup>+</sup> CD134 <sup>+</sup> IL21 <sup>+</sup> -Zellen zur C3-Spiegel	Seite 53
Abbildung 24	Beziehung von CD8 <sup>+</sup> INF $\gamma$ <sup>+</sup> -Zellen zur C4-Konzentration	Seite 53
Abbildung 25	Interaktion der follikulären T-Helferzelle mit der B-Zelle	Seite 58

## 8.2 Tabellen

Tabelle 1	ACR-Kriterien	Seite 8
Tabelle 2	Patientencharakteristika	Seite 17
Tabelle 3	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	Seite 18
Tabelle 4	Antikörper	Seite 19
Tabelle 5	Instrumente und Geräte	Seite 19
Tabelle 6 a., b.	Antikörperkombinationen mit IL-21 (a.) und mit IL-11 (b.)	Seite 21

## 8.3 Abkürzungen

ACR	American College of Rheumatology
Ag	Antigen
ANA	Antinukleäre Antikörper
Anti-Sm-AK	Anti-Smith-Antikörper
B	B-cell = B-Zelle
Bcl6	B-cell lymphoma 6 protein = B-Zell Lymphom 6-Protein
BCR	B-cell receptor = B-Zell-Rezeptor
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CR2 / FcRII	Complement-Receptor II / 40-kDa Fc gamma Receptor = Komplement-Rezeptor II / 40-kDa Fc gamma-Rezeptor
CRP	C-reaktives Protein
CXCR5	Chemokinrezeptor 5
DC	Dendritic cell = dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	Doppelstrang-DNA
FCS	Fetal Calf Serum = fetales Kalbsserum
FSC	Forward scatter = Vorwärtsstreuung
FITC	Fluoreszin Isothiocyanate
ICOS	Inducible T-cell Costimulator = induzierbarer T-Zell-Kostimulator
ICOSL	Inducible T-cell Costimulator Ligand = induzierbarer T-Zell-Kostimulator Ligand
IgG	Immunglobulin G
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL-21	Interleukin-21
IL-21R	Interleukin-21-Rezeptor
IL-22	Interleukin-22
LN	Lupusnephritis
mRNA	Mitochondriale Ribonukleinsäure
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell = periphere mononukleare Blutzelle
PBS	Phosphat buffered saline = Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Plasmacell = Plasmazelle
PC7	Phycoerytherin-Cyanin7
PD1	Programmed death 1
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridiniumchlorophyll-Protein
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
pMHCII	peptid major histocompatibility complex = Peptid-Major-Histokompatibilitäts-Komplex

rpm	rounds per minute = Runden pro Minute
RPMI Lösung	Roswell Park Memorial Institute Lösung
SD	Standard deviation = Standardabweichung
SLE	Systemischer Lupus erythematosus
SLEDAI	systemic lupus erythematosus disease activity index
SSC	Sideward scatter = Seitwärtsstreuung
TCR	T-cell receptor = T-Zell-Rezeptor
Tfh-Zellen	follikulären T-Helferzellen
Th-Zellen	T-Helferzellen
USA	United States of America = Vereinigte Staaten von Amerika
WHO	World Health Organisation = Weltgesundheitsorganisation

## 8.4 SLEDAI

### SLEDAI: DATA COLLECTION SHEET

Chart no.: \_\_\_\_\_ Date of Visit: \_\_\_\_\_

Patient's

M.D.: \_\_\_\_\_ Name: \_\_\_\_\_

(Enter weight in SLEDAI Score column if descriptor present at the time of the visit or in the preceding 10 days.)

Weight SLEDAI Score **Descriptor** Definition

- 8 \_\_\_\_\_ **Seizure:** Recent onset. Exclude metabolic, infectious or drug causes.
- 8 \_\_\_\_\_ **Psychosis:** Altered ability to function in normal activity due to severe disturbance in the perception of reality. Include hallucinations, incoherence, marked loose associations, impoverished thought content, marked illogical thinking, bizarre, disorganized, or catatonic behaviour. Exclude uremia and drug causes.
- 8 \_\_\_\_\_ **Organic brain syndrome:** Altered mental function with impaired orientation, memory, or other intellectual function, with rapid onset and fluctuating clinical features. Include clouding of consciousness with reduced capacity to focus, and inability to sustain attention to environment, plus at least 2 of the following: perceptual disturbance, incoherent speech, insomnia or daytime drowsiness, or increased or decreased psychomotor activity. Exclude metabolic, infectious, or drug causes.
- 8 \_\_\_\_\_ **Visual disturbance:** Retinal changes of SLE. Include cytoid bodies, retinal hemorrhages, serous exudate or hemorrhages in the choroid, or optic neuritis. Exclude hypertension, infection, or drug causes.
- 8 \_\_\_\_\_ **Cranial nerve disorder:** New onset of sensory or motor neuropathy involving cranial nerves.
- 8 \_\_\_\_\_ **Lupus headache:** Severe, persistent headache; may be migrainous, but must be nonresponsive to narcotic analgesia.
- 8 \_\_\_\_\_ **CVA:** New onset of cerebrovascular accident(s). Exclude arteriosclerosis.
- 8 \_\_\_\_\_ **Vasculitis:** Ulceration, gangrene, tender finger nodules, periungual infarction, splinter hemorrhages, or biopsy or angiogram proof of vasculitis.
- 4 \_\_\_\_\_ **Arthritis:** More than 2 joints with pain and signs of inflammation (i.e., tenderness, swelling, or effusion).
- 4 \_\_\_\_\_ **Myositis:** Proximal muscle aching/weakness, associated with elevated creatine phosphokinase/aldolase or electromyogram changes or a biopsy showing myositis.
- 4 \_\_\_\_\_ **Urinary casts:** Heme-granular or red blood cell casts.
- 4 \_\_\_\_\_ **Hematuria:** > 5 red blood cells/high power field. Exclude stone, infection, or other cause.
- 4 \_\_\_\_\_ **Proteinuria:** > 0.5 gm/24 hours. New onset or recent increase of more than 0.5 gm/24 hours.
- 4 \_\_\_\_\_ **Pyuria:** > 5 white blood cells/high power field. Exclude infection.
- 2 \_\_\_\_\_ **New rash:** New onset or recurrence of inflammatory type rash.
- 2 \_\_\_\_\_ **Alopecia:** New onset or recurrence of abnormal, patchy or diffuse loss of hair.
- 2 \_\_\_\_\_ **Mucosal ulcers:** New onset or recurrence of oral or nasal ulcerations.
- 2 \_\_\_\_\_ **Pleurisy:** Pleuritic chest pain with pleural rub or effusion, or pleural thickening.
- 2 \_\_\_\_\_ **Pericarditis:** Pericardial pain with at least 1 of the following: rub, effusion, or electrocardiogram or echocardiogram confirmation.
- 2 \_\_\_\_\_ **Low complement:** Decrease in CH50, C3, or C4 below the lower limit of normal for testing laboratory.
- 2 \_\_\_\_\_ **Increased DNA binding:** > 25 % binding by Farr assay or above normal range for testing laboratory.
- 1 \_\_\_\_\_ **Fever:** > 38°C. Exclude infectious cause.
- 1 \_\_\_\_\_ **Thrombocytopenia:** < 100,000 platelets/mm<sup>3</sup>.
- 1 \_\_\_\_\_ **Leukopenia:** < 3,000 white blood cells/mm<sup>3</sup>. Exclude drug causes.

TOTAL SLEDAI SCORE \_\_\_\_\_

## **9. Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.