

Aus dem
CharitéCentrum 13 für Innere Medizin mit Gastroenterologie und Nephrologie
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und Internistische
Intensivmedizin
Charité Campus Virchow
Direktor: PD. Dr. med. Andreas Kahl

Habilitationsschrift

Zelluläre Immunpathogenese der Lupusnephritis

Zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin und Nephrologie
vorgelegt dem Fakultätsrat der
Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

von
Dr. med. Philipp Enghard

Eingereicht: Oktober/2016

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter/in:

2. Gutachter/in:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1 Lupusnephritis	3
1.2 Lokale Pathogenese der Lupusnephritis	3
1.2.1 Mögliche Rolle von B-Zellen und Plasmazellen in der lokalen Nierenentzündung	4
1.2.2 Mögliche Rolle von T-Zellen in der tubulointerstitiellen Entzündung	5
1.3 Lupusnephritis – das klinische Problem	7
2. Fragestellungen	10
3. Eigene Arbeiten	11
3.1 B1a B-Zellen vollziehen einen Klassenwechsel zur IgG-Produktion und Akkumulieren in entzündeten Ziel-Organen wie den Nieren in einem murinen SLE-Modell	11
3.2 Demaskierung der mit dem SmD1(83-119)-Autoantigen reaktiven CD4+ T-Zellen durch <i>in vitro</i> Depletion von CD25+ regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit SLE	23
3.3 CXCR3+CD4+ T-Zellen lassen sich im Urin nachweisen, ähneln den intrarenalen T-Zellen und stellen einen Biomarker für die akute Lupus- nephritis dar	33
3.4 CD3+CD4+ T-Zellen im Urin als Biomarker zur Diagnose und Verlaufparameter für eine aktive, proliferative Lupusnephritis	43
3.5 CD4+ T-Zellsubtypen, CD8+ T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen im Urin als Biomarker für die akute Lupusnephritis	52
4. Diskussion	63
5. Zusammenfassung	70
6. Literaturangaben	71
7. Abkürzungsverzeichnis	79
8. Danksagung	80
9. Erklärung	81

1. Einleitung

1.1 Lupusnephritis

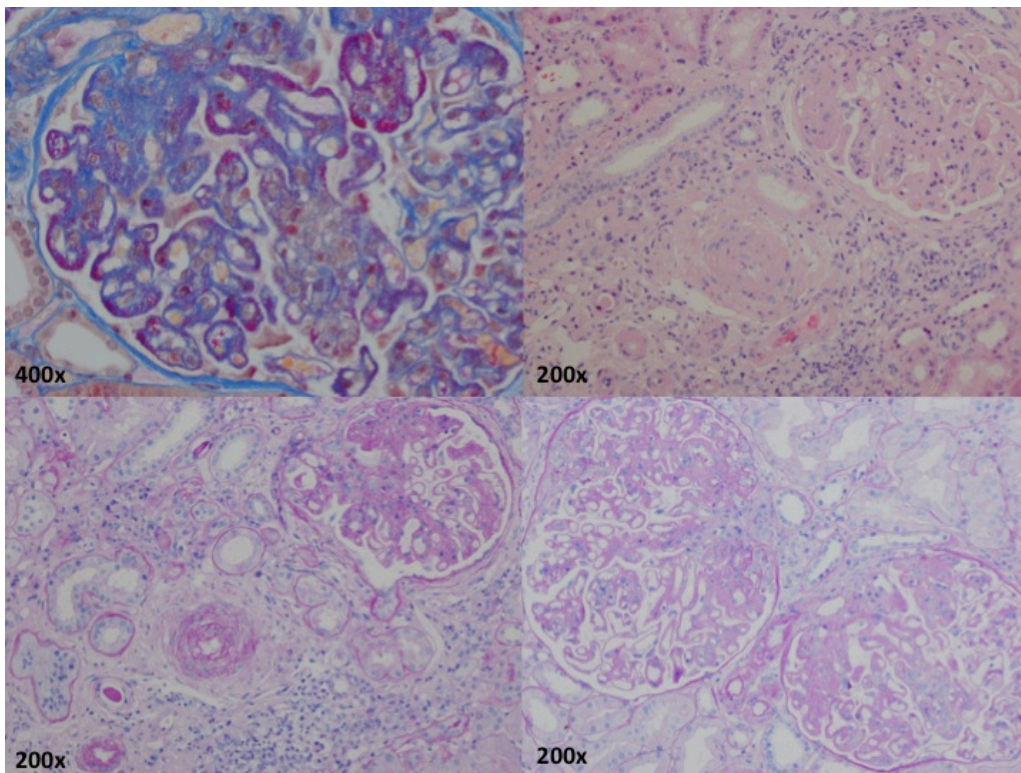
Die Lupusnephritis (LN) ist eine der typischen Organmanifestationen des systemischen Lupus erythematodes (SLE) und eine der Hauptdeterminanten für eine schlechte Prognose^[1]. Abhängig von der untersuchten Population entwickeln 25-75% aller SLE-Patienten eine renale Beteiligung^[2]. Trotz Fortschritten in der Behandlung weisen Patienten mit LN weiterhin eine relevante 5-Jahres-Mortalität von bis zu 18% auf, bei weiteren 10-15% kommt es trotz Therapie zum permanenten, dialysepflichtigen Nierenversagen^[3, 4]. Zusätzlich bergen die aktuellen Standardtherapieoptionen ein erhebliches Risiko in Form von Nebenwirkungen für die Patienten bis hin zu tödlich verlaufenden Therapiekomplicationen, wie in aktuellen Studien zum Vergleich von Cyclophosphamid und Mycophenolat Mofetil (MMF) dokumentiert^[5, 6]. Es besteht also von klinischer Seite erheblicher Bedarf an weiterer Forschung zur Pathogenese der LN, um mit einem besseren Verständnis der Erkrankung in Zukunft gezieltere und effizientere Therapien zu ermöglichen.

1.2 Lokale Pathogenese der Lupusnephritis

Im Rahmen des SLE kommt es durch Ablagerung von Autoantikörpern, Immunkomplexen und Komplement in den Glomeruli zur Entzündung der Nieren. Das Auftreten der Lupusnephritis korreliert mit dem Vorhandensein von bestimmten Autoantikörpern, beispielsweise sind dsDNA-Antikörper (Antikörper gegen doppelsträngige DNA) mit Lupusnephritis assoziiert^[7]. Anti-dsDNA-Antikörper lassen sich aus den entzündeten Nieren bei LN eluieren^[8, 9], und Transfer von bestimmten dsDNA-Autoantikörper kann LN in Mäusen auslösen^[10, 11]. Passend dazu lassen sich in Nierenbiopsien von Patienten mit LN in den Glomeruli neben entzündlichen Veränderungen Antikörper und Komplement nachweisen. Die Kausalkette, dass Autoantikörperablagerungen in den Glomeruli bei SLE eine Nephritis auslösen, ist also schlüssig belegt. Konsistent mit diesem pathogenetischen Konzept fokussieren die gängigen WHO- und ISN/RPS-Klassifikationen der LN auf die Schäden in den Glomeruli^[12].

Allerdings findet sich neben diesen pathologischen Veränderungen in den Glomeruli regelhaft auch eine **Infiltration von Entzündungszellen** in das renale Interstitium (siehe Graphik 1 für Beispielhistologien)^[13, 14]. In diesem Infiltrat sammeln sich CD4+ T-Zellen, die sich vor allem in perivaskulären und periglomerulären Infiltraten. Neben den CD4+ T-

Zellen finden sich CD8+ T-Zellen, Makrophagen, B-Zellen sowie Plasmablasten/-zellen im entzündeten Nierengewebe^[13, 14]. Das Ausmaß der renalen Infiltration ist einer der Faktoren in der Nierenbiopsie, der am engsten mit der Nierenschädigung korreliert^[15, 16]. Der Nachweis von tubulointerstitieller Entzündung ohne Entzündung der Glomeruli deutet darauf hin, dass beide Prozesse beim SLE unabhängig voneinander auftreten können^[17, 18]. Demnach könnte der tubulointerstitiellen Entzündung eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der LN zukommen. Allerdings ist die Entstehung und Bedeutung der Entzündung nicht ausreichend verstanden.



Graphik 1: Beispielbilder der Nierenhistologie bei proliferativer Lupusnephritis (Typ IV). In den Glomeruli finden sich als Korrelat der Antikörper- und Komplementablagerungen verdickte Schlingen. Neben den Veränderungen an den Glomeruli zeigt sich ein deutliches Infiltrat von Entzündungszellen im Niereninterstitium. (Bilder von B. Rudolph, Pathologie Charité)

1.2.1 Mögliche Rolle von B-Zellen und Plasmazellen in der lokalen Nierenentzündung

Im Nierengewebe finden sich bei LN auch B-Zellen und Plasmazellen, zum Teil in direktem Kontakt zu T-Helferzellen^[19, 20]. Die Präsenz von B-Zellen und Plasmazellen in den Nieren wirft die Fragen auf, ob B-Zellen lokal zur Antikörperproduktion angeregt werden und welche Auswirkung die lokale Antikörperproduktion hat.

Bei einem Teil der Nierenbiopsien von Patienten mit proliferativer LN lassen sich umschriebene T-/B-Zell-Aggregate nachweisen, zum Teil sogar Germinal-Center-Strukturen^[21]. Im MRL.lpr-Mausmodell für den SLE konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von autoreaktiven B-Zellen außerhalb von klassischen Lymphfollikeln stattfindet^[22], was auch in den entzündeten Nieren der Fall sein könnte. Innerhalb der B-Zellen in Nierenbiopsien von LN-Patienten lässt sich Proliferation mit klonaler Expansion sowie somatischer Hypermutation nachweisen, was eine lokale Aktivierung und Selektion der B-Zellen beweist. Es bilden sich in den entzündeten Nieren also tertiäre Lymphfollikelstrukturen aus, in denen B-Zellen zur Antikörperproduktion aktiviert werden können. Ob in solchen tertiären Lymphfollikeln womöglich autoreaktive T- und B-Zellen leichter und unkontrollierter aufeinandertreffen, ist spekulativ.

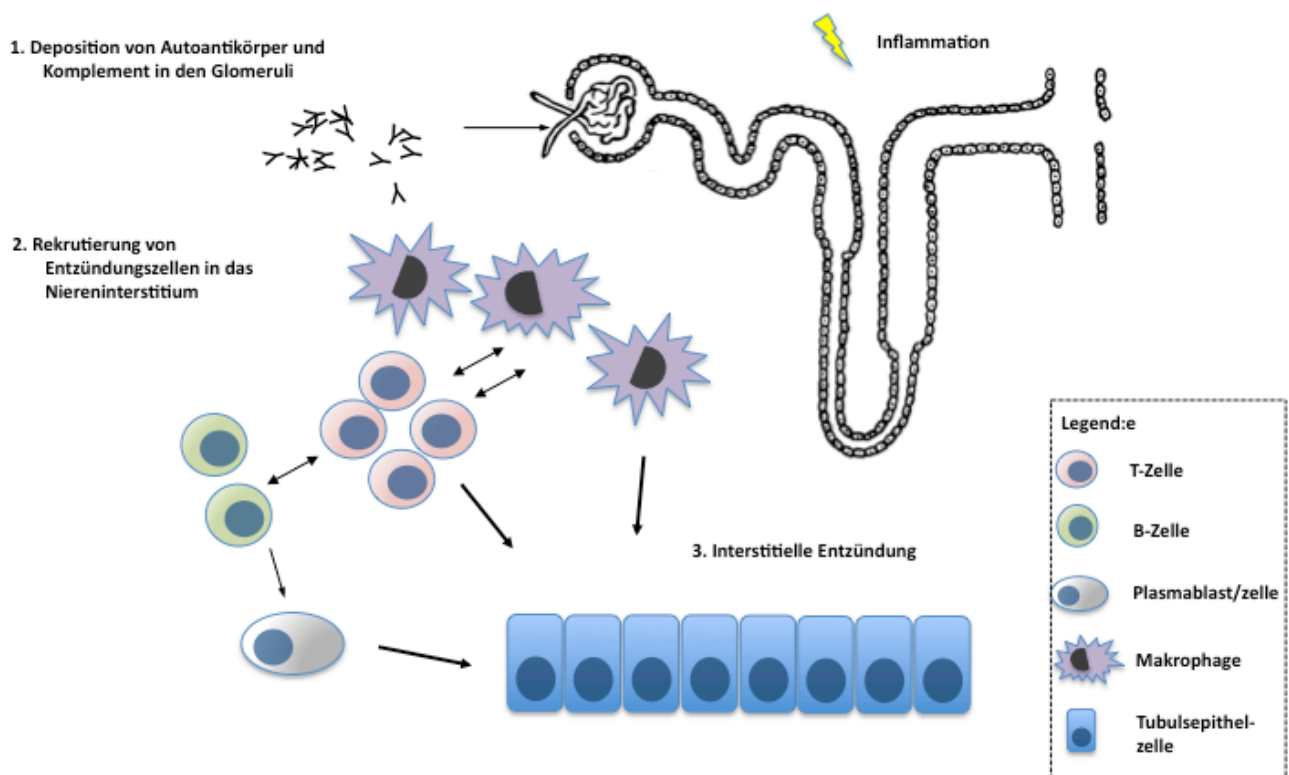
Neben einer Aktivierung vor Ort stellen die entzündeten Nieren auch eine Nische für andernorts aktivierte Plasmablasten/-zellen dar. Im Mausmodell für LN ist gezeigt, dass nach Immunisierung ein Teil der antigenspezifischen Plasmazellen in die Nieren einwandern und die Nieren ähnlich viele Antikörperproduzenten beherbergen wie die Milz und das Knochenmark^[23]. Die Nieren der Mäuse stellen also ein Reservoir für antikörperproduzierende Plasmazellen dar und beherbergen auch autoreaktive Plasmazellen^[24]. Aus Nierenbiopsien von LN isolierte Plasmazellen sind zur Mehrheit autoreaktiv, wobei die dominante Zielstruktur nicht Zellkernbestandteile sind, sondern das im Niereninterstitium exprimierte Vimentin^[25].

Die entzündeten Nieren bei LN stellen demnach einen Ort dar, wo autoreaktive B-Zellen zur Antikörperproduktion aktiviert werden könnten, was wahrscheinlich die interstitielle Entzündung vorantreibt. Zeitgleich stellen die Nieren ein Reservoir für Antikörperproduzenten dar, was wiederum zur systemischen Autoimmunreaktion beiträgt und diese aufrechterhalten könnte.

1.2.2 Mögliche Rolle von T-Zellen in der tubulointerstitiellen Entzündung

Mehrere Beobachtungen deuten auf eine potentielle Schlüsselrolle des von T-Zellen dominierten Entzündungsinfiltrates in der Pathogenese der Lupusnephritis. Verschiedene Tiermodelle unterstützen die Hypothese einer pathogenen Auswirkung des interstitiellen Infiltrates. In einem genetisch modifizierten MRL.lpr murinen Lupusmodell, in dem B-Zellen die Fähigkeit zur Antikörpersekretion genommen wurde, findet sich eine Nephritis mit einem T-Zell dominierten Infiltrat, trotz des völligen Fehlens von (Auto-)Antikörpern^[26]. Zudem lässt sich durch Transfer von T-Zellen in verschiedenen Nephritismodellen eine Nierenentzündung auslösen^[27-30].

Der exakte Mechanismus, wie die lokal infiltrierenden Lymphozyten/Leukozyten die Nieren schädigen, ist nicht bekannt. Allerdings weisen die in den Nieren akkumulierenden CD4+ T-Zellen ein oligoklonales T-Zell-Rezeptor-Repertoire auf, was eine Anreicherung von T-Zellen mit bestimmter Antigenreaktivität suggeriert^[31-35]. Parallel dazu lässt sich in den entzündeten Nieren eine deutliche Hochregulation von MHCII-Molekülen auf professionell Antigen präsentierenden Zellen (APCs) als auch auf Nierentubulusepithelzellen finden^[36], was ebenfalls beides auf einen CD4+ T-Zell-vermittelten, antigenspezifischen Prozess hindeutet. Rein mechanistisch wurde in einem transgenen Mausmodell bereits der formale Beleg erbracht, dass mit einem renalen Antigen reaktive T-Zellen ausreichen, um eine Nierenentzündung auszulösen^[37].



Graphik 2: Übersicht über die Pathogenese der Lupusnephritis. Initial (1) kommt es in den meisten Fällen wahrscheinlich zu einer Ablagerung von Autoantikörpern und Immunkomplexen in den Glomeruli, was eine Entzündung auslöst. Subsequent werden (2) T-Zellen, Makrophagen, B-Zellen und Plasmablasten/-zellen in das Niereninterstitium rekrutiert. Dort können T-Zellen direkt mit Nierenepithelzellen interagieren und diese schädigen. Zudem können T-Zellen Makrophagen und B-Zellen aktivieren, die über die Sekretion von Zytokinen und Antikörpern zusätzlich die Nierenepithelzellen schädigen können.

1.3 Lupusnephritis – das klinische Problem

Die Behandlung der LN ist weiterhin unbefriedigend. Unter der Standardtherapie mit Cyclophosphamid oder MMF drohen zum einen erhebliche Nebenwirkungen, unter anderem das Risiko von schweren Infekten unter der Immunsuppression. Zum anderen erreichen wiederholt in Studien nur rund 45% der Patienten eine komplette Remission unter der Therapie^[5, 6], was eine erhebliche Morbidität impliziert^[38].

Die schlechte Rate an kompletten Remissionen lässt zwei Schlussfolgerungen zu: Die Patienten benötigen eine noch intensivere Therapie, um auch in therapierefraktären Fällen eine Remission zu erreichen. Das würde bedeuten, noch mehr Immunsuppression. Alternativ könnten die in den Studien genutzten Remissionskriterien insuffizient sein und viele Patienten zu Unrecht als fehlende oder inkomplette Remission identifizieren.

Prinzipiell ist durch Studien zur Stammzelltransplantation bei SLE belegt, dass eine eskalierte Immunsuppression von Benefit sein kann: Einige der behandelten Patienten erreichen eine dauerhafte „Heilung“ ohne Erhaltungstherapie, allerdings auf Kosten eines erheblichen Risikos der Behandlung^[39]. Um eine gezieltere Immunsuppression zu etablieren, haben in den letzten Jahren verschiedene kontrollierte Multizenterstudien eine Intensivierung der Immunsuppression zur Behandlung der LN untersucht. In diesen Studien wurde in der Regel die Standardtherapie um jeweils ein Biologicum bzw. Placebo ergänzt. Für die Therapie der LN brachte keine der bisher untersuchten Substanzen einen Vorteil, oder die Studie musste wegen Nebenwirkungen (in der Regel zu starke Immunsuppression und Infekte) abgebrochen werden. So wurde eine zusätzlich B-Zelldepletion mit Rituximab (kein Benefit^[40]), Ocrelizumab (kein Ansprechen und Nebenwirkungen^[41]) und Atacicept (Abgebrochen wegen Nebenwirkungen^[42]) ohne Erfolg untersucht. Ebenso wenig verbesserte eine T-Zell-gerichtete Therapie mit Abatacept in zwei großen Studien das Therapieansprechen bei LN^[43, 44].

Diese Fehlschläge können so interpretiert werden, dass bisher die falschen Ziele mit Biologika gehemmt/depletiert/modifiziert wurden. Demzufolge werden eine weitere Erforschung der Pathogenese der LN und weitere Studien dringend benötigt. Eine alternative Lesart ist, dass die bisher benutzten Kriterien zum Erreichen einer renalen Remission insuffizient sind. In der Regel wurden als Remissionskriterien der Verlauf der Proteinurie, des Kreatinins und des Sediments/Hämaturie benutzt. In einer denkwürdigen Reanalyse der Daten einer der Abatacept-Studien wird die Schwäche der Remissionskriterien eindrucksvoll demonstriert: Bereits geringfügig andere Remissionskriterien hätten die Ergebnisse mit sensationellem Erfolg (Komplette Remission in 22% bzw. 24% der Fälle versus 6% in der Placebogruppe) signifikant werden lassen^[45] (Siehe Tabelle 1 zum Vergleich verschiedener Kriterien).

Partielle Remission	Komplette Remission	Quelle
<ul style="list-style-type: none"> - Inaktives Urinsediment - Reduktion Proteinurie auf ≤ 0.5 g/d - Normale oder konstante GFR 	<ul style="list-style-type: none"> - Inaktives Sediment - Reduktion Proteinurie auf ≤ 0.2 g/d - Normale oder konstante GFR 	<i>Gordon C European Consensus 2009 [46]</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Kreatinin $\leq 115\%$ des Ausgangswertes - Sediment: RBCs/hpf $\leq 50\%$ des Ausgangswertes, keine Erythrozytenzylinder - $\geq 50\%$ Reduktion Protein-Kreatinin Ratio auf < 1.0 (falls Ausgangswert ≤ 3.0) oder ≤ 3.0 (falls Ausgangswert > 3.0) 	<ul style="list-style-type: none"> - Normales Kreatinin oder $\leq 115\%$ des Ausgangswertes - Inaktives Sediment (< 5 RBCs/hpf, keine Erythrozytenzylinder) - Reduktion Protein-Kreatinin Ratio auf ≤ 0.5 g/d 	<i>Rovin BH Arthritis and Rheumatology 2012 Lunar Studie [40]</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Verbesserung um $\geq 50\%$ von 2 Parametern (Kreatinin, Proteinurie, Sediment) ohne Verschlechterung (innerhalb 10%) des anderen Parameters 	<ul style="list-style-type: none"> - Normwertiges Kreatinin (+/- 10%) - Keine Proteinurie - Inaktives Sediment 	<i>Ginzler EM, NEJM 2005 [5]</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Kreatinin $\leq 115\%$ des Ausgangswertes - Protein-Kreatinin Ratio auf < 0.26 - Unauffälliges Sediment <p>Alle Parameter müssen 2x im Abstand Von 4 Wochen erfüllt werden.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Normale bzw. um 50% bessere GFR, Kreatinin $\leq 115\%$ des Ausgangswertes - Reduktion Proteinurie $\geq 50\%$ - Unauffälliges Sediment 	<i>Furie-R 2014 Abatacept Studie [43]</i>

Tabelle 1: Verschiedene Kriterien für komplette und partielle Remission einer LN (RBC = red blood cells; hpf = high power field).

Das Dilemma von fehlenden zuverlässigen Kriterien, eine renale Remission festzustellen, findet sich auch in der Klinik wieder. Für die Behandlung der LN gibt es keine Surrogatparameter für die verlässliche Überwachung des Therapieansprechens. Am häufigsten werden Proteinurie und Kreatinin als renale Parameter überprüft, allerdings können beide nicht zwischen aktiver Inflammation (also Entzündungsaktivität in den Nieren) und bleibender, residueller Schädigung (im Sinne einer Narbe) unterscheiden. In einer Nachfolgeuntersuchung der Patienten aus dem Euro-Lupus-Trial wurde untersucht, welcher der Parameter Proteinurie, Kreatinin und Erythrozyturie ein

gutes renales Ansprechen am besten vorhersagen konnte, wobei gutes renales Ansprechen definiert wurde als ein Kreatininwert < 1 mg/dl 7 Jahre später. Den besten prädiktiven Wert hatte 12 Monate nach Beginn der Therapie die Proteinurie, mit einer AUC (Area under the Receiver operator curve) von 0.83, gefolgt von Kreatinin (AUC 0.76) und Erythrozyturie (0.68)^[47]. Proteinurie hat demnach den besten prädiktiven Wert für ein gutes renales Ansprechen, obgleich eine AUC von 0.83 für einen Biomarker ein eher suboptimales Ergebnis ist. Aus anderen Studien ist bekannt, dass sich die Proteinurie bei LN nur langsam zurückbildet: 52% der LN-Patienten normalisieren ihre Proteinausscheidung innerhalb von 2 Jahren, weitere 22% innerhalb von 5 Jahren^[48]. Ob hinter einer residuellen Proteinurie eine weiter persistierende Entzündung in den Nieren oder eine abheilende Schädigung steckt, ist nichtinvasiv nicht mit Gewissheit zu sagen. In Studien, in denen LN eine Routine-Renierenbiopsie erhalten haben, wurde gezeigt, dass ein relevanter Teil der Patienten mit kompletter Remission (gemessen an Proteinurie, Kreatinin und Sediment) weiter eine histologisch aktive Erkrankung hat, während ein Teil ohne klinisches Ansprechen histologisch keine aktive Erkrankung mehr vorweist^[49].

Die Proteinurie ist also der beste renale Parameter für das Therapieansprechen, aber weder ein besonders genauer Marker noch ein schneller Parameter, um das Ansprechen zu beurteilen, was den Einsatz in Klinik und Studien limitieren sollte.

Neue Biomarker könnten helfen, dieses Dilemma zu lösen, und könnten die Prognose der LN durch schnellere Diagnose und besseres Monitoring des Therapieansprechens verbessern und sowohl Unter- als auch Übertherapie vermeiden helfen. Zudem könnten innovative Biomarker der Schlüssel zum Erfolg für kommende Interventionsstudien zur Therapie der LN sein.

2. Fragestellungen

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht die lokale Pathogenese der LN. In den Arbeiten wurden verschiedene Aspekte der Pathogenese der LN erforscht und neue Biomarker für die LN entwickelt. Im Einzelnen wurde untersucht, inwiefern ein spezielles Subset von B-Zellen, die B1a B-Zellen, in der Pathogenese des SLE und der LN partizipiert. Bei gesunden Probanden und SLE-Patienten wurden autoantigenspezifische T-Zellen analysiert, mit dem Ziel deren Nachweis zu etablieren und zu prüfen, inwieweit diese mit der Krankheitsaktivität korrelieren. Die Rolle von CXCR3 wurde in der Rekrutierung von T-Zellen in die entzündeten Nieren bei Patienten mit LN untersucht. Schließlich wurde analysiert, ob sich die renal infiltrierenden Zellen auch im Urin nachweisen lassen und als Biomarker für die LN eignen.

3. Eigene Arbeiten

3.1 B1a B-Zellen vollziehen einen Klassenwechsel zur IgG-Produktion und akkumulieren in entzündeten Ziel-Organen wie den Nieren in einem murinen SLE-Modell

Enghard P, Humrich JY, Chu VT, Grussie E, Hiepe F, Burmester GR, Radbruch A, Berek C, Riemekasten G.

Class switching and consecutive loss of dsDNA-reactive B1a B cells from the peritoneal cavity during murine lupus development.

Eur J Immunol. 2010 Jun;40(6):1809-18. PubMed PMID: 20333624.

Ausgangspunkt der Arbeit war die Beobachtung, dass sich in den entzündeten Nieren im NZB/W F1-Mausmodell für den SLE ein erheblicher Anteil an B1a B-Zellen nachweisen lässt. B1a B-Zellen sind ein spezieller Typ B-Zelle, der sich normalerweise vor allem in der Peritonealhöhle findet und nach Aktivierung IgM produziert^[50]. Die B1a B-Zellpopulation ist angereichert mit autoreaktiven Zellen, gilt als leicht aktivierbar und könnte eine wichtige Rolle in der Pathogenese des SLE spielen.

In einer detaillierten Analyse der Verteilung der B1a B-Zellen im NZB/W F1 Modell und im Vergleich zu Kontroll-Mausstämmen sahen wir eine Expansion des B1a B-Zell Subtyps mit zunehmendem Alter in der Peritonealhöhle und der Milz, sowie eine Infiltration von B1a B-Zellen in entzündeten Organen wie Thymus und Nieren. Interessanterweise war in der Milz und den entzündeten Zielorganen ein Verlust der IgM-Expression und vermehrt IgG-Expression zu sehen, was vermuten lässt, dass diese Zellen beim SLE einen Ig-Klassenwechsel zu IgG vollziehen. In Transferexperimenten von aus der Peritonealhöhle von jungen NZB/W F1-Mäusen isolierten B1a B-Zellen in ältere Tiere mit bereits voll entwickeltem Lupus konnte die Migration dieser Zellen in Milz, Thymus und Nieren bestätigt werden. Parallel sahen wir einen Verlust der IgM-Expression und Wechsel zu IgG, was mit Durchflusszytometrie und ELISPOT bestätigt werden konnte. Zudem zeigten die B1a B-Zellen, die sich in der Milz wiederfanden, eine höhere Proliferationsrate als Ausdruck einer Aktivierung im Vergleich zu den Zellen, die ihren Weg in die Peritonealhöhle fanden.

Unter den IgG+ B1a B-Zellen in der Milz fanden sich autoreaktive Zellen mit Spezifität gegen doppelsträngige DNA (dsDNA), die sich bei jungen Tieren vor der vollen Ausprägung des Lupus nicht fanden. Im Kontrast dazu konnten wir in der Peritonealhöhle bei jungen Tieren eine mit zunehmendem Alter deutlich abnehmende Frequenz an dsDNA-reaktiven B1a B-Zellen nachweisen; diese Abnahme an

autoreaktive Spezifitäten mit zunehmendem Alter/Krankheitsprogress konnte ebenso für autoreaktive Zellen mit Reaktivität mit Nukleosomen und Erythrozyten gezeigt werden, während sich die Frequenz an neoantigen-reaktiven B1a B-Zellen in der Peritonealhöhle nicht veränderte (bzw. eher leicht zunahm).

Zusammengefasst konnte eine Expansion von B1a B-Zellen in NZB/W F1-Lupusmäusen, eine Aktivierung der Zellen und ein Klassenwechsel zu IgG gezeigt werden. Diese Zellen enthalten autoreaktive B1a B-Zellen, während autoreaktive B1a B-Zellen aus der Peritonealhöhle depletiert werden. Neben der Milz finden sich die B1a B-Zellen auch in den entzündeten Zielorganen wie der Niere, wo die Zellen zu noch höherem Anteil IgG tragen.

<http://dx.doi.org/10.1002/eji.200940050>

3.2 Demaskierung der mit dem SmD1(83-119)-Autoantigen reaktiven CD4+ T-Zellen durch *in vitro* Depletion von CD25+ regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit SLE

Engler JB, Undeutsch R, Kloke L, Rosenberger S, Backhaus M, Schneider U, Egerer K, Dragun D, Hofmann J, Huscher D, Burmester GR, Humrich JY, **Enghard P***, Riemekasten G*.

Unmasking of autoreactive CD4 T cells by depletion of CD25 regulatory T cells in systemic lupus erythematosus.

Ann Rheum Dis. 2011 Dec;70(12):2176-83. Epub 2011 Sep 16.

*** geteilte Letztautorenschaft**

Der SLE ist gekennzeichnet durch den Bruch der Immuntoleranz gegen nukleäre Autoantigene, gegen die sich charakteristische Autoantikörper finden^[51]. Es wird angenommen, dass es auch zum Bruch der T-Zell-Immuntoleranz gegen diese nukleären Autoantigene kommt. Allerdings ist der Nachweis von autoreaktiven T-Zellen technisch schwierig und autoreaktive CD4+ T-Zellen wurden beim SLE bisher nur unzureichend nachgewiesen, was an der niedrigen Ausgangsfrequenz und noch partiell intakter Immunregulation liegen könnte.

In unserer Arbeit haben wir die Nachweisbarkeit von autoantigenspezifischen CD4+ T-Zellen über die Expression von CD154 gegen das zellkernassoziierte Autoantigen SmD1(83-119) untersucht. Aus dem Blut isolierte Immunzellen (PBMCs) von 41 Blutproben von 38 SLE-Patienten wurden mit dem SmD1(83-119)-Autoantigen, Kontrollantigenen (SEB und CMV Peptidpool) oder ohne Antigenzugabe restimuliert. In 9.8% der Proben konnten, gemessen an der Negativkontrolle, SmD1(83-119)-reaktive CD4+ T-Zellen nachgewiesen werden.

Um eine mögliche Suppression der CD154-Hochregulation nach Antigenkontakt *in vitro* durch regulatorische T-Zellen (Treg) zu untersuchen, wurden in einer zweiten Kohorte von 11 SLE Patienten vor der Restimulation mit Autoantigen klassische CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen durch Depletion von CD25+ Zellen entfernt. Durch diese Elimination von Treg vor Restimulation konnten bei diesen 11 Patienten bei 63.6% SmD1(83-119)-autoreaktive CD4+ T-Zellen detektiert werden, wohingegen bei den selben Patienten mit Tregs nur bei 18.2% solche Zellen nachgewiesen werden konnten. Die Frequenz an SmD1(83-119)-reaktiven CD4+ T-Zellen im peripheren Blut korrelierte signifikant mit dem SLEDAI als Maß für die Krankheitsaktivität, wobei diese Korrelation nach Depletion der Tregs enger war.

Zusammengefasst konnten anhand der Hochregulation von CD154 nach Antigenkontakt mit dem SmD1(83-119)-Autoantigen reaktive CD4+ T-Zellen bei SLE-Patienten nachgewiesen werden und deren Menge korrelierte mit der Krankheitsaktivität. Durch *in vitro* Depletion von Tregs lässt sich die Nachweisbarkeit dieser autoreaktiven T-Zellen steigern, was eine zumindest partiell intakte Immunregulation durch Tregs suggeriert.

<http://dx.doi.org/10.1136/ard.2011.153619>

3.3 CXCR3+CD4+ T-Zellen lassen sich im Urin nachweisen, ähneln den intrarenalen T-Zellen und stellen einen Biomarker für die akute Lupusnephritis dar

Enghard P, Humrich JY, Rudolph B, Rosenberger S, Biessen R, Kuhn A, R Manz, F Hiepe, A Radbruch, GR Burmester, G Riemekasten.

CXCR3+CD4+ T cells are enriched in inflamed kidneys and urine and provide a new biomarker for acute nephritis flares in SLE patients.

Arthritis Rheum. 2009 Jan;60(1):199-206.

Ähnlich wie bei der Lupusnephritis finden sich in verschiedenen Mausmodellen für die Lupusnephritis und in anderen Nephritismodellen T-Zellen im entzündeten Nierengewebe. Allerdings ergeben sich aus den Mausmodellen zum Teil widersprüchliche Daten, wie diese Zellen in das entzündete Nierengewebe rekrutiert werden. Die Analyse der Rolle von Chemokinen bei Patienten mit Lupusnephritis war bisher limitiert auf die Untersuchung von Nierenbiopsiegewebe und auf die Bestimmung der Konzentration von Chemokinen in Blut und Urin. Um eine möglichst direkte Analyse der T-Zellen zu ermöglichen, etablierten wir den durchflusszytometrischen Nachweis von T-Zellen im Urin.

Bei Patienten mit aktiver, proliferativer Lupusnephritis konnte regelhaft eine deutliche Population an CD3+CD4+ T-Zellen im Urin nachgewiesen werden, die sich bei Patienten ohne aktive Nephritis nicht fand. Bei den 38 analysierten SLE-Patienten fanden sich ausschließlich bei Patienten mit aktiver, proliferativer Lupusnephritis erhöhte Mengen an CD3+CD4+ T-Zellen im Urin (>800 CD4+ T-Zellen/100ml Urin). Auf diesen CD4+ T-Zellen im Urin ließ sich CXCR3 nachweisen und direkt anfärben. Im direkten Vergleich der Frequenz an CXCR3+CD4+ T-Zellen im Urin und Blut zeigte sich eine signifikante Anreicherung von CXCR3-tragenden Zellen im Urin, was als Hinweis für eine selektive Anreicherung der Zellen im Urin gesehen werden kann.

Um zu untersuchen, ob das Zellbild im Urin die lokale Entzündung in den Nieren widerspiegelt, wurden zudem Nierenbiopsie-Schnitte von 18 Patienten mit proliferativer Lupusnephritis untersucht. Im Nierengewebe ließ sich mit immunhistochemischen Färbungen eine deutliche Färbung von CXCR3 zeigen. Zudem fanden sich viele CXCL10-positive Zellen, was einer der wichtigsten CXCR3-bindenden Liganden ist. Mit Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen konnte eine Kolokalisation von CXCR3- und CXCL10-positiven Zellen gezeigt werden, und dass sich CXCR3 auf den renal infiltrierenden CD3+ T-Zellen findet.

Zusammengefasst konnten wir in der Publikation zeigen, dass 1.) CD3+CD4+ T-Zellen im Urin von SLE-Patienten nachweisbar und ein potentieller Biomarker für die Lupusnephritis sind, 2.) CXCR3 bei der Rekrutierung der T-Zellen in die Nieren eine Rolle spielen könnte und 3.) die Zellen im Urin den Phänotyp der T-Zellen im entzündeten Nierengewebe widerspiegeln.

<http://dx.doi.org/10.1002/art.24136>

3.4 CD3+CD4+ T-Zellen im Urin als Biomarker zur Diagnose und Verlaufsparemeter für eine aktive, proliferative Lupusnephritis

Enghard P, Rieder C, Kopetschke K, Klocke JR, Undeutsch R, Biesen R, Dragun D, Gollasch M, Schneider U, Aupperle K, Humrich JY, Hiepe F, Backhaus M, Radbruch A, Burmester GR, Riemekasten G.

Urinary CD4 T cells identify SLE patients with proliferative lupus nephritis and can be used to monitor treatment response.

Ann Rheum Dis. 2014 Jan;73(1):277-83. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202784. Epub 2013 Mar 8.

Anknüpfend an unsere vorherigen Arbeiten haben wir in dieser Arbeit in einer größeren Kohorte von SLE-Patienten (n=148) untersucht, inwieweit CD3+CD4+ T-Zellen im Urin als Biomarker für die aktive, proliferative Lupusnephritis genutzt werden könnten.

In unseren Messungen korrelierte die Menge an CD4+ T-Zellen im Urin bei Patienten mit renaler Beteiligung gut mit der Krankheitsaktivität (SLEDAI); SLE-Patienten ohne Nierenbeteiligung zeigten hingegen auch bei erhöhter Krankheitsaktivität kaum T-Zellen im Urin. Bei 29 Patienten wurde der Urin zeitgleich zu einer Nierenbiopsie analysiert, was einen direkten Vergleich mit dem diagnostischen Goldstandard ermöglichte: Alle Patienten mit proliferativer Lupusnephritis und solche mit atypischer, proliferativer Lupusnephritis zeigten erhöhte Mengen an CD3+CD4+T-Zellen im Urin (>800 CD4+ T-Zellen/100ml Urin). Insgesamt wurde in der von uns untersuchten Kohorte von 147 SLE-Patienten solche mit proliferativer Lupusnephritis anhand einer Erhöhung der CD4+ T-Zellen im Urin mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 98% identifiziert (Fläche unter der ROC-Kurve AUC 0.9969).

Bei einer Gruppe von Patienten mit Lupusnephritis (n=14) wurden zudem der Verlauf der T-Zellen im Urin im Krankheitsverlauf unter Therapie untersucht, wobei sich zwei Gruppen abzeichneten: Zum einen Patienten, bei denen sich unter der Therapie die Menge an CD3+CD4+ T-Zellen im Urin normalisierte (<800 Zellen/100ml Urin), zum anderen Patienten mit einer Persistenz oder sogar ansteigenden T-Zell-Zahlen im Urin. Nach 6 Monaten Therapie zeigten Patienten mit normalisierter Zellzahl eine geringere Krankheitsaktivität und ein günstigeres Kreatinin-Niveau als Patienten mit Persistenz oder sogar ansteigenden Mengen von CD4+ T-Zellen im Urin.

Zusammengefasst konnte in dieser Studie in einer größeren Kohorte von SLE-Patienten die Anwendbarkeit der Menge an CD3+CD4+ T-Zellen im Urin als Biomarker zur Diagnose einer proliferativen Lupusnephritis und zur Verlaufsbeurteilung unter Therapie gezeigt werden.

<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202784>

3.5 CD4+ T-Zellsubtypen, CD8+ T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen im Urin als Biomarker für die akute Lupusnephritis

Kopetschke K, Klocke J, Grießbach AS, Humrich JY, Biesen R, Dragun D, Burmester GR, **Enghard P**, Riemekasten G.

The cellular signature of urinary immune cells in Lupus nephritis: new insights into potential biomarkers.

Arthritis Res Ther. 2015 Apr 3;17:94. doi: 10.1186/s13075-015-0600-y.

*** geteilte Letztautorenschaft**

In dieser Arbeit wurden die im Urin bei Lupusnephritis nachweisbaren Immunzellen weiter im Detail untersucht. Neben den CD3+CD4+ T-Zellen wurden CD3+CD8+ T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen im Urin quantifiziert. Zusätzlich wurden die CD3+CD4+ T-Zellen weiter in Hinblick auf Aktivierungsstatus, Naive- oder Memory/Effektor-Phänotyp und Präsenz von regulatorischen T-Zellen analysiert. Zusätzlich zu SLE-Patienten mit (n=19) und ohne (n=78) aktiver Lupusnephritis wurden Patienten mit diabetischer Nephropathie (n=14) und ANCA-assoziiertes Vaskulitis mit Nierenbeteiligung (n=11) untersucht.

Bei Patienten mit aktiver Lupusnephritis fanden sich CD4+ T-Zellen (Median 1415/100ml), CD8+ T-Zellen (Median 1911/100ml) und CD14+ Makrophagen (Median 33808/100ml) und in geringen Mengen auch CD19+ B-Zellen (Median 231/100ml) im Urin. Bei SLE Patienten ohne aktive Nephritis fanden sich signifikant weniger von allen Zellarten, und die Menge von allen Zellarten korrelierte mit der Krankheitsaktivität. Interessanterweise konnte bei einem Teil der Patienten ohne aktive Nephritis eine deutliche Population an CD14+ Makrophagen im Urin nachgewiesen werden, deren Bedeutung aktuell unklar ist.

Auch bei einigen der untersuchten Patienten mit diabetischer Nephropathie und ANCA-assoziiertes Vaskulitis mit Nierenbeteiligung konnten CD4+ und CD8+ T-Zellen, Makrophagen sowie geringe Mengen an B-Zellen im Urin nachgewiesen werden. Somit ist der Nachweis dieser Zellen nicht spezifisch für die Lupusnephritis, sondern spiegelt wahrscheinlich generell eine Nierenentzündung wider. Allerdings fand sich bei Patienten mit Lupusnephritis eine niedrigere CD4/CD8-Ratio im Urin, was im Vergleich zur diabetischen Nephropathie signifikant war.

Hinsichtlich des Phänotyps der CD4+ T-Zellen im Urin fanden sich im Vergleich zum Blut signifikant mehr CD40L+ und Ki-67+ Zellen im Urin, was auf eine kürzliche Aktivierung

dieser Zellen hindeutet. Die CD4⁺ Zellen im Urin waren angereichert mit CD45RO⁺CCR7⁻ Memory/Effektor-T-Zellen. Im Urin konnten zudem FoxP3⁺CD127⁻ regulatorische T-Zellen (Tregs) nachgewiesen werden. Die Frequenz an Tregs war im Urin numerisch höher als im Blut, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant. Ähnlich wie in der Gesamtpopulation der CD4⁺ T-Zellen sahen wir auch bei den Tregs eine signifikant höhere Proliferationsrate im Urin als im Blut (gemessen an KI-67⁺ Zellen).

Als Biomarker für die aktive Lupusnephritis zeigten sowohl die CD4⁺ T-Zellen (AUC 0.9982) als auch die CD8⁺ T-Zellen (AUC 1.0) eine sehr scharfe Trennung von Patienten mit und ohne aktiver Lupusnephritis. Beide Marker waren dabei in unserer Kohorte klassischen Markern wie Proteinurie oder Kreatinin überlegen. Eine weitere Phänotypisierung der CD4⁺ T-Zellen brachte hinsichtlich der Genauigkeit als Biomarker keinen Vorteil. Makrophagen und B-Zellen im Urin zeigten sich als Biomarker weniger geeignet.

Zusammengefasst können im Urin neben CD4⁺ T-Zellen auch CD8⁺ T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen nachgewiesen werden. Als Biomarker zeigten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen die besten Resultate, wobei eine weitere Subcharakterisierung der CD4⁺ T-Zellen die Genauigkeit als Biomarker nicht verbesserte. Die Nachweisbarkeit von Immunzellen im Urin ist nicht spezifisch für die Lupusnephritis, sondern fand sich auch bei anderen Nierenerkrankungen mit intrarenaler Inflammation.

<http://dx.doi.org/10.1186/s13075-015-0600-y>

4. Diskussion

In den vorgestellten Arbeiten konnten wir in den letzten Jahren einen Beitrag zum besseren Verständnis der LN liefern und neue Biomarker für die LN entwickeln. Mit der Etablierung der Durchflusszytometrie von Immunzellen im Urin ist es zusätzlich gelungen, einen methodischen Ansatz zu etablieren, der direkten Zugang zu den in der lokalen Pathogenese der LN partizipierenden Immunzellen ermöglicht. Diese Methodik bietet ein direktes „Fenster in die Nieren“, was für die weitere Erforschung der humanen LN äußerst relevant sein könnte.

B1a B-Zellen sind ein spezielles Subset von B-Zellen, welches phylogenetisch und ontogenetisch früh entsteht. B1a B-Zellen finden sich normalerweise vor allem in Körperhöhlen wie der Bauchhöhle. Diese Zellen sind leicht aktivierbar, tragen vor allem IgM und sind die Quelle von > 80% der IgM-Moleküle im Serum^[52-54]. Ihre Aufgabe liegt am ehesten in einer schnellen Produktion von Antikörpern bei Infekten, wie beispielsweise für Influenza gezeigt^[52].

B1a B-Zellen sind allerdings angereichert mit autoreaktiven Spezifitäten, unter anderem gegen DNA^[55-60]. Zusammen mit der niedrigen Aktivierungsschwelle macht sie das zu einer potentiellen Sollbruchstelle, an der die Produktion von Autoantikörpern induziert und die Immuntoleranz beim SLE gebrochen werden könnte. In verschiedenen Mausmodellen für den SLE findet sich eine Expansion des B1a B-Zellpools^[53, 61], was ein weiterer Hinweis für einen Beitrag zur Pathogenese des SLE sein könnte. Obwohl B1a B-Zellen normalerweise IgM tragen, konnte ein Klassenwechsel zu IgG gezeigt werden^[50].

In unserer Arbeit zu B1a B-Zellen konnten wir einen Klassenwechsel zu IgG zeigen und eine Akkumulation von IgM-IgG+ B1a B-Zellen in Milz und entzündeten Zielorganen wie den Nieren nachweisen. Interessanterweise fand sich parallel eine Depletion von autoreaktiven Spezifitäten aus der Peritonealhöhle. Das kann als Hinweis gedeutet werden, dass diese Zellen früh im Leben entstehen, später im Leben aber kein neuer Influx von Zellen z.B. aus dem Knochenmark erfolgt. Damit wäre erklärt, wie es zu einer Depletion des autoreaktiven peritonealen B-Zellpools durch Aktivierung und Auswanderung dieser Zellen kommen kann. Was zur Aktivierung der autoreaktiven B1a B-Zellen führt, ist unklar, insbesondere eine Interaktion mit autoreaktiven T-Zellen, der zum Klassenwechsel notwendig sein könnte, ist ungewiss.

Autoreaktiven CD4+ T-Zellen wird in der Pathogenese des SLE eine entscheidende Rolle zugeschrieben^[62], wobei als charakteristische Zielstruktur nukleäre Peptide gelten^[63]. Diese autoreaktiven T-Zellen führen unter anderem zur Aktivierung von autoreaktiven B-Zellen mit konsekutiver Produktion der für den SLE typischen

Autoantikörper. Der Nachweis von autoreaktiven CD4+ T-Zellen gilt allerdings aufgrund der geringen Frequenz und der limitierten Nachweistechniken als schwierig, weshalb es nur wenige valide Daten mit direktem Nachweis autoreaktiver CD4+ T-Zellen bei SLE-Patienten (und bei anderen Autoimmunerkrankungen) gibt. Aktuell werden zum Nachweis von antigenspezifischen CD4+ T-Zellen vor allem zwei Methoden verwendet: Der Nachweis einer Hochregulation von CD40L auf CD4+ T-Zellen nach Antigenstimulation und der proliferationsbasierte Nachweis in T-Zell-Bibliotheken („T cell library“). CD40L (CD154) wird nach antigenspezifischer Aktivierung auf T-Zellen schnell exprimiert und kann mit Durchflusszytometrie nachgewiesen werden^[64]. Stehen genügend Zellen zur Verfügung, kann die Sensitivität der Methode durch Anreicherung mit Zellsortierung von CD40L-exprimierenden Zellen vor der Detektion noch erhöht werden^[64]. Zur Generation von T-Zell-Bibliotheken werden CD4+ T-Zellen aufgereinigt und jeweils 2000 Zellen in kleinen Kulturen *in vitro* expandiert. Nach einer Expansionsphase von circa 14 Tagen werden die T-Zell-Kulturen mit verschiedenen Antigenzugaben stimuliert und deren Proliferation gemessen. Durch den vorgeschalteten Expansionsschritt können auch sehr niedrige Frequenzen an antigenspezifischen Zellen detektiert werden^[65].

Das SmD1₍₈₃₋₁₁₉₎-Peptid ist ein Teilstück des Sm(Smith)-Antigens. Anti-Sm-Autoantikörper finden sich zwar nur bei rund 30% aller SLE-Patienten, der Nachweis der Sm-Autoantikörper gilt aber als hochspezifisch für den SLE und die Autoantikörper korrelieren mit der Krankheitsaktivität^[66, 67]. Autoantikörper gegen das SmD1₍₈₃₋₁₁₉₎-Peptid haben demgegenüber eine überlegene Sensitivität (70%) und eine weiterhin sehr gute Spezifität von 93.7% für die Diagnose des SLE^[68]. In einem Mausmodell für den SLE konnte zudem gezeigt werden, dass eine Immunisierung mit SmD1₍₈₃₋₁₁₉₎ zu einer Akzeleration des SLE ähnlichen Krankheitsbildes führt^[69]. Ebenso in einem Mausmodell konnten mit SmD1₍₈₃₋₁₁₉₎ reaktive CD4+ T-Zellen nachgewiesen werden, die B-Zellen zur Produktion von anti-dsDNA-Autoantikörpern aktivieren^[70].

Es ist uns in einer Arbeit gelungen, anhand der Hochregulation von CD40L nach Antigenkontakt mit dem nukleären Peptid SmD1₍₈₃₋₁₁₉₎ reaktive CD4+ T-Zellen im peripheren Blut von SLE-Patienten nachzuweisen^[71]. Bei SLE-Patienten fanden sich häufiger autoreaktive CD4+ T-Zellen als bei gesunden Probanden, und die Frequenz der autoantigenspezifischen Zellen korrelierte mit der Krankheitsaktivität. Diese Experimente bieten Einblicke in die Pathogenese des Lupus und belegen, dass der Nachweis von autoreaktiven T-Zellen möglich ist^[71].

Verschiedene Beobachtungen weisen auf eine aktive Partizipation von T-Zellen in der **lokalen Pathogenese der LN** hin: Das Infiltrat korreliert mit der Prognose^[15, 16], in diversen Tiermodellen lässt sich durch Transfer von T-Zellen eine Nierenentzündung

auslösen^[27-30]. In den entzündeten Nieren findet sich eine deutliche Hochregulation von MHCII-Molekülen auf professionell Antigen-präsentierenden Zellen sowie auf Nierentubulusepithelzellen^[36], und die lokal akkumulierenden CD4+ T-Zellen zeigen ein oligoklonales T-Zell-Rezeptor-Repertoire^[31-35]. Dementsprechend stellt die Rekrutierung von T-Zellen in das entzündete Nierengewebe einen entscheidenden Schritt dar, der zudem pharmakologisch „angreifbar“ wäre.

Verschiedene **Chemokine und ihre respektiven Rezeptoren** steuern die Migration von Lymphozyten und ihre Rekrutierung in entzündetes Gewebe. Typische „Verdächtige“, welche die Rekrutierung von CD4+ T-Zellen in entzündete Organe vermitteln, sind die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR5 und CXCR3 und die entsprechenden Chemokinliganden^[72-74]. Diese Chemokinrezeptoren werden bevorzugt auf Th1 T-Zellen exprimiert, und die Expression der genannten Chemokinrezeptoren wurde für die humane LN beschrieben^[75, 76].

In verschiedenen Mausmodellen für die LN wurden die genannten Chemokinrezeptoren mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen untersucht. Blockade von CCR1 mildert die Nephritis im MRL.lpr-Modell^[77], während der Knock-Out die Nierenentzündung im nephrotoxischen Nephritismodell (NTN-Modell) verschärft^[78]. Ähnlich verhält es sich mit dem Knock-Out von CCR5, der im NTN-Modell zu einer Aggravierung der Nephritis führt^[79], hingegen im MRL.lpr-Modell den Krankheitsverlauf mildert^[80]. Blockade von CXCR3 wirkt im NTN-Modell protektiv, ebenso zeigen im MRL.lpr-Modell CXCR3-Defizienz bzw. Knock-Out der entsprechenden Liganden einen abgeschwächten Verlauf^[81, 82]. Im NZB/W F1-Modell allerdings zeigt eine genetische Deletion von CXCR3 keinen Einfluss auf die LN^[83].

Diese gegenläufigen Beobachtungen in murinen Modellen für die LN können wahrscheinlich mit den Besonderheiten der einzelnen Modelle und der gewählten Intervention (Knock-Out oder Blockade) erklärt werden. Inwieweit die genannten Modelle auf den menschlichen SLE übertragbar sind und ob das murine Chemokinsystem repräsentativ für das humane System untersucht werden kann, ist zudem diskutabel. Dementsprechend sind humane Untersuchungen zur Rekrutierung von T-Zellen bei der LN zwingend erforderlich, um potentielle Ziele für eine pharmakologische Intervention zu validieren.

Die nephrologische Forschung an humanen Proben/Zellen hat sich bisher in der Regel auf die Analyse von Nierenbiopsien, die Analyse von löslichen Molekülen in Serum und Urin und auf Zellkulturexperimente beschränkt. Eine Untersuchung der Zellen im Sediment findet sich nur in wenigen Publikationen. **Analysen der Zellen im Urin mit Durchflusszytometrie** – der „State of the Art“-Methode zur Analyse von Zellen in Suspension – finden sich bisher nur bei einigen wenigen Autoren^[84]. Zur Untersuchung

der Rekrutierung von CD4+ T-Zellen bei der humanen LN haben wir den Nachweis von CD4+ T-Zellen im Urin etabliert. Auf diesen Zellen fand sich eine deutliche Expression des Chemokinrezeptors CXCR3 und eine Anreicherung von CXCR3+ CD4+ T-Zellen im Vergleich zum peripheren Blut. Passend zu den Zellen im Urin wurde in Nierenbiopsiematerial ebenfalls eine deutliche Expression von CXCR3 gesehen, und die entsprechenden Zellen fanden sich in unmittelbarer Nachbarschaft von Produzenten des CXCR3-Liganden CXCL10. Wir folgen der Annahme, dass eine Anreicherung von CXCR3+ T-Zellen im Urin im Vergleich zum Blut eine selektive Rekrutierung dieser Zellen widerspiegelt. Zusammen mit dem Nachweis einer lokalen Produktion eines der entsprechenden CXCR3-Liganden in den Nieren deuten wir unsere Ergebnisse als starke Hinweise auf eine Partizipation von CXCR3 in der Rekrutierung von CD4+ T-Zellen in der humanen LN. Diese Experimente sind zwar nur beschreibend und nicht funktionell beweisend für eine Rekrutierung der Zellen via CXCR3 per se, allerdings sind bei Patienten jenseits von Interventionsstudien kausal beweisende Untersuchungen kaum möglich.

Der Nachweis von Immunzellen im Urin wirft die Frage auf, wie die Zellen in den Urin gelangen und wie repräsentativ diese Zellen für die intrarenalen Zellen sind. Neben CD4+ T-Zellen konnten wir im Urin CD8+ T-Zellen, Makrophagen und in geringer Menge B-Zellen nachweisen. T-Zellen und Makrophagen lassen sich nicht nur im Urin von LN-Patienten nachweisen, sondern auch bei anderen Nierenerkrankungen mit entzündlichem Infiltrat im Nierengewebe wie der (ANCA)-assoziierten Glomerulonephritis (ANCA GN), der IgA-Nephropathie (IgAN) und bei Nierentransplantatempfängern (NTX) mit Rejektion. Der genaue Ursprung dieser Zellen ist bisher nicht eindeutig belegt. Der Phänotyp der Zellen im Urin ähnelt den in der Nierenhistologie nachweisbaren intrarenalen Zellen und unterscheidet sich von den Zellen des peripheren Blutes. Zumindest für einige Moleküle ist gezeigt, dass der Kontakt von Immunzellen mit Urin innerhalb von 4-8h zu keiner nennenswerten Veränderung der Expression führt, was ein adäquates Zeitfenster für die Analyse von frischen Urinproben ist^[(85) und unveröffentlichte Daten]. Diese Ähnlichkeit der Immunzellen in Nierengewebe und Urin legt nahe, dass die Zellen nicht über eine passive Blutung in den Urin gelangen, sondern aus dem Nierengewebe stammen^[85-87]. Daher wurde die Durchflusszytometrie des Urins zur Differentialdiagnose einer Hämaturie bereits vorgeschlagen: Bei Patienten mit Glomerulonephritis(GN)-assoziiierter Hämaturie ließen sich größere Mengen an T-Zellen und Makrophagen im Urin nachweisen. Bei Patienten mit Nierenstein-assoziiierter Hämaturie, ideopathischer Hämaturie und erblich bedingter Hämaturie wie dem Alport-Syndrom ließen sich hingegen kaum T-Zellen und

Makrophagen im Urin nachweisen^[88, 89]. Dementsprechend kann ein Ursprung der Zellen aus dem Nierengewebe angenommen werden.

In der Nierenpathologie diverser renaler Erkrankungen lassen sich infiltrierende T-Zellen und Makrophagen in verschiedenen anatomischen Kompartimenten nachweisen, etwa in den Glomeruli, dem Niereninterstitium und als Tubulitis zwischen den Tubulusepithelzellen. Ob die Immunzellen im Urin ihren Ursprung in einem bestimmten anatomischen Kompartiment haben, ist aktuell ungeklärt. Die Menge an T-Zellen und Makrophagen im Urin korreliert gut mit dem Vorhandensein von glomerulären Crescents und der glomerulären Schädigung (gemessen als Score), was einen glomerulären Ursprung der Zellen nahelegt^[90, 91]. Weiterhin teilen die Makrophagen im Urin einige phänotypische Ähnlichkeiten mit den intraglomerulären Makrophagen, beispielsweise die Expression von CD16^[89]. Die überwiegende Mehrheit der renal infiltrierenden Leukozyten/Lymphozyten findet sich allerdings im Niereninterstitium und weist Ähnlichkeiten mit den Zellen im Urin auf. Beispielsweise finden sich bei der LN CXCR3+ T-Zellen in Niereninterstitium und Urin, aber nicht in den Glomeruli^[85, 86]. CD8+ T-Zellen finden sich bei LN ebenso in Urin und Niereninterstitium, aber kaum in den Glomeruli^[85, 86]. Auch bei NTX-Patienten findet sich eine Übereinstimmung des Zellphänotyps im Urin und im Niereninterstitium und eine Korrelation der Menge an Memory/Effektor-T-Zellen im Niereninterstitium und im Urin^[92], was ebenfalls suggeriert, dass die Immunzellen im Urin das Infiltrat im Niereninterstitium widerspiegeln.

Passend zum mutmaßlichen Ursprung der Immunzellen im Urin können wahrscheinlich zwei prinzipielle renale Schädigungsmuster anhand des Vorhandenseins oder Fehlens von T-Zellen und Makrophagen im Urin unterschieden werden. Bei verschiedensten Formen von Nierenerkrankungen, die mit einem entzündlichen renalen Infiltrat einhergehen, lassen sich erhöhte Mengen an T-Zellen und Makrophagen im Urin nachweisen. Das trifft sowohl auf klassisch immunologisch vermittelte Nierenerkrankungen wie LN, ANCA GN und NTX-Rejektion zu, als auch auf Nierenerkrankungen wie die diabetische Nephropathie, wo die Nierenentzündung sekundär auftritt. Im Gegensatz dazu berichten verschiedene Autoren von nur minimalen Mengen an Immunzellen im Urin bei weniger entzündlichen Nierenerkrankungen. Bei nicht-proliferativen nephrotischen Syndromen wie der Minimal-Change-Nephropathie, der membranösen Nephropathie und der fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) finden sich beispielsweise sehr wenige bis gar keine T-Zellen und Makrophagen im Urin^[85, 89, 90, 93-95]. In den meisten Studien wurden diese Erkrankungen zwar nur in kleiner Zahl als Kontrollgruppe analysiert, die Übereinstimmung der Daten verschiedener Publikationen ist aber so konsistent, dass

anzunehmen ist, dass sich bei nicht-proliferativen und nicht-entzündlichen Nierenerkrankungen keine relevanten Mengen an Immunzellen im Urin finden.

Möglicherweise ist das Zellbild im Urin zur Detektion bestimmter pathologischer Veränderungen sogar sensitiver als die Nierenbiopsie. Viele pathologische Veränderungen sind in den Nieren nicht homogen verteilt, sondern treten eher grob verstreut auf, und können dementsprechend in der Nierenbiopsie verfehlt werden. Von den Glomeruli ist bekannt, dass eine zu geringe Menge an Glomeruli in der Nierenbiopsie die Sensitivität reduziert^[96], Ähnliches gilt wahrscheinlich für das Niereninterstitium. Der Urin hingegen spiegelt mutmaßlich die Verhältnisse in den gesamten Nieren wider, was eine bessere Sensitivität annehmen lässt.

Wie bereits in der Einleitung dargelegt gibt es einen dringenden Bedarf an **Biomarkern für die LN** – als Surrogatparameter für klinische Studien und in der klinischen Praxis, zum Monitoring und zur rechtzeitigen Adjustierung der Therapie. Rein mechanistisch ist es plausibel anzunehmen, dass ein Biomarker, der die intrarenale Entzündung spezifisch widerspiegelt, am ehesten im Urin zu finden ist. Verschiedene Publikationen haben in den letzten Jahren vor allem Chemokine und Zytokine im Urin als Biomarker für die LN mit ELISA oder RT-PCR untersucht. Die Präsenz von zwei Gruppen von Chemokinen/Zytokinen scheint die LN besonders gut widerzuspiegeln, was wahrscheinlich Schlüsselmomente in der Pathogenese reflektiert. CCL2 (MCP-1) wurde in verschiedenen Studien mit guten Resultaten als Biomarker untersucht und könnte sogar prädiktiv für kommende Schübe sein^[97-100]. CCL2 ist vermutlich für die Rekrutierung von Makrophagen in die Nieren verantwortlich, und Blockade von CCL2 mildert die LN in einem Mausmodell^[101, 102]. Die zweite Gruppe umfasst CXCL10 und IFN γ , die bei LN alle erhöht im Urin nachweisbar sind und auf eine Th1-vermittelte Entzündung in den Nieren hindeuten^[103, 104]. Die Urinspiegel von TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis) korrelieren ebenfalls gut mit dem Vorhandensein einer aktiven LN. Interessanterweise wird angenommen, dass die Expression von TWEAK durch CCL2 und CXCL10 induziert wird^[105]. Neben den genannten gibt es zahlreiche weitere, in einzelnen Studien untersuchte lösliche Biomarker im Urin. Es zeichnet sich allerdings ab, dass kein einzelner löslicher Biomarker eine befriedigende Genauigkeit für den klinischen Einsatz bietet, weshalb die Kombination von verschiedenen löslichen Biomarkern aktuell propagiert und evaluiert wird^[106, 107].

In unseren Arbeiten konnten wir zeigen, dass sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen im Urin eine hervorragende Sensitivität und Spezifität zur Diagnose und womöglich Verlaufskontrolle der proliferativen LN haben. Praktisch zeitgleich und unabhängig von unseren Untersuchungen kam eine zweite Arbeitsgruppe zu sehr ähnlichen Ergebnissen, was die Validität der Daten stärkt^[87, 108]. Woran könnte es liegen, dass im

Urin T-Zellen eine überlegene Sensitivität und Spezifität gegenüber Zytokinen und Chemokinen aufweisen? T-Zellen integrieren vermutlich mehrere, potentiell redundante Chemokinsignale bei ihrer Rekrutierung, und die von T-Zellen produzierten Effektor-Zytokine sind ebenfalls pleiotrop. Demzufolge wäre es gut erklärbar, dass T-Zellen den Entzündungsprozess besser widerspiegeln als einzelne Chemokine oder Zytokine, die für den Krankheitsprozess verzichtbar sind und interindividuell eine heterogene Expression aufweisen könnten. Da die Durchflusszytometrie durch den breiten Einsatz in der Hämatonkologie in größeren Krankenhäusern etabliert und verfügbar ist, wäre die Nutzung von T-Zellen im Urin als Biomarker logistisch durchaus machbar. Eine multizentrische Studie zur weiteren Validierung der Urin-T-Zellen wäre zur Implementierung dieses vielversprechenden Markers wünschenswert, scheiterte aber bisher an der Finanzierung.

Da sich T-Zellen auch bei anderen Nierenerkrankungen im Urin finden, wären diese Zellen zwar kein für die LN spezifischer Marker. Es ist aber anzunehmen, dass dies ebenso für Chemokine, Zytokine und andere Immunmediatoren gilt und diese Moleküle nicht LN-spezifisch sind, sondern eine renale Entzündung widerspiegeln. Auf eine Nierenbiopsie zur Sicherung der Diagnose wird demnach wahrscheinlich auch in Zukunft nur im Ausnahmefall verzichtet werden können. Der Bedarf an einem validen Biomarker zur Entscheidung, wer einer Nierenbiopsie benötigt, und zur Verlaufsbeurteilung ist davon unberührt.

5. Zusammenfassung

In den vorliegenden Arbeiten konnte zum Verständnis einiger Schlüsselmomente in der Pathogenese der LN beigetragen werden. Mit den B1a B-Zellen wurde ein spezielles Subset von B-Zellen untersucht, die eine Schwachstelle für den Bruch der Immuntoleranz bei SLE darstellen könnten. Für diese Zellen konnte eine aktive Partizipation an der Pathogenese mit Klassenwechsel und Infiltration von Milz und entzündeten Zielorganen gezeigt werden. Bei Patienten mit SLE konnten autoreaktive CD4+ T-Zellen nachgewiesen werden, die mit der Krankheitsaktivität korrelieren und B-Zellen Hilfe zur Autoantikörperproduktion geben könnten. Mit CXCR3 wurde ein Rekrutierungsweg von CD4+ T-Zellen in die entzündeten Nieren bei Patienten mit LN untersucht und validiert.

Zudem wurde in unseren Arbeiten mit den T-Zellen im Urin ein neuer Biomarker für die LN entwickelt. Die Menge von T-Zellen im Urin scheint exzellent das Vorliegen einer aktiven, proliferativen LN widerzuspiegeln und eine Verlaufsbeurteilung unter Therapie zu ermöglichen. Damit sind T-Zellen im Urin einer der aktuell genauesten, in Erprobung befindlichen Biomarker für die LN.

Mit der Etablierung des Nachweises von T-Zellen und anderen Immunzellen im Urin bei LN konnte außerdem eine methodische Plattform etabliert werden, die eine nichtinvasive Quelle für Immunzellen aus den Nieren bietet. Dieser Ansatz bietet ein „Fenster in die Nieren“ zur besseren Analyse der lokalen Entzündungsvorgänge und könnte zu einer mehr human-zentrierten Erforschung von Nierenerkrankungen beitragen.

6. Literaturangaben

1. Mills JA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1994;**330**:1871-9.
2. Mavragani CP, Moutsopoulos HM. Lupus nephritis: current issues. *Annals of the rheumatic diseases* 2003;**62**:795-8.
3. Moore RA, Derry S. Systematic review and meta-analysis of randomised trials and cohort studies of mycophenolate mofetil in lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* 2006;**8**:R182.
4. Cameron JS. Lupus nephritis: an historical perspective 1968-1998. *Journal of nephrology* 1999;**12 Suppl 2**:S29-41.
5. Ginzler EM, Dooley MA, Aranow C, Kim MY, Buyon J, Merrill JT, Petri M, Gilkeson GS, Wallace DJ, Weisman MH, Appel GB. Mycophenolate mofetil or intravenous cyclophosphamide for lupus nephritis. *N Engl J Med* 2005;**353**:2219-28.
6. Appel GB, Contreras G, Dooley MA, Ginzler EM, Isenberg D, Jayne D, Li LS, Mysler E, Sanchez-Guerrero J, Solomons N, Wofsy D, Aspreva Lupus Management Study G. Mycophenolate mofetil versus cyclophosphamide for induction treatment of lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2009;**20**:1103-12.
7. Yung S, Chan TM. Anti-DNA antibodies in the pathogenesis of lupus nephritis--the emerging mechanisms. *Autoimmun Rev* 2008;**7**:317-21.
8. Winfield JB, Faiferman I, Koffler D. Avidity of anti-DNA antibodies in serum and IgG glomerular eluates from patients with systemic lupus erythematosus. Association of high avidity antinative DNA antibody with glomerulonephritis. *J Clin Invest* 1977;**59**:90-6.
9. Ebling F, Hahn BH. Restricted subpopulations of DNA antibodies in kidneys of mice with systemic lupus. Comparison of antibodies in serum and renal eluates. *Arthritis and rheumatism* 1980;**23**:392-403.
10. Ehrenstein MR, Katz DR, Griffiths MH, Papadaki L, Winkler TH, Kalden JR, Isenberg DA. Human IgG anti-DNA antibodies deposit in kidneys and induce proteinuria in SCID mice. *Kidney international* 1995;**48**:705-11.
11. Madaio MP, Carlson J, Cataldo J, Ucci A, Migliorini P, Pankewycz O. Murine monoclonal anti-DNA antibodies bind directly to glomerular antigens and form immune deposits. *J Immunol* 1987;**138**:2883-9.
12. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, Balow JE, Bruijn JA, Cook T, Ferrario F, Fogo AB, Ginzler EM, Hebert L, Hill G, Hill P, Jennette JC, Kong NC, Lesavre P, Lockshin M, Looi LM, Makino H, Moura LA, Nagata M. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2004;**15**:241-50.
13. Jeruc J, Jurcic V, Vizjak A, Hvala A, Babic N, Kveder R, Praprotnik S, Ferluga D. Tubulo-interstitial involvement in lupus nephritis with emphasis on pathogenesis. *Wien Klin Wochenschr* 2000;**112**:702-6.
14. Brentjens JR, Sepulveda M, Baliah T, Bentzel C, Erlanger BF, Elwood C, Montes M, Hsu KC, Andres GA. Interstitial immune complex nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Kidney international* 1975;**7**:342-50.
15. Park MH, D'Agati V, Appel GB, Pirani CL. Tubulointerstitial disease in lupus nephritis: relationship to immune deposits, interstitial inflammation, glomerular changes, renal function, and prognosis. *Nephron* 1986;**44**:309-19.

16. Schwartz MM, Fennell JS, Lewis EJ. Pathologic changes in the renal tubule in systemic lupus erythematosus. *Hum Pathol* 1982;**13**:534-47.
17. Singh AK, Ucci A, Madias NE. Predominant tubulointerstitial lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 1996;**27**:273-8.
18. Mori Y, Kishimoto N, Yamahara H, Kijima Y, Nose A, Uchiyama-Tanaka Y, Fukui M, Kitamura T, Tokoro T, Masaki H, Nagata T, Umeda Y, Nishikawa M, Iwasaka T. Predominant tubulointerstitial nephritis in a patient with systemic lupus nephritis. *Clin Exp Nephrol* 2005;**9**:79-84.
19. Liarski VM, Kaverina N, Chang A, Brandt D, Yanez D, Talasnik L, Carlesso G, Herbst R, Utset TO, Labno C, Peng Y, Jiang Y, Giger ML, Clark MR. Cell distance mapping identifies functional T follicular helper cells in inflamed human renal tissue. *Sci Transl Med* 2014;**6**:230ra46.
20. Hutloff A, Buchner K, Reiter K, Baelde HJ, Odendahl M, Jacobi A, Dorner T, Kroczeck RA. Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 2004;**50**:3211-20.
21. Chang A, Henderson SG, Brandt D, Liu N, Guttikonda R, Hsieh C, Kaverina N, Utset TO, Meehan SM, Quigg RJ, Meffre E, Clark MR. In situ B cell-mediated immune responses and tubulointerstitial inflammation in human lupus nephritis. *J Immunol* 2011;**186**:1849-60.
22. William J, Euler C, Christensen S, Shlomchik MJ. Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science* 2002;**297**:2066-70.
23. Cassese G, Lindenau S, de Boer B, Arce S, Hauser A, Riemekasten G, Berek C, Hiepe F, Krenn V, Radbruch A, Manz RA. Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. *Eur J Immunol* 2001;**31**:2726-32.
24. Enghard P, Grussie E, Rieder C, Burmester GR, Riemekasten G. Subset size, activation threshold and distribution of autoreactive MZ and FO B cells do not differ in a sex-specific manner in the NZB/W F1 murine lupus model: an experimental mouse study. *Lupus* 2011;**20**:1240-9.
25. Kinloch AJ, Chang A, Ko K, Henry Dunand CJ, Henderson S, Maienschein-Cline M, Kaverina N, Rovin BH, Salgado Ferrer M, Wolfgeher D, Liarski V, Haddon DJ, Utz PJ, Wilson PC, Clark MR. Vimentin is a dominant target of in situ humoral immunity in human lupus tubulointerstitial nephritis. *Arthritis & rheumatology* 2014;**66**:3359-70.
26. Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med* 1999;**189**:1639-48.
27. Reynolds J, Sallie BA, Syrganis C, Pusey CD. The role of T-helper lymphocytes in priming for experimental autoimmune glomerulonephritis in the BN rat. *J Autoimmun* 1993;**6**:571-85.
28. Zakheim B, McCafferty E, Phillips SM, Clayman M, Neilson EG. Murine interstitial nephritis. II. The adoptive transfer of disease with immune T lymphocytes produces a phenotypically complex interstitial lesion. *J Immunol* 1984;**133**:234-9.
29. Mann R, Zakheim B, Clayman M, McCafferty E, Michaud L, Neilson EG. Murine interstitial nephritis. IV. Long-term cultured L3T4+ T cell lines transfer delayed expression of disease as I-A-restricted inducers of the effector T cell repertoire. *J Immunol* 1985;**135**:286-93.

30. Wu J, Hicks J, Borillo J, Glass WF, 2nd, Lou YH. CD4(+) T cells specific to a glomerular basement membrane antigen mediate glomerulonephritis. *J Clin Invest* 2002;**109**:517-24.
31. Bagavant H, Deshmukh US, Wang H, Ly T, Fu SM. Role for nephritogenic T cells in lupus glomerulonephritis: progression to renal failure is accompanied by T cell activation and expansion in regional lymph nodes. *J Immunol* 2006;**177**:8258-65.
32. Walters G, Habib AM, Reynolds J, Wu H, Knight JF, Pusey CD. Glomerular T cells are of restricted clonality and express multiple CDR3 motifs across different Vbeta T-cell receptor families in experimental autoimmune glomerulonephritis. *Nephron Exp Nephrol* 2004;**98**:e71-81.
33. Massengill SF, Goodenow MM, Sleasman JW. SLE nephritis is associated with an oligoclonal expansion of intrarenal T cells. *Am J Kidney Dis* 1998;**31**:418-26.
34. Murata H, Matsumura R, Koyama A, Sugiyama T, Sueishi M, Shibuya K, Tsutsumi A, Sumida T. T cell receptor repertoire of T cells in the kidneys of patients with lupus nephritis. *Arthritis and rheumatism* 2002;**46**:2141-7.
35. Winchester R, Wiesendanger M, Zhang HZ, Steshenko V, Peterson K, Geraldino-Pardilla L, Ruiz-Vazquez E, D'Agati V. Immunologic characteristics of intrarenal T cells: trafficking of expanded CD8+ T cell beta-chain clonotypes in progressive lupus nephritis. *Arthritis and rheumatism* 2012;**64**:1589-600.
36. Kelley VR, Singer GG. The antigen presentation function of renal tubular epithelial cells. *Exp Nephrol* 1993;**1**:102-11.
37. Heymann F, Meyer-Schwesinger C, Hamilton-Williams EE, Hammerich L, Panzer U, Kaden S, Quaggin SE, Floege J, Grone HJ, Kurts C. Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury. *J Clin Invest* 2009;**119**:1286-97.
38. Ward MM. Changes in the incidence of endstage renal disease due to lupus nephritis in the United States, 1996-2004. *J Rheumatol* 2009;**36**:63-7.
39. Alexander T, Arnold R, Hiepe F. [Immunoablation followed by autologous stem cell transplantation in lupus: a clinical update]. *Z Rheumatol* 2009;**68**:205-8, 10-13.
40. Rovin BH, Furie R, Latinis K, Looney RJ, Fervenza FC, Sanchez-Guerrero J, Maciuca R, Zhang D, Garg JP, Brunetta P, Appel G, Group LI. Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study. *Arthritis and rheumatism* 2012;**64**:1215-26.
41. Mysler EF, Spindler AJ, Guzman R, Bijl M, Jayne D, Furie RA, Houssiau FA, Drappa J, Close D, Maciuca R, Rao K, Shahdad S, Brunetta P. Efficacy and safety of ocrelizumab in active proliferative lupus nephritis: results from a randomized, double-blind, phase III study. *Arthritis and rheumatism* 2013;**65**:2368-79.
42. Ginzler EM, Wax S, Rajeswaran A, Copt S, Hillson J, Ramos E, Singer NG. Ataccept in combination with MMF and corticosteroids in lupus nephritis: results of a prematurely terminated trial. *Arthritis Res Ther* 2012;**14**:R33.
43. Furie R, Nicholls K, Cheng TT, Houssiau F, Burgos-Vargas R, Chen SL, Hillson JL, Meadows-Shropshire S, Kinaszchuk M, Merrill JT. Efficacy and safety of abatacept in lupus nephritis: a twelve-month, randomized, double-blind study. *Arthritis & rheumatology* 2014;**66**:379-89.

44. Group AT. Treatment of lupus nephritis with abatacept: the Abatacept and Cyclophosphamide Combination Efficacy and Safety Study. *Arthritis & rheumatology* 2014;**66**:3096-104.
45. Wofsy D, Hillson JL, Diamond B. Abatacept for lupus nephritis: alternative definitions of complete response support conflicting conclusions. *Arthritis and rheumatism* 2012;**64**:3660-5.
46. Gordon C, Jayne D, Pusey C, Adu D, Amoura Z, Aringer M, Ballerin J, Cervera R, Calvo-Alen J, Chizzolini C, Dayer J, Doria A, Ferrario F, Floege J, Guillevin L, Haubitz M, Hiepe F, Houssiau F, Lesavre P, Lightstone L, Meroni P, Meyer O, Moulin B, O'Reilly K, Praga M, Schulze-Koops H, Sinico R, Smith K, Tincani A, Vasconcelos C, Hughes G. European consensus statement on the terminology used in the management of lupus glomerulonephritis. *Lupus* 2009;**18**:257-63.
47. Dall'Era M, Cisternas MG, Smilek DE, Straub L, Houssiau FA, Cervera R, Rovin BH, Mackay M. Predictors of long-term renal outcome in lupus nephritis trials: lessons learned from the Euro-Lupus Nephritis cohort. *Arthritis & rheumatology* 2015;**67**:1305-13.
48. Touma Z, Urowitz MB, Ibanez D, Gladman DD. Time to recovery from proteinuria in patients with lupus nephritis receiving standard treatment. *J Rheumatol* 2014;**41**:688-97.
49. Zickert A, Sundelin B, Svenungsson E, Gunnarsson I. Role of early repeated renal biopsies in lupus nephritis. *Lupus science & medicine* 2014;**1**:e000018.
50. Baumgarth N, Tung JW, Herzenberg LA. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol* 2005;**26**:347-62.
51. Riemekasten G, Hahn BH. Key autoantigens in SLE. *Rheumatology (Oxford)* 2005;**44**:975-82.
52. Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown L, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;**96**:2250-5.
53. Hayakawa K, Hardy RR, Parks DR, Herzenberg LA. The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J Exp Med* 1983;**157**:202-18.
54. Stall AM, Wells SM, Lam KP. B-1 cells: unique origins and functions. *Semin Immunol* 1996;**8**:45-59.
55. Casali P, Burastero SE, Balow JE, Notkins AL. High-affinity antibodies to ssDNA are produced by CD-B cells in systemic lupus erythematosus patients. *J Immunol* 1989;**143**:3476-83.
56. Casali P, Burastero SE, Nakamura M, Inghirami G, Notkins AL. Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1+ B-cell subset. *Science* 1987;**236**:77-81.
57. Hayakawa K, Carmack CE, Hyman R, Hardy RR. Natural autoantibodies to thymocytes: origin, VH genes, fine specificities, and the role of Thy-1 glycoprotein. *J Exp Med* 1990;**172**:869-78.
58. Hayakawa K, Hardy RR, Honda M, Herzenberg LA, Steinberg AD. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;**81**:2494-8.

59. Masmoudi H, Mota-Santos T, Huetz F, Coutinho A, Cazenave PA. All T15 Id-positive antibodies (but not the majority of VHT15+ antibodies) are produced by peritoneal CD5+ B lymphocytes. *Int Immunol* 1990;**2**:515-20.
60. Burastero SE, Casali P, Wilder RL, Notkins AL. Monoreactive high affinity and polyreactive low affinity rheumatoid factors are produced by CD5+ B cells from patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1988;**168**:1979-92.
61. Morshed SR, Mannoork K, Halder RC, Kawamura H, Bannai M, Sekikawa H, Watanabe H, Abo T. Tissue-specific expansion of NKT and CD5+B cells at the onset of autoimmune disease in (NZBxNZW)F1 mice. *Eur J Immunol* 2002;**32**:2551-61.
62. Hoffman RW. T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2001;**6**:D1369-78.
63. Bruns A, Blass S, Hausdorf G, Burmester GR, Hiepe F. Nucleosomes are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 2000;**43**:2307-15.
64. Bacher P, Scheffold A. New technologies for monitoring human antigen-specific T cells and regulatory T cells by flow-cytometry. *Current opinion in pharmacology* 2015;**23**:17-24.
65. Geiger R, Duhon T, Lanzavecchia A, Sallusto F. Human naive and memory CD4+ T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells. *J Exp Med* 2009;**206**:1525-34.
66. Tan EM, Kunkel HG. Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 1966. 96: 464-471. *J Immunol* 2006;**176**:1297-304.
67. Yasuma M, Takasaki Y, Matsumoto K, Kodama A, Hashimoto H, Hirose S. Clinical significance of IgG anti-Sm antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1990;**17**:469-75.
68. Riemekasten G, Marell J, Trebeljahr G, Klein R, Hausdorf G, Haupl T, Schneider-Mergener J, Burmester GR, Hiepe F. A novel epitope on the C-terminus of SmD1 is recognized by the majority of sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1998;**102**:754-63.
69. Riemekasten G, Kawald A, Weiss C, Meine A, Marell J, Klein R, Hofer B, Meisel C, Hausdorf G, Manz R, Kamradt T, Burmester GR, Hiepe F. Strong acceleration of murine lupus by injection of the SmD1(83-119) peptide. *Arthritis and rheumatism* 2001;**44**:2435-45.
70. Riemekasten G, Langnickel D, Ebling FM, Karpouzas G, Kalsi J, Herberth G, Tsao BP, Henklein P, Langer S, Burmester GR, Radbruch A, Hiepe F, Hahn BH. Identification and characterization of SmD183-119-reactive T cells that provide T cell help for pathogenic anti-double-stranded DNA antibodies. *Arthritis and rheumatism* 2003;**48**:475-85.
71. Engler JB, Undeutsch R, Kloke L, Rosenberger S, Backhaus M, Schneider U, Egerer K, Dragun D, Hofmann J, Huscher D, Burmester GR, Humrich JY, Enghard P, Riemekasten G. Unmasking of autoreactive CD4 T cells by depletion of CD25 regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases* 2011;**70**:2176-83.
72. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F. Differential

expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998;**187**:129-34.

73. Masutani K, Akahoshi M, Tsuruya K, Tokumoto M, Ninomiya T, Kohsaka T, Fukuda K, Kanai H, Nakashima H, Otsuka T, Hirakata H. Predominance of Th1 immune response in diffuse proliferative lupus nephritis. *Arthritis and rheumatism* 2001;**44**:2097-106.

74. Weber C, Weber KS, Klier C, Gu S, Wank R, Horuk R, Nelson PJ. Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T(H)1-like/CD45RO(+) T cells. *Blood* 2001;**97**:1144-6.

75. Furuichi K, Wada T, Sakai N, Iwata Y, Yoshimoto K, Shimizu M, Kobayashi K, Takasawa K, Kida H, Takeda SI, Mukaida N, Matsushima K, Yokoyama H. Distinct expression of CCR1 and CCR5 in glomerular and interstitial lesions of human glomerular diseases. *Am J Nephrol* 2000;**20**:291-9.

76. Segerer S, Banas B, Wornle M, Schmid H, Cohen CD, Kretzler M, Mack M, Kiss E, Nelson PJ, Schlondorff D, Grone HJ. CXCR3 is involved in tubulointerstitial injury in human glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2004;**164**:635-49.

77. Anders HJ, Belemezova E, Eis V, Segerer S, Vielhauer V, Perez de Lema G, Kretzler M, Cohen CD, Frink M, Horuk R, Hudkins KL, Alpers CE, Mampaso F, Schlondorff D. Late onset of treatment with a chemokine receptor CCR1 antagonist prevents progression of lupus nephritis in MRL-Fas(lpr) mice. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2004;**15**:1504-13.

78. Topham PS, Csizmadia V, Soler D, Hines D, Gerard CJ, Salant DJ, Hancock WW. Lack of chemokine receptor CCR1 enhances Th1 responses and glomerular injury during nephrotoxic nephritis. *J Clin Invest* 1999;**104**:1549-57.

79. Turner JE, Paust HJ, Steinmetz OM, Peters A, Meyer-Schwesinger C, Heymann F, Helmchen U, Fehr S, Horuk R, Wenzel U, Kurts C, Mittrucker HW, Stahl RA, Panzer U. CCR5 deficiency aggravates crescentic glomerulonephritis in mice. *J Immunol* 2008;**181**:6546-56.

80. Turner JE, Paust HJ, Bennstein SB, Bramke P, Krebs C, Steinmetz OM, Velden J, Haag F, Stahl RA, Panzer U. Protective role for CCR5 in murine lupus nephritis. *American journal of physiology Renal physiology* 2012;**302**:F1503-15.

81. Steinmetz OM, Turner JE, Paust HJ, Lindner M, Peters A, Heiss K, Velden J, Hopfer H, Fehr S, Krieger T, Meyer-Schwesinger C, Meyer TN, Helmchen U, Mittrucker HW, Stahl RA, Panzer U. CXCR3 mediates renal Th1 and Th17 immune response in murine lupus nephritis. *J Immunol* 2009;**183**:4693-704.

82. Menke J, Zeller GC, Kikawada E, Means TK, Huang XR, Lan HY, Lu B, Farber J, Luster AD, Kelley VR. CXCL9, but not CXCL10, promotes CXCR3-dependent immune-mediated kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2008;**19**:1177-89.

83. Moser K, Kalies K, Szyska M, Humrich JY, Amann K, Manz RA. CXCR3 promotes the production of IgG1 autoantibodies but is not essential for the development of lupus nephritis in NZB/NZW mice. *Arthritis and rheumatism* 2012;**64**:1237-46.

84. Patel VB, Preedy, Victor R. Biomarkers in Kidney Disease 2016.

85. Enghard P, Humrich JY, Rudolph B, Rosenberger S, Biesen R, Kuhn A, Manz R, Hiepe F, Radbruch A, Burmester GR, Riemekasten G. CXCR3+CD4+ T cells are enriched in inflamed kidneys and urine and provide a new biomarker for acute nephritis flares in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis and rheumatism* 2009;**60**:199-206.
86. Dolff S, Abdulahad WH, van Dijk MC, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M. Urinary T cells in active lupus nephritis show an effector memory phenotype. *Annals of the rheumatic diseases* 2010;**69**:2034-41.
87. Dolff S, Abdulahad WH, Arends S, van Dijk MC, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M. Urinary CD8+ T-cell counts discriminate between active and inactive lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* 2013;**15**:R36.
88. Hotta O, Yusa N, Ooyama M, Taguma Y. Urinary macrophage counts and ratio to T lymphocytes: possible use in differential diagnosis and management of glomerular disease. *Journal of clinical laboratory analysis* 1996;**10**:205-8.
89. Hotta O, Yusa N, Ooyama M, Unno K, Furuta T, Taguma Y. Detection of urinary macrophages expressing the CD16 (Fc gamma RIII) molecule: a novel marker of acute inflammatory glomerular injury. *Kidney Int* 1999;**55**:1927-34.
90. Deenitchina SS, Shinozaki M, Hirano T, Ando T, Hirakata H, Kiyohara Y, Katafuchi R, Fujishima M. Association of a T-cell receptor constant alpha chain gene polymorphism with progression of IgA nephropathy in Japanese patients. *Am J Kidney Dis* 1999;**34**:279-88.
91. Hotta O, Taguma Y, Ooyama M, Yusa N, Nagura H. Analysis of CD14+ cells and CD56+ cells in urine using flow cytometry: a useful tool for monitoring disease activity of IgA nephropathy. *Clin Nephrol* 1993;**39**:289-94.
92. van Doesum WB, Abdulahad WH, van Dijk MC, Dolff S, van Son WJ, Stegeman CA, Sanders JS. Characterization of urinary CD4(+) and CD8(+) T cells in kidney transplantation patients with polyomavirus BK infection and allograft rejection. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* 2014;**16**:733-43.
93. Sakatsume M, Xie Y, Ueno M, Obayashi H, Goto S, Narita I, Homma N, Tasaki K, Suzuki Y, Gejyo F. Human glomerulonephritis accompanied by active cellular infiltrates shows effector T cells in urine. *J Am Soc Nephrol* 2001;**12**:2636-44.
94. Hotta O, Taguma Y, Yusa N, Ooyama M. Analysis of mononuclear cells in urine using flow cytometry in glomerular diseases. *Kidney international Supplement* 1994;**47**:S117-21.
95. Enghard P, Rieder C, Kopetschke K, Klocke JR, Undeutsch R, Biesen R, Dragun D, Gollasch M, Schneider U, Aupperle K, Humrich JY, Hiepe F, Backhaus M, Radbruch AH, Burmester GR, Riemekasten G. Urinary CD4 T cells identify SLE patients with proliferative lupus nephritis and can be used to monitor treatment response. *Annals of the rheumatic diseases* 2013.
96. Corwin HL, Schwartz MM, Lewis EJ. The importance of sample size in the interpretation of the renal biopsy. *Am J Nephrol* 1988;**8**:85-9.
97. Wada T, Yokoyama H, Su SB, Mukaida N, Iwano M, Dohi K, Takahashi Y, Sasaki T, Furuichi K, Segawa C, Hisada Y, Ohta S, Takasawa K, Kobayashi K, Matsushima K. Monitoring urinary levels of monocyte chemotactic and

- activating factor reflects disease activity of lupus nephritis. *Kidney international* 1996;**49**:761-7.
98. Noris M, Bernasconi S, Casiraghi F, Sozzani S, Gotti E, Remuzzi G, Mantovani A. Monocyte chemoattractant protein-1 is excreted in excessive amounts in the urine of patients with lupus nephritis. *Lab Invest* 1995;**73**:804-9.
99. Rovin BH, Song H, Birmingham DJ, Hebert LA, Yu CY, Nagaraja HN. Urine chemokines as biomarkers of human systemic lupus erythematosus activity. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2005;**16**:467-73.
100. Watson L, Tullus K, Pilkington C, Chesters C, Marks SD, Newland P, Jones CA, Beresford MW. Urine biomarkers for monitoring juvenile lupus nephritis: a prospective longitudinal study. *Pediatr Nephrol* 2014;**29**:397-405.
101. Kulkarni O, Pawar RD, Purschke W, Eulberg D, Selve N, Buchner K, Ninichuk V, Segerer S, Vielhauer V, Klussmann S, Anders HJ. Spiegelmer inhibition of CCL2/MCP-1 ameliorates lupus nephritis in MRL-(Fas)lpr mice. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2007;**18**:2350-8.
102. Tesch GH, Maifert S, Schwarting A, Rollins BJ, Kelley VR. Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-Fas(lpr) mice. *J Exp Med* 1999;**190**:1813-24.
103. Avihingsanon Y, Phumesin P, Benjachat T, Akkasilpa S, Kittikowit V, Praditpornsilpa K, Wongpiyabavorn J, Eiam-Ong S, Hemachudha T, Tungsanga K, Hirankarn N. Measurement of urinary chemokine and growth factor messenger RNAs: a noninvasive monitoring in lupus nephritis. *Kidney international* 2006;**69**:747-53.
104. Chan RW, Tam LS, Li EK, Lai FM, Chow KM, Lai KB, Li PK, Szeto CC. Inflammatory cytokine gene expression in the urinary sediment of patients with lupus nephritis. *Arthritis and rheumatism* 2003;**48**:1326-31.
105. Schwartz N, Rubinstein T, Burkly LC, Collins CE, Blanco I, Su L, Hojaili B, Mackay M, Aranow C, Stohl W, Rovin BH, Michaelson JS, Putterman C. Urinary TWEAK as a biomarker of lupus nephritis: a multicenter cohort study. *Arthritis Res Ther* 2009;**11**:R143.
106. Abulaban KM, Song H, Zhang X, Kimmel PL, Kusek JW, Nelson RG, Feldman HI, Vasani RS, Ying J, Mauer M, Nelsestuen GL, Bennett M, Brunner HI, Rovin BH. Predicting decline of kidney function in lupus nephritis using urine biomarkers. *Lupus* 2016;**25**:1012-8.
107. Wolf BJ, Spainhour JC, Arthur JM, Janech MG, Petri M, Oates JC. Development of Biomarker Models to Predict Outcomes in Lupus Nephritis. *Arthritis & rheumatology* 2016;**68**:1955-63.
108. Dolff S, Abdulahad WH, van Dijk MC, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M. Urinary T cells in active lupus nephritis show an effector memory phenotype. *Annals of the rheumatic diseases*.

7. Abkürzungsverzeichnis

ANCA - Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper

GN - Glomerulonephritis

APC – Antigen-präsentierenden Zelle

AUC - Area under the Receiver operator curve, Fläche unter der ROC-Kurve

CD – Cluster of Differentiation

dsDNA-Antikörper - Antikörper gegen doppelsträngige DNA

hpf = high power field

IgAN – IgA-Nephropathie

ISN/RPS - International Society of Nephrology/Renal Pathology Society

LN - Lupusnephritis

MMF - Mycophenolat Mofetil

NTN - Nephrotoxisches Nephritismodell

NTX – Nierentransplantat

PBMC - Peripheral Blood Mononuclear Cell (mononukleäre Zellen des
peripheren Blutes)

RBC - Red blood cells, rote Blutkörperchen

SLE - Systemischer Lupus erythematodes

SLEDAI - Systemic Lupus Erythematosus. Disease Activity Index; Score, der die
SLE-Krankheitsaktivität widerspiegelt

Sm – Smith, Protein und Zielstruktur von Autoantikörpern beim SLE

SmD1(83-119) – Teilstück des Sm-Proteins

Treg – Regulatorische CD4+ T-Zelle

TWEAK - TNF-like weak inducer of apoptosis

WHO - Weltgesundheitsorganisation

8. Danksagung

Als erstes möchte ich Prof. Gabriela Riemekasten danken, für die langjährige Unterstützung, die vielen gemeinsamen Ideen und Diskussionen. Prof. Gabriela Riemekasten hat mir den Spaß an der Forschung vermittelt, hat mich mit ihrer ansteckenden Leidenschaft für die Medizin motiviert und mir in der Forschung enorme Freiheiten gelassen.

Ebenso möchte ich Prof. Gerd-Rüdiger Burmester danken, der mich immer unterstützt und gefördert hat. Dank auch an Prof. Falk Hiepe, der mich immer wieder beraten und an entscheidenden Stellen geholfen hat.

Prof. Andreas Radbruch gilt auch großer Dank! Seine Ratschläge waren von unermesslichem Wert. Ich kann mir keinen besseren Direktor eines Forschungsinstitutes vorstellen.

In der Abteilung für Nephrologie möchte ich Prof. Achim Jörres danken, der mich unterstützt und gefördert hat. Ebenso großer Dank gilt Prof. Duska Dragun, ohne ihre Hilfe wäre ich nicht so weit gekommen. Dank gilt ebenso PD Andreas Kahl, Prof. Maik Gollasch, Prof. Petra Reinke, Dr. Andreas Grützkau und Prof. Alexander Scheffold für wissenschaftliche Diskussionen und Ratschläge. Der Nierenpathologien der Charité Dr. Birgit Rudolph danke ich für gemeinsame Projekte, viele gute Ideen und tolle Bilder.

Ganz besonderer Dank gilt natürlich meinen Kollegen aus der Forschungsarbeitsgruppe! Dr. Jens Humrich – ohne ihn hätte ich es sicher nicht geschafft! Dr. Reinmar Undeutsch, Dimas Abdirama, Dr. Angelika Rose, Dr. Caro von Spee-Mayer, Anika Klaus, Dr. Dirk Langnickel, Dr. Angela Kill, Dr. Jeannine Günther, alles Wegbegleiter, die ich nicht missen möchte. Ebenso Dank an die vielen Doktoranden, die ich mitbetreuen durfte, Erwin Grußie, Stefan Rosenberger, Broder Engler, Claudia Rieder, Katharina Kopetschke, Jan Klocke, Anna-Sophie Griebach, Valerie Langhans, Sebastian Tesch, Hannah Brandt und Nina Dworschak, es hat mir mit ihnen großen Spaß gemacht.

Neben vielen Anderen danke ich meinen Forschungskollegen Dr. Andrey Kruglov, Dr. Timo Gaber, Dr. Cindy Strehl, Dr. Chu Van Trung, Dr. Robert Biesen, Dr. Sabine Baumgart für unzählige Ratschläge und gute Diskussionen.

In meiner klinischen Ausbildung haben mich neben den vielen bereits Genannten Dr. Udo Schneider, Dr. Anne Krüger, Lutz Nibbe, Dr. Roland Körner, Dr. Jan Kruse und Dr. Christian Lojewski tief beeindruckt. Ich danke ihnen für die Vorbildfunktion als exzellente Kliniker.

Danke auch an alle Patienten, die bereitwillig viele, viele Proben gespendet haben.

Zu guter Letzt – großer Dank geht an meine Familie, Antonia, Ida und Ben und meine Eltern Brigitte und Armin für die unermessliche Liebe und Unterstützung!

9. Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern und Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift abgegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité - Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....
Datum

.....
Unterschrift