

Aus dem Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin (DRFZ)
Institut der Leibniz-Gemeinschaft
und
aus der Medizinischen Klinik
mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

CD4-T-Zell-Subsets im Urin als Biomarker der Lupus-Nephritis

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Claudia Franziska Katharina Rieder
aus Freiburg i. B.

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. Gabriela Riemekasten
 2. Prof. Dr. med. Elisabeth Märker-Hermann
 3. Prof. Dr. med. Torsten Witte

Datum der Promotion: 03.06.2012

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Systemischer Lupus Erythematoses	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie	1
1.1.3	Klinische Symptome und Diagnostik	2
1.1.4	Morbidität und Mortalität	3
1.2	Lupus-Nephritis	4
1.2.1	Pathogenese	4
1.2.2	Rolle der T-Zellen bei der Lupus-Nephritis	9
1.3	Diagnostik einer Lupus-Nephritis	11
1.3.1	Biomarker in der Forschung	14
1.4	Chemokine	17
1.4.1	Chemokinrezeptoren	18
1.5	Oberflächenmarker	21
1.5.1	CD45	21
1.5.2	CD69	21
1.6	Fragestellung	22
2	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	Material	24
2.1.1	Geräte und Software	24
2.1.2	Glas- und Plastikmaterial	24
2.1.3	Chemikalien und Puffer	25
2.1.4	Antikörper und Beads	25
2.2	Methoden	27
2.2.1	Patienten	27
2.2.2	Patientengruppeneinteilung	27
2.2.3	Kontrollgruppe und Proben zusätzlicher Tests	28
2.2.4	Bestimmung der Krankheitsaktivität	28
2.2.5	Bestimmung der renalen Krankheitsaktivität	29
2.2.6	Probengewinnung	30
2.2.7	Durchflusszytometrie	31
2.2.8	Isolierung und Färbung der Leukozyten aus der Vollblut-Probe	33
2.2.9	Isolierung und Färbung der Urinprobe	34
2.2.10	Untersuchung zum zellulären Überleben in Urin	35
2.2.11	Färben toter Zellen mit Propidium Jodid	36
2.2.12	Auswertung und Gatingstrategie	37
2.2.13	Quantitative Bestimmung der Zellen	39
2.2.14	Statistische Auswertung	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	Patienten	41
3.1.1	Patientengruppe mit Nierenbeteiligung	41
3.1.2	Patientengruppe ohne Nierenbeteiligung	42
3.1.3	Gesunde Kontrollgruppe	43

Inhaltsverzeichnis

3.2	Zellüberleben in Urin	44
3.3	Einflussfaktoren auf den Nachweis von Zellen in Urin	47
3.3.1	Urin pH-Wert	47
3.3.2	Regelblutung der Frau.....	47
3.4	Berechnung der Absoluten Zellzahl	48
3.5	Durchflusszytometrische Analyse der CD3+CD4+T-Zellen in Urin	50
3.5.1	Anzahl der T-Helfer Zellen in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität	52
3.6	Messungen zum gleichen Zeitpunkt einer Nierenbiopsieentnahme	56
3.7	CD3+CD4+T-Zellen im Vergleich zur Leukozyturie	57
3.8	Berechnung der Spezifität und Sensitivität des Verfahrens	58
3.9	CD3+CD4+T-Zellzahlen im Krankheitsverlauf	60
3.10	Charakterisierung der T-Zellen an Hand von Oberflächenmarkern	62
3.10.1	Memory/Effektor T-Zellen	62
3.10.2	Aktivierungszustand der CD4+T-Helferzellen	64
3.10.3	Chemokinrezeptoren	65
4	DISKUSSION	68
4.1	Methodik	68
4.1.1	Einflussfaktoren auf den Nachweis von Zellen in Urin	68
4.1.2	Patientenkollektiv.....	70
4.1.3	Festlegung der Krankheitsaktivität	70
4.2	Erhöhte T-Zellzahl im Urin von Lupus Patienten	71
4.3	Bezug der Urinzellzahl zur Krankheitsaktivität	72
4.3.1	Betrachtung der Untergruppen	73
4.4	Oberflächenmarker CD45/CD69	74
4.5	Spiegelt die CCR1- und CCR5-Expression auf den T-Zellen den pathophysiologischen Prozess der T- Zell-Rekrutierung wider?	75
4.6	Nierenbiopsien zum Zeitpunkt der Messungen	76
4.7	Urinzellzahlen im Krankheitsverlauf	77
4.8	Sensitivität und Spezifität der CD3CD4-Messung als diagnostisches Verfahren	78
4.9	Vergleich zu bereits vorhandenen Biomarkern	78
4.10	Schlussfolgerung und Ausblick	79
5	ZUSAMMENFASSUNG	80
6	LITERATURVERZEICHNIS	82
7	ANHANG	94

1 Einleitung

1.1 Systemischer Lupus Erythematoses

Der Systemische Lupus Erythematoses (SLE) ist eine Autoimmunerkrankung, die zu dem Formenkreis der Kollagenosen (entzündliche Bindegewebserkrankungen) gezählt wird. Diese systemisch verlaufende Erkrankung kann eine Anzahl verschiedener Organe betreffen, wodurch es zu einer Vielzahl an unterschiedlichen Symptomen und Erscheinungsformen kommt. Der SLE ist eine chronische Erkrankung, die lebensbedrohlich verlaufen kann, wenn wichtige Organe betroffen sind.

1.1.1 Epidemiologie

Menschen beider Geschlechter, jeden Alters und aller ethnischer Gruppen können von einem SLE betroffen sein. Zu 90 % sind jedoch Frauen im gebärfähigen Alter erkrankt. So wird die Spitze des Erkrankungsalters zwischen 17 und 40 Jahren angegeben [1]. Interessanterweise scheint das Erkrankungsalter in Entwicklungsländern niedriger zu sein, was womöglich auf die dortige geringere Lebenserwartung zurückzuführen ist [2]. Aktuelle Studien geben eine Inzidenzrate von 1-10 Neuerkrankten pro 100.000 Menschen pro Jahr an sowie Prävalenzraten von 20-70 pro 100.000 Einwohner [2-8]. Über die letzten 50-60 Jahre ist ein Anstieg der Inzidenzrate um mehr als das 10fache zu verzeichnen [9].

Die höchste Prävalenz unter den ethnischen Gruppen tritt bei Afroamerikanern und bei in industrialisierten Ländern lebenden Asiaten auf. Interessanterweise lassen sich in Westafrika nicht vergleichbar hohe Prävalenzraten finden [10]. Dies mag einerseits darauf hinweisen, dass neben genetischen auch Umweltfaktoren in der Ätiologie des SLE eine Rolle spielen und andererseits, dass einfache diagnostische Möglichkeiten in Entwicklungsländern nicht zur Verfügung stehen und dort eventuell unverhältnismäßig seltener die Diagnose eines SLE gestellt wird.

1.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Systemischen Lupus Erythematoses ist trotz vieler Forschungsergebnisse bisher weitgehend unklar. Vermutet wird, da auch Mausmodelle des SLE darauf hinweisen, dass es durch Interaktion von Suszeptibilitätsgenen und Umweltfaktoren zu einer vielschichtigen Fehlreaktion des Immunsystems kommt.

Einleitung

Auf einen Einfluss genetischer Faktoren deuten eine familiäre Häufung sowie ein erhöhtes Vorkommen bei eineiigen Zwillingen hin [11]. Auch sind bei Untersuchungen von Familienmitgliedern Erkrankter Häufungen (noch) nicht pathogener Immunfehlerreaktionen beschrieben worden. Nur sehr selten kann ein einzelnes Gen für die Krankheitsentstehung allein verantwortlich gemacht werden. Vielmehr wird eine polygene Vererbung bezüglich eines erhöhten Erkrankungsrisikos vermutet. Bei einem Teil der SLE-Patienten scheinen jedoch einige Gene für die Krankheitsentstehung entscheidend mitverantwortlich zu sein [12]. Mit einem SLE assoziiert wurden beispielsweise vermehrt die HLA-Merkmale -A1, -B8 und -DR3 gefunden [13]. Eine starke Korrelation fand sich ebenfalls zwischen dem Auftreten primärer Immundefizite und einem SLE sowie Lupus-ähnlicher Erkrankungen. Insbesondere sind hier Defizite früher Faktoren des klassischen Aktivierungsweges des Komplements aufgefallen. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Patienten mit einem homozygoten Mangel des C1q-Moleküls in 93 % der Fälle einen SLE entwickelten [14].

Zu den charakteristischen exogenen Auslösern eines SLE zählen UV-Exposition und hormonelle Umstellungsphasen wie Schwangerschaft und Östrogenapplikationen. Durch die Einnahme einiger Medikamente kann ein Lupus-ähnliches Bild hervorgerufen werden. Fraglich bleibt, ob virale Infektionen wie beispielsweise mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) oder auch Impfungen zu einer Entstehung eines SLE beitragen [15, 16].

1.1.3 Klinische Symptome und Diagnostik

Eine Besonderheit des SLE ist der schubförmige Verlauf mit unvorhersehbaren Exazerbationen und Remissionen.

Der Systemische Lupus Erythematoses zeigt ein sehr breites Spektrum an Symptomen, welche von allgemeinen Beschwerden wie plötzlich auftretendes Fieber über Schwäche und Gewichtsverlust reichen. Häufig kommt es im Rahmen des SLE zu Gelenksbeschwerden. Ebenfalls betroffen sein können Herz, Lunge, Haut, ZNS und insbesondere die Nieren.

Die 1997 neu modifizierten diagnostischen Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) werden zur Klassifikation eines SLE herangezogen [17, 18].

Sind vier dieser Kriterien erfüllt, lässt sich von der Diagnose eines SLE sprechen.

Tabelle 1: ACR Kriterien

ACR Kriterien zur Klassifikation des systemischen Lupus Erythematoses:

1. Schmetterlingserythem
 2. diskoider Lupus
 3. Photosensibilität der Haut
 4. Orale oder nasale Schleimhautulzerationen
 5. Nichterosive Arthritis von zwei oder mehr Gelenken
 6. Serositis (Pleuritis, Pericarditis)
 7. Renale Funktionsstörung (Proteinurie > 0,5 g/d oder Zylindurie)
 8. Neurologische Störungen (Krampfanfälle, Psychosen)
 9. Hämatologische Veränderungen (Zytopenien)
 10. Immunologische Veränderungen (a-dsDNS-AK, anti-Sm- oder Phospholipid-AK)
 11. Antinukleäre Antikörper (ANA)
-

1.1.4 Morbidität und Mortalität

Wie in vielen Studien gezeigt werden konnte, hat sich in den letzten Jahrzehnten die Überlebensrate des SLE sehr verbessert. Allerdings beziehen sich diese Daten vor allem auf die kurze und mittlere Überlebensrate. Die Langzeitüberlebenswahrscheinlichkeit ist weiterhin deutlich eingeschränkt gegenüber der normalen Bevölkerung [19, 20]. So besteht für einen bei Diagnosestellung 20 jährigen Patienten eine Wahrscheinlichkeit von 1:6, bis zu seinem 35. Lebensjahr an den Folgen der Erkrankung zu sterben [21]. Zu vermerken ist, dass Patienten innerhalb des ersten Erkrankungsjahres zumeist durch Folgen schwerer Krankheitsaktivität insbesondere einer Nieren- oder einer ZNS-Beteiligung des Lupus sterben. Im späteren Krankheitsverlauf hingegen liegen den Sterbefällen eher Komplikationen der langanhaltenden und chronischen Erkrankung sowie insbesondere der Therapie durch Immunsuppressiva zu Grunde [21-23]. Ausdruck dessen können beispielsweise eine terminale Niereninsuffizienz, ein gesteigertes Risiko für Infektionen [24-26], Artherosklerose [27] und Tumorerkrankungen sein [22]. Daher sollte neben der Therapie der Grunderkrankung und der Kontrolle der Krankheitsaktivität unbedingt das Verabreichen einer optimierten kleinsten effektiven Dosis an Immunsuppressiva und Steroiden im Vordergrund stehen. Um dieser Tatsache gerecht zu werden, sollte versucht werden die Therapie auf den individuellen Krankheitsverlauf und begleitende Risikofaktoren eines jeden einzelnen Patienten abzustimmen. Es sollte eine Untergenau sowie eine Übertherapie vermieden werden.

1.2 Lupus-Nephritis

Die Lupus-Nephritis (LN) ist eine sehr schwere Erkrankung und ein wichtiger Organbefall im Rahmen des Systemischen Lupus Erythematoses. In 60-90 % der SLE Patienten kommt es im Laufe der Erkrankung zu einer Beteiligung der Nieren [28-31]. Ein höheres Risiko hierfür besteht bei afrikanischer und asiatischer Herkunft der Patienten [21, 32, 33].

Eine Beteiligung der Nieren ist mit einer deutlich schlechteren Prognose verbunden. Betroffene Patienten zeigen eine 5 Jahres Sterbewahrscheinlichkeit von bis zu 18 %. Weitere 10-15 % entwickeln trotz Therapie im Verlauf der Erkrankung eine terminale Niereninsuffizienz [31, 34].

1.2.1 Pathogenese

In der Pathogenese der LN kommt es vermutlich durch das initiale Vorhandensein von Autoantikörpern zur Formation pathogenetischer Immunkomplexe. Durch die Ablagerung dieser an die Basalmembran der Nierenglomeruli kommt es in der Folge zu der Entstehung einer Nierenentzündung. Dabei spielt die Aktivierung des Komplements sowie die Ausschüttung von Chemokinen und anderen chemotaktisch wirksamen Substanzen eine Rolle. Diese Mediatoren münden gemeinsam in eine Rekrutierung von Leukozyten sowie deren Aktivierung und Proliferation. Die infiltrierenden Leukozyten, in der Mehrzahl Makrophagen und T-Zellen, unterstützen durch das Ausschütten proinflammatorischer Zytokine das entzündliche Geschehen und führen darauf folgend zu Gewebeschädigung und Fibrose, welche bis hin zur Glomerulosklerose und dem Verlust der Organfunktion führen kann.

Im weiteren Verlauf wird vereinfachend darauf zurückgegriffen, die Nierenentzündung in vier Phasen einzuteilen: die Initial-, die Amplifikations- sowie die Progressions- und Terminalphase.

Initialphase

Hyperaktive B-Zellen haben in der Pathogenese des SLE eine wichtige und entscheidende Bedeutung. Sie produzieren die für den SLE charakteristischen Autoantikörper. Diese sind zumeist gegen nukleäre Strukturen wie beispielsweise doppelsträngige DNA, das nukleäre Glykoprotein Sm-Antigen sowie Nukleosomen aber auch Strukturen wie den Komplementfaktor C1q gerichtet.

Einer der Gründe für das Vorkommen von Auto-Antikörpern mag das Vorhandensein von sonst verborgenen ‚kryptischen‘ Antigenen sein. Hierfür macht man einerseits eine gestörte und unterdrückte zelluläre Apoptose und andererseits eine verminderte Clearance des vermehrt vorkommenden apoptotischen Materials verantwortlich.

Einleitung

Zahlreiche unterschiedliche Mechanismen wie beispielsweise eine abnorme T-Zell-Rezeptor-Funktion, eine defekte Expression des Fas-Liganden und eine damit einhergehende Beeinträchtigung der Fas-Rezeptor-Bindung sowie eine Überexpression des bcl-2 Onkogens führte in Mausmodellen zu einem Auftreten von SLE ähnlichen autoimmunen Krankheitsbildern [35, 36].

Diese gestörte Apoptose führt zum Einen zur Persistenz autoreaktiver T-Zellen und andererseits zum vermehrten Vorhandensein strukturell abnormer immunkompetenter Nukleosomen [37].

Die im Blut zirkulierenden autoreaktiven T-Helferzellen werden durch diese abnorme Expression der Kernantigene wiederum aktiviert und tragen ihrerseits durch die Produktion von unter anderem IL-10 zu der Aktivierung autoreaktiver B-Lymphozyten bei [38].

Wie bereits erwähnt spielt vermutlich auch eine verminderte Clearance eine Rolle in der Pathogenese der LN. Hierfür ist eine verminderte Phagozytose verantwortlich. Für diesen Vorgang ist das Komplement von entscheidender Bedeutung. In einigen Studien stellte sich diese Annahme unterstützend heraus, dass insbesondere der klassische Aktivierungsweg für den Lupus bedeutend zu sein scheint. So birgt auch ein genetisches Defizit von Komplementfaktoren dieses Pfades ein stark erhöhtes Risiko an SLE zu erkranken. Die stärkste Assoziation wird hierbei mit einem C1q-Defizit gesehen [39, 40].

Drei mögliche Hypothesen, wie es zu der Ablagerung von Autoantikörpern kommt, sind: Erstens, dass die beschriebenen Autoantikörper als bereits formierte Antigen-Antikörper-Komplexe oder zweitens durch Kreuzreaktivität an glomeruläre Strukturen wie das α -Aktinin und Laminin binden. Eine dritte Möglichkeit könnte das Binden der positiv geladenen Histone an das negativ geladene Heparansulfat (HS) der glomerulären Basalmembran sein [41-46].

In den unterschiedlichen histologischen Klassen der LN kommt es zu Ablagerungen der Immunkomplex an verschiedenen Seiten der Basalmembran mit daraus folgenden geringfügigen Unterschieden der nachfolgenden Läsionen [47, 48].

Bei der LN der Klasse V neigen die Antikörper als kleine kationische Komplexe eher zu einer Ablagerung in den subepithelialen Raum, wo sie durch das Vermitteln eines lytischen Membran-attackierenden-Komplexes die Podozyten angreifen und es zu einer Unterbrechung der Integrität der Basalmembran und in der Folge hieraus zu einer Proteinurie kommt.

Einleitung

Bei der LN der Klasse IV kommt es eher zu einer Ablagerung großer Immunkomplexe, die vorzugsweise subendothelial zu finden sind. Diese Immunkomplexe haben zumeist direkten Kontakt sowohl zu den intrinsischen Zellen als auch durch endotheliale Poren zu humoralen und zellulären Bestandteilen des Immunsystems im zirkulierenden Blut.

Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung des Komplementsystems an den Immunkomplexen. Patrouillierende Leukozyten werden so mit ihren Fc-Rezeptoren sowie Rezeptoren wie für den Komplementfaktor C3b angelockt und aktiviert [49, 50].

Haben die Immunkomplexe einmal durch das Binden von Komplementfaktoren deren Kaskade angeworfen, kommt es in der Folge zu Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen, zur Migration von Makrophagen sowie zur Stimulation intrinsischer glomerulärer Zellen zu proliferieren. Am Ende der Komplementkaskade steht die Formierung der terminalen Komplementkomponente C5b-C9 sowie des Membran-attackierenden-Komplexes, welche scheinbar direkten schädigenden Einfluss auf das Endothel sowie die Basalmembran haben [51].

Neben dem Geschehen im Nierenparenchym selbst kommt es in den Gefäßen durch eine Schädigung des Endothels zur Aktivierung von Thrombozyten und angrenzenden glomerulären Zellen. Zusätzlich scheinen dort auch noch penetrierte Antikörper Einfluss auf lokale Immunmodulatoren wie z.B. Bradykinin, Interleukine, endotheliale und homöostatische Faktoren zu nehmen. Dies resultiert gemeinsam in die Bildung von Mikrothromben und eine lokale Induktion des Connective Tissue Growth Factors (CTGF), wodurch es in der Folge zu einer Reduktion der glomerulären Filtration kommt [52-54].

Zusammengenommen führt dies zu Veränderungen in den Gefäßen der Nieren und in Folge dessen zu mikrovaskulären Zylindern und thrombotischen Mikroangiopathien.

Amplifikationsphase

Die eingewanderten Leukozyten (hauptsächlich T-Zellen und Makrophagen) proliferieren und tragen ihrerseits durch die Produktion proinflammatorischer und profibrotischer Zytokine sowie durch Chemokine und Wachstumsfaktoren (FGF, TGF β , TNF α , PDGF) zu einer Fortführung der Entzündungsreaktion bei. Sie sezernieren extrazelluläre Matrixkomponenten und sondern Sauerstoffradikale sowie zelltoxische Moleküle wie beispielsweise TNF α und IFN γ ab [55-57].

Durch die Schädigung des Gewebes wird die Entzündungsreaktion wiederum durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus selbst aufrecht erhalten und die primäre Schädigung wird um ein Vielfaches verstärkt.

Einleitung

Es wird vermutet, dass diese primäre Glomerulopathie durch das Vorschreiten der Entzündungsreaktion zu einer sekundären Beteiligung des Interstitiums führt. Ein möglicher Grund hierfür mag durch Verletzung der Bowmann'schen Kapsel fehlgeleitetes Ultrafiltrat sein [58]. Die eingewanderten Leukozyten verursachen in der Folge eine ausgeprägte Fibroblastenproliferation und gesteigerte Matrixproduktion [59].

Progressions- und Terminalphase

Wird dieser Entzündungsprozess aufrechterhalten, kommt es in der Folge zu einer chronisch progredienten Gewebeschädigung. Neben dem Untergang intrinsischer Zellen kommt es durch fortbestehende Matrixproduktion zu einer Erweiterung des interstitiellen Raumes. Übersteigt dies eine kritische Grenze kommt es zu einer Gewebeischämie und zu einer daraus folgenden weiteren Gewebeschädigung [60]. Katabole Enzyme tragen ihrerseits zu einer entstehenden Fibrosierung der Nieren bei. Im Endstadium der Erkrankung kommt es zu einer Glomerulosklerose und zum Verlust der Organfunktion.

Einleitung

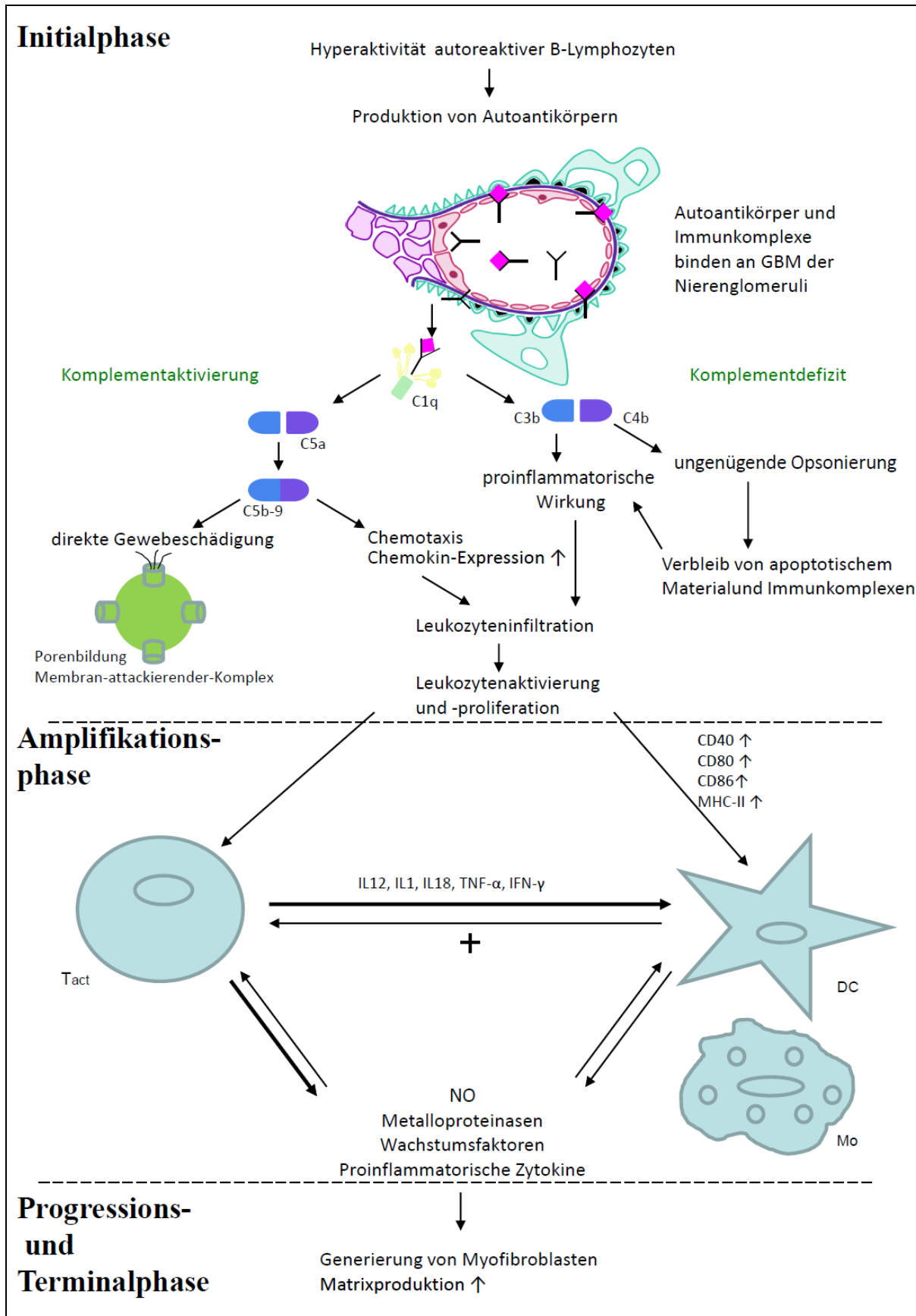


Abbildung 1: schematische Darstellung der Pathogenese der Lupus-Nephritis
 NO: Stickstoffmonoxid; T_{act}: aktivierte T-Zellen; DC: dendritische Zellen; Mo: Monozyten
 Die Graphik wurde mit Hilfe des Softwareprogrammes GIMP sowie Powerpoint erstellt.

1.2.2 Rolle der T-Zellen bei der Lupus-Nephritis

Ein charakteristisches Erscheinungsbild insbesondere der LN Klasse IV ist die Präsenz von T-Zellen und Makrophagen in sowohl dem glomerulären als auch dem interstitiellen Kompartiment der Nieren.

T-Zellen scheinen dabei besonders entscheidend in der Entwicklung einer Glomerulonephritis zu sein. Sie initiieren, führen und modifizieren die adaptive Immunantwort. So konnte Heymann et al. und auch C. Kurts in Studien zeigen, dass das Transfundieren von antigenspezifischen T-Zellen in zuvor gesunde Mäuse ausreicht Krankheit zu verursachen und zur Entstehung von Nierenentzündung und glomerulärem Schaden führt [57, 61].

Da auch in Gesunden bis zu 10 % niedrigaffine Selbstantigen erkennende T-Zellen nachgewiesen werden können, leitet dies zu der Frage, wie es im Rahmen des SLE zu einer Aktivierung dieser Zellen kommt, wie sie im gesunden Individuum nicht geschieht [62].

Eine Theorie beinhaltet, dass die Aktivierungsschwelle der T-Zellen erniedrigt ist. Oder eine intrinsische Hyperreaktivität dieser Zellen vorliegt [63].

Vieles spricht dafür, dass eine Infektion Einflussfaktor für das Durchbrechen der Selbsttoleranz sein könnte. Mikrobielle Peptidantigene können Anteile enthalten, welche Abschnitte von körpereigenen Antigenen gleichen. Da in diesem Fall die gegen Infektionsantigene gerichteten T-Lymphozyten auch Autoantigene erkennen können (wenn auch mit geringer Affinität), kann es parallel zu einer Reaktion gegen diese Autoantigene kommen. Ein Teil der bei der Immunreaktion gegen den Infektionserreger aktivierten Lymphozyten wandelt sich in Gedächtniszellen um. T-Gedächtniszellen besitzen als wichtige Eigenschaft eine deutlich verminderte Aktivierungsschwelle. Auch sind diese nicht auf kostimulatorische Signale angewiesen. Da aktivierte Gedächtniszellen selbst ein Milieu schaffen, das die Entstehung weiterer Gedächtniszellen begünstigt, kommt die Autoimmunreaktion nicht mehr zum Stillstand und erhält sich somit selbst aufrecht.

Einige tierexperimentelle Befunde legen nahe, dass eine Autoimmunerkrankung dann ausbricht, wenn in dem betroffenen Organ eine kritische Anzahl autoreaktiver (Gedächtnis-) T-Lymphozyten überschritten wird [64].

Einleitung

Aber auch eine Fehlregulation ausgeschütteter Zytokine und anderer kostimulatorischer Signale wie CD40, CD80 und CD86 scheinen Einfluss auf eine abnorme Aktivierung autoreaktiver Lymphozyten zu nehmen [65, 66].

Verhindert man das Einwandern von Leukozyten in die Niere durch Blockierung von Chemokinrezeptoren und anderen chemotaktisch wirksamen Stoffen, so schützt dies die Niere vor Schädigung. Dies unterstützt beispielsweise die Beobachtung, dass Mäuse, welche ein genetisches Defizit des MCP-1 aufweisen, eine verminderte Proteinurie sowie ein verlängertes Überleben aufweisen [67].

T-Zellen spielen nicht nur eine entscheidende Rolle als Helfer der Aktivierung und der Aufrechterhaltung von autoreaktiven B-Zellen sondern auch als Zellen, welche effektiv zur Vermittlung von Gewebeschäden beitragen [68].

Diese Annahme unterstützt eine Studie, in der die T-Zell-Aktivierung durch die Gabe des Blockers CTLA4Ig und einer zusätzlichen Cyclophosphamidgabe (welche ebenfalls Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung zu haben scheint) verhindert wurde. Hierbei kam es trotz weiterem Vorhandensein von Immunkomplexen und unbeeinträchtigter a-dsDNS-spezifischer B-Zellen zu einer deutlich verzögerten Mortalität der behandelten Mäuse. In einer weiteren Studie zeigte sich hierdurch eine reduzierte glomeruläre Inflammation sowie eine Abnahme der schweren Proteinurie [69, 70].

Eine stärkere Proliferation von CD4⁺T-Zellen zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung hat eine Long-Term Effekt auf das Verbleiben der pathogenen T-Zellen in der Niere und damit auf einen schwereren Krankheitsverlauf [71].

In immunhistologischen Untersuchungen von Nierenbiopsien konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass die Anzahl der CD4⁺T-Zellen gegenüber den anderen Zellgruppen überwiegt [72-75].

Die Anzahl infiltrierender Leukozyten insbesondere der T-Zellen im Interstitium der Nieren korreliert mit der Klinik und Prognose der Erkrankung und ist ein besserer und aussagekräftigerer Prädiktor für das Entstehen eines Nierenversagens als glomeruläre Veränderungen [48, 72, 76, 77].

1.3 Diagnostik einer Lupus-Nephritis

Um eine frühzeitige Therapie der LN zu gewährleisten und eine chronische Schädigung der Nieren zu verhindern, ist die schnelle Diagnosestellung von besonderer Bedeutung. Eine Herausforderung stellt hierbei dar, dass sich eine Nierenbeteiligung auch schleichend manifestieren kann.

In der Klinik verwandte Kriterien zur Diagnosestellung sind das Vorkommen von Proteinurie, Hämaturie, Pyurie und Harnzylindern sowie ein positiver Nierenbiopsiefund. Zusätzlich werden allgemeine Lupus-Aktivitätszeichen wie erhöhte a-dsDNS-AK Titer sowie eine Verminderung der Komplementfaktoren hinzugezogen. Es hat sich gezeigt, dass insbesondere anti-C1q-AK, anti-Nukleosomen-AK und anti- α -Aktinin-AK mit dem Vorkommen einer Nierenbeteiligung assoziiert sind.

Die Urinanalyse ist somit zentraler Bestandteil der nicht-invasiven Diagnostik, doch mitunter ist es schwierig an Hand dieser Befunde eine chronische Schädigung von einer akuten Entzündung abzugrenzen.

Derzeit existieren verschiedene Methoden, um eine Proteinurie festzustellen: die Untersuchung mittels eines Urinteststreifens, die Bestimmung des Protein/Kreatinin-Quotienten sowie der bisherige Goldstandard, die Untersuchung des 24-h-Sammelurins. Die Veröffentlichung von Abebe J. et al. zeigt, dass Urinteststreifen bezüglich des Anzeigens einer Proteinurie lediglich eine Sensitivität und Spezifität von 81 % und 47 % aufweisen [78]. Ähnliche Angaben bestätigen weitere Veröffentlichungen [79]. Bei der 24-h-Sammlung des Urins kommt es mitunter zu Schwankungen bei wiederholten Testungen, die nicht zuletzt auf Sammelfehlern und Unterschiede in physischer Aktivität zurückzuführen sind. Um diese Schwankungen zu nivellieren, wird empfohlen den Mittelwert dreier Messungen heranzuziehen, doch diese Methode ist bereits bei einfacher Durchführung sehr aufwendig.

Auch der Nachweis einer Leukozyturie mittels eines Teststreifens ist nur eingeschränkt aussagekräftig. Der Teststreifen zeigt die Anwesenheit der Indoxyl-Esterase aus lysierten Granulozyten und Makrophagen an. Leukozyten platzen besonders schnell in alkalischem Urin sowie in Urin geringer Dichte. Hingegen wird die Lyse bei hoher Dichte verhindert. In der Literatur wird eine Sensitivität und Spezifität von 75-83 % und 66-70 % angegeben [80, 81].

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Urinanalyse ist die Urinmikroskopie. Bei dieser Methode ist es besonders wichtig, dass es zu einer schnellen Untersuchung der Proben kommt, da Bakterienwachstum mögliche Befunde überdecken kann. Ein Einfrieren der Proben ist nicht möglich, da ausgefällte Kristalle eine spätere Untersuchung unmöglich machen. Die akurate

Einleitung

Beurteilung des Sediments erfordert Sorgfalt, ein schnelles Vorgehen sowie gute Qualitätskontrollen und persönliche Erfahrung des Untersuchenden.

Die Nierenbiopsie liefert als Goldstandard einen genaueren Einblick in das aktuelle Geschehen in den Nieren.

Eine renale Biopsie bei Lupus Patienten ist weltweit als indiziert anerkannt, wenn Patienten Auffälligkeiten in den Urinuntersuchungen aufweisen oder eine verminderte renale Funktion vorliegt. Die Biopsie ist bisher die einzige Möglichkeit den aktuellen Status der Inflammation zu erfassen und aus dem histologischen Bild Schlüsse über die Prognose an Hand des Chronizitätsindexes zu ziehen.

An Hand des histologischen Bildes ist es allgemein üblich die Lupus Nephritis in Gruppen der 2003 entwickelten Klassifikation der International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN-RPS) einzuteilen. Dies ist für die Entscheidungsfindung einer geeigneten und an die Erkrankung angepassten Therapie von entscheidender Bedeutung.

Tabelle 2: Klassifikation der Lupus-Nephritis, ISN/RPS 2003

Klasse		Glomeruläre Läsionen
Klasse I	minimale mesangiale LN	normale Glomeruli in der Lichtmikroskopie, aber mit mesangialen Immunablagerungen in der Immunfluoreszenz
Klasse II	mesangiale proliferative LN	nur mesangiale Hyperzellularität oder mesangiale Matrixexpansion in der Lichtmikroskopie mit mesangialen Immunablagerungen
Klasse III	fokale LN	aktive oder inaktive, (segmental oder globale) endo- oder extrakapilläre GN, < 50 % aller Glomeruli betreffend, typischerweise mit subendothelialen Immunablagerungen
Klasse IV	diffus proliferative LN	aktive oder inaktive diffuse, (segmental oder globale) endo- oder extrakapilläre GN, > 50 % der Glomeruli involviert, mit diffusen subendothelialen Immunkomplexablagerungen
Klasse V	membranöse LN	globale oder segmentale subepitheliale Immunablagerungen, weist eine fortgeschrittene Sklerose auf
Klasse VI	fortgeschrittene sklerosierende LN	> 90 % der Glomeruli sind global sklerosiert

Einleitung

Durch das Vergleichen serieller Biopsien konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf der Erkrankung zu einem Wechsel der Klassen kommen kann [82].

In Anbetracht der Tatsache, dass das histologische Bild einer Nierenentzündung sich nicht ausschließlich homogen darstellt, sondern sich zumeist inselhafte Ansammlungen finden lassen, ist es fraglich, ob durch das blinde Entnehmen einer Biopsie eine repräsentative Anzahl an Glomeruli in der Mehrzahl der Eingriffe entnommen wird und in wie fern diese eine Aktivität und Chronizität der Nierenbeteiligung widerspiegeln [83].

In einigen Studien wurde gezeigt, dass serielle Biopsieentnahmen eine bessere Aussagekraft besitzen als die initiale Biopsie [82, 84]. Da es allerdings im Rahmen einer solchen Probenentnahme zu Nebenwirkungen und Komplikationen kommen kann und es sich um ein invasives Geschehen handelt, ist ein mehrmaliges Wiederholen dieses Eingriffes in der klinischen Praxis nicht umsetzbar.

Um eine Nierenbeteiligung schnell zu erkennen, diese unter Therapie monitoren zu können und so einen Rückfall sowie ein suffizientes Ansprechen auf die Therapie einschätzen zu können, ist es von größter Bedeutung klinische Marker für einer Nierenentzündung zu entwickeln.

1.3.1 Biomarker in der Forschung

1.3.1.1 MCP-1

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) ist ein auf Leukozyten chemotaktisch wirksamer Faktor, welcher im Rahmen der Induzierung von Entzündung und Schäden der Nieren eine Rolle spielt [85]. In SLE Mausmodellen führte ein genetisches Ausschalten oder eine Blockade des Rezeptors für MCP-1 zu einer vergleichsweise verminderten glomerulären und interstitiellen Entzündung und daraus folgend zu geringerem Nierenschaden [67, 86]. Auch in humanen Nierenbiopsien konnte eine erhöhte Expression von MCP-1 gezeigt werden [87].

Zwei Publikationen konnten zeigen, dass MCP-1 in Urin von SLE Patienten erhöht nachweisbar ist und mit der Stärke der Proteinurie sowie der Schwere der glomerulären Läsionen korreliert [88-90]. Chan et al. untersuchte die MCP-1 mRNA Expression im Urin von Lupus Patienten. Auch er konnte mit Hilfe seiner Ergebnisse eine Korrelation der MCP-1 mRNA-Expression mit der Krankheitsaktivität sowie mit dsDNS-AK Titern darlegen.

Eine Untersuchung dieses Markers in einer longitudinalen Studie sowie an größeren Patientenpopulationen steht bisher noch aus.

1.3.1.2 NGAL

Lipocalin-2 ist ein glykosyliertes Protein geringer Größe, welches in vielen Organen und Geweben produziert wird. NGAL (neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) wird konstitutiv gering in der Niere exprimiert. Kommt es allerdings zu Gewebeschäden wie z.B. durch Inflammation im Rahmen eines Lupus Schubes wird Lipocalin-2 hochreguliert. Allerdings kommt es auch bei anderen pathologischen Ereignissen wie Ischämie und Infektion zu erhöht messbaren Werten [91-93]. Bolognino et al. zeigte, dass sowohl Serum als auch Urin NGAL-Werte besser mit einer verminderten glomerulären Filtrationsrate korrelieren als Serum Kreatinin-Werte [94, 95]. Auch longitudinale Studien konnten signifikant höhere Werte in SLE Patienten mit Nierenbeteiligung messen als in Gesunden und Patienten mit anderen rheumatologischen Erkrankungen wie der juvenilen idiopathischen Arthritis [96-98].

1.3.1.3 TWEAK

TWEAK (tumor necrosis Factor-Like Inducer of Apoptosis) ist ein multifunktionales Zytokin, welches zu der TNF-Liganden Superfamilie gehört. Während TWEAK in gesunden Geweben kaum vorkommt, ist es bei Inflammation und Gewebeschaden erhöht exprimiert [99].

Es gibt Hinweise darauf, dass eine erhöhte TWEAK Expression auf aktivierten T-Zellen in LN die Apoptose von Makrophagen und Monozyten induziert, welches zu der Initiierung eines SLE durch gesteigerte Apoptose beitragen mag [100].

Zwei Studien zeigten, dass TWEAK Werte im Urin (uTWEAK) bei Patienten mit akuter LN signifikant höher waren als bei Patienten ohne eine Nephritis. uTWEAK Werte korrelierten dabei mit der Krankheitsaktivität [101]. 13 Patienten wurden im Laufe eines Schubes gemessen, wodurch sich ein Anstieg des Markers vor bzw. während des Schubes und ein Abfall der Werte nach Remission erkennen ließen.

Es fiel allerdings auf, dass die uTWEAK Werte sich in den gesamten Kontrollgruppen nicht merklich voneinander unterschieden und sich einige Werte von SLE Patienten mit Nierenbeteiligung mit denen der Kontrollgruppe überschneiden, so dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass dieser Marker spezifisch für eine Nierenbeteiligung ist.

uTWEAK Werte zeigten keine Hinweise auf die histologischen Klassen einer LN.

1.3.1.4 Im Urin nachweisbare Proteine (urine proteomics)

Suzuki et al. untersuchte in einer ersten Studie acht verschiedene Peptid/Protein Moleküle. Vier von diesen waren Albumin oder fragmentierte Teile des Albumins. Die vier Weiteren setzten sich aus Transferrin (TF), α 1-acid-glycoprotein (AGP), Caeruloplasmin (CP) und Lipocalin-Type Prostaglandin D-Synthetase (L-PGDS) zusammen. Auch er konnte in einer Population von 32 SLE Patienten signifikant höhere Werte als in den Vergleichsgruppen nachweisen [102]. Zwei darauf folgende Studien ließen ähnliche Ergebnisse erkennen [103, 104].

Im Rahmen dieser Studien wurde gezeigt, dass diese Proteine besser mit der Krankheitsaktivität korrelieren als im Serum gemessene Kreatinin-Werte oder eine Komplementverminderung. Transferrin schien hierbei besser als L-PGDS und AGP eine Verschlechterung der Nierenbeteiligung anzuzeigen. Der Vorhersagewert dieser Proteine bezüglich der Anzeige eines Schubes wurde nicht untersucht.

Hepcidin ist ein kleines Peptidhormon, welches hauptsächlich in der Leber produziert wird. Hepcidin scheint in der Pathogenese der Anämie sowie im Rahmen chronischer Erkrankungen wie beispielsweise chronischer Nierenerkrankungen eine Rolle zu spielen [105]. In einer prospektiven Studie von Zhang et al. konnte gezeigt werden, dass 19 von 25 SLE Patienten, welche einen erneuten Rückfall ihrer Erkrankung erfuhren, 4 Monate zuvor höhere Werte von Hepcidin-20 aufwiesen. Diese Werte fielen in Remission wieder ab [106].

1.3.1.5 Im Urin nachweisbare T-Zellen

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, die 2009 veröffentlicht wurden, zeigte eine Untersuchung von 38 Patienten mit SLE, dass CD4+T-Zellen im Urin von Patienten mit akuter Nephritis erhöht nachweisbar waren im Vergleich zu Patienten ohne renale Aktivität. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Anzahl dieser Zellen mit der Krankheitsaktivität gemessen an Hand des SLEDAI korreliert. Die gemessenen CD4+T-Zellen zeigten zu 50 % eine Expression des Oberflächenmoleküls CXCR3 verglichen zu einer Oberflächenexpression von nur 22 % auf peripheren Blutzellen. Hierdurch wird die Annahme unterstützt, dass infiltrierende T-Zellen mit Hilfe von Chemokinen in die entzündeten Nieren gelangen und im Rahmen eines Schubes die Entzündung im Urin widerspiegeln [73]. Dolff et al. unterstützt diese These mit der im Mai 2010 veröffentlichten Studie. Von 35 der insgesamt 43 eingeschlossenen SLE Patienten wurde der Urin hinsichtlich der vorkommenden Zellzahl untersucht. Neben der im Vordergrund stehenden erhöhte CD8+T-Zellzahlen konnte ein vermehrtes Vorkommen von CD4+T-Zellen im Urin von Patienten mit akuter LN [107] gezeigt werden.

Tabelle 3: weitere Biomarker in der SLE-Forschung

untersuchter Biomarker	Hauptaussage	Referenz
FOXP3	erhöhte Expression bei aktiver LN als bei inaktiver Vergleichsgruppe, korreliert mit Proteinurie	[108]
Urine endotheline-1	erhöht bei Patienten mit LN im Vergleich zu anderen chronisch entzündlichen Nierenerkrankungen	[109]
IL-12 (in Serum und Urin)	höhere Werte bei SLE Patienten mit einer Nierenbeteiligung als bei Patienten ohne eine Beteiligung der Nieren	[110]
VCAM-1, P-Selektin, TNFR-1 und CXCL16	korrelieren mit Proteinurie und Krankheitsaktivität, erhöht bei Patienten mit Nierenbeteiligung	[111, 112]
TGFβ-1	bei aktiver LN erhöht, korreliert mit a-dsDNS-AK und C3-Werten	[113]
IL-6, IL-10	keine gute Korrelation	[114]
CXCL10	am höchsten in der Klasse IV der LN, nicht nachweisbar in gesunder Vergleichsgruppe	[113]

1.4 Chemokine

Chemokine werden zur Familie der Zytokine gezählt. Sie sind kleine Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 8 und 11 kDa. Bislang sind mehr als 50 Chemokine und fast 20 verschiedene Chemokinrezeptoren bekannt [115]. Ihre Hauptaufgabe besteht zu einem Großteil in der direkten Beeinflussung der Leukozytenmigration, in welcher sie mit Selektinen und Integrinen eng verwoben zusammen wirken. Daneben haben Chemokine auch Einfluss auf die Aktivierung von Leukozyten und modulieren die Angiogenese [116].

Chemokine werden von einer Vielzahl verschiedener Zellen gebildet. Hierzu zählen beispielsweise Makrophagen, T-Lymphozyten, Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen, wobei ihre Synthese durch viele verschiedene Faktoren ausgelöst werden kann.

Es ist eine bis zu 70 %-ige Homologie der Aminosäuresequenz in dem Aufbau der Chemokine bekannt. Typischerweise besitzen sie vier charakteristische Cysteinreste, welche intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden und damit für das Entstehen ihrer spezifischen Tertiärstruktur verantwortlich sind [117]. An Hand dieser Cysteinreste lassen sich die Chemokine in vier Gruppen einteilen, wobei das ‚X‘ jeweils für eine variable Aminosäure steht: die C-, die CC-, die CXC- und die CX₃C-Subfamilien [118].

In Abhängigkeit ihrer Funktion können Chemokine in zwei Gruppen eingeteilt werden, die homeostatisch und die inflammatorisch wirksamen Chemokine.

Homeostatische Chemokine werden konstitutiv produziert. Sie organisieren und dirigieren die physiologische Rezirkulation von Lymphozyten, was u.a. eine Rolle bei der zellulären Zusammensetzung und Organisation in den sekundären lymphatischen Organen eine Rolle spielt („housekeeping“-Funktion) [119].

Inflammatorische Chemokine bzw. ihre Rezeptoren sind maßgeblich an der Ausbildung entzündlicher Reaktionen beteiligt. Sie haben nicht nur eine chemotaktische Wirkung, sondern auch eine starke Fähigkeit Zellen zu aktivieren. Zu ihnen werden vor allem die Chemokinerezeptoren CXCR1-3, CCR1-6 sowie CX3CR1 gezählt.

1.4.1 Chemokinrezeptoren

Die Wirkung der Chemokine wird über Rezeptoren vermittelt. Die Familie der Chemokinrezeptoren gehört der Untergruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren an. Sie verfügen über sieben Transmembrandomänen (α -Helices), einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus [120, 121].

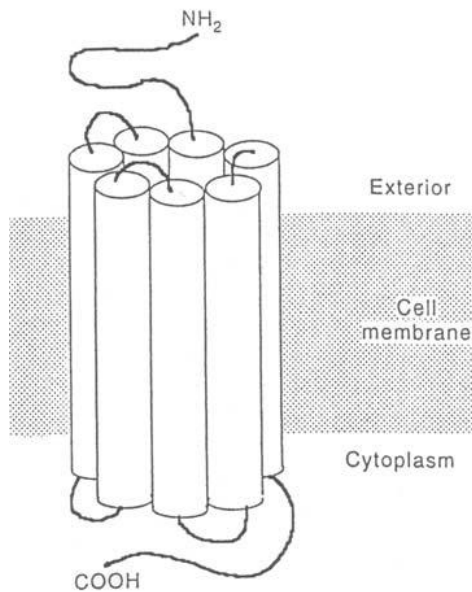


Abbildung 2: typische Struktur eines Chemokinrezeptors

Quelle: Mahalingam S, (1999) Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases

Chemokinrezeptoren werden fast ausschließlich auf Leukozyten exprimiert. Zu einem kleineren Teil finden sie sich jedoch auch auf anderen Zellgruppen wie beispielsweise den Mesangialzellen der Nieren [122].

Zellsubpopulationen zeigen spezifische Expressionsmuster hinsichtlich der Chemokinrezeptoren. Auch passt sich die Expression auf Lymphozyten deren funktionellem Zustand an und ist damit für deren Reife, Differenzierung, Aktivität und Lokalität spezifisch [115].

Bezüglich der Ligandenspezifität zeigen die proinflammatorischen Chemokinrezeptoren eine breitere Redundanz als homeostatische Chemokinrezeptoren [123].

Die vor allem an der zellulären Immunreaktion beteiligten Th1-Zellen exprimieren vermehrt CCR1, CXCR3 und CCR5. Th2-Zellen hingegen tragen vermehrt CCR4 und CCR8 auf ihrer Oberfläche [124].

Da Chemokine für die Migration und Chemotaxis von Leukozyten eine solch große Rolle spielen, sind diese besonders im Rahmen von entzündlichen Geschehen von immens großer Bedeutung. So nehmen Chemokine im Zuge einer LN Einfluss auf die Entstehung und das Bestehen der Entzündung und in Folge dessen auf Fibrose und die Entwicklung eines chronischen Nierenversagens [125]. Auf Grund dieses Wissens wurden zunächst Mausmodelle und darauffolgend menschliche Nierengewebe auf eine abnorme Chemokinexpression hin untersucht. Die Pathogenese der LN unterstützend fanden sich vornehmlich inflammatorische Chemokine wie CCR1, CCR2 und CCR5 erhöht exprimiert vor [126-128].

Einleitung

Tabelle 4: Für diese Arbeit relevante Chemokinrezeptoren und ihre Liganden

Chemokin-rezeptor	Systematische Bezeichnungen der Liganden	Alte Bezeichnungen der Liganden	Expressionsprofil des Rezeptors
CCR1	CCL2,-3,-4,-5,-7,-23,-14	RANTES, MIP-1 α , MCP-3, MPIF-1, HCC1, MCP-1, MIP1 β	Mo, akt T-Zellen, Neutros, Eos
CCR5	CCL3,-4,-5,-8	RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-2	Mo, akt T-Zellen, DZ

Mo=Monozyten, akt T= aktivierte T-Zellen, DZ= Dendritische Zellen, Neutros=Neutrophile Granulozyten, Eos=Eosinophile Granulozyten

1.4.1.1 CCR1

CCR1, früher als CD191 bezeichnet, bindet vor allem an CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 α , CCL7/ MCP-3, CCL23/ MPIF-1 und CCL14/HCC1 und weniger stark an CCL2/MCP-1 und CCL4/MIP1 β . CCR1 wird zumeist auf Leukozyten, zu einem kleineren Teil aber auch auf anderen Zellen exprimiert. Auf Monozyten, T-Lymphozyten (v.a. CD45RO+ Gedächtniszellen), Neutrophilen und Eosinophilen vermittelt er die Infiltration in Entzündungsgebiete.

Eine Relevanz des CCR1 bei Entzündungsreaktionen ist *in vivo* hinsichtlich verschiedener Aspekte und bei unterschiedlichen Erkrankungen untersucht worden. Beispiele hierfür stellen chronische Nierenerkrankungen wie die obstruktive Nephropathie sowie die Nierentransplantatabstoßung dar [129, 130].

Im Rahmen der LN konnte gezeigt werden, dass ein Blockieren des CCR1 durch den Antagonisten BX471 eine signifikante Verbesserung hinsichtlich interstitieller entzündlicher Infiltrate erzielte. In der Folge kam es dadurch zu vermindertem tubulärem Schaden und interstitieller Fibrose. Die interstitiellen Läsionen konnten hierdurch von 51 % auf 22 % reduziert werden. Glomeruläre Läsionen und Proteinurie wurden allerdings nicht beeinflusst [131].

Anders et al. konnte dies unterstützend nachweisen, dass auch eine spät einsetzende Therapie mit dem CCR1 Antagonist BX471 noch das Krankheitsfortschreiten aufhalten kann, indem vor allem im Interstitium die Anzahl der CCR1 exprimierender Leukozyten (allen voran die T-Zellen) abnahm [132].

Furuichi et al. konnte in Biopsien von 12 Patienten mit LN eine erhöhte Anzahl an CCR1-Expression auf T-Zellen aufdecken. Die Anzahl korrelierte mit der Stärke der interstitiellen Fibrose und der tubulären Atrophie [126].

1.4.1.2 CCR5

CCR5, früher als CD195 bezeichnet, wird auf Makrophagen, aktivierten T-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert. Neben dem wichtigen Chemokin RANTES binden an CCR5 MIP-1 α , MIP-1 β und MCP-2.

Sowohl Stasikowska et al. als auch Furuichi et al. konnten in Nierenbiopsien von an SLE erkrankten Patienten immunhistochemisch eine erhöhte Expression von CCR5 nachweisen. Dieses erhöhte Vorkommen auf zumeist CD3+T-Zellen vor allem im Interstitium der Nierenproben zeigte sich in keinem der gesunden Probanden. Interessanterweise korrelierte diese erhöhte Expression mit den Serumkreatininwerten und den interstitiellen Läsionen der Patienten [126, 133].

Vielhauer et al. konnte mittels Durchflusszytometrie im murinen Lupusmodell in den Nieren jedoch nicht im peripheren Blut eine erhöhte Anzahl CCR5+T-Zellen nachweisen [134].

Mamtani et al. untersuchte, ob ein bestimmter Phänotyp für CCR5 mit einem erhöhten Risiko verbunden ist, an SLE zu erkranken. Der Autor schloss aus dem erhöhten Vorkommen des Haplotyps HHE und HHG*2 in der Gruppe der Erkrankten, dass dieser Phänotyp das Risiko negativ zu beeinflussen scheint [135].

In der Veröffentlichung von Turner et al. wurden CCR5 knockout Mäuse untersucht. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass CCR5 defiziente Mäuse eine Verschlechterung der GN entwickelten und eine erhöhte Letalität aufwiesen. Interessanter Weise fanden sich erhöhte Werte der CCR5 Liganden. Ausgehend von dem Wissen, dass spezifische Chemokine zumeist an eine große Bandbreite von Chemokinrezeptoren binden, ist bekannt, dass die CCR5 Liganden auch an CCR1 binden. Der Autor schloss aus dieser Beobachtung eine CCR1 vermittelte vermehrte Rekrutierung der Leukozyten. Unterstützt wurde diese Annahme durch die Beobachtung, dass in der Folge einer zusätzlichen CCR1 Blockade mit BX471 kaum eine T-Zell-Rekrutierung nachgewiesen werden konnte. Auch Topham et al. hatte zuvor in Mäusen, welche ein alleiniges Defizit an CCR1 aufwiesen, entgegen der zuvor gehegten Erwartungen eine vermehrte Anzahl an rekrutierten Leukozyten nachgewiesen [136, 137].

Bedeutend ist die Funktion von CCR5 als wichtiger Korezeptor neben CD4 für den Eintritt des HI-Virus in die Zellen [138].

1.5 Oberflächenmarker

Als Cluster of Differentiation (CD) werden Oberflächenmoleküle zusammengefasst, welche ein weites Spektrum an Funktionen abdecken. Es handelt sich hierbei zumeist um membrangebundene Glykoproteine. In der experimentellen Praxis werden monoklonale AK an diese Strukturen gebunden, um Zellsubpopulationen sowie den Funktionszustand der untersuchten Zelle zu analysieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Oberflächenmarker CD69 und CD45RO zur weiteren Spezifizierung der gemessenen CD3+CD4+T-Zellen herangezogen.

1.5.1 CD45

Bei dem CD45-Molekül handelt es sich um ein 180-220 kD großes Glykoprotein, welches unterschiedliche Isoformen auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert. Es wird herangezogen als phänotypischer Marker für bestimmte Subpopulationen der T-Zellen. CD45RA kommt hierbei vor allem auf naiven T-Zellen vor, wohingegen CD45RO nach Antigenexpression und Aktivierung typischerweise auf Memory/Effektor-T-Zellen zu finden ist. CD45 beteiligt sich an der Bildung des signaltransduzierenden Komplexes im Bereich der immunologischen Synapse und trägt so zu der Aktivierung der T-Zellen bei. So können T-Zellen, welche kein CD45-Molekül tragen nicht über ihren TCR aktiviert werden. Es wird vermutet, dass die Anzahl an CD45-Moleküle, die sich mit dem T-Zellrezeptor/CD3/CD2 und CD4 bzw. CD8-Komplex verbinden, das Ausmaß der T-Zell-Aktivierung bestimmt [139, 140].

Neben diesen Aufgaben spielt CD45 auch eine Rolle in der Signaltransduktion des Fc-Rezeptors auf Mastzellen sowie der TLR auf dendritischen Zellen. Zusätzlich zu diesen bereits erwähnten Aufgaben scheint CD45 auch Einfluss auf die Adhäsion und Migration von Leukozyten zu nehmen [141].

1.5.2 CD69

CD69 ist ein Aktivierungsmarker, welcher sehr schnell in naiven T-Zellen induziert und damit in der Folge exprimiert wird. Bereits zwei bis vier Stunden nach Stimulation durch ihren Antigen-spezifischen TCR konnte in T-Zellen ein Transkriptionspeak des CD69-Moleküls beschrieben werden, der anschließend sehr schnell abfällt und innerhalb von 18 h wieder den basal Wert erreicht hat [142]. In der Arbeit von Ziegler et al. konnte diese Expression vor allem auf $\alpha\beta$ TCR tragenden T-Zellen gezeigt werden. Dies gilt sowohl für CD8+ als auch für CD4+T-Zellen [143].

1.6 Fragestellung

Auf Grund der Schwere der Erkrankung einer Nierenbeteiligung im Rahmen des Systemischen Lupus Erythematodes, den nebenwirkungs- und komplikationsreichen Therapieoptionen sowie der Tatsache, dass bisher die Nierenbiopsie als Goldstandard der Diagnosestellung gilt, ist das Forschen nach einem geeigneten Biomarker für diese Erkrankung ein sehr wichtiges und aktuelles Thema.

Die besondere Rolle der infiltrierenden T-Zellen für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Entzündung einer Lupus-Nephritis mit den Folgen einer Fibrose bis hin zum chronischen Nierenversagen ist eine anerkannte Hypothese.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob sich die These des Wiederfindens von CD3+CD4+T-Zellen im Urin erkrankter Patienten mit einer aktiven Lupus-Nephritis an einer größeren Kohorte verifizieren lässt.

Im Einzelnen wurden folgende Fragen gestellt:

- Sind bei im Schub befindlichen SLE Patienten mit einer Nierenbeteiligung CD3+CD4+T-Zellen im Urin nachweisbar?
- Sind erhöhte Urin-Zellzahlen in den Vergleichspopulationen nachweisbar?
- Wie verhält sich das Zellüberleben in Urin?
- Wird das Messen von T-Zellen in Urin beeinflusst durch den Urin pH-Wert sowie die Regelblutung einer Frau?
- Korreliert die CD3+CD4+T-Zellzahl mit der aktuellen Krankheitsaktivität der Patienten?
- Wie verhält sich die CD3+CD4+T-Zellzahl im Krankheitsverlauf?
- Handelt es sich bei den nachgewiesenen Zellen um aktivierte T-Zellen (CD69+)?
- Handelt es sich bei den nachgewiesenen T-Zellen um Memory-Effektor-Zellen (CD45RO+)?
- Unterscheidet sich sowohl der Aktivierungsgrad als auch der Prozentsatz an Memory-Effektorzellen von den im peripheren Blut messbaren CD3+CD4+T-Zellen?
- Weisen die nachgewiesenen T-Zellen eine erhöhte CCR1 und CCR5 Chemokinrezeptor-Expression auf?
- Unterscheidet sich die Chemokinrezeptor-Expression für CCR1 und CCR5 auf den im Urin nachgewiesenen T-Zellen von denen im peripheren Blut? Ist diese Chemokin-

Einleitung

Expression für die in die Niere einwandernden T-Zellen spezifisch und spiegelt diese so den pathophysiologischen Prozess der T-Zell-Rekrutierung wieder?

- Hat der Verbleib von Zellen in Urin Einfluss auf die Expression von Oberflächenmolekülen und Chemokinrezeptoren

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Software

– Ultrazentrifuge	Thermo Scientific
– Tischzentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific
– Mischgerät Vortex-Genie	Scientific Industries
– Kühlschrank +4°C	Liebherr
– Gefrierschrank -20°C	Bosch
– Pipetten	Eppendorf
– Pipettierhelfer accu-jet [®] pro	Brand
– Vakuumpumpe CVC 2000	Analıs
– Durchflusszytometer (FACS): FACSCalibur	Becton&Dickinson
– FACS-Software: Cell Quest [™] Pro Version 6.0	Becton&Dickinson
– FACS-Auswertesoftware: FlowJo Version 5.5.5	Tree Star, USA
– PAWS 18	SPSS Inc.
– Graph Pad Prism Version 5.0	GraphPad Software

2.1.2 Glas- und Plastikmaterial

– Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
– Plastikspitzen für Pipetten	Schubert/Pharmacia
– Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon
– Rundbodenröhrchen (5 ml)	Sarstedt
– Cell Strainer (Zellsieb) 70 µm Ø	Becton&Dickinson

2.1.3 Chemikalien und Puffer

PBS (phosphate buffered saline)

1000 ml H₂O bidest

8,0 g NaCl

Roth, Karlsruhe, Deutschland

0,2 g KCl

Roth, Karlsruhe, Deutschland

0,2 g KH₂PO₄

Roth, Karlsruhe, Deutschland

1,42 g Na₂HPO₄x2H₂O

Roth, Karlsruhe, Deutschland

pH auf 7,2 eingestellt, Lösung autoklaviert

PBS/BSA

500 ml PBS

2,5 g BSA

Sigma, München, Deutschland

Lösung steril filtriert (0,2 µm Ø)

Erylysepuffer

500 ml H₂O bidest.

0,5 g KHCO₃

Roth, Karlsruhe, Deutschland

4,15 g NH₄Cl

Roth, Karlsruhe, Deutschland

18,5 mg EDTA

Sigma, München, Deutschland

Lösung mit HCl einstellen auf pH 7,43

Lösung steril filtriert (0,2 µm Ø)

Multistix Urinteststreifen

Bayer Diagnostics, München

2.1.4 Antikörper und Beads

Beads

Flow Cytometry Absolute Count Standard™

Polysciences Europe

Propidium Jodid (PJ)

Sigma, München, Deutschland

Material und Methoden

Tabelle 5: verwendete Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Fluorochrom</u>	<u>Isotyp</u>	<u>Klon</u>	<u>Hersteller</u>
CD4	FITC	Maus IgG2b	OKT4	BioLegend
CD3	PE	Maus IgG2a	HIT3a	BioLegend
CD45RO	APC	Maus IgG2a	UCHL 1	BioLegend
CD69	APC	Maus IgG1	FN50	BioLegend
CCR1	Alexa Fluor® 647	Maus IgG2b	TG4/CCR1	BioLegend
CCR5	APC	Maus IgG1	CTC5	R&D Systems
IgG2a	Cy5	Maus IgG2a (Isotypenkontrolle)		DRFZ
IgG1	APC	Maus IgG1 (Isotypenkontrolle)		BD

2.2 Methoden

2.2.1 Patienten

In dem Zeitraum von Januar 2009 bis April 2010 wurden 67 Patienten mit Systemischem Lupus Erythematoses (SLE) in die Studie eingeschlossen. Die Patienten stellten sich entweder zur Verlaufskontrolle ihrer Erkrankung in der Rheumatologischen Ambulanz der Charité vor oder befanden sich in stationärer Behandlung der Rheumatologischen Abteilung (Station 127) der Charité Universität Berlin am Campus Mitte.

Die Patienten wurden anhand der ACR Kriterien (American College of Rheumatology) als an SLE erkrankt diagnostiziert, so dass alle Patienten mindestens 4 dieser Kriterien erfüllten.

Daneben wurden Proben von 10 gesunden Probanden als Kontrollgruppe untersucht.

Probanden, bei denen Mischkollagenosen diagnostiziert wurden, sowie solche mit einem akuten Harnwegsinfekt oder Nebendiagnosen, welche die Nieren beeinträchtigen, wurden ausgeschlossen. Ebenfalls wurden Patientinnen, die ihre Regelblutung hatten, nicht mit einbezogen.

Sieben Patienten wurden im Verlauf ihrer Erkrankung zu dem Zeitpunkt 0 bei Beginn der Studienteilnahme, nach 3 Monaten sowie vier der Patienten zusätzlich nach 6 Monaten untersucht.

Für die Durchführung der Studie wurde ein aktueller Ethikantrag (EA1/034/10) durch die Mitglieder der Ethikkommission bewilligt. Die Patienten wurden aufgeklärt und gaben schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

2.2.2 Patientengruppeneinteilung

Die Population von 67 SLE Patienten wurde im Nachhinein in zwei Gruppen unterteilt.

SLE Patienten mit Nierenbeteiligung (SLE NB+) und SLE Patienten ohne eine Nierenbeteiligung (SLE NB-).

Um diese Aufteilung vornehmen zu können, wurden der Krankheitsverlauf des Systemischen Lupus Erythematoses bis zum Zeitpunkt der Studienteilnahme, bis dahin auffällig gewordene Urinuntersuchungen, stattgehabte Nierenbiopsien und die klinische Einschätzung der rheumatologischen und nephrologischen Abteilung der Medizinischen Klinik am Campus Mitte einbezogen. In die Patientengruppe SLE NB+ wurden 44 Patienten mit im Verlauf ihrer Erkrankung durch eine Nierenbiopsie gesicherten Beteiligung der Nieren einbezogen.

In die Patientengruppe SLE NB- wurden 23 Patienten aufgenommen, welche bis zum Zeitpunkt der Studienteilnahme keine Anzeichen einer Nierenbeteiligung aufwiesen.

2.2.3 Kontrollgruppe und Proben zusätzlicher Tests

In die Kontrollgruppe wurden zehn freiwillige Probanden unterschiedlichen Alters und scheinbarer Gesundheit aufgenommen. Es wurde darauf geachtet, dass sowohl die Alters- als auch die Geschlechterverteilung der Patientenpopulation entspricht. Rekrutiert wurden die Freiwilligen mittels Aushängen, Emails über Verteiler der Universität und der Mitarbeiter sowie Mundpropaganda.

Für die Untersuchung der Urinproben während der Regelblutung wurden zehn weitere Probandinnen gefunden. Auch diese Untersuchungsgruppe entsprach den oben genannten Kriterien, wobei sie allerdings verständlicherweise einen geringeren Altersdurchschnitt aufwies. Ausgehend von der Annahme, dass die Regelblutung am zweiten Tag am stärksten ist, wurden alle Messungen zu diesem Zeitpunkt durchgeführt.

Ebenfalls freiwillig und aufgeklärt über etwaige Risiken wurden für den Kinetik Test peripheres Blut sowie Spontanurin von sechs weiteren Probanden zur Verfügung gestellt. Auch diese gaben zum Zeitpunkt der Studienteilnahme keine Erkrankungen an und wurden als gesund eingeschätzt.

2.2.4 Bestimmung der Krankheitsaktivität

Die Krankheitsaktivität der Patienten wurde mit Hilfe des Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) bestimmt.

Bei dem SLEDAI handelt es sich um einen globalen Index, der die Krankheitsaktivität der letzten 10 Tage bewertet. Die Deskriptoren repräsentieren 9 potenziell vom SLE betroffene Organsysteme. Dabei werden 24 gewichtete klinische Symptome und Befunde sowie Laborparameter erfasst. Hierbei wird das ZNS und Gefäßsystem mit jeweils 8 Punkten bemessen, 4 Punkte für das renale und muskuloskeletale System, 2 Punkten für Haut-/Schleimhaut- und das immunologische System sowie 1 Punkt für den konstitutionellen und hämatologischen Status.

Die hierbei genutzten immunologischen Laborparameter wurden durch das Rheumatologisch-Immunologische Labor der Charité unter der Leitung von Dr. Dr. Karl Egerer erhoben.

Material und Methoden

Tabelle 6: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI)

Kategorie	Punkte
Anfall	8
Psychose	8
Psychoorganisches Syndrom	8
Sehstörungen	8
Hirnnerven-Störung	8
Lupus-Kopfschmerz	8
Zerebrovaskulärer Insult	8
Vaskulitis	8
Arthritis	4
Myositis	4
Harnzylinder	4
Hämaturie	4
Proteinurie	4
Pyurie	4
Erythem	2
Alopezie	2
Schleimhaut-Ulcera	2
Pleuritis	2
Perikarditis	2
Komplementverminderung	2
erhöhte dsDNA-Antikörper	2
Fieber	1
Thrombozytopenie	1
Leukopenie	1

Die maximale zu erreichende Punktzahl ergibt somit 105. In der Praxis weisen jedoch wenige Patienten Punktzahlen von mehr als 45 auf. Leichte bis mäßige Erkrankung entspricht einem SLEDAI-Punktwert von < 10 . SLEDAI-Werte ≥ 10 entsprechen stärkerer Krankheitsaktivität [144, 145].

Die aktuell verwendete Version des 1992 erstmalig beschriebenen Index ist der SLEDAI-2k [146]. Dieser Score wurde ausgewählt, da er sich auch als zuverlässig erwiesen hat, wenn ihn Ärzte verwenden, die wenig Erfahrung mit der Beurteilung der Krankheitsaktivität von SLE-Patienten besitzen [147].

2.2.5 Bestimmung der renalen Krankheitsaktivität

Um die Krankheitsaktivität des Systemischen Lupus Erythematoses ins Besondere in Hinblick auf die Nierenbeteiligung zum Zeitpunkt der Studienteilnahme beurteilen zu können, wurde ein renaler SLEDAI erhoben. Dieser stützt sich auf die im Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index vorhandenen nierenbezogenen Punkte.

Material und Methoden

Tabelle 7: renaler SLEDAI

Deskriptor	Definition	Punkte
Harnzylinder	granuläre Zylinder oder Erythrozyten-Zylinder	4
Hämaturie	>5 Erythrozyten im Mikroskopierfeld bei 400facher Vergrößerung; Steine, Infektionen oder andere Ursachen müssen ausgeschlossen werden	4
Proteinurie	>0,5g/24 Stunden; neu beginnend oder Steigerung in jüngster Zeit um mehr als 0,5g / 24 Stunden	4
Pyurie	>5Leukozyten im Mikroskopierfeld bei 400facher Vergrößerung; Ausschluss einer Infektion	4

Insgesamt ergab sich so eine maximal zu vergebende Punktzahl von 16.

Die hierfür notwendigen Parameter wurden, wenn vorhanden aus den klinischen Daten erhoben. Hierbei wurden insbesondere die durchgeführten 24-h-Sammelurinmessungen sowie Urinmikroskopien vorrangig berücksichtigt. Zusätzlich, um fehlende Daten zu ergänzen, wurde bei jeder untersuchten Urinprobe eine eigene Untersuchung mittels Urinteststreifen durchgeführt.

2.2.6 Probengewinnung

Die an der Studie teilnehmenden Probanden wurden über die Studie und deren Zweck sowie etwaige Risiken einer peripheren Blutentnahme aufgeklärt und unterschrieben eine Einwilligungserklärung.

Den Probanden wurde durch Punktion einer peripheren Vene 6 ml heparinisiertes Vollblut im Rahmen der Routineblutentnahme entnommen. Des Weiteren wurden zur gleichen Zeit 1-2 Becher Spontanurin abgegeben. Hierbei wurde darauf geachtet, dass eine Mindestmenge von 100 ml Urin nicht unterschritten wurde. Bei den Proben der stationären Patienten handelte es sich um Morgenurinproben. Aus organisatorischen Gründen war es bezogen auf die ambulanten Patienten nicht gewährleistet die Urinproben zu einem einheitlichen Tageszeitpunkt zu gewinnen.

Die Proben wurden in unser Labor transportiert und innerhalb weniger Stunden weiterverarbeitet.

Die 17 zur Studienteilnahme zeitgleich durchgeführten Nierenbiopsien (aufgeführt in Abschnitt 3.6) wurden im Institut für Pathologie des Campus Mitte der Charité unter der Leitung von Prof. Dr. Dietel pathologisch-anatomisch begutachtet.

2.2.7 Durchflusszytometrie

2.2.7.1 Prinzip des Durchflusszytometers

Der Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting) liegt das Prinzip eines optischen Messsystems für einzelne in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte Partikel zugrunde, deren quantitative Fluorochromierung gemessen wird. Dies bedeutet, dass mit geeigneten Fluorochromen gekoppelte Partikel ihrer Anzahl entsprechend detektiert werden können [121]. Das Messverfahren kann für eine Vielzahl von Untersuchungszielen herangezogen werden wie beispielsweise der Zelltypisierung und Zellzyklusanalysen. Häufigste Nutzung ist sicherlich das Darstellen von Zelleigenschaften und Zellsupopulationen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper.

Die mit Antikörpern markierten Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom einzeln in einer Reihe an einem Laserstrahl vorbeigeleitet.

Durch den Fluoreszenzfarbstoff freigesetzte Photonen werden mittels des Photodetektors aufgezeichnet. Deren Anzahl verhält sich nun proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern auf der Zelle und erlaubt somit z.B. eine Aussage über die Expression von Oberflächenmolekülen sogenannten Cluster of Differentiation (CD) auf den untersuchten Zellen. Beim Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle kommt es weiterhin zur Beugung und Streuung des Lichtes. Das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) entspricht hierbei der Granularität und Komplexität der Zellen, wohingegen das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) Aufschluss über die Zellgröße gibt [148].

An Hand dieser Informationen können die Lymphozyten von anderen Zellen und Zelldebris unterschieden werden.

a) Quarz-Küvetten-Einheit

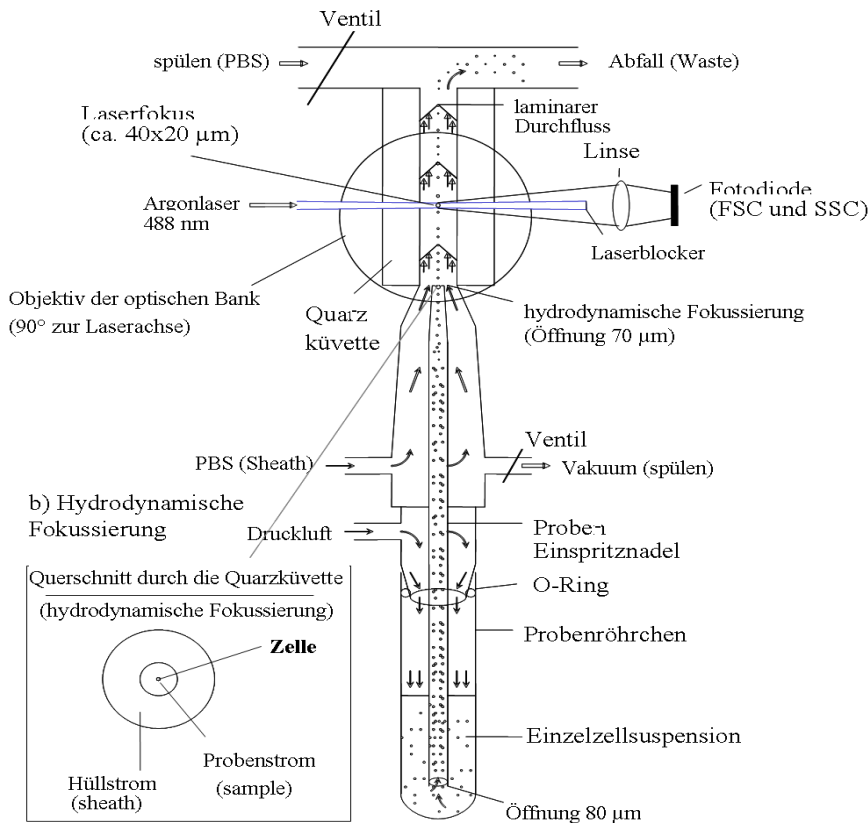


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines FACS-Gerätes

(Homepage der FACS Core Facility der Universität Mainz: <http://www.facsclab.toxikologie.uni-mainz.de/images/Bild1a.png>)

2.2.7.2 Vier-Kanal-Durchflusszytometer

Die Oberflächenantigene können entweder in der direkten oder der indirekten Färbung nachgewiesen werden.

Bei der direkten Fluoreszenzfärbung werden monoklonale Antikörper, welche bereits direkt mit dem jeweiligen Fluorochrom konjugiert sind, verwendet. Es handelt sich dabei also nur um einen Färbeschritt.

Bei der indirekten Färbung wird zunächst ein spezifischer Antikörper zu dem Untersuchungsmaterial gegeben, an welchen dann in einem zweiten Schritt ein weiterer fluorochrommarkierter Antikörper bindet. Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist, obwohl sich die eingesetzten Farbstoffe mit derselben Wellenlänge anregen lassen, möglich, da ihre Emissionsspektren Maxima unterschiedlicher Wellenlängen aufweisen.

Material und Methoden

In dem verwendeten Durchflusszytometer FACSCalibur können vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zur selben Zeit detektiert werden.

Tabelle 8: Verwendete Fluorochrome

Fluorochrom	Kanal	Absorptionsmaxima	Emission
FITC	FL 1	495 nm	519 nm
PE	FL 2	480 nm	578 nm
PJ	FL 3	550 nm	617 nm
APC	FL 4	650 nm	660 nm
Alexa Fluor 647	FL 4	650 nm	668 nm

Zur Markierung der gesuchten Oberflächenantigene wurden ausschließlich direkt markierte monoklonale Antikörper verwendet. In Tabelle 4 ist aufgeführt mit welchen Farbstoffen diese verbunden waren.

Die optimale Antikörperkonzentration wurde vorher durch eine Titrationsreihe an Hand von Vollblutproben ermittelt.

Tabelle 9: Färbeschema

Tube	FITC		PE		PJ		APC	Alexa Fluor 647	
1	CD4	1:10	CD3	1:10	PJ	1:500			
2	CD4	1:10	CD3	1:10	PJ	1:500	CD45RO		1:10
3	CD4	1:10	CD3	1:10	PJ	1:500	CD69		1:10
4	CD4	1:10	CD3	1:10	PJ	1:500		CCR1	1:10
5	CD4	1:10	CD3	1:10	PJ	1:500	CCR5		1:10

2.2.7.3 Fc-Rezeptorblockade

Um ein unspezifisches Binden der Antikörper an Fc-Rezeptoren anderer Zellen und somit eine hohe Hintergrundfärbung zu verhindern, wird die Zellsuspension mit einem Überschuss an Immunglobulin präinkubiert, welches keine Spezifität für das zu untersuchende Antigen besitzt. So werden die Fc-Rezeptoren gesättigt und stehen im Folgenden nicht mehr für die unspezifische Bindung zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde jede Probe vor dem eigentlichen Färbeschritt mit humanem IgG inkubiert.

2.2.8 Isolierung und Färbung der Leukozyten aus der Vollblut-Probe

- 4 ml einer heparinisierten Vollblutprobe wurden im Verhältnis 1:20 mit Erylysepuffer versetzt und 20 min bei + 4 °C kühl gestellt.
- Um die Zellen von dem Überstand zu trennen, wurde die Probe bei 1300 U/min und 4 °C 8 min zentrifugiert (Ultrazentrifuge) und der Überstand verworfen.

Material und Methoden

- Das Zellpellet wurde in 5 ml PBS/BSA Pufferlösung resuspendiert und mit je 1ml auf fünf 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße verteilt.
- Die Reaktionsgefäße wurden erneut 8 min bei 4 °C und 2300 U/min zentrifugiert (Tischzentrifuge Heraeus Fresco 17) und der Überstand mit Hilfe der Vakuumpumpe CVC 2000 abgesaugt.
- Anschließend wurde das Pellet auf Eis mit jeweils 100 µl Antikörperlösung, bestehend aus PBS/BSA und humanem IgG im Verhältnis 1:10, resuspendiert und die Antikörper entsprechend dem Färbeschema in Tabelle 4 hinzugefügt.
- Darauf folgte eine Inkubationszeit von 20 min bei 4 °C.
- Waschschrift: Den Zellen wurde jeweils 1 ml PBS/BSA zugegeben, woraufhin sie 8 min bei 4 °C und 2300 U/min zentrifugiert wurden (Tischzentrifuge Heraeus Fresco 17).
- Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 500 µl PBS/BSA resuspendiert, 10µl Flow Cytometer Count Standard hinzugefügt und unmittelbar im Anschluss daran die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt.

2.2.9 Isolierung und Färbung der Urinprobe

- Die Urinprobe wurde mittels Multi-Urinstix auf Blut, Leukozyten, Nitrit, Protein und den pH-Wert hin untersucht und die Ergebnisse dokumentiert.
- Anschließend wurde der gesamte Urin in 50 ml Falcons überführt, das Gesamtvolumen notiert und die Proben 8 min bei 4 °C und 1300 U/min zentrifugiert (Ultrazentrifuge).
- Der Überstand wurde dekantiert und bei -20 °C eingefroren.
- Nun folgte ein Waschschrift: Das Pellet wurde in 15 ml PBS/BSA resuspendiert und ein weiteres Mal 8 min bei 1300 U/min zentrifugiert (Ultrazentrifuge). Der Überstand wurde verworfen.
- Anschließend wurde das Zellpellet in 4 ml PBS/BSA resuspendiert und die Gesamtflüssigkeit zu gleichen Teilen auf vier 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße verteilt und 8 min bei 2300 U/min zentrifugiert (Tischzentrifuge Heraeus Fresco 17).
- Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 100 µl Antikörperlösung, bestehend aus PBS/BSA und humanem IgG im Verhältnis 1:10, resuspendiert, wozu die Antikörper entsprechend dem Färbeschema in Tabelle 4 hinzugefügt wurden. Dieser Pipettierschritt wurde auf Eis durchgeführt.
- Waschschrift: Den Zellen wurde jeweils 1 ml PBS/BSA zugegeben, woraufhin sie 8 min bei 4 °C und 2300 U/min zentrifugiert wurden (Tischzentrifuge Heraeus Fresco 17).

- Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 500 µl PBS/BSA resuspendiert, 10µl Flow Cytometer Count Standard hinzugefügt und unmittelbar im Anschluss daran die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt.

2.2.10 Untersuchung zum zellulären Überleben in Urin

Um das Zellüberleben in Urin zu untersuchen und die Frage beantworten zu können, ob die Expression von Oberflächenmarkern durch Urin induziert wird wurde ein Kinetikversuch über 24 Stunden durchgeführt.

- Hierfür wurden sechs 300 ml Urinproben (U1-U6) zunächst 8 min bei 4 °C und 1300 U/min zentrifugiert (Ultrazentrifuge) und anschließend der Überstand der jeweiligen Proben von dem Zellpellet getrennt
- sechs Proben mit jeweils 5 ml heparinisiertem Vollblut (PB1-PB6) wurden im Verhältnis 1:20 mit Erylysepuffer versetzt und 20 min bei +4 °C kühl gestellt.
- Um die Zellen von dem Überstand zu trennen, wurden die Blutproben anschließend bei 1300 U/min und 4 °C 8 min zentrifugiert (Ultrazentrifuge). Der Überstand wurde verworfen.
- Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS/BSA Pufferlösung resuspendiert und nochmalig bei 1300 U/min und 4 °C 8 min zentrifugiert (Ultrazentrifuge). Der Überstand wurde verworfen.
- Nun wurden die Pellets der Blutproben in jeweils 5ml PBS aufgenommen.
- Jeweils 45 ml Urinüberstand der Proben U1 bis U6 wurden in sechs 50 ml Falcons überführt und je 1 ml Zellsuspension der dazugehörigen Blutprobe PB1 bis PB6 hinzugegeben.
- Zu den Zeitpunkten 0h, 2h, 5h, 8h, 10h und 24h wurden jeweils Probe 1 bis Probe 6 wie folgt behandelt:
 - Um die Zellen von dem Überstand zu trennen, wurden die Proben bei 1300 U/min bei 4 °C 8 min zentrifugiert (Ultrazentrifuge) und der Überstand verworfen.
 - Das Zellpellet wurde in 6 ml PBS/BSA Pufferlösung resuspendiert und mit je 1ml auf fünf 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße verteilt.
 - Die Reaktionsgefäße wurden erneut 8 min bei 4 °C und 2300 U/min zentrifugiert (Tischzentrifuge Heraeus Fresco 17) und der Überstand mit Hilfe der Vakuumpumpe CVC 2000 abgesaugt.

Material und Methoden

- Anschließend wurde das Pellet auf Eis mit jeweils 100 µl Antikörperlösung, bestehend aus PBS/BSA und humanem IgG im Verhältnis 1:10, resuspendiert und die Antikörper entsprechend dem Färbeschema in Tabelle 4 hinzugefügt.
- Darauf folgte eine Inkubationszeit von 20 min bei 4 °C.
- Waschschrift: Den Zellen wurde jeweils 1ml PBS/BSA zugegeben, woraufhin sie 8 min bei 4 °C und 2300 U/min zentrifugiert wurden (Tischzentrifuge Heraeus Fresco 17).
- Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 500 µl PBS/BSA resuspendiert und unmittelbar im Anschluss daran die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt.

2.2.11 Färben toter Zellen mit Propidium Jodid

Eine intakte Zellmembran ist für Propidium Jodid (PJ), welcher auch als Totfarbstoff bezeichnet wird, nicht durchlässig. Dieser Farbstoff kann somit nur in die DNA von Zellen einlagern, deren Membran stark geschädigt ist. Durch diese Färbung der DNA abgestorbener Zellen ist nun eine einfache Unterscheidung lebender Zellen von toten Zellen möglich. Eine 0,1 mg/ml PJ Lösung wurde kurz vor der Analyse der Zellen in einem Verhältnis von 1:500 in die Zellsuspension gegeben und gut vermischt. Nicht mehr intakte Zellen erschienen im Fluoreszenzkanal 3 (FL3) des Durchflusszytometers positiv.

2.2.12 Auswertung und Gatingstrategie

Für die Auswertung der gemessenen Daten standen verschiedene Darstellungsformen zur Verfügung.

Benutzt wurde ein Punktehistogramm (Dot-Plot), in welchem zwei Parameter, das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, zueinander in Beziehung gesetzt werden. Zur Anwendung kamen ebenfalls ein Dichteplot, bei welchem mehrfach überlagerte Punkte innerhalb eines Dot-Plots mit verschiedenen Farben sichtbar gemacht werden sowie die Histogramm-Darstellung.

2.2.12.1 Lymphozytengate

Die zu untersuchende Zellpopulation, die Lymphozyten, wurde, um sie von anderen Strukturen und Zellsubpopulationen abzugrenzen, im Dichteplot des Vorwärts-Seitwärts-Scatters anhand ihrer spezifischen Größen- und Granularitätsmerkmale erkannt und in der Folge in einem weiteren Fensters dargestellt. Dieses Vorgehen wird als „Gating“ bezeichnet. Die folgenden Analysen der FACS-Bilder wurden nur für Messdaten innerhalb des eingegrenzten Bereiches durchgeführt.

In der Darstellung der Urinproben ist das Setzen eines Leukozytengates aufgrund von vermehrt vorkommendem Zelldebris und Aggregaten erschwert. Um sicher zu gehen, keine Lymphozyten fälschlicherweise auszugrenzen, wurde das Lymphozytengate der Blutprobe in etwas ausgeweiteter Form als Vergleich für die Messung der Urinprobe herangezogen.

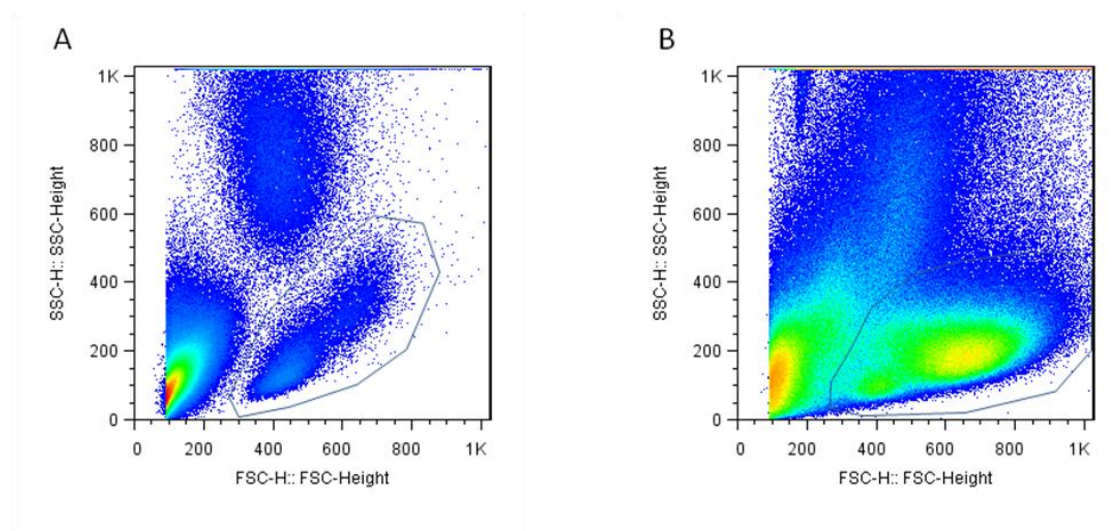


Abbildung 4: Darstellung der Lymphozyten in einem Pseudocolour Punktehistogramm

A) Lymphozyteneingrenzung einer Blutprobe; B) erweitertes Lymphozytengate einer Urinprobe

2.2.12.2 Weitere Analyse der Lymphozytenpopulation

Aus dem Primärfenster FSC/SSC wurde die eingegrenzte Lymphozytenpopulation auf weitere Fenster zur Analyse der spezifischen Marker übertragen. Zunächst wurde CD3 gegenüber PJ dargestellt, um nur lebende T-Zellen im weiteren Verlauf zu untersuchen.

Um nun die Anzahl der CD3+CD4+Zellen zu ermitteln, wurden diese beiden Marker gegenübergestellt und die positiven Zellen mit einem Gate umzogen.

Ausgehend von diesem Gate wurden die Marker CD45RO, CD69, CCR1 und CCR5 gegen CD3 aufgetragen.

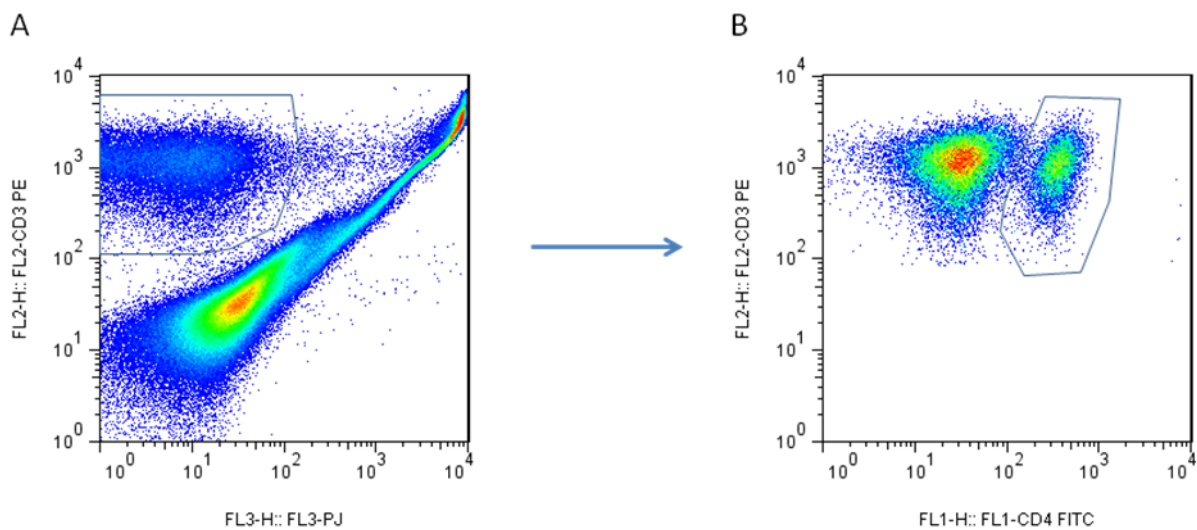


Abbildung 5: Darstellung der Lymphozyten in einem Pseudocolour Punktehisogramm

A) Darstellung der Lymphozyten in einem Live-Gate; Ordinate: CD3 PE Abszisse: PJ-Lebendfarbstoff

B) Darstellung der lebenden CD3+CD4+Lymphozyten; Ordinate: CD3 PE Abszisse: CD4 FITC

2.2.13 Quantitative Bestimmung der Zellen

Um die absolute Zellzahl quantitativ bestimmen zu können, wurden zwei verschiedene Methoden verwandt, Berechnung mittels True-Count-Beads und eine Berechnung über das Ursprungsvolumen.

2.2.13.1 Berechnung mit Hilfe von Beads

Bei den Beads handelte es sich um einen Flow Cytometer Count Standard, eine Suspension mit einer bekannten Anzahl an Partikeln pro ml Volumen. Diese Partikel sind mit verschiedenen multiplen Fluorochromen gelabelt, deren Kombination es möglich macht durch einen gewöhnlichen Argon Laser (488nm) angeregt zu werden und in den Kanälen FL1, FL2 und FL3 detektiert werden zu können. Die Partikel des Absolute Count Standards besitzen ungefähr die Größe eines humanen Lymphozyten (7-9 μm) und befinden sich in einer steril filtrierten und isotonisch gepufferten Lösung (pH 7,4). Da die Konzentration der Suspension mit 1×10^6 Beads/ml bekannt war, konnte mit Hilfe der Anzahl an aufgenommenen Beads die absolute Zellzahl/ μl berechnet werden (siehe Formel 1).

Formel 1: Berechnung der absoluten Zellzahl mit Hilfe von Beads

$$\frac{\text{absolute Zellzahl}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{gemessene Zellen}}{\text{gemessene Beads}} \times \text{Faktor}$$

$$\text{Faktor} = \frac{10\,000 \text{ Beads}}{500 \mu\text{l Staining Volumen}}$$

2.2.13.2 Berechnung über das Volumen

Die zweite Methode bestand darin die absolute Zellzahl über das Volumen zu berechnen. Hierfür wurde das Ursprungsvolumen der Probe in Bezug zu dem Aufnahmevolumen und der insgesamt gemessenen Zellzahl gesetzt. Voraussetzung hierfür war die gesamte Probe ohne Verluste aufzunehmen. Siehe hierzu folgende Formel 2.

Formel 2: Berechnung der absoluten Zellzahl an Hand des Volumens

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen}}{100 \text{ ml}} = \frac{\text{Anzahl der gemessenen Zellen}}{\text{Urinmenge in ml}} \times 100$$

2.2.14 Statistische Auswertung

Da bei den vorliegenden Patientendaten auf Grund der geringen Fallzahlen meist von keiner Normalverteilung der Ergebnisse auszugehen war, wurden in diesen Fällen an Stelle von Mittelwerten Medianwerte angegeben. Für die nicht-normalverteilten Werte wurde im Folgenden für den Vergleich der Medianwerte der Test nach Mann-Whitney-U verwendet. Für die normalverteilten Daten wurde ein T-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt.

Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt. Um Korrelationen zu berechnen wurde der bivariate Spearman's rho-Test verwendet. Eine Korrelation wurde ab einem Korrelationskoeffizienten $r > \pm 0,3$ angenommen.

Sensitivitäts- und Spezifitäts-Berechnungen

Um eine Berechnungen der Sensitivität und Spezifität durchzuführen, wurden zunächst Kreuztabellen, auch sogenannte Vierfeldertafeln, mit Hilfe des SPSS-Programmes erstellt. Hierbei wurden Patienten mit einem SLEDAI-Punktwert ≥ 10 mit einer erhöhten Krankheitsaktivität und im Schub befindlich definiert. Pateinten mit einem SLEDAI-Punktwert < 10 wurden zusammengenommen als gesund bzw. als gering aktiv erkrankt angesehen. Als erhöhte Zellzahl wurde ein Grenzwert von 800 CD3+CD4+T-Zellen pro 100 ml Urin festgelegt.

Tabelle 10: Vierfeldertafel

Anzahl der positiven und negativen Testergebnisse bei gleichzeitiger Kenntnis des "wahren" Sachverhaltes

Testergebnis	Wahrheit	
	negativ	positiv
negativ	n (- -)	n (- +)
positiv	n (+ -)	n (+ +)

Ausgehend von der Tabelle 10 lassen sich die Sensitivität $P (+|+)$ und Spezifität $P (-|-)$ wie folgt berechnen:

$$P (+|+) = \frac{n(+|+)}{n(+|+) + n(-|+)}$$

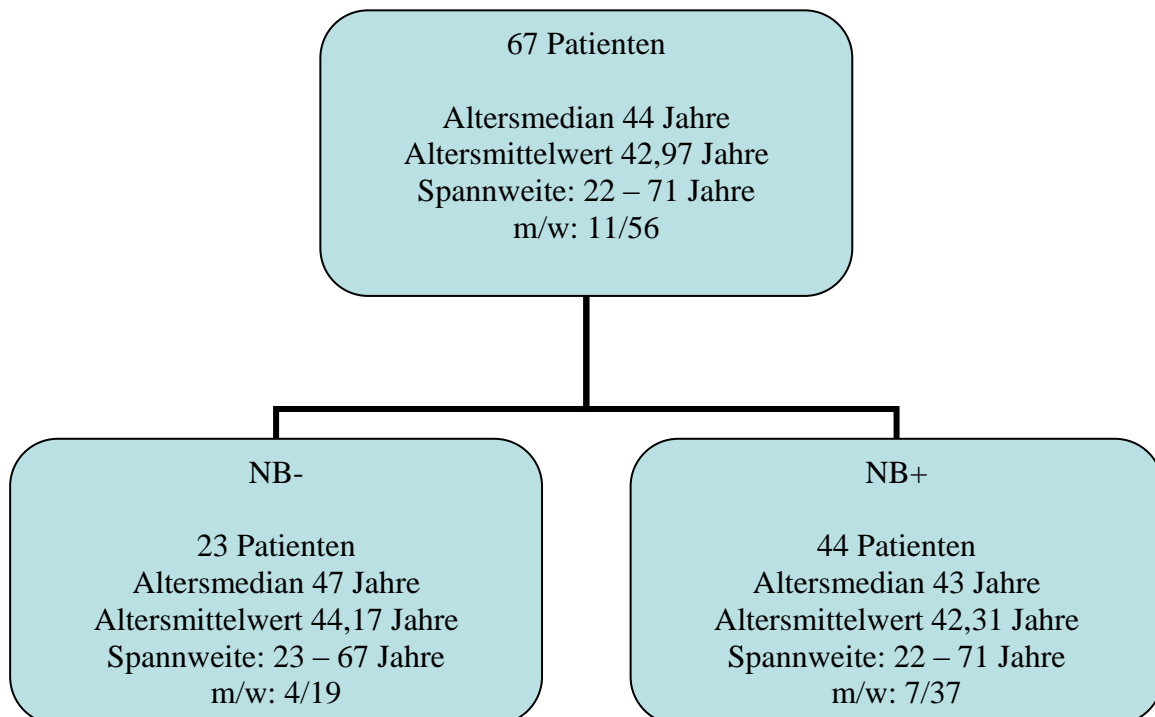
$$P (-|-) = \frac{n(-|-)}{n(-|-) + n(+|-)}$$

Für die zusammengenommenen statistischen Berechnungen sowie das Erstellen der Graphiken wurde PAWS Version 18 (Chicago, Illinois, USA) sowie GraphPad Prism Version 5.0 (San Diego, California, USA) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Patienten

67 Patienten im Alter von 22 bis 71 Jahren und einem Altersmedian von 44 Jahren wurden in zwei Gruppen „Patienten mit Nierenbeteiligung“ (NB+) und „Patienten ohne Nierenbeteiligung“ (NB-) eingeteilt. Unter den Patienten fanden sich 11 Männer und 56 Frauen.



3.1.1 Patientengruppe mit Nierenbeteiligung

In die Gruppe „Patienten mit Nierenbeteiligung“ (NB+) wurden 44 Patienten im Alter von 22 bis 71 Jahren und einem Altersmedian von 43 Jahren aufgenommen. Hierunter befanden sich 7 Männer und 37 Frauen. 17 von ihnen waren in der Ambulanz vorstellig geworden, 24 waren zum Zeitpunkt der Studienteilnahme stationär auf der rheumatologischen Station der Charité am Campus Mitte gewesen und drei Patienten hatten stationär auf der nephrologischen Station des Universitätskrankenhauses gelegen.

Bis auf 3 der Patienten war die gesamte restliche Population zum Zeitpunkt der Studienteilnahme immunsupprimiert. Die jeweiligen Aufnahmegründe sind der Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: Aufnahmegrund der Patienten mit Nierenbeteiligung

	Häufigkeit	Prozent
Verlaufskontrolle	17	39,5
Schub	8	18,2
V.a. Schub	5	11,6
Infusionstherapie	11	25,6
Reevaluation der Erkrankung	2	4,7
Anderes	1	2,3
Gesamt	44	100,0

34 Patienten der Gruppe NB+ hatten zu einem früheren Zeitpunkt ihrer Erkrankung eine Nierenbiopsie erhalten. Da bekannt ist, dass sich das histologische Bild einer LN im Verlauf der Erkrankung verändern kann und möglicherweise auch die Einnahme von Medikamenten eine Rolle spielt, wurden in dieser Studie nur zeitgleiche sowie innerhalb der letzten 3 Monate vor Studienteilnahme durchgeführte Biopsien als repräsentativ für die aktuelle Krankheitsaktivität gewertet und im Rahmen der vorliegenden Arbeit berücksichtigt. 10 Patienten hatten zur selben Zeit der Probenmessung eine Nierenbiopsie erhalten.

3.1.2 Patientengruppe ohne Nierenbeteiligung

Die Gruppe „Patienten ohne Nierenbeteiligung“ (NB-) umfasste 23 Patienten im Alter von 23 bis 67 Jahren und einem Altersmedian von 47 Jahren. Zwischen den beiden Patientenpopulationen war zum Zeitpunkt der Messung kein signifikanter Altersunterschied festgestellt worden, was durch den T-Test für unabhängige Stichproben gezeigt werden konnte (T-Wert = 0,5229; $p = 0,6029$).

In der Patientengruppe NB- befanden sich 4 Männer und 19 Frauen. 7 der Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Studienteilnahme in stationärer Behandlung auf der Rheumatologischen Station der Charité am Campus Mitte. 16 Patienten dieser Gruppe stellten sich in der Ambulanz vor. Alle der Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Studienteilnahme in immunsupprimierender Behandlung. Da keiner der Patienten bis zum Zeitpunkt der Studienteilnahme Auffälligkeiten bezogen auf die Niere aufgewiesen hatte, wurde im bisherigen Krankheitsverlauf bei keinem der Patienten eine Nierenbiopsie durchgeführt.

In der Tabelle 12 sind die jeweiligen Gründe des Vorstellens in der Klinik aufgeführt.

Tabelle 12: Aufnahmegrund der Patienten ohne Nierenbeteiligung

	Häufigkeit	Prozent
Verlaufskontrolle	15	65,2
V.a. Schub	2	8,7
Infusionstherapie	1	4,3
Reevaluation der Erkrankung	3	13,0
Anderes	2	8,7
Gesamt	23	100,0

3.1.3 Gesunde Kontrollgruppe

In die gesunde Kontrollgruppe wurden 10 Probanden eingeschlossen. Bei keinem Studienteilnehmer dieser Gruppe war zum Zeitpunkt der Messung eine Grunderkrankung bekannt. Die Probanden waren zwischen 22 und 58 Jahren alt, wodurch sich für deren zusammengenommene Population ein Altersmedian von 36 Jahren ergab. Zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den an Systemischem Lupus Erythematoses erkrankten Patienten ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Altersverteilung, welches mit Hilfe eines T-Testes für unabhängige Stichproben überprüft wurde (T-Wert = 0,4662; p = 0,6425).

3.2 Zellüberleben in Urin

Um Rückschlüsse ziehen zu können, wie sich das Zellüberleben in Urin im Rahmen der Untersuchung verhält und die Frage beantworten zu können, ob dieses über den Verlauf von Stunden hin abnimmt, wurde ein Kinetik-Test durchgeführt. Weiterhin sollte analysiert werden, ob die untersuchten Oberflächenmarker und Chemokinrezeptoren bei dem Verbleib von Zellen in Urin induziert werden.

In diesem Versuch wurde eryliertes Vollblut in 300 ml Urin über 24 h inkubiert und zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 5 h, 8 h, 10 h und 24 h die Anzahl der lebenden T-Zellen, die Anzahl der lebenden CD3+CD4+T-Zellen sowie deren Expression der Oberflächenmarker CD45RO und CD69 und der Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 gemessen.

Aus dieser Untersuchung ergab sich, wie sich der Abbildung 6 entnehmen lässt, dass die Anzahl der lebenden CD3+T-Zellen in allen sechs Proben über den Verlauf von 24 Stunden rapide abnahm. Im Mittel aller Proben kam es dabei zu einer Reduzierung der zum Zeitpunkt 0h gemessenen Zellzahl um 84,24 %. Schon nach 2 Stunden war eine Verminderung der lebenden Zellen um 34,8 % zu vermerken.

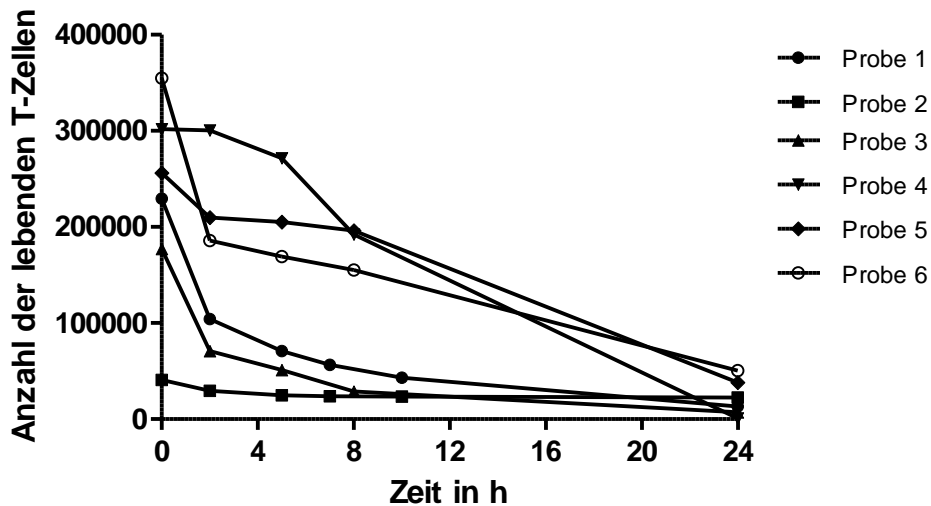


Abbildung 6: Anzahl der lebenden T-Zellen über den Verlauf von 24 Stunden

Daraus ergab sich wie zu erwarten auch eine Abnahme der lebenden CD3+CD4+T-Zellen. Auf Grund der besonderen Bedeutung dieser für die vorliegende Arbeit werden sie in der Abbildung 7 gesondert dargestellt. Rechnerisch ergab sich für diese Zellpopulation über den Verlauf von 24 Stunden im Mittel eine Abnahme der Zellzahl um 82,75 %.

Ergebnisse

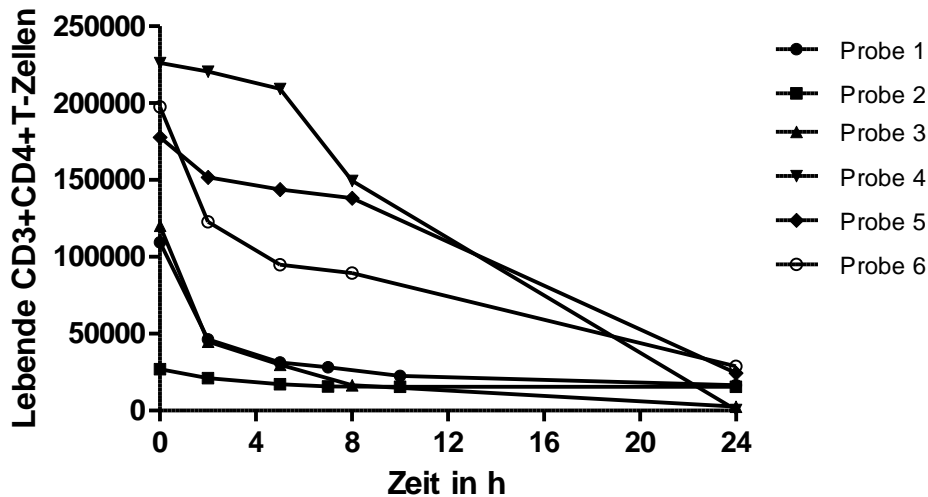


Abbildung 7: Anzahl der lebenden CD3+CD4+ T-Zellen über den Verlauf von 24 Stunden

Ebenfalls wurde eine eventuelle Induktion der Oberflächenmarker sowie der Chemokinrezeptoren durch das Verbleiben der Zellen in Urin überprüft.

Für den CD45RO Oberflächenmarker konnte in keiner der Proben eine veränderte Expression über den Zeitraum von 24 Stunden festgestellt werden. Um dies statistisch zu überprüfen, wurden die relativen Expressionswerte der einzelnen Proben zu den verschiedenen Zeitpunkten miteinander in Bezug gesetzt und mittels eines T-Testes für verbundene Stichproben auf einen signifikanten Unterschied hin getestet. Es ergab sich hieraus kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 13: statistische Werte der CD45RO-Expression über 24 Stunden

Probe	T-Wert	p-Wert
Probe 1	0,14	0,89
Probe 2	0,01	0,99
Probe 3	0,11	0,92
Probe 4	0,01	0,99
Probe 5	0,48	0,65
Probe 6	0,31	0,77

Auch die Expression des Oberflächenmoleküls CD69 auf den CD3+CD4+T-Zellen nach Verbleib derer über den Zeitraum von 0 h, 2 h, 5 h, 8 h, 10 h und 24 h in Urin ergab keine signifikanten Unterschiede.

Ergebnisse

Tabelle 14: statistische Werte der CD69-Expression über 24 Stunden

Probe	T-Wert	p-Wert
Probe 1	0,01	0,99
Probe 2	0,00	1,0
Probe 3	0,05	0,96
Probe 4	0,04	0,97
Probe 5	0,35	0,74
Probe 6	0,02	0,98

Betrachtet man die Expression der Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 auf den CD3+CD4+T-Zellen in diesem Versuch, so zeigt sich optisch in den Graphiken der Abbildung 8 ein scheinbarer Anstieg der Expressionswerte. Statistisch ergab sich jedoch sowohl für die CCR1 als auch für die CCR5 Expression kein signifikanter Unterschied innerhalb der sechs gemessenen Proben über den Zeitraum von 24 Stunden.

Tabelle 15: statistische Werte der CCR1- und CCR5-Expression über 24 Stunden

Probe	CCR1		CCR5	
	T-Wert	p-Wert	T-Wert	p-Wert
Probe 1	0,01	0,99	0,01	0,99
Probe 2	0,14	0,95	0,04	0,97
Probe 3	0,01	0,99	0,01	0,99
Probe 4	0,01	0,99	0,04	0,97
Probe 5	0,08	0,94	0,01	0,99
Probe 6	0,00	1,0	0,00	1,0

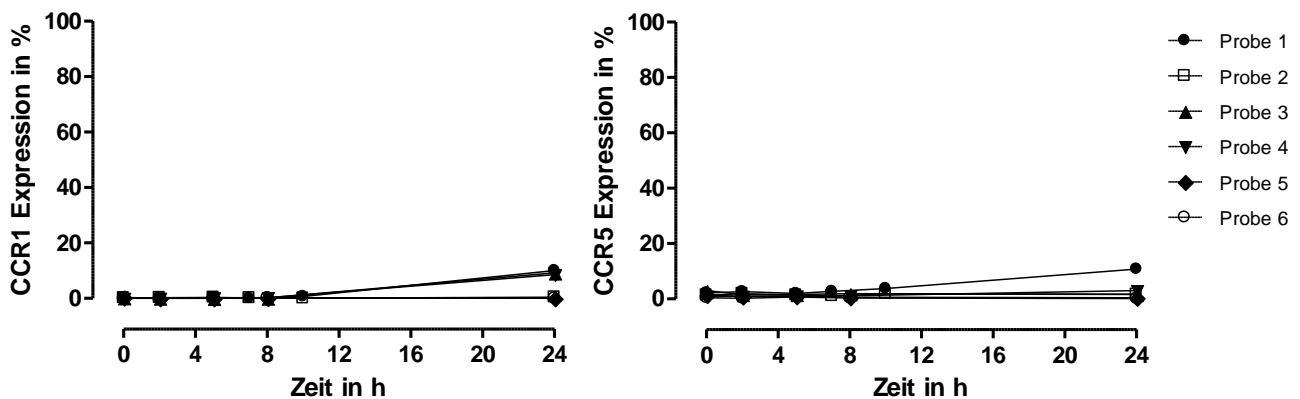


Abbildung 8: CCR1 und CCR5 Expression über den Verlauf von 24 Stunden

3.3 Einflussfaktoren auf den Nachweis von Zellen in Urin

3.3.1 Urin pH-Wert

Betrachtet man die pH-Werte aller gemessenen Proben, so ergibt sich für diese eine Normalverteilung mit einem Mittelwert von 6,13.

Im Folgenden wurden die gemessenen pH-Werte gegenüber der Anzahl an lebenden T-Zellen aufgetragen und dies an Hand des Spearman's rho Testes auf eine mögliche Korrelation hin untersucht. Als Ergebnis hieraus ergab sich keine signifikante Korrelation ($r = 0,0054$; $p = 0,9681$).

Des Weiteren wurden Gruppen von Urinproben gebildet, welche denselben pH-Wert aufwiesen. Die Mediane dieser Gruppen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Testes auf mögliche Unterschiede hin getestet. Auch hierbei ergab sich innerhalb der Gruppen kein signifikanter Unterschied.

3.3.2 Regelblutung der Frau

Untersucht werden sollte ebenfalls der Einfluss der Regelblutung bei der Frau auf den Nachweis von lebenden T-Zellen im Urin.

Interessanterweise konnte in keiner der zehn gemessenen Proben eine erhöhte Anzahl lebender CD3+T-Zellen nachgewiesen werden. Die Proben stellten sich wie die der gesunden Kontrollgruppe sowie gesunder Patienten dar.

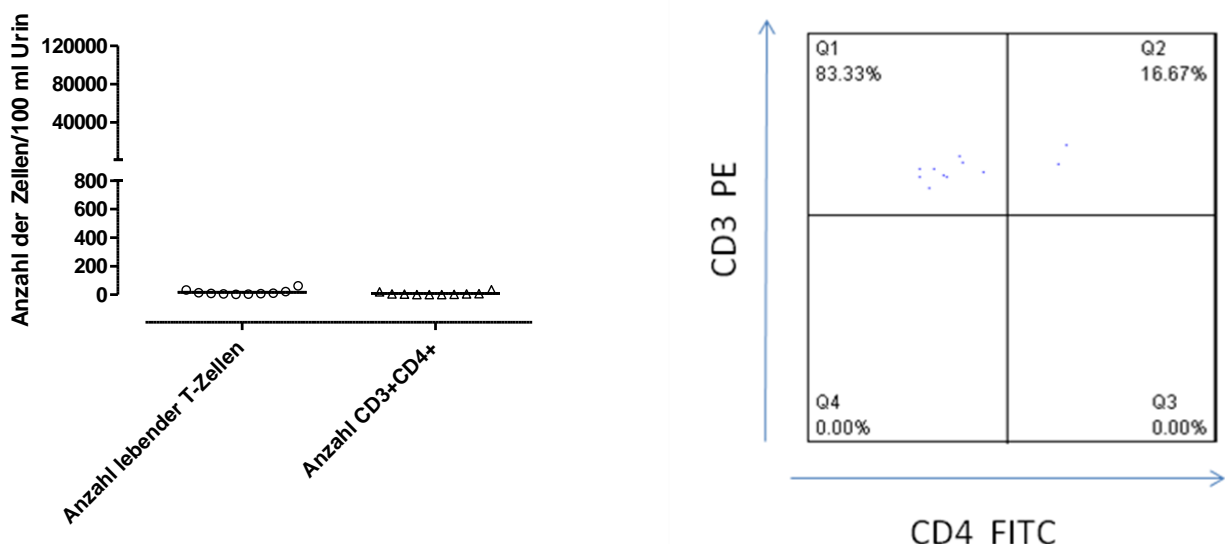


Abbildung 9: Urinuntersuchungen zum Zeitpunkt der Regelblutung

linke Abb.: Anzahl der lebenden T-Zellen sowie der CD3+CD4+T-Zellen pro 100 ml Urin

rechte Abb.: FACS-Bild einer Urinprobe zum Zeitpunkt der Regelblutung Abszisse: CD4 FITC Ordinate: CD3 PE

3.4 Berechnung der Absoluten Zellzahl

Die absolute Anzahl an gemessenen Zellen wurde auf zwei verschiedene Weisen berechnet. Eine Methode hierfür war, einen Flow Cytometer Count Standard (sogenannte Beads) mit den Proben aufzunehmen. Eine weitere Methode war es, das gesamte Volumen der Probe aufzunehmen und so die Möglichkeit zu haben, über dieses auf die Zellzahl im Ursprungsvolumen Rückschlüsse ziehen zu können.

Wie der Abbildung 10 zu entnehmen ist, ergaben sich leider deutliche Unterschiede in der errechneten Zellzahl der beiden Methoden.

Errechnet man die Differenz zwischen den beiden Werten, die sich aus einer Probe ergaben, so kam es zu einer mittleren Differenz von 18 206 Zellen/100 ml Urin (Medianwert). Der größte Unterschied zwischen zwei Werten derselben Probe lag bei 15 578 363 Zellen/100 ml Urin.

Um die absolute Zellzahl mit Hilfe des Count Standards zu berechnen, wird zunächst an Hand der gemessenen Beads das Volumen berechnet, welches durch das FACS-Gerät aufgenommen wurde. Betrachtete man in der vorliegenden Arbeit diese berechneten Volumina, so ergab sich eine Spanne von 1,4 µl bis 633 µl vermeintlich aufgenommenem Volumen. Da diese Werte nicht normalverteilt sind wurde der Medianwert errechnet, dieser ergibt ein Volumen von 249 µl.

In den Mess-Tubes, deren Volumen vollständig aufgenommen wurde, befand sich allerdings jeweils ein Volumen von 500 µl.

Eingeschlossen der Tatsache, dass es zu Schwankungen kommen kann, da das FACS-Gerät zu Beginn eventuell verzögert aufzeichnet, ist es wenig plausibel, dass es zu einem Volumenverlust von 498,6 µl kam. Dies entspräche einem Verlust von 99,7 %.

Aus dieser Beobachtung heraus wurde getestet, ob die Einstellungen des FACS-Gerätes so getroffen wurden, dass der Count Standard von diesem erfasst werden konnte. Dies war der Fall. Die Beads konnten einwandfrei in einer einzelnen Probe verdünnt in PBS/BSA detektiert werden. Auch kam es hierbei zu keinem nennenswerten Verlust.

Bewahrte man den Count Standard allerdings in einem Eppendorf-Gefäß zu sonst gleichen Bedingungen bei 4°C auf, so konnten in diesem Gefäß keine Beads mehr nachgewiesen werden.

Daraus ließ sich ableiten, dass es zu nicht bekannten Interferenzen gekommen sein muss.

Die Beads der einzelnen Messungen waren zunächst zu den Proben in Eppendorf-Gefäßen gegeben worden, bevor sie dann unmittelbar vor der Messung gemeinsam mit der Probe durch

Ergebnisse

ein Zellsieb gefiltert wurden. Möglicherweise kam es hierbei zu einer Ablagerung an der Plastikoberfläche.

Aus den oben gezeigten Daten ist anzunehmen, dass dieses Vorgehen nicht geeignet war und zu Fehlern in der Berechnung führte.

In den folgenden Angaben der absoluten Zellzahlen wird daher auf die zweite Methode zurück gegriffen.

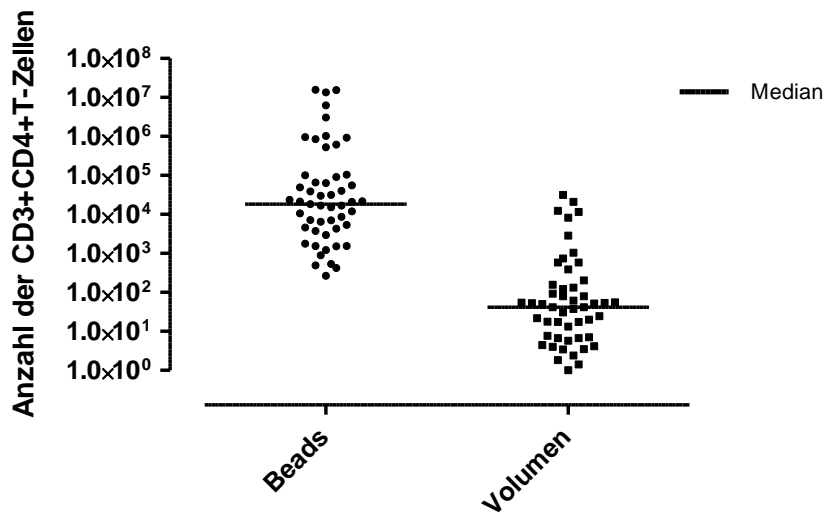


Abbildung 10: Berechnung der absoluten Zellzahl

Die Abbildung zeigt die beiden verschiedenen Methoden der Errechnung der absoluten Anzahl der CD3+CD4+T-Zellen pro 100 ml Urin. Links ist dies mittels des Flow Cytometer Count Standards (Beads) rechts mit Hilfe des aufgenommenen Volumens erfolgt.

3.5 Durchflusszytometrische Analyse der CD3+CD4+T-Zellen in Urin

Ziel der Arbeit war es, die Anzahl der CD3+CD4+T-Zellen im Urin SLE erkrankter Patienten zu messen. Weiterhin sollte die Frage beantwortet werden, ob diese Zellzahl mit der aktuellen Krankheitsaktivität der Patienten korreliert.

Wie zuvor bereits erläutert, wurden die Patienten in eine Gruppe mit Nierenbeteiligung (NB+) und eine Gruppe ohne Nierenbeteiligung (NB-) eingeteilt. Aus der gemessenen Anzahl an CD3+CD4+T-Zellen wurde für die jeweilige Population der Medianwert errechnet. Dieser sowie die Spannweite der Messungen sind der Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: Median und Spannweite der CD3+CD4+T-Zellen der einzelnen Populationen

Population	Median	Minimalwert	Maximalwert
Pat. mit NB (NB+)	41,82	0,00	113352
Pat. ohne NB (NB-)	6,670	0,00	122
gesunde Kontrollgruppe	10,19	0,00	44

In der Gruppe NB+ fanden sich Messungen, in denen eine erhöhte Anzahl von Zellen nachzuweisen war. Im Gegensatz dazu waren sowohl in der Gruppe NB- als auch in der Gruppe der gesunden Probanden keine erhöhten Zellzahlen in den untersuchten Urinproben nachweisbar. Setzt man diese Messungen in Bezug zueinander, so ergibt sich zwischen der Gruppe NB+ und der Gruppe NB- ein signifikanter Unterschied. Gleiches gilt ebenfalls, wenn die Messungen der Patienten NB+ mit denen der gesunden Kontrollgruppe miteinander verglichen werden. Siehe hierzu die Abbildung 11.

Auf Grund des deutlichen Unterschiedes der Anzahl an T-Zellen im Urin und vergleichenden Angaben der Literatur wird in folgenden Abschnitten dieser Arbeit ab einem Wert von > 800 CD3+CD4+T-Zellen /100 ml Urin von einer erhöhten Urinzellzahl gesprochen [73, 107].

Ergebnisse

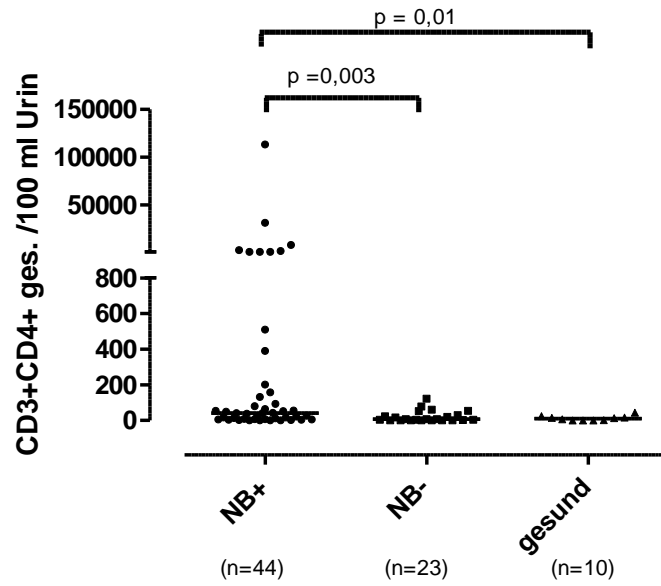


Abbildung 11: CD4+T-Zellen im Urin

Die Abbildung zeigt die Anzahl der CD3+CD4+T- Zellen in 100 ml Urin der Gruppe von SLE Patienten mit Nierenbeteiligung (NB+), der Gruppe von SLE Patienten ohne Nierenbeteiligung (NB-) sowie der gesunden Kontrollgruppe.

3.5.1 Anzahl der T-Helfer Zellen in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität

Um die Frage beantworten zu können, ob die gemessene Anzahl der CD4+T-Helfer-Zellen mit der aktuellen Krankheitsaktivität der Patienten korreliert, wurden diese beiden Parameter miteinander in Bezug gesetzt. Wie in der Abbildung 12 ersichtlich, fand sich eine Korrelation, welche mit Hilfe des Spearman's rho-Testes statistisch überprüft wurde. Hieraus ergab sich ein p-Wert $< 0,0004$ und ein r-Wert $> 0,417$.

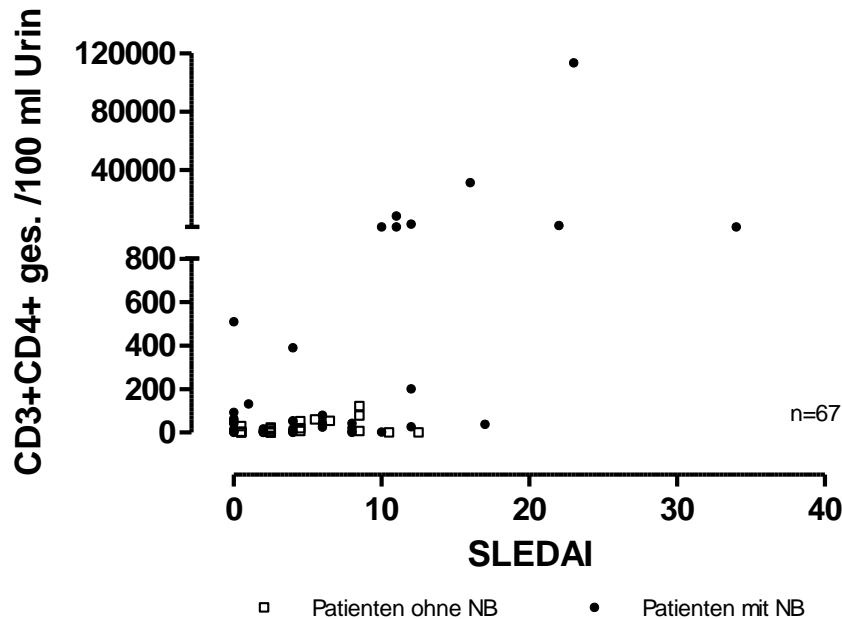


Abbildung 12: Urinzellzahl in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität

Dargestellt ist die Anzahl der CD3+CD4+T -Zellen in 100 ml Urin bezogen auf die Krankheitsaktivität der SLE Patienten. Diese wurde anhand des SLEDAI erhoben.

In der Abbildung 13 ist dieselbe Patientenpopulation aufgetrennt dargestellt. Es wurden Patienten mit Nierenbeteiligung (NB+) von Patienten ohne Nierenbeteiligung (NB-) unterschieden und innerhalb dieser Gruppen eine Einteilung getroffen über deren Krankheitsaktivität zum Zeitpunkt der Studienteilnahme. Hierbei entspricht ein SLEDAI-Punktwert von < 10 leichter bis mäßiger Erkrankung. SLEDAI-Werte ≥ 10 entsprechen erhöhter Krankheitsaktivität [144, 145].

Hierbei ist noch einmal deutlich zu erkennen, dass sich in der Population NB- sowohl bei geringer Erkrankung als auch bei erhöhter Krankheitsaktivität keine relevante Anzahl an CD4+T-Helfer-Zellen nachweisen lässt.

In der Patientengruppe NB+ mit geringer Krankheitsaktivität ergab sich ein Medianwert von 17,31 CD3+CD4+T-Zellen/100 ml Urin. Dieser Wert unterschied sich nicht signifikant von der

Ergebnisse

gering aktiven wie auch der hoch aktiven Gruppe NB- ($p = 0,98$; $p = 0,5$). In der Patientengruppe NB+ mit erhöhter Krankheitsaktivität fand sich jedoch ein signifikant erhöhter Medianwert.

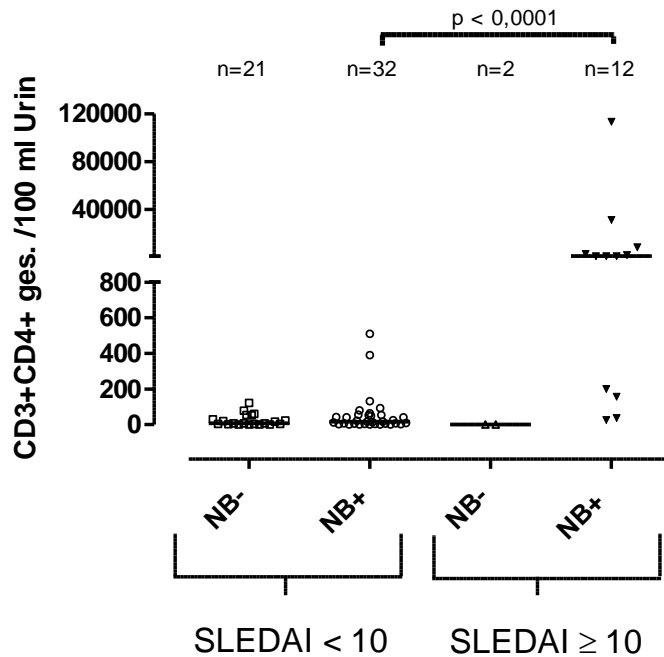


Abbildung 13: Urinzellzahl der Patientensubgruppen

In dieser Abbildung wurde die Anzahl der CD3+CD4+T-Zellen pro 100 ml Urin innerhalb der SLE Patientengruppen mit (NB+) und ohne Nierenbeteiligung (NB-) mit Berücksichtigung der Krankheitsaktivität gemessen anhand des SLEDAI dargestellt.

Im Folgenden wurde die Patientengruppe NB+ auf Grund ihres aktuellen Erkrankungsstatus bezogen auf die Nieren eingeteilt in „hochaktiv“, „gering aktiv“ und „in Remission“ befindlich. Unter die Bezeichnung hochaktiv fielen alle Patienten, welche zwei oder mehr pathologische Parameter des renalen SLEDAI aufwiesen. Als gering aktiv wurden solche gewertet, die nur eine der folgenden Pathologien zeigten: Proteinurie, Pyurie, Harnzylinder oder Hämaturie.

Zu der Gruppe „in Remission“ zählten Patienten der Gruppe NB+, die zum Zeitpunkt der Studienteilnahme keine Auffälligkeiten bezogen auf die Nieren aufwiesen.

Der Abbildung 14 lässt sich entnehmen, dass in der Gruppe NB+ lediglich die Population der hochaktiven Patienten erhöhte Zellzahlen über dem angenommenen cut-off-Wert von 800 CD3+CD4+T-Zellen/100 ml Urin aufwiesen.

Zu vermerken ist hierbei, dass eine Patientin mit einer geringen systemischen Krankheitsaktivität (SLEDAI < 10) einen renalen SLEDAI-Punktwert von 8 aufwies und somit in die Gruppe der „hochaktiven“ gezählt wurde (Urinzellzahl von 400 CD3+CD4+T-Zellen/100 ml Urin).

Ergebnisse

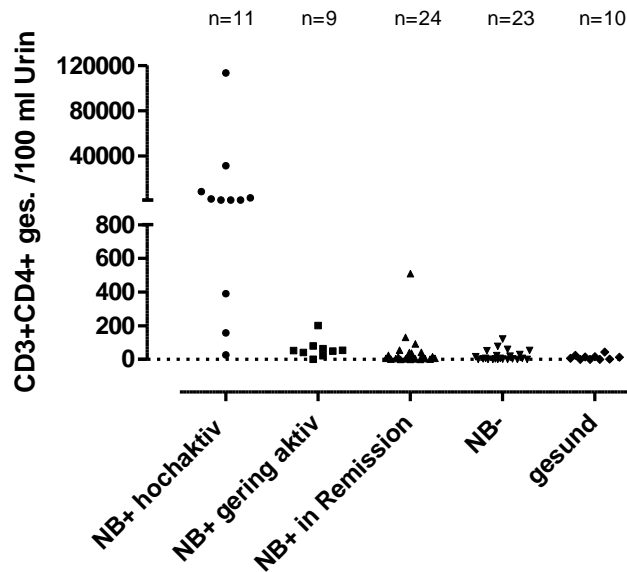


Abbildung 14: Urinzellzahl bezogen auf die Aktivität der Nierenbeteiligung

Dargestellt ist die Anzahl der CD3+CD4+T-Zellen aufgeteilt auf die verschiedenen Patientengruppen; NB+ Patienten mit Nierenbeteiligung; NB- Patienten ohne Nierenbeteiligung; „hochaktiv“ renaler SLEDAI ≥ 8 ; „gering aktiv“ renaler SLEDAI-Wert von 4; „in Remission“ renaler SLEDAI-Wert von 0

Um die Gruppe NB+ mit einem SLEDAI-Wert ≥ 10 (dargestellt in Abb. 13) genauer zu betrachten und der Frage auf den Grund zu gehen, warum in vier der Proben nicht wie erwartet eine erhöhte Anzahl an CD4+T-Helfer-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde diese Population noch einmal einzeln in ihrer aktuellen Krankheitsaktivität nur bezogen auf die Nieren dargestellt (Abbildung 15). Hieraus ergab sich, dass ein Patient trotz bekannter Nierenbeteiligung und zu diesem Zeitpunkt erhöhter Krankheitsaktivität zum Zeitpunkt der Messung keine Auffälligkeiten im Rahmen der Urindiagnostik aufwies und sich daraus vermuten lässt, dass die Niere im Rahmen dieses Schubes nicht in Mitleidenschaft gezogen war. Dieser Patient wies keine erhöhte Urinzellzahl auf.

3.6 Messungen zum gleichen Zeitpunkt einer Nierenbiopsieentnahme

Die Nierenbiopsie gilt neben dem klinischen Langzeitverlauf der Erkrankung als „Gold-Standard“ der Diagnosestellung einer Nierenbeteiligung im Rahmen eines SLE. Da nur mit Hilfe einer Biopsie eine Aussage darüber getroffen werden kann, ob tatsächlich eine Nierenentzündung zu diesem Zeitpunkt vorliegt und wie stark diese ausgeprägt ist, galt den Messungen, die zeitgleich zu einer Nierenbiopsie durchgeführt wurden, besondere Aufmerksamkeit.

Für diese Untersuchung wurden neben eigens erhobener Messungen zuvor noch nicht ausgewertete Daten der Arbeitsgruppe einbezogen und analysiert.

Der Abbildung 16 ist zu entnehmen, dass bei dem Ergebnis einer chronisch interstitiellen Nephritis auf Grund eines Hypertonus keine erhöhte Zellzahl nachweisbar ist.

Die Patienten der beiden übrigen Gruppen befanden sich zum Zeitpunkt der Probenentnahmen mit SLEDAI-Punktwerten ≥ 10 in schwer erkrankten Krankheitszuständen.

Zwölf Patienten wurden mit einer LN Klasse IV der WHO-Klassifikation eingestuft. In den Proben all dieser Patienten konnte eine erhöhte Anzahl an CD3+CD4+T-Zellen nachgewiesen werden.

Die Resultate der Biopsien der letzten Gruppe ergaben eine LN Klasse V der WHO-Klassifikation. Interessanterweise wiesen drei der Patienten keine erhöhten Zellzahlen in den untersuchten Urinproben auf.

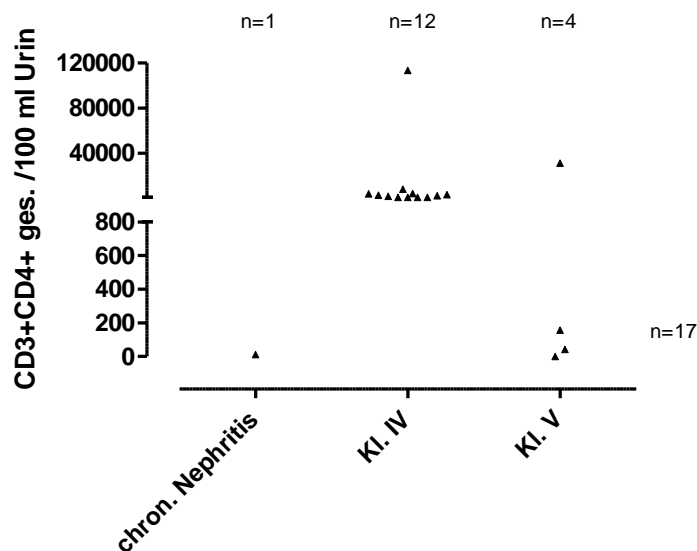


Abbildung 16: Messungen zur gleichen Zeit einer Nierenbiopsieentnahme

3.8 Berechnung der Spezifität und Sensitivität des Verfahrens

Die Spezifität eines diagnostischen Verfahrens gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass eine „negative Wahrheit“ auch als negativ erkannt wird. Für die vorliegende Arbeit bedeutet dies, inwiefern Gesunde auch als gesund angezeigt werden.

Die Untersuchung von T-Zellen im Urin an SLE erkrankten Patienten zeigte alle Gesunden bzw. Patienten mit einem SLEDAI-Punktwert unter zehn als gesund an. Dies beruht auf der Tatsache, dass sowohl in der gesunden Vergleichsgruppe als auch in der Patientenpopulation, welche keine erhöhte Krankheitsaktivität aufwies, keine erhöhte T-Zellzahl im Urin nachgewiesen werden konnte. Aus den Daten der Tabelle 17 errechnet sich somit eine Spezifität des Verfahrens von 100 %.

Tabelle 17: Vierfeldertafel der gesamten Patientenpopulation bezogen auf die systemische Krankheitsaktivität (SLEDAI)

		SLEDAI		Gesamt
		< 10	≥ 10	
CD3+CD4+T-Zellen	keine erhöhte Zellzahl	53	6	59
	erhöhte Zellzahl	0	8	8
Gesamt		53	14	67

Die Sensitivität eines diagnostischen Verfahrens gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine „positive Wahrheit“ durch diesen Test auch als positiv angezeigt wird. Berechnet man die Wahrscheinlichkeit des Testes, eine erhöhte systemische Krankheitsaktivität anzuzeigen, so ergibt sich für die Gesamtheit der 67 Patienten eine Sensitivität von 57 % (s. Tab. 17).

Tabelle 18: Vierfeldertafel der 44 SLE Patienten mit einer Nierenbeteiligung bezogen auf das Anzeigen der systemischen Krankheitsaktivität (SLEDAI)

		SLEDAI		Gesamt
		< 10	≥ 10	
CD3+CD4+T-Zellen	keine erhöhte Zellzahl	32	4	36
	erhöhte Zellzahl	0	8	8
Gesamt		32	12	44

Bezogen auf die 44 SLE Patienten mit einer Nierenbeteiligung errechnete sich eine Wahrscheinlichkeit von 67 %, dass Patienten mit einem SLEDAI-Punktwert über zehn, und somit als Patienten mit erhöhter Krankheitsaktivität gewertet, ein pathologisches Ergebnis

Ergebnisse

aufweisen (vergl. Tab. 18). Der Tabelle 19 ist die renale Krankheitsaktivität der gesamten Patientenpopulation gemessen anhand des renalen SLEDAI zu entnehmen. Berechnet man aus diesen Daten die Wahrscheinlichkeit, dass der Test eine erhöhte renale Krankheitsaktivität anzeigt, so ergibt sich eine Sensitivität von 73 %.

Tabelle 19: Vierfeldertafel der gesamten Patientenpopulation bezogen auf die renale Krankheitsaktivität (rSLEDAI)

		rSLEDAI		Gesamt
		rSLEDAI von 0 - 4	rSLEDAI \geq 8	
CD3+CD4+T-Zellen	keine erhöhte Zellzahl	56	3	59
	erhöhte Zellzahl	0	8	8
Gesamt		56	11	67

Heraus zu heben ist, betrachtet man die Gesamtheit der 67 untersuchten Patienten dargestellt in Tabelle 17 und 19, dass es in keinem der Fälle zu einem falsch positiven Testergebnis gekommen ist.

3.9 CD3+CD4+T-Zellzahlen im Krankheitsverlauf

Sieben der Patienten sind im Verlauf ihrer Erkrankung mehrmals untersucht worden. Vier Patienten zu den Zeitpunkten 0, nach 3 Monaten sowie nach 6 Monaten. Drei der Patienten wurden zum Zeitpunkt 0 sowie letztmalig nach 3 Monaten bezüglich der T-Zellzahl im Urin untersucht.

Wie der Abbildung 19 zu entnehmen ist, zeigte sich bei allen Patienten eine Abnahme der Zellzahl über den Beobachtungszeitraum.

In vier Fällen nahm die Zellzahl unter die Grenze von 800 CD3+CD4+T-Zellen/100 ml Urin ab. Dies war zuvor als Grenze zu erhöhter Zellzahl definiert worden (vergl. Kap. 3.5).

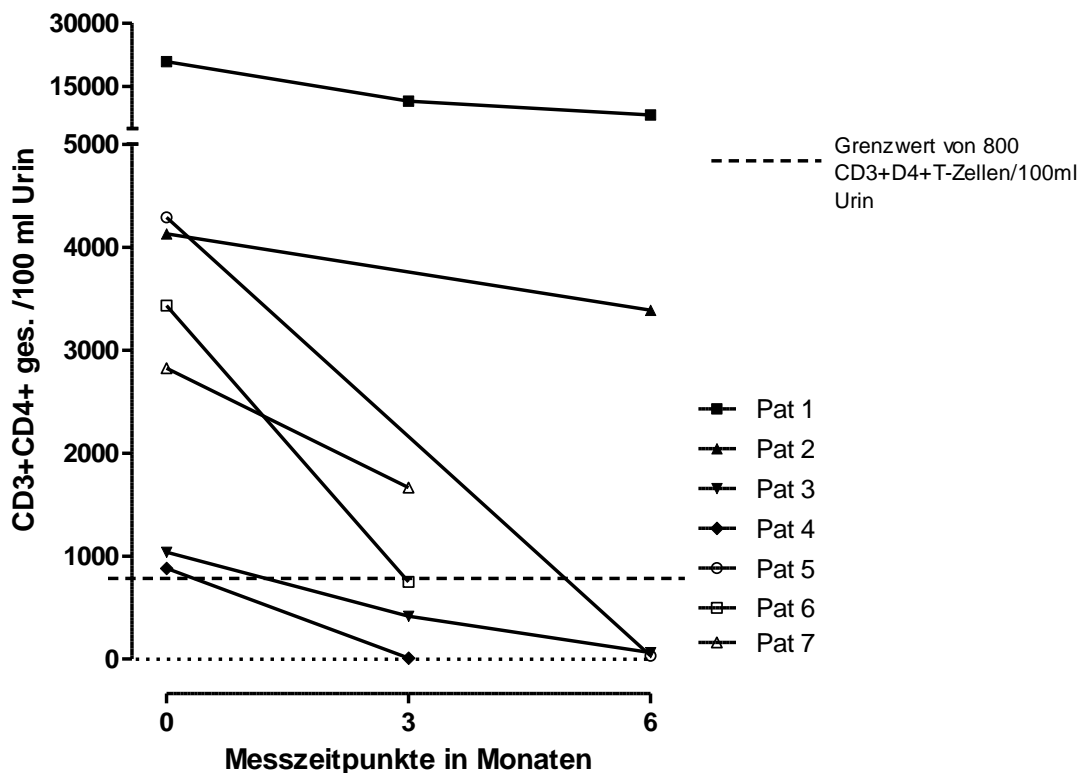


Abbildung 19: Urinzellzahlmessungen im Krankheitsverlauf

In der Abbildung dargestellt ist die CD3+CD4+T-Zellzahl in 100 ml Urin von sieben SLE Patienten zu den Zeitpunkten 0 sowie nach drei bzw. nach sechs Monaten im Krankheitsverlauf. Die gestrichelt Linie zeigt dabei den Grenzwert von 800 CD3+CD4+T-Zellen/100 ml Urin an, welcher zuvor als Grenze erhöhter Urinzellzahlen definiert wurde. (Siehe hierzu Kap. 3.5)

Die Abbildung 20 zeigt die Krankheitsaktivität der im Verlauf beobachteten Patienten zum letzten Zeitpunkt der durchgeführten Messung. Ersichtlich ist hieraus der zuvor bereits in Kap. 3.5.1 beobachtete Zusammenhang zwischen der Urinzellzahl und der Krankheitsaktivität der Patienten.

Ergebnisse

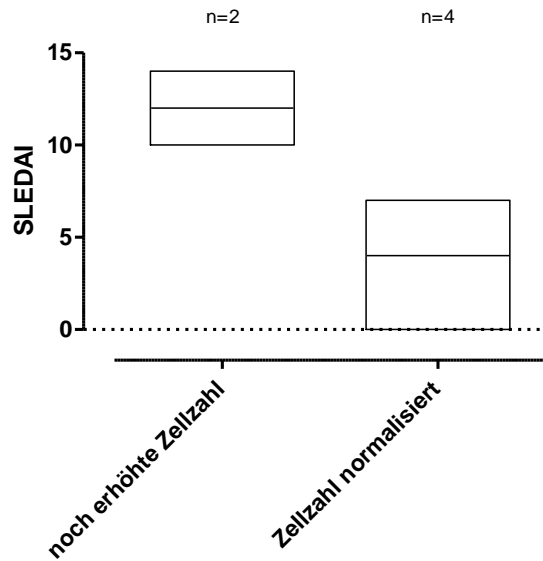


Abbildung 20: Krankheitsaktivität im Verlauf

Dargestellt ist der SLEDAI-Punktwert der im Verlauf beobachteten SLE Patienten. Als noch erhöhte Zellzahl wurde hierbei eine Zellzahl > 800 CD3+CD4+T-Zellen/100 ml Urin gewertet. Patient Nr. 7 musste hierbei ausgeschlossen werden, da keine klare Zuordnung zu einer der beiden Gruppen getroffen werden kann.

Der Tabelle 20 ist die im Zeitraum der Beobachtung verabreichte Menge Prednisolon sowie Cyclophosphamid (Endoxan®) der Patienten zu entnehmen. Auf Grund der geringen Fallzahl wurde bewusst auf eine Korrelationsanalyse verzichtet.

Tabelle 20: Darstellung der Krankheitsaktivität sowie die verabreichte Menge immunsuppressiver Therapie im Beobachtungszeitraum

Pat. Nr.	Beobachtungszeitraum in Monaten	SLEDAI nach 3 Monaten	SLEDAI nach 6 Monaten	verabreichte Menge Prednisolon in mg	verabreichte Menge Endoxan® in mg	Zellzahlverhalten
1	6	13	10	3062,5	2600	erhöht
2	6	-	14	510	4200	erhöht
3	6	2	0	1125	4800	normalisiert
4	3	4	-	5710	0	normalisiert
5	6	-	4	1130	4000	normalisiert
6	3	7	-	5630	1800	normalisiert
7	3	12	-	4930	800	nicht zuordbar

3.10 Charakterisierung der T-Zellen an Hand von Oberflächenmarkern

Die in den Urinproben gemessenen CD3+CD4+T-Zellen wurden im Hinblick auf verschiedene Oberflächenmarker untersucht.

Zunächst galt es die Frage zu beantworten, ob es sich bei diesen Zellen vermehrt um Memory/Effektor-T-Zellen handelt und in welchem Aktivierungszustand sich diese befinden.

Verwendet wurden hierfür die Marker CD45RO und CD69.

- CD45RO ist eine Isoform des CD45 Antigens. Während CD45RA auf naiven Zellen exprimiert wird, lässt sich CD45RO auf Memory/Effektor-T-Zellen finden.
- CD69 (Very early activation antigen) wird innerhalb von Stunden nach T-Zell Aktivierung auf den Zellen hochreguliert.

3.10.1 Memory/Effektor T-Zellen

Im Folgenden werden nur die Daten der Proben dargestellt, welche eine Anzahl von CD3+CD4+T-Zellen über dem festgesetzten Wert von 800 Zellen pro 100 ml Urin aufwiesen.

Im Mittel der sieben gemessenen Proben ergab sich eine relative Expression des CD45RO-Moleküls von 93,47 %.

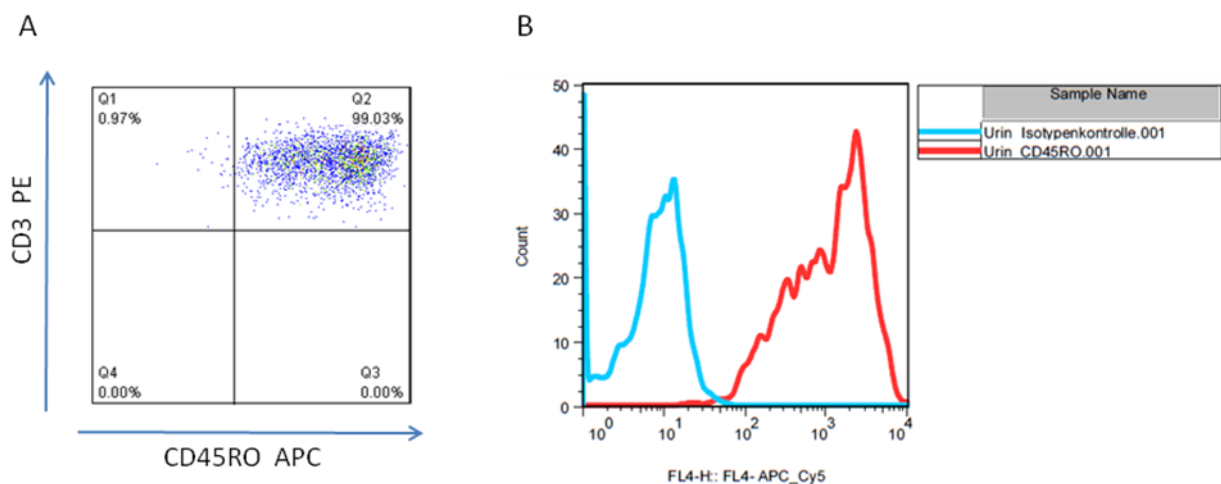


Abbildung 21: FACS-Bilder der CD45RO Färbung

in A) ist die CD45RO Färbung einer Urinprobe als Pseudocolor Punkthistogramm dargestellt; in B) ist die CD45RO Färbung einer Urinprobe mittels einer Histogramm-Darstellung gegen die Isotypenkontrolle aufgeführt

Ergebnisse

Vergleicht man die CD45RO Expression der CD4+T-Helfer-Zellen der Urinproben mit denen der Blutproben, so ergibt sich rechnerisch ein schwach signifikanter Unterschied (p -Wert = 0,051). Ein Trend ist erkennbar. Siehe hierzu die Abb. 22.

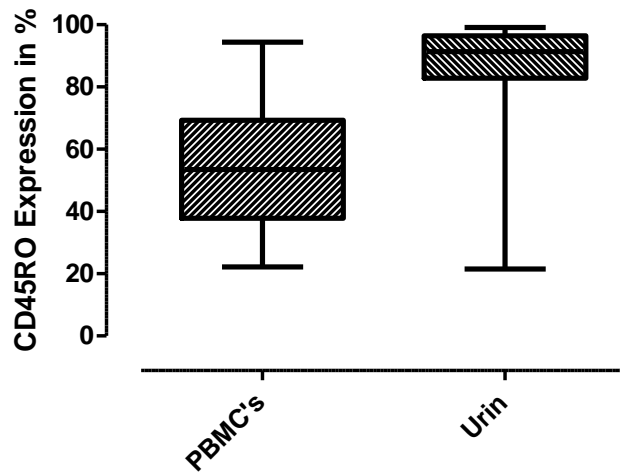


Abbildung 22: Relative CD45RO Expression auf Blut- und Urinzellen

In der Abbildung ist ein Vergleich der relativen CD45RO Expression von Blut- und Urinproben der sieben Patienten, deren CD3+CD4+T-Zellzahl im Urin über 800 Zellen/100 ml Urin lagen, dargestellt.

3.10.2 Aktivierungszustand der CD4+T-Helferzellen

Im Folgenden wurden nur Proben mit einer erhöhten Anzahl an gemessenen T-Helferzellen berücksichtigt. Als Ergebnis konnte eine deutlich erhöhte CD69 Expression nachgewiesen werden. Somit handelte sich in der Mehrzahl der nachweisbaren Zellen um aktivierte T-Zellen. Im Mittel aller Proben errechnete sich ein Medianwert von 77,2 % für die relative CD69 Expression.

Vergleicht man diese Werte mit der CD69-Expression auf CD4+T-Zellen der Blutproben derselben Patienten, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,0006.

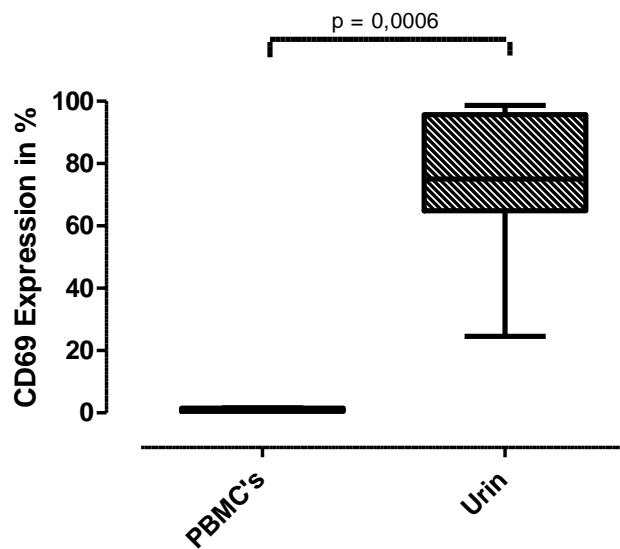


Abbildung 23: Relative CD69-Expression in Blut und Urin

Vergleich der relativen CD69 Expression der Blut- und Urinproben von Patienten, deren CD3+CD4+T-Zellzahl im Urin über 800 Zellen/100 ml Urin lagen

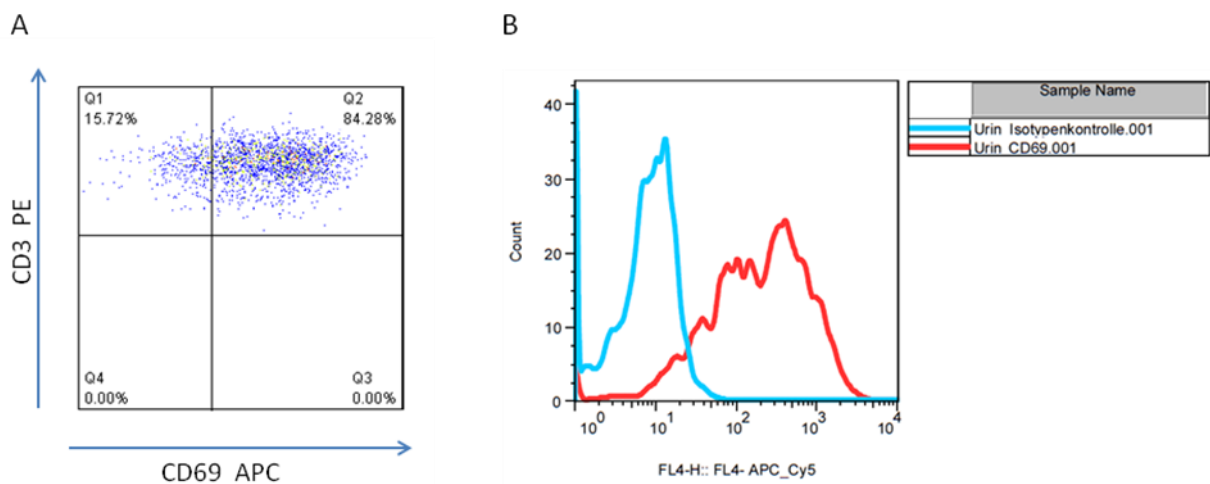


Abbildung 24: CD69 Färbung

in A) ist die CD69 Färbung einer Urinprobe als Pseudocolor Punkthistogramm dargestellt

in B) ist die CD69 Färbung einer Urinprobe mittels einer Histogramm Darstellung gegen die Isotypenkontrolle aufgeführt

3.10.3.2 CCR5

Die relative Expression des Chemokinrezeptors CCR5 zeigte einen Medianwert von 30,52 % auf den untersuchten CD3+CD4+T-Zellen der acht Patienten mit einer Urinzellzahl über 800 CD3+CD4+T-Zellen/100 ml Urin. Vergleicht man diese Werte mit denen der Blutproben derselben Patienten, welche zur selben Zeit entnommen wurden, so ergibt sich zwischen deren Expressionswerten bei einem p-Wert von 0,0379 ein signifikanter Unterschied. (Siehe hierzu die Abbildung 28.)

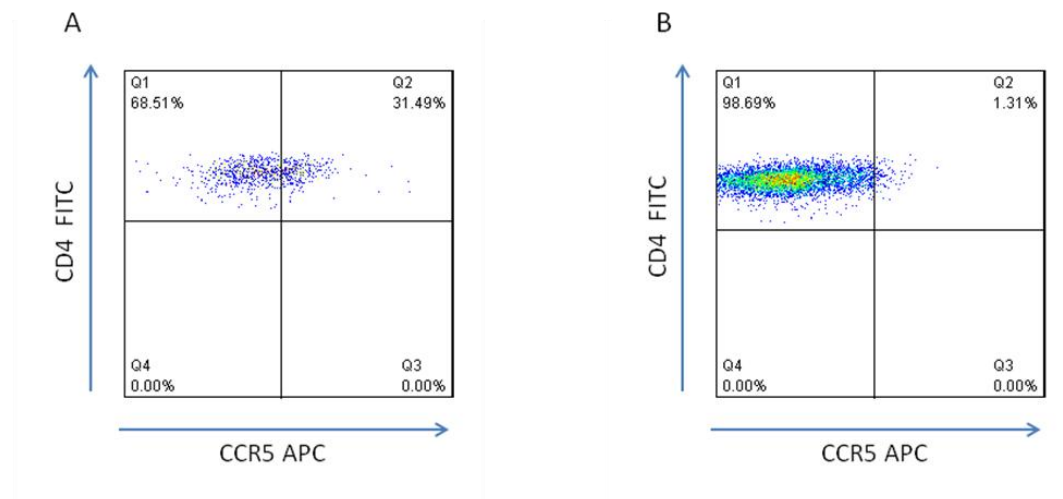


Abbildung 27: CCR5 Färbung

in A) Darstellung der CCR5 Färbung einer Urinprobe als Pseudocolour Punkthistogramm dargestellt
in B) Darstellung einer CCR5 Färbung der peripheren Blutprobe desselben Patienten in einem Pseudocolour Punkthistogramm

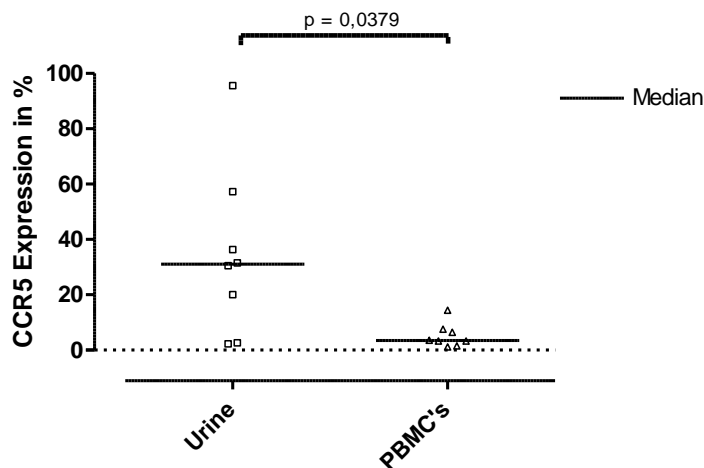


Abbildung 28: Relative CCR5 Expression der Blut- und Urinproben

Vergleich der relativen CCR5 Expression der Blut- und Urinproben von Patienten, deren CD3+CD4+T-Zellzahl im Urin über 800 Zellen/100 ml Urin lagen

In 30 peripheren Blutproben von SLE Patienten wurde eine Färbung der Chemokinrezeptoren durchgeführt. Betrachtet man diese größere Population, so fällt eine im Allgemeinen sehr geringe Expression dieser Chemokinrezeptoren auf im Blut zirkulierenden Lymphozyten auf. Im

Ergebnisse

Vergleich zu diesen Ergebnissen, welche in der Abbildung 29 verdeutlicht sind, scheinen die oben beschriebenen streuenden Werte der CCR1 Expression auf den Urinzellen einen Trend widerzuspiegeln.

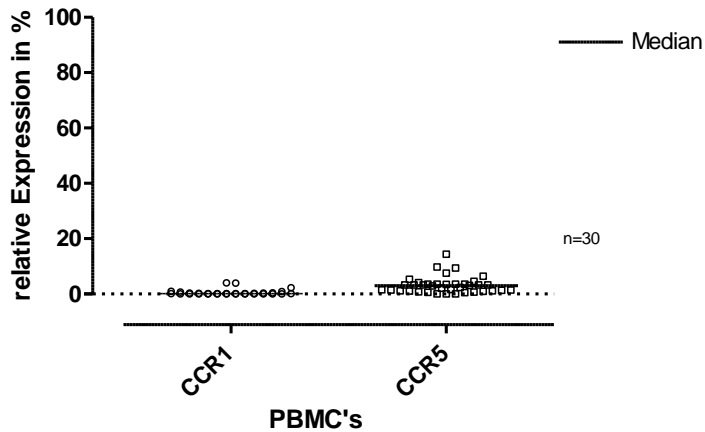


Abbildung 29: Relative Expression der Chemokinrezeptoren auf Blutzellen

Die Darstellung zeigt die relative Expression der Chemokinrezeptoren 1 und 5 auf CD3+CD4+T-Zellen des peripheren Blutes von 30 SLE Patienten

In der Abbildung 30 sind die Expressionswerte der Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 der acht Urinproben, welche eine erhöhte Anzahl CD3+CD4+T-Zellen gezeigt hatten, gegeneinander dargestellt. Auf Grund der geringen Fallzahl ist bewusst auf eine statistische Berechnung verzichtet worden. In vier der acht Proben war es jedoch zu einer erhöhten Expression des CCR5 und nur zu einer sehr geringen Expression des CCR1 gekommen.

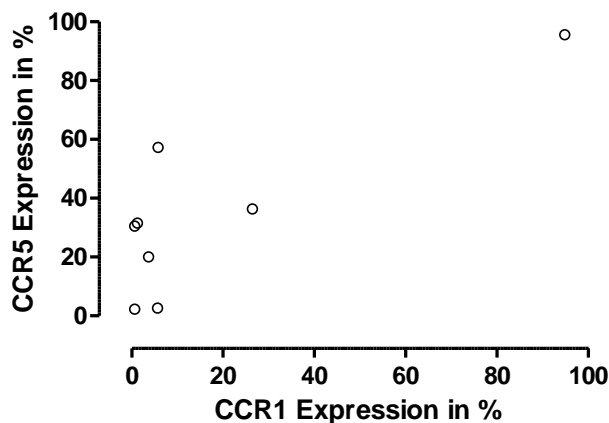


Abbildung 30: Gegenseitiges Verhältnis der relativen Expression von CCR1 und CCR5

Die Abbildung zeigt die 8 Proben, deren CD3+CD4+T-Zellzahl über der Grenze von 800 T-Helferzellen/100 ml Urin liegt. Die relative Expression des CCR1 sowie des CCR5 einer Patientenprobe sind gegeneinander aufgetragen.

4 Diskussion

Die Lupus-Nephritis (LN) ist ein sehr schweres Erkrankungsbild. Da 60-90 % der SLE Patienten im Laufe ihrer Erkrankung eine Nierenbeteiligung (NB) entwickeln und sich ihre Prognose hierdurch deutlich verschlechtert, ist dies ein sehr bedeutender Organbefall und erfordert eine frühzeitige Erkennung und individuell angepasste Therapie [28-31]. Die derzeit genutzte Urinanalyse zur Diagnosestellung einer LN macht es unter Umständen schwierig zu entscheiden, wie schwer die Nieren tatsächlich betroffen sind, und ob eine intensive Immunsuppression gerechtfertigt ist. Auch das Unterscheiden chronischer Schäden gegenüber einem neuen Schub fällt im Krankheitsverlauf mitunter schwer (vergl. Kap. 1.3). Derzeit gilt die Nierenbiopsie als die beste Möglichkeit, eine Aussage über den Status der Nierenerkrankung zu treffen. Da es sich hierbei jedoch um einen invasiven Eingriff handelt, welcher risikobehaftet ist, besteht großes Interesse, neue Marker zur Diagnostik sowie insbesondere zur Verlaufskontrolle der Erkrankung zu etablieren.

Da sich bei einer LN zum Großteil T-Zellen im Interstitium anreichern, wurde die These aufgestellt, dass die dort vermehrt vorkommenden T-Zellen sich auch im Urin der Patienten wiederfinden lassen. Ihr Nachweis im Urin würde einerseits den Pathomechanismus der T-Zell Rekrutierung in die entzündeten Nieren widerspiegeln, als auch als Marker der Nierenerkrankung dienen können.

4.1 Methodik

Die durchflusszytometrische Untersuchung von Urinzellen wird bereits seit den 90er Jahren für verschiedene Erkrankungen experimentell genutzt. Anfänge machten dabei Untersuchungen der Nierentransplantatabstoßung. Aber auch bei anderen renalen Erkrankungen wie beispielsweise der IgA-Nephropathie und der ANCA-assoziierten GN wurde diese Methode bereits herangezogen um Zellsubpopulationen des Urinsediments genauer bestimmen zu können [80, 81, 149-153].

4.1.1 Einflussfaktoren auf den Nachweis von Zellen in Urin

4.1.1.1 Zellüberleben in Urin

Um zu Prüfen inwiefern das Überleben der Zellen über die Dauer des Verbleibens in Urin beeinflusst wird, wurde ein Kinetiktest durchgeführt. Diese Untersuchung zeigte, dass nach dem Verbleib der T-Zellen im Urin über 24 h nur noch 15,76 % lebende Zellen der ursprünglich

vorhandenen Zellzahl zu messen waren. Bereits nach zwei Stunden hatte sich die Anzahl der lebenden Zellen um 34,8 % vermindert. Dies entspricht den Ergebnissen von Stachowski et al., dessen Ergebnisse bereits nach 5 Stunden einen maximalen Verbleib von 33 % der ursprünglichen Zellzahl in Abhängigkeit von der zusätzlich untersuchten Urin-Osmolalität zeigten [153]. Aus den gewonnenen Daten ließ sich schlussfolgern, dass eine Verarbeitung der Urinproben innerhalb der ersten zwei Stunden zu gewährleisten ist, um vergleichbare und auswertbare Daten zu erhalten. Auch zeigt diese Untersuchung, dass sich nur frischer Spontanurin nicht aber Sammelurin zur durchflusszytometrischen Analyse eignet.

In zukünftigen Untersuchungen dieser Fragestellung wäre es wünschenswert, zu jedem Messzeitpunkt in jeder Probe die Urin-Osmolalität sowie den Urin pH-Wert zu bestimmen, um einen möglichen Einfluss dieser Parameter abschätzen zu können.

Da im Zuge der Probengewinnung kein einheitlicher Tageszeitpunkt der Abnahme gewährleistet werden konnte, ist nicht auszuschließen, dass auch der unterschiedlich lange Verbleib des Urins in der Blase Einfluss auf die zu messende Anzahl an Zellen hat.

In der Untersuchung der Oberflächenmarker einschließlich der Chemokinrezeptoren fanden sich unveränderte Werte über die Zeitspanne des Verbleibens in Urin. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die relative Expression der Marker konstant und untereinander vergleichbar ist.

4.1.1.2 Urin-pH und Regelblutung der Frau

Sowohl der Urin-pH-Wert als auch die Regelblutung einer Frau wurden als mögliche Einflussfaktoren auf die Anzahl der lebenden T-Zellen untersucht. Aus den gewonnenen Daten ergab sich keinerlei erkennbarer Einfluss. Die pH-Werte der Urinproben unterlagen einer Normalverteilung, die nicht mit den Werten der lebenden T-Zellen korrelierte und auch bei dem Vergleich der einzelnen Mediane der Gruppen ergaben sich keine Unterschiede. Um die Frage allerdings exakt beantworten zu können, hätte es eines Kinetiktests mit Urinproben unterschiedlicher pH-Werte bedurft.

Der Untersuchungsbefund, dass die Regelblutung einer Frau keinen Einflussfaktor darstellt, macht das Testverfahren für die praktisch-klinische Durchführung anwendbar, da somit nicht eine vermeintlich große Gruppe von Patientinnen ausgeschlossen werden muss.

Da im Urin anders als bei der durchflusszytometrischen Untersuchung von Blut vermehrt Schleim, amorphe und nekrotische Zellüberreste das FACS-Bild überlagern können, wurde das Urinsediment mehrmalig gewaschen und aufgereinigt. Nicht-lymphoide Zellen ändern häufig ihre durchflusszytometrischen Charakteristika, wenn sie sterben und können so fälschlicherweise der Lymphozytenpopulation zugerechnet werden [154]. Tote Zellen färben sich häufig unspezifisch an und verursachen so in der FACS Analyse einen vermehrten unspezifischen Färbehintergrund, der eine exakte Abtrennung der Subpopulationen unmöglich machen kann. Aus diesen Gründen ist es insbesondere bei der Untersuchung von Urinproben von größter Bedeutung, ein Live-Gate zu nutzen. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf das beschriebene schnelle Absterben der Zellen in Urin.

4.1.2 Patientenkollektiv

Die 67 in die Studie aufgenommenen SLE Patienten wurden auf der rheumatologischen Bettenstation, der rheumatologischen Poliklinik sowie der nephrologischen Bettenstation der Charité rekrutiert. Der Frauenanteil von 83,3 % sowie die Altersverteilung entsprechen den in der Literatur angegebenen epidemiologischen Daten des SLE.

Mit SLEDAI Punktwerten zwischen 0 und 44 ist jede Gruppe der Krankheitsaktivität vertreten.

68 % der eingeschlossenen Patienten hatten eine Nierenbeteiligung, was dem erwarteten Prozentsatz entspricht.

Wie bereits beschrieben, waren die Patienten zum Zeitpunkt der Studienteilnahme unterschiedlich schwer erkrankt. Daher unterscheiden sich auch die zu diesem Zeitpunkt verordneten medikamentösen Therapien. Drei der Patienten wurden zu diesem Zeitpunkt erstdiagnostiziert und nahmen keinerlei Medikamente ein, hingegen waren andere Patienten in sehr unterschiedlichen Dosierungen bereits über verschieden lange Zeiträume immunsuppressiv behandelt. Die Art der Immunsuppression wurde im Zuge der Auswertung der Daten nicht gesondert berücksichtigt.

Zusammenfassend ist das Patientenkollektiv in Bezug auf Alters- sowie Geschlechterverteilung und Organmanifestationen als repräsentativ für den SLE zu betrachten.

4.1.3 Festlegung der Krankheitsaktivität

Die Krankheitsaktivität der Patienten wurde anhand des SLEDAI erhoben. Dieser Score gilt auch als zuverlässig, wenn er durch wenig erfahrenes medizinisches Personal bestimmt wird. Um eine mögliche Nierenbeteiligung festzustellen, wurde jede Urinprobe ergänzend zu den klinischen Angaben der Station auf das Vorliegen einer Proteinurie, Leukozyturie und Hämaturie mittels

eines Urinteststreifens untersucht. Wie zuvor in Kapitel 1.3 erläutert, weist dieser Test lediglich eine Sensitivität von 81 % und Spezifität von 47 % auf. Um eine Proteinurie nachzuweisen gilt derzeit der 24-h-Sammelurin als Goldstandard. Eine solche Untersuchung wurde allerdings nicht bei allen 67 in die Studie eingeschlossenen Patienten durchgeführt. Es zeigte sich, dass die mittels Urinsticks bestimmte Eiweißausscheidung teilweise von der im Sammelurin gemessenen stark abwich. Dies bestätigt die in der Literatur angegebenen Daten. Aus diesem Grund wurde, wenn vorliegend, bevorzugt das Ergebnis des 24-h-Sammelurins für die Erhebung des SLEDAI berücksichtigt.

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die untersuchte Leukozyturie nicht mit der CD3+CD4+T-Zellzahl im Urin korreliert. Ebenfalls besteht keine Abhängigkeit zwischen der so gemessenen Leukozyturie und der Krankheitsaktivität der Patienten. Diese Untersuchung führt jedoch zu einem Widerspruch, da mangels besserer Parameter die Leukozyturie für die Berechnung des SLEDAI sowie des renalen SLEDAI herangezogen wurde. Um eine validere Aussage über den aktuellen Status der Nierenbeteiligung treffen zu können, hätte es einer zeitgleichen Nierenbiopsie von jedem der Patienten bei Studienteilnahme bedurft. Die Indikation zu invasiven Maßnahmen dieser Art alleinig auf Grund einer Forschungsfragestellung zu stellen, ist nicht mit ethischen Grundsätzen vereinbar. Somit bleibt letztendlich die Frage, inwiefern die Krankheitsaktivität richtig eingeschätzt wurde, offen.

4.2 Erhöhte T-Zellzahl im Urin von Lupus Patienten

In der Pathogenese der LN kommt es durch die initiale Ablagerung von Autoantikörpern an der BM der Nierenglomeruli zu einer Aktivierung des Komplementsystems sowie der Aktivierung und Ausschüttung weiterer proinflammatorischer und chemotaktischer Moleküle wie beispielsweise der Chemokine. Dies führt zu einer Infiltration durch Entzündungszellen. Immunhistologische Untersuchungen von Nierenbiopsien bei der LN zeigen, dass es sich bei den eingewanderten Leukozyten vor allem um CD4+T-Zellen handelt [72-75]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der infiltrierenden Leukozyten und insbesondere die der T-Zellen im Interstitium der Nieren mit der Klinik und Prognose der Erkrankung korrelieren [48, 73, 76, 77].

In der vorliegenden Studie wurden CD3+CD4+T-Zellen im Urin der Patienten nachgewiesen. Interessanterweise war dies nur in der Gruppe der SLE Patienten mit einer NB (NB+) der Fall. Sowohl in der Gruppe der SLE Patienten NB- als auch in der gesunden Kontrollgruppe fanden sich keinerlei Zellen (vergl. Abb. 11). Dieses Ergebnis ist insbesondere im Hinblick auf die

Nutzung als diagnostischen Marker von besonderer Bedeutung, da somit in den Vergleichsgruppen keine falsch-positiven Messergebnissen vorkamen.

Ob das Vorkommen von T-Zellen im Urin spezifisch für den SLE ist, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Anzunehmen ist jedoch insbesondere im Hinblick auf die zitierte Literatur, dass es auch im Rahmen anderer GN-Formen zu positiven Untersuchungsergebnissen käme (s. hierzu Abschnitt 4.1).

Eine fortführende spannende Fragestellung ist, ob sich entsprechend der aufgestellten These in nicht entzündlich bedingten Nierenerkrankungen wie beispielsweise einer diabetischen Nephropathie keine T-Zellen im Urin nachweisen ließen.

4.3 Bezug der Urinzellzahl zur Krankheitsaktivität

Setzt man die Anzahl der CD3+CD4+T-Zellzahl in Bezug zur aktuellen Krankheitsaktivität der Patienten, so korrelieren diese miteinander ($p < 0,0004$, r-Wert $> 0,417$) (vergl. Abb.12).

Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass T-Zellen im Zuge des akuten Krankheitsgeschehens in entzündete Nieren rekrutiert werden und dass es im Fall einer schweren Erkrankung zu einem Übertreten der Zellen in den Harn kommt.

Dass sich Entzündungszellen im Rahmen von Nierenerkrankungen im Urinsediment nachweisen lassen, unterstützen auch die bereits zuvor erwähnten Arbeiten zu Nierentransplantatabstoßung und anderen proliferativen Nierenerkrankungen. Die aufgestellte These bestätigende Ergebnisse zeigte auch eine Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe, in welcher im Urin schwer erkrankter SLE Patienten mit einer NB CD4+T-Zellen mit einer vermehrten Expression des Chemokinrezeptors CXCR3 nachgewiesen werden konnten [73]. Auch die erst kürzlich von Dolff et al. veröffentlichte Arbeit mit der Urinuntersuchung von 35 SLE Patienten ergab ein vermehrtes Vorkommen von vor allem CD8+T-Zellen im Urinsediment der Patienten mit einer NB [107].

Leider gehen aus dieser Veröffentlichung nur Mittelwerte hervor. Hinzu kommt, dass in dieser Arbeit auf eine Lebendfärbung verzichtet wurde, die als essentiell für eine Beurteilung der im Urin vorkommenden Zellen betrachtet wird.

Spannenderweise wird ein ähnlicher theoretischer Ansatz mit der Untersuchung von Entzündungszellen in der bronchoalveolären Lavage bei entzündlichen interstitiellen Lungenerkrankungen verfolgt. Auch hier werden diese als Spiegelbild der interstitiellen Leukozyteninfiltrate gewertet [155].

4.3.1 Betrachtung der Untergruppen

Unterteilt man die Gruppe der Patienten mit NB in solche mit geringer bis mäßiger Krankheitsaktivität (SLEDAI < 10) und solche mit hoher Krankheitsaktivität (SLEDAI \geq 10), so zeigen sich nur bei den aktuell schwer erkrankten Patienten erhöhte Zellzahlen von über 800 CD3+CD4+T-Zellen/100 ml Urin. Bei den gesunden Probanden und auch bei den Patienten ohne eine NB liegen die Werte unter 200 CD3+CD4+T-Zellen/100 ml Urin. Dieser Wert wurde in der weiteren Auswertung als nicht erhöht und somit als negativer Befund eingestuft. Statistisch spiegelt ein p-Wert von < 0,0001 den Unterschied zwischen den beiden Gruppen von Patienten mit NB wieder (vergl. Abb. 13).

Diese untere Grenze des Nachweises von Zellen stimmt mit den Arbeiten von Dolff et al. und Enghard et al. überein [73, 107].

Die Grenze, ab wann von einer erhöhten Zellzahl gesprochen werden kann, wird allerdings unterschiedlich angegeben. So nutzt Enghard et al. ebenfalls eine Zellzahl > 800 CD4+T-Zellen/100 ml Urin. Dolff et al gibt in der Gruppe von 11 Patienten mit NB einen Mittelwert von 13400/100 ml Urin an, wobei die Streuung der Daten nicht ersichtlich ist und auf eine Grenze zu negativen Ergebnissen nicht eingegangen wird.

Neben der bereits beschriebenen Teilung in einen positiven und negativen Nachweis von Zellen fielen in der Betrachtung der Gruppe NB+ zwei Messungen von Patienten auf, deren SLEDAI-Punktwert unter 10 lag und deren Zellzahl im Urin mit 390 und 510 CD3+CD4+T-Zellen zwischen den bereits beschriebenen Grenzen lag (vergl. Abb. 13).

Eine der Patientinnen hatte zwar einen niedrigen gesamt SLEDAI-Wert, wurde jedoch in dem nur die Niere betrachtenden renalen SLEDAI als „hochaktiv“ (rSLEDAI \geq 8) eingestuft.

Es ließe sich vermuten, dass bei dieser Patientin zum Zeitpunkt der Studienteilnahme ein entzündliches Geschehen an den Nieren stattfand, welches mittels der derzeitigen diagnostischen Möglichkeiten nicht eindeutig eingeordnet werden kann. Wie diese Ergebnisse zu interpretieren sind und inwiefern diese einen Vorhersagewert auf die weitere Entwicklung des SLE und der Nierenerkrankung haben, bleibt auf Grund der sehr geringen Fallzahl von zwei Werten ausstehend.

Spannenderweise zeigten sich in der Gruppe der Patienten mit einer NB und einer erhöhten Krankheitsaktivität allerdings nicht nur wie erwartet positive Messergebnisse. Vier der 12 Patienten hatten keine erhöhten Urinzellzahlen.

In einer weiteren Betrachtung dieser Gruppe NB+ in Bezug auf ihre aktuelle entzündliche Aktivität der Nieren anhand des renalen SLEDAI, zeigte sich, dass zwei der vier negativen Messungen keine Auffälligkeiten bezüglich der standardmäßig durchgeführten Urinalysen aufwiesen (s. hierzu Abb. 14 und 15).

Es bleibt zu überlegen, ob es bei jedem SLE Patient, der einmalig eine NB im Zug eines Schubes gezeigt hatte, bei jedem weiteren Schub in der Zukunft zu einer erneuten NB kommen muss. Zugegebenermaßen ist die Wahrscheinlichkeit einer erneuten Manifestation in einem zuvor betroffenen Organ womöglich höher. Es existieren jedoch keine Untersuchungen, die dies genauer betrachten.

Umgekehrt lässt sich der Fall konstruieren, dass sich bei einem Patienten Auffälligkeiten in der Urinuntersuchung zeigen, diese jedoch zusammengenommen mit anderen Parametern nicht einen SLEDAI Punktwert ≥ 10 ergeben und somit in der klinischen Praxis nicht unweigerlich als erhöhte Krankheitsaktivität eingestuft werden. Ob sich jedoch eine unterschwellige entzündliche Aktivität an den Nieren abspielt, würde somit unterschätzt werden.

Ausgehend von diesem Gedankenkonstrukt, dass die systemische und die Nieren-spezifische Krankheitsaktivität eines Patienten sich in jedem Schub wieder getrennt voneinander verhalten können, kann die Vermutung geäußert werden, dass die gemessenen Zellzahlen im Urin eventuell eher die aktuelle Entzündung der Nieren widerspiegelt als der SLEDAI. Auf Grund der geringen Fallzahl und fehlender Biopsiedaten dieser Patienten bleiben diese Vermutungen jedoch spekulativ und weisen auf die Notwendigkeit hin gezielt Langzeitverläufe zu erheben.

4.4 Oberflächenmarker CD45/CD69

Um zu überprüfen, ob es sich bei den im Urin gefundenen Zellen tatsächlich wie erwartet um aktivierte und Memory/Effektor T-Zellen handelt, wurden die Oberflächenmarker CD69 und CD45RO auf den zu untersuchenden Zellen angefärbt.

Wie die Ergebnisse dieser Studie zeigen, fand sich auf den untersuchten Urinzellen eine erhöhte Expression dieser beiden Oberflächenmarker. Daraus lässt sich schließen, dass es sich in der Mehrzahl der Zellen um aktivierte Memory/Effektor T-Zellen handelt. Im Gegensatz dazu fanden sich diese hohen Expressionsraten von CD69 und CD45RO nicht auf den T-Zellen des peripheren Blutes derselben Patienten.

Sakatsume et al. zeigte in seiner Arbeit ebenfalls, dass die Mehrzahl der im Urin nachweisbaren T-Zellen bei glomerulär entzündlichen Erkrankungen (u. a. einschließlich der idiopathischen GN, der IgA Nephropathie, der Purpura Schoenlein Hennoch Nephritis, der ANCA assoziierten

GN sowie der Minimal Change GN) vom Effektor Typ sind (CD62L-CD45RO+) und den selben Phänotyp aufweisen wie die infiltrierenden T-Zellen in und um die Nierenglomeruli [152]. Ähnliche Ergebnisse ergaben auch Untersuchungen der ANCA assoziierten GN durch Abdulahad et al., bei der ein erhöhtes Vorkommen von Memory-Effektor (CD45RO+CCR7-CD3+CD4+) T-Zellen im Urin der Patienten nachgewiesen werden konnte [156].

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Urinzellen ein Korrelat der in die Niere eingewanderten Entzündungszellen darstellen und nicht aus eventuell verletzten Gefäßen in den Urin übergetreten sind.

Auch lässt dieses Ergebnis vermuten, dass die Aktivierung der T-Zellen erst in der Niere erfolgt, und nicht, dass im Blut aktivierte Zellen in die Nieren einwandern. Der Mechanismus der Aktivierung wurde in dieser Arbeit jedoch nicht näher untersucht.

Eine Betrachtung, ob die absolute Anzahl der CD69+T-Helferzellen der gesamten Patientenpopulation eine noch engere Korrelation zu der Krankheitsaktivität ergibt, wurde auf Grund einer anstehenden Veröffentlichung in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt.

4.5 Spiegelt die CCR1- und CCR5-Expression auf den T-Zellen den pathophysiologischen Prozess der T-Zell-Rekrutierung wider?

Der Theorie nach müssten sich auf den im Urin nachgewiesenen Zellen die zur Einwanderung in entzündete Gewebe erforderlichen Oberflächenmoleküle finden lassen. In histologischen Schnitten Lupus erkrankter Nieren ließ sich eine erhöhte CCR1 und CCR5 Expression nachweisen. Die Blockade des CCR1 durch BX471 führte zu einer deutlichen Verminderung der Leukozyteninfiltrate. Auch zeigten Studien, dass das Vorkommen eines bestimmten CCR5 Phänotyps mit einem erhöhten Risiko, eine LN zu entwickeln, verbunden ist (vergl. hierzu Kap. 1.4.1).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Chemokinrezeptoren auf den Urinzellen im Gegensatz zu den T-Zellen des Blutes erhöht exprimiert sind. Ein deutlicherer Unterschied fand sich hierbei für den Rezeptor CCR5 ($p = 0,038$).

Spannenderweise zeigte sich, dass nicht zwangsläufig auf ein und derselben untersuchten Probe beide Chemokinrezeptoren gleichermaßen hoch exprimiert sein müssen. Vielmehr fanden sich Proben, bei denen insbesondere einer der beiden Rezeptoren besonders hochreguliert ist (siehe hierzu Abb. 30). Die Ergebnisse bestätigen, dass sich der pathophysiologische Prozess der Leukozytenrekrutierung in die Nieren durch die Zellen im Urin widerspiegelt. Weiterführend kann spekuliert werden, dass die Expression einer der Chemokinrezeptoren ausreicht, um in das entzündete Gewebe einzutreten.

Im Hinblick auf das kleine Probenkollektiv mit stark erhöhten Urinzellzahlen sind die Resultate allerdings nur eingeschränkt verallgemeinerbar. Eine größere Probensammlung stand für die Untersuchung der Chemokinrezeptoren auf den Blutzellen zur Verfügung. Hier fand sich eindrücklich eine homogen geringe Expressionsrate der Chemokinrezeptoren.

Offen für zukünftige Untersuchungen bleibt, ob sich auch eine Blockade des CCR5 als therapeutische Intervention nutzen ließe.

4.6 Nierenbiopsien zum Zeitpunkt der Messungen

Aus der Schwierigkeit heraus, eine Aussage über das aktuelle Geschehen in den Nieren treffen zu können, wurden die Messungen mit vorhandenen zeitgleichen Nierenbiopsien verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung legen eindrücklich dar, dass in der Gruppe der WHO LN Kl. IV alle 12 Proben eine erhöhte Urinzellzahl aufweisen. In der Gruppe der LN Kl. V zeigen drei der vier Proben keine relevanten Zellzahlen im Urin. Auch bei dem Biopsieergebnis einer chronischen Nephritis finden sich keine Zellen im Urin.

Eine mögliche Erklärung dieser Untersuchungsergebnisse liegt möglicherweise in den unterschiedlichen histologischen Korrelaten der Klassen der LN. So schädigen bei der LN Kl. IV die Immunkomplexablagerungen zunächst das Endothel. Folge hiervon ist eine Exsudation und Leukozytenakkumulation in den betroffenen Glomeruli und ihrer Umgebung. Im Gegensatz dazu kommt es bei der Kl. V vor allem zu cytotoxischen Schädigungen der Podozyten und daraus folgend zu einer membranösen Schädigung sowie einer nicht exsudativen Entzündung der Glomeruli. Das heißt Leukozyteninfiltrate sind insbesondere ein Zeichen der Kl. IV der LN. Dem Nachweis von Leukozyten im Urin der erkrankten Patienten liegt die Annahme zu Grunde, dass genau diese eingewanderten Leukozyten in den Urin ausgewaschen werden. Mit dieser Theorie wäre vereinbar, dass dies nicht der Fall ist, wenn keine größeren Leukozyteninfiltrate vorhanden sind.

Diese Theorie bestätigt auch eine Untersuchung von Hotta et al., der nur in proliferativen Glomerulonephritiden nicht aber in non-proliferativen erhöhte Anzahlen von Makrophagen in dem Urin der Patienten nachweisen konnte [157].

Um zu erklären, wie es bei einer der Proben, die zum Zeitpunkt der Studienteilnahme als Kl. V diagnostiziert wurde, doch zu einem Nachweis erhöhter Zellzahlen im Urin kam, hilft vielleicht die Erklärung, dass die Nierenbiopsie nur den Bereich der Niere widerspiegelt, welcher biopsiert wurde. Es ist nicht selten, dass es insbesondere bei längerem Krankheitsverlauf zum Vorliegen beider Formen einer Kl. IV und Kl. V zur gleichen Zeit kommt [158]. Auch ist bekannt, dass es nicht zu einem homogenen entzündlichen Geschehen in der gesamten Niere kommen muss.

Dieses globale Geschehen kann eine Nierenbiopsie eines Bereiches der Nieren nicht widerspiegeln.

Wichtig sind diese Ergebnisse der Arbeit insbesondere im Hinblick darauf, dass vor allem die LN Kl. IV einen schweren und mitunter schnellen Krankheitsverlauf hat. Insbesondere für diese Untergruppe sind eine schnelle Diagnosestellung und ein schneller Therapiebeginn von großer Bedeutung.

4.7 Urinzellzahlen im Krankheitsverlauf

Die Untersuchung der Urinzellzahlen im Krankheitsverlauf zeigte, dass es in allen Fällen über den Beobachtungszeitraum von drei bzw. sechs Monaten zu einem Abfall der T-Helferzellen kam.

Vier der Patienten waren zum Abschluss der Untersuchung unter den Grenzwert von 800 CD3+CD4+T-Zellen abgefallen und zeigten eine deutliche klinische Besserung. Zwei Patienten wiesen auch noch nach 6 Monaten deutlich erhöhte Urinzellzahlen auf. Beide Patienten hatten zu diesem Zeitpunkt auch noch einen erhöhten SLEDAI-Punktwert und damit eine erhöhte Krankheitsaktivität.

Bezieht man die Ergebnisse des vorhergehenden Abschnittes mit ein, so scheinen Patienten mit einer LN der Kl. IV im Verlauf ihrer Erkrankung entsprechend ihrer Krankheitsaktivität Zellen im Urin zu zeigen. Insbesondere diese Gruppe, deren immunsuppressive Therapie von immenser Bedeutung für die Erhaltung der Organfunktion ist, könnte so im Verlauf der Therapie beobachtet werden. Die Hoffnung besteht durch diesen zusätzlichen Parameter eine bessere individuelle Anpassung der Therapie zu ermöglichen und so eine Unter- genauso wie eine Übertherapie zu vermeiden.

In den untersuchten Krankheitsverläufen konnte auf Grund der geringen Fallzahl keine genauere Betrachtung des Zusammenhangs zwischen verabreichter Therapie und einem Abfall der Zellzahl erfolgen.

Nicht auszuschließen ist, dass der Nachweis von Lymphozyten in Urin auch Ausdruck eines chronischen Schadens ist.

Da es sich in der untersuchten Population um eine sehr geringe Fallzahl handelt, ist zu beachten, dass die Ergebnisse nur eingeschränkt interpretier- und verallgemeinerbar sind. Die immense Bedeutung der Langzeitverläufe neben zeitgleich durchgeführten Nierenbiopsien macht eine Fortführung der Untersuchung notwendig.

4.8 Sensitivität und Spezifität der CD3CD4-Messung als diagnostisches Verfahren

Mit Hilfe der Sensitivität und Spezifität eines Verfahrens ist es möglich, dessen Güte zur Krankheitsklassifikation näher zu beschreiben. Ist für ein Messverfahren die Summe von Sensitivität und Spezifität kleiner als Eins so sind Fehlklassifikationen wahrscheinlicher als richtige Einstufungen. Ein solches Verfahren ist nicht brauchbar. Ist die Zahl allerdings größer als Eins so hat das Messverfahren einen gewissen Klassifikationswert. Ab welchem Wert ein Verfahren als gut eingestuft werden kann, ist pauschal nicht zu sagen und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Chiang et al. schlagen beispielsweise für die Sensitivität einen Wert von 0,90 und für die Spezifität einen Wert von 0,95 vor. Copeland et al. berichtet hingegen von Werten, die weit darunter liegen [159].

Für das untersuchte Verfahren der T-Zell Messung in Urin von Lupus Patienten ergab sich eine Spezifität von 100 %. Die Sensitivität wurde bezogen auf 44 Patienten der Gruppe NB+ mit einem Wert von 67 % errechnet. Ein Problem dieser Berechnungen besteht darin, dass ein SLEDAI Punktwert ≥ 10 als Bezugspunkt für das Erkranktsein herangezogen wurde. Ziel des Testes ist es allerdings nicht, einen erhöhten SLEDAI anzuzeigen, sondern den aktuellen Erkrankungsstatus der Nieren. Da jedoch nicht von allen Messungen eine parallele Nierenbiopsie vorhanden ist, welches als bestes diagnostisches Mittel hierfür in Frage käme, ist der errechnete Wert nur eingeschränkt aussagekräftig. Um diesem Tatbestand Rechnung zu tragen, wurde auch eine Berechnung mit dem renalen SLEDAI als Bezugspunkt durchgeführt, wobei dies eine Sensitivität von 73 % ergab.

4.9 Vergleich zu bereits vorhandenen Biomarkern

Auf Grund der Aktualität dieses Themas ist eine große Zahl an Biomarkern für eine LN beschrieben. Aus den meisten Veröffentlichungen gehen nur die Mittelwerte mit der Standardabweichung der Marker hervor. Die Spannweite und insbesondere die Streuung der einzelnen Daten ist somit zumeist nicht ersichtlich. Die Einzelwerte der untersuchten Populationen sind in der Mehrzahl der Studien nicht publiziert. So ist eine positiv/negativ Aussage mit einem Cut-off-Wert des untersuchten Markers häufig nicht zu treffen. Es bleibt die Frage offen, inwiefern ein spezifischer Wert etwas über die Erkrankung eines einzelnen Patienten aussagt.

Größere longitudinale Studien mit Patienten unterschiedlicher Herkunft stehen noch aus. Auch eine Untersuchung durch verschiedene unabhängige Forschungsgruppen wäre erstrebenswert.

Ein neuer Biomarker sollte sich an Hand einer guten Sensitivität und Spezifität des Verfahrens messen können.

Es sollte auch die Frage falsch positiver sowie falsch negativer Testungen beantwortet werden.

Bestehen bleibt das Problem, dass ohne eine Biopsie die histologischen Klassen nicht voneinander unterschieden werden können. Und somit die Biopsie vorerst als „Goldstandard“ bestehen bleibt.

4.10 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich im Urin von SLE Patienten CD3+CD4+T-Zellen finden lassen und diese mit der Krankheitsaktivität korrelieren. Die Urinzellzahl scheint die Leukozyteninfiltration in den entzündeten Nieren beim SLE widerzuspiegeln und somit insbesondere für die mitunter schwer verlaufende LN der Kl. IV ein zukunftsversprechender Marker zu sein. Möglicherweise ließe sich die Effizienz von Therapien gegen eine GN, welche mit einer Leukozyteninfiltration einhergeht, hierdurch monitoren und eine Exazerbation ohne das Durchführen einer Rebiopsie diagnostizieren.

Mit einer Spezifität von 100 % und einer Sensitivität von 67 - 73 % besteht ein ausreichender Klassifikationswert dieses Messverfahrens.

Da berichtet wurde, dass es nicht selten zu einem Wechsel der WHO Klassen im Laufe der Erkrankung kommen kann, und die Nierenbiopsie einen lokalen Einblick in das Erkrankungsbild der Nieren liefert, besteht die Hoffnung, durch die Analyse der in den Urin ausgeschwemmten Zellen einen globalen Marker zu erhalten.

In zukünftigen Studien müsste hinreichend untersucht werden, welche Bedeutung eine Urinzellzahl zwischen den angegebenen Grenzen hat und welchen prädiktiven Vorhersagewert diese Untersuchung für einen drohenden Schub besitzt.

Weiterhin gilt es, die Frage zu untersuchen, was eine nach Abschluss der Akuttherapie erhöhte T-Zellzahl im Urin bedeutet. Vermuten ließe sich eine Wertung als fehlendes Ansprechen auf die Therapie oder aber als ein Ausdruck einer chronischen Schädigung der Nieren.

Um die Aussagekraft dieses Messverfahrens im Hinblick auf die offen gebliebenen Fragen weiter zu prüfen, ist es von Bedeutung weitere Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv fortzuführen und diese insbesondere mit zeitgleichen Nierenbiopsien und Langzeitverläufen in Bezug zu setzen.

Ziel weiterführender Projekte ist es ebenfalls, die Spezifität für das Auftreten einer Lupus-Nephritis im Gegensatz zu anderen GN sowie der diabetischen Nephropathie zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Die Lupus-Nephritis (LN) ist ein schwerwiegender Organbefall des SLE, der die Prognose der Patienten maßgeblich verschlechtert. Im Zuge dieser Entzündung kommt es insbesondere bei der LN der WHO Klasse IV vermehrt zu einer Anreicherung von vor allem T-Zellen im Interstitium der Nieren. Auf Grund dessen wurde die These aufgestellt, dass die vermehrt vorkommenden T-Zellen sich auch im Urin der Patienten wiederfinden lassen und somit einerseits den Pathomechanismus der T-Zell Rekrutierung in die entzündeten Nieren widerspiegeln als auch als Marker für die Erkrankung der Nieren dienen können.

Es wurden 67 Blut- und Urinproben von SLE Patienten der Charité im Rahmen dieser Studie durchflusszytometrisch untersucht. Des Weiteren wurden 10 gesunde Probanden als Kontrollgruppe rekrutiert. Urinproben bei nachweislichem Harnwegsinfekt wurden ausgeschlossen. Von diesen 67 Patienten wiesen 44 eine Nierenbeteiligung auf, 23 der teilnehmenden Patienten hatten zu keinem Zeitpunkt des SLE eine Nierenerkrankung im Sinne einer LN gezeigt. Zu den Kriterien eine Nierenbeteiligung festzustellen zählten eine parallel durchgeführte Nierenbiopsie zum Zeitpunkt der Studienteilnahme, welche Zeichen einer LN belegt, sowie eine abnorme Urinanalysen wie eine vermehrte Proteinurie, Hämaturie, Pyurie und das Vorkommen von Harnzylindern bei Patienten, die in einer früheren Nierenbiopsie eine LN gezeigt hatten. Die aktuelle Krankheitsaktivität der Patienten wurde an Hand des SLEDAI ermittelt.

Als Ergebnis zeigt sich ein vermehrtes Vorkommen von CD3+CD4+T-Zellen bei SLE Patienten mit einer Nierenbeteiligung. Weder in der Gruppe der Patienten ohne eine Nierenbeteiligung noch in der gesunden Kontrollgruppe finden sich erhöhte Urinzellzahlen ($p = 0,003$). Spannenderweise besteht eine sehr enge Korrelation der Anzahl der T-Helferzellen mit der Krankheitsaktivität der Patienten (p -Wert $< 0,0004$; r -Wert $> 0,417$).

Die Hypothese dieser Arbeit unterstützend lassen sich in der Gruppe der Patienten mit einer Nierenbeteiligung die erhöhten Urinzellzahlen nur bei Patienten mit einer aktuell aktiven Erkrankung nachweisen ($p < 0,0001$). Bei den gemessenen Urinzellen handelt es sich in der Mehrzahl um aktivierte Memory/Effektor T-Zellen, deren Anteil im peripheren Blut zum gleichen Zeitpunkt sehr gering ist ($p = 0,006$ und $p = 0,051$). Ebenfalls sind die Chemokinrezeptoren 1 und 5 auf den T-Zellen des peripheren Blutes sehr geringe exprimiert. Bei Betrachtung dieser beiden Rezeptoren auf im Urin nachgewiesenen T-Zellen findet sich für CCR5 eine signifikant höhere Expression ($p = 0,038$), für CCR1 lässt sich ein Trend zu Gunsten eines vermehrten Vorkommens auf Urinzellen beobachten ($p = 0,052$).

Zusammenfassung

Mit dem histologischen Bild sowie dem vermuteten Pathomechanismus der verschiedenen WHO LN Klassen übereinstimmend, zeigen sich in der Betrachtung der zeitgleich durchgeführten Nierenbiopsien erhöhte Urinzellzahlen in allen 12 Fällen einer LN Klasse IV. In der WHO Klasse V waren drei der vier Messungen negativ. Auch bei dem Nachweis einer chronischen Nephritis ließen sich keine Urinzellen nachweisen.

In der Beobachtung von sieben der Patienten über einen Zeitraum von 3 bzw. 6 Monaten zeigt sich bei allen korrelierend zu ihrer Krankheitsaktivität eine Abnahme der Urinzellzahl.

Prüft man das Vorkommen von CD3+CD4+T-Zellen im Urin von SLE Patienten als einen Biomarker der LN, so errechnet sich für dieses Verfahren eine Spezifität von 100 %. Die Sensitivität kann mit Werten zwischen 67 und 73 % angegeben werden. Es ergeben sich hierbei vier falsch-negative und null falsch-positive Testergebnisse.

Ziel fortführender Studien sollte es sein, Untersuchungen an einer größeren Patientenpopulation durchzuführen, um die Ergebnisse aussagekräftiger und eventuell für die klinische Praxis anwendbar zu machen.

6 Literaturverzeichnis

1. D'Cruz, D.P., M.A. Khamashta, and G.R.V. Hughes, *Systemic lupus erythematosus*. *Lancet*, 2007. **369**(9561): p. 587-596.
2. Tikly, M. and S.V. Navarra, *Lupus in the developing world - is it any different?* *Best Practice & Research In Clinical Rheumatology*, 2008. **22**(4): p. 643-655.
3. Gabriel, S.E. and K. Michaud, *Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases*. *Arthritis Research & Therapy*, 2009. **11**(3).
4. Pons-Estel, G.J., et al., *Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus*. *Semin Arthritis Rheum*. **39**(4): p. 257-68.
5. Naleway, A.L., et al., *Epidemiology of systemic lupus erythematosus in rural Wisconsin*. *Lupus*, 2005. **14**(10): p. 862-6.
6. Nightingale, A.L., R.D. Farmer, and C.S. de Vries, *Incidence of clinically diagnosed systemic lupus erythematosus 1992-1998 using the UK General Practice Research Database*. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2006. **15**(9): p. 656-61.
7. Peschken, C.A. and J.M. Esdaile, *Systemic lupus erythematosus in North American Indians: a population based study*. *J Rheumatol*, 2000. **27**(8): p. 1884-91.
8. Stahl-Hallengren, C., et al., *Incidence studies of systemic lupus erythematosus in Southern Sweden: increasing age, decreasing frequency of renal manifestations and good prognosis*. *J Rheumatol*, 2000. **27**(3): p. 685-91.
9. Danchenko, N., J.A. Satia, and M.S. Anthony, *Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden*. *Lupus*, 2006. **15**(5): p. 308-18.
10. Molokhia, M., et al., *Systemic lupus erythematosus in migrants from west Africa compared with Afro-Caribbean people in the UK*. *Lancet*, 2001. **357**(9266): p. 1414-5.
11. Deapen, D., et al., *A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1992. **35**(3): p. 311-8.
12. Tsao, B.P., et al., *The genetic basis of systemic lupus erythematosus*. *Proc Assoc Am Physicians*, 1998. **110**(2): p. 113-7.
13. Bishof, N.A., et al., *DP polymorphism in HLA-A1,-B8,-DR3 extended haplotypes associated with membranoproliferative glomerulonephritis and systemic lupus erythematosus*. *Pediatr Nephrol*, 1993. **7**(3): p. 243-6.

14. Carneiro-Sampaio, M., et al., *Understanding systemic lupus erythematosus physiopathology in the light of primary immunodeficiencies*. J Clin Immunol, 2008. **28 Suppl 1**: p. S34-41.
15. Barzilai, O., M. Ram, and Y. Shoenfeld, *Viral infection can induce the production of autoantibodies*. Curr Opin Rheumatol, 2007. **19**(6): p. 636-43.
16. Goriely, S. and M. Goldman, *From tolerance to autoimmunity: is there a risk in early life vaccination?* J Comp Pathol, 2007. **137 Suppl 1**: p. S57-61.
17. Hochberg, M.C., *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(9): p. 1725.
18. Tan, E.M., et al., *The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1982. **25**(11): p. 1271-7.
19. Doria, A. and C. Briani, *Lupus: improving long-term prognosis*. Lupus, 2008. **17**(3): p. 166-170.
20. Doria, A., et al., *Long-term prognosis and causes of death in systemic lupus erythematosus*. American Journal Of Medicine, 2006. **119**(8): p. 700-706.
21. Ippolito, A. and M. Petri, *An update on mortality in systemic lupus erythematosus*. Clinical And Experimental Rheumatology, 2008. **26**(5): p. S72-S79.
22. Bernatsky, S., et al., *Mortality in systemic lupus erythematosus*. Arthritis And Rheumatism, 2006. **54**(8): p. 2550-2557.
23. Kasitanon, N., L.S. Magder, and M. Petri, *Predictors of survival in systemic lupus erythematosus*. Medicine, 2006. **85**(3): p. 147-156.
24. Greenberg, S.B., *Infections in the immunocompromised rheumatologic patient*. Crit Care Clin, 2002. **18**(4): p. 931-56.
25. Huang, L., et al., *An Official ATS Workshop Summary: Recent advances and future directions in pneumocystis pneumonia (PCP)*. Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(8): p. 655-64.
26. Sarzi-Puttini, P., et al., *Environment and systemic lupus erythematosus: an overview*. Autoimmunity, 2005. **38**(7): p. 465-72.
27. Doria, A., et al., *Risk factors for subclinical atherosclerosis in a prospective cohort of patients with systemic lupus erythematosus*. Annals Of The Rheumatic Diseases, 2003. **62**(11): p. 1071-1077.

28. Hahn, B.H., *Antibodies to DNA*. New England Journal Of Medicine, 1998. **338**(19): p. 1359-1368.
29. Steiger, J., D. Garzoni, and M. Mayr, [*Lupus nephritis*]. Ther Umsch, 2005. **62**(5): p. 313-9.
30. Mavragani, C.P. and H.M. Moutsopoulos, *Lupus nephritis: current issues*. Annals Of The Rheumatic Diseases, 2003. **62**(9): p. 795-798.
31. Cameron, J.S., *Lupus nephritis*. Journal Of The American Society Of Nephrology, 1999. **10**(2): p. 413-424.
32. Korbet, S.M., et al., *Severe lupus nephritis: racial differences in presentation and outcome*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(1): p. 244-54.
33. Schwartz, M.M., S.M. Korbet, and E.J. Lewis, *The prognosis and pathogenesis of severe lupus glomerulonephritis*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(4): p. 1298-306.
34. Moore, R.A. and S. Derry, *Systematic review and meta-analysis of randomised trials and cohort studies of mycophenolate mofetil in lupus nephritis*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(6): p. R182.
35. Bardwell, P.D., et al., *The Bcl-2 family antagonist ABT-737 significantly inhibits multiple animal models of autoimmunity*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7482-9.
36. Berden, J.H., *Lupus nephritis: consequence of disturbed removal of apoptotic cells?* Neth J Med, 2003. **61**(8): p. 233-8.
37. Berden, J.H., et al., *Lupus nephritis: a nucleosome waste disposal defect?* J Nephrol, 2002. **15 Suppl 6**: p. S1-10.
38. Llorente, L., et al., *Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus*. J Exp Med, 1995. **181**(3): p. 839-44.
39. Rahman, A. and D.A. Isenberg, *Systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med, 2008. **358**(9): p. 929-39.
40. Truedsson, L., A.A. Bengtsson, and G. Sturfelt, *Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus*. Autoimmunity, 2007. **40**(8): p. 560-6.
41. Kalaaji, M., et al., *Nephritogenic lupus antibodies recognize glomerular basement membrane-associated chromatin fragments released from apoptotic intraglomerular cells*. Am J Pathol, 2006. **168**(6): p. 1779-92.

42. Mjelle, J.E., M. Kalaaji, and O.P. Rekvig, *Exposure of chromatin and not high affinity for dsDNA determines the nephritogenic impact of anti-dsDNA antibodies in (NZBxNZW)F1 mice*. *Autoimmunity*, 2009. **42**(2): p. 104-11.
43. Mortensen, E.S., K.A. Fenton, and O.P. Rekvig, *Lupus nephritis: the central role of nucleosomes revealed*. *Am J Pathol*, 2008. **172**(2): p. 275-83.
44. Zykova, S.N., et al., *Reduced fragmentation of apoptotic chromatin is associated with nephritis in lupus-prone (NZB x NZW)F(1) mice*. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(3): p. 813-25.
45. Deocharan, B., et al., *Alpha-actinin is a cross-reactive renal target for pathogenic anti-DNA antibodies*. *J Immunol*, 2002. **168**(6): p. 3072-8.
46. Foster, M.H., et al., *Molecular analysis of spontaneous nephrotropic anti-laminin antibodies in an autoimmune MRL-lpr/lpr mouse*. *J Immunol*, 1993. **151**(2): p. 814-24.
47. Seshan, S.V. and J.C. Jennette, *Renal disease in systemic lupus erythematosus with emphasis on classification of lupus glomerulonephritis: advances and implications*. *Arch Pathol Lab Med*, 2009. **133**(2): p. 233-48.
48. Chadban, S.J. and R.C. Atkins, *Glomerulonephritis*. *Lancet*, 2005. **365**(9473): p. 1797-806.
49. Clynes, R., et al., *Modulation of the immune response in pristane-induced lupus by expression of activation and inhibitory Fc receptors*. *Clin Exp Immunol*, 2005. **141**(2): p. 230-7.
50. Clynes, R., et al., *Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors*. *J Exp Med*, 1999. **189**(1): p. 179-85.
51. Hsu, S.I. and W.G. Couser, *Chronic progression of tubulointerstitial damage in proteinuric renal disease is mediated by complement activation: a therapeutic role for complement inhibitors?* *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(7 Suppl 2): p. S186-91.
52. Grande, J.P., *Mechanisms of progression of renal damage in lupus nephritis: pathogenesis of renal scarring*. *Lupus*, 1998. **7**(9): p. 604-10.
53. Klahr, S., *Prevention of progression of nephropathy*. *Nephrol Dial Transplant*, 1997. **12 Suppl 2**: p. 63-6.
54. Nossent, H., J. Berden, and T. Swaak, *Renal immunofluorescence and the prediction of renal outcome in patients with proliferative lupus nephritis*. *Lupus*, 2000. **9**(7): p. 504-10.

55. Allam, R. and H.J. Anders, *The role of innate immunity in autoimmune tissue injury*. Curr Opin Rheumatol, 2008. **20**(5): p. 538-44.
56. Foster, M.H. and V.R. Kelley, *Lupus nephritis: update on pathogenesis and disease mechanisms*. Semin Nephrol, 1999. **19**(2): p. 173-81.
57. Heymann, F., et al., *Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury*. J Clin Invest, 2009. **119**(5): p. 1286-97.
58. Kriz, W., et al., *Tracer studies in the rat demonstrate misdirected filtration and peritubular filtrate spreading in nephrons with segmental glomerulosclerosis*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(3): p. 496-506.
59. Strutz, F., et al., *Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation*. Kidney Int, 2002. **61**(5): p. 1714-28.
60. Kang, D.H., et al., *Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(3): p. 806-16.
61. Kurts, C., et al., *Role of T cells and dendritic cells in glomerular immunopathology*. Semin Immunopathol, 2007. **29**(4): p. 317-35.
62. Danke, N.A., et al., *Autoreactive T cells in healthy individuals*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 5967-72.
63. Kammer, G.M., et al., *Abnormal T cell signal transduction in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(5): p. 1139-54.
64. Le Saout, C., et al., *Memory-like CD8+ and CD4+ T cells cooperate to break peripheral tolerance under lymphopenic conditions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(49): p. 19414-9.
65. Nagafuchi, H., et al., *Preferential expression of B7.2 (CD86), but not B7.1 (CD80), on B cells induced by CD40/CD40L interaction is essential for anti-DNA autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus*. Clin Exp Rheumatol, 2003. **21**(1): p. 71-7.
66. Yellin, M.J. and U. Thienel, *T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: potential roles of CD154-CD40 interactions and costimulatory molecules*. Curr Rheumatol Rep, 2000. **2**(1): p. 24-31.
67. Tesch, G.H., et al., *Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-Fas(lpr) mice*. J Exp Med, 1999. **190**(12): p. 1813-24.

68. Bagavant, H. and S.M. Fu, *Pathogenesis of kidney disease in systemic lupus erythematosus*. *Curr Opin Rheumatol*, 2009. **21**(5): p. 489-94.
69. Schiffer, L., et al., *Short term administration of costimulatory blockade and cyclophosphamide induces remission of systemic lupus erythematosus nephritis in NZB/W F1 mice by a mechanism downstream of renal immune complex deposition*. *J Immunol*, 2003. **171**(1): p. 489-97.
70. Wofsy, D., et al., *Treatment of murine lupus with monoclonal anti-T cell antibody*. *J Immunol*, 1985. **134**(2): p. 852-7.
71. Lang, T.J., et al., *Increased severity of murine lupus in female mice is due to enhanced expansion of pathogenic T cells*. *J Immunol*, 2003. **171**(11): p. 5795-801.
72. Alexopoulos, E., et al., *Lupus nephritis: correlation of interstitial cells with glomerular function*. *Kidney Int*, 1990. **37**(1): p. 100-9.
73. Enghard, P., et al., *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 Rheum*, 2009. **60**(1): p. 199-206.
74. Boucher, A., et al., *Characterization of mononuclear cell subsets in renal cellular interstitial infiltrates*. *Kidney Int*, 1986. **29**(5): p. 1043-9.
75. Jeruc, J., et al., *Tubulo-interstitial involvement in lupus nephritis with emphasis on pathogenesis*. *Wien Klin Wochenschr*, 2000. **112**(15-16): p. 702-6.
76. Hooke, D.H., et al., *Monoclonal antibody analysis of glomerular hypercellularity in human glomerulonephritis*. *Clin Nephrol*, 1984. **22**(4): p. 163-8.
77. Risdon, R.A., J.C. Sloper, and H.E. De Wardener, *Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis*. *Lancet*, 1968. **2**(7564): p. 363-6.
78. Abebe, J., et al., *Accuracy of urine dipsticks, 2-h and 12-h urine collections for protein measurement as compared with the 24-h collection*. *J Obstet Gynaecol*, 2008. **28**(5): p. 496-500.
79. Worrall, J.C., *Emergency department visual urinalysis versus laboratory urinalysis*. *Cjem*, 2009. **11**(6): p. 540-3.
80. Little, P., et al., *Validating the prediction of lower urinary tract infection in primary care: sensitivity and specificity of urinary dipsticks and clinical scores in women*. *Br J Gen Pract*. **60**(576): p. 495-500.

81. Marquette, G.P., et al., *The validity of the leukocyte esterase reagent test strip in detecting significant leukocyturia*. Am J Obstet Gynecol, 1985. **153**(8): p. 888-9.
82. Grootsholten, C., et al., *Treatment with cyclophosphamide delays the progression of chronic lesions more effectively than does treatment with azathioprine plus methylprednisolone in patients with proliferative lupus nephritis*. Arthritis And Rheumatism, 2007. **56**(3): p. 924-937.
83. Reyes-Thomas, J., I. Blanco, and C. Putterman, *Urinary Biomarkers in Lupus Nephritis*. Clin Rev Allergy Immunol.
84. Hill, G.S., et al., *Predictive power of the second renal biopsy in lupus nephritis: significance of macrophages*. Kidney Int, 2001. **59**(1): p. 304-16.
85. Rovin, B.H., et al., *Biomarker discovery in human SLE nephritis*. Bull NYU Hosp Jt Dis, 2007. **65**(3): p. 187-93.
86. Hasegawa, H., et al., *Antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 ameliorates the initiation and progression of lupus nephritis and renal vasculitis in MRL/lpr mice*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(9): p. 2555-66.
87. Yoshimoto, K., et al., *CD68 and MCP-1/CCR2 expression of initial biopsies reflect the outcomes of membranous nephropathy*. Nephron Clin Pract, 2004. **98**(1): p. c25-34.
88. Rovin, B.H., N. Doe, and L.C. Tan, *Monocyte chemoattractant protein-1 levels in patients with glomerular disease*. Am J Kidney Dis, 1996. **27**(5): p. 640-6.
89. Rovin, B.H., et al., *Urine chemokines as biomarkers of human systemic lupus erythematosus activity*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(2): p. 467-73.
90. Tian, S., et al., *Urinary levels of RANTES and M-CSF are predictors of lupus nephritis flare*. Inflamm Res, 2007. **56**(7): p. 304-10.
91. Mishra, J., et al., *Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(10): p. 2534-43.
92. Schwartz, N., J.S. Michaelson, and C. Putterman, *Lipocalin-2, TWEAK, and other cytokines as urinary biomarkers for lupus nephritis*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1109**: p. 265-74.
93. Trachtman, H., et al., *Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in D+HUS: a novel marker of renal injury*. Pediatr Nephrol, 2006. **21**(7): p. 989-94.
94. Bolognani, D., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage*. Am J Kidney Dis, 2008. **52**(3): p. 595-605.

95. Bolignano, D., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin reflects the severity of renal impairment in subjects affected by chronic kidney disease*. *Kidney Blood Press Res*, 2008. **31**(4): p. 255-8.
96. Hinze, C.H., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a predictor of the course of global and renal childhood-onset systemic lupus erythematosus disease activity*. *Arthritis Rheum*, 2009. **60**(9): p. 2772-81.
97. Pitashny, M., et al., *Urinary lipocalin-2 is associated with renal disease activity in human lupus nephritis*. *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(6): p. 1894-903.
98. Rubinstein, T., M. Pitashny, and C. Putterman, *The novel role of neutrophil gelatinase-B associated lipocalin (NGAL)/Lipocalin-2 as a biomarker for lupus nephritis*. *Autoimmun Rev*, 2008. **7**(3): p. 229-34.
99. Winkles, J.A., *The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting*. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. **7**(5): p. 411-25.
100. Kaplan, M.J., et al., *The apoptotic ligands TRAIL, TWEAK, and Fas ligand mediate monocyte death induced by autologous lupus T cells*. *J Immunol*, 2002. **169**(10): p. 6020-9.
101. Schwartz, N., et al., *Urinary TWEAK and the activity of lupus nephritis*. *J Autoimmun*, 2006. **27**(4): p. 242-50.
102. Suzuki, M., et al., *Identification of a urinary proteomic signature for lupus nephritis in children*. *Pediatr Nephrol*, 2007. **22**(12): p. 2047-57.
103. Mosley, K., et al., *Urinary proteomic profiles distinguish between active and inactive lupus nephritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2006. **45**(12): p. 1497-504.
104. Suzuki, M., et al., *Initial validation of a novel protein biomarker panel for active pediatric lupus nephritis*. *Pediatr Res*, 2009. **65**(5): p. 530-6.
105. Malyszko, J. and M. Mysliwiec, *Hepcidin in anemia and inflammation in chronic kidney disease*. *Kidney Blood Press Res*, 2007. **30**(1): p. 15-30.
106. Zhang, X., et al., *Biomarkers of lupus nephritis determined by serial urine proteomics*. *Kidney Int*, 2008. **74**(6): p. 799-807.
107. Dolff, S., et al., *Urinary T cells in active lupus nephritis show an effector memory phenotype*. *Ann Rheum Dis*.
108. Wang, G., et al., *Urinary FOXP3 mRNA in patients with lupus nephritis--relation with disease activity and treatment response*. *Rheumatology (Oxford)*, 2009. **48**(7): p. 755-60.

109. Dhaun, N., et al., *Urinary endothelin-1 in chronic kidney disease and as a marker of disease activity in lupus nephritis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(6): p. F1477-83.
110. Tucci, M., et al., *Overexpression of interleukin-12 and T helper 1 predominance in lupus nephritis*. Clin Exp Immunol, 2008. **154**(2): p. 247-54.
111. Wu, T., et al., *Elevated urinary VCAM-1, P-selectin, soluble TNF receptor-1, and CXC chemokine ligand 16 in multiple murine lupus strains and human lupus nephritis*. J Immunol, 2007. **179**(10): p. 7166-75.
112. Hammad, A.M., H.M. Youssef, and M.M. El-Arman, *Transforming growth factor beta 1 in children with systemic lupus erythematosus: a possible relation with clinical presentation of lupus nephritis*. Lupus, 2006. **15**(9): p. 608-12.
113. Avihingsanon, Y., et al., *Measurement of urinary chemokine and growth factor messenger RNAs: a noninvasive monitoring in lupus nephritis*. Kidney Int, 2006. **69**(4): p. 747-53.
114. Li, Y., et al., *Urinary biomarkers in lupus nephritis*. Autoimmun Rev, 2006. **5**(6): p. 383-8.
115. Baggiolini, M., *Chemokines in pathology and medicine*. J Intern Med, 2001. **250**(2): p. 91-104.
116. Moore, B.B., et al., *CXC chemokine modulation of angiogenesis: the importance of balance between angiogenic and angiostatic members of the family*. J Investig Med, 1998. **46**(4): p. 113-20.
117. Schwarz, M.K. and T.N. Wells, *Interfering with chemokine networks--the hope for new therapeutics*. Curr Opin Chem Biol, 1999. **3**(4): p. 407-17.
118. Sallusto, F. and M. Baggiolini, *Chemokines and leukocyte traffic*. Nat Immunol, 2008. **9**(9): p. 949-52.
119. Baggiolini, M. and P. Loetscher, *Chemokines in inflammation and immunity*. Immunol Today, 2000. **21**(9): p. 418-20.
120. Murphy, P.M., *The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 593-633.
121. Redl, S.V., *Chemokine und Chemokinrezeptor-exprimierende T-Zellen in bronchoalveolärer Lavage bei interstitiellen Lungenerkrankungen im Vergleich zu chronischer Bronchitis und malignen Erkrankungen der Lunge*, in *Medizinische Klinik - Innenstadt*. 2007, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München: München. p. 121.

122. Anders, H.J., V. Vielhauer, and D. Schlondorff, *Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease*. *Kidney Int*, 2003. **63**(2): p. 401-15.
123. Murphy, P.M., *International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature*. *Pharmacol Rev*, 2002. **54**(2): p. 227-9.
124. Eis, V., V. Vielhauer, and H.J. Anders, *Targeting the chemokine network in renal inflammation*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2004. **52**(3): p. 164-72.
125. Ferri, G.M., et al., *Urine chemokines: biomarkers of human lupus nephritis?* *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2007. **11**(3): p. 171-8.
126. Furuichi, K., et al., *Distinct expression of CCR1 and CCR5 in glomerular and interstitial lesions of human glomerular diseases*. *American Journal Of Nephrology*, 2000. **20**(4): p. 291-299.
127. Segerer, S., et al., *Expression of the C-C chemokine receptor 5 in human kidney diseases*. *Kidney Int*, 1999. **56**(1): p. 52-64.
128. Anders, H.J., et al., *Chemokine and chemokine receptor expression during initiation and resolution of immune complex glomerulonephritis*. *J Am Soc Nephrol*, 2001. **12**(5): p. 919-31.
129. Mayer, V., et al., *Expression of the chemokine receptor CCR1 in human renal allografts*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2007. **22**(6): p. 1720-1729.
130. Vielhauer, V., et al., *Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes*. *J Am Soc Nephrol*, 2001. **12**(6): p. 1173-87.
131. Vielhauer, V., et al., *CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome*. *Kidney Int*, 2004. **66**(6): p. 2264-78.
132. Anders, H.J., et al., *Late onset of treatment with a chemokine receptor CCR1 antagonist prevents progression of lupus nephritis in MRL-Fas(lpr) mice*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(6): p. 1504-13.
133. Stasikowska, O., M. Danilewicz, and M. Wagrowska-Danilewicz, *The significant role of RANTES and CCR5 in progressive tubulointerstitial lesions in lupus nephropathy*. *Pol J Pathol*, 2007. **58**(1): p. 35-40.
134. Vielhauer, V., et al., *Phenotyping renal leukocyte subsets by four-color flow cytometry: characterization of chemokine receptor expression*. *Nephron Exp Nephrol*, 2003. **93**(2): p. e63.

135. Mamtani, M., et al., *CCL3L1 gene-containing segmental duplications and polymorphisms in CCR5 affect risk of systemic lupus erythaematosus*. *Ann Rheum Dis*, 2008. **67**(8): p. 1076-83.
136. Turner, J.E., et al., *CCR5 deficiency aggravates crescentic glomerulonephritis in mice*. *J Immunol*, 2008. **181**(9): p. 6546-56.
137. Topham, P.S., et al., *Lack of chemokine receptor CCR1 enhances Th1 responses and glomerular injury during nephrotoxic nephritis*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(11): p. 1549-57.
138. Wu, Y. and A. Yoder, *Chemokine coreceptor signaling in HIV-1 infection and pathogenesis*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(12): p. e1000520.
139. Woodford-Thomas, T. and M.L. Thomas, *The leukocyte common antigen, CD45 and other protein tyrosine phosphatases in hematopoietic cells*. *Semin Cell Biol*, 1993. **4**(6): p. 409-18.
140. Mustelin, T., et al., *Protein tyrosine phosphatases in T cell physiology*. *Mol Immunol*, 2004. **41**(6-7): p. 687-700.
141. Saunders, A.E. and P. Johnson, *Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45*. *Cell Signal*. **22**(3): p. 339-48.
142. Ziegler, S.F., et al., *The mouse CD69 gene. Structure, expression, and mapping to the NK gene complex*. *J Immunol*, 1994. **152**(3): p. 1228-36.
143. Ziegler, S.F., F. Ramsdell, and M.R. Alderson, *The activation antigen CD69*. *Stem Cells*, 1994. **12**(5): p. 456-65.
144. Nossent, J.C., *Course and prognostic value of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index in black Caribbean patients*. *Semin Arthritis Rheum*, 1993. **23**(1): p. 16-21.
145. Bombardier, C., et al., *Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE*. *Arthritis Rheum*, 1992. **35**(6): p. 630-40.
146. Ibanez, D., M.B. Urowitz, and D.D. Gladman, *Summarizing disease features over time: I. Adjusted mean SLEDAI derivation and application to an index of disease activity in lupus*. *J Rheumatol*, 2003. **30**(9): p. 1977-82.
147. Hawker, G., et al., *A reliability study of SLEDAI: a disease activity index for systemic lupus erythematosus*. *J Rheumatol*, 1993. **20**(4): p. 657-60.
148. *Homepage der FACS Core Facility der Universität Mainz: <http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>*.

149. Hotta, O., et al., [*Analysis of mononuclear cells in urine using flow cytometry: a useful tool for monitoring disease activity of proliferative glomerulonephritis*]. Nippon Jinzo Gakkai Shi, 1992. **34**(7): p. 753-9.
150. Hotta, O., et al., *Urinary macrophages as activity markers of renal injury*. Clin Chim Acta, 2000. **297**(1-2): p. 123-33.
151. Roberti, I. and L. Reisman, *Serial evaluation of cell surface markers for immune activation after acute renal allograft rejection by urine flow cytometry--correlation with clinical outcome*. Transplantation, 2001. **71**(9): p. 1317-20.
152. Sakatsume, M., et al., *Human glomerulonephritis accompanied by active cellular infiltrates shows effector T cells in urine*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(12): p. 2636-44.
153. Stachowski, J., et al., *Flow cytometric analysis of urine lymphocytes isolated from patients with renal transplants--purification of urine lymphocytes*. J Immunol Methods, 1998. **213**(2): p. 145-55.
154. Lan, H.Y., et al., *A novel method of microwave treatment for detection of cytoplasmic and nuclear antigens by flow cytometry*. J Immunol Methods, 1996. **190**(1): p. 1-10.
155. Papiris, S.A., et al., *Relationship of BAL and lung tissue CD4+ and CD8+ T lymphocytes, and their ratio in idiopathic pulmonary fibrosis*. Chest, 2005. **128**(4): p. 2971-7.
156. Abdulahad, W.H., et al., *Urinary CD4+ effector memory T cells reflect renal disease activity in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(9): p. 2830-8.
157. Hotta, O., et al., *Urinary macrophage counts and ratio to T lymphocytes: possible use in differential diagnosis and management of glomerular disease*. J Clin Lab Anal, 1996. **10**(4): p. 205-8.
158. Weening, J.J., et al., *The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(2): p. 241-50.
159. Copeland, K.T., et al., *Bias due to misclassification in the estimation of relative risk*. Am J Epidemiol, 1977. **105**(5): p. 488-95.

7 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACR	American College of Rheumatology
a-dsDNS-AK	anti-Doppelstrang- Desoxyribonukleinsäure Antikörper
AK	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
ANCA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen –Präsentierende Zellen
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
C3, C4	Komplementfaktoren 3 bzw. 4
CCR1, CCR5	Chemokinrezeptor, Subgruppen 1 bzw. 5
CD	Cluster of Differentiation
CTGF	Connective Tissue Growth Factors
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenzkanal
FSC	Forward Scatter
g	Erdbeschleunigung
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GN	Glomerulonephritis
h	Stunde
HS	Heparansulfat
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin, Subtypen: IgM, IgG, IgA
IL	Interleukin

Anhang

ISN-RPS	International Society of Nephrology/Renal Pathology Society
LN	Lupus-Nephritis
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MHC	Major-Histokompatibilitäts-Komplex
Mo	Monozyten
n	Anzahl
NB-	ohne Nierenbeteiligung
NB+	mit Nierenbeteiligung
NGAL	Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
NO	Stickstoffmonoxid
p	p-Wert
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
PJ	Propidium Jodid
r	Korrelationskoeffizient
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SSC	Sideward Scatter
T _{act}	aktivierte T-Zellen
T _c	Cytotoxische T-Zellen
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _H	T-Helferzellen, Subgruppen: T _H 1, T _H 2, T _H 3, T _H 17, T _H 0
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
TWEAK	Tumor Necrosis Factor-Like Inducer of Apoptosis
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: schematische Darstellung der Pathogenese der Lupus-Nephritis	8
Abbildung 2: typische Struktur eines Chemokinrezeptors.....	18
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines FACS-Gerätes	32
Abbildung 4: Darstellung der Lymphozyten in einem Pseudocolour Punktehistogramm.....	37
Abbildung 5: Darstellung der Lymphozyten in einem Pseudocolour Punktehisogramm	38
Abbildung 6: Anzahl der lebenden T-Zellen über den Verlauf von 24 Stunden	44
Abbildung 7: Anzahl der lebenden CD3+CD4+ T-Zellen über den Verlauf von 24 Stunden....	45
Abbildung 8: CCR1 und CCR5 Expression über den Verlauf von 24 Stunden.....	46
Abbildung 9: Urinuntersuchungen zum Zeitpunkt der Regelblutung	47
Abbildung 10: Berechnung der absoluten Zellzahl.....	49
Abbildung 11: CD4+T-Zellen im Urin	51
Abbildung 12: Urinzellzahl in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität	52
Abbildung 13: Urinzellzahl der Patientensubgruppen	53
Abbildung 14: Urinzellzahl bezogen auf die Aktivität der Nierenbeteiligung	54
Abbildung 15: Urinzellzahl in Abhängigkeit der renalen Krankheitsaktivität	55
Abbildung 16: Messungen zur gleichen Zeit einer Nierenbiopsieentnahme	56
Abbildung 17: Leukozytenzahl-Messung mittels eines Urinteststreifens I	57
Abbildung 18: Leukozytenzahl-Messung mittels eines Urinteststreifens II	57
Abbildung 19: Urinzellzahlmessungen im Krankheitsverlauf	60
Abbildung 20: Krankheitsaktivität im Verlauf.....	61
Abbildung 21: FACS-Bilder der CD45RO Färbung.....	62
Abbildung 22: Relative CD45RO Expression auf Blut- und Urinzellen	63
Abbildung 23: Relative CD69-Expression in Blut und Urin	64
Abbildung 24: CD69 Färbung.....	64
Abbildung 25: CCR1 Färbung	65
Abbildung 26: Relative CCR1 Expression in Blut- und Urinproben.....	65
Abbildung 27: CCR5 Färbung	66
Abbildung 28: Relative CCR5 Expression der Blut- und Urinproben.....	66
Abbildung 29: Relative Expression der Chemokinrezeptoren auf Blutzellen	67
Abbildung 30: Gegenseitiges Verhältnis der relativen Expression von CCR1 und CCR5.....	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ACR Kriterien	3
Tabelle 2: Klassifikation der Lupus-Nephritis, ISN/RPS 2003	12
Tabelle 3: weitere Biomarker in der SLE-Forschung	16
Tabelle 4: Für diese Arbeit relevante Chemokinrezeptoren und ihre Liganden	19
Tabelle 5: verwendete Antikörper.....	26
Tabelle 6: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI).....	29
Tabelle 7: renaler SLEDAI	30
Tabelle 8: Verwendete Fluorochrome.....	33
Tabelle 9: Färbeschema.....	33
Tabelle 10: Vierfeldertafel	40
Tabelle 11: Aufnahmegrund der Patienten mit Nierenbeteiligung	42
Tabelle 12: Aufnahmegrund der Patienten ohne Nierenbeteiligung.....	43
Tabelle 13: statistische Werte der CD45RO-Expression über 24 Stunden	45
Tabelle 14: statistische Werte der CD69-Expression über 24 Stunden	46
Tabelle 15: statistische Werte der CCR1- und CCR5-Expression über 24 Stunden.....	46
Tabelle 16: Median und Spannweite der CD3+CD4+T-Zellen der einzelnen Populationen.....	50
Tabelle 17: Vierfeldertafel der gesamten Patientenpopulation bezogen auf die systemische Krankheitsaktivität (SLEDAI)	58
Tabelle 18: Vierfeldertafel der 44 SLE Patienten mit einer Nierenbeteiligung bezogen auf das Anzeigen der systemischen Krankheitsaktivität (SLEDAI).....	58
Tabelle 19: Vierfeldertafel der gesamten Patientenpopulation bezogen auf die renale Krankheitsaktivität (rSLEDAI)	59
Tabelle 20: Darstellung der Krankheitsaktivität sowie die verabreichte Menge immunsuppressiver Therapie im Beobachtungszeitraum	61

Danksagung

Bedanken möchte ich mich zu aller erst bei meiner Arbeitsgruppenleiterin Frau Prof. Dr. Riemekasten für das spannende und aktuelle Thema meiner Doktorarbeit, die kritische Durchsicht des Manuskripts und die konstruktiven Anregungen.

Mein herzlichster Dank gilt Dr. Philipp Enghard, der mich über die gesamte Zeit meiner Promotionsarbeit betreut hat. Danke, dass du es nie leid geworden bist, mir Deadlines zu setzen, die ich zwar (meist) nicht eingehalten habe, aber die mich stetig angetrieben haben und mich in Phasen der Erschöpfung über Durststrecken hinweggebracht haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe Riemekasten sowie der AG Buttgerit, die mein Jahr forschungsfrei geprägt haben und mich immer unterstützt haben. Im Einzelnen: Danke an Reinmar Undeutsch, der mir nicht nur immer wieder meinen Computer neu erklärt hat sondern auch sonst bei jeder Frage hilfreich weitergeholfen hat. Danke an Janine Guenther und Angela Kill, die mir eine stete emotionale Stütze waren und jeder Zeit (Janine auch spät abends noch) geduldig meine Fragen zu Laboralltäglichkeiten beantwortet haben.

Danke an Lutz Kloke ohne den ich wohl lange nicht so viel zu lachen gehabt hätte! Und ebenfalls vielen Dank an Martin Hahne, der mir immer bereitwillig geholfen hat, wenn sich der Beaker mit allen bekannten Mitteln einfach nicht mehr entstopfen ließ und hierfür immer noch einen neuen Zaubertrick in der Tasche hatte.

Frau Maria Eveslage (Statistikerin des DRFZ) möchte ich für die ausgezeichnete statistische Beratung danken. Ebenso gilt mein Dank Frau Dr. Backhaus für die Proben aus der Lupus-Sprechstunde und den Tagesklinik-Schwestern Beate Follendorf und Daniela Krahl für die nette und unkomplizierte Zusammenarbeit. Ich danke den Ärzten der Station 127 (insbesondere Dr. U. Schneider, Dr. M. Becker und Dr. S. Ohrndorf) sowie Dr. P. Burgwinkel der nephrologischen Station. Ebenfalls danke ich Herrn Dr. Dr. Egerer für die Bestimmung der Auto-Antikörper-Titer.

Ein besonderer Dank gilt meiner Mitbewohnerin und guten Freundin Stephanie Matthews, die sich im Verlauf der 33 Monate von der Idee meiner Arbeit mitreißen ließ, es nicht müde wurde, mit mir zu diskutieren und mich auch in Momenten, wenn im Labor einfach alles schief lief, geduldig Tränen getrocknet und zugehört hat.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mich über die gesamte Zeit finanziell und ebenfalls in dem Vorhaben 1 Jahr auszusetzen unterstützt haben. Und insbesondere meinem Vater PD Dr. Hartmut Rieder herzlichen Dank für das geduldsame und kritische Lesen meines Manuskriptes.

Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Claudia Rieder, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [CD4-T-Zell-Subsets im Urin als Biomarker der Lupus-Nephritis] selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 28.06.2011

Claudia Rieder