

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und
Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Antigen- und autoantigenspezifische T- und B-Zellproliferation
bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes und
gesunden Blutspendern

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Sandra Schneider
aus Simmern

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. F. Hiepe
2. Prof. Dr. med. B. Manger
3. Prof. Dr. med. A. Schwarting

Datum der Promotion: 23.03.2007

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1. EINLEITUNG	1
1.1 Immunologische Grundlagen	1
1.1.1 Angeborene und erworbene Immunität – phylogenetische Zweiteilung	1
1.1.2 Zelluläre und humorale Immunität – funktionelle Zweiteilung	1
1.1.3 Antigenerkennung durch T- und B-Zellen	2
1.1.4 Funktionelle Einteilung der T-Helfer-Lymphozyten	3
1.1.5 Toleranz und Autoimmunität	4
1.2 Der systemischer Lupus erythematodes (SLE)	5
1.2.1 Klinische Manifestationen	6
1.2.2 Pathogenese	7
1.2.3 Autoantikörper	10
1.2.4 Aufbau und Bedeutung der Nukleosomen	11
1.2.5 Nukleosomenspezifische T-Helfer-Zellen	12
1.3 Nachweismethoden antigenspezifischer T- und B-Zellen	13
1.3.1 Detektion anhand der DNA-Syntheserate	13
1.3.2 Detektion der Zytokinsekretion	14
1.3.3 Detektion durch direkte Markierung	15
1.3.4 Detektion anhand der Proliferation	16
1.4 Aufgabenstellung	18
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Geräte und Pufferlösungen	19
2.2 Blutspender und Blutabnahme	20

2.3	Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	21
2.4	Bestimmung der Zellzahl	22
2.5	Markierung von lebenden mononukleären Zellen mit 5- (und 6-) Carboxyfluoreszeindiazetat-Succinimidylester	22
2.6	Zellkulturmedien und –bedingungen	23
2.7	<i>In vitro</i> Antigenstimulation mononukleärer Zellen	23
2.8	Magnetische Zellsortierung	24
2.8.1	Magnetische Markierung der CD4 ⁺ -Zellen	24
2.8.2	Magnetische Anreicherung der CD4 ⁺ -Zellen	25
2.9	Polyklonale <i>in vitro</i> Th-Zellstimulation	26
2.10	Formaldehydfixierung von Zellen	26
2.11	Durchflusszytometrische Zellanalyse mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung	27
2.11.1	Fluorochrome in der Durchflusszytometrie	27
2.11.2	Funktionsweise des FACS Calibur™	28
2.11.3	Oberflächenfärbungen für die durchflusszytometrische Analyse	29
2.11.4	Intrazelluläre Färbung von Zytokinen für die durchflusszytometrische Analyse	30
2.11.5	Messungen und Datenanalyse	31
2.12	Statistische Auswertung	31
3.	ERGEBNISSE	32
3.1	Etablierung der sensitiven durchflusszytometrischen Detektion und Charakterisierung antigenspezifisch proliferierter B- und T-Lymphozyten im humanen System	32
3.1.1	Polyklonale Stimulation CFSE-markierter PBMC	32
3.1.2	Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der eingesetzten CFDA-SE-Färbekonzentration	35
3.1.3	Antigenspezifische Stimulation CFSE-markierter PBMC	37
3.1.3.1	Stimulation mit Tetanustoxoid	37

3.1.3.2 Anteil Tetanus-spezifisch proliferierter Lymphozyten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer – eine Kinetik	37
3.1.4 Charakterisierung tetanustoxoidspezifisch proliferierter Th-Zellen anhand ihres Zytokinprofils	39
3.1.5 Vergleich verschiedener Seren als Zusatz des Nährmediums während der Zellkultur	42
3.1.5.1 Vergleich von fetalem Kälberserum (FCS) und autologem Spenderserum (AS)	42
3.1.5.2 Vergleich von autologem Serum und humanem Mischserum von Spendern der Blutgruppe AB	43
3.1.6 Allergenstimulation – Allergiker und Nichtallergiker im Vergleich	45
3.1.7 Charakterisierung tetanustoxoidspezifisch proliferierter CD19⁺-Zellen	48
3.1.7.1 <i>In vitro</i> Nachweis antigenspezifischer Plasmablasten	49
3.2 Detektion und Charakterisierung autoantigen-spezifischer T- und B-Lymphozyten in SLE-Patienten und gesunden Spendern	51
3.2.1 Detektion autoantigenreaktiver Proliferation	51
3.2.2 Abhängigkeit der Frequenz nukleosomenspezifisch proliferierter Lymphozyten von der Inkubationsdauer	55
3.2.3 Analyse von PBMC aus SLE-Patienten und gesunden Spendern bezüglich der Proliferation von CD4⁺-, CD8⁺- und CD19⁺-Lymphozyten nach Stimulation mit Nukleosomen und Smd1₈₃₋₁₁₉-Peptid	56
3.2.3.1 Autoantigenreaktive Lymphozytenproliferation bei Gesunden	56
3.2.3.2 Autoantigenreaktive Lymphozytenproliferation bei SLE-Patienten	57
3.2.4 Vergleich der Frequenzen lebender Lymphozyten von Gesunden und SLE-Patienten nach 6-tägiger Kultivierung	59
3.2.5 Statistische Auswertung der Proliferationsuntersuchungen mit Nukleosomen und Smd1₈₃₋₁₁₉ an SLE-Patienten	60
3.2.5.1 Bestimmung der Unterschiede der Proliferation von CD4 ⁺ -, CD8 ⁺ - und CD19 ⁺ -Zellen in unstimulierten und stimulierten Proben	61
3.2.5.2 Zusammenhang zwischen Th- und B-Zellproliferation mit Anti-Nukleosomen-Ak	62

3.2.5.3	Zusammenhang zwischen Proliferation und Krankheitsaktivität	63
3.2.5.4	Zusammenhang zwischen Proliferation und immunsuppressiver Therapie	63
3.2.5.5	Zusammenhang zwischen nukleosomen- und SmD1 ₈₃₋₁₁₉ -spezifischer Th-Zellproliferation bei Gesunden und Patienten	64
3.2.5.6	Zusammenhang zwischen Th- und B-Zellproliferation bei gleichem Antigen	65
3.2.6	Zytokinmuster autoreaktiver CD4⁺-Zellen	66
4.	DISKUSSION	68
4.1	Auswahl und Etablierung der Methode zur Proliferationsmessung von Lymphozyten	68
4.1.1	Eigenschaften von CFSE	68
4.1.2	Vergleich mit [³ H]-Thymidin	68
4.1.3	Modifizierung der Methode	69
4.1.4	Optimierung des Nährmediums	69
4.2	Charakterisierung von antigenspezifisch proliferierten Lymphozyten	71
4.2.1	Proliferation von antigenspezifischen T- und B-Zellen	71
4.2.2	Tetanustoxoidspezifisch proliferierte Th-Zellen	71
4.2.3	Allergenspezifisch proliferierte Th-Zellen	72
4.2.4	Tetanustoxoidspezifische B-Lymphozyten – Generierung von Plasmablasten <i>in vitro</i>	73
4.3	Messung autoantigenspezifischer Proliferation	75
4.3.1	Auswahl der Autoantigene	75
4.3.2	Nachweis autoantigenspezifischer Th- und B-Zellen	76
4.3.3	Schwächere Reaktion auf Autoantigen bei Lupus-Patienten als bei Gesunden	76
4.3.4	Autoreaktive Lymphozyten bei Gesunden	78
4.3.5	Die Bedeutung autoreaktiver T- und B-Zellen bei Gesunden	80
4.3.6	Statistische Zusammenhänge	81

4.4	Ausblick	83
5.	ZUSAMMENFASSUNG	85
6.	LITERATURVERZEICHNIS	87
	DANKSAGUNG	99
	PUBLIKATIONEN	100
	ERKLÄRUNG AN EIDES STATT	101
	LEBENS LAUF	102

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
μmol	Mikromol
Abb.	Abbildung
ABS	Serum von Spendern der Blutgruppe AB
ACR	American College of Rheumatology
Ag	Antigen
AICD	aktivierungsinduzierter Zelltod
Ak	Antikörper
ANA	antinukleäre Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zellen
APC	Allophycocyanin
AS	autologes Serum
BCR	B-Zellrezeptor
BrDU	Bromodeoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C5a	Komplementfaktor
CD	Cluster of Differentiation
CFDA-SE	(5,6) Carboxyfluoreszeindiazetat-Succinimidylester
CFSE	(5,6) Carboxyfluoreszein-Succinimidylester
CO_2	Kohlendioxid
CTLA-4	Cytotoxic-T-Lymphocyte-Protein 4
Cy5	Indopentamethincyanin
d	Tag
DC	dendritische Zellen
ds	Doppelstrang-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECLAM	European Consensus Lupus Activity Measurement
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ENA	extrahierbare nukleäre Antikörper
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
Fas	Fibroblasten-assoziiert
FCS	fetales Kälberserum
FL	Fluoreszenzkanal
FSC	Forwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung
GAD	Glutaminsäure-Decarboxylase
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Koloniestimulierender Faktor
H1, 2A, 2B, 3, 4	Histone 1, 2A, 2B, 3, 4
HLA	humanes Leukozytenantigen
HMG-Proteine	High-Mobility-Group-Proteine (Gruppe von Chromatin-assoziierten Nicht-Histon-Proteinen)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
La	Patientenkürzel, nach dem ein Autoantigen benannt ist
Lf	Limes Flocculation
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	magnetische Zellsortierung
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
MRL/Mp-lpr/lpr-Mäuse	Mausstamm mit Lupus-ähnlichen Symptomen
ng	Nanogramm
NK	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
RNP	Ribonukleoprotein
NZB/NZW-Mäuse	New Zealand Black/New Zealand White; Mausstamm mit Lupus-ähnlichen Symptomen

p	Wahrscheinlichkeitsfaktor
PBMC	mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-a
pH	potentia hydrogenii
PJ	Propidiumjodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
PSS	Progressive systemische Sklerose
RA	Rheumatoide Arthritis
Rho	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
Ro	Patientenkürzel, nach dem ein Autoantigen benannt ist
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SEB	Staphylokokkenenterotoxin B
SLAM	Systemic Lupus Activity Measure
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
Sm	Patientenkürzel, nach dem ein Autoantigen benannt ist
SmD1 ₈₃₋₁₁₉	Peptidfragment des Sm-Antigens
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
SS	Sjögren Syndrom
SSC	Seitwärtsstreulicht
Tab.	Tabelle
Tc	zytotoxische T-Zellen
TCR	T-Zellrezeptor
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TSH	thyroideastimulierendes Hormon
TT	Tetanustoxoid
UV	ultraviolett

vgl.	vergleiche
vs.	versus
w/v	weight per volume
z.B.	zum Beispiel

Danken möchte ich

Herrn Prof. Dr. Falk Hiepe

für die Ermöglichung dieser Arbeit und für seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft, immer dann, wenn sie erforderlich waren.

Anne Bruns

für die stetige inhaltliche und organisatorische Unterstützung beim klinischen Teil dieser Arbeit und darüber hinaus.

Andreas Thiel

für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, zahlreiche fruchtbare Diskussionen und die ständige Ansprechbarkeit.

Dörte Huscher und Joachim Listing

für die statistische Beratung

Herrn Dr. Schmidt und Frau Prof. Dr. Gromnica-Ihle

für die Bereitstellung von Patientenblut

Gabriela Riemekasten

für Patientenblut und das SmD1-Peptid

Herrn Dr. Hausdorf

für die Präparation der Nukleosomen

Kerstin Gerhold

für die Allergene und das Allergikerblut

Falk und Hilmar

für die Computertechnik

Heidi Hecker-Kia, Heidi Schliemann, Tuula Geske, Frau Kiel

für alles, was man im Labor so braucht

Tobias Alexander, Bettina Borsdorf, Frank Chen, Meral Esen, Barbara Holzknecht, Sonja Kimmig, Siggie Kohler, Hardy Maetzel, Beate Moewes, Silke Nitsch, Martin Rothe, Arne Sattler, Kerstin Schnittger, Ilka Schulze und Diana Stauch

für die gute Atmosphäre in der Arbeitsgruppe und alles was dazu gehört

Bettina Borsdorf, Siggie Kohler und Beate Moewes

für die Einarbeitung im Labor

Barbara Holzknecht, Sonja Kimmig, Silke Nitsch, Arne Sattler und Nikolaus Maier

für's Korrekturlesen

Andreas Radbruch und allen Mitarbeitern

für das gute Arbeitsklima im DRFZ

Allen freiwilligen Blutspendern

Meiner Familie und meinen Freunden

für alles außerhalb von Klinik und Labor

Teilergebnisse dieser Arbeit sind veröffentlicht:

Schneider S, Bruns A, Moewes B, Holzknecht B, Hausdorf G, Riemekasten G, Radbruch A, Hiepe F, Thiel A. Simultaneous cytometric analysis of (auto)antigen-reactive T and B cell proliferation. *Immunobiology* 2002; 206:484-95.

Riemekasten G, Weiss C, Schneider S, Thiel A, Bruns A, Schumann F, Bläss S, Burmester GR, Hiepe F. T cell reactivity against the SmD1(83-119) C terminal peptide in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:779-785.

Erklärung

„Ich, Sandra Schneider, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: ‚Antigen- und autoantigenspezifische T- und B-Zellproliferation bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes und gesunden Blutspendern‘ 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.“

Datum

Unterschrift

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.