

## 1. Einleitung

### 1.1 Immunologische Grundlagen

Das Immunsystem schützt den Körper durch hoch entwickelte Mechanismen gegen Krankheit erregende Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen und Würmer. Angeborene oder erworbene Immunschwächen können zu lebensbedrohlichen Infektionen führen. Entscheidend für die gezielte Erregerabwehr ist die Fähigkeit des Immunsystems zwischen körperfremden und körpereigenen Strukturen zu unterscheiden. Durch Fehlfunktionen bei diesem Prozess können Autoimmunerkrankungen entstehen. Der systemische Lupus erythematodes (SLE) wird nach wie vor als Prototyp einer Autoimmunkrankheit angesehen. Trotz zahlreicher Studien zu diesem Thema ist seine Ätiologie noch weitgehend ungeklärt. Bevor darauf näher eingegangen wird, sollen zunächst einige immunologische Grundbegriffe erläutert werden.

#### 1.1.1 Angeborene und erworbene Immunität – phylogenetische Zweiteilung

Im Säugetierorganismus wird der phylogenetisch ältere Teil als angeborene oder natürliche Immunantwort bezeichnet. Wichtig bei dieser Form der Abwehr ist die unspezifische Eliminierung von Pathogenen durch Phagozytose. Phagozyten (Fresszellen) und andere Entzündungszellen werden durch eine mediorenvermittelte Entzündungsreaktion zum Ort des Geschehens gelockt. Zu den Effektorzellen dieses Systems zählen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen (DC) und Natürliche Killer(NK)-Zellen. Effektormoleküle sind Lysozym, Komplement, Akutphasenproteine und Interferone.

Die so genannte erworbene oder adaptive Immunantwort ist phylogenetisch jünger. Charakteristisch sind die klonale Expansion antigenspezifischer B- und T-Lymphozyten und die Entwicklung eines immunologischen „Gedächtnisses“ für einmal als fremd erkannte Antigene. Effektorzellen sind hier die Lymphozyten, Effektormoleküle die von ihnen produzierten Antikörper und Zytokine (*Burmester, 1998*).

#### 1.1.2 Zelluläre und humorale Immunität – funktionelle Zweiteilung

Die spezifische Abwehr von Krankheitserregern im extrazellulären Raum erfolgt mittels erregerspezifischer Antikörper (Immunglobuline), die von Plasmazellen, den

Effektor-B-Lymphozyten, sezerniert werden (humorale Immunität). Immunglobuline können Viren oder bakterielle Toxine neutralisieren, indem sie deren Bindung an Zellrezeptoren verhindern. Weiterhin erleichtern sie die Zerstörung von Pathogenen durch Phagozyten (Opsonierung) und verbessern die Angriffsmöglichkeit für Komplement. Hier greifen also Mechanismen der spezifischen und der unspezifischen Immunantwort ineinander.

Sind Pathogene ins Zellinnere gelangt und vermehren sich, greift das Prinzip der zellulären Immunität. Eine entscheidende Rolle spielen hierbei die T-Lymphozyten. Anhand von bestimmten Oberflächenmolekülen werden zwei große Gruppen unterschieden: zytotoxische T-Lymphozyten (Tc-Lymphozyten oder Tc-Zellen; c für: *cytotoxic*) exprimieren das CD8-Molekül (CD für: *cluster of differentiation*). T-Helfer-Lymphozyten (Th-Lymphozyten oder Th-Zellen) tragen in der Regel das CD4-Molekül.

Tc-Lymphozyten können Zellen, die von Erregern befallen sind, direkt zerstören. Außerdem können sie durch Botenstoffe (Zytokine) Fresszellen aktivieren und so indirekt die infizierten Zellen vernichten. Bei T-Zelldefekten treten daher vermehrt Infektionen mit intrazellulären Erregern auf. Man findet allerdings bei T-Zelldefizienzen auch erniedrigte erregerspezifische Antikörpertiter, obwohl B-Zellen vorhanden sind. Dies ist auf die Rolle der Th-Zellen zurückzuführen. Antigen-spezifisch aktivierte Th-Zellen sezernieren Zytokine, die die klonale Expansion von B-Zellen und deren Differenzierung zu Plasmazellen unterstützen. Sie besitzen daher sowohl in der zellulären als auch in der humoralen spezifischen Immunantwort eine Schlüsselfunktion, (*Alberts, 1994*).

### 1.1.3 Antigenerkennung durch T- und B-Zellen

Jeder Lymphozyt trägt auf seiner Zelloberfläche Antigenrezeptoren einer einzigen Spezifität (Monospezifität). Dabei unterscheiden sich die Rezeptoren der B- und T-Zellen in ihrer Struktur und in der Erkennungsweise von Antigenen (Ag).

B-Zellen exprimieren die von ihnen produzierten Immunglobuline (Ig) auf ihrer Zelloberfläche, so dass sie die Funktion von B-Zellrezeptoren (BCR) erhalten. Der BCR bindet spezifisch an eine bestimmte Proteinstruktur eines Antigens, um dieses in die Zelle aufnehmen zu können. BCR und die später sezernierten Immunglobuline (= Antikörper; Ak) der reifen, aus klonaler Expansion hervorgehenden Plasmazelle haben dieselbe Spezifität.

Die membranständigen T-Zellrezeptoren (TCR) hingegen erkennen antigene Strukturen nur im Zusammenhang mit bestimmten körpereigenen Molekülen, den MHC-Molekülen (von: *major histocompatibility complex* = Haupthistokompatibilitätskomplex). Sie werden in zwei Klassen unterteilt:

MHC-Klasse-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert. Tc-Zellen binden an diese Moleküle und können mit dem antigenspezifischen Teil ihres TCR fremde Peptidstrukturen erkennen, die von Virus befallenen Körperzellen oder Tumorzellen exprimiert werden.

MHC-Klasse-II-Moleküle finden sich konstitutiv nur auf professionellen Antigen präsentierenden Zellen (APC) des Immunsystems. Diese Zellen (Makrophagen, DC, B-Zellen) nehmen fremde Antigene auf und präsentieren deren Peptidfragmente zusammen mit den MHC-II-Molekülen den Th-Zellen, (Janeway, 1995).

#### 1.1.4 Funktionelle Einteilung der T-Helfer-Lymphozyten

Aufgrund ihrer Schlüsselfunktion als Bindeglied zwischen zellulärer und humoraler Immunität wurden Th-Zellen näher im Hinblick auf Subpopulationen untersucht.

Mosmann et al. konnten nach wiederholter Stimulation muriner Th-Zellklone zwei häufig auftretende Sekretionsmuster von Zytokinen unterscheiden (Mosmann, 1986). Hieraus und aus weiteren Experimenten mit murinen und humanen Lymphozyten folgte eine schematische Unterteilung der Th-Zellen in zwei Gruppen mit unterschiedlichen Funktionen. Nach diesem Modell unterstützen, vereinfacht gesehen, Th1-Zellen mit der Produktion von Interleukin (IL-) 2, Interferon (INF-)  $\gamma$  und Lymphotoxin (= Tumornekrosefaktor  $\beta$ ) die zellvermittelte Entzündungsreaktion durch Aktivierung von Makrophagen und Tc-Zellen, während Th2-Zellen durch Sekretion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 die Antikörperproduktion und die Proliferation von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen fördern. Beide Zellarten sezernieren u. a. IL-3 und Tumornekrosefaktor (TNF-)  $\alpha$ . Zytokine der Th1- bzw. Th2-Zellen inhibieren jeweils die Effektorfunktionen der anderen Th-Untergruppe (Mosmann, 1996). Th-Zellen, die sowohl IL-4 als auch INF- $\gamma$  produzieren, werden in diesem Modell als Th0-Zellen bezeichnet (Firestein, 1989). Eine weitere Untergruppe, die vorwiegend den transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta$  (*transforming growth factor* = TGF-) exprimiert, wurde Th3-Zellen genannt (Mosmann, 1996). Mittlerweile werden diese Zellen, wie auch Th-Zellen, die vor

allem IL-10 sezernieren, zu der größeren, heterogenen Gruppe der regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) gezählt (*Sakaguchi, 2000*).

Betrachtet man pathologische Immunreaktionen, spielen bei organspezifischen Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose, Diabetes mellitus Typ I oder Hashimoto-Thyreoiditis vor allem Th1-vermittelte Mechanismen eine Rolle. Bei systemischen Erkrankungen wie dem Lupus erythematoses oder dem Sjögren-Syndrom sowie bei Allergien ist die Th-Antwort dagegen weniger polarisiert bzw. stärker in Th2-Richtung verschoben (*De Carli, 1994; O'Shea, 2001*).

### 1.1.5 Toleranz und Autoimmunität

Im Normalfall richtet sich die Immunabwehr gegen Fremdproteine. Körpereigene Strukturen werden als solche erkannt und nicht angegriffen. Diese so genannte Toleranz gilt in der Regel für B- und T-Zellen. Bereits im Thymus bzw. im Knochenmark wird ein Großteil autoreaktiver T- bzw. B-Zellen eliminiert (zentrale Toleranz). Dennoch gelangen autoreaktive Lymphozyten in die Peripherie. Die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz versteht man heute als aktiven Prozess, an dem verschiedene Mechanismen teilhaben:

(i) Dabei spielt unter anderem der aktivierungsinduzierte Zelltod (AICD für: *activation induced cell death*) eine wichtige Rolle. Es handelt sich dabei um einen Apoptoseprozess, der nach wiederholter Ag-Stimulation über das membranständige Fas(CD95)-Molekül auf T-Zellen, teilweise auto- oder parakrin, vermittelt wird, um die natürliche Immunantwort zu begrenzen (*Kamradt, 2001; Radbruch 2001*).

(ii) Wird T-Zellen ein Antigen ohne entsprechende kostimulatorische Signale präsentiert, können sie auf zwei Arten reagieren. Entweder sie sterben durch Apoptose (*Kamradt, 2001*) oder die werden funktional inaktiv, d.h. sie überleben, reagieren aber auf Ag-Präsentation nicht mehr mit der Produktion von Zytokinen, vor allem nicht mit IL-2, das die klonale Expansion fördert. Diesen Zustand nennt man Anergie. Auch B-Zellen können anerg werden, sie sezernieren dann keine Antikörper (*Schwartz, 1996*).

(iii) Immunologisch ignorant werden T-Zellen genannt, wenn sie ihr Antigen nicht erkennen können, weil es entweder in zu geringen Mengen vorkommt oder weil eine anatomische Barriere, wie z.B. die Blut-Hirn-Schranke, autoreaktive Zellen von ihrem Autoantigen trennt. In beiden Fällen kann keine Reaktion ausgelöst werden (*Kamradt, 2001; Radbruch 2001*).

(iv) In den letzten Jahren wurde die Rolle regulatorischer Lymphozyten in der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz immer deutlicher. Von großem Interesse sind dabei vor allem die CD4<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>). Diese werden weiter unterteilt in (1) natürliche T<sub>reg</sub>, die u.a. über die starke CD25-Expression identifiziert werden können und über direkte Zell-Zell-Kontakte suppressiv in das Immungeschehen eingreifen und (2) induzierte T<sub>reg</sub>, die via Zytokine wie IL-10, TGF-β oder INF-α modulierend einwirken (*Damoiseaux 2006, Sakaguchi 2000*).

In Mausmodellen gibt es darüber hinaus auch Hinweise auf IL-10-produzierende regulatorische B-Zellen (*Fillatreau 2002*).

Kommt es zum Zusammenbruch der Toleranz entsteht Autoimmunität. Bei einer Vielzahl von Erkrankungen weiß man, dass autoimmune Prozesse beteiligt sind. Häufig sind die Immunreaktionen gegen bestimmte Organstrukturen gerichtet, wie zum Beispiel gegen die Inselzellen des Pankreas bei insulinabhängigem Diabetes mellitus, gegen die Parenchymzellen der Schilddrüse bei Hashimoto-Thyreoiditis, gegen die TSH-Rezeptoren beim Morbus Basedow oder gegen die Myelinscheiden zentraler Neurone bei Multipler Sklerose.

Systemische Autoimmunerkrankungen sind u.a. durch die Bildung von zirkulierenden Immunkomplexen charakterisiert (*Janeway, 1995*). Ablagerungen dieser Immunkomplexe führen zu Schäden in verschiedenen Organen. Beispiele sind die rheumatoide Arthritis (RA) sowie der systemische Lupus erythematodes.

## 1.2 Der systemische Lupus erythematodes (SLE)

Mit einer Prävalenz von circa 1/2000 (*Fessel, 1974*) ist der SLE nach der RA eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen (*Manger, 2000*). Die Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr gibt Fessel für die US-Bevölkerung mit 4-7/100000 an. Neuere Studien zeigen einen deutlichen Anstieg der Inzidenz (*Uramoto, 1999; Petri, 2000*) und damit – wegen der Chronizität der Erkrankung – auch der Prävalenz. Dies ist vermutlich weniger auf einen absoluten Anstieg der Erkrankungen zurückzuführen als auf bessere diagnostische Möglichkeiten und bessere Kenntnis der Symptome. Es erkranken überwiegend Frauen im gebärfähigen Alter. Die chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung verläuft in Schüben und weist eine Vielzahl von Organmanifestationen auf, die bis zum Tod führen können.

### 1.2.1 Klinische Manifestationen

Das charakteristische namensgebende Schmetterlingserythem, das sich symmetrisch über Wangen und Nasenrücken unter Aussparung der Nasolabialfalte erstreckt, findet sich nur bei circa 30-40 % der Patienten. Insgesamt wird eine dermatologische Beteiligung aber auf über 70 % beziffert. Als weitere Hautmanifestationen gelten erhabene, gerötete, hyperkeratotische Effloreszenzen, die als diskoider Lupus bezeichnet werden, erhöhte Photosensibilität sowie oronasale Ulzerationen. Gelegentlich kommt es auch zu einer Beteiligung der Kopfhaut mit vernarbender Alopezie. Unspezifische Allgemeinsymptome wie Fieber, Müdigkeit, Übelkeit oder Gewichtsverlust treten bei nahezu allen Patienten in einem aktiven Krankheitsstadium auf.

Sehr häufig (bei ca. 90 % der Patienten) findet man eine Gelenkbeteiligung in Form von Arthralgien, Arthritis und Tenosynovitis. Wie bei der rheumatoiden Arthritis zeigt sich oft ein symmetrischer Befall der kleinen Gelenke, im Gegensatz zur RA werden jedoch selten röntgenologisch erosive Veränderungen gefunden.

Von großer prognostischer Bedeutung sind die Entwicklung einer klinisch manifesten Glomerulonephritis, die sich bei ca. der Hälfte der Betroffenen ausbildet (histologische Veränderungen finden sich bei ca. 90 % der Patienten), und die Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS), welche sich in den verschiedensten neurologischen oder psychiatrischen Symptomen äußern kann und deren Häufigkeit auf 35-75 % geschätzt wird. Durch therapeutisch notwendige Immunsuppression, aber teilweise auch krankheitsbedingt, besteht ein erhöhtes Infektionsrisiko, das nicht unerheblich zur Letalität beiträgt, (*Reeves, 1992; Manger, 2000*).

Im akuten Schub sind Pleuritis oder Perikarditis häufige kardiopulmonale Begleiterscheinungen. Schwere pulmonale Manifestationen wie die akute Pneumonitis und die lebensbedrohliche alveoläre Hämorrhagie sind hingegen sehr selten. Ebenso sind die irreversible Lungenfibrose und die schwere pulmonale Hypertonie seltene Komplikationen des SLE (*Hiepe, 1996*). Bedingt durch die mittlerweile guten Langzeitüberlebensraten haben kardiovaskuläre Ereignisse eine große Bedeutung für Morbidität und Mortalität. Das Risiko für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit ist bei SLE-Patienten deutlich erhöht (*Petri, 1992*). Dies liegt teilweise an dem häufigeren Vorkommen von primären Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie und Hypercholesterinämie. Aber auch im Vergleich zu Kontrollgruppen mit gleichem Risikoprofil kommt es gehäuft zu Myokardinfarkten

(Bessant, 2004). Hier spielen neben der Arteriosklerose auch Koronaritis und thrombembolische Ereignisse im Rahmen eines sekundären Antiphospholipidsyndroms eine Rolle. Bestimmte Genotypen des Mannose-bindenden Lektins (MBL) sind mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung des SLE assoziiert (Ohlenschlaeger, 2004) und haben vermutlich auch eine Bedeutung für die Entwicklung einer Arteriosklerose (Tsutsumi, 2005). Die pathognomonische abakterielle Libman-Sacks-Endokarditis ist hingegen eine sehr seltene kardiale Krankheitsmanifestation.

Eine hämatologische Beteiligung kann sich in hämolytischer und häufiger in nicht-hämolytischer Anämie, in Leuko-, Lympho- und Thrombopenie, sowie in Splenomegalie und Lymphadenopathie äußern. Ophthalmologische Symptome können verschieden ausgeprägt sein, häufig im Rahmen eines sekundären Sjögren-Syndroms mit Beteiligung exokriner Drüsen. Nicht selten und komplikationsreich ist das sekundäre Antiphospholipid-Syndrom mit arteriellen und venösen Thrombosen, rezidivierenden Aborten und Antiphospholipid-Antikörpern. Akrale Durchblutungsstörungen im Sinne eines Raynaud-Syndroms sind seltener als bei anderen Kollagenosen, können aber Frühzeichen des SLE sein. Gastrointestinale Manifestationen spielen eine eher untergeordnete Rolle (Hiepe, 1996).

Für die objektivierbare Messung der Krankheitsaktivität wurden verschiedene Aktivitätsscores etabliert, in denen klinische und paraklinische Parameter berücksichtigt werden. Hierzu zählen unter anderem der SLAM (Systemic Lupus Activity Measure), der SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) und der ECLAM (European Consensus Lupus Activity Measurement). (Bencivelli, 1992; Bombardier, 1992; Vitali, 1992).

### 1.2.2 Pathogenese

Die Pathogenese des SLE ist sehr komplex. Teilweise ist die Unterscheidung zwischen krankheitsbedingten und therapieinduzierten Phänomenen schwierig. Die genaue Ätiologie des SLE ist nicht bekannt. Man geht jedoch davon aus, dass die Entstehung multifaktoriell bedingt ist: Neben genetischen (Tsokos, 2000; Botto, 1998) und immunregulatorischen Faktoren werden auch Umwelteinflüssen wie Infektionen (James, 1997; Harley, 1999), UV-Strahlung, Medikamenten und hormonellen Veränderungen eine Rolle bei der Aufhebung des immunologischen

Gleichgewichts zugesprochen. Dysfunktionen finden sich praktisch in allen Komponenten der Immunantwort.

Aus Autoantikörpern, Autoantigenen und Komplement bestehende zirkulierende Immunkomplexe führen durch ihre Ablagerung in Gefäßwänden zu einer Vaskulitis. Diese ist ursächlich für einen Großteil der Organschäden bei SLE. Daneben treten auch Symptome und Symptomkomplexe auf (vor allem hämatologischer Art), wie zum Beispiel die Thrombozytopenie oder das Antiphospholipid-Syndrom, die durch direkte Effekte von Antikörpern gegen Zelloberflächenmoleküle oder gegen Serumkomponenten hervorgerufen werden (*Mills, 1994*).

In verschiedenen Untersuchungen zeigt sich im Serum von SLE-Patienten eine Dysbalance zahlreicher Zytokine (*Dean, 2000*). Beispielsweise ist die Serumkonzentration von TNF- $\alpha$  häufig normal oder erhöht. Gleichzeitig erhöhte Konzentrationen des löslichen TNF- $\alpha$ -Rezeptors können aber zu einer relativ zu niedrigen TNF- $\alpha$ -Aktivität führen (*Gabay, 1997; Dean 2000*). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Entwicklung von Anti-dsDNA-Antikörper (vorrangig der Klasse IgM) bei RA-Patienten, die mit Anti-TNF- $\alpha$ -Antikörpern behandelt wurden (*Benucci, 2005; Charles, 2000*). Neuerdings wird auf der anderen Seite aber eine Anti-TNF- $\alpha$ -Therapie bei SLE-Patienten mit erhöhten Serumspiegeln in kleinem Rahmen eingesetzt. Dabei kam es bisher zwar zu einem Anstieg der Serum-Autoantikörper, aber zu einer Besserung der klinischen Symptome und der Krankheitsaktivität (*Aringer, 2004*).

TGF- $\beta$ , das mittelbar die IgG-Produktion in B-Zellen unterdrückt, ist im Serum der SLE-Patienten erniedrigt (*Dean, 2000*). Es fand sich eine negative Korrelation zwischen der *in vitro* Produktion von TGF- $\beta$  durch NK-Zellen und dem SLEDAI (*Ohtsuka, 1999*). Andererseits ist IL-10, das wie TGF- $\beta$  als antiinflammatorisches Zytokin angesehen wird, in seiner Konzentration erhöht (*Lacki, 1997*). Diese korreliert positiv mit Anti-dsDNA-Ak-Titern sowie dem SLEDAI und erhöht die IgG-Produktion in PBMC. Es zeigte sich außerdem ein Zusammenhang zu niedrigen Komplementwerten (*Dean, 2000*). Auch IL-6 ist im Serum erhöht und findet sich bei Patienten mit Lupusnephritis im Urin. B-Zellen von SLE-Patienten exprimieren konstitutiv IL-6-Rezeptoren. So wird vermutlich autokrin die typische chronische B-Zellaktivierung aufrechterhalten. IL-6 ist außerdem notwendig für die Reifung und das Überleben von Plasmazellen. IFN- $\gamma$  wird als weiterer Faktor für die polyklonale B-Zellaktivierung angesehen, auch seine Konzentration korreliert mit der

Krankheitsaktivität. Besonders Patienten mit Lupusnephritis weisen erhöhte Serumkonzentrationen auf (Dean, 2000). Für IL-2, das T-Zellen zur Proliferation anregt, zeigte sich neben hohen Serumkonzentrationen eine verstärkte Expression niedrigaffiner (also schwächerer) IL-2-Rezeptoren auf T- und B-Zellen von Patienten mit aktivem SLE (Huang, 1988). In einer anderen Studie war die IL-2-Produktion nach mitogener Stimulation vermindert (Linker-Israeli, 1983). An der Hemmung der Sekretion dieses Zytokins scheinen CD8<sup>+</sup>-Suppressor-T-Zellen beteiligt zu sein (Linker-Israeli, 1985; Linker-Israeli, 1988). Auch das von Monozyten sezernierte IL-12, das normalerweise eine Th1-Antwort induziert, ist vermindert. Dies scheint mit der starken IL-10-Erhöhung in Zusammenhang zu stehen (Liu, 1998 a und b).

Zelluläre Abnormalitäten wie die verminderte Zahl und Aktivität der Tc-Zellen und die verminderte NK-Zellaktivität tragen vermutlich zur Erhaltung der autoantigenspezifischen Th- und B-Zellen bei (Tsokos, 1992). Defekte im Monozyten-Makrophagen-System und anderen Störungen beim Abbau apoptotischen Zellmaterials führen zur Veränderung und vermehrter Freisetzung nukleärer Autoantigene (Steinbach, 2000; Herrmann, 1998; Rosen, 1999; Cascaiola-Rosen, 1999; Manfredi, 1998).

Die meisten dieser Prozesse werden als sekundär bzw. krankheitserhaltend angesehen. Großes Interesse besteht daran, die auslösenden immunologischen Faktoren des SLE zu finden.

Wie in der physiologischen Infektabwehr fällt vermutlich auch hier den Th-Zellen eine entscheidende Bedeutung zu. Hinweise auf eine Beteiligung der Th-Zellen sowohl bei der Auslösung als auch bei der Unterhaltung der zum SLE führenden Autoimmunprozesse fand man vor allem in Mausmodellen, aber auch beim Menschen.

(1) Der Charakter der pathogenetisch relevanten Anti-dsDNA-Ak und auch anderer antinukleärer Antikörper (siehe Kapitel 1.6.3), lässt eine autoantigenabhängige, Th-Zell-gesteuerte Genese vermuten. Die Autoantikörper sind vom IgG-Typ, haben also einen Immunglobulinklassenwechsel durchlaufen und weisen somatische Mutationen auf (Shlomchik, 1990; Davidson, 1990; Crow, 1992).

(2) Aus Lupus-Mäusen und auch aus dem Blut von Patienten mit aktivem SLE konnten Th-Zellklone isoliert werden, die die Produktion von Anti-dsDNA-Ak durch autoreaktive B-Zellen verstärkten (Sainis, 1988; Shivakumar, 1989; Datta, 1995).

(3) Athymische NZB/NZW-Mäuse (*New Zealand Black* / *New Zealand White* Mäuse; Mausstamm, der Lupus-ähnliche Symptome entwickelt) bildeten keine Anti-dsDNA-Ak und litten nicht an Glomerulonephritis trotz vorhandener B-Zell-Überempfindlichkeit gegenüber Mitogenen (*Mihara, 1988*). Auf der anderen Seite konnte der Transfer von T-Zellen aus adulten NZB/NZW-Mäusen in die F1-Generation ein Lupus-ähnliches Syndrom auslösen (*Gleichmann, 1982*).

(4) In einem anderen Experiment mit NZB/NZW-Mäusen konnte der Ausbruch der Krankheit durch die Blockade von CD4<sup>+</sup>-Th-Zellen durch monoklonale anti-CD4-Ak verzögert werden (*Wofsy, 1985*).

### 1.2.3 Autoantikörper

Bekannt sind eine Reihe charakteristischer Autoantikörper, überwiegend vom IgG-Typ, die sich vor allem gegen DNA, RNA und assoziierte Proteine richten (*Von Mühlen, 1995*). Grundlegend für die Antikörperdiagnostik bei SLE ist die Bestimmung der antinukleären Antikörper (ANA), die bei mehr als 95 Prozent der SLE-Patienten positiv sind (*Hiepe, 2006*). Es werden dabei unterschiedliche Subgruppen von Antikörpern erfasst, deren Gemeinsamkeit es ist, gegen Bestandteile des Zellkerns gerichtet zu sein. Dabei werden Antikörper gegen lösliche Bestandteile des Zellkerns, also gegen Proteine und Ribonukleinsäuren, extrahierbare nukleäre Antikörper (ENA) genannt.

Von großer diagnostischer Bedeutung sind Antikörper gegen native Doppelstrang-DNA (Anti-dsDNA-Ak), die, abhängig von der Nachweismethode, bei 40-80 % der SLE-Patienten gefunden werden (*Hiepe, 2006*). Wegen der hohen Spezifität für die Erkrankung sind sie wegweisend bei der Diagnosestellung. Zudem können sie, im Gegensatz zu den ANA, als Verlaufsparemeter herangezogen werden (*Spronk, 1995*). In den letzten Jahren richtete sich die Aufmerksamkeit außerdem auf Antikörper gegen Nukleosomen, die noch vor dem Auftreten von Anti-dsDNA-Ak gefunden werden und damit einen hohen prädiktiven Wert haben (*Amoura, 1994*). Die Bedeutung der Nukleosomen wird in Kapitel 1.2.4 näher erläutert.

Ebenfalls krankheitsspezifisch aber seltener als Anti-dsDNA-Ak sind Anti-Sm-Antikörper, die gegen Bestandteile eines Ribonukleoproteins gerichtet sind. Sie werden, je nach Zusammensetzung des Patientenkollektivs mit einer Häufigkeit von 5-70 % angegeben (*Hiepe, 2006*). In jüngerer Zeit sind vor allem Auto-Ak gegen das SmD1-Peptid in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Auffällig ist die Homologie

des C-terminalen Endes dieses Peptids zu einem nukleären Ag des Epstein-Barr-Virus.

Extrem selten sind die Anti-PCNA/Cyclin-Ak, die auch SLE-spezifisch sind. Klinisch relevant sind außerdem Anti-Ro/SS-A und Anti-La/SS-B-Ak, die auch bei anderen Autoimmunerkrankungen auftreten. Sie stehen im Zusammenhang mit erhöhter Photosensitivität und mit dem sekundären Sjögren-Syndrom. Sie sind darüber hinaus mit dem neonatalen Lupus assoziiert. Anti-Ro/SS-A-Ak spielen dabei insbesondere beim angeborenen AV-Block der Neugeborenen von SLE-Patientinnen eine Rolle (*Mok, 2001*). Mit dem sekundären Raynaud-Syndrom sind vor allem Anti-U1-RNP-Ak assoziiert, die neben dem SLE vor allem bei Mischkollagenosen vorkommen (*Hiepe, 2006*).

#### **1.2.4 Aufbau und Bedeutung der Nukleosomen**

Anti-dsDNA-Antikörper sind von zentraler Bedeutung beim SLE. Nicht abschließend geklärt ist jedoch ihre Entstehung. Versuche mit Mäusen zeigten, dass native DNA in der Regel nicht immunogen ist (*Van Bruggen, 1996; Reeves, 1994; Madaio, 1984*). Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Autoantikörper produzierende B-Zellen, wie bereits dargelegt, auf T-Zellhilfe angewiesen sind. T-Zellen können aber keine freie DNA erkennen, sondern nur Peptide, die ihnen von APC präsentiert werden. Somit stellt sich die Frage nach dem T-Zell-aktivierenden Autoantigen. In den letzten Jahren rückten daher die Nukleosomen vermehrt ins Zentrum der Aufmerksamkeit.

Die DNA als Träger der Erbinformation, liegt im Zellkern in Form von Chromatin vor, das die Chromosomen bildet. Die fundamentale, sich wiederholende Einheit des Chromatins ist das Nukleosom. Der Kern eines Nukleosoms (Core-Partikel) wird von einem Proteinoktamer gebildet, das aus jeweils zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 aufgebaut ist. Um dieses Core-Partikel windet sich die doppelsträngige DNA in 146 Basenpaaren. Dabei bildet sie vierzehn Kontaktstellen mit der Histonoberfläche aus. Das Chromatin bildend, sind die Nukleosomen wie Perlen einer Kette aneinander gereiht, wobei sie durch eine variable Menge (bis zu 60 Basenpaare) Histon-freier DNA verbunden sind. An der Ein- und Austrittsstelle der DNA in das Nukleosom befindet sich ein weiteres Histonmolekül (H1). Das Molekulargewicht eines Nukleosoms beträgt 262 kDa mit einem 1:1-Verhältnis von

Protein zu DNA. Freie Nukleosomen entstehen nur bei Apoptose durch Aufspaltung des Chromatins (*Amoura, 2000*).

Antikörper gegen Nukleosomen wurden erstmals 1993 in MRL/Mp-lpr/lpr-Mäusen (einem Mäusestamm, der Lupus-ähnliche Symptome entwickelt) gefunden (*Losman, 1993*). Diese Antikörper reagierten nicht mit dsDNA oder Histonen allein, waren also spezifisch gegen Nukleosomen gerichtet. Zwei Jahre später bestätigte sich dieser Befund im Serum von SLE-Patienten (*Chabre, 1995*).

In weiteren Experimenten mit MRL/Mp-lpr/lpr-Mäusen fand man, dass Anti-Nukleosomen-Ak lange vor der Entwicklung von Anti-dsDNA- und Anti-Histon-Ak gebildet wurden, was einen weiteren Hinweis auf eine pathogenetisch bedeutsame Rolle der Nukleosomen bei SLE darstellte (*Amoura, 1994*). Umgekehrt werden bei vorhandenen Anti-dsDNA-Ak-Titern fast immer auch Antikörper gegen Chromatin und subnukleosomale Komplexe gefunden (*Burlingame, 1994*).

Mittlerweile geht man davon aus, dass Anti-Nukleosomen-, Anti-Histon- und Anti-dsDNA-Ak zu einer gemeinsamen Gruppe gehören.

### 1.2.5 Nukleosomenspezifische T-Helfer-Zellen

MOHAN et al. untersuchten Anti-dsDNA-Ak-induzierende Th-Zellklone aus Lupus-Mäusen (siehe 1.6.3) auf Reaktivität gegen Nukleosomen. 50 % dieser Klone waren spezifisch für nukleosomale Antigene. Sie reagierten nicht auf Stimulation mit freier DNA oder Histonen, verstärkten aber die Produktion von IgG-Autoantikörpern sowohl in dsDNA-, histon- und nukleosomenspezifischen B-Zellen *in vitro* (*Mohan, 1993*).

Später gelang es, immundominante Peptiduntereinheiten der Histone zu finden, die diese Mäuse-Th-Zellklone stimulierten (*Kaliyaperumal, 1996*).

Auch aus dem Blut von SLE-Patienten gewonnene Th-Zelllinien wurden untersucht. Von 10 untersuchten Anti-dsDNA-Ak-induzierenden Th-Zelllinien reagierten 4 mit dem chromosomalen Nicht-Histon-Protein HMG und zwei mit nukleosomalen Histon-Proteinen. Eine Th-Zelllinie reagierte stärker mit aufgereinigter DNA als mit Nukleosomen (*Desai-Mehta, 1995*).

Weitere Experimente der gleichen Arbeitsgruppe führten auch bei T-Zelllinien und mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMC) von SLE-Patienten zur Bestimmung immundominanter Histonepitope. Wie bei den Mäusen reagierten die Th-Zellen stark auf die Peptidfragmente H2B<sub>10-33</sub>, H4<sub>16-39</sub> und H4<sub>71-94</sub>. Zusätzlich wurden die Epitope H2A<sub>34-48</sub> und H4<sub>49-63</sub> lokalisiert (*Lu, 1999*).

Eine andere Arbeitsgruppe charakterisierte histonspezifische Th-Zellklone von SLE-Patienten und Gesunden durch Messung der Zytokinsekretion mittels ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*). Sie fand sowohl bei Patienten als auch bei Gesunden Klone vom Th0-Typ mit IL-2-, IL-4- und INF- $\gamma$ -Produktion sowie Klone vom Th1-Typ mit IL-2- und INF- $\gamma$ -Produktion (Voll, 1997).

BRUNS et al. fanden nach Stimulation von PBMC mit Nukleosomen bei 14 von 26 SLE-Patienten, jedoch bei keinem von sieben gesunden Spendern T-Zellproliferation, gemessen anhand des Einbaus von [ $^3$ H]-Thymidin (Bruns, 2000).

### 1.3 Nachweismethoden antigenspezifischer T- und B-Zellen

Zur *ex vivo* Identifizierung antigenspezifischer Lymphozyten wurden verschiedene Methoden entwickelt, die auf unterschiedlichen Reaktionsmechanismen antigenstimulierter Zellen beruhen. Diese sollen im Folgenden dargestellt werden.

#### 1.3.1 Detektion anhand der DNA-Syntheserate

Eine immer noch weit verbreitete Methode, die auch in den meisten der in Kap. 1.2.5 vorgestellten Experimente angewandt wurde, ist die Messung der DNA-Synthese antigenstimulierter Lymphozyten anhand des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin ([ $^3$ H]-Thymidin). Dabei wird die DNA-Synthese-Rate als Maß für die Proliferation der Lymphozyten genutzt. Es muss aber beachtet werden, dass DNA-Synthese und Proliferation nicht gleichgesetzt werden können. Da auch nicht proliferierende Zellen DNA synthetisieren können, entsteht eine hohe Hintergrundaktivität, die die Detektion niedriger Frequenzen antigenspezifischer Zellen erschwert. Hinzu kommt, dass man keine weiteren Informationen über die Zellen erhält, so dass zum Beispiel eine Differenzierung in T- und B-Zellen nach Stimulation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMC) nicht möglich ist. Außerdem gibt die Methode nur Auskunft über die letzten 6-24 Stunden einer mehrtägigen Stimulation, da der radioaktive Marker erst am Ende der Kultivierungsphase zugesetzt wird. Zellen, die sich bereits früher geteilt haben, werden nicht erfasst. Insgesamt ist die Methode sehr störanfällig, der Radionuklideinbau kann stark variieren in Abhängigkeit von pH-Wert, verwendetem Zellkulturmedium *etc.* (Murat, 1990).

Die nicht radioaktive Substanz Bromodeoxyuridin (BrdU), die ebenfalls bei Neusynthese in die DNA eingebaut wird, kann mit Fluorochrom-gekoppelten

monoklonalen Ak gegengefärbt werden und ermöglicht so die durchflusszytometrische Analyse der antigenstimulierten Zellen und somit die phänotypische Charakterisierung auf Einzelzellebene. Außerdem können funktionelle Moleküle wie Zytokine oder Immunglobuline intrazellulär markiert werden. Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass die Zellen fixiert werden müssen, was weitere funktionelle Untersuchungen ausschließt (*Houck, 1985; Mehta, 1997*).

### 1.3.2 Detektion der Zytokinsekretion

Eine Möglichkeit zur Detektion antigenspezifischer Gedächtnis-T-Zellen besteht darin, die Zytokinproduktion nach Antigenstimulation auszunutzen. Will man bereits isolierte T-Zellklone auf ihre Spezifität testen, kann man mittels ELISA – nach Stimulation mit den jeweiligen Antigenen – Zytokinkonzentrationen (zum Beispiel IL-2) im Überstand der Kulturen bestimmen. Auch diese Methode wurde in mehreren der oben genannten Experimente angewandt (vgl. Kap. 1.2.5). Abgesehen davon, dass diese Vorgehensweise nur bei T-Zellklonen oder –linien möglich ist, aber nicht bei PBMC oder anderen gemischten Zellpopulationen, fehlt die Möglichkeit der Bestimmung des Th-Zelltyps (Th1, 2, 3, 0) einzelner Subpopulationen auf Einzelzellebene.

Eine Methode, die die Charakterisierung antigenspezifischer Th-Zellen bezüglich des Zytokinmusters und zusätzlicher Aktivierungsmarker wie CD69 oder CD25 erlaubt, ist die direkte intrazelluläre Zytokinfärbung und FACS-Analyse nach Kurzzeitstimulation von Lymphozyten zusammen mit APC (*Maino, 1995; Picker, 1995; Waldrop, 1997; Suni, 1998*). Hierbei werden die von den antigenstimulierten Zellen produzierten Zytokine durch die Zugabe des Sekretionsinhibitors Brefeldin A intrazellulär angereichert. Nach Fixierung der Zellen und Permeabilisierung der Zellmembran können die Zytokine mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert und auf Einzelzellebene analysiert werden. Die kurze Stimulationszeit gewährleistet die ausschließliche Erfassung von Gedächtniszellen und die Multiparameter-FACS-Analyse erlaubt das Betrachten der Koexpression verschiedener Zytokine. Die Technik kann in PBMC sowie in Vollblut angewandt werden. Auch zur Bestimmung immundominanter Epitope der Histone für autoreaktive Th-Zellen in SLE-Patienten wurde sie bereits angewendet (*Lu, 1999*). Ein wesentlicher Nachteil ist, dass niedrige Frequenzen antigenspezifischer Th-Zellen darüber schwer zu erfassen sind, da keinerlei Anreicherung erfolgt. Die Zahl autoantigenspezifischer T-Zellen liegt

vermutlich häufig unter der Nachweisgrenze dieser Methode. Außerdem ist das Vorhandensein intakter APC von grundlegender Bedeutung. Gerade bei Autoimmunerkrankungen stellt dies ein Problem dar. Aufgrund der notwendigen Fixierung stehen die untersuchten Zellen nicht für weitere Experimente zur Verfügung. Letzteres kann durch eine weiterentwickelte Technik, den zytometrischen Zytokinsekretionsassay, umgangen werden (*Manz, 1995; Brosterhus, 1999; Thiel, 2004*). Hierbei werden die von den aktivierten Zellen sezernierten Zytokine durch bispezifische Antikörper, z.B. gegen CD45 (Oberflächenmarker auf Lymphozyten) und gegen INF- $\gamma$  an der Zelloberfläche „aufgefangen“, so dass im Anschluss die Zytokine dort für die Zytometrie markiert werden können, ohne dass eine Fixierung erforderlich wird. Das Problem der niedrigen Frequenzen wird hier außerdem gemindert, indem nach der Sekretionsphase ein Anreicherungsschritt durch magnetische Zellsortierung zwischengeschaltet wird. Dennoch können auch dieser relativ aufwendigen Prozedur niedrigfrequente autoantigenspezifische Lymphozyten entgehen.

### 1.3.3 Detektion durch direkte Markierung

Antigenspezifische B-Lymphozyten können durch die Markierung der an ihrer Oberfläche exprimierten Immunglobuline der Durchflusszytometrie zugänglich gemacht werden. Hierzu muss das bekannte Antigen an einen fluoreszierenden Farbstoff, bzw. an magnetische Partikel zur zusätzlichen Anreicherung, gekoppelt werden. Die Einschränkung dieser Technik liegt lediglich in den eventuell großen Mengen erforderlichen Materials, da sich die Frequenz der antigenspezifischen Memory-B-Zellen, oft nur 1-10 Zellen in einem Milliliter Blut beläuft (*Irsch, 1995; Manz, 1998; Leyendeckers, 1999; Thiel, 2004*).

Weitaus schwieriger hingegen ist der direkte Zugang zu antigenspezifischen T-Zellen, da hier das immundominante Peptid des jeweiligen (Auto-)Antigens bekannt sein muss, was häufig noch nicht der Fall ist. Bei bekanntem Peptid ist zudem die Synthetisierung eines Tetramers erforderlich, da sich herausgestellt hat, dass monomere Peptide eine zu geringe Bindungsstärke (Avidität) zu ihrem korrespondierenden TCR aufbringen. Mittlerweile sind eine Reihe rekombinanter MHC-Klasse-I-Multimere zur Untersuchung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup>-Zellen erhältlich. Auf dem Gebiet der MHC-Klasse-II-Multimere ist die Technologie jedoch noch nicht weit fortgeschritten. Der Nachweis von CD4<sup>+</sup>-Zellen ist schwieriger, da

zum einen strukturell bedingt die Avidität zwischen MHC und TCR geringer ist und zum anderen antigenspezifische Th-Zellen 10 bis 100 mal seltener sind als die entsprechenden Tc-Zellen (*Altman, 1996; Thiel, 2004*).

#### 1.3.4 Detektion anhand der Proliferation

Neben Zytokinsekretion und DNA-Synthese kann auch die klonale Expansion von Gedächtnis-Lymphozyten nach Antigenkontakt, also die Proliferation, gemessen werden.

Carboxyfluoreszeindiazetat-Succinimidylester (CFDA-SE) ist ein membrangängiger, fluoreszierender Farbstoff, der nach Abspaltung der Diazetatgruppe (Carboxyfluoreszein-Succinimidylester = CFSE) in den Zellen verbleibt und dort über die Estergruppe an freie Aminogruppen zytosolischer Proteine bindet (siehe Abb. 1.1). Die Markierung bleibt über Wochen stabil und erlaubt die *in vitro* Kultivierung der markierten Zellen. Da sich nach jeder Zellteilung die CFSE-Konzentration in den Tochtergenerationen halbiert, können über die abnehmende Fluoreszenzintensität proliferierende Zellen durchflusszytometrisch analysiert werden. Bis zu einer gewissen Anzahl von Teilungen können die einzelnen Generationen gut unterschieden und, je nach Fragestellung, einzeln analysiert werden. Die Anzahl der verfolgbaren Teilungen hängt von der Stärke der Ausgangsfluoreszenz ab.

Lyons und Parish etablierten diesen Proliferationstest an Lymphozyten aus der Milz von Mäusen, die sie polyklonal stimulierten. Sie verglichen dabei ihre neue Methode mit der Hoechst Bis-Benzimidazol-Hemmung durch BrdU und konnten zeigen, dass die Zellpopulationen mit halbiertem CFSE-Fluoreszenz denen mit verminderter Hoechst-Fluoreszenz entsprachen (*Lyons, 1994*).

Später wurde CFSE auch im humanen System für den Nachweis Candida-albicans-spezifischer T-Lymphozyten eingesetzt. Dabei wurde die Methode mit dem Einbau von [<sup>3</sup>H]-Thymidin verglichen und zeigte sich als äquivalent im Bezug auf Reaktion oder Nichtreaktion der Spender (*Angulo, 1998*).

Die Messung antigenspezifischer Zellproliferation mit Hilfe von CFSE ist weniger aufwendig als das Arbeiten mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin und erlaubt zusätzlich die phänotypische Charakterisierung der Zellen. Im Gegensatz zur Kurzzeitstimulation mit anschließender Färbung intrazellulärer Zytokine ist diese Testmethode nicht auf eine schnelle Funktion der APC angewiesen, da die Stimulationsdauer im Bereich von Tagen und nicht von Stunden liegt. Der vielleicht größte Vorteil ist, dass die

---

Zellen lebend analysiert und auch für weitere Experimente isoliert werden können. Ersteres erlaubt während der FACS-Analyse den Ausschluss toter Zellen durch den Einsatz von Propidiumjodid, letzteres ermöglicht weitere funktionelle Untersuchungen der proliferierten Zellen.

## 1.4 Aufgabenstellung

Bei Autoimmunerkrankungen ist die Untersuchung autoantigenspezifischer T- und B-Zellen von großem Interesse. Bisher waren dazu entweder technisch aufwendige Experimente wie das Arbeiten mit Zellklonen erforderlich oder der Einsatz des radioaktiven [<sup>3</sup>H]-Thymidins notwendig. Der Erhalt weiterführender Informationen war dabei begrenzt.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Anwendungsmöglichkeit der Proliferationsmessung mittels CFSE für die Detektion und weitere Charakterisierung antigen- und autoantigenspezifischer Lymphozyten im humanen System zu schaffen. Hierbei sollten sowohl T- als auch B-Lymphozyten untersucht werden.

Im ersten Teil der Arbeit sollte die CFSE-Technik für die Detektion niedriger Frequenzen antigenspezifisch proliferierender T- und B-Zellen mit Hilfe des Impfantigens Tetanustoxoid und mit einem Allergen etabliert werden. Dabei wurden zeitliche Abläufe, Farbstoffkonzentrationen sowie Zellkulturbedingungen der Fragestellung angepasst. Ferner sollten antigenspezifisch proliferierte Th-Zellen durch die durchflusszytometrische Bestimmung ihres Zytokinprofils funktionell analysiert werden. Antigen-spezifisch proliferierte B-Zellen sollten durch die Messung funktioneller Oberflächenmarker phänotypisch genauer charakterisiert werden.

Die im ersten Teil erarbeitete Methodik sollte dann für die Analyse autoantigenspezifischer Lymphozyten bei SLE-Patienten im Vergleich mit klinisch gesunden Spendern angewendet werden. Als Autoantigene wurden aus Hühnererythrozyten isolierte Nukleosomen und das SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid, beide klinisch relevant in Pathogenese und Krankheitsverlauf des SLE, eingesetzt. Parallel wurden für die Patienten die klinischen Aktivitäts-Scores SLAM, SLEDAI und ECLAM ermittelt. Bei Patienten und Gesunden wurden außerdem Anti-Nukleosomen-Ak mittels ELISA gemessen. Abschließend sollten die Ergebnisse der Proliferationsmessungen mit den klinischen und paraklinischen Daten auf statistisch signifikante Zusammenhänge untersucht werden.