

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der sensitiven durchflusszytometrischen Detektion und Charakterisierung antigenspezifisch proliferierter B- und T-Lymphozyten im humanen System

Methodisches Ziel dieser Arbeit war es, eine Proliferationsmessung für die gleichzeitige und sensitive Identifizierung antigenspezifischer CD4⁺-, CD8⁺- und CD19⁺-Lymphozyten aus mononukleären Zellen peripheren Blutes (PBMC) zu etablieren. Ferner sollten proliferierende Th-Zellen anhand ihres Zytokinprofils, sowie proliferierende B-Zellen anhand funktioneller Oberflächenproteine weiter charakterisiert werden.

Zur polyklonalen Stimulation wurde das Superantigen Staphylokokkenenterotoxin B (SEB) eingesetzt. Die antigenspezifische Stimulation erfolgte mit Tetanustoxoid (TT) im Sinne eines Recall-Antigens sowie mit Gräserpollenextrakt als Allergen.

3.1.1 Polyklonale Stimulation CFSE-markierter PBMC

Für erste Proliferationsuntersuchungen wurden PBMC mit einer CFSE-Konzentration von 1 μ M markiert, unter Zugabe von SEB drei bis fünf Tage kultiviert und nachfolgend formaldehydfixiert. Anschließend wurden die Zellen zur Detektion der Th-Zellen mit einem fluoreszierenden Anti-CD4-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. In Abb. 3.1 a sind Analyse SEB-stimulierter PBMC und Kontrollansatz gegenübergestellt. Die Stimulationsdauer betrug jeweils fünf Tage.

In der Darstellung der Parameter Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen Seitwärtsstreulicht (SSC), also Größe gegen Granularität (vgl. Kap. 2.10), erkennt man nach SEB-Stimulation eine Zellpopulation, die sowohl im FSC als auch im SSC stärker signalgebend ist als die gemessenen Zellen im Kontrollansatz. Diese Zellpopulation entspricht den Lymphoblasten, die größer und dichter sind als ruhende Lymphozyten, welche im Kontrollansatz überwiegen. Es wurde ein Analysefenster um die Lymphozyten- und Lymphoblastenpopulation gesetzt, um Zelltrümmer, Monozyten und nach Aufreinigung verbliebene Erythrozyten und Granulozyten weitgehend aus der weiteren Auswertung auszuschließen. Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf die innerhalb dieses Fensters liegenden Zellen. Ein

solches Analysefenster wurde bei allen Auswertungen der FACS-Analysen in dieser Arbeit gesetzt.

Abb. 3.1 b zeigt in Histogrammen die Darstellung der CFSE-Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl. In der Analyse der polyklonal stimulierten PBMC kann man deutlich getrennte Populationen mit jeweils halbiertes CFSE-Intensität erkennen (logarithmische Skalierung). Dabei entspricht die Anzahl der Gipfel der Anzahl der Zellteilungen. In der Auswertung der unstimulierten PBMC zeigt sich hingegen die gleich bleibend starke Intensität des Farbstoffes, da nahezu keine Zellteilung stattgefunden hat.

In Abb. 3.1 c wurde die CFSE-Intensität gegen die CD4⁺-Markierung der Lymphozyten aufgetragen. Man sieht in der Darstellung der SEB-stimulierten Zellen hohe Frequenzen von Zellen mit verminderter CFSE-Fluoreszenz, also proliferierten Zellen. Die angegebenen Prozentzahlen in der Abbildung beziehen sich auf den Anteil proliferierter CD4⁺-Zellen an allen CD4⁺-Zellen. Die Frequenz der CD4⁺-Zellen mit verminderter CFSE-Intensität im Kontrollansatz liegt bei 0,24 % und ist damit im Vergleich zu der SEB-reaktiven Proliferation mit einer Frequenz von 67,7 % vernachlässigbar. Proliferation in den Kontrollen ohne Antigen wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Hintergrundproliferation bezeichnet.

In Abb. 3.2 wurden die Analysen drei und fünf Tage stimulierter PBMC miteinander verglichen. Die Auswahl dargestellter Parameter entspricht der in Abb. 3.1. Der Hauptanteil proliferierter Zellen befindet sich am Tag drei in der ersten Teilungsgeneration während die meisten proliferierten Zellen zwei Tage später mehrere Teilungen durchgemacht haben (Abb. 3.1b). Nach fünf Tagen liegt die Frequenz proliferierter CD4⁺-Zellen bei 67,7 % im Vergleich zu 10,9 % nach drei Tagen (Abb. 3.1c).

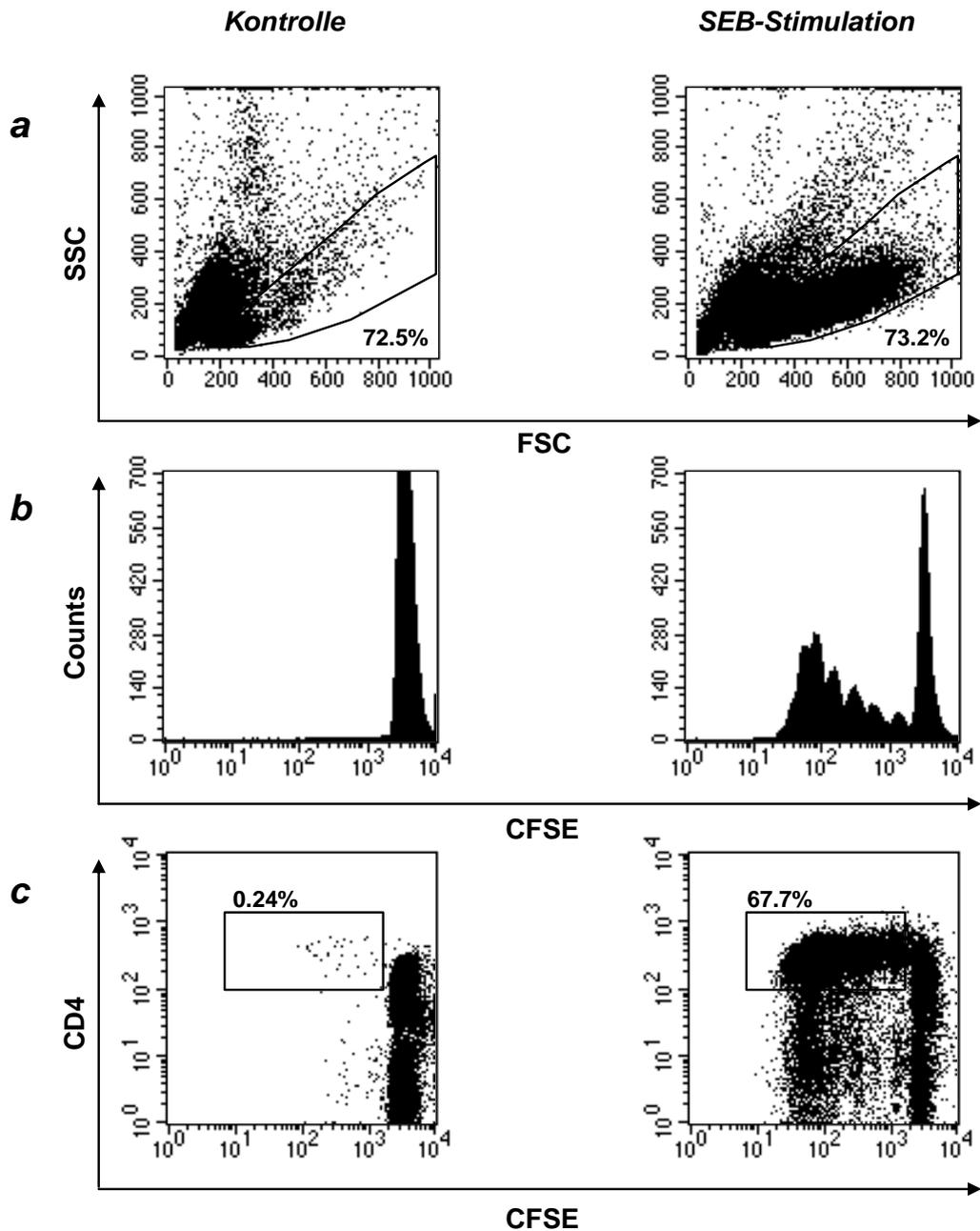


Abbildung 3.1: Proliferation SEB-stimulierter Th-Zellen. CFSE($1\mu\text{M}$)-markierte PBMC wurden für fünf Tage ohne Antigen (links) und mit SEB (rechts) kultiviert und anschließend formaldehydfixiert. Die fixierten Zellen wurden mit αCD4 -Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

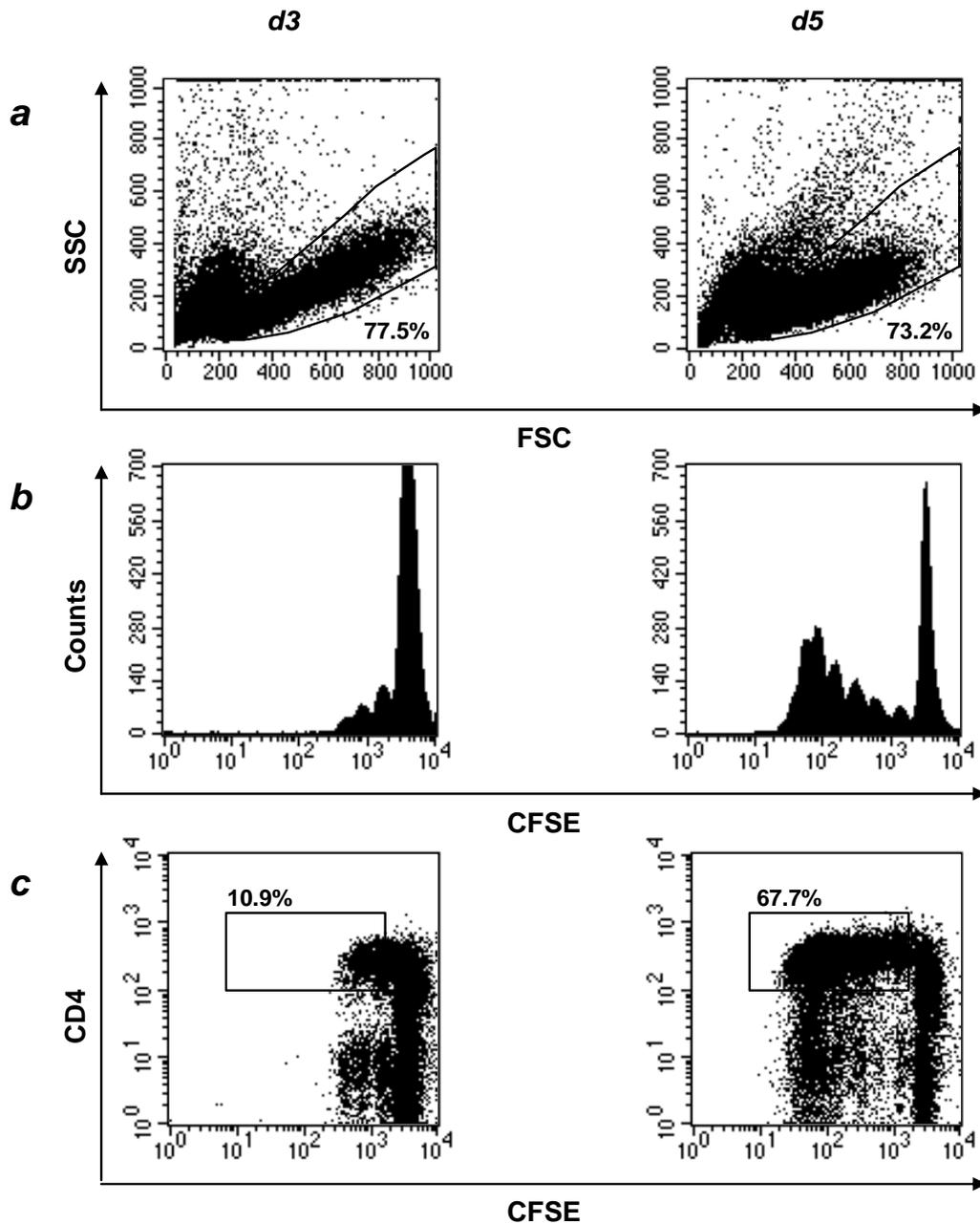


Abbildung 3.2: Vergleich von Tag 3 und Tag 5 der SEB-Stimulation. CFSE($1\mu\text{M}$)-markierte PBMC wurden für drei Tage (links) bzw. fünf Tage (rechts) mit (SEB) kultiviert und anschließend formaldehydfixiert. Die fixierten Zellen wurden mit $\alpha\text{CD4-Cy5}$ -Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

3.1.2 Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der eingesetzten CFDA-SE-Färbekonzentration

In der Literatur wurden für die CFDA-SE-Färbung Konzentrationen von $1\mu\text{M}$ und $5\mu\text{M}$ verwendet. Dabei konnten einzelne Teilungsgenerationen gut erkannt werden,

jedoch beeinträchtigte die starke Fluoreszenz, die im Wellenlängenbereich des 1. Messkanals liegt, die Messungen in den anderen Wellenlängenbereichen. Zur Detektion der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen sollte aber eine simultane Färbung mit α CD4-Ak für Th-Zellen, α CD8-Ak für Tc-Zellen und α CD19-Ak für B-Zellen ermöglicht werden. Um alle vier Messkanäle nutzen zu können, wurde deshalb die Fluoreszenzintensität durch niedrigere Färbekonzentrationen soweit verringert, dass eine gute Kompensation (vgl. Kap. 2.10.2) zwischen den Messkanälen möglich wurde. Hierzu wurden PBMC mit CFDA-SE in verschiedenen Konzentrationen zwischen 2 und 0,1 μ mol markiert. In Abb. 3.3 ist die mittlere Fluoreszenzintensität der analysierten PBMC gegen die CFDA-SE-Konzentration dargestellt. Bei Konzentrationen zwischen 1 und 0,25 μ mol kann man eine annähernde Halbierung der Fluoreszenzintensität bei halbiertem Färbekonzentration erkennen. Für die Konzentrationen 0,5 und 0,25 μ mol wurden die PBMC zusätzlich mit den Antikörperkonjugaten α CD8-PE, α CD4-PerCP und α CD19-APC markiert (nicht als Abbildung dargestellt). Bei der niedrigeren Konzentration gelang eine gute Kompensation, so dass alle Farbstoffe gemeinsam verwendet werden konnten. Deshalb wurde für die weiteren Versuche stets eine 0,25 μ M CFDA-SE-Färbelösung verwendet.

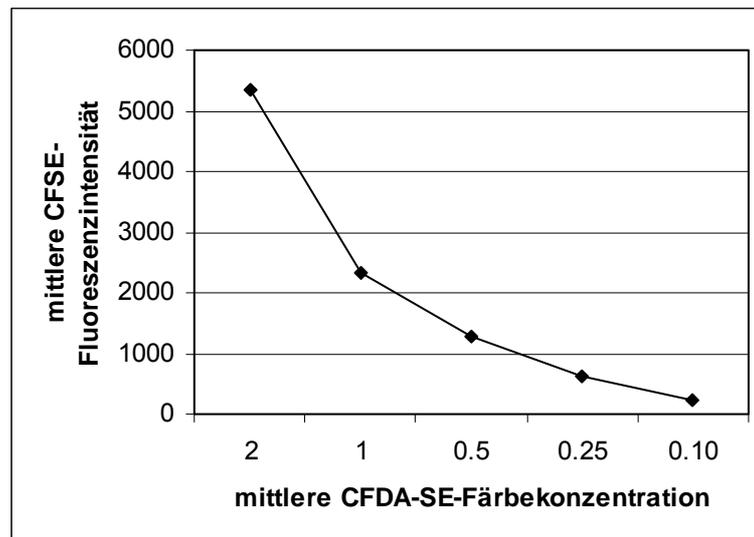


Abbildung 3.3: Titration der CFDA-SE-Konzentration. PBMC wurden mit CFDA-SE in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1-2 μ M) jeweils für 4 min inkubiert. Die Fluoreszenzintensität der Zellen wurde 24 Stunden später durchflusszytometrisch bestimmt. Die X-Achse zeigt die eingesetzte CFDA-SE-Konzentration, auf der Y-Achse sind die durchflusszytometrisch ermittelten mittleren CFSE-Fluoreszenzwerte der analysierten Zellen aufgetragen.

3.1.3 Antigen-spezifische Stimulation CFSE-markierter PBMC

3.1.3.1 Stimulation mit Tetanustoxoid

Das Superantigen SEB aktiviert alle T-Zellen deren TCR eine bestimmte V β -Kette beinhalten (V β 3, 12 oder 17), so dass keine Ag-spezifische Stimulation erfolgt, sondern ein genetisch determinierter Anteil des T-Zellpools auf das Antigen reagiert. B-Zellen werden durch SEB nicht stimuliert. Deshalb konnte es nicht als Modell für antigen-spezifische Proliferation verwendet werden. Da Tetanustoxoid (TT) zur Impfung gegen Wundstarrkrampf verwendet wird und somit bei den meisten gesunden Spendern Gedächtniszellen erwartet werden können, diente dieses Impfantigen zur weiteren Etablierung der CFSE-Technik für die Detektion Ag-spezifischer T- und B-Zellen.

Von einer gesunden Spenderin wurden bei ca. zwei Jahre zurückliegender TT-Immunsierung PBMC gewonnen, CFSE markiert und für fünf Tage mit TT kultiviert. Als Kontrolle wurden CFSE markierte PBMC ohne Antigen eingesetzt. Die durchflusszytometrische Analyse der nach Stimulation mit α CD8-, α CD4- und α CD19-Ak markieren Zellen (Abb. 3.4) zeigte stark proliferierte CD4⁺- und CD19⁺-Zellen nach TT-Stimulation (25,4 % der Th-Zellen, 42,3 % der B-Zellen) im Vergleich zu einer niedrigeren Hintergrundproliferation in den Kontrollansätzen (4,3 % der Th-Zellen, 12,9 % der B-Zellen). Tc-Zellen teilten sich in geringerem Maße: 5,6 % der TT-stimulierten CD8⁺-Zellen im Vergleich zu 1,6 % der unstimulierten CD8⁺-Zellen.

3.1.3.2 Anteil tetanustoxoidspezifisch proliferierter Lymphozyten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer – eine Kinetik

Zur Ermittlung des optimalen Zeitpunktes für die Messung Ag-spezifischer Proliferation nach TT-Stimulation wurden CFSE-markierte PBMC eines TT-immunisierten gesunden Spenders mit TT kultiviert. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Antigen. Am dritten bis siebten Tag der Kultivierung wurde jeweils eine Probe formaldehydfixiert. Zur FACS-Analyse wurden alle fixierten Zellen mit α CD4-, α CD8- und α CD19-Ak markiert.

In Abb. 3.5 sind die Anteile an proliferierten Zellen für CD4⁺-, CD8⁺- und CD19⁺-Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten in einem Diagramm dargestellt. Die Frequenzen proliferierter Zellen in den Kontrollansätzen wurden dabei von den Frequenzen der TT-stimulierten Zellen subtrahiert.

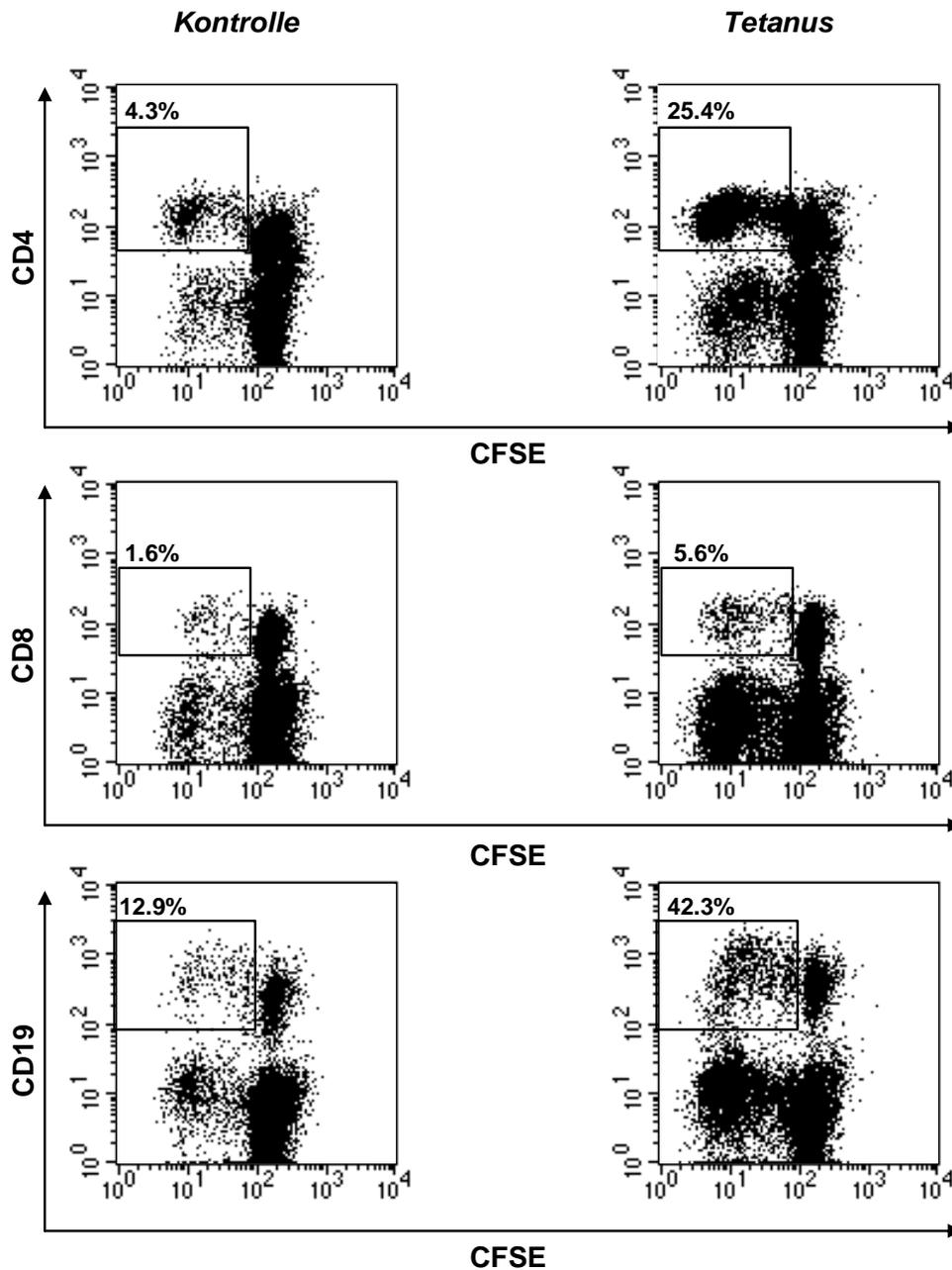


Abbildung 3.4: Proliferation TT-stimulierter Zellen. CFSE-markierte PBMC einer TT immunisierten Spenderin wurden für fünf Tage ohne Antigen (links) und mit Tetanustoxoid (rechts) kultiviert und im Anschluss formaldehydfixiert. Die fixierten Zellen wurden mit α CD8-, α CD4- und α CD19-Ak markiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Die Auswertung ergab bis zum siebten Tag ansteigende Frequenzen proliferierter CD4⁺-Zellen in den TT-stimulierten Proben. Die Differenz von stimulierten und unstimulierten Probe ist aber am siebten Tag etwas niedriger als am sechsten, da zwar die TT-stimulierten Zellen noch weiter proliferierten, jedoch in etwas stärkerem

Maße die Zellen ohne Stimulus. Der proliferierende Anteil der TT-stimulierten $CD8^+$ -Zellen war insgesamt deutlich niedriger, mit einem Anstieg bis zum sechsten Tag und anschließendem Abfall. Die Hintergrundproliferation in den Kontrollen stieg auch hier bis zum siebten Tag an. Die höchsten Frequenzen proliferierter $CD19^+$ -Zellen fanden sich am Tag 5. Dies galt auch für die Hintergrundproliferation in den Kontrollansätzen. Es zeigte sich also ein Optimum für die Detektion von T-Zellen (sowohl für $CD4^+$ - als auch für $CD8^+$ -Zellen) nach 6-tägiger und für B-Zellen nach 5-tägiger TT-Stimulation.

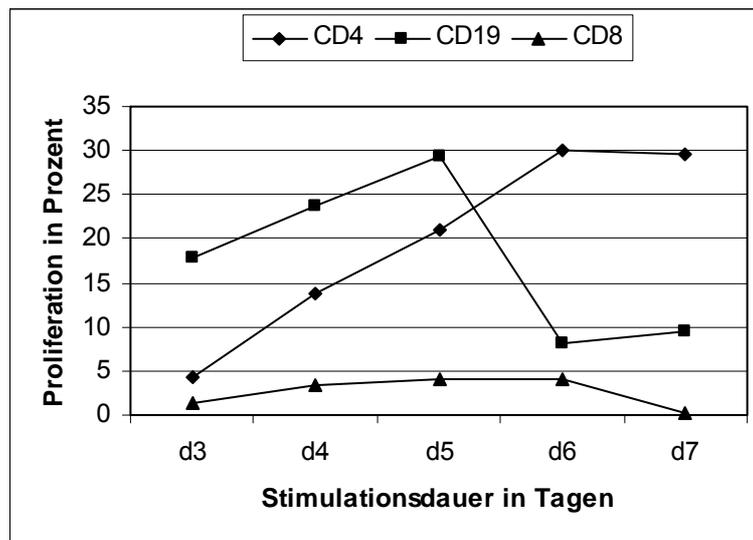


Abbildung 3.5: Proliferationskinetik TT-stimulierter PBMC. CFSE-markierte PBMC eines gesunden Spenders wurden mit TT stimuliert, nach 3 bis 7-tägiger Kultur formaldehydfixiert und anschließend für die FACS-Analyse mit fluoreszierenden Ak gegen CD4, CD8 und CD19 markiert. Auf der X-Achse ist die Dauer der Stimulation aufgetragen. Die Y-Achse gibt den Anteil proliferierter Zellen der jeweiligen Lymphozytensubpopulation ($CD4^+$ -, $CD19^+$ - und $CD8^+$ -Zellen) wieder. Die Hintergrundproliferation wurde herausgerechnet.

3.1.4 Charakterisierung tetanustoxoidspezifisch proliferierter Th-Zellen anhand ihres Zytokinprofils

Zur genaueren Charakterisierung der tetanustoxoidspezifischen Th-Zellen wurde nach polyklonaler Restimulation mit PMA und Ionomycin das Zytokinprofil analysiert. Hierzu wurden vor der Restimulation die $CD4^+$ -Zellen isoliert, da das CD4-Molekül bei der PMA/Ionomycin-Stimulation herabreguliert wird und danach nicht mehr aussagekräftig mit fluoreszierenden Ak markiert werden kann. Die Aufreinigung der $CD4^+$ -Zellen erfolgte mittels magnetassoziierter Zellsortierung (MACS). Die $CD4^+$ -

Zellen wurden aus den CFSE-markierten und 6 Tage TT-stimulierten PBMC gewonnen. Die Anreicherung wurde nach der Sortierung jedes Mal durchflusszytometrisch überprüft und lag immer bei über 99 % (vgl. Kap. 2.8.2).

Nach sechsstündiger Stimulation mit 5 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin unter Zugabe von 1 µg/ml Brefeldin A für die letzten zwei Stunden wurden die Zellen formaldehydfixiert. Nach Permeabilisierung mittels Saponin wurden die intrazellulär akkumulierten Zytokine mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert. Es wurden jeweils zwei Zytokine in einer Probe gefärbt. Folgende Antikörperpaare wurden gewählt: αIL-4/αIFN-γ, αIL-2/αIL-10, αIL-13/αIL-5 und αTNF-β/αTNF-α. In der Analyse konnten aufgrund der unterschiedlichen CFSE-Fluoreszenzintensität nicht proliferierte und verschieden stark proliferierte Zellpopulationen getrennt voneinander betrachtet werden (Abb. 3.6).

Um sich auf weniger Versuchsansätze zu beschränken, wurde in den weiteren Experimenten auf die Markierung der Zytokine IL-5 und TNF-β verzichtet und stattdessen TNF-α und IL-13 in einem Ansatz gefärbt. So wurde also jeweils ein Zytokin, das eher der Th1-Antwort zugesprochen wird (INF-γ, IL-2, TNF-α), mit einem der Th2- oder Th3-Antwort (IL-4, IL-13, IL-10) kombiniert.

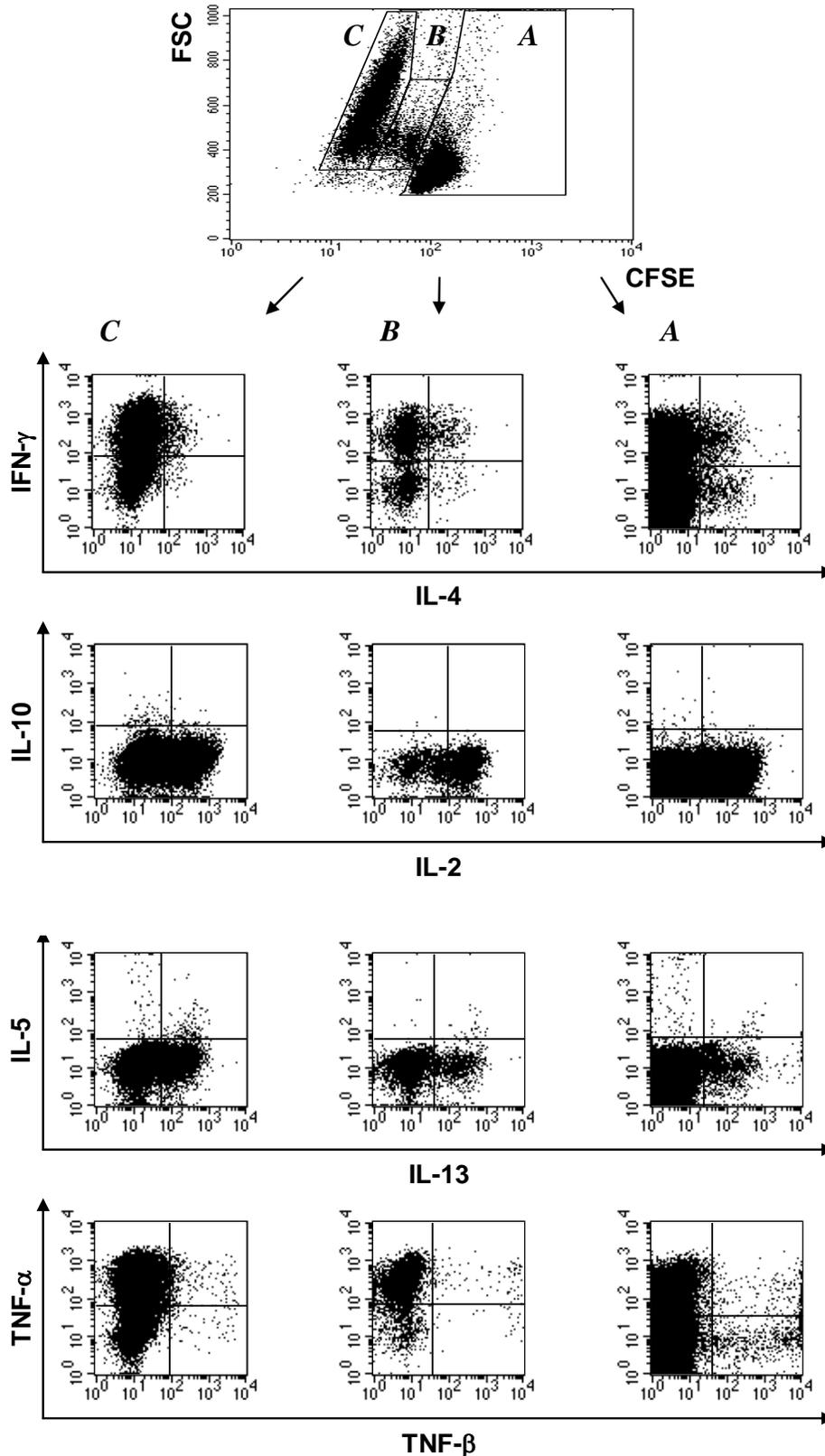


Abbildung 3.6: Zytokinsekretion proliferierter CD4⁺-Zellen nach polyklonaler Restimulation. Aus CFSE-markierten, 6 Tage TT-stimulierten PBMC wurden die CD4⁺-Zellen isoliert und diese für 6 Stunden mit PMA/Ionomycin restimuliert. Für die letzten zwei Stunden wurde der Sekretionsinhibitor

Brefeldin A zugegeben. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und in vier Proben aufgeteilt, die mit den Antikörperpaaren α IL-4 und α IFN- γ , α IL-2 und α IL-10, α IL-13 und α IL-5, bzw. α TNF- β und α TNF- α intrazellulär gefärbt wurden. Die Auswertung erfolgte durch Setzen verschiedener Analysefenster um nicht proliferierte (A) und unterschiedlich stark proliferierte Regionen (B, C).

3.1.5 Vergleich verschiedener Seren als Zusatz des Nährmediums während der Zellkultur

3.1.5.1 Vergleich von fetalem Kälberserum (FCS) und autologem Spenderserum (AS)

In den vorangegangenen Versuchen konnte man nach Stimulation mit Tetanustoxoid deutlich höhere Frequenzen proliferierter CD4⁺-Zellen erkennen als in den Kontrollansätzen. In diesen proliferierten Zellen konnte ferner das Zytokinmuster nach polyklonaler Restimulation bestimmt werden. Die unspezifische Proliferation von CD4⁺-

und auch CD19⁺-Zellen ohne Antigenstimulation stellte allerdings noch ein Problem dar (vgl. Abb. 3.4). Gerade für die weiterführende Charakterisierung der Th-Zellen, bei der die Zytokinsekretion der spezifisch proliferierten Zellen interessierte, sowie bei der Detektion niedriger Frequenzen autoreaktiver Zellen, wie sie bei SLE-Patienten zu erwarten waren, war diese Hintergrundproliferation unerwünscht.

Um zu überprüfen, ob der Medienzusatz FCS als tierisches Antigen für die unspezifische Zellproliferation verantwortlich war, wurde zum Vergleich autologes Serum des jeweiligen Blutspenders eingesetzt. Es wurden CFSE-markierte PBMC mit TT und ohne Antigen jeweils mit 10 % autologem Serum oder FCS als Medienzusatz kultiviert und nach 5 Tagen bezüglich der CD4⁺-Zellproliferation, sowie der Proliferation von CD8⁺- und CD19⁺-Zellen analysiert. Abb. 3.7 zeigt die Proliferation der CD4⁺-Zellen in diesem Experiment. Zu erkennen ist eine niedrigere Hintergrundproliferation in den Ansätzen ohne Antigen bei Verwendung von autologem Serum (0,06 %) im Vergleich zu FCS (0,4 %). Des Weiteren ist die Frequenz tetanustoxoidspezifisch proliferierter Th-Zellen bei AS-Medium (33,7 %) höher als bei FCS-Medium (11,7 %).

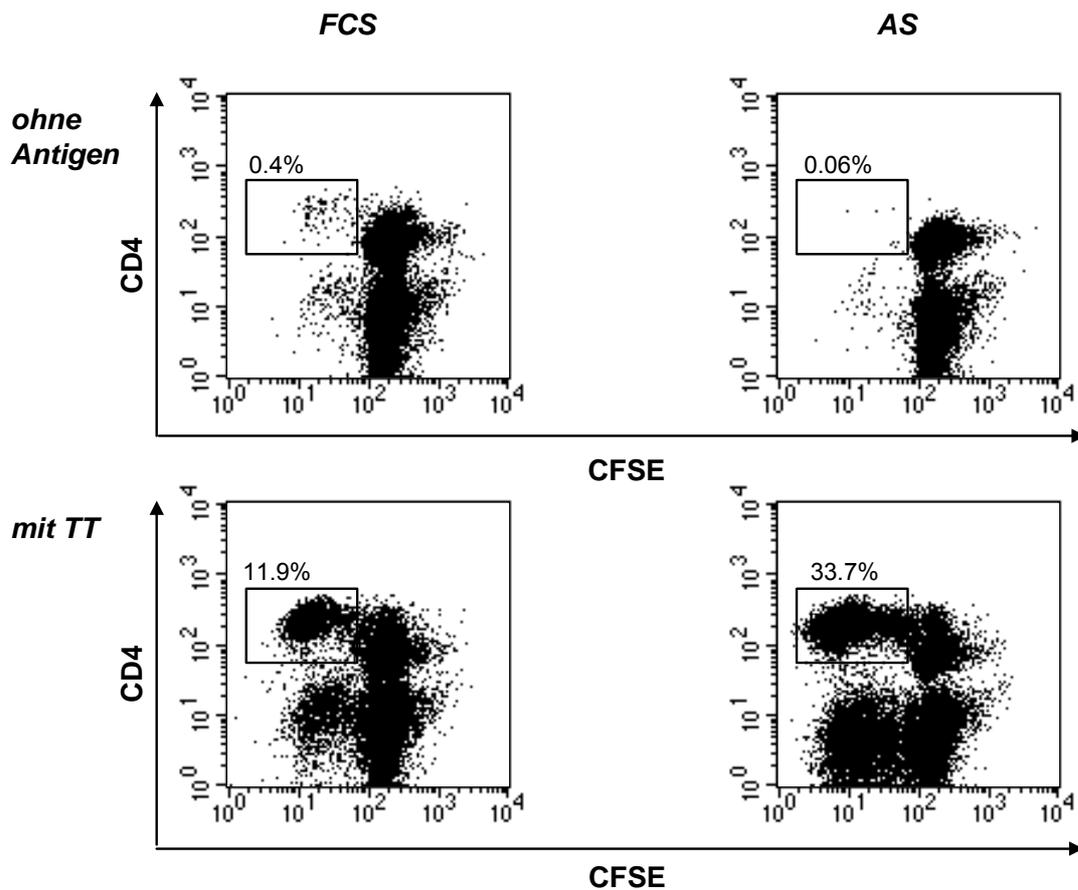


Abbildung 3.7: Vergleich von FCS und autologem Serum. CFSE-markierte PBMC wurden mit TT und ohne Antigen für 5 Tage kultiviert. Bei der Hälfte der Zellen wurde FCS als Medienzusatz verwendet (links), bei der anderen Hälfte autologes Serum (rechts). Die Zellen wurden mit α CD4-Ak markiert und die Proliferation durchflusszytometrisch analysiert.

3.1.5.2 Vergleich von autologem Serum und humanem Mischserum von Spendern der Blutgruppe AB

Nachteil des autologen Serums war, dass dadurch individuell unterschiedliche Faktoren die Vergleichbarkeit beeinflussten, bei SLE-Patienten z. B. Autoantikörper, Autoantigene oder Medikamente. Um einen einheitlicheren Versuchsaufbau zu schaffen, wurde deshalb humanes Mischserum von Spendern der Blutgruppe AB (ABS) getestet. Abb. 3.8 zeigt die Proliferation von CD4⁺-Zellen aus CFSE-markierten PBMC einer gesunden Spenderin nach Stimulation mit Nukleosomen bzw. TT. Dabei wurden AS und ABS als Medienzusätze gegenübergestellt. Man erkennt, dass die Frequenzen der proliferierten Zellen sowohl bei Nukleosomenstimulation als auch bei TT-Stimulation mit ABS-Medium deutlich

niedriger sind als mit AS-Medium. Insgesamt wurden CFSE-markierte PBMC von sieben gesunden Spendern getrennt mit AS- und mit ABS-Medium kultiviert und jeweils mit TT stimuliert oder unstimuliert belassen. Alle Proben wurden, wie in Abb. 3.8 gezeigt, durchflusszytometrisch analysiert.

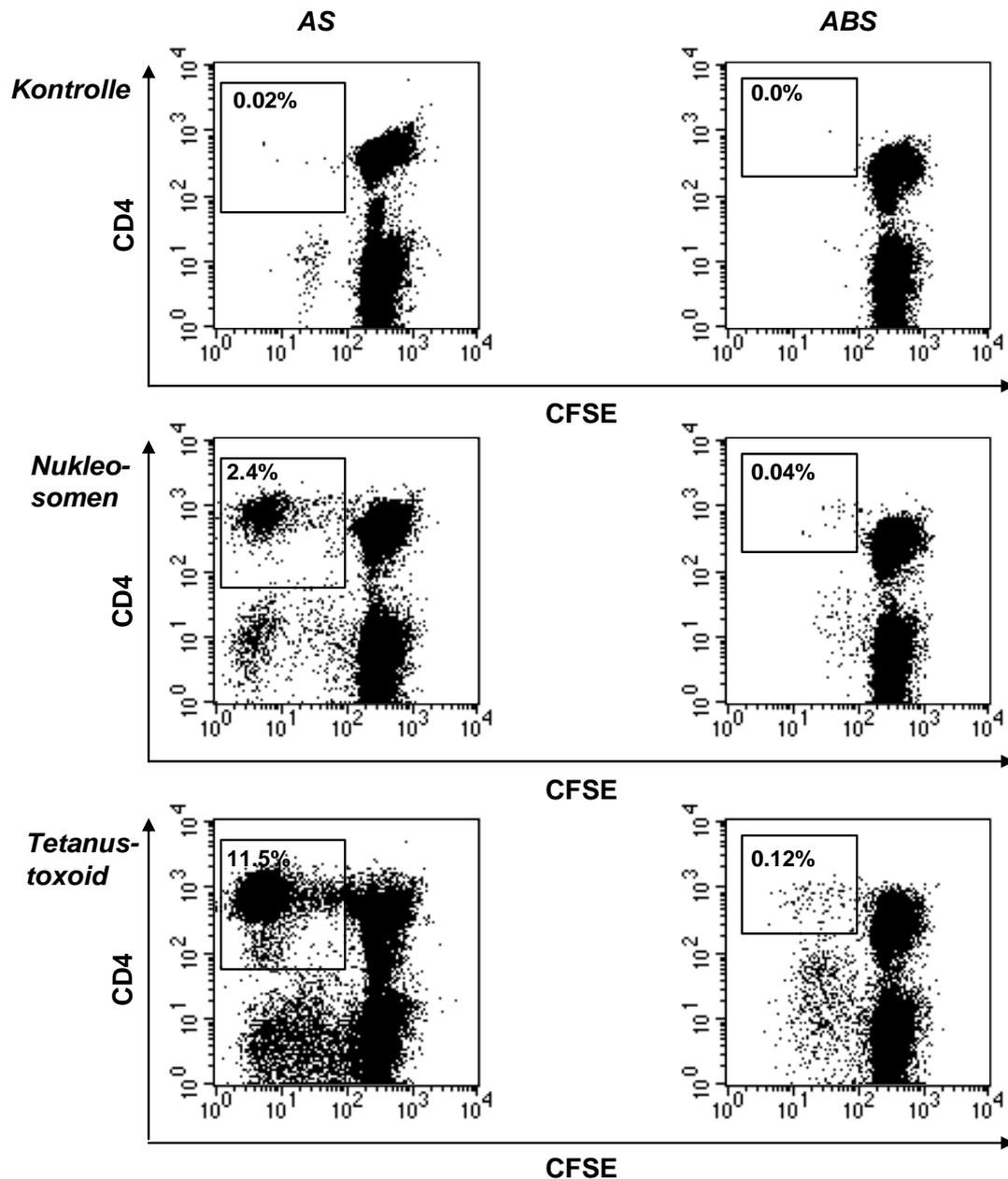


Abbildung 3.8: Vergleich von autologem Serum und humanem AB-Serum. Aus CFSE-markierten PBMC einer gesunden Spenderin wurde ein Teil in Medium mit autologem Serum und ein Teil in Medium mit humanem AB-Serum kultiviert. Sie wurden jeweils für 6 Tage mit TT und mit Nukleosomen stimuliert und anschließend mit α CD4-Ak gefärbt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil TT-spezifisch proliferierter an CD4⁺-Zellen.

In Abb. 3.9 sind die TT-reaktiv proliferierten $CD4^+$ -Zellen unter Verwendung von AS bzw. ABS in einem Diagramm dargestellt. Dabei wurde die Hintergrundproliferation aus den Werten der TT-reaktiven Proliferation herausgerechnet. Man sieht, dass bei jedem einzelnen Spender die Proliferation mit AS-Medium stärker war als mit ABS-Medium. Der Anteil der proliferierten $CD4^+$ -Zellen war mit AS zwischen viermal und 50-mal größer als mit ABS. Der nichtparametrische Wilcoxon-Test für abhängige Variablen ergab einen signifikanten Unterschied für die TT-reaktive $CD4^+$ -Zellproliferation mit AS im Vergleich zu ABS ($p = 0,018$). Da die antigenspezifische Proliferation unter Verwendung von ABS insgesamt zu schwach war, wurden die Experimente mit AS, welches sich FCS gegenüber als geeigneter erwiesen hatte, weitergeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurde im weiteren Verlauf AS als Medienzusatz verwendet.

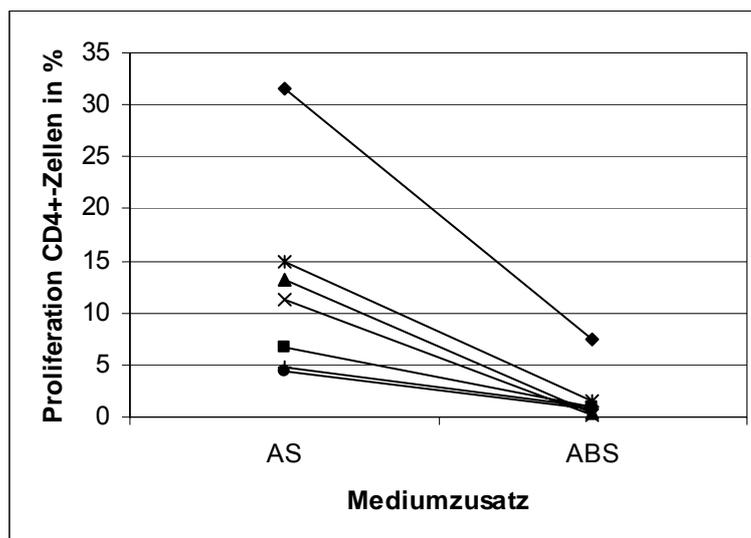


Abbildung 3.9: Vergleich der Proliferation von $CD4^+$ -Zellen nach TT-Stimulation bei PBMC von sieben gesunden Spendern bei Verwendung von AS bzw. ABS als Medienzusatz. CFSE-markierte PBMC wurden für 6 Tage mit TT oder ohne Antigen, jeweils in AS- oder ABS-Medium kultiviert, anschließend mit $\alpha CD4$ -Ak gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil TT-reaktiv proliferierter $CD4^+$ -Zellen (y-Achse) bei Verwendung von AS (links) oder ABS (rechts) für die verschiedenen Spender, die durch unterschiedliche geometrische Symbole dargestellt sind.

3.1.6 Allergenstimulation – Allergiker und Nichtallergiker im Vergleich

Durch die Verwendung von Allergenen zur Stimulation von PBMC sollten die Reaktionen eines sensibilisierten und eines nicht sensibilisierten Spenders verglichen

werden. Allergiker und Nichtallergiker wurden anhand der Klinik und durch die Bestimmung des spezifischen IgE für Gräserpollen unterschieden. CFSE-markierte PBMC von beiden Spendern wurden mit Gräserpollenextrakt für sechs Tage kultiviert, anschließend mit α CD4-, α CD8- und α CD19-Ak markiert und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.10). Allergiker und Kontrollperson reagierten mit etwa gleichen Frequenzen proliferierter CD4⁺-Zellen (jeweils ca. 3 %), während der Allergiker eine größere Anzahl proliferierender CD19⁺-Zellen zeigte als der Nichtallergiker (3,2 % vs. 0,73 %). CD8⁺-Zellen proliferierten nicht.

Um festzustellen, ob es Unterschiede im Zytokinmuster der reaktiven Zellen gab, wurden – wie bei TT gezeigt – CD4⁺-Zellen isoliert und polyklonal restimuliert. Anschließend wurden die proliferierten Th-Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Ak gegen Zytokine intrazellulär gefärbt, und hinsichtlich ihrer Zytokinsekretion durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.11).

Es zeigten sich dabei Unterschiede in den Frequenzen von IL-2- und INF- γ -Produzenten: IL-2 produzierten insgesamt 46,37 % der proliferierten Th-Zellen der Kontrollperson gegenüber 34,66 % der Zellen des Allergikers. Für INF- γ lagen die Prozentzahlen bei 29,26 bzw. 17,7 %. TNF- α wurde dagegen von mehr Zellen des Atopikers produziert (45,61 vs. 40,28 %). Für IL-10 fand sich kein deutlicher Unterschied (1,72 vs. 2 %). Bei IL-4 differierte vor allem die Frequenz der Einzelproduzenten, also der Zellen, die IL-4, aber kein INF- γ sezernierten. Diese lag beim Allergiker bei 5,93 % im Vergleich zu 1,98 % beim Gesunden. Die Gesamtzahlen unterschieden sich weniger stark (6,33 vs. 4,75 %). Der deutlichste Unterschied war jedoch in der Frequenz der IL-13-Produzenten zu verzeichnen: 15,46 % der proliferierten CD4⁺-Zellen des Atopikers, aber nur 4,8 % der Zellen der Kontrollperson sezernierten dieses Zytokin.

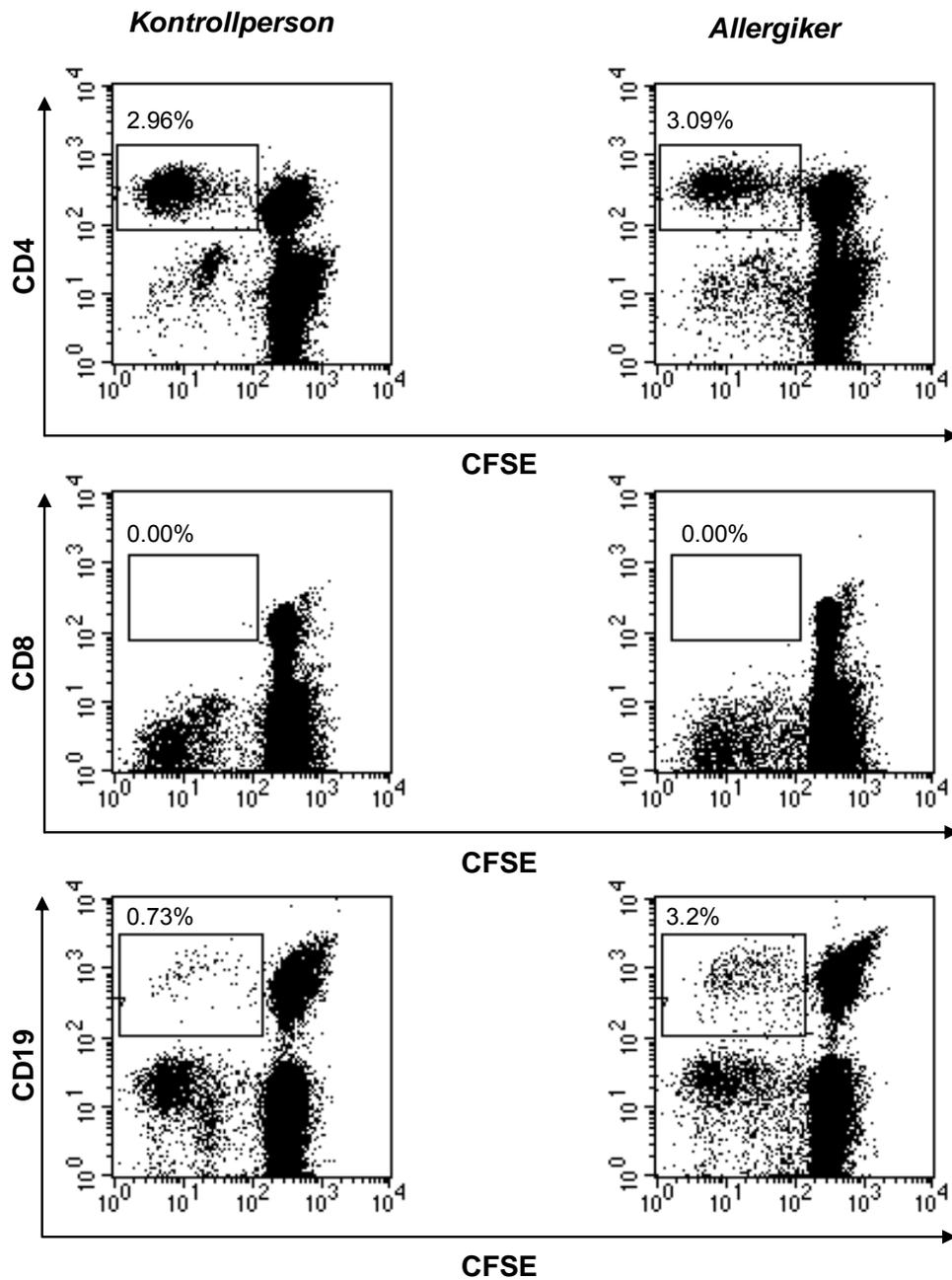


Abbildung 3.10: Proliferation von allergenstimulierten PBMC bei Nichtallergiker und Allergiker. CFSE-markierte PBMC eines Pollenallergikers und einer gesunden Kontrollperson wurden für 6 Tage mit Gräserpollenextrakt stimuliert und anschließend mit α CD4-, α CD8- und α CD19-Ak gefärbt. Die Prozentzahlen beziehen sich immer auf den Anteil der proliferierten Zellen an der jeweiligen Lymphozytenpopulation ($CD4^+$, $CD8^+$ oder $CD19^+$).

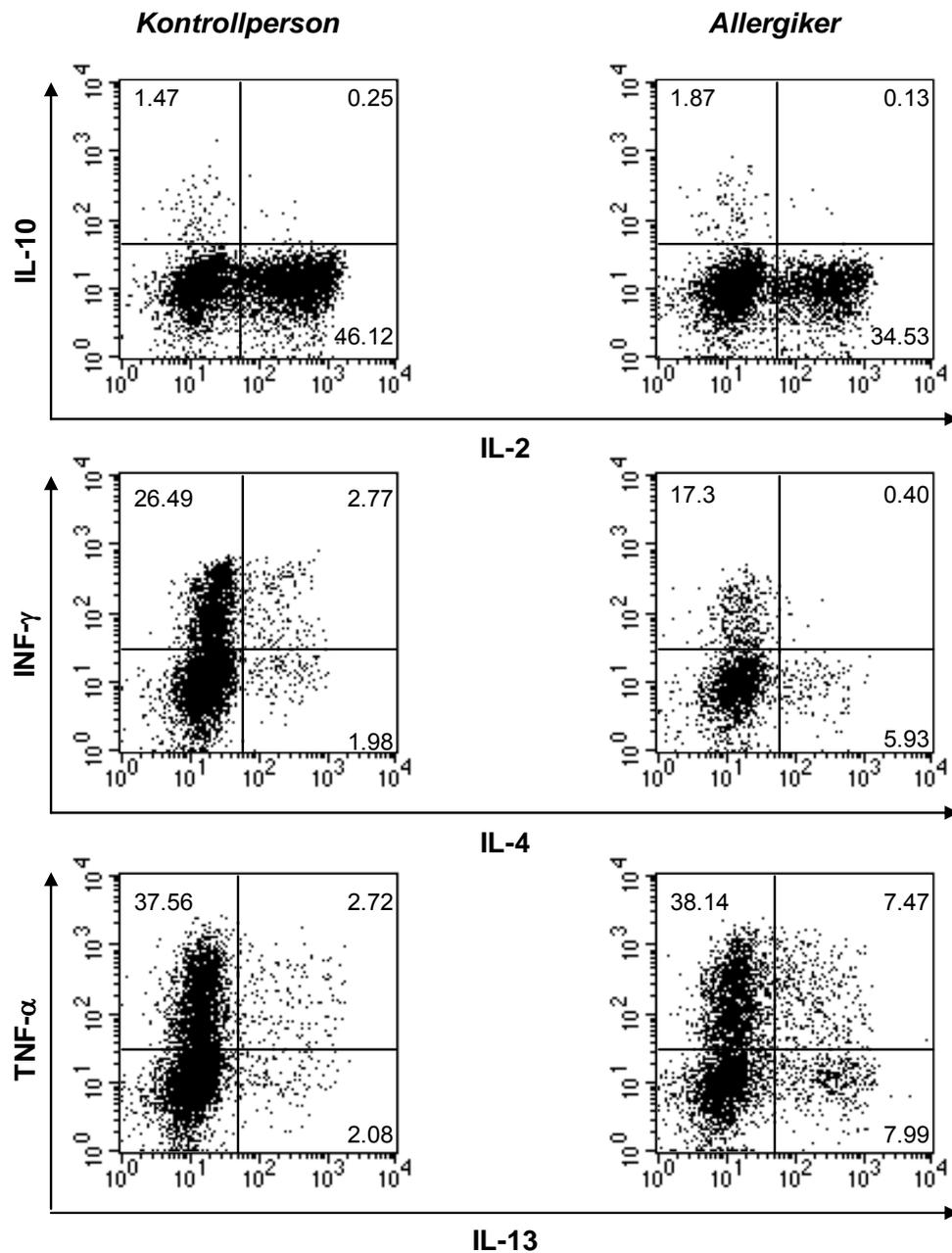


Abbildung 3.11: Zytokinmuster nach Allergenstimulation proliferierter Th-Zellen. $CD4^+$ -Zellen wurden aus CFSE-markierten, allergenstimulierten PBMC eines Nichtallergikers und eines Allergikers isoliert und mit PMA/Ionomycin (+ Brefeldin A) restimuliert. Die Zytokinsekretion wurde durch intrazelluläre Färbung bestimmt. Dargestellt sind nur die proliferierten Zellen, um die anhand der CFSE-Konzentration ein Analysefenster gelegt wurde.

3.1.7 Charakterisierung tetanustoxoidspezifisch proliferierter $CD19^+$ -Zellen

Wie eingangs erwähnt, sollten neben den Th-Zellen auch proliferierte B-Zellen näher charakterisiert werden. Da aktivierte antigenspezifische B-Zellen *in vivo* nach klonaler Expansion zu Plasmazellen ausdifferenzieren, sollte geprüft werden, ob auch die in

in vitro antigenspezifisch proliferierten CD19⁺-Zellen Merkmale dieser Effektorzellen aufwiesen.

3.1.7.1 *In vitro* Nachweis antigenspezifischer Plasmablasten

Es wurden zunächst, zusammen mit CFSE, der Aktivierungsmarker CD27 und der B-Zellmarker CD20 auf CD19⁺-Zellen nach 6-tägiger TT-Stimulation von CFSE-markierten PBMC betrachtet (Abb. 3.12). Charakteristisch für Plasmablasten ist der Verlust von CD20 bei gleichzeitig starker Expression von CD27-Molekülen (Odendahl, 2000). Anhand der CFSE-Fluoreszenzintensität wurden drei B-Zellpopulationen unterschieden: Die ruhenden B-Zellen, die B-Zellen, die bis zu vier Teilungen durchlaufen hatten und diejenigen, die sich mehr als viermal geteilt hatten. Nach mehr als vier Teilungen konnten keine einzelnen Generationen mehr unterschieden werden. Diese drei Gruppen wurden getrennt bezüglich der CD27/CD20-Koexpression analysiert. Es zeigte sich, dass in der Population der vielfach geteilten Zellen über 80 % das charakteristische Muster mit hochpositivem CD27 und niedrigem CD20 aufwiesen. In den Zellen, die sich seltener geteilt hatten, machte diese Fraktion nur 9 % aus und in den ruhenden B-Zellen weniger als 0,5%.

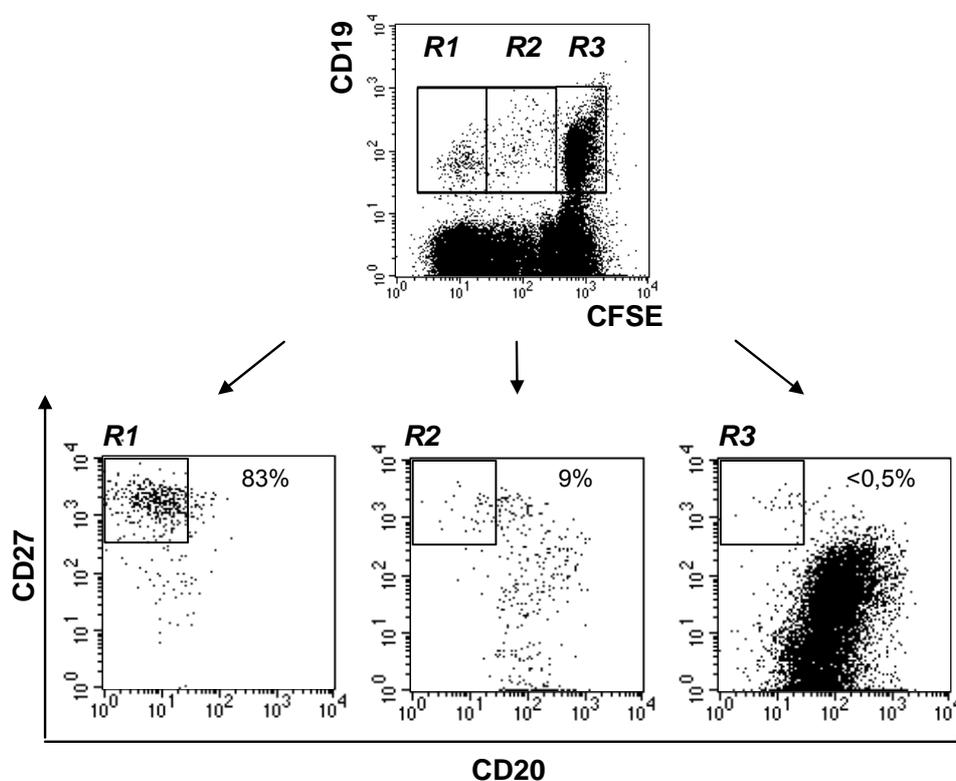


Abbildung 3.12: Charakterisierung TT-spezifisch proliferierter CD19⁺-Zellen bezüglich der Expression von CD20 und CD27. CFSE-markierte PBMC eines TT-immunisierten Spenders wurden

nach 6-tägiger TT-Stimulation mit α CD19-, α CD20- und α CD27-Ak gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Anhand der CFSE-Intensität wurden Analysefenster um die ruhenden, die bis zu viermal geteilten und die mehr als viermal geteilten CD19⁺-Zellen gesetzt (oben). Diese Subpopulationen wurden bezüglich ihrer Expression von CD20 und CD27 einzeln dargestellt (unten). Von links nach rechts sind mehr als viermal geteilte, bis zu viermal geteilte und ruhende CD19⁺-Zellen zu sehen.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde zusätzlich die Expression von CD138 auf diesen TT-spezifisch proliferierten B-Zellen untersucht. CD138 gilt als Differenzierungsmarker für Plasmazellen (Sanderson, 1989).

TT-stimulierte CFSE-markierte PBMC wurden dazu an Tag 3 bis 7 fixiert und mit α CD19-, α CD27- und α CD138-Ak für die durchflusszytometrische Analyse gefärbt. Abb. 3.13 zeigt die Koexpression von CD27 und CD138 in der proliferierten B-Zellpopulation im zeitlichen Verlauf. Die Frequenz CD27-hochpositiven B-Zellen steigt bis zum sechsten Tag auf fast 70%. CD138-positive B-Zellen können ab dem fünften Tag detektiert werden und erreichen am siebten Tag 14,7%.

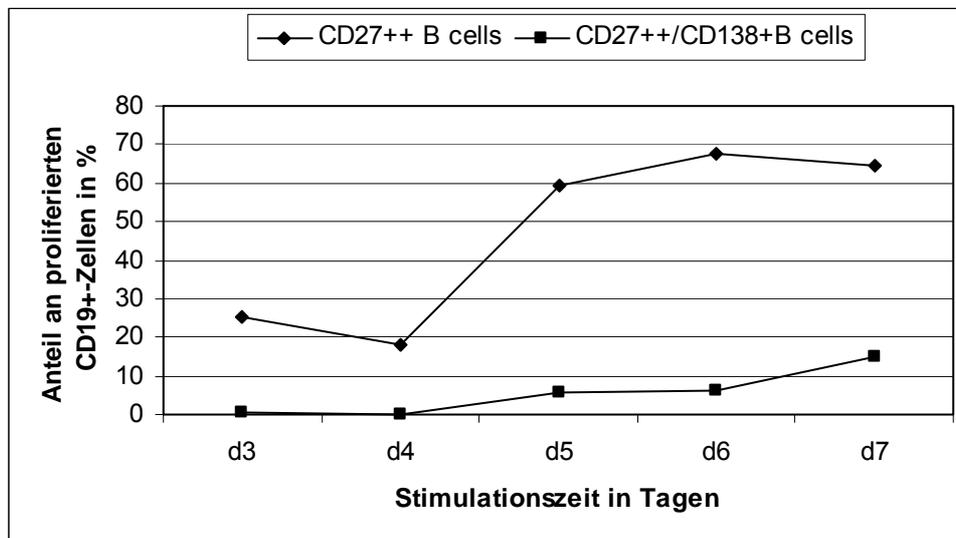


Abbildung 3.13: Zeitlicher Verlauf der Expression von CD27 und CD138 in TT-stimulierten CD19⁺-Zellen. CFSE-markierte PBMC eines TT-immunisierten Spenders wurden mit TT kultiviert und nach drei bis sieben Tagen formaldehydfixiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit α CD19-, α CD27 und α CD138-Ak gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die obere Kurve repräsentiert die Anteile der CD27-hochpositiven an proliferierten CD19-positiven Zellen im zeitlichen Verlauf. In der unteren Kurve sind die Frequenzen CD138-exprimierender CD27-hochpositiver Zellen dargestellt.

3.2 Detektion und Charakterisierung autoantigenspezifischer T- und B-Lymphozyten in SLE-Patienten und gesunden Spendern

Das zweite Ziel dieser Arbeit war die Anwendung der etablierten Proliferationsmessung mittels CFSE zur Analyse von PBMC aus SLE-Patienten und gesunden Kontrollpersonen. Hier sollten autoantigenspezifische T- und B-Zellen untersucht werden. Als Autoantigene dienten Nukleosomen und das C-terminale Ende des SmD1-Peptids (SmD1₈₃₋₁₁₉). Die erhaltenen Daten sollten auf Zusammenhänge mit klinischen und paraklinischen Parametern untersucht werden.

3.2.1 Detektion autoantigenreaktiver Proliferation

Zunächst wurde geprüft, ob eine Detektion von autoantigenspezifischer Proliferation innerhalb der Lymphozytensubpopulationen möglich war. Dazu wurden PBMC von fünf SLE-Patienten isoliert und mit CFSE markiert. Es wurden jeweils Ansätze mit Nukleosomen und Kontrollansätze ohne Antigen kultiviert. Bei drei Patientenproben wurde zusätzlich ein Ansatz mit dem SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid als zweitem Autoantigen stimuliert. Dem Zellkulturmedium wurde FCS zugesetzt. Nach sechstägiger Stimulation wurden die Zellen geerntet und mit α CD4-, α CD8- und α CD19-Ak gefärbt. Zum Ausschluss toter Zellen wurde PJ verwendet.

Abb. 3.14 zeigt die durchflusszytometrische Analyse von PBMC einer SLE-Patientin nach Nukleosomenstimulation im Vergleich zum Kontrollansatz. Während die Frequenz proliferierter CD4⁺-Zellen nach Kultivierung mit Nukleosomen mehr als doppelt so hoch ist wie im Kontrollansatz (7,9 vs. 3,0 %), sind die Frequenzen der proliferierten CD8⁺-Zellen sowohl mit als auch ohne Antigenzusatz deutlich geringer (jeweils 0,8 %). Die Prozentzahl der proliferierten CD19⁺-Lymphozyten ist nach Nukleosomenstimulation niedriger (5,2 %) als im Kontrollansatz (7,9 %). In Abb. 3.15 ist die Analyse der PBMC einer Patientin nach Stimulation mit SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid dargestellt. Die Frequenz der proliferierten CD4⁺-Zellen nach Stimulation mit dem Peptid beträgt circa das Zehnfache im Vergleich zum Kontrollansatz (15,6 vs. 1,4 %). Auch in den CD8⁺-Zellen lässt sich Proliferation nach Antigenstimulation finden (1,4 %), allerdings in wesentlich niedrigeren Frequenzen als in den CD4⁺-Zellen. In den CD19⁺-Zellen lag die Frequenz in der Kontrolle bei 1,9 % im Vergleich zu 3,0 % nach Antigenstimulation.

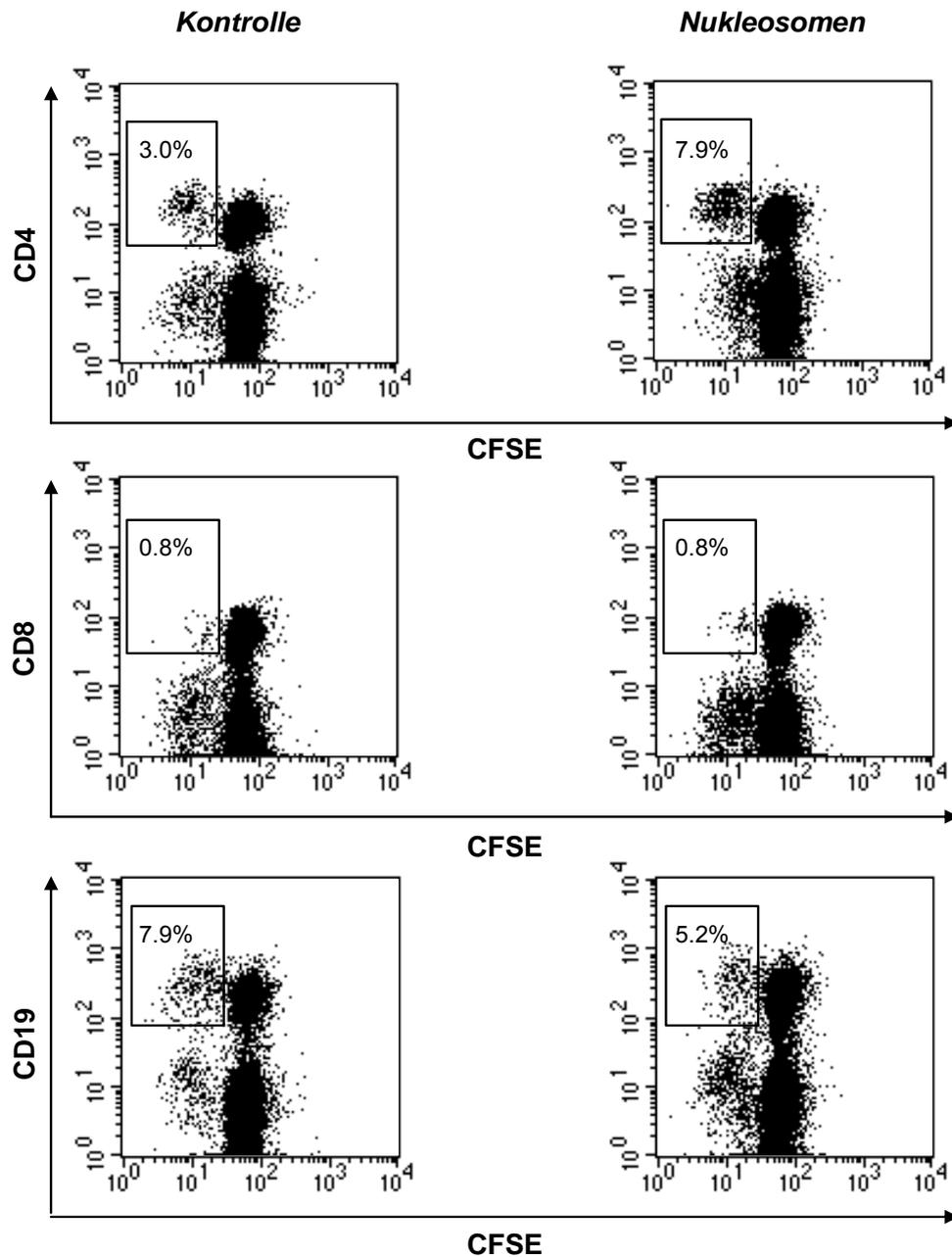


Abbildung 3.14: Proliferation von PBMC nach Stimulation mit Nukleosomen. CFSE-markierte PBMC einer SLE-Patientin wurden für 6 Tage mit Nukleosomen und ohne Antigen kultiviert. Als Medienzusatz wurde FCS verwendet. Anschließend wurden sie mit α CD4, α CD8- und α CD19-Ak sowie PJ gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

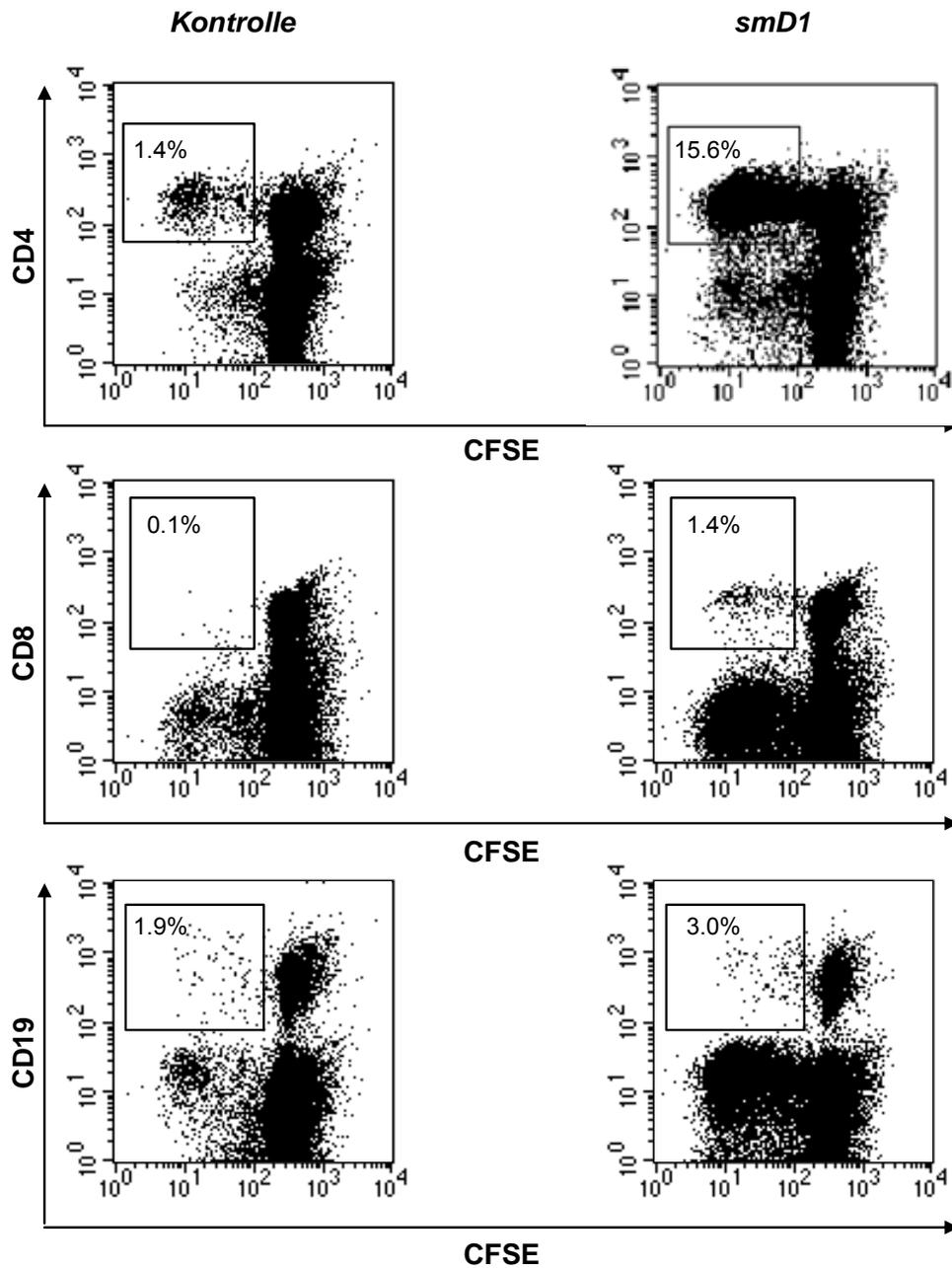


Abbildung 3.15: Proliferation von PBMC nach Stimulation mit Smd1₈₃₋₁₁₉-Peptid. CFSE-markierte PBMC einer SLE-Patientin wurden für 6 Tage mit Smd1₈₃₋₁₁₉-Peptid und ohne Antigen kultiviert. Als Medienzusatz wurde FCS verwendet. Im Anschluss wurden sie mit α CD4-, α CD8- und α CD19-Ak und PJ für die durchflusszytometrische Analyse gefärbt.

Tab. 3.1 und 3.2 zeigen eine Zusammenstellung der Frequenzen autoreaktiv proliferierter Zellen der fünf in diesem Vorexperiment analysierten Patienten. Es wurde jeweils die Differenz aus der Frequenz der proliferierten Zellen in den antigenstimulierten Proben und den unstimulierten Proben gebildet. Um das Ausmaß

der Hintergrundproliferation in die Darstellung mit einfließen zu lassen, wurde zusätzlich der Quotient stimuliert/unstimuliert berechnet. Je niedriger die Hintergrundproliferation in der Kontrolle, umso größer ist der Quotient und umso aussagekräftiger ist die Differenz. Bei vier von fünf Patienten lag nach Stimulation mit Nukleosomen die Differenz für CD4⁺-Zellen über 1 % der Proliferation bei einem Quotienten größer 2 (Tab. 3.1). Für CD19⁺- und CD8⁺-Zellen waren bei vier Patienten die Differenzen negativ. Das heißt, die Hintergrundproliferation ohne Antigen war stärker als nach Nukleosomenstimulation. Nach Stimulation mit Smd1₈₃₋₁₁₉-Peptid (Tab. 3.2) reagierte eine von drei Patienten mit einer Proliferation der CD4⁺-Zellen (14,52 %) und der CD8⁺-Zellen (1,31 %), während bei den anderen beiden die Proliferation in der Kontrolle stärker war als in Anwesenheit des Peptids.

Tabelle 3.1: Frequenzen in vitro nukleosomenspezifisch proliferierter T- und B-Zellen von 5 SLE-Patienten. Zahlen aus den Vorversuchen mit FCS als Mediumzusatz. Aus der Frequenz der Auto-Ag-reaktiv proliferierten Zellen und der in der Kontrolle proliferierten Zellen wurde für CD4⁺-, CD8⁺- und CD19⁺-Zellen jeweils die Differenz und der Quotient gebildet. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtzahl der jeweiligen Zellpopulation.

Pat. Nr.	Prol. CD4 ⁺ (in %)		Prol. CD19 ⁺ (in %)		Prol. CD8 ⁺ (in %)	
	Differenz	Quotient	Differenz	Quotient	Differenz	Quotient
4	4,90	2,65	-2,70	0,66	0,01	1,01
5	-0,23	0,71	-3,16	0,52	-0,11	0,50
6	1,56	3,85	-0,83	0,07	-0,35	0,53
8	2,15	2,37	-2,33	0,40	-0,20	0,57
12	1,83	2,27	0,96	1,51	0,04	1,44

Tabelle 3.2: Frequenzen in vitro Smd1₈₃₋₁₁₉-spezifisch proliferierter Zellen von 3 SLE-Patienten. Zahlen aus den Vorversuchen mit FCS als Mediumzusatz. Aus der Frequenz der Auto-Ag-reaktiv proliferierten Zellen und der in der Kontrolle proliferierten Zellen wurde für CD4⁺-, CD8⁺- und CD19⁺-Zellen jeweils die Differenz und der Quotient gebildet. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtzahl der jeweiligen Zellpopulation.

Pat. Nr.	Prol. CD4 ⁺ (in %)		Prol. CD19 ⁺ (in %)		Prol. CD8 ⁺ (in %)	
	Differenz	Quotient	Differenz	Quotient	Differenz	Quotient
5	-0,30	0,63	-3,12	0,53	-0,07	0,67
8	-0,27	0,83	-1,07	0,73	-0,15	0,67
12	14,52	11,12	1,12	1,60	1,31	14,57

3.2.2 Abhängigkeit der Frequenz nukleosomenspezifisch proliferierter Lymphozyten von der Inkubationsdauer

Zur Bestimmung des optimalen Zeitpunktes für die Detektion proliferierter Lymphozyten nach Stimulation mit Nukleosomen, wurden CFSE-markierte PBMC einer SLE-Patientin mit Nukleosomen stimuliert. Als Mediumzusatz wurde FCS verwendet. Es wurden am 3. bis 7. Tag Proben mit Formaldehyd fixiert und alle gemeinsam für die FACS-Analyse mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und CD19 markiert. In Abb. 3.16 sind die Ergebnisse in Form eines Diagramms dargestellt. Man kann erkennen, dass die Frequenz der proliferierten Th-Zellen – ähnlich wie bei Tetanustoxoid – bis zum siebten Tag ansteigt. Allerdings ist an Tag 5 – im Gegensatz zur Kinetik nach Tetanustoxoidstimulation – noch kein deutlicher Unterschied zwischen Kontrolle und Antigenstimulation zu erkennen. Bei CD8⁺-Zellen war keine Proliferation messbar. Für die CD19⁺-Zellen dieser SLE-Patientin fanden sich höhere Anzahlen proliferierter Zellen in den nicht stimulierten Kontrollansätzen. Da in dieser Darstellung von der Zahl der proliferierten Zellen nach Nukleosomen Stimulation die korrespondierende Zahl des Kontrollansatzes abgezogen wurde, ergibt sich für CD19⁺-Zellen ein negativer Kurvenverlauf. Die Autoantigenstimulationen wurden im weiteren Verlauf immer für sechs Tage durchgeführt.

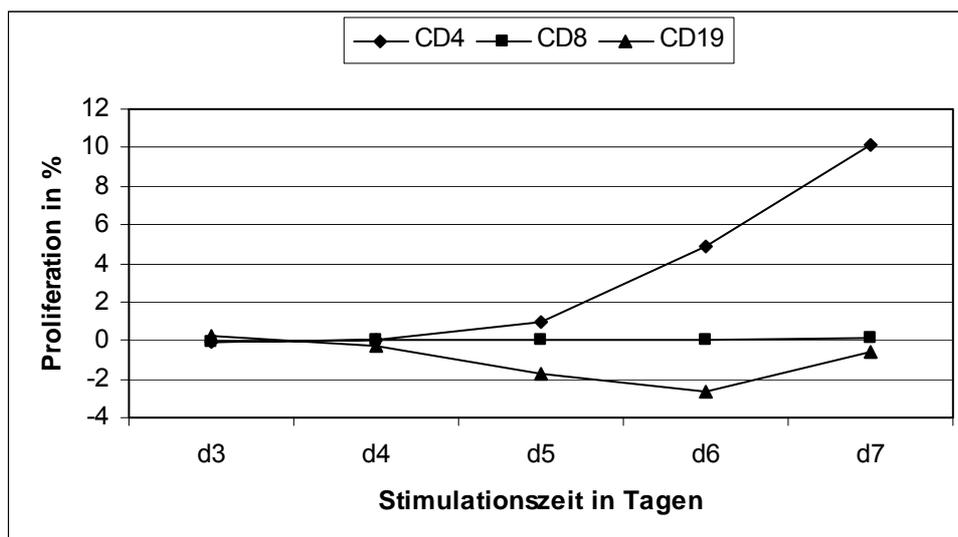


Abbildung 3.16: Proliferationskinetik nukleosomenstimulierter PBMC. CFSE-markierte PBMC einer SLE-Patientin wurden mit Nukleosomen stimuliert, nach 3 bis 7-tägiger Kultur formaldehydfixiert und anschließend für die FACS-Analyse mit fluoreszierenden Ak gegen CD4, CD8 und CD19 markiert. Auf der X-Achse ist die Dauer der Stimulation aufgetragen. Die Y-Achse gibt den Anteil proliferierter

Zellen der jeweiligen Lymphozytensubpopulation ($CD4^+$ -, $CD19^+$ - und $CD8^+$ -Zellen) wieder. Die Hintergrundproliferation wurde herausgerechnet.

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

Auch bei den Experimenten mit Autoantigenen wurde nach den Vorversuchen der Medienzusatz FCS durch autologes Serum ersetzt. Insgesamt konnten Zellen von 14 SLE-Patienten und 10 gesunden Spendern im Hinblick auf nukleosomenspezifische Proliferation analysiert werden. Bei 9 Patienten und 9 Gesunden wurde zusätzlich SmD1₈₃₋₁₁₉-reaktive Proliferation gemessen. Nach sechstägiger Kultivierung der CFSE-markierten, autoantigenstimulierten PBMC wurden die Zellen mit $\alpha CD4$ -, $\alpha CD8$ und $\alpha CD19$ -Ak gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse sind im Folgenden für gesunde Spender und SLE-Patienten getrennt aufgeführt.

3.2.3.1 Autoantigenreaktive Lymphozytenproliferation bei Gesunden

Wie in den Vorversuchen mit FCS wurde für proliferierte $CD4^+$ -, $CD8^+$ - und $CD19^+$ -Zellen jeweils die Differenz und der Quotient der Frequenzen proliferierter Zellen in den Ag-stimulierten Proben und den Kontrollen gebildet. Für die gesunden Spender sind die Ergebnisse nach Nukleosomenstimulation in Tabelle 3.3 dargestellt und nach SmD1₈₃₋₁₁₉-Stimulation in Tabelle 3.4. Bei 5 von 10 Kontrollpersonen lag die Differenz^{stimuliert-unstimuliert} der Proliferation nach Nukleosomenstimulation für $CD4^+$ -Zellen höher als 0,5 % bei Quotienten zwischen 15 und 145. Bei zwei Spendern lag zusätzlich die Differenz für $CD19^+$ -Zellen über 5 % (5,88 % bzw. 17,88 %) bei hohen Quotienten.

Nach SmD1₈₃₋₁₁₉-Stimulation lag für $CD4^+$ -Zellen die Differenz bei 2 von 9 Personen über 0,5% (0,52 % und 8,51 %) bei einem Quotienten von 5,03 bzw. 122,57. Bei letzterer Person lag die Differenz für $CD19^+$ -Zellen bei 5,22 % bei einem Quotienten von 5,81. Weder nach Nukleosomen- noch nach SmD1₈₃₋₁₁₉-Stimulation lag die Differenz für $CD8^+$ -Zellen über 0,5 %.

Tabelle 3.3: Frequenzen in vitro nukleosomenspezifisch proliferierter Zellen gesunder Spender.
Aus der Zahl der Auto-Ag-reaktiv proliferierten Zellen und der in der Kontrolle proliferierten Zellen wurde für CD4⁺-, CD8⁺- und CD19⁺-Zellen jeweils die Differenz und der Quotient gebildet. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtzahl der jeweiligen Zellpopulation.

Spender Nr.	Prol. CD4 ⁺ (in %)		Prol. CD19 ⁺ (in %)		Prol. CD8 ⁺ (in %)	
	Differenz	Quotient	Differenz	Quotient	Differenz	Quotient
1	0,47	2,25	-2,75	0,06	-0,11	0,63
13	0,77	6,98	0,36	1,60	0,11	*
14	0,04	1,35	-0,01	0,98	0,00	1,04
15	0,05	3,92	0,15	1,58	0,00	0,96
16	0,01	1,93	0,00	*	-0,04	0,00
17	0,74	14,78	0,17	3,15	-0,01	0,87
18	2,33	145,48	5,88	18,69	0,10	*
19	0,14	3,00	-0,98	0,10	0,01	*
20	2,98	75,50	0,38	2,30	0,24	25,00
21	2,07	104,50	17,88	46,95	0,08	5,00

* Division durch 0, da keine Proliferation in der Kontrolle

Tabelle 3.4: Frequenzen in vitro SmD1₈₃₋₁₁₉-spezifisch proliferierter Zellen gesunder Spender.
Aus der Zahl der Auto-Ag-reaktiv proliferierten Zellen und der in der Kontrolle proliferierten Zellen wurde für CD4⁺-, CD8⁺- und CD19⁺-Zellen jeweils die Differenz und der Quotient gebildet. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtzahl der jeweiligen Zellpopulation.

Spender Nr.	Prol. CD4 ⁺ (in %)		Prol. CD19 ⁺ (in %)		Prol. CD8 ⁺ (in %)	
	Differenz	Quotient	Differenz	Quotient	Differenz	Quotient
13	0,52	5,03	0,37	1,61	0,32	*
14	-0,03	0,74	-0,19	0,71	0,00	1,07
15	0,02	1,99	0,00	0,98	0,00	1,00
16	-0,02	0,00	0,00	*	-0,04	0,00
17	-0,02	0,59	0,00	1,05	0,00	0,95
18	0,06	5,03	0,31	1,93	0,00	*
19	8,51	122,57	5,22	5,81	0,24	*
20	0,18	5,50	1,20	5,15	0,02	3,00
21	0,09	5,50	1,72	5,43	0,00	1,00

* Division durch 0, da keine Proliferation in der Kontrolle

3.2.3.2 Autoantigenreaktive Lymphozytenproliferation bei SLE-Patienten

Die Proliferationswerte der PBMC der SLE-Patienten sind in Tabelle 3.5 (Nukleosomenstimulation) und Tabelle 3.6 (SmD1₈₃₋₁₁₉-Stimulation) dargestellt. Nach Nukleosomenstimulation lag die Differenz^{stimuliert/unstimuliert} für CD4⁺-Zellen bei 6 von 14

Patienten über 0,5 % (0,52 % - 0,94 %) bei Quotienten von 1,76 – 20,54. Bei einer Patientin betrug zusätzlich die Differenz für CD19⁺-Zellen 3,55 % bei einem Quotienten von 11,98. Eine Patientin wies CD19⁺-Werte von 5,56 % (Differenz) und 12,79 (Quotient) bei niedrigen CD4⁺-Werten (Differenz: 0,01 %, Quotient: 1,19) auf. Die Differenz für CD8⁺-Werte lag bei einem Patienten über 0,5 %.

Mit dem Smd1₈₃₋₁₁₉-Peptid wurden PBMC von 9 Patienten stimuliert. In den CD4⁺-Zellen lag hier keine Differenz über 0,5 % (der höchste Wert lag bei 0,22 %). Allerdings waren bei zwei Patienten die Quotienten größer als 5. Bei keinem der Patienten lag die Differenz für CD19⁺-Zellen über 0,5%. Der höchste Quotient betrug 3,99. Diese Patientin hatte auch einen hohen CD4⁺-Quotienten (5,93). Kein Differenzwert für CD8⁺-Zellen war größer 0,5%.

Tabelle 3.5: Frequenzen in vitro nukleosomenspezifisch proliferierter Zellen bei SLE-Patienten.

Aus der Zahl der Auto-Ag-reaktiv proliferierten Zellen und der in der Kontrolle proliferierten Zellen wurde für CD4⁺-, CD8⁺- und CD19⁺-Zellen jeweils die Differenz und der Quotient gebildet. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtzahl der jeweiligen Zellpopulation.

Patient Nr.	Prol. CD4 ⁺ (in %)		Prol. CD19 ⁺ (in %)		Prol. CD8 ⁺ (in %)	
	Differenz	Quotient	Differenz	Quotient	Differenz	Quotient
10	0,75	17,96	0,25	3,16	0,00	1,10
11	0,75	20,54	3,55	11,98	0,03	*
13	0,18	2,48	0,37	2,53	0,01	1,12
14	0,94	7,10	0,25	1,33	0,27	3,68
16	0,14	3,09	-0,02	0,88	0,47	4,20
19	0,01	1,19	5,56	12,79	-0,04	0,62
20	0,46	1,81	0,70	*	0,66	2,92
21	0,00	0,98	0,00	1,00	0,00	1,02
22	-0,26	0,48	0,00	*	0,00	0,99
27	0,52	1,76	0,34	1,70	-0,26	0,20
28	-0,59	0,08	-0,25	0,92	-0,08	0,00
43	0,03	1,23	-0,15	0,51	0,12	2,17
44	0,72	3,60	-1,28	0,24	0,03	1,66
45	0,93	8,56	-0,19	0,72	0,28	*

* Division durch 0, da keine Proliferation in der Kontrolle

Tabelle 3.6: Frequenzen in vitro Smd1₈₃₋₁₁₉-spezifisch proliferierter Zellen bei SLE-Patienten.
Aus der Zahl der Auto-Ag-reaktiv proliferierten Zellen und der in der Kontrolle proliferierten Zellen wurde für CD4⁺-, CD8⁺- und CD19⁺-Zellen jeweils die Differenz und der Quotient gebildet. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtzahl der jeweiligen Zellpopulation.

Spender Nr.	Prol. CD4 ⁺ (in %)		Prol. CD19 ⁺ (in %)		Prol. CD8 ⁺ (in %)	
	Differenz	Quotient	Differenz	Quotient	Differenz	Quotient
10	0,22	5,93	0,35	3,99	0,00	0,92
11	0,20	6,26	-0,15	0,52	0,00	*
13	0,03	1,26	0,00	1,02	0,00	1,06
19	-0,01	0,85	0,17	1,36	-0,06	0,38
27	-0,47	0,32	0,00	1,00	-0,32	0,00
28	-0,60	0,06	-2,55	0,18	-0,08	0,00
43	0,1	1,85	0,00	0,97	0,00	0,99
44	0,12	1,44	-0,62	0,63	-0,04	0,00
45	0,12	2,01	0,15	1,21	0,00	*

* Division durch 0, da keine Proliferation in der Kontrolle

3.2.4 Vergleich der Frequenzen lebender Lymphozyten von Gesunden und SLE-Patienten nach 6-tägiger Kultivierung

In der FACS-Analyse der CFSE-markierten Ag-stimulierten PBMC wurden durch Einsatz von Propidiumjodid tote Zellen von lebenden abgegrenzt. Durch eine zusätzliche Begrenzung der Analyse auf Lymphozyten und Lymphoblasten anhand von Zellgröße und der Granularität des Zytosols, die durch FSC bzw. SSC bestimmt wurden, konnten zusätzlich Zelltrümmer, Monozyten und trotz der Ficoll-Dichtezentrifugation verbliebene Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten von der Auswertung ausgeschlossen werden. Die Frequenzen der verbliebenen Lymphozyten, die letztendlich in die Auswertung der Proliferation eingingen, sind für Gesunde und SLE-Patienten getrennt in einem Diagramm dargestellt (Abb. 3.17).

Zu erkennen ist, dass bei der Mehrzahl der gesunden Kontrollpersonen, Prozentzahlen im Bereich von 70 % bis 90 % der aufgenommenen Zellen liegen, während bei den SLE-Patienten auch deutlich niedrigere Frequenzen vorkommen. Die daraus resultierende größere Streuung der Werte bei den Patienten wird durch den höheren Block bezogen auf die Abszisse dargestellt. Der kleinste Anteil analysierbarer Lymphozyten lag bei den Kranken unter 10%. Der Unterschied im Bezug auf die Frequenzen lebender Lymphozyten war zwischen der Gruppe der

Kranken und der Gruppe der Gesunden statistisch signifikant ($p = 0,007$ im Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Variablen).

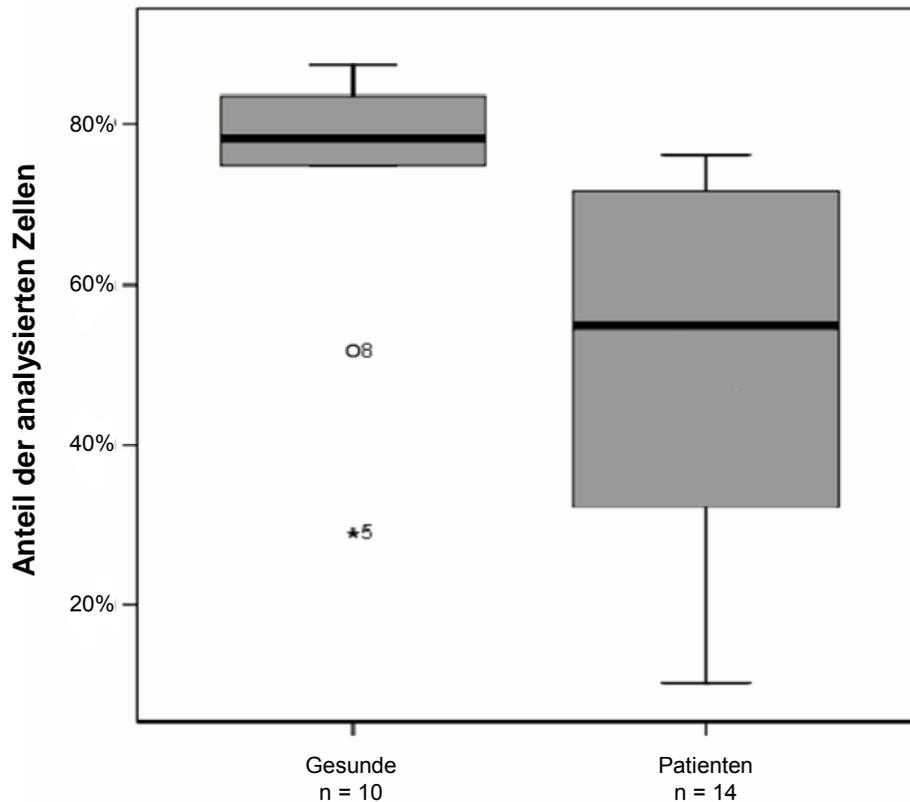


Abbildung 3.17: Lebende Lymphozyten in PBMC nach 6-tägiger Kultivierung. CFSE-markierte PBMC aus Gesunden und aus SLE-Patienten wurden ohne Antigen, mit Nukleosomen und zum Teil mit SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid für 6 Tage kultiviert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Als lebende Lymphozyten wurden die Zellen gewertet, die sich nicht durch PJ anfärben ließen und sich aufgrund von Zellgröße und Granularität des Zytosols der Lymphozyten- bzw. –blastenpopulation zuordnen ließen. Im so genannten Boxplot dargestellt sind die prozentualen Anteile der lebenden Lymphozyten an insgesamt analysierten Zellen von 10 gesunden Spendern (links) und 14 Patienten (rechts). Die oberen und unteren Begrenzungen markieren den jeweils größten und kleinsten Wert. Der schwarze Balken im dunkelgrauen Block stellt die 50. Perzentile dar. Die oberen und unteren Begrenzungen der Blöcke stehen für die 75. bzw. 25. Perzentile. Die Höhe der Blöcke ist ein Maß für die Streuung der Werte.

3.2.5 Statistische Auswertung der Proliferationsuntersuchungen mit Nukleosomen und SmD1₈₃₋₁₁₉ an SLE-Patienten

Die Ergebnisse der Proliferationsuntersuchungen an den 14 SLE-Patienten und den 10 gesunden Spendern (dargestellt in Tab. 3.3, 3.4, 3.5 und 3.6) wurden auf

statistische Zusammenhänge zu Anti-Nukleosomen-Ak, Krankheitsaktivität und immunsuppressiver Therapie untersucht. Außerdem wurde die Stärke der Proliferation bei Patienten und Gesunden verglichen sowie die Proliferation der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen.

3.2.5.1 Bestimmung der Unterschiede der Proliferation von CD4⁺-, CD8⁺- und CD19⁺-Zellen in unstimulierten und stimulierten Proben

Zunächst wurde nach Gesunden und Patienten und nach Nukleosomen- und Smd1₈₃₋₁₁₉-Stimulation getrennt die Signifikanz für die Unterschiedlichkeit der Stärke der Proliferation ohne und mit Stimulus bestimmt. Hierzu wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Test angewandt. Er eignet sich für abhängige Variablen und entspricht dem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Variablen. Tab. 3.7 zeigt die p-Werte jedes einzelnen Tests. Werte unter 0,05 stehen für signifikante Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten Proben. Dies war bei Stimulation mit Nukleosomen für CD4⁺-Zellen der Fall. Bei Gesunden war der Gesamtunterschied sogar stärker als bei SLE-Patienten. Der zweite signifikante Unterschied fand sich bei Patienten für Smd1₈₃₋₁₁₉-stimulierte CD8⁺-Zellen. Hier war aber die Proliferation in den Kontrollen insgesamt höher als in den stimulierten Zellen. Da der Test zweiseitig ist, kann sich auch ein signifikanter Wert für einen Unterschied in die entgegengesetzte Richtung ergeben. Für alle anderen Gruppen (anderer Stimulus oder andere Zellart) waren die Unterschiede nicht signifikant. Dieser Test diente dazu, Gesunde und SLE-Patienten in ihrer Reaktion miteinander zu vergleichen.

Tabelle 3.7: Signifikanz der Unterschiede der Proliferation von Th-, Tc- und B-Zellen in unstimulierten und stimulierten Proben. Dargestellt sind die p-Werte, die mit dem Wilcoxon-Test ermittelt wurden. Getrennt nach CD4-, CD8- und CD19-positiven Zellen, nach Gesunden und SLE-Patienten und nach Nukleosomen- oder Smd1₈₃₋₁₁₉-Stimulation.

	Nukleosomen		Smd1 ₈₃₋₁₁₉ -Peptid	
	Gesunde n=10	Patienten n=14	Gesunde n=9	Patienten n=9
CD4	0,005 ^a	0,022 ^a	0,086 ^a	0,594 ^a
CD8	0,285 ^a	0,096 ^a	0,207 ^a	0,043 ^b
CD19	0,314 ^a	0,173 ^b	0,069 ^a	0,859 ^a

^a basiert auf positiven Unterschieden; ^b basiert auf negativen Unterschieden

3.2.5.2 Zusammenhang zwischen Th- und B-Zellproliferation mit Anti-Nukleosomen-Ak

Die Titer der Anti-Nukleosomen-Ak wurden mittels ELISA im Serum der 10 Gesunden und 14 SLE-Patienten bestimmt. Da keiner der gesunden Spender einen positiven Titer hatte, wurden nur die Patientendaten auf Korrelation getestet. Als Maß für die Proliferation wurden die Differenzen und die Quotienten aus den Ergebnissen der nukleosomenstimulierten und unstimulierten Proben gebildet (siehe Tab. 3.5 und 3.6). Zur Bestimmung der Korrelationskoeffizienten wurde der Spearman-Test angewandt, der Ränge auswertet und somit nicht auf lineare Daten angewiesen ist. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen nukleosomenspezifischer Th- oder B-Zellproliferation und Anti-Nukleosomen-Ak-Titern, egal ob die Differenzen oder die Quotienten zugrunde gelegt wurden. Auch zwischen Proliferation in Reaktion auf das Smd1₈₃₋₁₁₉-Peptid und Anti-Nukleosomen-Ak zeigte sich kein Zusammenhang. In Abb. 3.18 ist exemplarisch ein Streudiagramm für die Verteilung nukleosomenreaktiver prozentualer CD4⁺-Zellproliferation im Bezug auf den Anti-Nukleosomen-Ak-Titer dargestellt. Der Korrelationskoeffizient Rho lag bei 0,177 ($p = 0,544$).

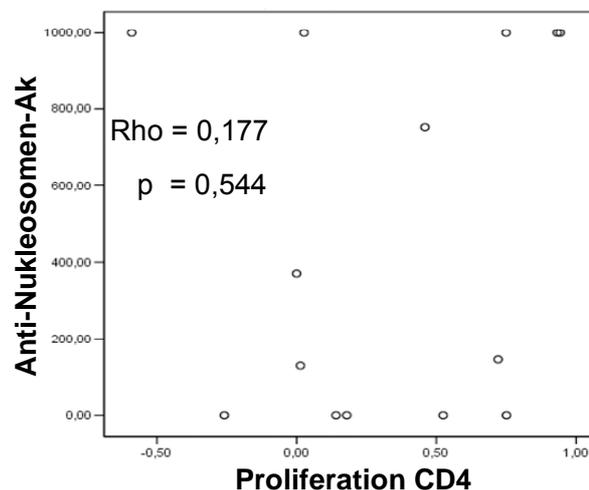


Abbildung 3.18: Korrelation nukleosomenreaktiver Th-Zellproliferation mit Anti-Nukleosomen-Ak-Titern. Dargestellt ist die Verteilung der Werte der prozentualen CD4⁺-Zellproliferation nach Nukleosomenstimulation (X-Achse) und der Anti-Nukleosomen-Ak-Titer (Y-Achse) der SLE-Patienten.

3.2.5.3 Zusammenhang zwischen Proliferation und Krankheitsaktivität

Zur Beurteilung der Krankheitsaktivität wurden für alle Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme die Aktivitätsscores ECLAM, SLAM und SLEDAI bestimmt. Diese wurden zu der nukleosomen- und Smd1₈₃₋₁₁₉-reaktiven Proliferation in Beziehung gesetzt. Dabei zeigte sich bei Anwendung des Spearman-Tests weder für Th- noch für B-Zellen ein signifikanter Zusammenhang zwischen Krankheitsaktivität und Proliferation. In Abb. 3.19 ist exemplarisch ein Streudiagramm für die Verteilung der SLAM-Werte im Bezug auf die Th-Zellproliferation dargestellt. Eine Ausrichtung ist nicht zu erkennen.

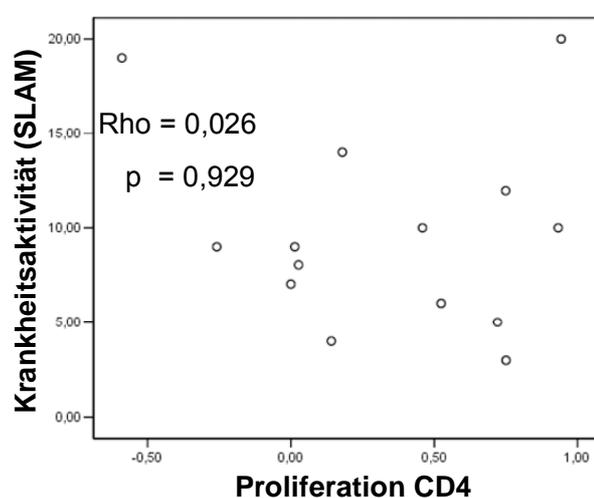


Abbildung 3.19: Korrelation nukleosomenreaktiver Th-Zellproliferation mit der Krankheitsaktivität (SLAM). Dargestellt ist die Verteilung der Werte der prozentualen CD4⁺-Zellproliferation nach Nukleosomenstimulation (X-Achse) und der SLAM-Werte (Y-Achse) der untersuchten SLE-Patienten.

3.2.5.4 Zusammenhang zwischen Proliferation und immunsuppressiver Therapie

Die Stärke der medikamentösen Therapie wurde in drei Gruppen unterteilt. Keine Medikation = Gruppe 0, nur Glukokortikoide = Gruppe 1, Glukokortikoide + andere Immunsuppressiva = Gruppe 2. Um Unterschiede zwischen diesen Gruppen im Hinblick auf die nukleosomen- oder Smd1₈₃₋₁₁₉-reaktive Proliferation von Th- und B-Zellen zu ermitteln wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Dieser Test ist für die Prüfung von mehr als zwei Gruppen geeignet und ermittelt die Unterschiede anhand

von Ranginformationen. In Tabelle 3.8 sind die Ergebnisse bei zugrunde liegenden Proliferationsquotienten dargestellt. Angegeben sind für CD4⁺- und CD19⁺-Zellen, getrennt nach Nukleosomen- und SmD1₈₃₋₁₁₉-Stimulation, die Rangmittelwerte der einzelnen Therapiegruppen und die dazugehörigen p-Werte. Zu erkennen ist, dass bei CD4⁺-Zellen die Rangmittelwerte in der Gruppe ohne Immunsuppressiva (Gruppe 0) jeweils deutlich höher sind als in Gruppe 2. Dies ist bei B-Zellen nicht der Fall. Diese Unterschiede waren jedoch bei der geringen Fallzahl nicht signifikant. Es lässt sich aber zumindest ein Trend erkennen, der darauf hinweist mit, dass die autoantigenspezifische Th-Zellproliferation bei stärkerer immunsuppressiver Therapie abnimmt, die B-Zellproliferation hingegen nicht.

Tabelle 3.8: Verhältnis nukleosomen- und SmD1₈₃₋₁₁₉-reaktiver T- und B-Zellproliferation zur Stärke der immunsuppressiven Therapie. Dargestellt sind die Rangmittelwerte der verschiedenen Therapiegruppen, getrennt nach Nukleosomen- und SmD1₈₃₋₁₁₉-Stimulation, sowie nach CD4⁺- und CD19⁺-Proliferation. Die angegebenen p-Werte wurden anhand des Kruskal-Wallis-Tests ermittelt.

		Therapiegruppe	Rangmittelwert	p-Wert
Nukleosomen n = 14	CD4	0	11,33	0,094
		1	9,0	
		2	5,5	
	CD19	0	7,67	0,73
		1	5,33	
		2	6,5	
SmD1 ₈₃₋₁₁₉ n = 9	CD4	0	6,67	0,087
		1	7,0	
		2	2,75	
	CD19	0	5,0	0,638
		1	6,5	
		2	4,25	

3.2.5.5 Zusammenhang zwischen nukleosomen- und SmD1₈₃₋₁₁₉-spezifischer Th-Zellproliferation bei Gesunden und Patienten

Die Zahlen nukleosomenspezifisch proliferierter CD4⁺-Zellen korrelierte bei Patienten – im Gegensatz zu Gesunden - mit der Zahl SmD1₈₃₋₁₁₉-spezifisch proliferierter CD4⁺-Zellen (Abb. 3.20). Bei zugrunde liegender Differenz von stimulierten und unstimulierten Proben lag der Korrelationskoeffizient Rho im Spearman-Test bei 0,817 (p = 0,007). Bei Gesunden fand sich hingegen kein Zusammenhang (Rho = 0,517; p = 0,154).

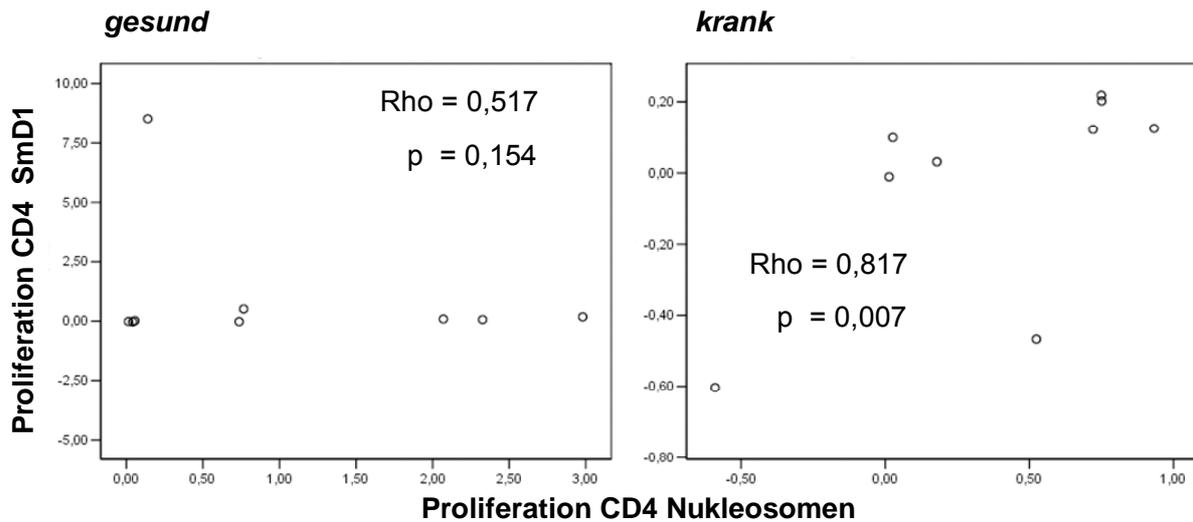


Abbildung 3.20: Korrelation nukleosomenreaktiver mit SmD1₈₃₋₁₁₉-reaktiver Th-Zellproliferation. Dargestellt ist die Verteilung der Werte der prozentualen CD4⁺-Zellproliferation nach Nucleosomenstimulation (X-Achse) und nach SmD1₈₃₋₁₁₉-Stimulation (Y-Achse) für Gesunde und SLE-Patienten.

3.2.5.6 Zusammenhang zwischen Th- und B-Zellproliferation bei gleichem Antigen

Th- und B-Zellproliferation korrelierten sowohl nach Nucleosomen- als auch nach SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid-Stimulation bei Gesunden – im Gegensatz zu den Kranken – signifikant miteinander. Für die Nucleosomenstimulation lag der Korrelationskoeffizient Rho bei 0,745 ($p = 0,013$) bei den Gesunden im Vergleich zu Rho = 0,143 ($p = 0,626$) bei den SLE-Patienten (Abb. 3.21). Nach SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid-Stimulation war Rho = 0,917 ($p = 0,001$) bei Gesunden und Rho = 0,333 ($p = 0,381$) bei den Kranken.

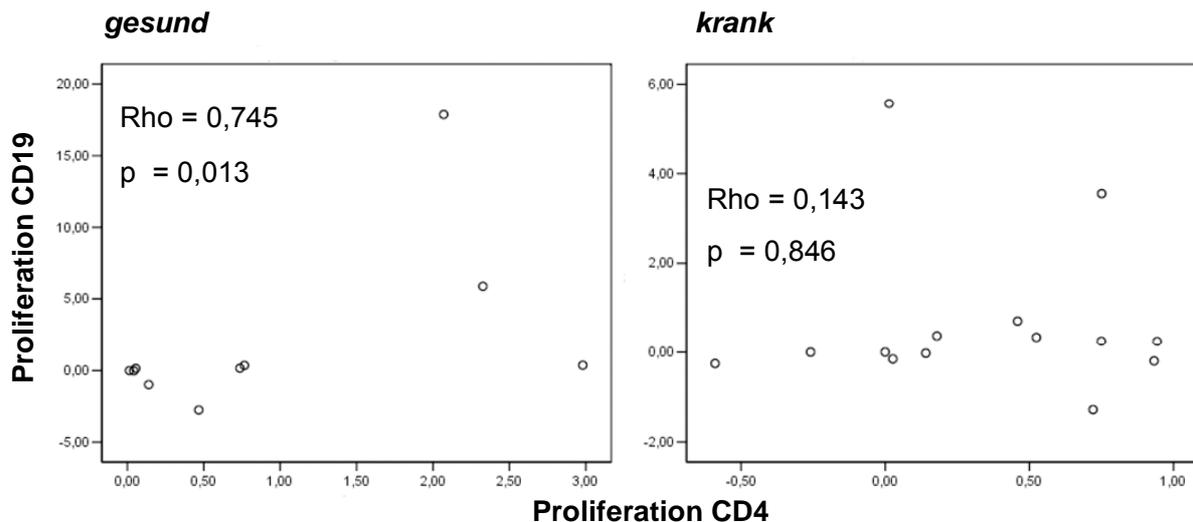


Abbildung 3.21: Korrelation von Th-Zellproliferation mit B-Zellproliferation. Dargestellt ist die Verteilung der Werte der prozentualen CD4⁺-Zellproliferation (X-Achse) und CD19⁺-Zellproliferation (Y-Achse) nach Nukleosomenstimulation für Gesunde (links) und SLE-Patienten (rechts).

3.2.6 Zytokinmuster autoreaktiver CD4⁺-Zellen

Wie schon mit TT- und allergenspezifischen Zellen durchgeführt (siehe oben), sollte auch in nukleosomenspezifisch proliferierten CD4⁺-Zellen das Zytokinmuster nach polyklonaler Restimulation betrachtet werden. Da auch in Gesunden Proliferation von Th-Zellen nach Stimulation mit Nukleosomen gesehen werden konnte – sogar in höheren Frequenzen als bei SLE-Patienten – sollte untersucht werden, ob es Unterschiede im Zytokinmuster gab, wie es im Vergleich eines Allergikers mit einem Nicht-Allergiker gezeigt werden konnte. Abb. 4.22 zeigt die durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Zytokinfärbungen an polyklonal restimulierten CD4⁺-Zellen, die aus nukleosomenstimulierten PBMC durch MACS-Separation gewonnen wurden. In den PBMC wurde zuvor die Proliferation von CD4⁺-, CD8⁺- und CD19⁺-Zellen mittels Oberflächen-Färbung und FACS-Analyse ermittelt. In den CD4⁺-Zellen der SLE-Patientin waren 0,51 % proliferiert, in den Zellen der gesunden Spenderin 3,11 %. Dargestellt ist die Analyse der Zytokinsekretion der proliferierten Th-Zellen, die sich durch niedrigere CFSE-Fluoreszenzintensität auszeichneten. Gefärbt wurden die Zytokinpaare IL-2/IL-10, INF- γ /IL-4 und TNF- α /IL-13. Da bei der SLE-Patientin dieser Teil nur eine sehr geringe Anzahl von Zellen ausmachte (ca. 300), sind die angegebenen Prozentzahlen der Zytokinproduzenten mit Vorsicht zu werten. Interessant ist aber, dass trotz der niedrigen Frequenzen IL-10-Produzenten zu sehen sind, hingegen keine IL-4- oder IL-13-Produzenten.

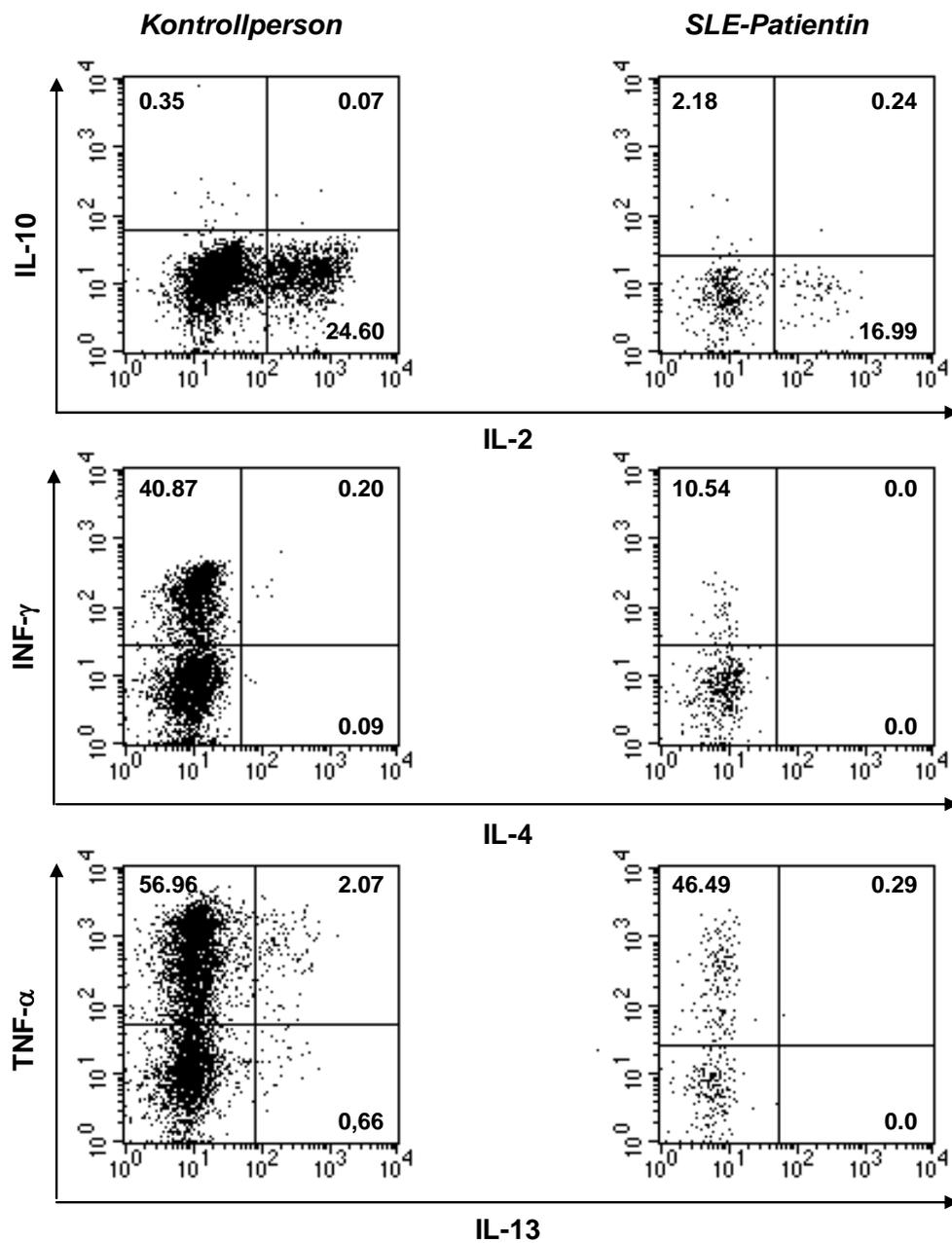


Abbildung 3.22: Zytokinmuster nukleosomenspezifisch proliferierter $CD4^+$ -Zellen nach polyklonaler Restimulation. Dargestellt sind die Ergebnisse der intrazellulären Färbungen der Zytokinpaare IL-2/IL-10, INF- γ /IL-4 und TNF- α /IL-13 in $CD4^+$ -Zellen aus nukleosomenstimulierten PBMC einer gesunden Spenderin und einer SLE-Patientin. Die Analyse wurde anhand der CFSE-Fluoreszenzintensität auf proliferierte Zellen beschränkt.