

Aus der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Mapping urinary chemokines in human Lupus nephritis: Potentially
redundant pathways recruit CD4+ and CD8+ T cells and macrophages

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Klocke
aus Düsseldorf

Datum der Promotion: 25.06.2017

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	2
Abstract	4
Eidesstattliche Versicherung	6
Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation	7
Auszug aus der Journal Summary List	8
Publikation	9
Lebenslauf	27
Publikationsliste	29
Danksagung	31

Abstrakt

Einleitung: Die Lupusnephritis (LN) ist eine der schwerwiegendsten Komplikationen des Systemischen Lupus Erythematoses (SLE). Renal infiltrierende Immunzellen spielen wahrscheinlich eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der LN; die Zellrekrutierung in die entzündeten Nieren ist jedoch unzureichend untersucht. Der aktuelle Wissensstand basiert überwiegend auf Daten aus Tiermodellen, welche die Verhältnisse in der humanen Erkrankung wahrscheinlich nur unzureichend abbilden und teils zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt haben. Gleichzeitig finden sich viele Studien zur humanen LN, welche Chemokine im Urin als Biomarker untersuchen, ohne die pathophysiologischen Aspekte zu beleuchten.

Methodik: Mit einem neuen, zweiseitigen Versuchsansatz haben wir daher den Einfluss von Chemokinen in der humanen LN untersucht: Im ersten Schritt wurde mittels Multiplex-Assays ein breites Spektrum von insgesamt 17 Chemokinen im Urin und Serum von 25 Patienten mit akuter LN und 78 weiteren SLE Patienten untersucht. Anhand der Ergebnisse erfolgte die Auswahl von acht komplementären Chemokinrezeptoren, welche mittels Durchflusszytometrie des Urins und Blutes von zehn aktiven LN-Patienten auf CD4+, regulatorischen und CD8+ T-Zellsubsets sowie CD14+ Makrophagen detektiert wurden.

Ergebnisse: Neun der 17 untersuchten Chemokine zeigten eine signifikant höhere Urinkonzentration in aktiven LN-Patienten als in anderen SLE-Patienten. Die Konzentration der Chemokine korrelierte mit der Krankheitsaktivität und der Anzahl an detektierten Urinzellen. Die erhöhten Konzentrationen zeichneten sich durch eine deutliche interindividuelle Variabilität aus.

Die angereicherten Urin-Chemokine bestanden aus den Makrophagen-assoziierten CCL2 (MCP-1, $p < 0.0001$), CCL7 (MCP-3, $p = 0.0106$) und CCL8 (MCP-2, $p < 0.0001$), CX3CL1 (fractalkine, $p < 0.0001$), sowie aus einer größeren Gruppe von T-Zell-assoziierten Chemokinen: CCL3 (MIP-1alpha, $p < 0.0001$) und CCL5 (RANTES, $p = 0.0291$), beides Liganden für CCR1 und CCR5; CXCR3-Liganden CXCL9 (MIG, $p = 0.0003$) und CXCL10 (IP-10, $p < 0.0001$) und CXCR6-Ligand CXCL16 (SR-PSOX, $p < 0.0001$).

Das Potential als Biomarker für die akute LN variierte zwischen den Chemokinen. Die besten Ergebnisse erreichten CXCL16 (Area under the Receiver-Operating-Characteristic-curve (AUROC) = 0.9035) und CXCL10 (AUROC = 0.8868).

Verglichen mit aus dem Blut gewonnenen Zellen zeigten beide T-Zellsubsets im Urin eine erhöhte Fraktion von CCR1+ ($p=0.0039$) und CCR5+ ($p=0.0039$) Zellen. CD4+ T-Zellen exprimierten jedoch im Urin ebenfalls häufiger CCR6 ($p=0.0195$), CXCR3 ($p=0.0028$) und CXCR6 ($p=0.0117$) als im Blut. Regulatorische T-Zellen zeigten eine ähnliche Expression; CD14+ Makrophagen exprimierten im Urin häufiger CCR5. Zudem zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen CXCR3+CD4+ T-Zell-Anzahl im Urin und der CXCL10-Urinkonzentration ($r=0.8667$, $p=0.0045$).

Schlussfolgerung: Die renale Rekrutierung scheint bei CD4+ T-Zellsubsets deutlich variantenreicher zu sein als bei CD8+ T-Zellen und CD14+ Makrophagen. Die hier erstmalig beschriebene individuelle Variabilität der Chemokine legt jedoch nahe, dass entsprechende diagnostische und therapeutische Konzepte auf das Individuum zugeschnitten sein müssen.

Abstract

Introduction: Renal infiltration of inflammatory cells contributes to the pathogenesis of Lupus nephritis (LN), one of the most severe complications of Systemic Lupus Erythematosus (SLE). Current knowledge on the chemotactic recruitment mechanisms of these leukocytes relies mainly on findings in rodent models, but the published results are in part contradictory and are probably not representative of the human disease. Simultaneously, many human studies focus on urinary chemokines as LN biomarkers, while omitting the pathophysiological aspect.

Methods: We assess various chemokine pathways in human LN by a new, bilateral approach: A broad spectrum of 17 urinary and serum chemokine concentrations were measured by multiplex assays in 25 patients with acute LN and in 78 other SLE patients. Based on the results of this screening, a panel of 8 corresponding chemokine receptors was measured on urinary and blood leukocytes (CD4+, regulatory and CD8+ T cells and CD14+ macrophages) in ten acute LN patients.

Results: Nine urinary chemokines were significantly elevated in LN patients and correlated with renal disease activity and urinary cell counts. However, the concentrations displayed considerable interindividual heterogeneity. Among the elevated urinary chemokines was a group of macrophage chemoattractant proteins (MCP), comprised of CCL2 (MCP-1, $p < 0.0001$), CCL7 (MCP-3, $p = 0.0106$) and CCL8 (MCP-2, $p < 0.0001$), CX3CL1 (fractalkine, $p < 0.0001$), as well as a large group of T cell associated chemokines: CCL3 (MIP-1alpha, $p < 0.0001$) and CCL5 (RANTES, $p = 0.0291$), ligands for receptors CCR1 and CCR5; CXCR3 ligands CXCL9 (MIG, $p = 0.0003$) and CXCL10 (IP-10, $p < 0.0001$) and CXCR6-ligand CXCL16 (SR-PSOX, $p < 0.0001$).

The assessed urinary chemokines showed varying potential as biomarkers for acute LN, with best results for CXCL16 (Area under the Receiver-Operating-Characteristic-curve (AUROC) = 0.9035) and CXCL10 (AUROC = 0.8868).

Both urinary T cell subsets had increased chemokine receptor expression compared to peripheral blood for CCR1 ($p = 0.0039$) and CCR5 ($p = 0.0039$), while urinary CD4+ T cells also expressed CCR6 ($p = 0.0195$), CXCR3 ($p = 0.0028$) and CXCR6 ($p = 0.0117$) more frequently. Urinary regulatory T cells showed similar CCR expression and urinary CD14+ macrophages were enriched for CCR5 expressing cells. A significant correlation of

CXCR3+CD4+ T cell counts and the urinary CXCL10 concentration was found ($r=0.8667$, $p=0.0045$).

Conclusion: The cell specific recruitment pattern seems to be varied for CD4+ T cell subsets, while CD8+ T cells and CD14+ macrophages rely on a limited receptor range. However, urinary chemokine abundance in active LN is individually variable in our cohort and does not offer a singular chemokine usable as universal biomarker or potential treatment target.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jan Klocke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Mapping urinary chemokines in human Lupus nephritis: Potentially redundant pathways recruit CD4+ and CD8+ T cells and macrophages.“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation:

Klocke J, Kopetschke K, Grießbach AS, Langhans V, Humrich JY, Biesen R, Dragun D, Radbruch A, Burmester GR, Riemekasten G and Enghard P. Mapping urinary chemokines in human Lupus nephritis: Potentially redundant pathways recruit CD4+ and CD8+ T cells and macrophages. Eur J Immunol. 2017 Jan;47(1):180-192.

Beitrag:

Konzeption und Design der Studie, Akquisition von Patienten und Probenmaterial, Versuchsdurchführung (Durchflusszytometrie, ELISA, diverse weitere Assays) und Datenerhebung, Optimierung der Messmethoden, Datenauswertung, Erstellen von Tabellen und Abbildungen, Literaturrecherche, Verfassen des Manuskriptes, Verwaltung des Review-Prozesses und Verfassen der Revision.

Alle oben genannten Punkte erfolgten eigenständig unter Supervision von P. Enghard und G. Riemekasten.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

Auszug aus der Journal Summary List

Das "European Journal of Immunology" ist im Bereich der Immunologie Teil der 30% führenden Journals (Platz 42/151, geordnet nach dem Impact Faktor) und hat einen Eigenfaktor von 0,03854 (siehe Abbildung unten). Es gilt damit nach den Kriterien der Promotionsordnung der Charité Universitätsmedizin Berlin als „Topjournal“.

Journal Summary List												
Journals from: subject categories IMMUNOLOGY VIEW CATEGORY SUMMARY LIST												
Sorted by: <input type="text" value="Impact Factor"/> <input type="button" value="SORT AGAIN"/>												
Journals 41 - 60 (of 151) Page 3 of 8												
Ranking is based on your journal and sort selections.												
Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data ¹						Eigenfactor [®] Metrics ¹		
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score	
<input type="checkbox"/>	41	EXPERT REV VACCINES	1476-0584	3530	4.222	4.087	0.954	109	4.6	0.01148	1.375	
<input checked="" type="checkbox"/>	42	EUR J IMMUNOL	0014-2980	21392	4.179	4.315	0.968	285	8.8	0.03854	1.585	
<input type="checkbox"/>	43	J LEUKOCYTE BIOL	0741-5400	16731	4.165	4.482	1.000	199	8.7	0.02433	1.543	
<input type="checkbox"/>	44	IMMUNOLOGY	0019-2805	9486	4.078	3.768	0.915	176	9.3	0.01379	1.203	
<input type="checkbox"/>	45	CLIN IMMUNOL	1521-6616	7277	4.034	3.841	0.774	168	7.4	0.01249	1.194	
<input type="checkbox"/>	46	CURR TOP MICROBIOL	0070-217X	5228	4.015	3.757	1.415	82	7.2	0.01121	1.453	
<input type="checkbox"/>	47	EMERG MICROBES INFECTION	2222-1751	421	4.012	3.865	0.531	32	2.0	0.00208	1.324	
<input type="checkbox"/>	48	BIOL BLOOD MARROW TR	1083-8791	8944	3.980	3.992	1.087	276	5.3	0.02370	1.309	
<input type="checkbox"/>	49	PEDIAT ALLERG IMM-UK	0905-6157	3510	3.947	3.262	0.612	98	5.5	0.00799	0.929	
<input type="checkbox"/>	50	TRANSPLANT REV-ORLAN	0955-470X	623	3.915	3.652	0.472	36	3.8	0.00217	1.247	
<input type="checkbox"/>	51	JAIDS-J ACQ IMM DEF	1525-4135	13282	3.806	3.953	1.076	341	6.2	0.03605	1.545	
<input type="checkbox"/>	52	J IMMUNOTHER	1524-9557	2890	3.712	3.649	0.810	42	6.6	0.00670	1.283	
<input type="checkbox"/>	53	TRANSPLANTATION	0041-1337	23045	3.690	3.446	1.050	341	9.7	0.03392	1.171	
<input type="checkbox"/>	54	BONE MARROW TRANSPL	0268-3369	11070	3.636	3.513	0.708	216	8.6	0.01708	1.079	
<input type="checkbox"/>	55	DEV COMP IMMUNOL	0145-305X	6754	3.620	3.543	0.990	197	6.0	0.01055	0.773	
<input type="checkbox"/>	56	CLIN DEV IMMUNOL	1740-2522	3153	3.603	3.701		0	3.4	0.01211	1.044	
<input type="checkbox"/>	56	INFECT IMMUN	0019-9567	47850	3.603	3.807	0.848	455	>10.0	0.04745	1.282	
<input type="checkbox"/>	58	ANN ALLERG ASTHMA IM	1081-1206	6345	3.475	3.281	0.679	137	7.7	0.01010	0.915	
<input type="checkbox"/>	59	MEDIAT INFLAMM	0962-9351	5537	3.418	3.649	0.298	487	2.9	0.01704	0.959	
<input type="checkbox"/>	60	VACCINE	0264-410X	37148	3.413	3.338	0.689	1093	5.9	0.08289	1.008	

Publikation

Mapping urinary chemokines in human Lupus nephritis:

Potentially redundant pathways recruit CD4⁺ and CD8⁺ T cells and macrophages

<https://dx.doi.org/10.1002/eji.201646387>

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Erstautorenschaften:

Klocke J, Kopetschke K, Gießbach AS, Langhans V, Humrich JY, Biesen R, Dragun D, Radbruch A, Burmester GR, Riemekasten G and Enghard P. *Mapping urinary chemokines in human Lupus nephritis: Potentially redundant pathways recruit CD4+ and CD8+ T cells and macrophages*. Eur J Immunol. DOI: 10.1002/eji.201646387.

Impact Faktor: 4,179; (42/151 Immunologie Journals, Eigenfaktor: 0,03854)

Kopetschke K¹, **Klocke J**¹, Gießbach AS, Humrich JY, Biesen R, Dragun D, Radbruch A, Burmester GR, Enghard P and Riemekasten G. *The cellular signature of urinary immune cells in Lupus nephritis: New insights into potential biomarkers*. Arthritis Res Ther. 2015 Apr 3;17(1):94.

Impact Faktor: 3,979; (8/31 Rheumatologie Journals, Eigenfaktor: 0,02973)

¹ geteilte Erstautorenschaft

Koautorenschaften:

Enghard P, Rudolph B, **Klocke J**, Riemekasten G. *Flow cytometry of urinary T cells and Macrophages as a biomarker of immune cells in inflammatory renal diseases*. DOI: 10.1007/978-94-007-7699-9_35, In book: Biomarkers in Kidney Disease, Part II, 2016, pp.327-345.

Enghard P, Rieder C, Kopetschke K, **Klocke JR**, Undeutsch R, Biesen R, Dragun D, Gollasch M, Schneider U, Aupperle K, Humrich J, Hiepe F, Backhaus M, Radbruch A, Burmester GR, Riemekasten G. *Urinary CD4 T cells identify SLE patients with proliferative lupus nephritis and can be used to monitor treatment response*. Ann Rheum Dis. 2014;73:277-83. **Impact Faktor: 10,377**

Poster/Abstracts:

Klocke J, Dragun D, Gollasch M, Schunck WH, Hammock BD, Riemekasten G, Enghard P. *Epoxigenase products in Lupus nephritis Inhibition of soluble epoxide hydrolase delays onset of nephritis and ameliorates kidney damage in NZB/W F1 mice*. Poster, Kongress der DGfN 2016, Berlin

Klocke J, Kopetschke K, Griebach AS, Enghard P, Riemekasten G. *The cellular signature of urinary immune cells in Lupus nephritis*. Poster, Kongress der DGRh 2014, Düsseldorf

Klocke J, Kopetschke K, Griebach AS, Riemekasten G, Enghard P. *Lymphozyten und Makrophagen im Urin: Neue Daten zu zellulären Biomarkern für die Lupusnephritis*. Poster, Kongress der DGfN 2014, Berlin

Klocke J, Enghard P, Riemekasten G. *Mechanisms of T cell recruitment in Lupus Nephritis*. Poster, Kongress der DGRh 2013, Mannheim/Heidelberg

Klocke J, Riemekasten G, Enghard P. *Mechanismen der T-Zellrekrutierung in der Lupusnephritis*. Poster, Kongress der DGfN 2013, Berlin

Klocke JR, Spee-Mayer C, Enghard P, Riemekasten G. *Mechanisms of T cell recruitment in Lupus Nephritis*. Abstract, EULAR 2013, Barcelona

von Spee-Mayer C, Wassermann N, Rose A, Alexander T, **Klocke J**, Humrich JY et al. *Regulatory T cell abnormalities and IL-2 deficiency in patients with systemic lupus erythematosus*. Abstract, EULAR 2013, Barcelona

Enghard P, Rieder C, Kopetschke K, **Klocke J**, Humrich JY, Undeutsch R, Biesen R, Burmester GR, Riemekasten G. *Urinary CD4 T cells identify SLE patients with proliferative lupus nephritis and can be used to monitor treatment response*. Poster, EULAR 2012, Berlin

Danksagung

Ich danke:

Philipp Enghard – für Motivation, Optimismus, Know-how, Einfallsreichtum und für nicht enden wollende Stunden beim Sortieren der Urinproben.

Gabriela Riemekasten – für die Möglichkeit zum Forschen und selbstständigen Arbeiten, für steten Rückhalt und immer konstruktive Kritik.

Katharina Kopetschke, Anika Klaus, Caroline von Spee-Mayer, Angelika Rose, Angela Kill, Jeannine Günther, Judith Rademacher, Anna-Sophie Grießbach, Valerie Langhans, Dimas Abdirama und Reinmar Undeutsch – für die praktische Einarbeitung im Labor, für die Hilfe bei der Datenerhebung, für fachliche Unterstützung und – vor allem – für viel Humor.

Timo Gaber, Cindy Strehl, Manuela Jakstadt, Martin Hahne und Cam Loan Tran – für zuverlässige „Nachbarschaftshilfe“.

Jens Humrich, Robert Biesen, Duska Dragun, Gerd-Rüdiger Burmester und Andreas Radbruch – für kompetente Beratung bei der Datenauswertung und Publikation.

der Rheumatologischen Klinik und Ambulanz an der Charité Campus Mitte – für die Hilfestellung bei der Patientenrekrutierung und das Sammeln endloser Blut- und Urinproben.

allen Patienten – für die Teilnahme und großzügige Spende von Probenmaterial.

Christiane Gawron – für mein Zuhause.