

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

DISSERTATION

Autoaggressive und regulatorische T-Zellen
beim Systemischen Lupus Erythematoses

Ein dynamisches Gleichgewicht

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Jan Broder Engler
aus Kiel

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. med. G. Riemekasten
2. Prof. Dr. med. U. Lange
3. Prof. Dr. med. C. Sunderkötter

Datum der Promotion: 19.11.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Arbeitsteilige Funktionsweise	2
1.1.2	Antigenerkennung	3
1.1.3	T _H -Zell-abhängige B-Zell-Reifung	4
1.1.4	Polarisierung der T _H -Zell-Antwort	4
1.1.5	Immunologische Toleranz	5
1.1.6	Autoaggression	7
1.2	Der Systemische Lupus Erythematodes	8
1.2.1	Klinisches Bild	8
1.2.2	Organmanifestationen	9
1.2.3	Autoantikörper	11
1.2.4	Immunologische Ätiopathogenese	12
1.2.5	Nukleäre Peptidantigene	13
1.2.6	Infektionen und SLE	15
1.3	Nachweismethoden antigenspezifischer T-Zellen	17
1.3.1	DNA-Syntheserate	17
1.3.2	Zytokinsekretion	17
1.3.3	Proliferationsmessung	18
1.3.4	Expression von Oberflächenmolekülen	19
1.4	Rationale der CD25-Depletion	20
1.5	Ziele der Arbeit	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Geräte und Pufferlösungen	22
2.2	Blutspender und Blutentnahme	23
2.3	Isolierung der mononukleären Zellen	24
2.4	Zellzahlbestimmung	24
2.5	Magnetische CD25-Depletion	25
2.5.1	Magnetische Markierung der CD25 ⁺ -Zellen	25
2.5.2	Magnetische Zellseparation	25
2.5.3	Kontrolle der Depletion	26
2.6	<i>In vitro</i> -Antigenstimulation	27

2.7	Formaldehyd-Fixierung	28
2.8	Durchflusszytometrie	29
2.8.1	Fluorochrome	29
2.8.2	Funktionsweise des FACS-Gerätes	30
2.8.3	Zellfärbung	31
2.8.4	Messung und Kompensation	34
2.8.5	Analyse und Gating	34
2.9	Bestimmung des Antikörperstatus	36
2.10	Bestimmung der Krankheitsaktivität	36
2.11	Statistische Auswertung	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Etablierung der Methode	38
3.1.1	Positivitätskriterien	38
3.1.2	Mitgeführte Kontrollen	40
3.1.3	Probenausschluss	44
3.2	Charakterisierung des Patientenkollektivs	45
3.3	Autoaggressive T _H -Antwort	46
3.3.1	SmD1 ₈₃₋₁₁₉ -Peptid (SMD)	46
3.3.2	Nukleosomen (NUC)	47
3.3.3	Ergebnisübersicht	49
3.3.4	Verlaufsbestimmungen	52
3.4	Einfluss der regulatorischen T-Zellen	53
3.4.1	Demaskierung der SmD1 ₈₃₋₁₁₉ -Reaktivität	55
3.4.2	CD137-Expression	57
3.5	Statistische Zusammenhänge	58
3.5.1	Zeichen der Krankheitsaktivität	58
3.5.2	Stationäre versus ambulante Betreuung	59
3.5.3	Organbeteiligung	59
3.5.4	CMV-Antwort und CMV-IgG-Status	60
3.5.5	Autoreaktive T _H -Zellen und Autoantikörperstatus	60
3.5.6	Autoreaktive T _H -Zellen und Krankheitsaktivität	61
3.5.7	Zeichen der Immunsuppression	62
3.5.8	Die CD137-Antwort	64
4	Diskussion	65
4.1	Etablierung der Methode	65
4.1.1	Nachweismethoden antigenspezifischer T-Zellen	65
4.1.2	Methodenoptimierung	67
4.1.3	Mitgeführte Kontrollen	67
4.2	Repräsentativität des Patientenkollektivs	69
4.3	Autoantigenspezifische T _H -Zellen beim SLE	70
4.3.1	Nukleosomen	70
4.3.2	SmD1 ₈₃₋₁₁₉ -Peptid	73

4.4	Einfluss der regulatorischen T-Zellen	74
4.5	SmD1 ₈₃₋₁₁₉ -Reaktivität und Krankheitsaktivität	76
4.6	Marker der Krankheitsaktivität	77
4.7	Zeichen der Immunsuppression	78
4.8	Autoaggressive und regulatorische T-Zellen – Ein dynamisches Gleichgewicht	79
4.9	Rolle der regulatorischen T-Zellen bei Tumoren und Infektionen	82
4.10	Ausblick	83
5	Zusammenfassung	86

Abbildungsverzeichnis

1.1	Sm-Proteine	14
2.1	Kontrolle der CD25-Depletion	26
2.2	Fluorochrom-Emissionsspektren	31
2.3	Gating	35
3.1	Bewertung der CD40L ⁺ -Population	39
3.2	Kontrollstimulationen 1	40
3.3	Kontrollstimulationen 2	42
3.4	Artifizielle T _H -Aktivierung	44
3.5	Ergebnis der Stimulation mit dem SmD1 ₈₃₋₁₁₉ -Peptid	46
3.6	Ergebnis der Stimulation mit chicken-Nukleosomen (cNUC)	47
3.7	Ergebnis der Stimulation mit humanen Nukleosomen (hNUC)	48
3.8	CD40L-Expression der T _H -Zellen nach Antigenstimulation	50
3.9	Einfluss der CD25-Depletion	54
3.10	Demaskierung der SmD1 ₈₃₋₁₁₉ -Reaktivität	56
3.11	CD137-Expression der T _H -Zellen nach Antigenstimulation	57
3.12	Korrelationen von Autoantikörpertiter und SLEDAI	58
3.13	SLEDAI-Werte	59
3.14	CMV-Antwort und CMV-IgG-Status	60
3.15	Korrelation von SMD-Antwort und SLEDAI	61
3.16	Korrelation von SEB-Antwort und SLEDAI	62
3.17	Immunsuppressive Medikation und SEB-Antwort	63

Tabellenverzeichnis

2.1	Geräte und Einmalgefäße	22
2.2	Pufferlösungen und Kulturmedien	23
2.3	Verwendete Antigene	27
2.4	Fluorochrome	30
2.5	Fluorochrom-konjugierte Antikörper und Peptide	32
3.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs	45
3.2	CD40L-Expression der T _H -Zellen nach Antigenstimulation	49
3.3	Kriterien und Frequenzen der CD40L-Positivität	51
3.4	Verlaufsbestimmungen	52
3.5	Einfluss der CD25-Depletion	53

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Dem Immunsystem kommt im Säugetierorganismus die Aufgabe zu, eine wirksame Bekämpfung pathogener Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen und Würmer) und körpereigener entarteter Zellen zu gewährleisten. Zur Erfüllung dieser Aufgabe hat sich in der Evolution eine Vielzahl von Effektormechanismen entwickelt. Das hat dazu geführt, dass in hochentwickelten Säugetieren mehrere redundante Strategien unterschiedlichen phylogenetischen Alters nebeneinander existieren, die sich jedoch in ihrer situationsgebundenen Effektivität unterscheiden.

Abgesehen von der Wahl des geeigneten Effektorprinzips besteht die initiale Kernleistung des Immunsystems in der Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen. Fehler bei diesem kritischen Entscheidungsschritt können für den Organismus zu lebensbedrohlichen Konsequenzen führen. Einerseits entziehen sich zahlreiche Erreger gezielt der Erkennung durch das Immunsystem und können zu letal verlaufenden Infektionen führen. Andererseits führt die fehlerhafte Erkennung von körpereigenen Strukturen zu einer gegen den eigenen Organismus gerichteten autoaggressiven Immunantwort. Daraus resultieren Autoimmunerkrankungen, zu denen auch der Systemische Lupus Erythematodes (SLE) zählt.

Bevor auf die immunologische Pathogenese des SLE näher eingegangen wird, sollen zunächst einige Grundprinzipien in der Arbeitsweise des Immunsystems dargestellt werden.

1.1.1 Arbeitsteilige Funktionsweise

Träger der Immunantwort ist eine heterogene Gruppe von spezialisierten weißen Blutzellen (Leukozyten). Sie treten im peripheren Blut als PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) in Erscheinung.

Die phylogenetisch ältere Fraktion umfasst Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DC) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Sie werden der ›angeborenen Immunität‹ zugeordnet und verfügen über Rezeptoren zur Mustererkennung (PRR: *Pattern Recognition Receptors*), die evolutionär konservierte Erregerstrukturen binden. Aufgrund ihrer ubiquitären Präsenz und guten Beweglichkeit sind sie zumeist die Ersten im Entzündungsherd und locken über proinflammatorische Mediatoren weitere Immunzellen an. Der zentrale Effektormechanismus der angeborenen Immunantwort besteht in der Eliminierung der Pathogene durch unspezifische Phagozytose. Bedeutsame Effektormoleküle sind Komplement, Akutphaseproteine, Lysozym und Interferone [1].

In der Coevolution von Erreger und Wirt wurden von den Mikroorganismen immer neue Strategien entwickelt, um der ›clearance-Funktion der angeborenen Immunität zu entgehen. Ein vielversprechendes Prinzip stellt dabei die Modifikation der Oberflächenmoleküle dar, um der PRR-vermittelten Erkennung zu entfliehen. Der kurze Generationszyklus der Erreger erlaubt dabei ein Maß an Oberflächen-Diversität, dem die Erkennung konservierter Erregerstrukturen durch die genetisch determinierten PRR nicht gewachsen ist. In diesem Kontext entwickelte sich die sog. ›adaptive‹ oder ›erworbene Immunantwort‹, die das Prinzip der Diversifizierung aufgreift und zufallssteuert eine Vielzahl monospezifischer Lymphozyten generiert. Diese sind in der Lage, klonal zu expandieren und einmal erkannte Antigene in Form eines immunologischen Gedächtnisses zu speichern.

Funktionell lässt die adaptive Immunität eine Zweiteilung erkennen. Unterschieden wird die von den T-Zellen getragene ›zelluläre Immunität‹ und die B-Zell-vermittelte ›humorale Immunität‹.

Zelluläre und humorale Immunität

Liegen die Pathogene im Extrazellulärraum vor, sind sie für die Effektoren der humoralen Immunantwort zugänglich – die sog. Antikörper (syn. Immunglobuline). Dabei handelt es sich um Proteine, die von den Plasmazellen

als terminaler Reifungsstufe der B-Zell-Reihe produziert werden und die über eine passgenaue (spezifische) Bindung an Erregeroberflächen verschiedene Effektormechanismen anstoßen. Zum einen können sie als neutralisierende Antikörper die Bindungsdomäne von Erregern überlagern und so deren Anhaftung verhindern. Zum anderen erleichtern sie als opsonierende Antikörper die Phagozytose durch Fresszellen oder stoßen die zytolytische Wirkung des Komplementsystems an.

Die Träger der zellulären Immunität sind die T-Zellen. Sie werden anhand der Expression bestimmter Oberflächenmarker (CD-Moleküle; CD: *Cluster of Differentiation*) in zwei Untergruppen eingeteilt. Die CD4-positiven T-Helfer-Zellen (T_H -Zellen) unterstützen die B-Zellen bei ihrer Ausdifferenzierung zur Plasmazelle und bilden somit eine Schnittstelle zur humoralen Immunität. Die CD8-positiven cytotoxischen T-Zellen (T_C -Zellen) sind auf die Bekämpfung intrazellulärer Erreger spezialisiert. Dazu sind sie auf die Präsentation intrazellulärer Antigene über den Major-Histokompatibilitäts-Komplex I (MHC-I) angewiesen. Erkennt eine T_C -Zelle ein Fremdatigen auf dem MHC-I-Rezeptor einer Körperzelle kann sie diese in den programmierten Zelltod (Apoptose) schicken oder für die zytokinvermittelte Phagozytose durch eine Fresszelle sorgen.

1.1.2 Antigenerkennung

Die Antigenerkennung der B-Zellen erfolgt über einen membranständigen Antikörper, der als B-Zell-Rezeptor (BCR) fungiert. Wird eine B-Zelle durch die spezifische Bindung ihres Antigens am BCR aktiviert und erhält zusätzlich Unterstützung von einer T_H -Zelle, kann sie zur Plasmazelle ausdifferenzieren. Diese terminale Reifungsstufe der B-Zell-Reihe verfügt über einen ausgeprägten Apparat zur Proteinbiosynthese, der es ihr gestattet, große Mengen löslicher Antikörper herzustellen. Diese besitzen dieselbe Spezifität wie ihr BCR und wirken über die weiter oben genannten Effektormechanismen.

T-Zellen sind zur Erkennung eines Antigens auf dessen Präsentation über den membranständigen MHC-Rezeptor angewiesen. Der MHC-I-Rezeptor wird auf allen kernhaltigen Körperzellen konstitutiv exprimiert und bindet intrazellulär prozessierte Peptidfragmente in einer speziellen Bindungstasche. Die Gesamtheit der von einer Körperzelle präsentierten Antigene stellt im übertragenen Sinne deren Rechenschaftsbericht zur aktuellen Proteinbiosyn-

these dar. Erkennt eine T_C -Zelle über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) ein virales Peptidantigen im MHC-I-Rezeptor einer Körperzelle, so kann sie diese direkt zerstören oder ihre Phagozytose veranlassen. Der MHC-II-Rezeptor wird von allen professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC), zu denen auch die B-Zellen zählen, exprimiert. Er erlaubt ihnen die Interaktion mit den T_H -Zellen.

1.1.3 T_H -Zell-abhängige B-Zell-Reifung

Für die Reifung zur Plasmazelle benötigt die B-Zelle neben der Bindung ihres Antigens über den BCR die Hilfe einer T_H -Zelle. Die Interaktion beider Zellreihen findet über den MHC-II-Rezeptor statt.

Bindet der BCR sein spezifisches Antigen, so wird dieser internalisiert. Das Antigen wird im Phagosom in seine Einzelpeptide zerlegt und auf ein MHC-II-Molekül geladen, das an die Zelloberfläche zirkuliert. Damit sind die Epitope des Antigens den CD4-positiven T_H -Zellen zugänglich. Die T_H -Zelle mit dem epitopspezifischen TCR kann den MHC-II-Rezeptor samt Antigenfragment binden, wobei das CD4-Molekül sich als Corezeptor seitlich an den MHC-II-Rezeptor anlagert. Weitere Corezeptoren wie die Paarungen CD40/CD40L und B7/CD28 stabilisieren den Zell-Zell-Kontakt [1].

Die effektive Initiation der B-Zell-Reifung ist an zwei Grundvoraussetzungen gebunden: 1) Erkennung des spezifischen Antigens über den BCR. 2) Kontakt zur korrespondierenden T_H -Zelle mit gegenseitiger Aktivierung. Ohne die Unterstützung durch eine T_H -Zelle kann die B-Zelle bei zusätzlicher Aktivierung durch repetitive bakterielle Motive lediglich Immunglobuline vom Typ IgM produzieren. Der T_H -Zell-abhängige Wechsel auf den IgG-Typ wird als ›Klassenwechsel‹ bezeichnet und kann zusätzlich mit einer Affinitätsreifung der Antikörper und der Produktion von B-Gedächtniszellen einhergehen.

1.1.4 Polarisierung der T_H -Zell-Antwort

Anhand charakteristischer Zytokinprofile nach Antigenstimulation lassen sich mehrere Subtypen der T_H -Zellreihe unterscheiden. Diesen konkurrierenden Subtypen kommt die Aufgabe zu, die Immunantwort in Richtung auf das geeignete Effektorprinzip zu polarisieren.

T_H1 -Zellen produzieren Interleukin 2 (IL-2), Interferon- γ (INF- γ) und Tumornekrosefaktor- β (TNF- β). Sie aktivieren Makrophagen und T_C -Zellen und stoßen damit geeignete Mechanismen zur Bekämpfung von Viren, intrazellulären Bakterien und Tumorzellen an [2].

T_H2 -Zellen treten als Produzenten von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 in Erscheinung. Sie initiieren die B-Zell-gestützte Antikörperproduktion und aktivieren eosinophile Granulozyten sowie Mastzellen. Eine T_H2 -polarisierte Antwort ist besonders effektiv gegen extrazelluläre Erreger und Würmer [2].

Die Botenstoffe IL-3 und TNF- α werden von beiden Populationen produziert. T_H -Zellen, die mit IL-4 und INF- γ je ein charakteristisches Zytokin jeder Population produzieren, nehmen eine Mittelstellung ein und werden als T_H0 -Zellen bezeichnet [3].

Die heterogene Gruppe der regulatorischen T-Zellen (T_{reg} -Zellen) umfasst die stark CD25-positiven ›natürlichen T_{reg} -Zellen‹ ebenso wie die als ›induzierbare T_{reg} -Zellen‹ bezeichneten Produzenten von TGF- β (syn. T_H3 -Zellen) und IL-10 (syn. Tr1-Zellen). Diese Zellen sind gegenwärtig verstärkt Gegenstand der Forschung. Ihnen kommt eine supprimierende und modulierende Funktion im Rahmen der Immunantwort zu [4, 5].

Kürzlich ist mit den T_H17 -Zellen ein weiterer Subtyp identifiziert worden, der sich durch die Produktion von IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26 und INF- γ auszeichnet [6]. Eine Hauptaufgabe der T_H17 -Zellen scheint in der effektiven Infektabwehr zu bestehen, wobei verschiedentlich auch eine Rolle bei der Genese von Autoimmunerkrankungen diskutiert wird. Nach bisherigem Verständnis treten sie im Rahmen der Immunregulation als Gegenspieler der supprimierenden T_{reg} -Zellen in Erscheinung [7].

1.1.5 Immunologische Toleranz

In den Bildungsstätten der Lymphozyten entsteht durch zufällige genetische Rekombination ein Heer von T- und B-Zell-Vorläufern unterschiedlichster Spezifität. Da dieser Diversifizierungsprozess vollkommen ungerichtet abläuft, werden so auch autoreaktive Lymphozyten produziert. Um die autoreaktive Selbstschädigung durch diese Zellen zu verhindern, existieren zwei grundlegende Mechanismen zur Induktion immunologischer Toleranz gegenüber dem eigenen Organismus.

Zentrale Toleranz

Ort der zentralen Toleranz sind die Bildungsstätten der B-Zellen im Knochenmark sowie der T-Zellen im Thymus. Auf ihrer Wanderung ins Thymusmark treffen die T-Zell-Vorläufer auf einen Parcours von dendritischen Zellen (DC) die über MHC-I körpereigenes Antigen präsentieren. Die Gesamtheit dieser Antigene stellt die Repräsentanz des ›immunologischen Selbst‹ dar. Autoreaktive Thymozyten binden an die DC und fallen, vermittelt durch den bim-Signalweg, der Apoptose anheim [8].

Diese zentrale negative Selektion ist jedoch nicht lückenlos. Es gibt Hinweise, dass zum einen niedrigaffine autoreaktive Zellen der Eliminierung entgehen und zum anderen das ›immunologische Selbstbild‹ aufgrund von insuffizienter Antigenpräsentation im Thymus unvollständig sein kann [9, 10]. Dies macht ergänzende periphere Toleranzmechanismen notwendig.

Periphere Toleranz

Das Modell der peripheren Toleranz geht auf Beobachtungen zurück, nach denen körperfremde Antigene, wenn sie in einem nicht-inflammatorischen Kontext auftreten, zu einer antigenspezifischen Toleranz führen. Diese kann durch Apoptose des spezifischen T-Zell-Klons oder durch dessen künftige Areaktivität (sog. ›Anergie‹) vermittelt sein [11, 12].

Eine Schlüsselposition kommt in diesem Zusammenhang den dendritischen Zellen (DC), einem Subtyp der APC zu. Wird durch sie ein Antigen aufgenommen und präsentiert, ohne dass proinflammatorische Botenstoffe ihre Reifung bewirken, vermitteln sie eine effektive Suppression des antigenspezifischen T_H-Zell-Klons. Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Adressierung des Xeno-Antigens Ovalbumin an DC über den endozytose-induzierenden Rezeptor DEC-205 zur regelrechten Präsentation des Antigens über MHC-II führt. Bei dieser Art der Antigenaufnahme wird eine Reifung zur CD83-positiven DC umgangen. In der Folge ist die Proliferation des Ovalbumin-spezifischen T_H-Zell-Klons nach 7 Tagen nicht mehr nachweisbar und lässt sich auch durch Restimulation mit Ovalbumin und IL-2 nicht reaktivieren. Wird dasselbe Experiment in Anwesenheit des proinflammatorischen Anti-CD40-Antikörpers FGK45 durchgeführt, stellt sich eine starke T_H1-polarisierte T-Zell-Antwort ein. Das Milieu des Antigenfundes und dessen

reifungsinduzierende Potenz stellt somit eine kritische Determinante bei der Entscheidung zwischen Toleranz- und Immunitätsentwicklung dar [13].

Bei Cokultivierung von T-Zellen und unreifen CD83⁻-DC konnte weiterhin die Entwicklung einer Tr1-artigen T_{reg}-Population mit dominanter IL-10-Sekretion beobachtet werden. Diese Zellen konnten die korrespondierenden T_H-Zellen durch Zell-Zell-Kontakt effektiv supprimieren [14].

Man geht inzwischen davon aus, dass die T_{reg}-Zellen über ein ebenso breites Spektrum an Antigenpezifitäten verfügen wie die T_H-Zellen. Sie stehen in einem funktionellen und zahlenmäßigen Gleichgewicht mit den T-Effektorzellen und verhindern durch deren konstitutive Unterdrückung überschießende Immunreaktionen und autoreaktive Selbstschädigung. So lässt sich beispielsweise in der gesunden Maus durch die Depletion der natürlichen CD25^{high}-T_{reg}-Zellen ein generalisiertes autoimmunogenes Krankheitsbild induzieren [4].

1.1.6 Autoaggression

Versagen die Toleranzmechanismen, können autoaggressive Zellklone zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen.

Bei den organspezifischen Varianten kommt es T_H-Zell-vermittelt zur Bildung von Autoantikörpern gegen Oberflächenantigene bestimmter Zelltypen. Beim Diabetes mellitus Typ I sind dies die Inselzellen des Pankreas, deren Zerstörung zu einem absoluten Mangel an Insulin führt. Bei der Multiplen Sklerose sind die Myelinscheiden der zentralen Neurone die Zielstruktur. Autoantikörper gegen die Parenchymzellen der Schilddrüse führen zu einer hypothyreoten Autoimmun-Thyreoiditis, der sog. Hashimoto-Thyreoiditis. Auch agonistisch wirkende Antikörper sind bekannt. So kommt es im Rahmen des Morbus Basedow zur Bildung von Autoantikörpern, die am TSH-Rezeptor stimulierend wirken und damit eine hyperthyreote Stoffwechsellage verursachen.

Bei den Systemischen Autoimmunerkrankungen, die verschiedene Organsysteme in variablem Ausmaß betreffen können, ist die Zuordnung von Autoantikörper und pathogenem Effekt weniger deutlich. Trotz Fehlen einer klaren Polarisation der T_H-Zell-Antwort erscheint doch im Falle des SLE die T_H1-Antwort als Grundlage der Produktion von Autoantikörpern von besonderer Bedeutung zu sein [15].

1.2 Der Systemische Lupus Erythematoses

Beim SLE handelt es sich um eine Systemische Autoimmunerkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen, die sich an der Haut und am Gefäßbindegewebe zahlreicher Organe manifestiert. Sie geht mit einer Vaskulitis der Arteriolen bedingt durch Immunkomplex-Ablagerungen einher, welche aus DNA, Anti-dsDNA-Antikörpern, Komplement und Fibrin bestehen.

Die Prävalenz der Erkrankung beträgt 50/100.000, jährlich werden 5–10/100.000 Neuerkrankungen diagnostiziert. Damit ist der SLE nach dem Sjögren-Syndrom die häufigste Kollagenose. Frauen – speziell im gebärfähigen Alter – sind mit einem Verhältnis von 10:1 weitaus häufiger betroffen als Männer. In Zentralafrika ist die Erkrankung unbekannt, bei der afroamerikanischen US-Bevölkerung hingegen häufiger als in Europa. Es liegt eine Assoziation mit den HLA-Antigenen DR2 und DR3 vor [16].

Aufgrund der Ungleichverteilung in der Weltbevölkerung wurden vielfach hormonelle, klimatische, genetische und infektiöse Einflüsse als pathogenetisch bedeutsame Faktoren diskutiert.

Die Messung der Krankheitsaktivität erfolgt anhand der folgenden standardisierten Protokolle: SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index), ECLAM (European Consensus Lupus Activity Measure) und SLAM (Systemic Lupus Activity Measure) [17, 18, 19].

1.2.1 Klinisches Bild

Klinisch ist der SLE durch ein Mischbild von Symptomen unterschiedlicher Organsysteme gekennzeichnet. Diese unterscheiden sich in der Spezifität für das Krankheitsbild sowie in der Häufigkeit ihres Auftretens. Unspezifische Allgemeinsymptome wie Fieber, Schwäche, Müdigkeit und Gewichtsverlust werden von der überwiegenden Mehrzahl der SLE-Patienten berichtet.

Hauterscheinungen werden bei 70 % der Patienten beobachtet, wobei das typische Schmetterlingserythem in 30–40 % der Fälle auftritt. Es handelt sich dabei um ein flächiges Erythem an Wangen und Nasenrücken unter Aussparung der Nasolabialfalte, das zu der Krankheitsbezeichnung *Lupus* (lat. *Wolf*) *Erythematoses* (griech. *Röte*) führte. Weitere Hautmanifestationen treten als Diskoider Lupus in Form leuchtend roter hyperkeratotischer Papeln, als oronasale Ulzerationen und Lichtempfindlichkeit in Erscheinung. Die Kopfhaut kann in Form einer vernarbenden Alopezie befallen sein [16].

Gelenkbeschwerden bestehen in 90 % der Fälle in Form von Arthralgien, Arthritiden und Tendosynovitiden. Typisch ist ein symmetrischer Befall der kleinen Gelenke ohne röntgenologische Erosionen, eventuell aber mit Subluxationen und Fehlstellungen. Entzündliche Muskelschmerzen werden in 40 % der Fälle berichtet [16].

Als Zusatzsyndrome können auftreten: 1) Sjögren-Syndrom: Verminderte Produktion der Tränen- und Speicheldrüsen. 2) Antiphospholipid-Syndrom: Gehäufte Aborte sowie arterielle und venöse Thrombosen. 3) Raynaud-Syndrom: Krisenhafte vasospastische Minderperfusion der Hände und Füße mit anschließender Hyperperfusion.

Weiterhin kommt es zu typischen Organmanifestationen, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

1.2.2 Organmanifestationen

Der Befall der Nieren in Form einer ›Lupusnephritis‹ ist eine häufige Organmanifestation des SLE (60–70 %) und geht mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher. Sie gilt als typischer Vertreter einer Immunkomplex- Glomerulonephritis. Die im Gefäßsystem zirkulierenden Immunkomplexe aus Antigen-Antikörper-Komplexen, Komplement und Fibrin werden in den glomerulären Gefäßschlingen im Rahmen der Ultrafiltration stark aufkonzentriert. In der Folge kommt es zur lokalen Einlagerung von Immunkomplexen sowie zum Anstoßen von Antikörper-assoziierten Effektormechanismen. Daraus resultiert eine Entzündungsreaktion unter Einschluss der Glomeruli und des Niereninterstitiums – eine Glomerulonephritis (GN) [20].

Die klinische Manifestation einer histologisch gesicherten Nierenbeteiligung kann dabei sehr unterschiedlich ausfallen. Neben der akuten GN mit akutem nephritischem Syndrom müssen auch eine asymptomatische Hämaturie und/oder Proteinurie, ein nephrotisches Syndrom oder eine ›Rasch Progrediente Glomerulonephritis‹ (RPGN) bei entsprechenden Hinweisen an eine SLE-Manifestation denken lassen. Endstadium der entzündlichen Nierendestruktion ist die fortgeschrittene sklerosierende Lupusnephritis begleitet vom Funktionsverlust der Nieren mit dialysepflichtiger chronischer Niereninsuffizienz [16].

Kardiopulmonale Manifestationen (60–70 % d. Fälle) treten im akuten Schub in Form einer Polyserositis unter Beteiligung des Perikards und der Pleura in Erscheinung. Selten kommt auch eine chronische Lungenfibrose mit pulmonaler Hypertonie, konsekutiver Rechtsherzinsuffizienz und limitierter Prognose vor. Sehr selten ist die pathognomonische abakterielle Libman-Sacks-Endokarditis [21].

Weiterhin weisen SLE-Patienten ein deutlich erhöhtes Risiko für Koronare Herzkrankheit (KHK) und kardiovaskuläre Ereignisse auf. Ein Umstand, der relevant zur SLE-assoziierten Mortalität beiträgt [22]. Ursächlich spielen neben einer Häufung kardiovaskulärer Risikofaktoren (Arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie) im SLE-Kollektiv auch vaskulitische (Koronaritis), thrombembolische (Antiphospholipid-Syndrom) und genetische Faktoren (Risikophänotypen des Mannose-bindenden Lektins) eine Rolle [23, 24, 25].

Zentralnervöse Manifestationen werden in 60 % der Fälle beschrieben. Sie sind gemeinsam mit dem renalen Befall prognosebestimmend und können einen schwerpunktmäßig psychiatrischen oder neurologischen Verlauf nehmen. Mischformen kommen ebenfalls vor.

Die ›Fokale Form‹ ist durch eine Mikrozirkulationsstörung oft im Rahmen eines Antiphospholipid-Syndroms charakterisiert. MRT-morphologisch imponieren kleine mikrovaskuläre Läsionen, im EEG können fokale Herde auftreten. Die Symptomatik umfasst neben epileptischen Anfällen und zerebralen Infarkten auch schubförmige Verlaufsformen ähnlich der Multiplen Sklerose [16].

Die ›Diffuse Form‹ ist weniger durch fokale Läsionen als vielmehr durch eine intrathekale Proteinerhöhung und den Nachweis Anti-neuronaler Antikörper gekennzeichnet. Die Symptomatik umfasst Einschränkungen der kognitiven Leistungsfähigkeit, depressive Episoden, analgetikaresistente Kopfschmerzen bis hin zu schizophrenoiden Verlaufsformen [16].

Eine hämatologische Beteiligung kann in Form von Anämie, Leukozytopenie, Lymphozytopenie und Thrombozytopenie bestehen. Der Verbrauch von Komplementfaktoren – speziell von C₃ und C₄ – kann als sensitiver Marker der Krankheitsaktivität herangezogen werden. Auch Splenomegalie und Lymphadenopathie kommen vor [21].

1.2.3 Autoantikörper

Im Verlauf des SLE können Autoantikörper nachgewiesen werden, die vorwiegend der IgG-Klasse angehören und gegen membranbildende Phospholipide und verschiedene Kernbestandteile gerichtet sind. Manchen kommt aufgrund ihrer hohen Spezifität diagnostische Bedeutung zu, andere korrelieren mit der Krankheitsaktivität und können als Aktivitätsmarker verwandt werden.

Noch bevor die genauen Zielantigene bekannt waren, wurden in der Immunfluoreszenz unterschiedliche Präzipitationsmuster von Antinukleären Antikörpern (ANA) beschrieben. Eine Positivität für ANA lässt sich in über 95 % der Fälle nachweisen. Die in dieser Gruppe subsummierten Autoantikörper weisen Spezifitäten für unterschiedlichste nukleäre Antigene auf. Diese lassen sich inzwischen weiter differenzieren:

Anti-dsDNA-Antikörper sind gegen die doppelsträngige DNA gerichtet und finden sich in einer Einmalbestimmung bei 30–60 % der SLE-Patienten. Über den gesamten Krankheitsverlauf lassen sich 60–83 % positiv testen [26]. Anti-dsDNA-Antikörper korrelieren besser mit der Krankheitsaktivität als ANA [27].

Anti-Nukleosomen-Antikörper binden an die intranukleäre Ordnungseinheit der DNA – das Nukleosom. Sie sind in 31–88 % der Fälle positiv. Ihre Eignung als Aktivitätsmarker ist begrenzt, da sie auch in 25–62 % der inaktiven Patienten positiv bestimmt werden [28].

Anti-Sm-Antikörper sind gegen Sm-Proteine des ›small nuclear ribonucleoproteins‹ (snRNP) gerichtet (vgl. Kap. 1.2.5). Sie sind in 25 % der Fälle nachweisbar. Antikörper gegen ein immundominantes Epitop am C-Terminus des SmD1-Proteins treten mit wesentlich höherer Frequenz von 70 % auf. Diese Anti-SmD1₈₃₋₁₁₉-Antikörper weisen zudem eine hohe Spezifität von 93 % auf, ihr Titer korreliert mit der Krankheitsaktivität und dem Auftreten einer Lupusnephritis [29].

In der retrospektiven Untersuchung asservierter Serumproben konnten in 77 % der SLE-Patienten Autoantikörper bereits vor dem klinischen Krankheitsausbruch nachgewiesen werden. Es ließ sich eine typische Sequenz feststellen, nach der zunächst unspezifische ANA und in der Folge schrittweise Antikörper gegen Ro(SSA), La(SSB), dsDNA und snRNP nachweisbar wurden [30].

Diese Autoantikörper-Abfolge wurde von einigen Autoren im Sinne eines schrittweisen Versagens der Toleranzmechanismen gewertet. Danach soll es durch Ausweitung der Autoreaktivität auf weitere Antigene bei Überschreiten eines kritischen Schwellenwertes zum Ausbruch der Erkrankung kommen [28].

1.2.4 Immunologische Ätiopathogenese

Die Pathogenese des SLE konnte bisher nicht auf einen dominanten pathogenetischen Mechanismus eingeschränkt werden und bleibt Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. Vorherrschend ist die Annahme einer multifaktoriellen Genese unter der Beteiligung endogener (Genetik, Immunregulation, Hormonhaushalt) und exogener Faktoren (Infektion, Medikamente, UV-Strahlung, Umwelt) [31].

Im gegenwärtigen Verständnis der Erkrankung nehmen die oben beschriebenen Autoantikörper eine Schlüsselstellung ein. Zum einen kommt ihnen als Bestandteil der Immunkomplexe eine unmittelbar kapillar- und nierenschädigende Bedeutung zu [20]. Zum anderen korrelieren Anti-dsDNA-Antikörper signifikant mit der Krankheitsaktivität. Folglich fokussierten sich viele Untersuchungen auf die Bedeutung der Autoantigene und den immunologischen Pathomechanismus des Toleranzbruchs ihnen gegenüber.

Den Anti-dsDNA-Antikörpern kommt dabei gewissermaßen die Rolle eines immunologischen Paradoxons zu. Der verantwortliche Plasmazellklon hat den Klassenwechsel zu IgG vollzogen und eine Affinitätsreifung durchlaufen, was ohne T_H-Zell-Hilfe nicht vorstellbar ist. Grundlage der Interaktion zwischen aktivierter B-Zelle und korrespondierender T_H-Zelle ist der MHC-II-Rezeptor. Dieser ist jedoch nur für die Präsentation von Peptidantigenen ausgelegt, so dass die Nukleinsäuren der DNA selbst nicht zum Gegenstand einer suffizienten T_H-Zell-Hilfe werden können.

Im Folgenden sollen Hypothesen zur Lösung dieses scheinbaren Widerspruches dargestellt werden. Hierfür bedeutsam sind eine Reihe nukleärer Peptidantigene, die ebenfalls zum Ziel SLE-spezifischer Autoantikörper werden. Im Anschluss wird die pathogenetische Bedeutung von Infektionen dargelegt.

1.2.5 Nukleäre Peptidantigene

Nukleäre Peptidantigene wie der Nukleosomen-Komplex oder die Sm-Proteine liegen im Zellkern in unmittelbarer Nähe der DNA vor. Immunisationsexperimente in der Maus legten nahe, dass ihnen eine Bedeutung beim Bruch der Toleranz gegenüber der nicht immunogenen DNA zukommt. So lässt sich durch die Immunisation mit reiner DNA zwar eine Anti-dsDNA-Produktion induzieren, diese ist jedoch wesentlich stärker ausgeprägt, wenn DNA als Chromatin, also im Komplex mit nukleären Proteinen Verwendung findet [32].

Es entstand die Hypothese, dass T_H -Zellen mit einer Spezifität für nukleäre Peptidantigene in einer Kreuzreaktion den dsDNA-spezifischen B-Zellen zu einer Ausdifferenzierung zur Plasmazelle verhelfen [33]. Im Zentrum dieser pathoimmunologischen Kreuzreaktion steht die B-Zelle. Erkennt eine DNA-spezifische B-Zelle über ihren BCR einen Komplex aus DNA und assoziierten Proteinen, so wird dieser im Ganzen phagozytiert und den Phago lysosomen zugeführt. Dort erfolgt die proteolytische Spaltung der assoziierten Peptidantigene und die Beladung der MHC-II-Rezeptoren. Diese zirkulieren an die Zelloberfläche und bieten Peptid-spezifischen T_H -Zellen die Möglichkeit zur Leistung von T-Zell-Hilfe. Durch die Phagozytose des DNA-Protein-Komplexes ist somit eine DNA-spezifische B-Zelle entstanden, die jedoch über ihren MHC-II-Rezeptor DNA-assoziiertes Peptidantigen präsentiert.

Nukleosomen

Die Nukleosomen bestehen aus einem von Histon-Molekülen gebildeten Peptidkern um den 1,8 Windungen der DNA-Doppelhelix gewunden sind. Sie bilden die kleinste Einheit in der Verpackungsstruktur des Erbgutes, des Weiteren kommt ihnen eine Funktion bei der Transkriptionsregulation zu.

Der Peptidkern wird von einem Octamer aus je zwei Histon-Molekülen der Typen H2A, H2B, H3 und H4 gebildet. Die Aminosäure-Sequenz der Histone ist evolutionär hochkonserviert und besonders reich an den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. Diese neutralisieren die polyanionische DNA und erlauben damit die enorme Packungsdichte des Chromatins. Durch Phosphorylierung und Acetylierung der Histone lässt sich der Kondensations-

zustand der DNA variieren. Die für die Transkription nötige Auflockerung wird durch die Acetylierung von Lysinresten eingeleitet [34].

Es konnte gezeigt werden, dass murine Nukleosomen-spezifische T_H-Zell-Klone in der Lage sind, im Rahmen einer Kreuzreaktion die Produktion von Autoantikörpern gegen dsDNA zu induzieren [35].

Sm-Proteine

Die Sm-Proteine bilden gemeinsam mit der ›small nuclear RNA‹ (snRNA) die Grundbausteine der ›small nuclear ribonucleoproteins‹ (snRNP), aus denen sich das Spleißosom zusammensetzt. Dieser intranukleäre RNA-Protein-Komplex besorgt im Rahmen der Transkription die Eliminierung der nicht kodierenden Introns und damit die Prozessierung der hnRNA zur mRNA.

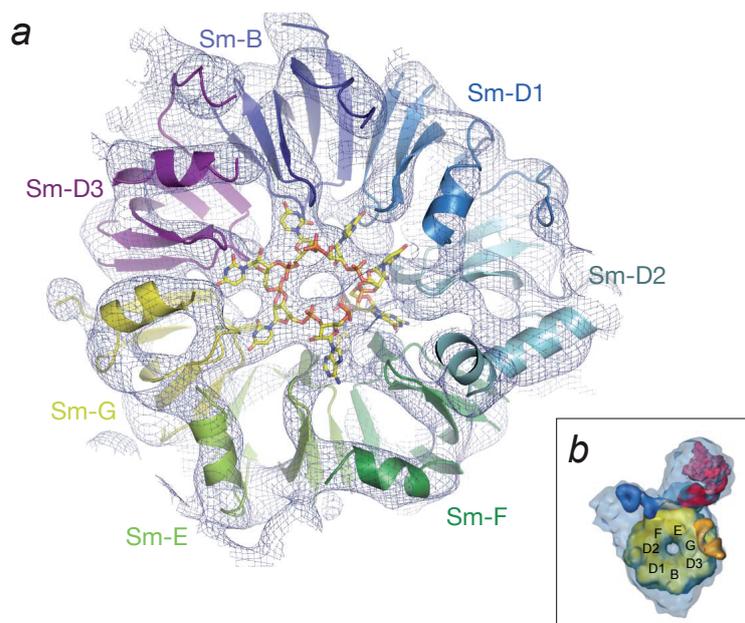


Abbildung 1.1: Sm-Proteine. Tertiärstruktur des Sm-Heptamer-Ringes.
(a) 3D-Modell auf der Grundlage einer Elektronendichtekartierung. Auflösung: 5,5 Å.
(b) Position des Sm-Heptamer-Ringes (gelb) innerhalb des humanen U1 snRNP. Modell auf der Grundlage der Kryo-Elektronen-Mikroskopie.
(Abb. modifiziert nach [36, 37])

Innerhalb der snRNPs formen die Sm-Proteine einen 20 nm durchmessenden Heptamer-Ring, der aus je einem Sm-Molekül der Typen B, D1, D2, D3, E, F und G zusammengesetzt ist (siehe Abb. 1.1). An der äußeren Zirkumferenz des Ringes liegen die Epitope, die als Sm-Antigene fungieren.

Ursprünglich wurden die Sm- oder Smith-Proteine als Autoantigene bei der SLE-Patientin Stephanie Smith entdeckt, deren Namen sie nun tragen [38]. Später konnte von Riemekasten *et al.* gezeigt werden, dass insbesondere Autoantikörper gegen den C-terminalen Anteil des SmD1-Peptids von Aminosäure 83-119 (SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid) eine hohe Sensitivität und Spezifität für den SLE aufweisen (vgl. Kap. 1.2.3) [29].

Im SLE-Mausmodell führt die Immunisierung von NZB/NZW-Mäusen mit dem SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid ebenfalls zu einer gesteigerten Produktion von Antikörpern gegen dsDNA. Interessanterweise steigt der Anti-dsDNA-Titer dabei sogar noch bevor Autoantikörper gegen das SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid selbst nachzuweisen sind [39]. Dies unterstreicht die Bedeutung immunologischer Kreuzreaktionen in der Pathogenese des SLE.

1.2.6 Infektionen und SLE

Wie bereits weiter oben erwähnt, wurden verschiedenste Faktoren als ätiopathogenetisch bedeutsam für den SLE diskutiert. In diesem Zusammenhang ergaben sich u. a. Hinweise darauf, dass mikrobielle Infektionen als initiale Auslöser der autoreaktiven T- und B-Zell-Antwort eine Rolle spielen. Insbesondere eine Assoziation von Epstein-Barr-Virus-(EBV-)Infektionen und dem SLE wird beschrieben.

Epstein-Barr-Virus (EBV)

Epidemiologische Studien zeigen in SLE-Kollektiven ein gehäuftes Auftreten von EBV-Infektionen, die mit erhöhter Viruslast und erhöhten Antikörpertitern einhergehen. Zudem lässt sich ein zeitlicher Zusammenhang zwischen EBV-Infektion und Ausbruch des SLE nachweisen [40, 41]. Demnach geht die EBV-Infektion der SLE-Manifestation in der Regel zeitlich voraus [42], was suggestiv für eine ätiopathogenetische Bedeutung von EBV erscheint [28, 43].

Weiterhin bemerkenswert ist eine hohe Homologierate von Viruspeptiden und Sequenzabschnitten der Sm-Peptide. Das Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 (EBNA-1) weist eine Homologie zu C-terminalen Sequenzen von SmB'/B und SmD1₉₅₋₁₁₉ auf [44, 45], das EBNA-2 zu SmD1₁₀₁₋₁₁₉ [46].

Diese Homologien bergen das Risiko, dass die initial gegen exogene Pathogene gerichtete Immunreaktion sich in der Folge gegen homologe en-

dogene Strukturen richtet. Ist eine Toleranz für diese endogene Struktur unzureichend etabliert, wird sie zum Autoantigen und unterhält die Entzündungsreaktion unabhängig vom infektiösen Agens.

Mikrobielle DNA

Virale und bakterielle DNA unterscheidet sich von humaner DNA u.a. durch eine Hypomethylierung von Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-(CpG-)Dinukleotiden. Auch im Rahmen des SLE treten vermehrt DNA-Sequenzen mit vermindertem Methylierungsgrad auf [47].

Diese hypomethylierten CpGs weisen eine erhöhte Immunogenität auf und führen zu einer wirksamen Aktivierung der angeborenen Immunität über die sog. ›Toll-like Rezeptoren‹ (TLR), die eine Untergruppe der PRR bilden. Weiterhin führen sie zu einer polyklonalen B-Zell-Aktivierung, der Sekretion von IL-6 und zu einer erhöhten Apoptose-Resistenz – Mechanismen, die ein Überleben von autoreaktiven Zellen begünstigen können [47, 48]. Zudem sind im Zusammenwirken von angeborenem und adaptivem Immunsystem durch TLR9-Aktivierung auch IgG-Klassenwechsel beobachtet worden, die normalerweise die Hilfe einer T_H-Zelle voraussetzen [49].

Weiterhin kann die Aktivierung durch TLR9 eine Reifung von DC bewirken [50], deren kritische Rolle bei der Weichenstellung zwischen Immunitäts- und Toleranzentwicklung bereits weiter oben dargestellt wurde (vgl. Kap. 1.1.5). Wird von DC hypomethylierte DNA im Komplex mit nukleären Peptidantigenen aufgenommen, so kann daraus demnach eine autoreaktive Immunantwort gegen den Peptidanteil resultieren.

1.3 Nachweismethoden antigenspezifischer T-Zellen

1.3.1 DNA-Syntheserate

Eine frühe Methode zum Nachweis einer antigenspezifischen Reaktion des Immunsystems ist die quantitative Messung der DNA-Synthese. Zu diesem Zweck wird der Kultur im Anschluss an die Antigenstimulation das radioaktiv markierte Nukleotid ^3H -Thymidin zugesetzt. Dieses wird von den PBMC als Substrat der DNA-Synthese aufgenommen und in das Erbgut eingebaut. Die Kinetik dieses Einbaus lässt einen Rückschluss auf die DNA-Syntheserate und somit indirekt auf die antigenspezifische T-Zell-Proliferation zu.

Aufgrund der Verwendung eines radioaktiven Markers ist diese Methode an entsprechende räumliche und organisatorische Voraussetzungen gebunden und wird deshalb zunehmend weniger angewandt. DNA-Synthese findet zudem auch in nicht proliferierenden Zellen statt, was eine hohe Hintergrundaktivität und eine geringe Sensitivität zur Folge hat. Weiterhin differenziert die Methode nicht zwischen den einzelnen PBMC-Subpopulationen, so dass kleine, proliferationschwache Populationen im entstehenden Mischbild untergehen. Des Weiteren ist die Methode stark von verschiedenen Störgrößen wie PH-Wert, Kulturmedium usw. abhängig [51]. Da vor der Messung eine Fixierung der Zellen nötig ist, stehen diese nicht für eine Kultivierung oder weitere funktionelle Untersuchung zur Verfügung.

1.3.2 Zytokinsekretion

Im Zuge der antigenspezifischen Aktivierung von Gedächtnis-T-Zellen kommt es je nach T-Zell-Subgruppe zur Produktion eines charakteristischen Zytokinprofils (vgl. Kap. 1.1.4). Diese löslichen Botenstoffe lassen sich im Überstand der Kultur mittels ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) quantitativ bestimmen und als Maß für die T-Zell-Aktivierung verwenden [52, 53, 54, 55].

Je nach immunologischem Reaktionstyp, kommt es beispielsweise im Rahmen einer allergischen Reaktion zu einer T_H2 -dominanten Immunantwort mit Sekretion von IL-2, IL-4 und TNF- α . Virale Antigene führen zu einer von T_H1 -Zellen getragenen Produktion von TNF- α , IFN- γ und IL-2. Das bakterielle Impfantigen Tetanus-Toxoid führt zu einer starken IL-2- und TNF- α -Antwort sowie geringer ausgeprägt zur Sekretion von IFN- γ [56].

Da je nach Art des Antigens eine andere T_H-Subpopulation mit jeweils charakteristischem Zytokinprofil die Federführung übernimmt, lässt die Konzentration eines Einzelzytokins keinen Rückschluss auf die Stärke der zugrunde liegenden Aktivierung zu. So könnte die gleiche Konzentration an IL-2 ebenso von einer schwachen T_H2-Antwort wie von einer starken T_H1-Antwort herrühren. Weiterhin muss für jede untersuchte Subpopulation ein charakteristisches Zytokin bekannt sein, ansonsten entgeht sie der Detektion [56].

1.3.3 Proliferationsmessung

Eine andere Methode der Proliferationsmessung beruht auf der zytosolischen Anfärbung der PBMC mit Carboxylfluoreszein-Succinimidylester (CFSE). Dieses Fluorochrom verteilt sich bei jeder Zellteilung gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen, in denen es folglich in halbiertes Konzentration vorliegt. So lässt sich die Generationsfolge in der Durchflusszytometrie anhand der abnehmenden CFSE-Konzentration verfolgen. Dies ermöglicht eine gezielte Analyse der proliferierenden Klone, die anhand von Markermolekülen einer weiteren Differenzierung unterzogen werden können. Zudem kann die Messung mit lebenden PBMC durchgeführt werden, die weiterhin für die Kultivierung oder physiologische Untersuchungen zur Verfügung stehen [57, 58, 59].

Zur Identifizierung der proliferierenden Zellen findet die Stimulation über mehrere Tage statt, so dass mehrere Generationszeiten durchlaufen werden. Dies erhöht die Sensitivität der Methode, da auch niedrige Zellfrequenzen nach klonaler Expansion detektierbar werden. Allerdings mindert es die Spezifität, da in einer mehrtägigen Stimulation die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Aktivierung steigt. Neben von außen eingebrachten Verunreinigungen können auch Bestandteile zugrundegegangener Zellen eine Aktivierung verursachen. So ist davon auszugehen, dass intranukleäre Antigene in einer mehrtägigen Kultur im Rahmen der natürlichen Autolyse ubiquitär vorliegen. Demgegenüber beschränkt sich eine 6-stündige Stimulation auf die Erfassung der präformierten Immunantwort getragen durch die Gedächtniszellen der T- und B-Zellreihe.

Eine weitere Schwäche dieses Verfahrens ist die Gleichsetzung von Aktivierung mit klonaler Expansion. Dies ist zwar im Grundsatz nachvollziehbar, führt aber zu einer Unterschätzung der schwach oder nicht proliferierenden aktivierten T-Zellen.

1.3.4 Expression von Oberflächenmolekülen

Im Rahmen der T-Zell-Aktivierung kommt es zur Expression und Exposition einer Reihe oberflächenständiger Moleküle. Verschiedene Markermoleküle, einschließlich CD25, CD69 und CD71 wurden in diesem Zusammenhang als Aktivierungsmarker evaluiert. Allerdings ist ihre Spezifität begrenzt. Sie werden einerseits auf bestimmten T_H-Subpopulationen konstitutiv exprimiert und deshalb u. a. als Differenzierungsmarker herangezogen. Andererseits vermag auch eine TCR-unabhängige Aktivierung ihre Expression zu verstärken [60, 61, 62].

Zuletzt stellten Frentsch *et al.* das Oberflächenmolekül CD40L (syn. CD154) als neuen Aktivierungsmarker mit hoher Sensitivität und Spezifität vor. CD40L wird intrazellulär in sekretorischen Vesikeln gespeichert und kann im Zuge der Aktivierung schnell an die Zelloberfläche mobilisiert werden [63]. Es ist durch eine geringe konstitutionelle Expression und eine streng antigenspezifische Induktion gekennzeichnet. So zeigen nach Stimulation mit Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) nur die V β 12⁺-T_H-Zellen eine CD40L-Expression. V β 5.2⁺-T_H-Zellen, deren TCR keine Bindungsstelle für SEB aufweist, reagieren hingegen nicht [56].

Weiterhin ermöglicht CD40L eine Erfassung sämtlicher T_H-Subpopulationen unabhängig von ihrem Zytokinprofil. Die Stimulation mit dem Birch-Allergen, dem Cytomegalievirus-Peptid pp65 und mit dem Impfantigen Tetanus-Toxoid führen zu jeweils unterschiedlich polarisierten T_H-Zell-Antworten, die mit der Sekretion eines charakteristischen Zytokinmusters einhergehen. Die CD40L-Expression ist bei allen genannten Reaktionstypen nachweisbar und bietet somit die Möglichkeit, mit einem einzelnen Marker die Antwort der gesamten T-Zellreihe zu erfassen [56].

Weiter konnte gezeigt werden, dass sich CD40L zur Anreicherung antigenspezifischer Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS: *Magnet-Activated Cell Sorting*) eignet. Nach Stimulation mit dem Cytomegalievirus-(CMV-)Antigen pp65 wurden die CD40L⁺-T_H-Zellen mittels MACS aufgereinigt und in Kultur genommen. Die somit isolierten CMV-spezifischen T_H-Zellen zeigten bei einer Restimulation mit pp65 eine gegenüber der PBMC-Population 300-fach erhöhte CD40L-Expression [56].

1.4 Rationale der CD25-Depletion

Das Oberflächenmolekül CD25 entspricht der α -Kette des IL-2-Rezeptors und wird von T-Zellen im Rahmen der antigenspezifischen Aktivierung verstärkt exprimiert. In hohen Oberflächenkonzentrationen (CD25^{high}) ist CD25 als Marker für regulatorische T-Zellen (T_{reg}-Zellen) von Bedeutung. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass bei einer CD25-Färbung nur jene 2–4 % der Zellen mit der maximalen CD25-Expression die T_{reg}-Population bilden [64]. Die Depletion aller CD25⁺-Zellen hat somit zur Folge, dass neben den T_{reg}-Zellen auch andere PBMC-Subpopulationen dezimiert werden.

Bisher gibt es keine einheitliche Klassifizierung, wo die Grenze der hoch-CD25-positiven zu den intermediär-CD25-positiven Zellen und damit die Grenze der T_{reg}-Population verläuft. Dies macht den Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen schwierig und führte in der Literatur der vergangenen Jahre immer wieder zu widersprüchlichen Standpunkten [65]. Der T_{reg}-Marker mit der gegenwärtig höchsten Spezifität ist der Transkriptionsfaktor forkhead box P3 (FoxP3). Dieser ist essentiell für eine suffiziente Entwicklung und Funktion der T_{reg}-Zellen [65]. FoxP3-defiziente Mäuse entwickeln eine fatale generalisierte Autoimmunpathologie auf der Grundlage unkontrollierter APC-Reifung und entfesselter autoreaktiver T-Zellen [66].

Zur vollständigen Eliminierung der T_{reg}-Zellen aus einer Zellsuspension kann die CD25-Depletion jedoch weiterhin als Standardmethode angesehen werden. Insbesondere da FoxP3 als intranukleäres Molekül nicht für eine Oberflächenmarkierung lebender Zellen zur Verfügung steht.

In der vorliegenden Arbeit soll anhand der Eliminierung der T_{reg}-Zellen deren Einfluss auf die autoaggressive T_H-Antwort untersucht werden. Es gibt Hinweise darauf, dass die T_{reg}-Population eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle autoreaktiver Immunantworten spielt. So ließ sich in bisher unveröffentlichten Mausexperimenten unserer Arbeitsgruppe die autoreaktive T_H-Antwort gegen das SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid durch eine CD25-Depletion effektiv steigern. Hier soll nun geprüft werden, ob sich auch im humanen System mittels der CD25-Depletion der Nachweis autoreaktiver T_H-Zellen in einem SLE-Kollektiv führen lässt.

1.5 Ziele der Arbeit

1. Etablierung eines zuverlässigen Verfahrens zur Detektion von autoaggressiven T_H -Zellen beim SLE
2. Ermittlung der Frequenzen autoaggressiver T_H -Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen in einem repräsentativen SLE-Kollektiv
3. Untersuchung des Einflusses der T_{reg} -Zellen auf die autoaggressive T_H -Antwort
4. Ermittlung statistischer Zusammenhänge von Patientendaten und Krankheitsaktivität mit der autoaggressiven T_H -Antwort

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Geräte und Pufferlösungen

Gerät	Bezeichnung	Firma
Sterile Werkbank	HeraSafe	Heraeus
CO ₂ -Inkubator	CB 210	Binder
Zentrifugen	Megafuge 1.0R	Heraeus
	Multifuge 3 L-R	Heraeus
	Labofuge 400R	Heraeus
	Biofuge fresco	Heraeus
Pipettierhilfe	Pipettboy	Brand
	Accu-Jet pro	
Pipetten	0,5–10 µl; 2–20 µl; 10–100 µl; 20–200 µl; 100–1000 µl	Eppendorf & Abimed
Pipettenspitzen		Greiner Bio-one
Polypropylen-Röhrchen (Schraubdeckelröhrchen)	Falcon 15 und 50 ml	Greiner Bio-one
Polypropylen- Reaktionsgefäße	0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Eppendorf
Mikroskop	Wilovert S	hund
Durchflusszytometer	FACS Calibur	Becton-Dickinson

Tabelle 2.1: Geräte und Einmalgefäße.

In den Tabellen 2.1 und 2.2 sind die häufig verwendeten Geräte und Einmalgefäße sowie gängige Pufferlösungen und Kulturmedien aufgeführt. Die übrigen Materialien erscheinen im Zusammenhang mit ihrer Verwendung im jeweiligen Methodenkapitel.

Pufferlösung	Zusammensetzung
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung), pH 7,2–7,4	2,7 mM Kaliumchlorid 1,5 mM Kaliumhydrogenphosphat 137 mM Natriumchlorid 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat
PBS/BSA	0,5% BSA (w/v) in PBS
PBS/BSA/Azid	0,05% (v/v) NaN ₃ in PBS/BSA
PBS/BSA/EDTA	2 mM EDTA in PBS/BSA
Erythrozyten-Lyse-Puffer	0,01 M KHCO ₃ , 0,155 M NH ₄ Cl, 0,1 mM EDTA, ad 500 ml H ₂ O, pH 7,5
Saponin-Puffer	0,5% (w/v) Saponin in PBS/BSA/Azid
Fixierungspuffer	2% (w/v) Paraformaldehyd in PBS/BSA/Azid
Kulturmedium	
RPMI Medium	Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640, Fa. Gibco

Tabelle 2.2: Pufferlösungen und Kulturmedien.

2.2 Blutspender und Blutentnahme

Untersucht wurden die Blutproben von SLE-Patienten, die sich im Studienzeitraum in Behandlung auf der rheumatologischen Bettenstation oder in der rheumatologischen Poliklinik der Charité auf dem Campus Mitte befanden. Die Probandenauswahl erfolgte nach den folgenden Kriterien: 1) in der Charité nach ACR-Kriterien [67] gesicherte Diagnose eines SLE, 2) möglichst keine rheumatologischen Nebendiagnosen, 3) keine Overlap-Syndrome.

Die Blutentnahme erfolgte nach ausführlicher Aufklärung und Einholung des schriftlichen Einverständnisses auf der Grundlage des Ethikvotums EA1/098/07 – wenn möglich im Rahmen einer Routine-Blutentnahme. Es wurden je SLE-Patient 20 bis 50 ml periphervenöses Blut in Natriumheparinisierte Röhrchen des Vacutainer-Systems (*Fa. Becton Dickinson*) abgenommen und die mononukleären Zellen isoliert.

2.3 Isolierung der mononukleären Zellen

Die Isolierung der mononukleären Zellen (PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), zu denen T- und B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen sowie Monozyten gehören, erfolgte mittels einer Dichtegradientenzentrifugation.

Dazu wird eine wässrige Lösung des synthetisch hergestellten Polysaccharids Ficoll mit verdünntem heparinisierten Vollblut überschichtet und im Anschluss zentrifugiert. Die Dichte der Ficoll-Lösung ist mit 1–1,2 g/ml so gewählt, dass Blutbestandteile hoher Dichte wie Erythrozytenaggregate und tote Zellen während der Zentrifugation die Ficoll-Phase durchwandern und am Röhrchenboden sedimentieren. Aufgrund ihrer geringen Dichte flottieren Granulozyten weiterhin im Serum, während sich die mitteldichten PBMC am Übergang zum Ficoll als Zwischenring niederschlagen und mit der Pipette aufgenommen werden können.

Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde Vollblut im Verhältnis 2:1 mit PBS/BSA verdünnt. 20 ml Ficoll-Lösung (LSM 1077, Fa. PAA) wurden mit maximal 30 ml des verdünnten Vollbluts überschichtet und 20 Minuten bei 650 x g und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert.

Der Zwischenring wurde in ein weiteres 50 ml-Röhrchen übernommen und mit PBS/BSA bis auf 50 ml aufgefüllt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 300 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 3 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer aufgenommen. Die Lyse wurde nach 3 Minuten durch das Auffüllen mit 50 ml PBS/BSA abgestoppt. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Pellet zur Zellzählung in einem definierten Volumen PBS/BSA aufgenommen.

2.4 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine 10 µl-Probe der Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit Trypan-Blau verdünnt und unter das Deckgläschen einer Zählkammer (Fa. Neubauer) pipettiert. Unter dem Mikroskop (Wilovert S, Fa. hund) wurden vier Quadranten á 0,1 µl unter Ausschluss der toten Trypan-blau-gefärbten Zellen ausgezählt und das Ergebnis gemittelt. Durch Multiplikation mit 10^5 ergab sich die Zellzahl/ml.

2.5 Magnetische CD25-Depletion

In ausgewählten Experimenten wurden die CD25⁺-T_{reg}-Zellen durch magnetische Zellsortierung (MACS: *Magnet-Activated Cell Sorting*) aus der PBMC-Suspension entfernt, bevor die Antigenstimulation erfolgte.

Diese Methode wurde 1990 von Miltenyi *et al.* entwickelt und beruht auf der Markierung von Oberflächenmolekülen mit spezifischen Antikörpern, an die ein magnetischer Mikropartikel (syn. MicroBead) gekoppelt ist [68]. Ist die gewünschte Zellpopulation auf diesem Wege magnetisch markiert, wird die Zellsuspension in einer Säule durch ein Hochgradienten-Magnetfeld geführt. Die markierten Zellen werden aufgrund ihrer ferromagnetischen Wechselwirkung mit dem umgebenden Magnetfeld in der Säule zurückgehalten, so dass eine Negativfraktion die Säule verlässt. Nach Entfernung des Magnetfeldes kann die Positivfraktion diluiert werden.

Zur Depletion der CD25⁺-T_{reg}-Zellen wurde ein ferromagnetisch gekoppelter Anti-CD25-Antikörper verwendet. Die CD25-negative Fraktion wurde aufgefangen, die Säule samt der CD25-positiven Zellen verworfen.

2.5.1 Magnetische Markierung der CD25⁺-Zellen

Vor Beginn der Depletion wurde eine Probe von 1×10^6 Zellen zur späteren Erfolgskontrolle sichergestellt. Die in PBS/BSA suspendierten PBMC wurden bei 400 x g und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert und entsprechend der Herstellerangaben in einer Lösung aus 80 % PBS/BSA/EDTA und 20 % CD25-MicroBeads II (*Fa. Miltenyi Biotec*) resuspendiert. Die Puffervolumina wurden protokollgemäß der jeweiligen Proben-Zelldichte angepasst. Nach der folgenden 15-minütigen Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen mit PBS/BSA/EDTA gewaschen.

2.5.2 Magnetische Zellseparation

Nach erneutem Abzentrifugieren der PBMC bei 400 x g und 4°C für 10 Minuten erfolgte die Resuspension in 500 µl/ml PBS/BSA/EDTA. Die Matrixsäule (Cell-Separation LD Column, Magnet und Magnethalter, *Fa. Miltenyi Biotech*) wurde mit 2 ml PBS/BSA/EDTA angespült und nach Aufsetzen eines Filters (Pre-Separation Filter, *Fa. Miltenyi Biotech*) mit der PBMC-Suspension überschichtet. Das Nachspülen erfolgte mit 2 x 1 ml PBS/BSA/EDTA, die

Negativfraktion wurde in einem Schraubdeckelröhrchen aufgefangen, die Matrixsäule samt Positivfraktion verworfen.

2.5.3 Kontrolle der Depletion

Um die Effektivität der Depletion zu beurteilen, wurde jeweils die CD25-Expression der CD4⁺-Zellen vor und nach der Depletion bestimmt und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die Färbung der Lebendzellprobe erfolgte entsprechend der weiter unten ausführlich dargestellten Handlungsanweisungen (siehe Kap. 2.8.3). Nach Ausschluss der toten PJ-positiven Zellen wurde im Scatter-Plot auf die T-Zell-Population gegatet und in einem DotPlot CD4 gegen CD25 dargestellt. Die Abbildung 2.1 zeigt beispielhaft SLE#109 mit 44,0% CD4⁺CD25⁺-Zellen vor und 2,1% nach der Depletion. Im Mittel ergibt sich für alle 11 Depletionen eine Reduktion der CD4⁺CD25⁺-Zellen um 91,5 %.

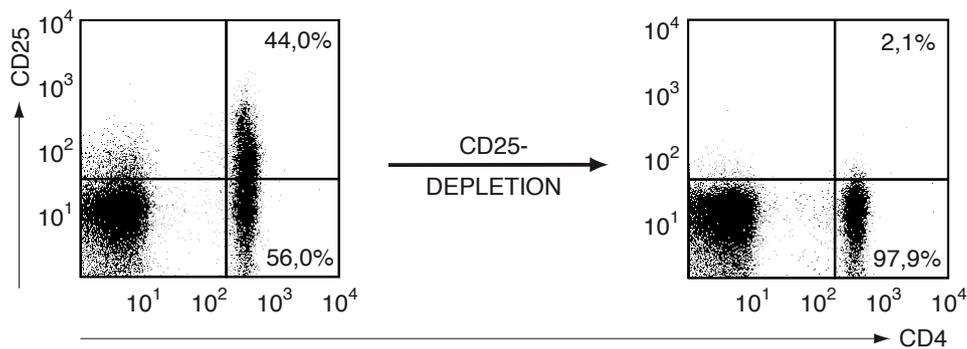


Abbildung 2.1: Kontrolle der CD25-Depletion. Zytometrische Darstellung der CD4⁺CD25⁺-Zellen von SLE#109 vor und nach der CD25-Depletion. Prozentangaben beziehen sich auf die CD4⁺-Zellen.

2.6 *In vitro*-Antigenstimulation

Die PBMC wurden bei einer Zelldichte von $1-2 \times 10^6$ /ml in jeweils 200 μ l RPMI Medium 1640 (*Fa. Gibco*) in 96-Loch-Rundbodenplatten (*Fa. Greiner bio-one*) in einem CO₂-Inkubator kultiviert. Die Kultivierung fand über 6 Stunden bei 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5,0 % CO₂ statt. Die Stimulation erfolgte durch Co-Inkubation mit verschiedenen Kontrollantigenen sowie als Negativkontrolle ohne Antigenzusatz. Die Testansätze wurden in der Regel als Triplikate angelegt. In der Tabelle 2.3 sind die verwendeten Antigene mit ihrer jeweiligen Endkonzentration und Herstellerangabe aufgeführt.

Antigen Abkürzung	Endkonzentration	Hersteller
Staphylokokken- Enterotoxin B SEB	1 μ g/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Cytomegalievirus pp65 Peptid-Mix CMV	20 μ l/ml ^a	Miltenyi Biotec
Tetanus-Toxoid ₈₃₀ TET	20 μ g/ml	Anaspec
Hühner- Nukleosomen cNUC	20 μ g/ml	Dr. G. Hausdorf, Charité, Präparation aus Hühnererythro- zyten, siehe Bruns <i>et al.</i> [69]
Humane Nukleosomen hNUC	20 μ g/ml	Orgentec, Präparation aus humanen HeLa-Zellen nach Morales <i>et al.</i> [70]
SmD1 ₈₃₋₁₁₉ -Peptid SMD	20 μ g/ml	Dr. P. Henklein, HU Biochemie. Synthetisches Peptid, siehe Riemekasten <i>et al.</i> [29]
randomisiertes Peptid RND	20 μ g/ml	Dr. P. Henklein, HU Biochemie. Synthetisches Peptid, siehe Riemekasten <i>et al.</i> [29]

^a keine Angabe zur Stoffkonzentration erhältlich, Verwendung lt. Herstellerangaben

Tabelle 2.3: Verwendete Antigene.

Zusätzlich wurde allen Ansätzen außer den Positivkontrollen ein costimulierender CD28-spezifischer Antikörper (NA/LE Mouse anti-human, *Fa. BD Pharmingen*) in einer Konzentration von 10 μ g/ml zugesetzt. Neben der

spezifischen TCR-Bindung ist die Aktivierung des T-Zell-Corezeptors CD28 eine zwingende Voraussetzung für die Induktion von NF-kappaB und somit die T-Zell-Aktivierung [71]. Bei der T-Zell-Aktivierung fungiert das Molekül B7 auf aktivierten APC als stimulatorischer Ligand für CD28. Die Zugabe des Anti-CD28-Antikörpers macht die T-Zell-Aktivierung somit von einer suffizienten Voraktivierung der APC unabhängig.

Für die letzten 4 Stunden der Stimulation wurden zusätzlich 20 µg/ml Brefeldin A (*Fa. Sigma-Aldrich*) hinzugegeben, das über eine Deassemblierung des Golgiapparates zu einer Häufung von Produkten der Proteinbiosynthese im Zellinneren führt [72]. Dies betrifft auch die oberflächenständigen CD-Moleküle, die sich somit intrazellulär mit höherer Sensitivität durchflusszytometrisch nachweisen lassen.

2.7 Formaldehyd-Fixierung

In der Zellbiologie findet das Formaldehyd-Polymer Paraformaldehyd (PFA), das als wasserlösliches weißes Pulver eingesetzt wird, breite Anwendung bei der Zellfixierung. Grundlage der Methode ist die Quervernetzung von Peptidketten im Rahmen der Mannich-Reaktion. Hierbei wird in einem ersten Schritt ein sekundäres Amin der Peptidkette mit Formaldehyd unter Wasserabspaltung zu einem mesomerie-stabilisierten Carbenium-Iminium-Ion umgesetzt. Das elektrophile Kohlenstoffatom des Carbenium-Iminium-Ions wird in einem zweiten Schritt von dem aciden Kohlenstoffatom einer zweiten Peptidkette angegriffen, so dass eine kovalente Quervernetzung beider Peptidketten entsteht.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben in 96-Loch-Rundbodenplatten für 2 Minuten bei 400 x g und 4°C herunterzentrifugiert, die PBMC in je 200 µl 2% PFA in PBS/BSA/Azid aufgenommen und für 15 Minuten bei 21°C fixiert. Nach dem Waschen mit PBS/BSA/Azid wurden die Proben in 200 µl PBS/BSA/Azid resuspendiert und bis zur durchflusszytometrischen Messung bei 4°C dunkel gelagert.

2.8 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Analyse von Körperzellen beruht auf der Detektion optischer Phänomene, die durch eine Einzelzelle bei der Passage eines Laserstrahls hervorgerufen werden.

Um die Zellen der Probe einzeln nacheinander an dem Laserstrahl vorbeiführen zu können, müssen diese in einem Flüssigkeitsstrom linearisiert werden. In diesem 'hydrodynamische Fokussierung' genannten Prozess wird der Probenstrom im Zentrum eines schneller fließenden Mantelstroms freigesetzt und von diesem gleichsam auseinandergezogen.

Bei der Passage des monochromatischen Lichts kommt es am Zellkörper zu Beugungs- und Brechungsphänomenen, die von photosensiblen Detektoren registriert werden. Das gebeugte Licht wird in einem in der Laserachse verlaufendem Korridor mit einem Öffnungswinkel von 3–10° als Vorwärtsstreulicht (FSC: *Forward Scatter*) registriert und gibt Auskunft über die Zellgröße. Das Brechungslicht wird rechtwinklig zur Laserachse als Seitwärtsstreulicht (SSC: *Sideward Scatter*) gemessen. Es gibt Auskunft über den Reichtum an lichtbrechenden Zellstrukturen wie sekretorischen Granula und Membranstapeln. Anhand der Messgrößen von FSC und SSC lässt sich bereits ein Großteil der verschiedenen Zell-Populationen der PBMC gegeneinander abgrenzen.

2.8.1 Fluorochrome

Als Fluorochrome werden photoaktive Stoffe bezeichnet, welche die Anregung durch monochromatisches Licht einer definierten Wellenlänge mit der Emission von elektromagnetischer Strahlung mit einem Fluorochrom-spezifischen Wellenlängen-Spektrum beantworten. Dies macht man sich in der Durchflusszytometrie bei der Untersuchung Fluorochrom-gefärbter Zellen zu Nutze. Das emittierte Licht wird dabei durch optische Filter gelenkt, die nur für das Fluorochrom-spezifische Emissionsmaximum durchgängig sind. Durch Messung der Intensität des gefilterten Lichtes kann auf die Fluorochrom-Konzentration der Zelle geschlossen werden.

Fluorochrome lassen sich einerseits an Antikörper koppeln oder können aufgrund ihrer Affinität zu bestimmten Zellbestandteilen direkt eingesetzt werden. Das Fluorochrom Propidiumjodid (PJ) bindet beispielsweise an DNA, wird allerdings von lebenden Zellen in einem aktiven Transportprozess aus

dem Zellinneren eliminiert. Tote Zellen lassen sich demnach anhand ihrer PJ-Positivität identifizieren.

Die Tabelle 2.4 zeigt eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome, jeweils mit ihrer Abkürzung, Verwendung sowie ihrem charakteristischen Emissionsmaximum.

Fluorochrom	Abkürzung	Verwendung	Messkanal	Emissionsmaximum in nm
Fluorescein-isothiocyanat	FITC	Ak-Konjugation	FL 1	530
Phycoerythrin	PE	Ak-Konjugation	FL 2	575
Peridinin-Chlorophyll-a	PerCP	Ak-Konjugation	FL 3	680
Propidiumjodid	PJ	Anfärben der DNA toter Zellen	FL 2/3	617
Allophycocyanin	APC	Ak-Konjugation	FL 4	660

Tabelle 2.4: Fluorochrome.

2.8.2 Funktionsweise des FACS-Gerätes

Die durchflusszytometrischen Messungen der vorliegenden Arbeit wurden mit einem FACS Calibur™ (Fa. Becton Dickinson) durchgeführt. FACS steht dabei für Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*).

In diesem Gerät können vier Fluorochrome in separaten Messkanälen (FL1–FL4) zeitgleich gemessen werden. Die Aktivierung der Fluorochrome erfolgt zeitversetzt mit zwei Lasern. Einem Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm, die innerhalb des Absorptionsspektrums von FITC, PE, PerCP und PJ liegt. Und einem roten Diodenlaser mit 635 nm, der APC zur Fluoreszenz-Emission anregt.

Das Fluoreszenzlicht wird über Verteilerspiegel den vier Messkanälen zugeleitet. Dem Detektor (Photomultiplier) jedes Kanals ist ein optischer Filter vorgeschaltet, der nur die charakteristische Wellenlänge desjenigen Fluorochroms passieren lässt, das in dem Kanal gemessen werden soll. Es ergibt sich eine feste Paarung von Messkanal und Fluorochrom entsprechend FL1/FITC, FL2/PE, FL3/PerCP und FL4/APC.

Wie in Abbildung 2.2 ersichtlich, überschneiden sich die Spektren der einzelnen Fluorochrome. Das gilt auch für die Wellenlängen ihrer jeweiligen Emissionsmaxima λ_{\max} , so dass eine Kompensation der Interferenz notwendig wird. Beispielsweise müssen vom PE-Messsignal (blau) bei 575 nm näherungsweise 20 % des FITC-Signals (grün) subtrahiert werden, um die Interferenz auszugleichen. Diese Kompensation erfolgt individuell für jede Probenreihe und ist weiter unten detailliert dargestellt (siehe Kap. 2.8.4).

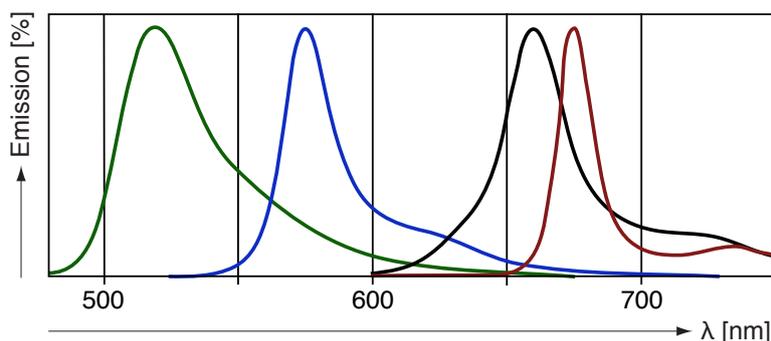


Abbildung 2.2: Fluorochrom-Emissionsspektren. Emissionsspektren der Fluorochrome FITC (grün; $\lambda_{\max}=530$ nm), PE (blau; $\lambda_{\max}=575$ nm), APC (schwarz; $\lambda_{\max}=660$ nm) und PerCP (rot; $\lambda_{\max}=680$ nm) nach der Wellenlänge λ [nm].

Die starke Überschneidung des APC- und PerCP-Spektrums und die damit einhergehende große Interferenz wird durch die zweizeitige Analyse mit zwei separaten Lasern umgangen. Dabei passiert der Probenstrom die Laser nacheinander, so dass in Kenntnis der Laufzeitlatenz eine Trennung der Signale möglich ist.

2.8.3 Zellfärbung

Zur genaueren Differenzierung der PBMC-Subpopulationen hat sich die Unterscheidung anhand von Oberflächenproteinen etabliert. Die sog. ›CD-Nomenklatur‹ (CD: *Cluster of Differentiation*) umfasst derzeit über 300 dieser Oberflächenmarker, die mit einer fortlaufenden Indexnummer versehen sind. So steht beispielsweise CD3 für den T-Zell-Rezeptor (TCR) und CD154 (syn. CD40L) für den Liganden des für die T-Zell-Aktivierung bedeutsamen costimulatorischen Moleküls CD40.

Die gezielte Markierung von CD-Molekülen durch spezifische Fluorochrom-gekoppelte Antikörper stellte einen Meilenstein für die Untersuchung von Zellpopulationen mit Hilfe der Durchflusszytometrie dar.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fluorochrom-gekoppelten Antikörper sowie ihre Endkonzentration sind in der Tabelle 2.5 aufgeführt. Die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper werden im Folgenden auch als »Färbe-Antikörper«, die Inkubation mit ihnen als »färben« bezeichnet.

Spezifität	Klon/Peptid	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
CD3	UCHT-1	FITC	1:200	DRFZ
CD3	UCHT-1	PE	1:200	DRFZ
CD4	TT1	PE	1:200	DRFZ
CD4	TT1	PE	1:500	DRFZ
CD4	TT1	Biotin	1:100	DRFZ
CD25	BC96	FITC	1:5	BioLegend
CD25	4E3	APC	1:10	Miltenyi Biotec
CD137	4B4-1	PE	1:15	BD Pharmingen
CD40L	5C8	APC	1:50	Miltenyi Biotec
Biotin	<i>Streptavidin</i>	PerCP	1:200	BD Pharmingen

Tabelle 2.5: Fluorochrom-konjugierte Antikörper und Peptide.

Intrazelluläre Färbung fixierter Zellen

Sind CD-Moleküle nur in geringer Konzentration an der Zelloberfläche nachweisbar, kann zur Verbesserung der Signalstärke bei fixierten Zellen eine intrazelluläre Färbung vorgenommen werden. Dazu wurden für die letzten 4 Stunden der Antigen-Stimulation 20 µg/ml Brefeldin A (*Fa. Sigma-Aldrich*) zugesetzt, das über eine Deassemblierung des Golgiapparates zu einer intrazellulären Akkumulation von Produkten der Proteinbiosynthese führt [72]. Dies betrifft auch die membranständigen Peptide, die somit nicht an die Zelloberfläche gelangen und nicht im Rahmen der Membran-Rezirkulation der Degradation zum Opfer fallen.

Um den Zugang der Färbe-Antikörper zum Zytosol zu ermöglichen, wurde der Pflanzengiftstoff Saponin (*Fa. Sigma-Aldrich*) eingesetzt, der über Interaktion mit den membranbildenden Phospholipiden für eine Permeabilisierung der Zellmembran sorgt.

Um während des Färbevorganges eine unspezifische Bindung der Färbe-Antikörper an die Fc-Rezeptoren einiger PBMC zu verhindern, wurde während der Inkubation gepooltes humanes Immunglobulin (Flebogamma, *Fa. Grifols*) zugesetzt. Die humanen Immunglobuline treten mit den Färbe-

Antikörpern in Konkurrenz um die Fc-Bindungsstellen und führen, im Überschuss hinzugegeben, zu deren Blockierung.

Bei der Messung einiger Blutproben wurde ein Biotin-gekoppelter Anti-CD4-Antikörper verwendet. Da Biotin selbst nicht photoaktiv ist, wurde in einem weiteren Färbeschritt PerCP-gekoppeltes Streptavidin zugesetzt. Die Bindung zwischen Streptavidin und Biotin zählt zu den stärksten bekannten nicht-kovalenten Bindungen, so dass die Kopplungssequenz Antikörper-Biotin-Streptavidin-PerCP funktionell einem PerCP-gekoppelten Antikörper entspricht.

Nach Ablauf der 6-stündigen Antigenstimulation wurden die in 200 μ l RPMI-Medium gelösten PMBC in 96-Loch-Rundbodenplatten bei 400 x g und 4°C herunterzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen zur Permeabilisierung und zur Blockierung des Fc-Rezeptors in 80 μ l 0,5%-igem Saponin-Puffer mit 5 mg/ml Flebogamma (*Fa. Grifols*) aufgenommen und 15 Minuten bei 4°C inkubiert.

Dann erfolgte die Zugabe der Farbe-Antikörper in PBS/BSA/Azid, in der Weise, dass bei 100 μ l Gesamtvolumen die oben genannten Endkonzentrationen erreicht wurden (siehe Tab. 2.5). Nach 15-minütiger Inkubation in Dunkelheit und bei 4°C wurden die PBMC mit 100 μ l Saponin-Puffer gewaschen. Für den Fall, dass ein Biotin-gekoppelter Antikörper verwandt wurde, erfolgte nach dem Herunterzentrifugieren eine weitere 15-minütige Inkubation mit Streptavidin-PerCP. Zum Abschluss wurden die gefärbten PBMC einmalig mit PBS/BSA/Azid gewaschen und in 200 μ l PBS/BSA/Azid für die Messung aufgenommen. Die Lagerung der Proben bis zur durchflusszytometrischen Analyse erfolgte auf Eis unter Lichtabschluss.

Extrazelluläre Färbung lebender Zellen

Zur Depletions-Kontrolle wurden lebende PBMC vor und nach der Depletion auf die Oberflächen-Expression von CD25 hin untersucht (siehe Kap. 2.5.3). Die Zellproben in 500 μ l PBS/BSA wurden in Polypropylen-Reaktionsgefäßen bei 400 x g und 4°C 8 Minuten herunterzentrifugiert und in einem Endvolumen von 200 μ l in PBS/BSA gefärbt. Die Inkubation mit Flebogamma und den Färbeantikörpern in den oben angegebenen Endkonzentrationen (siehe Tab. 2.5) erfolgte über 15 Minuten bei 4°C und in Dunkelheit. Nach

einmaligem Waschen mit PBS/BSA wurden die Zellen in 200 μ l PBS/BSA aufgenommen.

Durch Zugabe von Propidiumjodid (PJ) in einer Verdünnung von 1:100 kurz vor der durchflusszytometrischen Messung wurden tote Zellen von der Analyse ausgeschlossen. Die Proben wurden bis zur Messung dunkel und auf Eis gelagert.

2.8.4 Messung und Kompensation

Wie weiter oben bereits erwähnt, macht die Überschneidung der Emissionsspektren der verschiedenen Fluorochrome (siehe Abb. 2.2) und die daraus resultierende Interferenz der Messkanäle eine Kompensation nötig. Hierzu wurden je Färbeschema ein ungefärbter Ansatz sowie Einzelfärbungen mit jeweils einem Einzel-Fluorochrom hergestellt. Diese ermöglichen die interferenzfreie Eichung des FACS-Gerätes.

Für die Messung wurden die Proben in FACS-Röhrchen (*Fa. BD Bioscience*) überführt und über den Ansaugkanal des FACS-Gerätes der optischen Analyse zugeführt. Je Ansatz wurden im Mittel 250.000 PBMC aufgenommen, davon 50.000 T_H-Zellen.

2.8.5 Analyse und Gating

Die durchflusszytometrischen Daten wurden mit der ›Cellquest Research Software‹ (*Fa. Becton-Dickinson*) aufgenommen und gespeichert. Die weitere Auswertung erfolgte mit dem Programm ›Flowjo 7.2.5‹ (*Fa. Tree Star*). Die Daten wurden dazu in zweidimensionalen Koordinatensystemen als sog. ›DotPlots‹ dargestellt. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine einzelne Zelle mit ihrer jeweiligen Fluoreszenz-Intensität für die auf den Achsen abgetragenen Farbe-Antikörper. Die Achsskalierung für FSC und SSC erfolgt linear, jene für Fluorochrom-Emission logarithmisch. In mehrfarbigen DotPlots ist die Zelldichte im Koordinatensystem durch eine Fehlfarbenkodierung wiedergegeben.

Die sequenzielle Einschränkung der Analyse auf bestimmte PBMC-Subpopulationen wird als ›Gating‹ bezeichnet. Die Abbildung 2.3 zeigt die in dieser Arbeit verwendete Selektion der CD3⁺CD4⁺-T_H-Zellen. Zunächst wurde ein großzügiges Gate um die PBMC gelegt, um auch durch Aktivierung hyperplastische T-Zellen nicht von der Analyse auszuschließen. Der Sequenz weiter

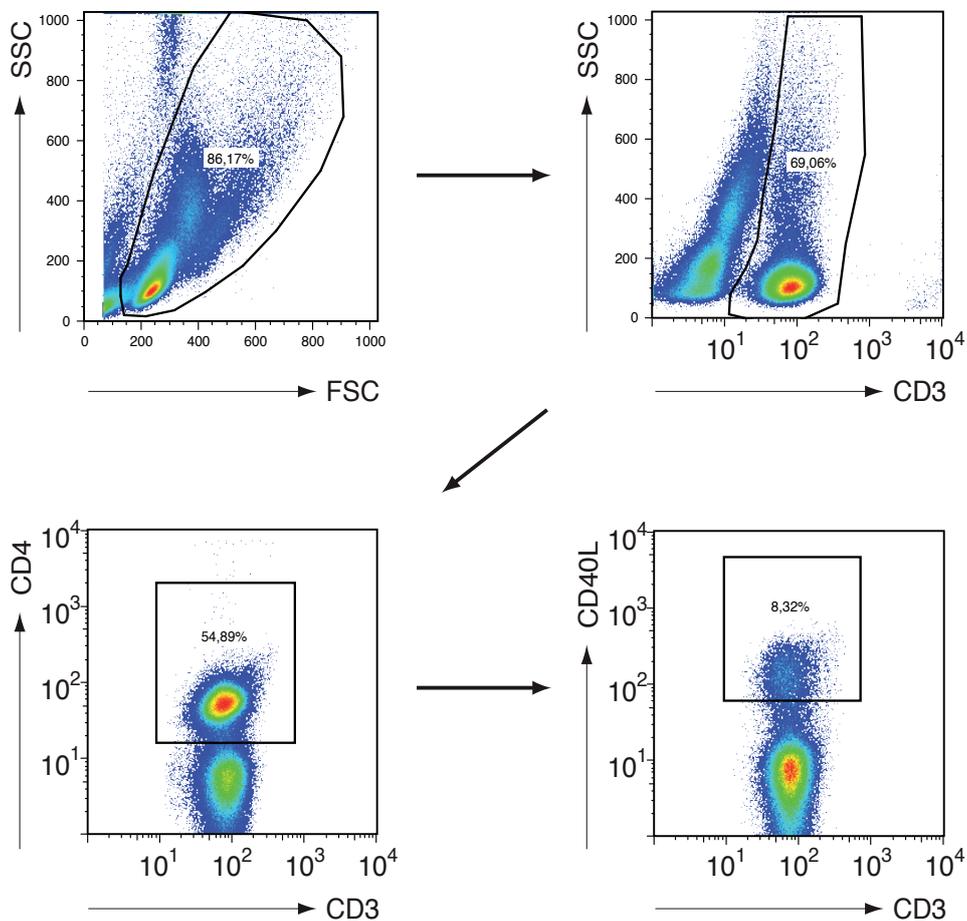


Abbildung 2.3: Gating. Sequenzielle Einschränkung der Analyse auf die T_H -Zell-Subpopulation. **Links oben)** ScatterPlot mit Gate auf PBMC. **Rechts oben)** Übertrag der PBMC aus dem vorangegangenen DotPlot mit Gate auf $CD3^+$ -Zellen. **Links unten)** $CD3^+$ -Zellen mit Gate auf $CD4^+$ -Zellen. **Rechts unten)** $CD3^+CD4^+$ - T_H -Zellen mit Anteil $CD40L^+$ -Zellen.

folgend wurde im Anschluss auf die $CD3^+$ -Zellen und dann auf die $CD4^+$ -Zellen gated. Die somit ausgewählten $CD3^+CD4^+$ - T_H -Zellen wurden auf die $CD40L$ -Expression untersucht werden. Die Prozentzahl in den DotPlots gibt jeweils den Anteil der im Gate befindlichen Zellen an.

2.9 Bestimmung des Antikörperstatus

Der Nachweis der Auto-Antikörper gegen SmD1 und Nukleosomen sowie von Anti-CMV-IgG und Anti-CMV-IgM erfolgte mittels eines ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Hierzu wird das nachzuweisende Antigen am Boden eines Reaktionsgefäßes immobilisiert und mit verdünntem Patientenserum überschichtet. Sind Antigen-spezifische Antikörper im Serum vorhanden, binden diese an das Antigen; die übrigen Antikörper werden durch mehrmaliges Waschen entfernt. Durch Zugabe eines Enzym-gekoppelten Antikörpers, der gegen das Fc-Fragment von humanem IgG/IgM gerichtet ist, können nun die spezifisch gebundenen Patientenantikörper markiert und im Zuge einer durch das Enzym katalysierten Farbreaktion quantitativ bestimmt werden. Die photometrische Messung des umgesetzten Farbstoffes ist dabei der Antikörperkonzentration im Patientenserum proportional.

Die Bestimmung der Anti-CMV-Antikörper wurde freundlicherweise durch das Virologische Institut der Charité (Leitung Virusdiagnostik: Herr PD Dr. Jörg Hofmann) vorgenommen. Verwendung fand ein kommerzieller ELISA-Test (*Fa. Medac-Diagnostika*).

Die Bestimmung der Autoantikörper gegen SmD1 und Nukleosomen erfolgte freundlicherweise durch das Rheumatologisch-immunologische Labor der Charité (Leitung: Herr Dr. Dr. Karl Egerer). Es wurden ebenfalls kommerzielle ELISA-Kits (*Fa. Imtec*) verwandt.

2.10 Bestimmung der Krankheitsaktivität

Die Bestimmung der Krankheitsaktivität erfolgte nach dem standardisierten SLEDAI-Score (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) [17]. Grundlage ist die Vergabe von gewichteten Punktwerten für das Vorliegen aktivitätsassoziiertes Symptome und pathologischer Laborparameter zum Zeitpunkt des Arztbesuches oder innerhalb der vergangenen 10 Tage. Für die Erfüllung eines Kriteriums werden je nach betreffendem Organsystem folgende Punktwerte vergeben: jeweils 8 Punkte für ZNS und Gefäßsystem, je 4 Punkte für renales und muskuloskeletales System, je 2 Punkte für Haut-/Schleimhaut- und immunologisches System sowie je 1 Punkt für den konstitutionellen und hämatologischen Status.

Der SLEDAI errechnet sich als Summe der vergebenen Punktwerte. Minimal können 0, maximal 105 Punkte erreicht werden, wobei Werte über 45 im klinischen Alltag praktisch nicht vorkommen. Werte zwischen 1 und 10 entsprechen leichter bzw. mäßiger Aktivität. SLEDAI-Werte > 10 entsprechen stärkerer Krankheitsaktivität. Ein dauerhaft erhöhter SLEDAI ist mit erhöhter Letalität assoziiert [73].

2.11 Statistische Auswertung

Die durchflusszytometrischen Daten wurden gemeinsam mit klinischen und paraklinischen Patientendaten in einer Datenbank gespeichert und je nach Bedarf für statistische Erhebungen ausgelesen. Für die Rechnung statistischer Testverfahren wurde das Programm »SPSS« (*Statistical Package for the Social Sciences*) in der Version 17.0 für Mac OS X (*Fa. SPSS*) verwendet.

Für die Testung auf Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde bei nicht gegebener Normalverteilung der Wilcoxon-Test angewandt. Zur Überprüfung statistischer Zusammenhänge zweier Merkmale (Covarianz-Testung) kamen je nach Datentyp der getesteten Variablen unterschiedliche Verfahren zur Anwendung. Auf lineare Zusammenhänge kontinuierlicher Variablen wurde nach Pearson getestet. Die Korrelation kontinuierlicher Daten mit kategorialen Daten erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test oder dem Kruskal-Wallis-Test. Kategorielle Variablen wurden untereinander mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson oder dem Fisher-Exakt-Test analysiert.

Dem Autor ist bewusst, dass die »statistische Teststärke« (sog. »Power«) der angewandten Methoden in einzelnen Testungen aufgrund der geringen Fallzahl begrenzt ist. Eine kritische Bewertung der Aussagekraft der angewandten Testverfahren findet sich im jeweiligen Kapitel ihrer Verwendung. Das Signifikanzniveau α wurde bei 5 % angenommen, so dass p-Werte $\leq 0,05$ als signifikant zu werten sind.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Etablierung der Methode

Aufgrund der zu erwartenden sehr niedrigen Frequenzen der Autoantigen-spezifischen T_H-Zellen wurde besonderer Wert auf ein möglichst sensitives und reliables Messverfahren gelegt.

Zur Erhöhung der Reliabilität der Messungen wurden bei der überwiegenden Mehrzahl der Proben 3 Ansätze je Stimulations-Antigen (Triplikate) mitgeführt und der Mittelwert errechnet. Die über alle Triplikate gemittelte relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) beträgt 0,25. Dies entspricht einer Standardabweichung von 25 % des jeweiligen Mittelwertes.

Je Ansatz wurden 250.000 PBMC und davon 50.000 T_H-Zellen aufgenommen, um auch sehr niedrige Zell-Frequenzen zuverlässig erfassen zu können.

3.1.1 Positivitätskriterien

Das CD40L-Gate wurde so eingestellt, dass sich für die unstimulierte Negativkontrolle (UNST) eine Hintergrund-Frequenz von 0,05 % CD40L⁺-T_H-Zellen ergibt. Um die Stimulation mit einem Antigen als positiv zu bewerten, ist demnach ein Überschreiten dieser Hintergrundaktivität nötig. Einige Proben, die diese Voraussetzung erfüllen, unterscheiden sich im optischen Aspekt ihrer CD40L-Antwort dennoch deutlich von den Positivkontrollen. Es ist zu beobachten, dass die Negativpopulation in das Gate hineinstrahlt, ohne dass eine klare Positivpopulation abgrenzbar ist.

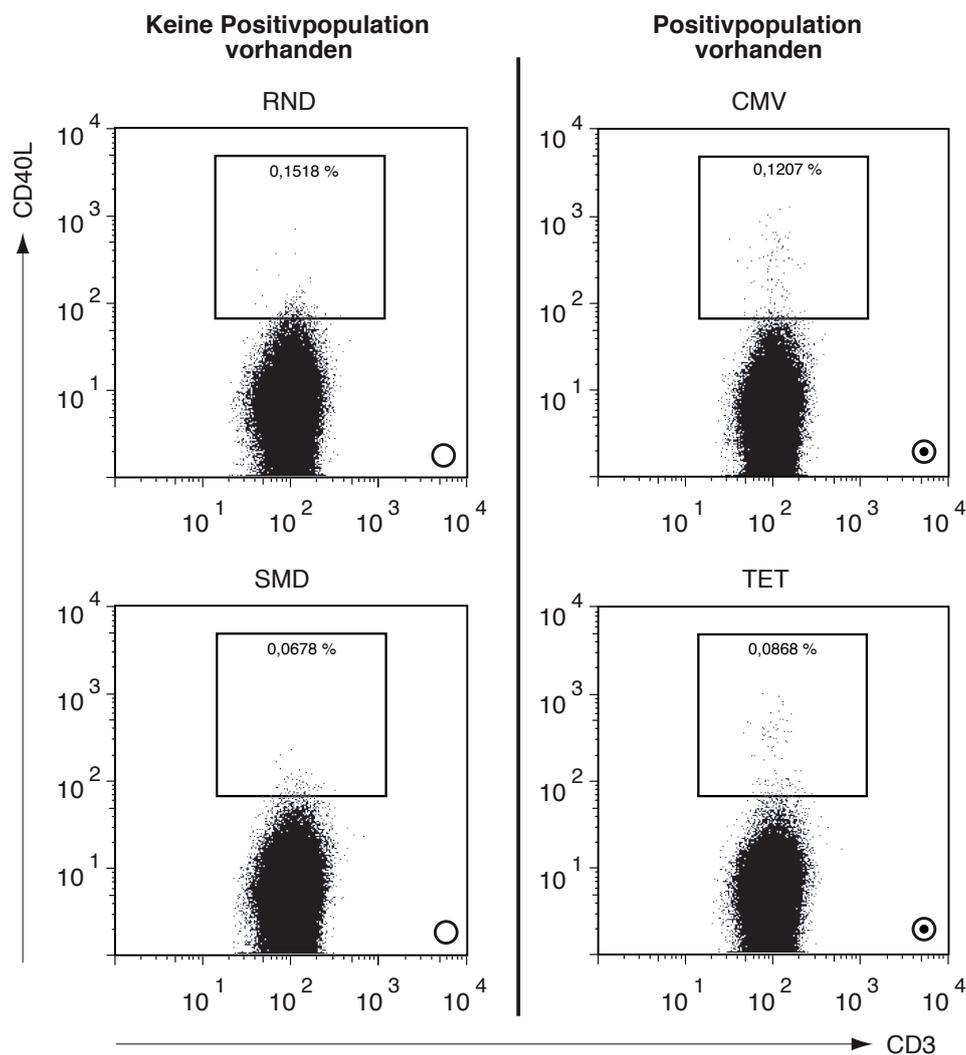


Abbildung 3.1: Bewertung der CD40L⁺-Population. Dargestellt ist Patient SLE#10. **Linke Spalte)** Die Stimulationen mit dem randomisierten Peptid (RND) und dem Smd1₈₃₋₁₁₉-Peptid (SMD) zeigen keine saubere Positivpopulation (Symbol: ○), obwohl RND den Grenzwertes von 0,07% überschreitet. **Rechte Spalte)** Klar abgrenzbare Positivpopulationen der Tetanus- und CMV-Stimulationen (Symbol: ⊙).

Um diesem Umstand in der statistischen Auswertung Rechnung zu tragen, wurde die Positiv-Bewertung einer Stimulation an die Erfüllung zweier Kriterien geknüpft: Kriterium 1) CD40L-Expression $\geq 0,07\%$. Der gewählte Grenzwert von 0,07% liegt 0,02% entsprechend 1.000 CD40L⁺-T_H-Zellen oberhalb des Kontrollniveaus. Kriterium 2) Deutlich erkennbare Positivpopulation im DotPlot. Zur Illustration dieser Vorgehensweise zeigt die Abbildung 3.1 beispielhaft die Bewertung der Populationen von SLE#10.

3.1.2 Mitgeführte Kontrollen

Zur Kontrolle der verwendeten Messmethode wurden je Probe mindestens eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Als obligatorische Kontrollen dienten unstimulierte Proben (UNST) sowie das Superantigen Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB). Zur weiteren Überprüfung einer zuverlässigen Erfassung von aktivierten T_H -Zellen wurden die infekts-assoziierten Antigene Cytomegalievirus-Peptid pp65 (CMV) und Tetanus-Toxoid (TET) verwendet. Die Abbildungen 3.2 und 3.3 zeigen eine Probenauswahl.

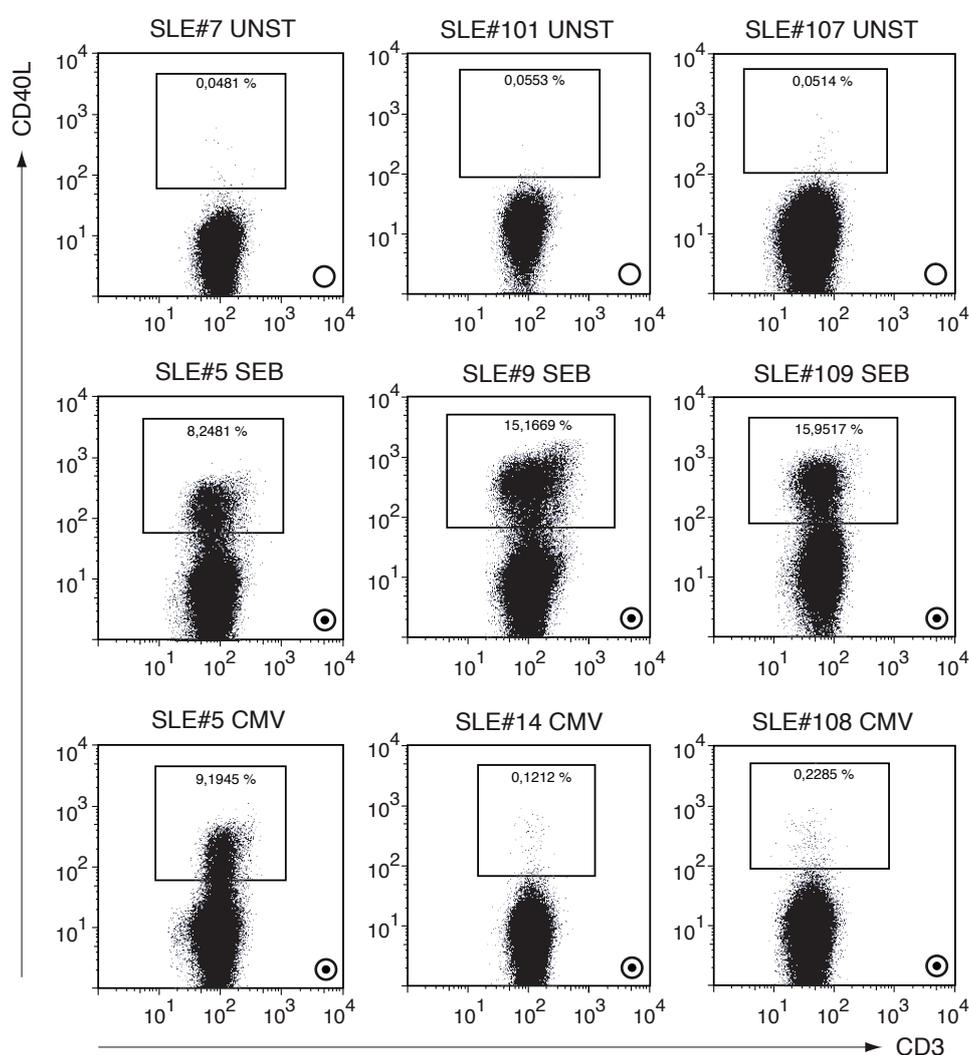


Abbildung 3.2: Kontrollstimulationen 1. Dargestellt ist eine Probenauswahl. Prozentzahlen bezeichnen den Anteil der $CD40L^+$ - T_H -Zellen.

⊙ Positivpopulation vorhanden. ○ Keine Positivpopulation vorhanden.

Unstimulierte Proben (UNST)

Zur Ermittlung der Hintergrundaktivierung der T_H-Zellen wurden die Ansätze der Negativkontrolle ohne Zusatz eines Antigens für 6 Stunden inkubiert. Das CD40L-Gate wurde auf einen Wert von 0,05 % CD40L⁺-T_H-Zellen eingestellt und auf alle übrigen Ansätze übertragen. Dies ermöglichte eine optimale Trennung der Positiv- und Negativpopulation in Bezug auf Sensitivität und Spezifität.

Im Median ergibt sich für die unstimulierten Proben eine CD40L-Expression von 0,0428 %. Der Mittelwert beträgt 0,0429 %, die Standardabweichung 0,0062 % (entsprechend 14,5 % vom Mittelwert). Alle nachfolgend beschriebenen Stimulationsergebnisse wurden zur Negativkontrolle in Bezug gesetzt.

Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)

Als standardmäßige Positivkontrolle wurde Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) verwandt, welches als Superantigen über eine Quervernetzung von MHC-II-Rezeptor und T-Zell-Rezeptor (TCR) eine direkte antigenunabhängige T-Zell-Aktivierung bewirkt. Diese Aktivierung ist auf T_H-Zellen beschränkt, deren TCR eine V β -Kette vom Typ 3, 12 oder 17 aufweist [74].

Die Stimulation mit SEB wurde mit einer starken medianen CD40L-Expression von 8,5991 % beantwortet, die deutlich (+ 8,5563 %) oberhalb des unstimulierten Hintergrundniveaus liegt ($p < 0,001$).

Cytomegalievirus-Peptid pp65 (CMV)

Das in Cytomegalievirus-infizierten Zellen exprimierte Protein pp65 konnte als Träger eines der Haupt-T_H-Zell-Epitope des Virus identifiziert werden [75]. Es findet breite Anwendung bei der CMV-spezifischen *in vitro*-Stimulation.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine mediane CD40L-Expression von 0,1109 %, die mit einer Differenz von + 0,0681 % signifikant oberhalb jener der Negativkontrollen liegt ($p < 0,001$). Anhand der o.g. Positivitätskriterien (siehe Kap. 3.1.1) lässt sich bei 22 von 34 Proben (64,7 %) eine positive CD40L-Antwort feststellen.

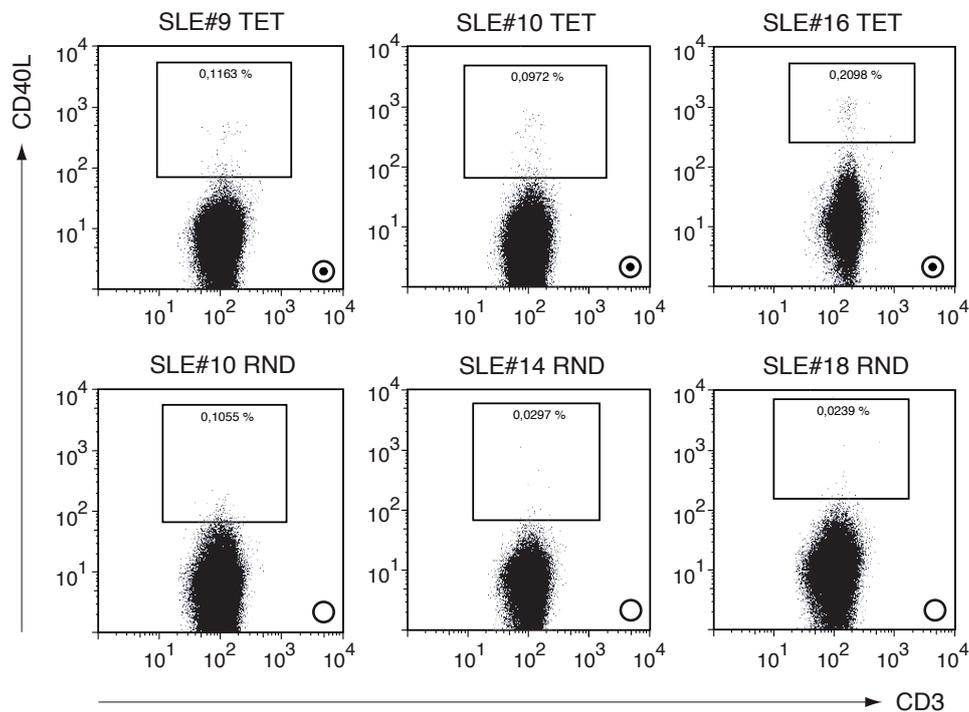


Abbildung 3.3: Kontrollstimulationen 2. Dargestellt ist eine Probenauswahl. Prozentzahlen bezeichnen den Anteil der $CD40L^+$ - T_H -Zellen.

● Positivpopulation vorhanden. ○ Keine Positivpopulation vorhanden.

Tetanus-Toxoid (TET)

Das in Impfstoffen verwendete Tetanus-Toxoid₈₃₀ stellt als Träger des dominanten T_H -Zell-Epitops ein klassisches Recall-Antigen dar. Durch *in vitro*-Stimulation von PBMC lässt sich eine Tetanus-spezifische T_H -Zell-Antwort initiieren, die sich durch eine Auffrischungsimpfung noch wirksam steigern lässt [76, 77].

Die Stimulation mit TET führte zu einer medianen CD40L-Expression von 0,0626 %. Die Differenz zur Negativkontrolle von + 0,0198 % ist signifikant ($p < 0,001$). 8 von 25 Proben (32 %) wurden als positiv im Sinne von Kap. 3.1.1 gewertet.

Randomisiertes Peptid (RND)

Als zusätzliche Kontrolle für die Stimulation mit dem Smd1₈₃₋₁₁₉-Peptid (SMD) wurde das randomisierte RND-Peptid mitgeführt. Es besitzt die gleiche Länge und beinhaltet die gleichen Aminosäuren wie SMD – allerdings

in zufälliger Reihenfolge. Anhand der RND-Antwort lässt sich überprüfen, ob die positive SMD-Antwort eines Patienten tatsächlich auf eine Epitop-spezifische Aktivierung zurückgeht oder ob ein Peptid gleicher Länge und Zusammensetzung ebenfalls eine – dann als unspezifisch zu wertende – Reaktion hervorruft.

Im Median erbrachte die Stimulation mit RND eine CD40L-Expression von 0,0354%. Ein Unterschied zu den unstimulierten Negativkontrollen war nicht feststellbar ($p=0,629$). 5 von 30 Proben (16,7%) zeigen eine CD40L-Expression oberhalb 0,07% (Kriterium 1), jedoch keine Positivpopulation (vgl. Kap. 3.1.1 und Abb. 3.1). Somit wurde keine Probe als positiv bewertet.

3.1.3 Probenausschluss

Im Rahmen der Laborarbeit wurde es nötig, einzelne Proben aus unterschiedlichen Gründen von der weiteren Auswertung auszuschließen:

SLE#6: Fehlerhafte Färbung mit Anti-CD4-PE und Anti-CD40L-PE.

SLE#28: Positiver Anti-HCV-Titer. Um einer Kontamination der offenen Messanlagen innerhalb des DRFZ vorzubeugen, wurde auf die Analyse verzichtet. Im Sinne der Laborsicherheit wurde die Probe verworfen.

SLE#103 und SLE#104: 24-stündige Lagerung der PBMC bei 4°C nach der CD25-Depletion. Für die Stimulation am Folgetag wurde ein RPMI-Medium mit dem Zusatz von BSA und fetalem Kälberserum (FCS) verwendet. In der Folge ergab sich eine unspezifische Aktivierung der T_H-Zellen in den unstimulierten Kontrollansätzen (siehe Abb. 3.4). Als Konsequenz wurde auf die Verwendung von FCS verzichtet. Alle übrigen Proben wurden innerhalb eines Tages verarbeitet.

SLE#111: Versehentliche 2-stündige Lagerung des heparinisierten Vollbluts bei 4°C direkt nach der Abnahme. Wegen der Aggregation der Blutzellen unter Kühlung standen diese nicht mehr für eine Isolierung der PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation zur Verfügung.

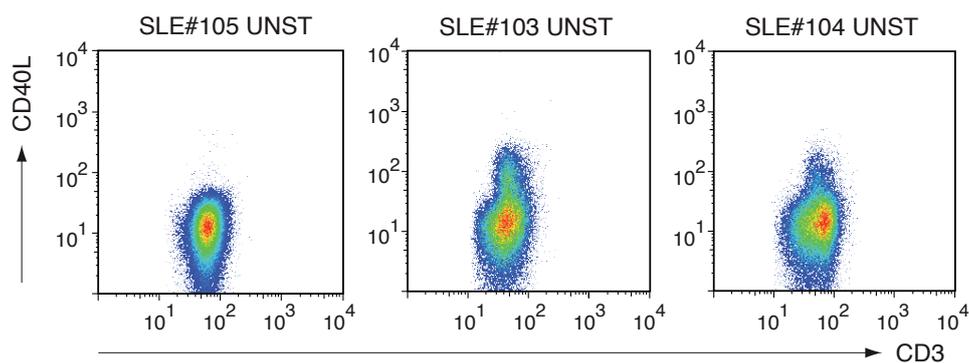


Abbildung 3.4: Artificielle T_H-Aktivierung. SLE#103 und SLE#104 zeigen durch den Medienzusatz FCS und 24-stündige Lagerung bei 4°C eine artificielle T_H-Aktivierung in den unstimulierten Ansätzen (UNST). Zum Vergleich der saubere unstimulierte Kontrollansatz von SLE#105.

3.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Insgesamt wurden 46 Blutproben für die Studie akquiriert. Davon mussten 5 nachträglich von der Auswertung ausgeschlossen werden (siehe Kap. 3.1.3). Die verbleibenden 41 Proben beinhalten 3 Verlaufsbestimmungen an bereits zuvor eingeschlossenen Patienten, so dass insgesamt 38 Patienten untersucht wurden.

Die Tabelle 3.1 zeigt eine nähere Charakterisierung des Patientenkollektivs. War von einem Patienten eine Verlaufsbestimmung vorhanden, wurde jene Probe zum Zeitpunkt der höheren Krankheitsaktivität berücksichtigt.

SLE-Patienten	n = 38		
Geschlecht	weiblich	32	(84,2 %)
	männlich	6	(15,8 %)
Alter in Jahren	Mittelwert	42	(23–76)
behandelnde Einrichtung	Bettenstation	13	(34,2 %)
	Poliklinik	25	(65,8 %)
Krankheitsaktivität	SLEDAI Mittelwert	5	(0–20)
Krankheitsdauer in Jahren	Mittelwert	11	(0–26)
Organbeteiligung	Niere	15	(39,5 %)
	Lunge	8	(21,1 %)
	ZNS	8	(21,1 %)
	Herz	3	(7,9 %)
Antikörperstatus (n = 37)	Anti-SmD1	6	(16,2 %)
	Anti-Nukleosomen	25	(67,6 %)
	Anti-CMV-IgG	24	(64,9 %)
	Anti-CMV-IgM	7	(18,9 %)
Medikation (teilweise Mehrfachmedikation)	keine Immunsuppressiva	1	(2,6 %)
	Glukokortikoide	36	(94,7 %)
	Hydroxychloroquin	14	(36,8 %)
	Mycophenolat Mofetil	11	(28,9 %)
	Azathioprin	11	(28,9 %)
	Cyclophosphamid	5	(13,2 %)
	Ciclosporin A	1	(2,6 %)
	Methotrexat	1	(2,6 %)
Leflunomid	1	(2,6 %)	

Tabelle 3.1: Charakterisierung des Patientenkollektivs.

3.3 Autoaggressive T_H-Antwort

Zur Erfassung einer SLE-Autoantigen-spezifischen T_H-Zell-Aktivierung wurde eine Stimulation mit dem SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid (SMD) und zwei unterschiedlichen Nukleosomen-Aufbereitungen durchgeführt.

3.3.1 SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid (SMD)

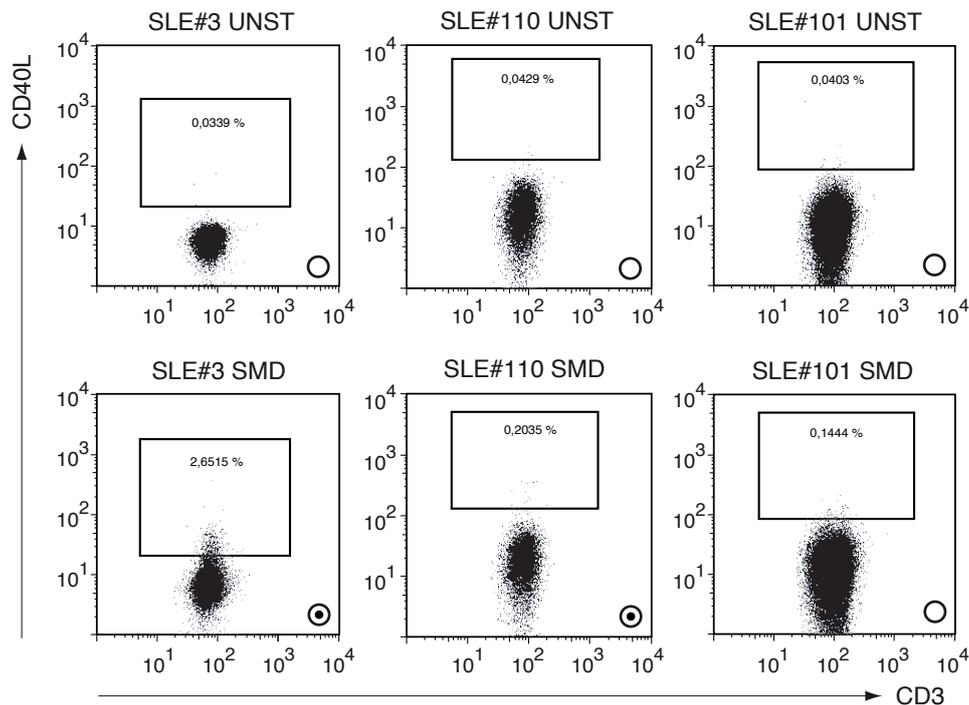


Abbildung 3.5: Ergebnis der Stimulation mit dem SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid.
Dargestellt ist eine Probenauswahl. Jeweilige Negativkontrolle (UNST) zum Vergleich. Prozentzahlen bezeichnen den Anteil der CD40L⁺-T_H-Zellen.
⊙ Positivpopulation vorhanden. ○ Keine Positivpopulation vorhanden.

Die Stimulation mit SMD führte zu einer medianen CD40L-Antwort von 0,0372%. Dies liegt knapp unterhalb der unstimulierten Negativkontrollen (-0,0056%), zu denen kein signifikanter Unterschied besteht ($p=0,600$).

4 von 41 SMD-Proben (9,8%) zeigen eine CD40L-Expression oberhalb von 0,07%, wobei die Bewertung der Positivpopulationen sich schwierig gestaltet. Die positiven Zellen im DotPlot imponieren eher als Schweif der CD40L⁻-Zellen, denn als eigenständige Population. Bei 2 Proben (4,9%) wurde die Antwort dennoch aufgrund ihres klaren morphologischen Unter-

schiedes zu den unstimulierten Ansätzen als positiv gewertet. Die Abbildung 3.5 zeigt die positiv gewerteten Proben SLE#3 und SLE#110, sowie die negativ gewertete Probe SLE#101.

3.3.2 Nukleosomen (NUC)

In der vorliegenden Arbeit kamen zwei verschiedene Nukleosomen-Aufbereitungen für die Stimulationsansätze zur Anwendung. Die aus Hühnerembryonen extrahierten chicken-Nukleosomen (cNUC) wurden von Bruns et al. erstmals zur T-Zell-Stimulation bei SLE-Patienten verwandt [69].

Die humanen Nukleosomen (hNUC) wurden mittels eines von Morales et al. beschriebenen Extraktionsverfahrens aus humanen immortalisierten Cervix-Carcinom-Zellen (HeLa-Zellen) gewonnen [70].

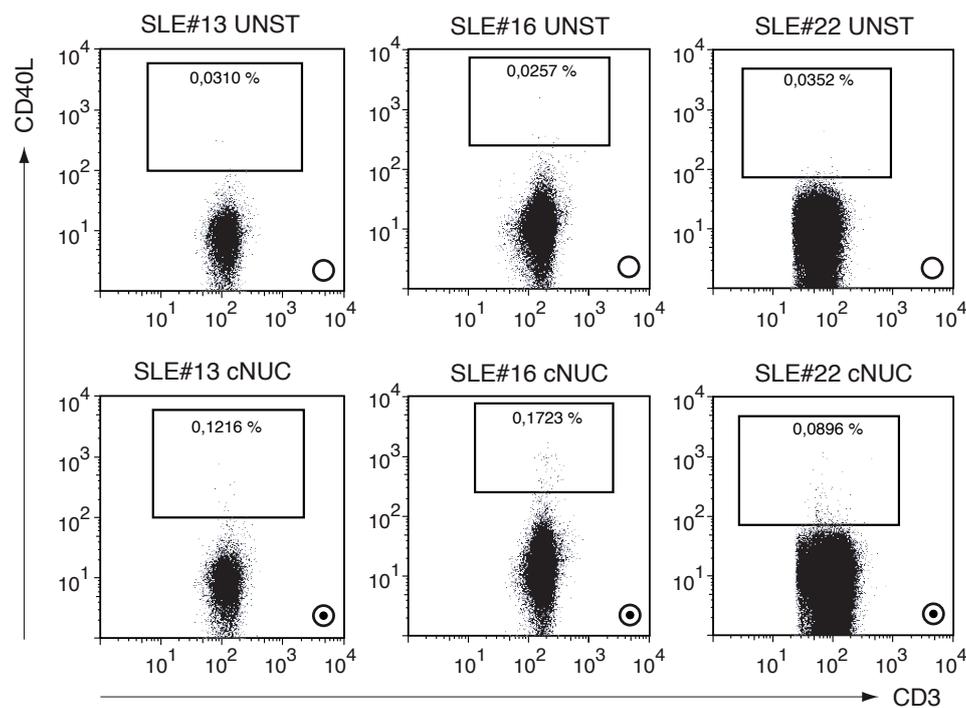


Abbildung 3.6: Ergebnis der Stimulation mit chicken-Nukleosomen (cNUC). Dargestellt ist eine Probenauswahl. Jeweilige Negativkontrolle (UNST) zum Vergleich. Prozentzahlen bezeichnen den Anteil der CD40L⁺-T_H-Zellen.
 ⊙ Positivpopulation vorhanden. ○ Keine Positivpopulation vorhanden.

chicken-Nukleosomen (cNUC)

Die Stimulation der PBMC mit cNUC wurde mit einer medianen CD40L-Expression von 0,0561 % beantwortet. Dies liegt mit + 0,0133 % signifikant oberhalb der Negativkontrollen ($p=0,036$).

6 von 19 Proben (31,6 %) wurden als positiv i. S. von Kapitel 3.1.1 bewertet. Im Vergleich mit den SMD-Antworten erscheinen die Positivpopulationen nach cNUC-Stimulation klarer abgrenzbar (vgl. Abb. 3.5 und 3.6).

Humane Nukleosomen (hNUC)

Mit 0,0178 % liegt die CD40L-Expression bei Stimulation mit hNUC im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich niedriger ($-0,0250 %$). Diese verminderte Antwort gegenüber UNST ist mit einem p-Wert von 0,012 signifikant.

Keine der 8 Proben zeigte eine CD40L-Expression $\geq 0,07 %$ oder eine Positivpopulation. Die Abbildung 3.7 zeigt eine Gegenüberstellung von UNST und hNUC ausgewählter Proben.

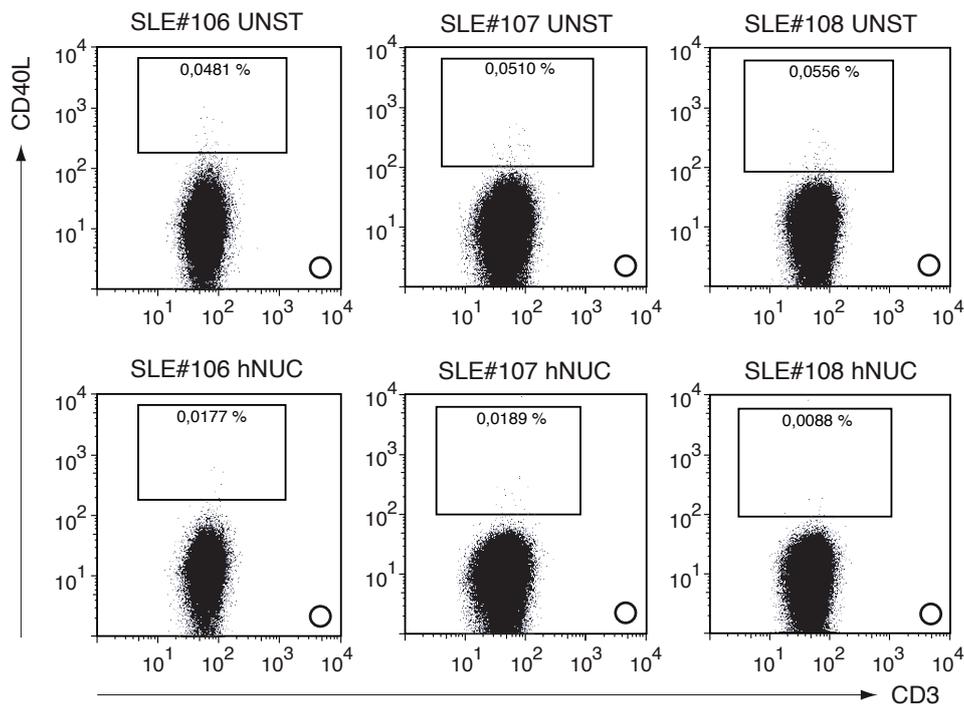


Abbildung 3.7: Ergebnis der Stimulation mit humanen Nukleosomen (hNUC). Dargestellt ist eine Probenauswahl. Jeweilige Negativkontrolle (UNST) zum Vergleich. Prozentzahlen bezeichnen den Anteil der $CD40L^+$ - T_H -Zellen.

● Positivpopulation vorhanden. ○ Keine Positivpopulation vorhanden.

3.3.3 Ergebnisübersicht

Die Tabelle 3.2 gibt einen Überblick über die CD40L-Expression der T_H-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit den aufgeführten Antigenen. Die unterschiedliche Probenanzahl (n) je Antigen ergibt sich daraus, dass zur Sicherstellung der Stimulations-Zelldichte von 1–2 x 10⁶/ml bei einigen Proben auf die Stimulation mit einzelnen Antigenen verzichtet werden musste. Die unstimulierte Negativkontrolle (UNST), das Superantigen Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) und das SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid (SMD) wurden bei allen 41 Proben mitgeführt.

Eine gegenüber den Negativkontrollen signifikant erhöhte CD40L-Expression ergibt sich für die Stimulation mit SEB, dem Cytomegalieviruspp65-Peptidmix (CMV), dem Tetanus-Toxoid (TET) und den Hühner-Nukleosomen (cNUC). Die Stimulation mit humanen Nukleosomen (hNUC) führte interessanterweise zu einer signifikant verringerten CD40L-Antwort (p=0,012).

Kein Unterschied zu den unstimulierten Proben ließ sich für das SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid (SMD) (p=0,600) und das randomisierte Peptid (RND) (p=0,629) nachweisen.

Antigen (n)	CD40L-Expression [†]	ΔUNST [‡]	p-Wert
UNST (41)	0,0428 %	—	—
SEB (41)	8,5991 %	+ 8,5563 %	<0,001*
CMV (34)	0,1109 %	+ 0,0681 %	<0,001*
TET (25)	0,0626 %	+ 0,0198 %	<0,001*
cNUC (19)	0,0561 %	+ 0,0133 %	0,036*
hNUC (8)	0,0178 %	– 0,0250 %	0,012*
SMD (41)	0,0372 %	– 0,0056 %	0,600
RND (30)	0,0354 %	– 0,0074 %	0,629

Tabelle 3.2: CD40L-Expression der T_H-Zellen nach Antigenstimulation.

[†] Median der CD40L-Expression nach Antigenstimulation.

[‡] Differenz zur unstimulierten Negativkontrolle.

* Signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (Wilcoxon-Test).

Eine grafische Übersicht aller gemessenen Proben als Streudiagramm bietet die Abbildung 3.8. Das Überschreiten des Grenzwertes 0,07 % lässt sich an der Punktlage ober- bzw. unterhalb der gestrichelten Linie erkennen. Markierte Punkte symbolisieren das Vorhandensein einer Positivpopulation.

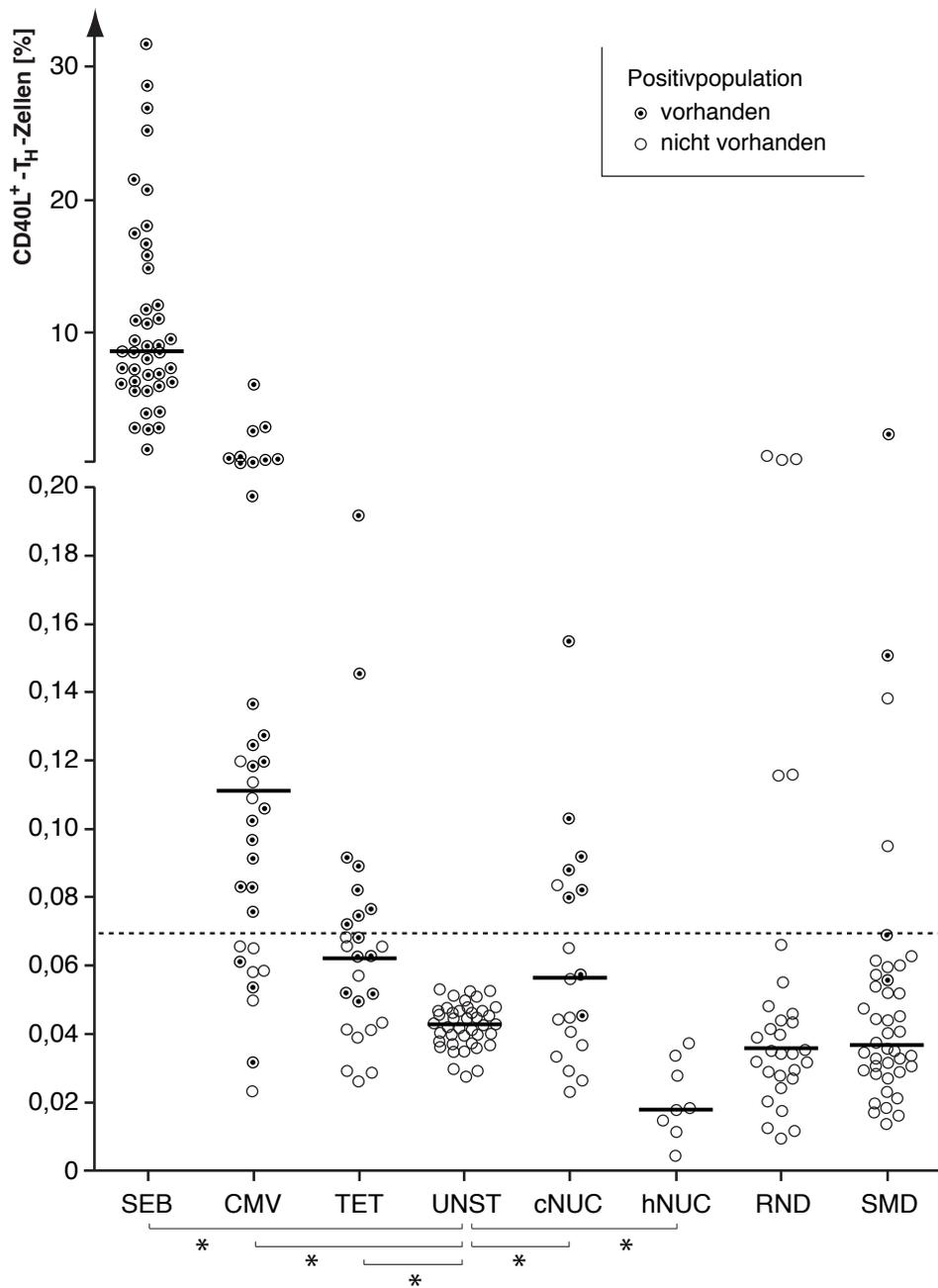


Abbildung 3.8: CD40L-Expression der T_H-Zellen nach Antigenstimulation.
 Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD40L⁺-T_H-Zellen nach Stimulation mit den aufgeführten Antigenen. Horizontale durchgezogene Linien bezeichnen den Median. Die horizontale gepunktete Linie bezeichnet den Grenzwert bei 0,07 % (Kriterium 1).
 ⊙ Positivpopulation vorhanden (Kriterium 2).
 * Signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (Wilcoxon-Test).

Durch die Anwendung der oben erläuterten Positivitätskriterien (siehe Kap. 3.1.1) ergeben sich für die verwendeten Antigene die in Tabelle 3.3 dargestellten Frequenzen.

Antigen	Krit.1†	Krit.2 ⊙	Krit.1+Krit.2‡
UNST	0/41 (0,0%)	0/41 (0,0%)	0/41 (0,0%)
SEB	41/41 (100,0%)	41/41 (100,0%)	41/41 (100,0%)
CMV	25/34 (73,5%)	25/34 (73,5%)	22/34 (64,7%)
TET	8/25 (32,0%)	14/25 (56,0%)	8/25 (32,0%)
cNUC	7/19 (36,8%)	8/19 (42,1%)	6/19 (31,6%)
hNUC	0/8 (0,0%)	0/8 (0,0%)	0/8 (0,0%)
SMD	4/41 (9,8%)	4/41 (9,8%)	2/41 (4,9%)
RND	5/30 (16,7%)	0/30 (0,0%)	0/30 (0,0%)

Tabelle 3.3: Kriterien und Frequenzen der CD40L-Positivität. Dargestellt ist die Erfüllung der Kriterien in absoluten Zahlen und als prozentualer Anteil.

† Kriterium 1: CD40L-Expression $\geq 0,07\%$.

⊙ Kriterium 2: Vorhandene Positivpopulation.

‡ Logische UND-Verknüpfung beider Kriterien.

3.3.4 Verlaufsbestimmungen

Bei 3 Patienten wurde eine Verlaufsbestimmung durchgeführt. Die Abnahme der Blutprobe erfolgte zu zwei Zeitpunkten unterschiedlicher Krankheitsaktivität, mit dem Ziel, die intraindividuelle Dynamik der Parameter einschätzen zu können. Die Tabelle 3.4 zeigt eine Übersicht.

Patient		Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2
SLE#5	SLEDAI	8	11
SLE#5	Anti-SmD1 [U/ml]	12	12
SLE#5	Anti-Nukleosomen [U/ml]	43	60
SLE#5	SEB-Antwort†	7,8762 %	2,7910 %
SLE#5	SMD-Antwort†	0,0158 %	0,0452 %
SLE#17	SLEDAI	0	6
SLE#17	Anti-SmD1 [U/ml]	10	11
SLE#17	Anti-Nukleosomen [U/ml]	113	183
SLE#17	SEB-Antwort†	26,8976 %	10,6666 %
SLE#17	SMD-Antwort†	0,0269 %	0,0210 %
SLE#18	SLEDAI	6	10
SLE#18	Anti-SmD1 [U/ml]	7	70
SLE#18	Anti-Nukleosomen [U/ml]	8	200
SLE#18	SEB-Antwort†	6,1204 %	7,1947 %
SLE#18	SMD-Antwort†	0,0944 %	0,0287 %

Tabelle 3.4: Verlaufsbestimmungen

† Bezeichnet Anteil der $CD40L^+$ - T_H -Zellen nach Antigenstimulation.

Bei den Patienten SLE#5 und SLE#17 zeigt sich eine deutliche Abnahme der SEB-Antwort bei erhöhter Krankheitsaktivität, bei SLE#18 steigt sie hingegen leicht an. Die SMD-Antwort steigt bei SLE#5 mit steigendem SLEDAI, bei SLE#17 und SLE#18 nimmt sie hingegen einmal leicht, einmal deutlich ab. Die Auto-Antikörper-Titer korrelieren besser mit der Krankheitsaktivität, wobei der Anti-Nukleosomen-Antikörper-Titer den SLEDAI besser widerspiegelt als der Anti-SmD1-Titer.

3.4 Einfluss der regulatorischen T-Zellen

Zur Kontrolle des möglichen Einflusses der CD25⁺-T_{reg}-Zellen auf die T_H-Zell-Aktivierung wurden insgesamt 11 Proben auf zwei separate Arme aufgeteilt und in diesen weiterverarbeitet. In einem Arm fand die Depletion der CD25⁺-Zellen statt, im anderen blieben die PBMC ohne Modifikation.

Die Tabelle 3.5 und die Abbildung 3.9 zeigen eine Gegenüberstellung der antigenspezifischen CD40L-Expression ohne und nach stattgehabter CD25-Depletion. Für die Stimulation mit UNST und hNUC ergibt sich nur ein geringer, nicht signifikanter Unterschied zwischen den beiden Armen. Für die Positivkontrolle mit SEB ließ sich hingegen eine signifikante 23,1 %-ige Reduktion der CD40L-Expression durch die CD25-Depletion nachweisen (p=0,016).

Die stärkste relative Änderung zeigte sich bei den SMD-stimulierten Ansätzen. Durch die CD25-Depletion ließ sich die CD40L-Expression um 46,6 % steigern (p=0,050). Die SMD-Expression oberhalb des Kontrollniveaus ließ sich von 0,0090 % auf 0,0336 % um 370 % steigern.

Für die CMV-Antwort zeigte sich ebenfalls eine, wenn auch geringer ausgeprägte Steigerung der CD40L-Antwort um 24,9 % durch die CD25-Depletion. Dieser Effekt war jedoch bei der kleinen getesteten Probenzahl (n=3) nicht signifikant (p=0,593).

CD25-Depletion	Antigen (n)	CD40L-Expression†	ΔUNST‡	p-Wert
ohne	UNST (11)	0,0481 %	–	–
ohne	SEB (11)	12,0772 %	+ 12,0291 %	0,003*
ohne	hNUC (8)	0,0178 %	– 0,0303 %	0,012*
ohne	SMD (11)	0,0571 %	+ 0,0090 %	0,248
ohne	CMV (4)	0,0919 %	+ 0,0438 %	0,068
nach	UNST (11)	0,0501 %	–	–
nach	SEB (11)	9,2844 %	+ 9,2343 %	0,003*
nach	hNUC (8)	0,0160 %	– 0,0342 %	0,018*
nach	SMD (11)	0,0837 %	+ 0,0336 %	0,026*
nach	CMV (3)	0,1148 %	+ 0,0647 %	0,109

Tabelle 3.5: Einfluss der CD25-Depletion.

† Median der CD40L-Expression der T_H-Zellen nach Antigenstimulation.

‡ Differenz zur unstimulierten Negativkontrolle.

* Signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (Wilcoxon-Test).

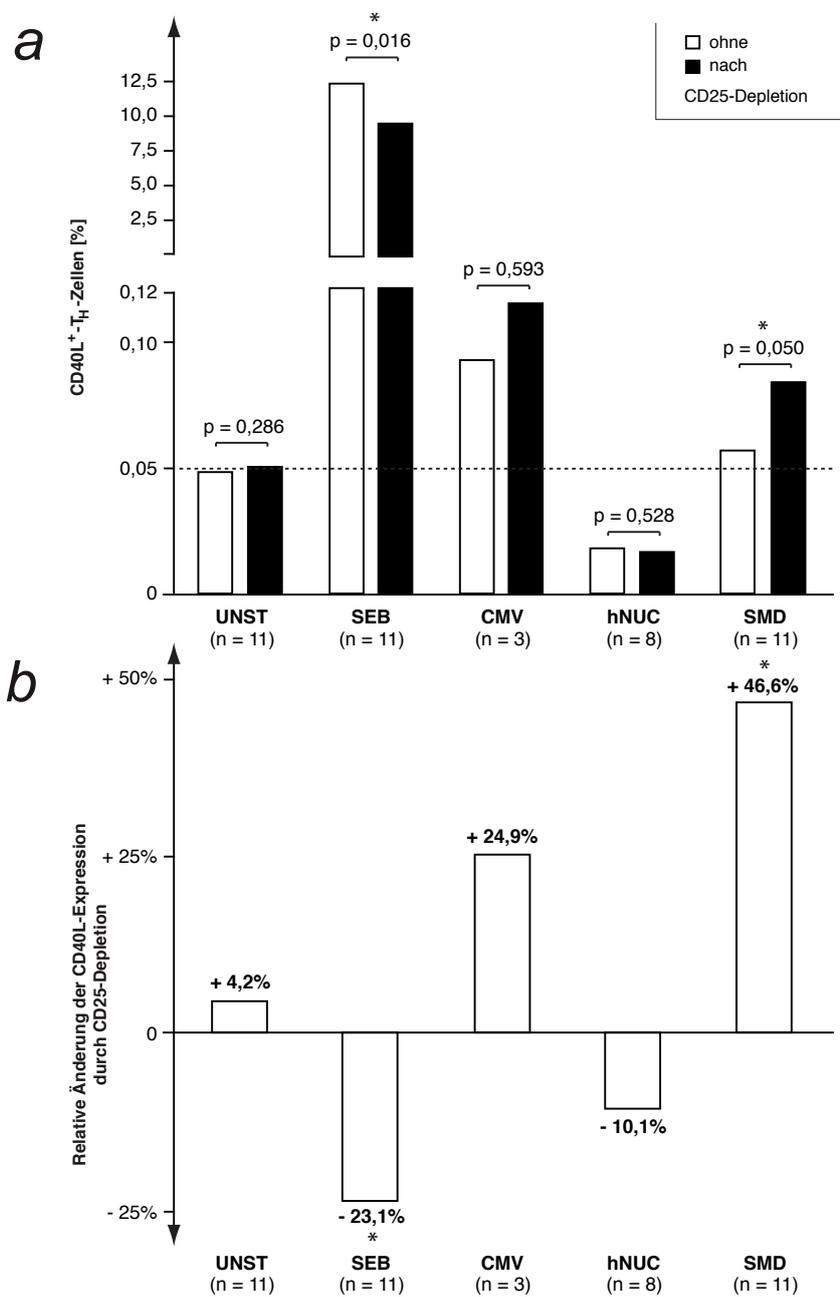


Abbildung 3.9: Einfluss der CD25-Depletion.

(a) Gegenübergestellt ist die antigenspezifische Aktivierung der T_H-Zellen in Anwesenheit und nach Depletion der CD25⁺-T_{reg}-Zellen. Angegeben ist der Median. Die horizontale gepunktete Linie bezeichnet das Niveau der unstimulierten Negativkontrollen bei 0,05 %.

(b) Relative Änderung der CD40L-Expression durch CD25-Depletion.

* Signifikanter Unterschied (Wilcoxon-Test).

3.4.1 Demaskierung der SMD₁₈₃₋₁₁₉-Reaktivität

Vor der Depletion bestand bei den 11 untersuchten Proben kein signifikanter Unterschied zwischen der SMD-Antwort und den unstimulierten Negativkontrollen ($p=0,248$). Nach der CD25-Depletion war hingegen eine signifikant oberhalb des Kontrollniveaus liegende SMD-Antwort nachweisbar ($p=0,026$) (siehe Abb. 3.10 b). Die erreichte Steigerung der SMD-Antwort um 46,6 % war mit $p=0,050$ ebenfalls signifikant (siehe Abb. 3.9).

Besonders prägnant ist der Effekt der CD25-Depletion bei der Probe SLE#108. Hier steigt die mittlere SMD-Antwort von 0,0571 % ohne Depletion auf 0,5159 % nach Depletion an. Dies entspricht einer Steigerung um 900 %. Der Unterschied ist über die jeweils 3 mitgeführten Ansätze konsistent. Die Abbildung 3.10 a zeigt hierzu zwei exemplarische DotPlots. In diesem Zusammenhang interessant war, dass die Patientin SLE#108 in dieser Gruppe zudem die höchste Krankheitsaktivität mit einem SELDAI von 12 aufwies.

Weiterhin ist festzustellen, dass ohne Depletion 2/11 (18,2 %) Patienten eine CD40L-Expression $\geq 0,07$ % zeigen (Kriterium 1), nach der CD25-Depletion sind es mit 7/11 (63,6 %) deutlich mehr (siehe Abb. 3.10 c).

Die in der vorliegenden Arbeit bereits weiter oben angewandte Bewertung der Positivpopulationen gestaltet sich bei den Ergebnissen der CD25-Depletion schwierig. Wie im Vergleich von demaskierter SMD-Antwort (Abb. 3.10 a) mit der infektiösen CMV-Antwort (Abb. 3.2) ersichtlich, unterscheidet sich die Morphologie der CD40L⁺-Populationen deutlich voneinander. Die CMV-Antwort beinhaltet auch T_H-Zellen mit starker CD40L-Expression und entspricht vom Aspekt eher einer abgeschwächten Variante der SEB-Antwort. Die SMD-Antwort ist dagegen durch ein Überwiegen schwach CD40L-positiver Zellen gekennzeichnet, die aus der Negativpopulation in das Gate hineinstrahlen.

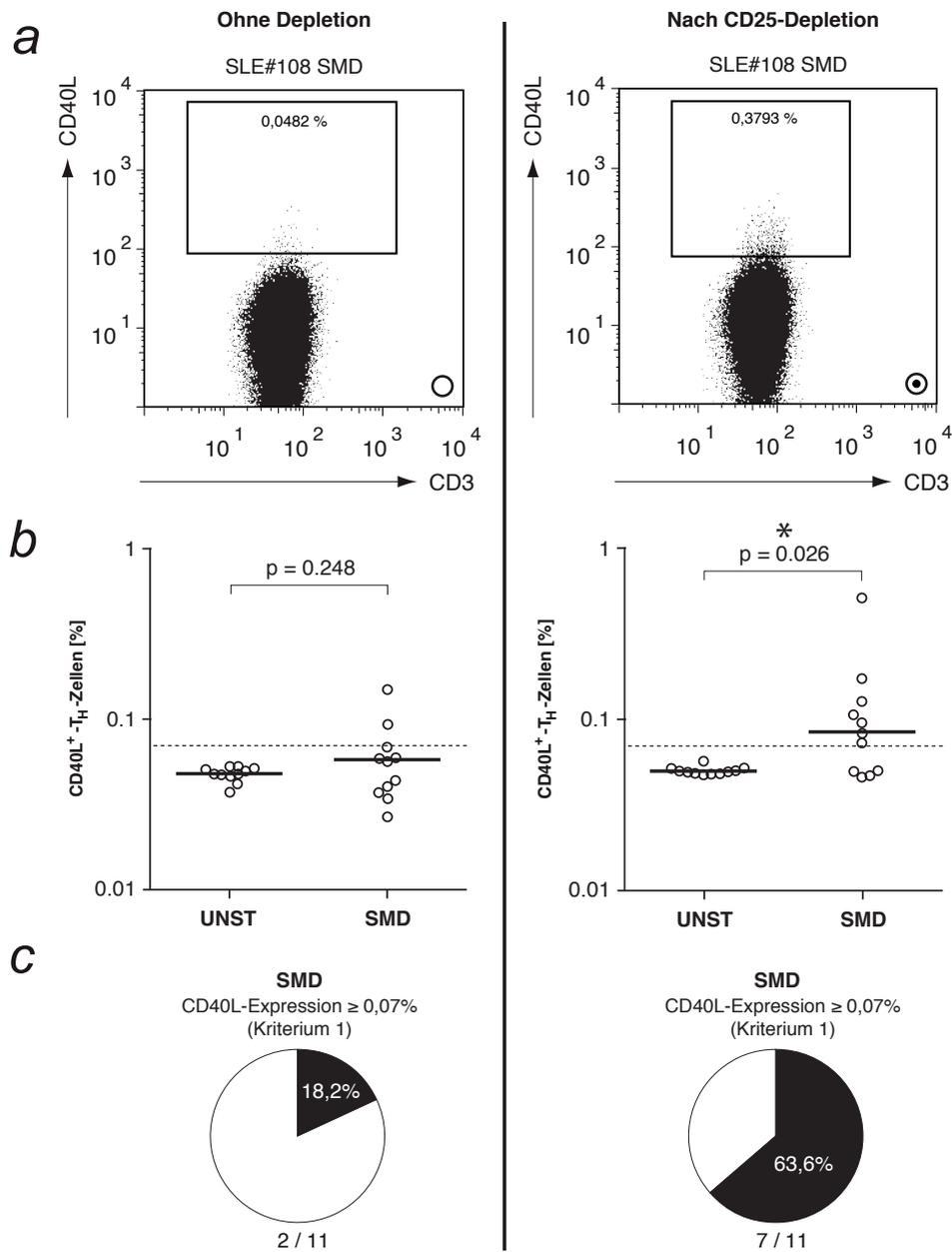


Abbildung 3.10: Demaskierung der Smd1₈₃₋₁₁₉-Reaktivität.

Gegenübergestellt sind die Smd1₈₃₋₁₁₉-Stimulationsergebnisse ohne und nach CD25-Depletion. **(a)** Exemplarische DotPlots von SLE#108. **(b)** SMD-Antwort im Vergleich mit Negativkontrolle (UNST). Durchgezogene Linien bezeichnen den Median. Die gepunktete Linie bezeichnet den Grenzwert bei 0,07%. **(c)** Erfüllung von Kriterium 1.

⊙ Positivpopulation vorhanden. ○ Keine Positivpopulation vorhanden.

* Signifikanter Unterschied (Wilcoxon-Test).

3.4.2 CD137-Expression

Bei 18 Proben wurde zusätzlich die CD137-Expression bestimmt. Das Molekül CD137 (syn. 4-1BB) gehört in die Familie der TNF-Rezeptoren und es gibt Hinweise auf eine besondere Bedeutung bei der Aktivierung von natürlichen T_{reg} -Zellen [78]. Hier wurde untersucht, ob sich die T_{reg} -Population anhand der CD137-Expression nach Antigenstimulation identifizieren lässt. Die Abbildung 3.11 zeigt die CD137-Expression der T_H -Zellen nach Stimulation mit den angegebenen Antigenen. Zusammenfassend zeigte sich abgesehen von der SEB-Positivkontrolle ($p < 0,001$) kein signifikanter Unterschied zu den unstimulierten Kontrollen.

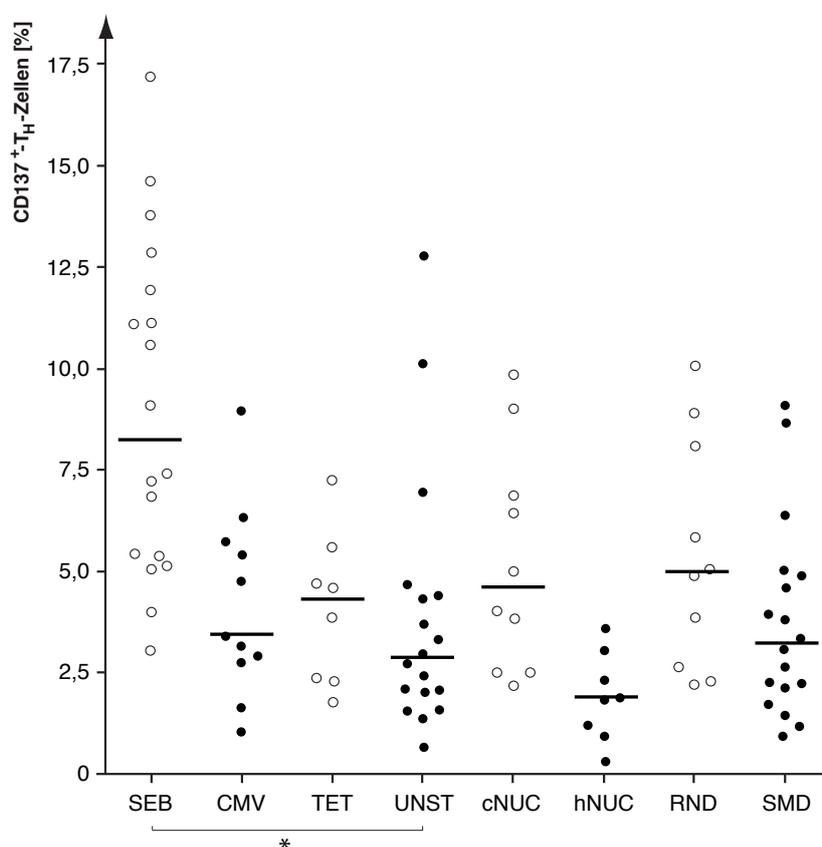


Abbildung 3.11: CD137-Expression der T_H -Zellen nach Antigenstimulation. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der $CD137^+$ - T_H -Zellen nach Stimulation mit den aufgeführten Antigenen. Horizontale durchgezogene Linien bezeichnen den Median. * Signifikanter Unterschied (Wilcoxon-Test).

Auch eine CD25-Depletion wurde bei 8 Proben durchgeführt (hier nicht gezeigt). Es ergab sich keine signifikante Änderung der CD137-Expression.

3.5 Statistische Zusammenhänge

3.5.1 Zeichen der Krankheitsaktivität

Die Krankheitsaktivität gemessen im SLEDAI-Score zeigte einen linearen Zusammenhang mit der Anzahl der betroffenen Organe ($p=0,017$; $r=0,371$), der täglichen Prednisolon-Dosis ($p<0,001$; $r=0,729$), sowie den folgenden Autoantikörpertitern: Anti-Nukleosomen-Ak ($p=0,003$; $r=0,452$), ANA ($p<0,001$; $r=0,719$) und Anti-dsDNA-Ak ($p<0,001$; $r=0,597$). Kein Zusammenhang ließ sich hingegen für den Anti-SmD1-Ak-Titer ($p=0,674$; $r=-0,071$) zeigen (siehe Abb. 3.12). Laborchemisch war ein Verbrauch der Komplementfaktoren C_3 ($p=0,004$; $r=-0,496$) und C_4 ($p=0,003$; $r=-0,512$) als Zeichen erhöhter Krankheitsaktivität festzustellen.

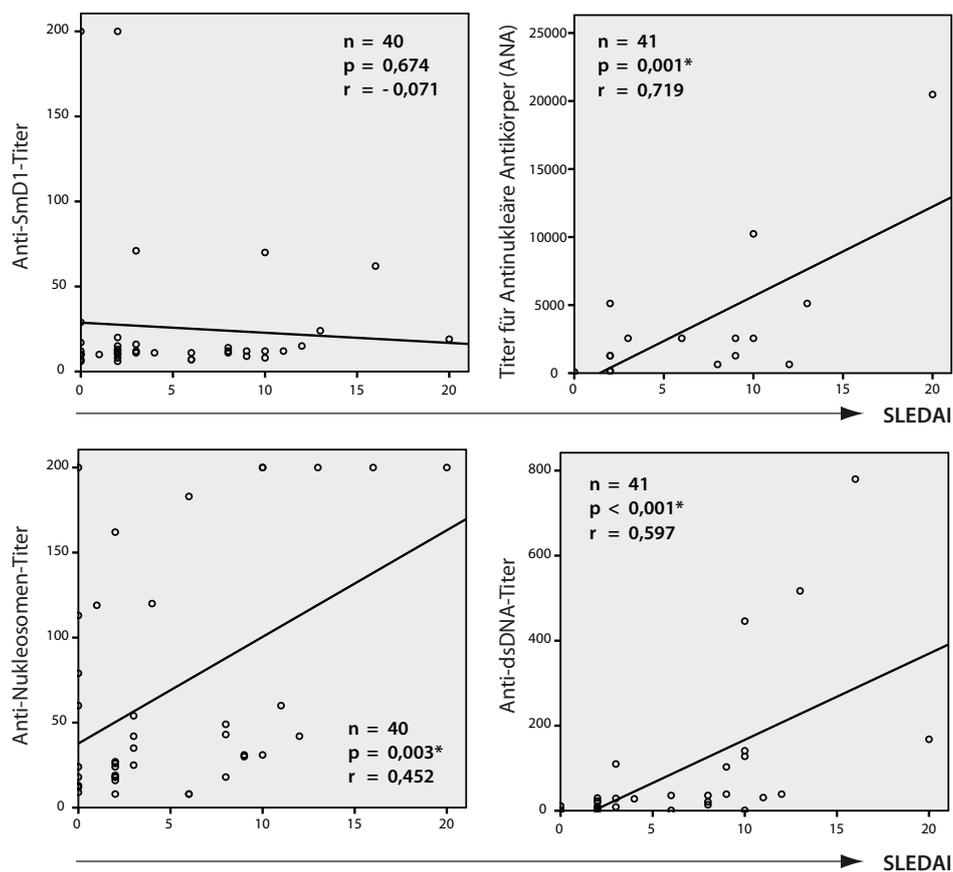


Abbildung 3.12: Korrelationen von Autoantikörpertiter und SLEDAI.
Dargestellt ist die Prüfung auf lineare Zusammenhänge nach Pearson.

Im Mann-Whitney-U-Test fand sich eine Korrelation von erhöhter Krankheitsaktivität mit dem Vorhandensein einer neurologischen Organbeteiligung ($p=0,013$) und der Erforderlichkeit eines stationären Aufenthalts ($p=0,014$).

3.5.2 Stationäre versus ambulante Betreuung

Im Mann-Whitney-U-Test waren die stationär behandelten Patienten im Rangmittel jünger ($p=0,023$), benötigten eine höhere Prednisolon-Tagesdosis ($p<0,001$) und bei ihnen waren mehr Organe betroffen ($p=0,043$) als bei den ambulant betreuten Patienten. Weiterhin hatten sie höhere Titer von Anti-Nukleosomen-Ak ($p=0,003$), ANA ($p<0,001$) und Anti-dsDNA-Ak ($p<0,001$).

Die Abbildung 3.13 gibt einen Überblick der ambulant und stationär ermittelten SLEDAI-Werte.

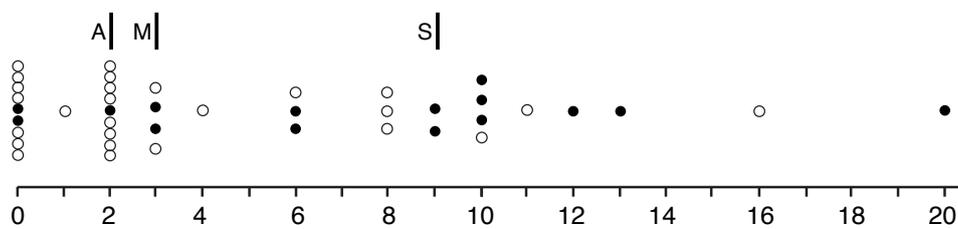


Abbildung 3.13: SLEDAI-Werte.

Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung der ermittelten SLEDAI-Werte. Schwarze Punkte bezeichnen stationäre Patienten. **A:** Median der ambulanten Proben. **M:** Median aller Proben. **S:** Median der stationären Proben.

3.5.3 Organbeteiligung

Kardiologische Organmanifestationen ($n=3$) waren assoziiert mit erhöhtem Anti-Nukleosomen-Titer ($p=0,006$) und hoher Prednisolon-Tagesdosis ($p=0,035$). Interessanterweise bestand ebenfalls ein Zusammenhang zu einer schwachen NUC- und SMD-Antwort ($p=0,047$ und $p=0,048$). Diese Korrelationen sind bei der kleinen Fallzahl ($n=3$) allerdings als grenzwertig aussagekräftig zu bewerten.

Es ergab sich kein Hinweis auf die Korrelation des Vorliegens einer nephrologischen Beteiligung ($n=15$) mit den übrigen erhobenen Daten. Neurologische Organmanifestationen ($n=8$) waren assoziiert mit einem hohen SLEDAI ($p=0,013$) und einer starken CMV-Antwort ($p=0,006$). Eine Lungenbeteiligung ($n=8$) zeigte eine Assoziation mit erhöhten Titern von Anti-

Nukleosomen-Ak ($p=0,016$), Anti-SmD1-Ak ($p=0,040$), ANA ($p=0,005$) und Anti-dsDNA-Ak ($p=0,010$). Die Anzahl der betroffenen Organe zeigte einen linearen Zusammenhang mit dem SLEDAI ($p=0,017$; $r=0,371$), einer hohen Prednisolon-Tagesdosis ($p=0,011$; $r=0,409$) und erhöhten Titern von Anti-Nukleosomen-Ak ($p=0,003$; $r=0,452$) und ANA ($p<0,001$; $r=0,597$).

3.5.4 CMV-Antwort und CMV-IgG-Status

Bei Auswertung der Vierfeldertafel (Abb. 3.14) mittels Fisher-Exakt-Test zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang von positiver CMV-Antwort i. S. von Kap. 3.1.1 und einem positiven Anti-CMV-IgG-Titer ($p=0,024$).

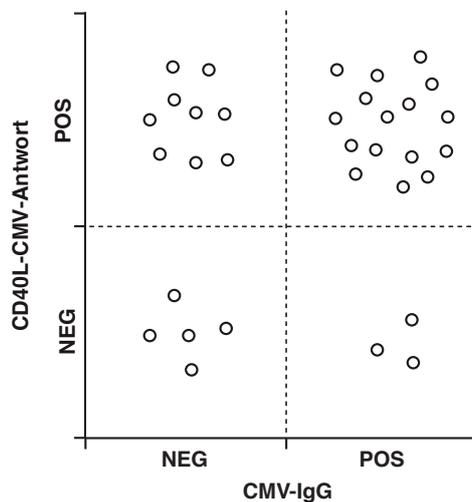


Abbildung 3.14: CMV-Antwort und CMV-IgG-Status.

Dargestellt ist eine Vierfeldertafel. Die Wahrscheinlichkeit für einen Zusammenhang von CMV-Antwort und CMV-IgG errechnet sich im Fisher-Exakt-Test zu $p=0,024$.

3.5.5 Autoreaktive T_H-Zellen und Autoantikörperstatus

Für die Antworten auf SMD, cNUC und hNUC ließ sich kein signifikanter Zusammenhang mit den gemessenen Auto-Antikörper-Titern (ANA, Anti-dsDNA, Anti-Nukleosomen, Anti-SmD1) zeigen.

3.5.6 Autoreaktive T_H-Zellen und Krankheitsaktivität

In der Testung auf lineare Zusammenhänge nach Pearson (n=41) ließ sich kein Zusammenhang zwischen dem SLEDAI und der CD40L-Antwort auf Stimulation mit SMD (p=0,668) und cNUC (p=0,686) nachweisen. Auch die angelegten Positivitätskriterien konnten im Mann-Whitney-U-Test keinen Zusammenhang des SLEDAI mit der SMD-Positivität (p=0,549) oder der cNUC-Positivität (p=0,639) zeigen.

Bei den Proben (n=11), bei denen zusätzlich der Einfluss der T_{reg}-Zellen mithilfe der CD25-Depletion untersucht wurde, zeigt sich hingegen bereits ohne Depletion ein signifikanter linearer Zusammenhang der SMD-Antwort mit der Krankheitsaktivität (p=0,044; r=0,616). Das ist insofern bemerkenswert, als dass die gemessenen Werte sich im Bereich der unstimulierten Kontrollen bewegen. Die SMD-Antwort unterschied sich – wie oben beschrieben – nicht signifikant von den Negativkontrollen (p=0,248).

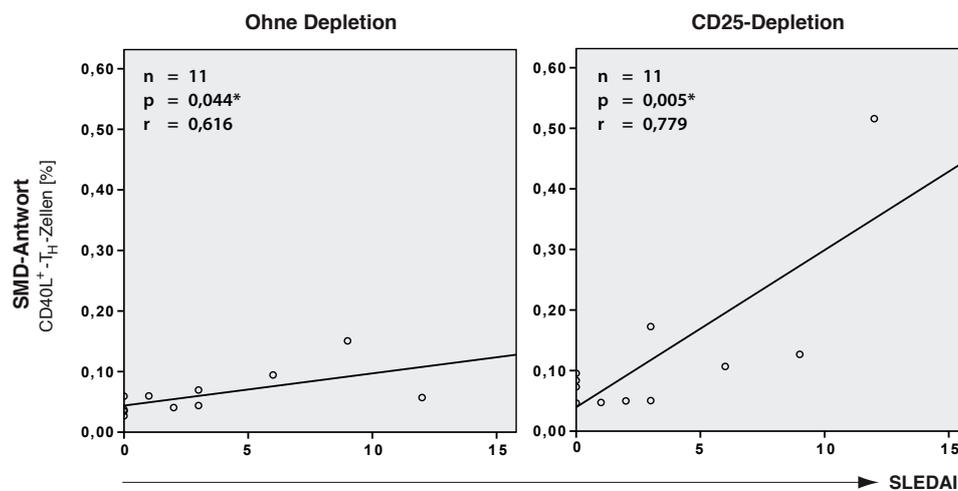


Abbildung 3.15: Korrelation von SMD-Antwort und SLEDAI.

Dargestellt ist die Prüfung auf einen linearen Zusammenhang nach Pearson.

Durch die Depletion der CD25⁺-T_{reg}-Zellen ließ sich eine 46,6 %-ige Steigerung der SMD-Antwort erreichen, die sich damit signifikant vom Kontrollniveau abhebt (siehe Abb. 3.10 b). Im Zuge dieser Demaskierung der autoaggressiven SMD-Antwort durch Eliminierung der T_{reg}-Zellen, zeigt sich auch eine deutlich bessere Korrelation von SMD-Antwort und SLEDAI (p=0,005; r=0,779). So ließ sich durch die Depletion die aufgeklärte Vari-

anz von 37,9 % auf 60,7 % steigern. In der Abbildung 3.15 sind die beiden Korrelationen in gleichem Maßstab gegenübergestellt. Es wird deutlich, dass sich durch die CD25-Depletion zusätzlich eine etwa um den Faktor 5 stärkere Steigung der Geraden ergibt. So wird ohne Depletion die Zunahme um einen SLEDAI-Punkt mit einer Zunahme der SMD-Antwort um 0,005 % beantwortet; nach der Depletion ist es eine Zunahme um 0,026 %.

3.5.7 Zeichen der Immunsuppression

Zur Untersuchung der Immunkompetenz aktiver Patienten wurde hier die SEB-Antwort als Marker für die Reaktionsfähigkeit des Immunsystems verwandt und zur Krankheitsaktivität in Bezug gesetzt. In den Verlaufsbestimmungen war bei zwei Patienten eine verminderte SEB-Antwort bei höherer Krankheitsaktivität auffällig gewesen (vgl. Kap. 3.3.4).

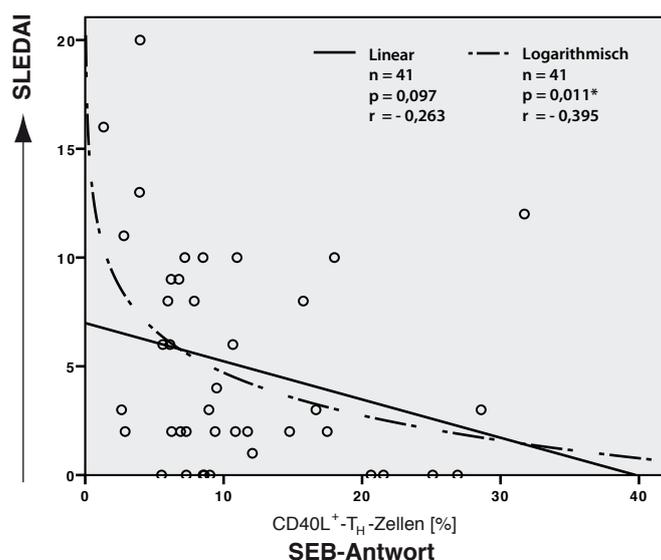


Abbildung 3.16: Korrelation von SEB-Antwort und SLEDAI.

Dargestellt ist die Prüfung auf lineare (Pearson) und logarithmische (Spearman) Zusammenhänge.

Die Abbildung 3.16 zeigt die Ergebnisse einer linearen und logarithmischen Korrelation. Besser beschrieben wird die Kovarianz beider Variablen durch die logarithmische Kurve ($p=0,011$). Wie in der Abbildung ersichtlich, streuen die Einzelwerte recht stark um den angenommenen logarithmischen Zusammenhang. Die aufgeklärte Varianz beträgt lediglich 15,6 %. Dennoch

lässt sich der deutliche Trend erkennen, dass SLE-Patienten mit höherer Krankheitsaktivität eine geringere T_H-Antwort auf SEB zeigen.

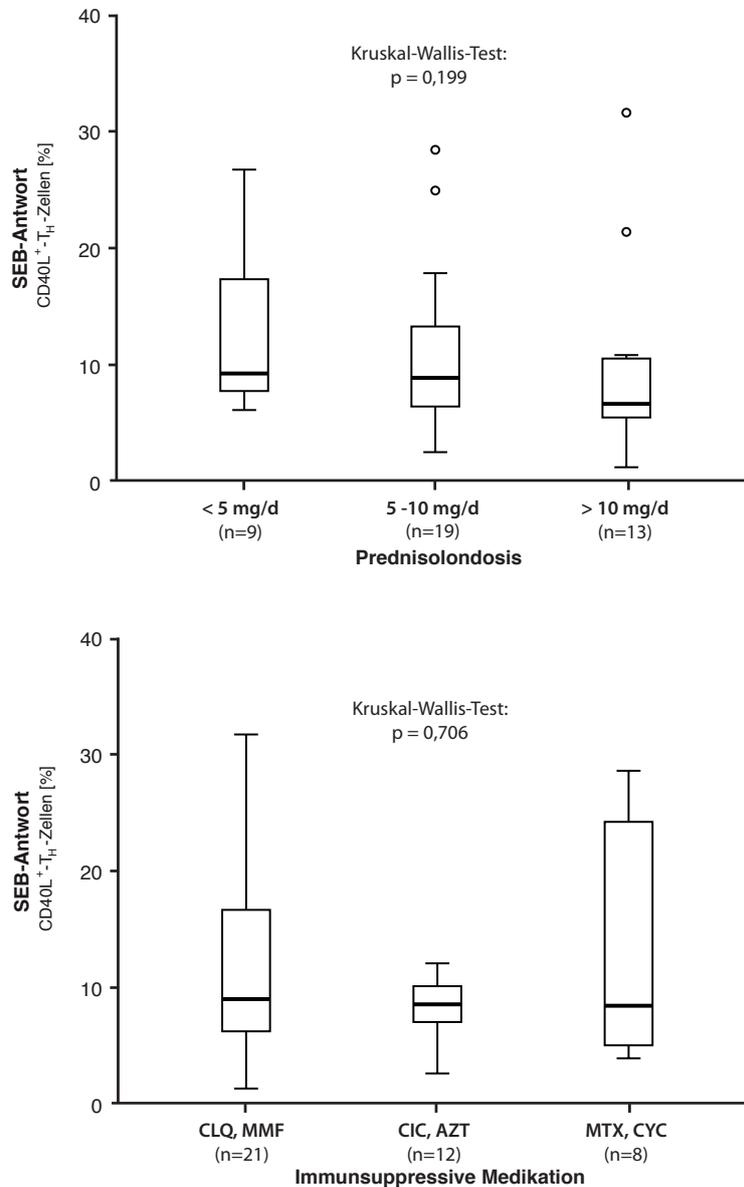


Abbildung 3.17: Immunsuppressive Medikation und SEB-Antwort. Hydroxychloroquin (CLQ), Mycophenolat Mofetil (MMF), Ciclosporin A (CIC), Azathioprin (AZT), Methotrexat (MTX), Cyclophosphamid (CYC).

Um zu ermitteln, ob die verminderte SEB-Antwort in aktiven SLE-Patienten auf Art oder Stärke der immunsuppressiven Medikation zurückzuführen ist, wurde eine Subgruppenanalyse durchgeführt (siehe Abb. 3.17).

Im Kruskal-Wallis-Test ließ sich jedoch kein Zusammenhang von Prednisolontagesdosis ($p=0,199$) oder Art des Immunsuppressivums ($p=0,706$) mit der SEB-Antwort nachweisen.

3.5.8 Die CD137-Antwort

Wie bereits weiter oben erwähnt, differenzierte die CD137-Expression nicht zwischen den verschiedenen Antigenstimulationen (siehe Kap. 3.4.2). Es ließen sich keine sinnvollen korrelativen Zusammenhänge konstruieren.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Etablierung der Methode

4.1.1 Nachweismethoden antigenspezifischer T-Zellen

Zum Nachweis antigenspezifischer T_H-Zellen kamen in der Vergangenheit verschiedene Methoden zur Anwendung.

Die Messung der DNA-Syntheserate mittels ³H-Thymidin stellte die erste Standardmethode mit breiter Anwendung dar. Sie ist aufgrund der fehlenden Differenzierbarkeit zwischen den PBMC-Subpopulationen und dem organisatorischen Aufwand im Umgang mit radioaktivem Material weitgehend verlassen worden.

Von Schneider *et al.* wurde die Proliferationsmessung mittels der konsekutiven Ausverdünnung von CFSE zum Nachweis autoreaktiver T-Zellen weiterentwickelt. Dabei werden die PBMC mit dem fluoreszensaktiven Farbstoff CFSE gefärbt und die schrittweise Halbierung der intrazellulären Konzentration im Zuge der Zellteilung als Maß für die Aktivierung herangezogen. Bei dieser Methode ist durch die Färbung zusätzlicher Oberflächenmarker eine Differenzierung der PBMC möglich [79]. Allerdings sind lange Stimulationszeiten von mehreren Tagen nötig, um eine messbare T_H-Antwort zu erzielen. Dies birgt das Risiko unspezifischer Aktivierung, beispielsweise durch exogene Kontamination oder das Freiwerden nukleärer Peptidantigene im Rahmen des auftretenden Zellunterganges.

Breite Anwendung findet auch die Messung charakteristischer Zytokinprofile der T_H-Zellen nach Antigenstimulation [52, 53, 54, 55]. Diese Methode gibt einerseits Auskunft über die Polarisierung der T_H-Zell-Antwort, erfordert

allerdings andererseits die Messung einer ganzen Palette an Zytokinen, da kein Einzelzytokin als universeller Aktivierungsmarker zur Verfügung steht [56].

In dieser Arbeit wurde das von Frentsch *et al.* 2005 als universeller Aktivierungsmarker der T-Zell-Reihe vorgestellte Oberflächenmolekül CD40L verwandt [56]. CD40L zeichnet sich anders als CD25 und CD69 durch eine geringe konstitutionelle Expression aus, was einen geringen Hintergrund und damit eine höhere Sensitivität zur Folge hat. Nach der Stimulation mit einem Antigen erfolgt lediglich auf den antigenspezifischen T-Zellen eine Exposition von CD40L – unabhängig davon, welcher T_H-Polarisierung sie angehören (vgl. Kap. 1.3.4). Zudem ist die Isolierung der CD40L⁺-Zellen mittels MACS zur Anreicherung antigenspezifischer T_H-Zellen geeignet [56].

Die Messung der CD40L-Expression als Zugang zur Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung wurde seither von verschiedenen Arbeitsgruppen erfolgreich verwendet. So konnte für Morbus Whipple-Patienten gezeigt werden, dass diese gegenüber Tuberkulose-Patienten und gesunden Kontrollpatienten über eine insuffiziente T_H-Antwort auf den Erreger *Tropheryma whipplei* verfügen. Die T_H-Antworten auf andere infektiöse Kontrollantigene waren hingegen ungestört [80]. In einer anderen Studie wurde die alloreaktive T_C-Antwort bei 58 Leber-transplantierten Kindern anhand der CD40L-Expression evaluiert. Erhöhte CD40L-Antworten alloreaktiver T_C-Gedächtniszellen vor der Transplantation waren dabei ein guter Prediktor für Wahrscheinlichkeit und Schwere einer Organrejektion. Die im postoperativen Verlauf kontinuierlich gemessenen alloreaktiven T_C-Antworten konnten zudem eine Abstoßungsreaktion sensitiv anzeigen und korrelierten mit dem histologischen Grad einer eventuellen Rejektionsreaktion [81].

Mit dem Einsatz von CD40L zur Identifizierung von autoreaktiven Immunzellen liegen bisher noch keine Erfahrungen vor. Mit der hier vorliegenden Arbeit soll die Methode für diesen Zweck weiterentwickelt werden. Eine besondere Herausforderung stellt dabei die geringe Anzahl autoreaktiver Zellen im peripheren Blut dar.

4.1.2 Methodenoptimierung

Bei den zu erwartenden geringen Frequenzen der autoreaktiven T_H-Zellen wurde besonderer Wert auf ein stabiles und reliables Messverfahren gelegt. In aller Regel wurden für jedes Einzelantigen Triplikate mitgeführt und eine ausreichende Zellzahl von 50.000 T_H-Zellen je Ansatz in der Durchflusszytometrie analysiert. Innerhalb einer Triplikatreihe ergab sich im Mittel eine Standardabweichung von 25 % des jeweiligen Mittelwertes. Damit ist die zytometrische Messung als stabil zu bewerten.

Es erfolgte ein konsequenter Ausschluss von Proben, die durch Laborfehler oder artifizielle Aktivierung verfälscht waren (vgl. Kap. 3.1.3). Auf den Zusatz von potentiell aktivierenden Medienzusätzen wie FCS wurde verzichtet und eine unverzügliche Verarbeitung der Proben gewährleistet.

Trotz der möglichst großen aufgenommenen Zellzahlen liegt der Nachweis autoreaktiver T-Zellen in den durchgeführten Experimenten dicht an der Sensitivitätsgrenze der FACS-Methode. Um eine optimale Bewertung der CD40L-Antworten vornehmen zu können, erwies sich eine Einstellung der unstimulierten Negativkontrollen auf eine Hintergrundfrequenz von 0,05 % als am besten geeignet. Zur Deklaration einer CD40L-Antwort als positiv wurde ein Doppelkriterium aus gemessener CD40L-Expression und visueller Kontrolle der CD40L⁺-Positivpopulation entwickelt. Es wird sowohl eine CD40L-Expression $\geq 0,07\%$ (Kriterium 1) als auch eine optisch erkennbare Positivpopulation (Kriterium 2) gefordert. Dieser methodische Ansatz verfolgt das Ziel, die Zahl falsch-positiver Befunde zu verringern und damit die Spezifität der Methode zu erhöhen (vgl. Kap 3.1.1).

4.1.3 Mitgeführte Kontrollen

Als obligatorische Kontrollen wurden unstimulierte Ansätze und das Superantigen SEB mitgeführt. Alle eingeschlossenen Proben wiesen funktionierende Positiv- und Negativkontrollen auf (siehe Abb. 3.8). Als zusätzliche Positivkontrollen wurden die infektionsassoziierten Peptide CMV und TET eingesetzt.

Plausibilität der CMV-Antwort

Die CMV-Antwort war gegenüber den unstimulierten Proben signifikant erhöht messbar ($p < 0,001$). Bei 64,7% der Proben konnte eine positive CMV-Antwort anhand der o. g. Kriterien festgestellt werden (vgl. Tab. 3.3).

Eine positive CMV-Antwort der T_H -Zellen korrelierte dabei im Fisher-Exakt-Test signifikant mit einem positiven Anti-CMV-IgG-Status ($p = 0,024$). Dies unterstreicht die Relevanz der gemessenen CD40L-Antworten. In CMV-immunisierten Probanden ließ sich neben den spezifischen Antikörpern der langlebigen Plasmazellen auch der korrespondierende spezifische T_H -Zellklon sicher nachweisen.

Wie in der Vierfeldertafel (vgl. Abb. 3.14) ersichtlich, scheint die Messung der CD40L-CMV-Antwort sogar tendenziell sensitiver als der CMV-IgG-Status zu sein. So weisen 9 Proben die Konstellation $CMV-CD40L^+ CMV-IgG^-$ auf, nur 3 Proben verhalten sich entgegengesetzt: $CMV-CD40L^- CMV-IgG^+$.

Bezüglich der ermittelten Frequenz positiver CMV-Antworten (64,7%) wurde in einer großen epidemiologischen Studie eine vergleichbare CMV-Seroprävalenz beschrieben [82].

Plausibilität der Tetanus-Antwort

Die Antwort auf das Tetanus-Toxoid₈₃₀ (TET) war gegenüber den unstimulierten Proben ebenfalls signifikant erhöht messbar ($p < 0,001$). Eine positive Antwort war bei 32% der Proben nachweisbar (siehe Tab. 3.3). Auch in Unkenntnis des Impfstatus im untersuchten Kollektiv erscheint dieser Anteil gegenüber berichteten Immunisierungsraten von knapp 90% in einem Kollektiv von 321 deutschen Blutspenden als zu gering [83]. Allerdings berichten neuere Arbeiten über wesentlich niedrigere effektive Impfschutzraten; in einer Untersuchung von 784 Patienten einer belgischen Rettungsstelle wiesen nur 64,2% einen effektiven Impfschutz auf [84]. In diesem Zusammenhang ist die Compliance der Tetanusimpfung von besonderer Bedeutung. In der belgischen Studie waren beispielsweise die Merkmale junger, männlicher, in Belgien geborener Patient gute Prediktoren für einen suffizienten Impfschutz. In der klinisch-rheumatologischen Praxis wird demgegenüber häufig die Erfahrung gemacht, dass Patienten mit autoimmunologischen Erkrankungen einen unzureichenden Impfschutz aufweisen [85]. Dies liegt oftmals an der Befürchtung der Patienten und z. T. auch ihrer Hausärzte, eine Impfung kön-

ne einen Krankheitsschub auslösen. Darüber hinaus wurde bei SLE-Patienten ohnehin ein schlechteres Ansprechen auf Impfungen verglichen mit gesunden Kontrollen festgestellt. Die immunsuppressive Therapie scheint hierfür entscheidend mitverantwortlich zu sein [86].

Weiterhin wird in der Literatur beschrieben, dass nicht alle immunisierten Probanden auf TET eine T_H-Antwort zeigten, da es nur eines der beiden immundominanten Epitope des Tetanustoxins darstellt [87]. Auch wurde TET in der Literatur oft in höherer Konzentration eingesetzt als in dieser Arbeit (25-100 µg/ml versus 20 µg/ml). In diesem Zusammenhang erscheint interessant, dass 6 untersuchte Proben zwar eine Positivpopulation zeigen, den Grenzwert von 0,07 % CD40L-Expression aber nicht überschreiten (siehe Abb. 3.8). Dies könnte Ausdruck einer Unterdosierung des Peptidantigens sein. Unter reiner Beachtung der Positivpopulation (Kriterium 2) wiesen immerhin 56 % der Patienten eine positive TET-Antwort auf (siehe Tab. 3.3). Dies kommt den Impfschutzraten im o. g. belgischen Rettungstellen-Kollektiv (64,2 % bei n=784) schon deutlich näher. Schlussendlich wird eine Kombination der o. g. Gründe für die unerwartet niedrige TET-Antwort verantwortlich sein.

4.2 Repräsentativität des Patientenkollektivs

Die 38 eingeschlossenen SLE-Patienten wurden in der Poliklinik (n=25) und auf der rheumatologischen Bettenstation (n=13) rekrutiert. Der Frauenanteil von 84,2 % entspricht etwa dem in der Literatur beschriebenen Geschlechterverhältnis von 1:10. Das mittlere Alter betrug 42 Jahre, die jüngste Patientin war 23, die älteste 76 Jahre alt. Bei einer mittleren Krankheitsaktivität von 5 Punkten im SLEDAI-Score wurden inaktive ebenso wie aktive Patienten eingeschlossen (Minimum: 0 Punkte, Maximum: 20 Punkte). Bei 39,5 % der Patienten lag eine manifeste Nierenbeteiligung vor.

Zusammenfassend ist die Stichprobe in Bezug auf Geschlechterverhältnis, Alter und Krankheitsaktivität als repräsentativ für ein SLE-Kollektiv zu bewerten (siehe Tab. 3.1).

4.3 Autoantigenspezifische T_H-Zellen beim SLE

Obwohl Autoantikörper gegen nukleäre Peptidantigene beim SLE lange bekannt sind, gestaltete sich der direkte Nachweis der korrespondierenden autoaggressiven T_H-Zellen in der Vergangenheit schwierig. Ein wesentlicher Grund hierfür sind die sehr niedrigen Frequenzen der autoreaktiven Zellen im peripheren Blut.

Es wurde mittels verschiedener Methoden versucht, eine ausreichende Sensitivität für die Detektion zu erreichen, was auf der anderen Seite zu Lasten der Spezifität ging. Im Folgenden soll der aktuelle Forschungsstand für die in dieser Arbeit untersuchten Autoantigene (Nukleosomen und SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid) im Vergleich mit den eigenen Ergebnissen dargestellt werden.

4.3.1 Nukleosomen

Die polykationischen Nukleosomen spielen eine zentrale Rolle in der komplexen Verpackungsarchitektur des kondensierten Erbgutes. Zum einen neutralisieren sie die polyanionische DNA und ermöglichen so deren enorme Packungsdichte, zum anderen sind sie als epigenetische Regulatoren an der Transkriptionskontrolle beteiligt (vgl. Kap. 1.2.5).

Hinweise auf ihre pathogenetische Bedeutung beim SLE ergaben sich zunächst aus dem Nachweis Nukleosomen-spezifischer Autoantikörper in SLE-Kollektiven [88, 89, 69]. Weiterhin legten Immunisationsexperimente eine Rolle der Nukleosomen beim initialen Toleranzbruch gegenüber nukleären Antigenen und dsDNA nahe. In der Maus ließ sich durch intravenöse Injektion von apoptotischen Zellen das Auftreten anti-nukleärer Antikörper und die Entwicklung SLE-typischer Symptome provozieren. Gemeinsam mit der Beobachtung des gehäuftten Auftretens von Apoptosedefekten in SLE-Individuen wurde das akzidentelle Freiwerden von Nukleosomen als möglicher Auslöser einer anti-nukleären Immunantwort identifiziert [90, 91, 92].

Der Nachweis autoreaktiver T_H-Zellen als Träger der B-Zell-Hilfe gelang allerdings zunächst nur indirekt in Form von T-Zell-Klonen und T-Zell-Linien [93, 94, 35]. Bei der Analyse des TCR muriner autoreaktiver T-Zell-Linien wurden vermehrt polyanionische Regionen entdeckt; die Hälfte der Klone zeigte eine Spezifität für nukleosomale Epitope. Die Re-Injektion dieser T-

Zell-Linien führte im SLE-Mausmodell zu einem rapideren und schwereren Krankheitsverlauf [35].

Bruns *et al.* untersuchten erstmals gezielt die Nukleosomen-spezifische T_H-Antwort im Menschen mittels eines ³H-Thymidin-Proliferationsassays [69]. Bei 14 von 26 SLE-Patienten (54 %) konnte nach der 3-tägigen Stimulation mit aus Hühner-Erythrozyten extrahierten Nukleosomen eine Proliferationszunahme gezeigt werden. Schwäche dieses Messverfahrens ist die Erfassung aller PBMC-Subpopulationen, die weiterhin aufgrund der notwendigen Fixierung nicht für funktionelle Untersuchungen zur Verfügung stehen (vgl. Kap. 1.3.1). Um zumindest schwerpunktmäßig die T-Zell-Antwort zu registrieren, wurde von Bruns *et al.* ein T-Zell-optimiertes Kulturmedium verwandt, das die Proliferation der übrigen PBMC-Populationen unterdrücken soll [69].

Schneider *et al.* unternahmen 2002 den Versuch, eine durchflusszytometrische Nachweismethode autoaggressiver T_H-Zellen beim SLE zu etablieren [79]. Die auf der Ausverdünnung von CFSE beruhende Methode erbrachte für die Stimulation mit Nukleosomen eine gegenüber dem Kontrollniveau signifikant erhöhte T_H-Zell-Antwort sowohl im SLE-Kollektiv als auch bei den gesunden Kontrollen. Entgegen der Erwartung reagierten die T_H-Zellen der gesunden Spender sogar stärker als jene von den SLE-Patienten. Die Detektion einer ausreichenden T_H-Zellzahl gelang mittels CFSE erst ab einer Stimulationdauer von 5 Tagen, wobei zwecks besserer Differenzierbarkeit für die Auswertung noch spätere Zeitpunkte herangezogen wurden [79]. Mit steigender Stimulationsdauer ist allerdings ebenfalls mit einer Zunahme artifizierender Einflüsse und einer Abnahme der Spezifität zu rechnen (vgl. Kap. 1.3.3). Ein statistischer Zusammenhang der Nukleosomen-spezifischen T_H-Zell-Antwort mit dem Anti-Nukleosomen-Antikörper-Titer oder der Krankheitsaktivität im SLEDAI konnte durch Schneider *et al.* nicht gezeigt werden [59].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine deutlich unterschiedliche T_H-Zell-Antwort auf die beiden verwendeten Nukleosomenaufbereitungen. Während die Stimulation mit den bereits von Bruns und Schneider verwandten chicken-Nukleosomen (cNUC) bei 6 von 19 Proben (31,6 %) zu einer positiven Antwort führte, zeigten die T_H-Zellen auf die Stimulation mit humanen Nukleosomen (hNUC) in keiner von 8 Proben eine positive Ant-

wort. Stattdessen war sogar eine gegenüber den unstimulierten Kontrollen signifikant geringere CD40L-Expression nachzuweisen.

Die CD40L-Expression nach Stimulation mit chicken-Nukleosomen (cNUC) lag zwar signifikant über dem unstimulierten Kontrollniveau ($p=0,036$), eine positive Antwort wurde mit 31,6 % versus 54 % aber seltener beobachtet als durch Bruns *et al.* [69] (siehe Tab. 3.3). Dies könnte unter anderem auf die 12 mal längere Stimulationsdauer zurückzuführen sein (72 Stunden vs. 6 Stunden). Eine lange Stimulationsdauer ermöglicht zwar auf der einen Seite eine für die Detektion ausreichende klonale Expansion des spezifischen T-Zell-Klones, birgt auf der anderen Seite aber das Risiko unspezifischer Reaktionen. Neben dem Freiwerden intrazellulärer Antigene im Zuge des Zellunterganges (endogene Kontamination) ist auch die Gefahr von außen eingetragener Verunreinigungen (exogene Kontamination) größer. Weiterhin stellt das von Bruns *et al.* verwandte rekombinante IL-2 eine mögliche Quelle unspezifischer Aktivierung dar.

Die humanen Nukleosomen (hNUC) wurden durch Präparation aus immortalisierten Zervixkarzinom-Zellen (HeLa-Zellen) nach Morales *et al.* [70] gewonnen und von der Firma *Orgentec* bezogen. Auf die Stimulation mit hNUC ergab sich überraschenderweise eine T_H -Antwort, die deutlich unterhalb des unstimulierten Negativniveaus liegt ($p=0,012$) (vgl. Abb. 3.8).

Als mögliche Ursache kommt unter anderem eine Suppression der Nukleosomen-spezifischen T_H -Zellen durch einen T_{reg} -vermittelten Toleranzmechanismus in Frage. Auch Bruns *et al.* fanden bei 2/26 untersuchten SLE-Patienten eine Suppression der Nukleosomen-Antwort – in diesem Fall allerdings wurden Hühner-Nukleosomen verwandt [69].

Eine weitere Ursache könnte in der Verwendung von immortalisierten Karzinomzellen als Ausgangsmaterial für die Nukleosomenanreicherung liegen. Für Tumoren konnten verschiedene Mechanismen gezeigt werden, mit denen sie das Immunsystem unterdrücken und somit die Tumor-Eliminierung verhindern. Beschrieben sind beispielsweise die Ausschüttung antiinflammatorischer Botenstoffe, die Oberflächenexpression von CD40 oder das Anstoßen tolerogener T_{reg} -Antworten gegen die Tumor-reaktiven T-Effektorzellen [95].

4.3.2 SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid

Die Sm-Proteine bilden einen Heptamerring innerhalb der snRNPs, aus denen sich das Spleißosom zusammensetzt. Dieses ist essentiell an der Prozessierung der hnRNA zur mRNA im Rahmen der Proteinbiosynthese beteiligt (vgl. Kap. 1.2.5).

Hinweise auf eine Bedeutung der Sm-Proteine in der Pathogenese des SLE wurden 1990 erstmals von Yasuma *et al.* veröffentlicht. In einem Kollektiv von 350 SLE-Patienten konnten vermehrt Anti-Sm-Antikörper nachgewiesen werden, die eine Korrelation mit der Krankheitsaktivität zeigten [96]. Die mittlere Frequenz der Anti-Sm-Antikörper wurde mit 25 % beziffert. Später wurde das C-terminale Ende (Aminosäure 83-119) des SmD1-Peptids als besonders autoimmunogen identifiziert [97, 98, 29]. Für Autoantikörper gegen dieses SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid konnte eine hohe Sensitivität (70 %) und Spezifität (93,7 %) gezeigt werden [29].

Weiterhin gibt es Hinweise auf eine kritische Rolle der SmD1₈₃₋₁₁₉-spezifischen T_H-Zellen beim Toleranzbruch gegenüber dsDNA. Riemekasten *et al.* extrahierten Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten junger NZB/NZW Lupus-Mäuse und stimulierten diese mit dem SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid. Dadurch ließ sich *in vitro* die Produktion von Anti-dsDNA-Antikörpern induzieren. Auch in lebendigen Tieren ließ sich durch die Immunisierung mit dem SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid eine autoreaktive Antikörperantwort gegen dsDNA erreichen. In diesem Zusammenhang interessant erscheint der Umstand, dass in diesen Immunisierungsexperimenten zunächst Antikörper gegen dsDNA und erst im weiteren Verlauf auch gegen SmD1₈₃₋₁₁₉ selbst nachweisbar waren [39]. Dies unterstreicht die Bedeutung immunologischer Kreuzreaktionen zwischen nukleären Antigenen in der Pathogenese des SLE.

Im ³H-Thymidin-Proliferationsassay fanden Riemekasten *et al.* bei 11 von 28 SLE-Patienten (39 %) eine SmD1₈₃₋₁₁₉-spezifische T_H-Zell-Antwort, gegenüber 2/29 (7 %) bei den Kontrollen [99]. Die Antigenstimulation fand über insgesamt 12 Tage statt, wobei die größte autoreaktive T-Zell-Antwort zwischen Tag 3 und Tag 7 erreicht wurde. Ein Zusammenhang mit dem Anti-SmD1₈₃₋₁₁₉-Antikörper-Titer oder der Krankheitsaktivität ließ sich nicht zeigen, auch wenn der Patient mit der größten autoreaktiven T_H-Zell-Antwort (Stimulationsindex: 165) ebenfalls die höchste Krankheitsaktivität (SLEDAI: 18) und hohe Titer von Anti-SmD1₈₃₋₁₁₉-Antikörpern aufwies [99].

In den eigenen Experimenten erbrachte die 6-stündige Stimulation mit dem SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid (SMD) über alle Proben keinen signifikanten Unterschied zum Kontrollniveau ($p=0,600$). Die morphologische Abgrenzung der Positivpopulationen gestaltete sich bei den SMD-Proben als schwierig (siehe Kap. 3.3.1). Die Positivpopulationen werden überwiegend von schwach CD40L-positiven Zellen gebildet, die den Eindruck erwecken, sie würden aus der Negativpopulation hineinstrahlen. Eine denkbare Ursache hierfür wäre eine niedrigere TCR-Affinität der autoreaktiven T_H-Zellen im Vergleich mit den infektiösen T_H-Antworten. Nichtsdestoweniger wurde bei 2/41 Proben (4,9 %) eine positive Antwort auf SMD im Sinne von Kap. 3.1.1 festgestellt. Bei 4/41 Proben (9,8 %) besteht eine CD40L-Expression $\geq 0,07\%$ (Kriterium 1).

Im Vergleich zu der von Riemekasten *et al.* beschriebenen hohen SMD-Antwortrate von 39 % wurden demnach deutlich weniger Patienten mit SMD-Autoreaktivität gefunden. Die deutlich kürzere Stimulationsdauer und die methodischen Unterschiede zum ³H-Thymidin-Proliferationsassay dürften hierfür ursächlich sein.

Auf den entscheidenden Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die Nachweisbarkeit der SMD-reaktiven T_H-Zellen soll im Folgenden näher eingegangen werden.

4.4 Einfluss der regulatorischen T-Zellen

Die Rolle der T_{reg}-Zellen in der Pathogenese des SLE ist zur Zeit Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. Bereits bezüglich der Frequenzen von T_{reg}-Zellen beim SLE war die Literatur lange widersprüchlich. So wurden erhöhte ebenso wie erniedrigte Frequenzen in SLE-Kollektiven beschrieben [100, 101]. Dies geht unter anderem auf die uneinheitliche Definition der T_{reg}-Zellen als CD4⁺CD25^{high}-, CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺- oder CD4⁺FoxP3⁺-T-Zellen zurück. In der größten bisher veröffentlichten Studie untersuchten Barreto *et al.* 2009 insgesamt 148 SLE-Patienten, 166 Verwandte der Patienten und 117 gesunde Kontrollen. Die Arbeitsgruppe konnte eine signifikante Verringerung der CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺-T_{reg}-Zellen im SLE-Kollektiv zeigen [102]. Diese Verringerung der T_{reg}-Zellen war in der Gruppe der Verwandten ebenfalls nachweisbar, wenn auch geringer ausgeprägt. Innerhalb der

gesunden Kontrollgruppe war die Frequenz zusätzlich bei den Frauen niedriger als bei den Männern. Bei den SLE-Patienten zeigte sich zudem eine Korrelation niedriger T_{reg} -Zahlen mit erhöhtem SLEDAI und hohen Anti-dsDNA-Antikörper-Titern [102].

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse auf eine ineffektive Kontrolle der autoreaktiven Immunantwort durch die T_{reg} -Zellen im Rahmen des aktiven SLE. Die Ergebnisse der Verwandtenuntersuchung sowie die Geschlechterdifferenz in der Kontrollgruppe deuten zusätzlich auf die Beteiligung genetischer Faktoren an der insuffizienten T_{reg} -Kontrolle hin.

In der hier vorliegenden Arbeit hat die Eliminierung der T_{reg} -Zellen mittels CD25-Depletion sowohl auf die SEB-, als auch auf die SMD-Antwort einen signifikanten Effekt, nicht hingegen auf die CMV- und hNUC-Antwort.

Da SEB als Superantigen über einen direkten antigenunabhängigen Kurzschluss zwischen MHC-II und TCR alle reagiblen T-Zellen aktiviert, wäre kein wesentlicher Einfluss der T_{reg} -Zellen auf die SEB-Antwort zu erwarten gewesen. Überraschenderweise zeigte sich die CD40L-Expression nach Stimulation mit SEB (n=11) aber durch die vorherige CD25-Depletion um 23,1 % signifikant gesenkt ($p=0,016$; vgl. Abb. 3.9). Dies ist am ehesten auf ein Miterfassen der voraktivierten intermediär-CD25-positiven T-Zellen im Zuge der Depletion zurückzuführen. Insgesamt wurden methodenbedingt 30–40 % der eingesetzten PBMC von der Depletion erfasst. Dies könnte sich in besonderem Maße auf die voraktivierten T-Zellen ausgewirkt haben, so dass diese folglich in geringerer Konzentration einer Aktivierung durch SEB zur Verfügung standen.

Besonders bedeutsam war der Einfluss der CD25-Depletion auf die SMD-Antwort. Während bei direkter Stimulation kein Unterschied zum unstimulierten Kontrollniveau gezeigt werden konnte ($p=0,248$), war dies nach vorheriger CD25-Depletion möglich ($p=0,026$) (vgl. Abb. 3.10 b). Durch die Eliminierung der T_{reg} -Zellen ließ sich eine signifikante Steigerung der SMD-Antwort um 46,6 % ($p=0,05$) erreichen (siehe Abb. 3.9). Interessanterweise war dieser Effekt bei der Patientin mit der höchsten Krankheitsaktivität mit einer 9-fachen Steigerung besonders ausgeprägt.

Diese Ergebnisse weisen auf eine konstitutionelle Unterdrückung des SmD1₈₃₋₁₁₉-spezifischen T_H -Zell-Klones durch die T_{reg} -Population hin. Wer-

den die T_{reg}-Zellen aus diesem Gleichgewicht entfernt, kommt es zu einer Entfesselung der autoreaktiven T_H-Antwort.

Ähnliche Effekte ließen sich auch im Mausexperiment zeigen. So ergaben Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe eine Steigerung der SmD1₈₃₋₁₁₉-spezifischen T_H-Antwort muriner Lymphozyten bei vorheriger CD25-Depletion. Hier kann dieser Zusammenhang nun erstmals auch für den humanen SLE gezeigt werden.

Zusammenfassend kann also durch die T_{reg}-Depletion eine Demaskierung der SmD1₈₃₋₁₁₉-reaktiven T_H-Zellen erreicht werden, so dass diese einer weiteren Untersuchung zugänglich werden.

4.5 SmD1₈₃₋₁₁₉-Reaktivität und Krankheitsaktivität

Die Bedeutung der T_H-Antwort auf SMD und ihrer Demaskierung durch eine Depletion der T_{reg}-Zellen zeigt sich auch in einer exzellenten Korrelation mit der Krankheitsaktivität im SLEDAI-Score. Zwar war bei den 11 untersuchten Patienten dieser Zusammenhang schon vor der CD25-Depletion nachweisbar, allerdings ließ sich die aufgeklärte Varianz durch die Depletion annähernd verdoppeln (37,9% versus 60,7%; vgl. auch Abb. 3.15). Zudem bewegten sich die SMD-Antworten vor der Depletion im Bereich der unstimulierten Negativkontrollen, von denen sie nicht sicher unterschieden werden konnten ($p=0,248$). Erst in Abwesenheit der T_{reg}-Kontrolle ist die Autoreaktivität gegen das SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid zuverlässig erfassbar ($p=0,026$) und präsentiert sich als guter Marker der Krankheitsaktivität (vgl. Abb 3.10 b).

Diese Daten unterstreichen die Bedeutung der SMD-spezifischen T_H-Antwort nicht nur für den initialen Toleranzbruch gegenüber dsDNA, sondern ebenfalls für die Aktivitätsdynamik im Krankheitsverlauf. So scheinen die autoreaktiven T_H-Zellen im SLE-Schub eine verstärkte Aktivierung zu erfahren. Dies konnte am Beispiel des SLE-spezifischen nukleären SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptidantigens erstmals in dieser Form gezeigt werden.

Es stellt sich die Frage, ob diese gesteigerte Aktivität primär von einem Überwiegen der SMD-Antwort oder einer insuffizienten T_{reg}-Kontrolle herrührt. Der Umstand, dass auch ohne Depletion – in Anwesenheit der T_{reg}-Zellen – im untersuchten Subkollektiv eine Korrelation der SMD-Antwort mit der Krankheitsaktivität nachweisbar war, könnte als Hinweis auf eine

a priori insuffiziente Kontrolle gedeutet werden. Unterstützt würde diese Interpretation durch Untersuchungen, die auf eine zahlenmäßige und/oder funktionelle Unterlegenheit der T_{reg}-Zellen im aktiven SLE hinweisen. Zum einen wird von mehreren Arbeitsgruppen ein absoluter Mangel an T_{reg}-Zellen in SLE-Kollektiven und insbesondere im aktiven Schub berichtet [103, 102]; als zugrundeliegender Mechanismus wird u. a. eine erhöhte Sensitivität der T_{reg}-Zellen gegenüber dem Apoptose-vermittelnden Fas-Liganden diskutiert [104]. Zum zweiten sind auch Funktionsdefizite der T_{reg}-Zellen in Form verminderter suppressiver Wirksamkeit im SLE-Schub beschrieben [105].

Nach der Depletion kam es erwartungsgemäß zu einer Entfesselung der autoreaktiven SMD-Antwort mit einer signifikanten Steigerung um 46,6 % ($p=0,05$). Nach der Eliminierung der T_{reg}-Zellen zeigte sich zudem eine noch bessere Korrelation von SMD-Antwort und Krankheitsaktivität. Ob diese nun – in Abwesenheit der T_{reg}-Zellen – noch deutlicher in Erscheinung tretende autoreaktive Immunantwort eine Folge der insuffizienten T_{reg}-Kontrolle ist, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Einerseits könnte man argumentieren, dass bei einem reinen T_{reg}-Versagen nach der Depletion eine SLEDAI-unabhängige SMD-Antwort zu erwarten wäre. Andererseits könnte eine insuffiziente Kontrolle der SMD-Antwort selbstverständlich auch erst zu einer Expansion der SMD-spezifischen T_H-Zellen geführt haben. Eine genaue Identifizierung der primären Auslenkung des Gleichgewichts ist somit zunächst nicht möglich.

Zur weiteren Klärung könnte in folgenden Untersuchungen zusätzlich die T_{reg}-Frequenz und -Funktion in Zusammenschau mit der autoreaktiven SMD-Antwort erfasst werden. Dies würde es erlauben, die T_{reg}-Funktion in unmittelbarem Zusammenhang mit einer SLE-relevanten autoreaktiven T_H-Antwort zu studieren.

4.6 Marker der Krankheitsaktivität

In der weiteren statistischen Analyse erwiesen sich vor allem in der Literatur bereits beschriebene Parameter als Surrugatmarker einer erhöhten Krankheitsaktivität. Ein erhöhter Punktwert im SLEDAI korrelierte erwartungsgemäß mit erhöhten Auto-Antikörpertitern (ANA, Anti-Nukleosomen, Anti-dsDNA), dem Verbrauch der Komplementfaktoren C₃ und C₄ sowie der Anzahl betroffener Organsysteme und machte stationäre Aufenthalte und höhere Prednisolon-Dosen erforderlich.

Im Vergleich zeigte sich überraschenderweise die hier erstmals untersuchte SMD-Antwort nach CD25-Depletion ($p=0,005$; $r=0,779$; siehe Abb. 3.15) als der paraklinische Marker mit der besten Korrelation zum SLE-DAI. Der Zusammenhang übertrifft die Korrelationen mit dem ANA-Titer ($p<0,001$; $r=0,719$), dem Anti-dsDNA-Titer ($p<0,001$; $r=0,597$) und dem Anti-Nukleosomen-Titer ($p=0,003$; $r=0,452$) und bietet bei einer aufgeklärten Varianz von 60,7% einen direkten Zugang zur autoreaktiven T-Zell-Immunität.

Bei der Einführung als klinischer Aktivitätsmarker sind allerdings der nicht unerhebliche Laboraufwand und der vergleichsweise hohe Materialbedarf der Methode zu berücksichtigen. Zur Durchführung eines Einzeltests mit der hier verwandten Methode würden bei Mitführung einer Positiv- und einer Negativkontrolle sowie der Anlage von Triplikaten ca. 25 ml heparinisiertes Vollblut benötigt. Bei Verzicht auf Triplikate wären knapp 10 ml nötig. Zugegebenermaßen erscheint eine routinemäßige Bestimmung im klinischen Alltag unter diesen Voraussetzungen eher unrealistisch. Im experimentellen Setting bietet die Methode hingegen einen wertvollen direkten Zugang zur T_H -getragenen Autoreaktivität beim SLE.

4.7 Zeichen der Immunsuppression

In SLE-Kollektiven werden vermehrt Leukopenien und Lymphopenien sowie eine verstärkte Infektneigung beobachtet [106]. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich diese verminderte Immunkompetenz aktiver Patienten auch in der T_H -Antwort gegen das Superantigen SEB widerspiegelt. Tatsächlich zeigt sich ein logarithmischer Zusammenhang von hoher Krankheitsaktivität mit einer verminderten SEB-Antwort ($p=0,011$; $r=-0,395$). Dieser Zusammenhang ist bei einer aufgeklärten Varianz von lediglich 15,6% allerdings als Trend zu bezeichnen (vgl. Abb. 3.16).

Entsprechend der Therapieleitlinien des SLE orientiert sich die Eskalationsstufe der immunsuppressiven Therapie maßgeblich an der Krankheitsaktivität. Als Ausdruck dessen ließ sich in dieser Studie eine starke Korrelation von SLEDAI und Prednisolontagesdosis zeigen ($p<0,001$; $r=0,746$). Die Therapie mit Prednisolon, auch in moderaten Dosen, ist jedoch neben dem Vorhandensein von Organschäden [106] ein weiterer wesentlicher Risikofaktor von infektiösen Komplikationen beim SLE [107].

Um zu untersuchen, ob die Verminderung der SEB-Antwort von der Art oder Stärke der immunsuppressiven Medikation abhängig ist, wurde eine Subgruppenanalyse durchgeführt (Abb. 3.17). Dabei konnte im Kruskal-Wallis-Test kein signifikanter Zusammenhang der SEB-Antwort mit der Höhe der Prednisolontagesdosis ($p=0,199$) oder der Art des Immunsuppressivums gezeigt werden ($p=0,706$). Bei der verringerten SEB-Antwort im aktiven SLE scheint es sich demnach um eine medikationsunabhängige Reaktionsschwäche im Rahmen der Krankheitsaktivität zu handeln.

4.8 Autoaggressive und regulatorische T-Zellen – Ein dynamisches Gleichgewicht

Das Verständnis von der Pathogenese systemischer Autoimmunerkrankungen unterliegt einem stetigen Wandel. Die Forschungsergebnisse der vergangenen Jahre und das zunehmend bessere Verständnis der Modulation des Immunsystems durch die regulatorischen T-Zellen haben ein Umdenken in Gang gesetzt.

Ähnlich des Modells der Karzinogenese wurde auch die Entstehung systemischer Autoimmunerkrankungen als eine Sequenz immunologischer Fehlleistungen interpretiert. Diese sollte mit einem schrittweisen Versagen der Toleranzmechanismen einhergehen, an dessen Ende die autoaggressive Selbstschädigung steht. Mit der Entdeckung der regulatorischen T-Zellen als einer allgegenwärtigen Kontrollinstanz der Immunantwort wurde dieses statische Modell um die Annahme eines dynamischen Gleichgewichtes von autoaggressiven und regulatorischen T-Zellen ergänzt. Die entscheidende Bedeutung einer intakten Kontrolle der autoaggressiven Immunität wird auch an den wiederholten Funden autoaggressiver Zellen in gesunden Spendern deutlich. Folglich kommt den autoreaktiven Zellen nicht *a priori* eine pathologische Bedeutung zu, vielmehr verhindert im Gesunden ein intaktes dynamisches Gleichgewicht autoreaktiver und supprimierender Kräfte eine pathologische Entgleisung.

Die in dieser Arbeit verwandte Methode bietet erstmals die Möglichkeit der direkten zytometrischen Messung der autoreaktiven T_H -Antwort im humanen SLE. Die Ergebnisse bestätigen die Hinweise anderer Arbeitsgruppen auf die Beteiligung einer insuffizienten T_{reg} -Funktion an der Pathogenese des SLE. Gleichzeitig ist aber auch in Abwesenheit der T_{reg} -Zellen nach

CD25-Depletion eine stärkere SMD-Antwort aktiver Patienten zu beobachten. Es ist also von einer zumindest partiell erhaltenen T_{reg} -Funktion auszugehen. Zudem wird die Bedeutung der SMD-spezifischen T_H -Zellen auch und gerade in der aktiven Krankheitsphase betont. Ob die verstärkte SMD-Antwort die alleinige Folge einer partiell insuffizienten T_{reg} -Kontrolle ist, lässt sich jedoch anhand der ermittelten Daten nicht klären. Es bleibt die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen, um die pathogenetisch bedeutsamen Mechanismen dieses dynamischen Gleichgewichts besser zu verstehen.

Erst kürzlich wurden von Humrich *et al.* neue Daten vorgestellt, die das Signalmolekül IL-2 in seiner kritischen Bedeutung für die Aufrechterhaltung der immunologischen Balance in den Fokus rücken. Ausgehend von Hinweisen auf eine numerische und/oder funktionelle Unterlegenheit der T_{reg} -Zellen in Autoimmunerkrankungen [65] untersuchte die Arbeitsgruppe die Rolle der T_{reg} -Zellen im Krankheitsverlauf der NZB/NZW-Lupus-Modellmaus [108].

Es zeigte sich ein zunehmendes homöostatisches Ungleichgewicht von T_{reg} -Zellen und konventionellen T-Zellen mit einem partiellen Zusammenbruch der T_{reg} -Population im peripheren Blut. Dennoch schien die T_{reg} -Population funktionell intakt. So konnte sie Effektor-T-Zellen *in vitro* effektiv unterdrücken, zudem führte eine *in vivo*-CD25-Depletion zu erhöhter Proteinurie und verkürztem Überleben. Andersherum führte der Transfer isolierter $CD4^+ FoxP3^+$ - T_{reg} -Zellen zu verminderter Proteinurie und verlängertem Überleben [108]. Auch hier wird also die Kontrolle der autoreaktiven Immunantwort als eine entscheidende Funktion der T_{reg} -Zellen deutlich.

Der Frage nach der Ursache für das Scheitern der T_{reg} -Kontrolle nachgehend, gewinnt eine weitere Beobachtung an Bedeutung. Mit fortschreitender Erkrankung erlangten die $CD4^+$ -T-Zellen die Fähigkeit zur Produktion von $IFN-\gamma$ und verloren jene zur IL-2-Produktion. Obwohl IL-2 ursprünglich als Schlüsselmolekül der effektiven T_H1 -Antwort entdeckt wurde, scheint es auch für die Aufrechterhaltung einer handlungsfähigen T_{reg} -Population von Bedeutung. So führt die Injektion von anti-IL-2-Antikörpern in der Modellmaus zu einer Verringerung der $CD25^+$ - T_{reg} -Zellen, zu einer Verstärkung der Proteinurie und einem verkürztem Gesamtüberleben. Andersherum konnte eine Intervalltherapie mit rekombinantem rIL-2 die Proteinurie dauerhaft vermindern und das Überleben der Mäuse verlängern. Die $CD4^+ FoxP3^+$ - T_{reg} -Zellen

zeigten eine stärkere Proliferation, sowie eine stärkere CD25-Expression [108].

Mit IL-2 scheint demnach in der Maus ein direkter therapeutischer Zugang zu dem homöostatischen Gleichgewicht von regulatorischen und konventionellen T-Zellen gefunden. Ob sich dieser Ansatz auch auf den humanen SLE gewinnbringend übertragen lässt, müssen zukünftige klinische Studien zeigen.

Auch in anderen Autoimmunerkrankungen gelangen die regulatorischen T-Zellen zunehmend in den Fokus des Forschungsinteresses.

In EAE-Mäusen (EAE: *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*), dem Standard-Tiermodell der Multiplen Sklerose (MS), konnten die T_{reg}-Zellen ebenfalls als wichtiger Gegenspieler der autoreaktiven Immunantwort identifiziert werden. Nach *in vivo*-CD25-Depletion zeigten die Tiere eine erhöhte Krankheitsaktivität und eine verstärkte ³H-Proliferation der Lymphknoten- und Milz-Lymphozyten auf *in vitro*-Restimulation. Weiterhin waren erhöhte Zahlen ZNS-penetrierender CD4⁺-Zellen und vermehrt IFN- γ -Produzenten im ZNS nachweisbar [109].

Zudem ergaben sich Hinweise auf eine streng Autoantigen-spezifische Funktion der T_{reg}-Zellen. Prinzipiell lässt sich die EAE in der Maus sowohl durch die Immunisation mit MOG (*Myelin Oligodendrocytes Glykoprotein*) aus der Ratte als auch aus der Maus auslösen. Die MOGs beider Spezies unterscheiden sich lediglich in 6 Aminosäurepositionen voneinander. Interessanterweise hatte die CD25-Depletion bei rat-MOG-immunisierten Mäusen keinen Effekt auf den Krankheitsverlauf. Demgegenüber führte die CD25-Depletion bei mouse-MOG-immunisierten EAE-Mäusen zu der o. g. erhöhten Krankheitsaktivität. Dies legt nahe, dass die T_{reg}-Kontrolle nur die mouse-MOG-spezifischen autoreaktiven Zellen erfasst. Zusammenfassend scheint also die Kontrollfunktion durch die T_{reg}-Zellen streng Art- und Antigen-spezifisch zu sein und funktioniert nicht im Sinne einer generalisierten ungerichteten Suppression der Effektorzellen [109].

Auch für die Pathogenese der chronisch inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (CIDP) und des Diabetes mellitus Typ 1 (T1D) gewinnen T_{reg}-Zellen an Bedeutung. Für beide Erkrankungen konnte eine verminderte suppressive Potenz der T_{reg}-Population bei unveränderter T_{reg}-Frequenz gezeigt werden [110, 111, 112]. Im Falle des T1D gibt es zusätzlich

– wie weiter oben für den SLE ausgeführt – Hinweise darauf, dass Funktionsverlust und vermehrte Apoptoserate der T_{reg} -Zellen auf einen Mangel an IL-2 zurückzuführen sind. Dessen Produktion durch Effektor-T-Zellen ist auch in T1D-Individuen stark vermindert [113].

4.9 Rolle der regulatorischen T-Zellen bei Tumoren und Infektionen

Nachdem hier in aller Ausführlichkeit über die regulatorischen T-Zellen als große Hoffnung zur Bekämpfung von Autoimmunität berichtet wurde, soll nun auch auf die negativen Effekte einer Überregulation des Immunsystems durch die T_{reg} -Zellen kurz eingegangen werden.

Sowohl Infektionserreger als auch Tumorzellen heuern T_{reg} -Zellen zu ihrem Schutz an, um der gegen sie gerichteten Immunantwort zu entgehen. Ein klassisches Beispiel sind intestinale Fadenwürmer (Nematoden), die periphere Toleranzmechanismen aktivieren, um der Eliminierung zu entfliehen. Diese generalisierte Aktivierung des tolerogenen Systems scheint dabei nicht Antigen-spezifisch zu sein. So konnte gezeigt werden, dass die Infektion von C57BL/6-Mäusen mit einem Malariaerreger, der normalerweise effektiv und schnell eliminiert wird, bei gleichzeitiger Co-Infektion mit *Heligmosomoides polygyrus* (Hg) zu schweren und tödlichen Krankheitsverläufen führt. Die Hg-Infektion schützt somit den Malariaerreger vor der effektiven Bekämpfung durch das Immunsystem. Dieser Effekt ging mit einer Aktivierung von $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ - T_{reg} -Zellen einher. Durch die *in vivo*-CD25-Depletion konnte die effektive Immunantwort gegen Malaria wiederhergestellt werden [114].

Ebenso konnte für *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) eine Unterdrückung der gegen ihn gerichteten T_H17 -Antwort durch die Aktivierung von T_{reg} -Zellen gezeigt werden. Auch hier führte die CD25-Depletion zu einer effektiveren Erregerbekämpfung durch den spezifischen T_H17 -Klon [115]. Dies lässt auch die Rolle von *H. pylori* als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines Magenkarzinoms in einem neuen Licht erscheinen. So wäre eine ineffektive Bekämpfung entarteter Zellen in dem durch *H. pylori* etablierten tolerogenen Mikromilieu denkbar.

Für verschiedene Tumorentitäten konnte bereits eine gezielte Beeinflussung des Immunsystems gezeigt werden. Um der Eliminierung durch na-

türliche Killerzellen (NK-Zellen) zu entgehen, aktivieren Tumorzellen unter anderem T_{reg}-Zellen, die in vielen Tumorpatienten erhöht gemessen werden. In einem murinen Mammakarzinom-Modell ließ sich beispielsweise durch eine *in vivo*-CD25-Depletion die Tumorausbreitung und die pulmonale Metastasierung signifikant reduzieren sowie die Überlebensrate effektiv steigern [116]. Auch in anderen Tumormodellen stärkte eine CD25-Depletion die Generierung Tumor-spezifischer T-Effektorzellen und erhöhte die Effektivität von Tumor-Vakzinen [117].

Anhand der geschilderten Befunde wird die Dynamik regulatorischer Prozesse im Immunsystem deutlich. Eine Auslenkung des Gleichgewichtes in die eine wie in die andere Richtung kann demnach zu schwerwiegenden Pathologien führen.

4.10 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein repräsentatives SLE-Kollektiv auf die autoreaktive T_H-Zell-Antwort und deren Modulation durch die regulatorischen T-Zellen untersucht. Die Messung des Oberflächenmarkers CD40L erwies sich als geeignet zur Identifizierung der autoreaktiven T_H-Antwort gegen das SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid, die zudem besonders in Abwesenheit der CD25⁺-T_{reg}-Zellen eine exzellente Korrelation mit der Krankheitsaktivität zeigte. Diese Methode könnte auch in anderen Autoimmunerkrankungen zum Nachweis und zur Anreicherung Autoantigen-spezifischer T-Zellen eingesetzt werden.

Die erhobenen Daten betonen die zentrale Rolle sowohl der T_{reg}-Zellen als auch der SmD1₈₃₋₁₁₉-spezifischen T_H-Zellen während des schubhaft-dynamischen Krankheitsverlaufs des SLE und bieten damit Ansatzpunkte einer spezifischen Immuntherapie. Zwar ist die bisherige immunsuppressive Therapie des SLE meist sehr wirkungsvoll, allerdings weisen die verwandten Medikamente oft schwere Nebenwirkungen auf. Zudem besitzen die klassischen Medikamente eine geringe Spezifität, indem sie beispielsweise bevorzugt stark proliferierende Zellen des Organismus treffen. Vergleicht man das Immunsystem mit einem Sinfonieorchester, in dem im Falle der Autoimmunität einige Musiker zu laut spielen, so gleichen viele therapeutische Ansätze bisher der Entlassung des halben Orchesters. Das gesamte

Orchester wird damit zwar leiser spielen, die Wiederherstellung des harmonischen Zusammenspiels ist jedoch nicht notwendigerweise erreicht. Die Antigen-spezifische Immuntherapie bietet demgegenüber die Möglichkeit, das Dirigieren des Immun-Orchesters zu erlernen.

Gegenwärtig werden drei Hauptansätze der Immuntherapie verfolgt und haben zum Teil den Sprung in erste klinische Studien geschafft:

1) Transfusion *in vitro* expandierter T_{reg}-Zellen.

Grundlage ist die Isolierung antigenspezifischer T_{reg}-Zellen aus dem peripheren Patientenblut und die nachfolgende *in vitro*-Expansion. Die expandierten T_{reg}-Zellen werden dem Patienten reinfundiert und führen durch Suppression der autoreaktiven Immunantwort zu einer Remissionsinduktion [103, 118]. Auch im SLE-Mausmodell konnte mittels T_{reg}-Transfer die Progression der Nephritis verzögert und ein längeres Überleben erreicht werden [108].

2) *In vivo* T_{reg}-Induktion durch Transfusion unreifer DC.

Wie bereits weiter oben ausgeführt, kommt dem Reifungsgrad der dendritischen Zellen (DC) eine Schlüsselrolle bei der Induktion peripherer Toleranz zu (vgl. Kap. 1.1.5). Die Infusion unreifer, mit Autoantigen beladener DC oder die direkte *in vivo* Adressierung von Antigen über DEC-205 stellen experimentelle Ansätze zur Toleranzinduktion dar [13]. Ein Problem stellt hierbei die Stabilität der unreifen DC dar, die wenn sie in einem inflammatorischen Milieu reifen würden, eine Autoantigen-spezifische T-Zell-Antwort sogar unterstützen könnten [103].

3) ›Tolerisierung‹ versus Immunisierung.

Unter ›Tolerisierung‹ wird die Induktion Antigen-spezifischer Toleranz durch die orale, subcutane oder intravenöse Applikation von Autoantigenen ohne inflammatorische Adjuvantien verstanden [103]. Träger dieser Art der Toleranzinduktion sind wahrscheinlich ebenfalls die DC, die das Antigen in einem tolerogenen Kontext aufnehmen und eine antigenspezifische Toleranz etablieren. Im SLE-Mausmodell konnte durch die intravenöse Applikation des Autoantigens SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid eine Verzögerung der Anti-dsDNA-Antikörper-Produktion, der Entwicklung einer Lupusnephritis sowie eine Lebensverlängerung erreicht werden [119].

Ein weiterer vielversprechender Ansatz wurde kürzlich von Humrich *et al.* publiziert. In Experimenten mit der Lupus-Modellmaus (NZB/NZW) konnte ein Mangel an IL-2 als ein entscheidender Faktor für das Scheitern einer suffizienten T_{reg}-Kontrolle identifiziert werden (vgl. Kap. 4.8). Die Gabe von rekombinantem rIL-2 konnte die Progression der Nephritis verzögern und führte zu einem längeren Überleben der so behandelten Tiere [108]. Die Substitution von IL-2 stellt somit einen weiteren therapeutischen Ansatzpunkt im SLE dar. Entgegen den vorgenannten Therapieansätzen handelt es sich hierbei nicht um eine Antigen-spezifische Immuntherapie. Vielmehr scheint mit IL-2 ein wesentlicher Moderator des immunologischen Gleichgewichtes identifiziert, in das nun erstmals gezielt therapeutisch eingegriffen werden kann.

Inwieweit sich diese beachtenswerten Ergebnisse im Mausmodell in eine effektive Therapie beim Menschen übersetzen lassen, müssen jedoch weitere Experimente und klinische Studien in der Zukunft erweisen.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Obgleich der Systemische Lupus Erythematoses (SLE) gewissermaßen als Prototyp der systemischen Autoimmunerkrankungen gilt, ist seine Pathogenese noch weitgehend unklar. Von Bedeutung scheint im Rahmen des Auftretens von Autoantikörpern gegen dsDNA auch eine mangelnde Kontrolle autoreaktiver T_H -Zellen zu sein. Diese vor allem gegen nukleäre Peptidantigene gerichteten T_H -Zellen können in einer immunologischen Kreuzreaktion die Produktion von Anti-dsDNA-Antikörpern induzieren.

Die Untersuchung autoreaktiver T_H -Zellen gestaltete sich in der Vergangenheit jedoch methodisch schwierig. Hauptgrund hierfür ist ihre sehr geringe Frequenz im peripheren Blut. Dies machte lange Stimulationszeiten von mehreren Tagen erforderlich, um die T_H -Zellen anhand ihrer gesteigerten Proliferation identifizieren zu können. Mit steigender Stimulationsdauer ergab sich allerdings die Schwierigkeit, eine ausreichende Spezifität der Messungen sicherzustellen. Durch Zelluntergang eingetragene nukleäre Antigene (endogene Kontamination) und der Einfluss von außen eingetragener Verunreinigungen (exogene Kontamination) brachten die vorhandenen Methoden an die Grenze ihrer spezifischen Aussagekraft.

In dieser Arbeit wird eine leicht zu handhabende zytometrische Nachweismethode autoreaktiver T_H -Zellen im peripheren Blut von SLE-Patienten vorgestellt. Als Marker für die antigenspezifische Aktivierung wurde CD40L verwandt. Die Stimulationszeit konnte mit 6 Stunden wesentlich kürzer gewählt werden als bei den bisherigen Proliferationsassays. Dies garantiert eine Messung der präformierten autoaggressiven Immunantwort und umgeht den Spezifitätsverlust durch eine mehrtägige Stimulation. Die Methode erlaubt

im selben Arbeitsgang eine genaue zytometrische Phänotypisierung der autoaggressiven Zellen, die zudem einer gezielten Anreicherung und Kultivierung mittels MACS zur Verfügung stehen.

Mittels der CD40L-Expression wurde die autoaggressive T_H-Zell-Antwort in einem repräsentativen SLE-Kollektiv (n= 41 Blutproben) untersucht. Gegen Nukleosomen gerichtete T_H-Zellen konnten bei 6/19 (31,6 %) der untersuchten Proben festgestellt werden. Autoreaktive T_H-Zellen gegen das nukleäre Peptidantigen SmD1₈₃₋₁₁₉ (SMD) ließen sich demgegenüber wesentlich seltener nachweisen 2/41 (4,9 %).

Weiterhin wurde der Einfluss der regulatorischen T-Zellen auf die autoaggressive Immunantwort bei 11 Proben mittels einer *in vitro*-CD25-Depletion untersucht. Durch die Depletion der T_{reg}-Zellen konnte eine Steigerung der T_H-Antwort gegen SMD um 46,6 % erreicht werden (p=0,05), die sich damit signifikant vom Kontrollniveau abhebt (p=0,026). Diese demaskierte SMD-Antwort zeigt zudem eine exzellente Korrelation mit der Krankheitsaktivität gemessen im SLEDAI-Score (p=0,005; r=0,779) und ist in dieser Untersuchung der beste Krankheitsaktivitätsmarker.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Bedeutung des dynamischen Gleichgewichtes autoreaktiver und regulatorischer T-Zellen für die Pathogenese des SLE. Wird die im Rahmen eines Krankheitsschubs verstärkte autoreaktive Immunantwort nicht effektiv durch die regulativen T-Zellen beherrscht, kommt es zur autoreaktiven Selbstschädigung. Die entscheidende Rolle der regulatorischen T-Zellen für die Krankheitsdynamik im humanen SLE konnte hier erstmals in dieser Form gezeigt werden. Regulative T-Zellen und das Autoantigen SmD1₈₃₋₁₁₉-Peptid stellen vielversprechende Ansatzpunkte für zukünftige spezifische Immuntherapien dar.

Die hier etablierte Methode zur zytometrischen Messung autoreaktiver T_H-Zellen im Patientenblut könnte auch in anderen Autoimmunerkrankungen einen direkten Zugang zur autoaggressiven T-Zell-Antwort ermöglichen.

Literaturverzeichnis

- [1] Janeway C.A. & Travers, P. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2002.
- [2] Mosmann, T. R. & Sad, S. *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more*. *Immunol Today*, 17(3):138–146, 1996.
- [3] Firestein, G. S., Roeder, W. D., Laxer, J. A. et al. *A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile*. *J Immunol*, 143(2):518–525, 1989.
- [4] Sakaguchi, S. *Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses*. *Annu Rev Immunol*, 22:531–562, 2004.
- [5] Damoiseaux, J. *Regulatory T cells: back to the future*. *Neth J Med*, 64(1):4–9, 2006.
- [6] Wilson, N. J., Boniface, K., Chan, J. R. et al. *Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells*. *Nat Immunol*, 8(9):950–957, 2007.
- [7] Oukka, M. *Th17 cells in immunity and autoimmunity*. *Ann Rheum Dis*, 67 Suppl 3:iii26–9, 2008.
- [8] Bouillet, P., Purton, J. F., Godfrey, D. I. et al. *BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes*. *Nature*, 415(6874):922–926, 2002.
- [9] Michaels, M. A., Kang, H.-K., Kaliyaperumal, A., Satyaraj, E., Shi, Y. & Datta, S. K. *A defect in deletion of nucleosome-specific autoimmune T cells in lupus-prone thymus: role of thymic dendritic cells*. *J Immunol*, 175(9):5857–5865, 2005.

- [10] Bouneaud, C., Kourilsky, P. & Bousso, P. *Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. Immunity*, 13(6):829–840, 2000.
- [11] Kamradt, T. & Mitchison, N. A. *Tolerance and autoimmunity. N Engl J Med*, 344(9):655–664, 2001.
- [12] Schwartz, R. H. *Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? J Exp Med*, 184(1):1–8, 1996.
- [13] Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y. et al. *Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. J Exp Med*, 194(6):769–779, 2001.
- [14] Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. & Enk, A. H. *Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. J Exp Med*, 192(9):1213–1222, 2000.
- [15] Greidinger, E. L., Gazitt, T., Jaimes, K. F. & Hoffman, R. W. *Human T cell clones specific for heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 autoantigen from connective tissue disease patients assist in autoantibody production. Arthritis Rheum*, 50(7):2216–2222, 2004.
- [16] Herold, G. *Innere Medizin*. Eigenverlag, 2006.
- [17] Bombardier, C., Gladman, D. D., Urowitz, M. B., Caron, D. & Chang, C. H. *Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. Arthritis Rheum*, 35(6):630–640, 1992.
- [18] Bencivelli, W., Vitali, C., Isenberg, D. A. et al. *Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. III. Development of a computerised clinical chart and its application to the comparison of different indices of disease activity. The European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE. Clin Exp Rheumatol*, 10(5):549–554, 1992.
- [19] Vitali, C., Bencivelli, W., Isenberg, D. A. et al. *Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the*

European Workshop for Rheumatology Research. II. Identification of the variables indicative of disease activity and their use in the development of an activity score. The European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE. Clin Exp Rheumatol, 10(5):541–547, 1992.

- [20] Riede, U.-N. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Thieme Verlag, 2004.
- [21] Hiepe, F. & Burmester, G. *Klinik und Diagnostik des systemischen Lupus erythematoses. DMW, 121:1095–1100, 1996.*
- [22] Petri, M., Perez-Gutthann, S., Spence, D. & Hochberg, M. C. *Risk factors for coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus. Am J Med, 93(5):513–519, 1992.*
- [23] Bessant, R., Hingorani, A., Patel, L., MacGregor, A., Isenberg, D. A. & Rahman, A. *Risk of coronary heart disease and stroke in a large British cohort of patients with systemic lupus erythematosus. Rheumatology (Oxford), 43(7):924–929, 2004.*
- [24] Ohlenschlaeger, T., Garred, P., Madsen, H. O. & Jacobsen, S. *Mannose-binding lectin variant alleles and the risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus. N Engl J Med, 351(3):260–267, 2004.*
- [25] Tsutsumi, A., Takahashi, R. & Sumida, T. *Mannose binding lectin: genetics and autoimmune disease. Autoimmun Rev, 4(6):364–372, 2005.*
- [26] Hahn, B. H. *Antibodies to DNA. N Engl J Med, 338(19):1359–1368, 1998.*
- [27] Spronk, P. E., Limburg, P. C. & Kallenberg, C. G. *Serological markers of disease activity in systemic lupus erythematosus. Lupus, 4(2):86–94, 1995.*
- [28] Riemekasten, G. & Hahn, B. H. *Key autoantigens in SLE. Rheumatology (Oxford), 44(8):975–982, 2005.*
- [29] Riemekasten, G., Marell, J., Trebeljahr, G. et al. *A novel epitope on the C-terminus of SmD1 is recognized by the majority of sera from patients with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest, 102(4):754–763, 1998.*

- [30] Arbuckle, M. R., McClain, M. T., Rubertone, M. V. et al. *Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. N Engl J Med*, 349(16):1526–1533, 2003.
- [31] Mason, L. J. & Isenberg, D. A. *Immunopathogenesis of SLE. Baillieres Clin Rheumatol*, 12(3):385–403, 1998.
- [32] Desai, D. D., Krishnan, M. R., Swindle, J. T. & Marion, T. N. *Antigen-specific induction of antibodies against native mammalian DNA in non-autoimmune mice. J Immunol*, 151(3):1614–1626, 1993.
- [33] Riemekasten, G. *Die Rolle eines SmD1 Peptids bei der Entstehung von pathogenetisch bedeutsamen Autoantikörpern beim systemischen Lupus erythematosus. Habilitationsschrift, Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät - Universitätsklinikum Charité*, 2002.
- [34] Koolmann, J. & Röhm, K.-H. *Taschenatlas der Biochemie. Thieme Verlag*, 2003.
- [35] Mohan, C., Adams, S., Stanik, V. & Datta, S. K. *Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. J Exp Med*, 177(5):1367–1381, 1993.
- [36] Pomeranz Krummel, D. A., Oubridge, C., Leung, A. K. W., Li, J. & Nagai, K. *Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution. Nature*, 458(7237):475–480, 2009.
- [37] Stark, H., Dube, P., Luhrmann, R. & Kastner, B. *Arrangement of RNA and proteins in the spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. Nature*, 409(6819):539–542, 2001.
- [38] Tan, E. M. & Kunkel, H. G. *Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. J Immunol*, 96(3):464–471, 1966.
- [39] Riemekasten, G., Langnickel, D., Ebling, F. M. et al. *Identification and characterization of SmD183-119-reactive T cells that provide T cell help for pathogenic anti-double-stranded DNA antibodies. Arthritis Rheum*, 48(2):475–485, 2003.

- [40] Dror, Y., Blachar, Y., Cohen, P., Livni, N., Rosenmann, E. & Ashkenazi, A. *Systemic lupus erythematosus associated with acute Epstein-Barr virus infection. Am J Kidney Dis*, 32(5):825–828, 1998.
- [41] James, J. A., Neas, B. R., Moser, K. L. et al. *Systemic lupus erythematosus in adults is associated with previous Epstein-Barr virus exposure. Arthritis Rheum*, 44(5):1122–1126, 2001.
- [42] Verdolini, R., Bugatti, L., Giangiacomi, M., Nicolini, M., Filosa, G. & Cerio, R. *Systemic lupus erythematosus induced by Epstein-Barr virus infection. Br J Dermatol*, 146(5):877–881, 2002.
- [43] James, J. A., Kaufman, K. M., Farris, A. D., Taylor-Albert, E., Lehman, T. J. & Harley, J. B. *An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. J Clin Invest*, 100(12):3019–3026, 1997.
- [44] James, J. A., Gross, T., Scofield, R. H. & Harley, J. B. *Immunoglobulin epitope spreading and autoimmune disease after peptide immunization: Sm B/B'-derived PPPGMRPP and PPPGIRGP induce spliceosome autoimmunity. J Exp Med*, 181(2):453–461, 1995.
- [45] James, J. A., Scofield, R. H. & Harley, J. B. *Lupus humoral autoimmunity after short peptide immunization. Ann N Y Acad Sci*, 815:124–127, 1997.
- [46] Incaprera, M., Rindi, L., Bazzichi, A. & Garzelli, C. *Potential role of the Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus autoimmunity. Clin Exp Rheumatol*, 16(3):289–294, 1998.
- [47] Krieg, A. M. *CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus? J Clin Immunol*, 15(6):284–292, 1995.
- [48] Yi, A. K., Hornbeck, P., Lafrenz, D. E. & Krieg, A. M. *CpG DNA rescue of murine B lymphoma cells from anti-IgM-induced growth arrest and programmed cell death is associated with increased expression of c-myc and bcl-xL. J Immunol*, 157(11):4918–4925, 1996.
- [49] Marshak-Rothstein, A., Busconi, L., Rifkin, I. R. & Viglianti, G. A. *The stimulation of Toll-like receptors by nuclear antigens: a link between*

- apoptosis and autoimmunity. Rheum Dis Clin North Am*, 30(3):559–574, 2004.
- [50] Boule, M. W., Broughton, C., Mackay, F., Akira, S., Marshak-Rothstein, A. & Rifkin, I. R. *Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. J Exp Med*, 199(12):1631–1640, 2004.
- [51] Murat, J. C., Gamet, L., Cazenave, Y. & Trocheris, V. *Questions about the use of [3H]thymidine incorporation as a reliable method to estimate cell proliferation rate. Biochem J*, 270(2):563–564, 1990.
- [52] Manz, R., Assenmacher, M., Pfluger, E., Miltenyi, S. & Radbruch, A. *Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(6):1921–1925, 1995.
- [53] Suni, M. A., Picker, L. J. & Maino, V. C. *Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. J Immunol Methods*, 212(1):89–98, 1998.
- [54] Waldrop, S. L., Pitcher, C. J., Peterson, D. M., Maino, V. C. & Picker, L. J. *Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. J Clin Invest*, 99(7):1739–1750, 1997.
- [55] Brosterhus, H., Brings, S., Leyendeckers, H. et al. *Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion. Eur J Immunol*, 29(12):4053–4059, 1999.
- [56] Frentsch, M., Arbach, O., Kirchhoff, D. et al. *Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. Nat Med*, 11(10):1118–1124, 2005.
- [57] Lyons, A. B. & Parish, C. R. *Determination of lymphocyte division by flow cytometry. J Immunol Methods*, 171(1):131–137, 1994.
- [58] Angulo, R. & Fulcher, D. A. *Measurement of Candida-specific blastogenesis: comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester labelling*

- of T cells, thymidine incorporation, and CD69 expression. *Cytometry*, 34(3):143–151, 1998.
- [59] Schneider, S. *Antigen- und autoantigenspezifische T- und B-Zellproliferation bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses und gesunden Blutspendern*. Dissertationsschrift, Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2007.
- [60] Kahi, S., Cozon, G. J., Greenland, T., Wallon, M., Gay-Andrieu, F. & Peyron, F. *A rapid flow cytometric method to explore cellular immunity against Toxoplasma gondii in humans*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 5(6):745–748, 1998.
- [61] Michalek, J., Collins, R. H., Durrani, H. P. et al. *Definitive separation of graft-versus-leukemia- and graft-versus-host-specific CD4+ T cells by virtue of their receptor beta loci sequences*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(3):1180–1184, 2003.
- [62] Maino, V. C., Suni, M. A. & Ruitenberg, J. J. *Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation*. *Cytometry*, 20(2):127–133, 1995.
- [63] Koguchi, Y., Thauland, T. J., Slifka, M. K. & Parker, D. C. *Preformed CD40 ligand exists in secretory lysosomes in effector and memory CD4+ T cells and is quickly expressed on the cell surface in an antigen-specific manner*. *Blood*, 110(7):2520–2527, 2007.
- [64] Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J. & Hafler, D. A. *CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood*. *J Immunol*, 167(3):1245–1253, 2001.
- [65] Costantino, C. M., Baecher-Allan, C. M. & Hafler, D. A. *Human regulatory T cells and autoimmunity*. *Eur J Immunol*, 38(4):921–924, 2008.
- [66] Kim, J. M., Rasmussen, J. P. & Rudensky, A. Y. *Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice*. *Nat Immunol*, 8(2):191–197, 2007.

- [67] Hochberg, M. C. *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum*, 40(9):1725, 1997.
- [68] Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W. & Radbruch, A. *High gradient magnetic cell separation with MACS. Cytometry*, 11(2):231–238, 1990.
- [69] Bruns, A., Blass, S., Hausdorf, G., Burmester, G. R. & Hiepe, F. *Nucleosomes are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum*, 43(10):2307–2315, 2000.
- [70] Morales, V. & Richard-Foy, H. *Role of histone N-terminal tails and their acetylation in nucleosome dynamics. Mol Cell Biol*, 20(19):7230–7237, 2000.
- [71] Park, S., Schulze-Luehrman, J., Hayden, M. et al. *The kinase PDK1 integrates T cell antigen receptor and CD28 coreceptor signaling to induce NF-kappaB and activate T cells. Nat Immunol*, 2009.
- [72] Silletta, M. G., Colanzi, A., Weigert, R. et al. *Role of brefeldin A-dependent ADP-ribosylation in the control of intracellular membrane transport. Mol Cell Biochem*, 193(1-2):43–51, 1999.
- [73] Nossent, J. C. *Course and prognostic value of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index in black Caribbean patients. Semin Arthritis Rheum*, 23(1):16–21, 1993.
- [74] Baker, M. D. & Acharya, K. R. *Superantigens: structure-function relationships. Int J Med Microbiol*, 293(7-8):529–537, 2004.
- [75] Kern, F., Bunde, T., Faulhaber, N. et al. *Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. J Infect Dis*, 185(12):1709–1716, 2002.
- [76] Valmori, D., Pessi, A., Bianchi, E. & Corradin, G. *Use of human universally antigenic tetanus toxin T cell epitopes as carriers for human vaccination. J Immunol*, 149(2):717–721, 1992.
- [77] Barbey, C., Pradervand, E., Barbier, N. & Spertini, F. *Ex vivo monitoring of antigen-specific CD4+ T cells after recall immunization with tetanus toxoid. Clin Vaccine Immunol*, 14(9):1108–1116, 2007.

- [78] So, T., Lee, S.-W. & Croft, M. *Immune regulation and control of regulatory T cells by OX40 and 4-1BB. Cytokine Growth Factor Rev*, 19(3-4):253–262, 2008.
- [79] Schneider, S., Bruns, A., Moewes, B. et al. *Simultaneous cytometric analysis of (auto)antigen-reactive T and B cell proliferation. Immunobiology*, 206(5):484–495, 2002.
- [80] Moos, V., Kunkel, D., Marth, T. et al. *Reduced peripheral and mucosal Tropheryma whipplei-specific Th1 response in patients with Whipple's disease. J Immunol*, 177(3):2015–2022, 2006.
- [81] Ashokkumar, C., Talukdar, A., Sun, Q. et al. *Allospecific CD154+ T cells associate with rejection risk after pediatric liver transplantation. Am J Transplant*, 9(1):179–191, 2009.
- [82] Badami, K. G., McQuilkan-Bickerstaffe, S., Wells, J. E. & Parata, M. *Cytomegalovirus seroprevalence and 'cytomegalovirus-safe' seropositive blood donors. Epidemiol Infect*, 137(12):1776–1780, 2009.
- [83] Aue, A., Hennig, H., Kruger, S., Closius, B., Kirchner, H. & Seyfarth, M. *Immunity against diphtheria and tetanus in German blood donors. Med Microbiol Immunol*, 192(2):93–97, 2003.
- [84] Stubbe, M., Swinnen, R., Crusiaux, A., Mascart, F. & Lheureux, P. E. *Seroprotection against tetanus in patients attending an emergency department in Belgium and evaluation of a bedside immunotest. Eur J Emerg Med*, 14(1):14–24, 2007.
- [85] Millet, A., Decaux, O., Perlat, A., Grosbois, B. & Jegou, P. *Systemic lupus erythematosus and vaccination. Eur J Intern Med*, 20(3):236–41, May 2009.
- [86] Holvast, A., van Assen, S., de Haan, A. et al. *Studies of cell-mediated immune responses to influenza vaccination in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum*, 60(8):2438–2447, 2009.
- [87] Valmori, D., Pessi, A., Bianchi, E. & Corradin, G. *Use of human universally antigenic tetanus toxin T cell epitopes as carriers for human vaccination. J Immunol*, 149(2):717–721, 1992.

- [88] Massa, M., De Benedetti, F., Pignatti, P. et al. *Anti-double stranded DNA, anti-histone, and anti-nucleosome IgG reactivities in children with systemic lupus erythematosus. Clin Exp Rheumatol*, 12(2):219–225, 1994.
- [89] Chabre, H., Amoura, Z., Piette, J. C., Godeau, P., Bach, J. F. & Koutouzov, S. *Presence of nucleosome-restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum*, 38(10):1485–1491, 1995.
- [90] Fournel, S. & Muller, S. *Anti-nucleosome antibodies and T-cell response in systemic lupus erythematosus. Ann Med Interne (Paris)*, 153(8):513–519, 2002.
- [91] Burlingame, R. W., Rubin, R. L., Balderas, R. S. & Theofilopoulos, A. N. *Genesis and evolution of antichromatin autoantibodies in murine lupus implicates T-dependent immunization with self antigen. J Clin Invest*, 91(4):1687–1696, 1993.
- [92] Burlingame, R. W., Boey, M. L., Starkebaum, G. & Rubin, R. L. *The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus. J Clin Invest*, 94(1):184–192, 1994.
- [93] Desai-Mehta, A., Mao, C., Rajagopalan, S., Robinson, T. & Datta, S. K. *Structure and specificity of T cell receptors expressed by potentially pathogenic anti-DNA autoantibody-inducing T cells in human lupus. J Clin Invest*, 95(2):531–541, 1995.
- [94] Lu, L., Kaliyaperumal, A., Boumpas, D. T. & Datta, S. K. *Major peptide autoepitopes for nucleosome-specific T cells of human lupus. J Clin Invest*, 104(3):345–355, 1999.
- [95] Gross, S. & Walden, P. *Immunosuppressive mechanisms in human tumors: why we still cannot cure cancer. Immunol Lett*, 116(1):7–14, 2008.
- [96] Yasuma, M., Takasaki, Y., Matsumoto, K., Kodama, A., Hashimoto, H. & Hirose, S. *Clinical significance of IgG anti-Sm antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol*, 17(4):469–475, 1990.

- [97] Sabbatini, A., Dolcher, M. P., Marchini, B., Bombardieri, S. & Migliorini, P. *Mapping of epitopes on the SmD molecule: the use of multiple antigen peptides to measure autoantibodies in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol*, 20(10):1679–1683, 1993.
- [98] James, J. A., Mamula, M. J. & Harley, J. B. *Sequential autoantigenic determinants of the small nuclear ribonucleoprotein Sm D shared by human lupus autoantibodies and MRL lpr/lpr antibodies. Clin Exp Immunol*, 98(3):419–426, 1994.
- [99] Riemekasten, G., Weiss, C., Schneider, S. et al. *T cell reactivity against the SmD1(83-119) C terminal peptide in patients with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis*, 61(9):779–785, 2002.
- [100] Yan, B., Ye, S., Chen, G., Kuang, M., Shen, N. & Chen, S. *Dysfunctional CD4+, CD25+ regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferon-alpha-producing antigen-presenting cells. Arthritis Rheum*, 58(3):801–812, 2008.
- [101] La Cava, A. *T-regulatory cells in systemic lupus erythematosus. Lupus*, 17(5):421–425, 2008.
- [102] Barreto, M., Ferreira, R. C., Lourenco, L. et al. *Low frequency of CD4+CD25+ Treg in SLE patients: a heritable trait associated with CTLA4 and TGFbeta gene variants. BMC Immunol*, 10:5, 2009.
- [103] Humrich, J. & Riemekasten, G. *Regulatory T cells in rheumatic diseases. Dtsch Med Wochenschr*, 131(41):2288–2291, 2006.
- [104] Miyara, M., Amoura, Z., Parizot, C. et al. *Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. J Immunol*, 175(12):8392–8400, 2005.
- [105] Alvarado-Sanchez, B., Hernandez-Castro, B., Portales-Perez, D. et al. *Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. J Autoimmun*, 27(2):110–118, 2006.
- [106] Jallouli, M., Frigui, M., Marzouk, S., Maaloul, I., Kaddour, N. & Bahloul, Z. *Infectious complications in systemic lupus erythematosus: a series of 146 patients]. Rev Med Interne*, 29(8):626–631, 2008.

- [107] Ruiz-Irastorza, G., Olivares, N., Ruiz-Arruza, I., Martinez-Berriotxo, A., Egurbide, M.-V. & Aguirre, C. *Predictors of major infections in systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther*, 11(4):R109, 2009.
- [108] Humrich, J. Y., Morbach, H., Undeutsch, R. et al. *Homeostatic imbalance of regulatory and effector T cells due to IL-2 deprivation amplifies murine lupus. Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(1):204–209, 2010.
- [109] Akirav, E. M., Bergman, C. M., Hill, M. & Ruddle, N. H. *Depletion of CD4(+)CD25(+) T cells exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis induced by mouse, but not rat, antigens. J Neurosci Res*, 87(15):3511–3519, 2009.
- [110] Sanvito, L., Makowska, A., Gregson, N., Nemni, R. & Hughes, R. A. C. *Circulating subsets and CD4(+)CD25(+) regulatory T cell function in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. Autoimmunity*, 42(8):667–677, 2009.
- [111] Lindley, S., Dayan, C. M., Bishop, A., Roep, B. O., Peakman, M. & Tree, T. I. M. *Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. Diabetes*, 54(1):92–99, 2005.
- [112] Brusko, T. M., Wasserfall, C. H., Clare-Salzler, M. J., Schatz, D. A. & Atkinson, M. A. *Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes. Diabetes*, 54(5):1407–1414, 2005.
- [113] Jailwala, P., Waukau, J., Glisic, S. et al. *Apoptosis of CD4+ CD25(high) T cells in type 1 diabetes may be partially mediated by IL-2 deprivation. PLoS One*, 4(8):e6527, 2009.
- [114] Tetsutani, K., Ishiwata, K., Ishida, H. et al. *Concurrent infection with Heligmosomoides polygyrus suppresses anti-Plasmodium yoelii protection partially by induction of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg in mice. Eur J Immunol*, 39(10):2822–2830, 2009.
- [115] Kao, J., Zhang, M., Miller, M. et al. *Helicobacter pylori Immune Escape Is Mediated by Dendritic Cell-Induced Treg Skewing and Th17 Suppression in Mice. Gastroenterology*, 2009.

- [116] Hong, H., Gu, Y., Zhang, H. et al. *Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells enhances natural killer T cell-mediated anti-tumour immunity in a murine mammary breast cancer model. Clin Exp Immunol*, 159(1):93–99, 2009.
- [117] Poehlein, C., Haley, D., Walker, E. & Fox, B. *Depletion of tumor-induced Treg prior to reconstitution rescues enhanced priming of tumor-specific, therapeutic effector T cells in lymphopenic hosts. Eur J Immunol*, 39(11):3121–3133, 2009.
- [118] Bluestone, J. A. *Regulatory T-cell therapy: is it ready for the clinic? Nat Rev Immunol*, 5(4):343–349, 2005.
- [119] Riemekasten, G., Langnickel, D., Enghard, P. et al. *Intravenous injection of a D1 protein of the Smith proteins postpones murine lupus and induces type 1 regulatory T cells. J Immunol*, 173(9):5835–5842, 2004.

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
ACR	American College of Rheumatology
Ak	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
APC	Antigen-Präsentierende Zellen
APC	Allophycocyanin
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
C ₃ , C ₄	Komplementfaktor 3 bzw. 4
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxylfluoreszein-Succinimidylester
CIDP	Chronisch Inflammatorische Demyelinisierende Polyneuropathie
CMV	Cytomegalievirus; Cytomegalievirus-Peptid pp65
cNUC	chicken-Nukleosomen
CO ₂	Kohlendioxid
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
DC	Dendritische Zellen
Δ	Differenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EBNA	Epstein-Barr-Virus Nuclear Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECLAM	European Consensus Lupus Activity Measure

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	Forward Scatter
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenzkanal
FoxP3	Forkhead box P3
g	Erdbeschleunigung
GN	Glomerulonephritis
HCV	Hepatitis-C-Virus
Hg	Heligmosomoides polygyrus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
hnRNA	heterogeneous nuclear RNA
hNUC	humane Nukleosomen
H. pylori	Helicobacter pylori
Ig	Immunglobulin, Subtypen: IgM, IgG, IgA
IL	Interleukin
INF	Interferon
KHK	Koronare Herzkrankheit
MACS	Magnet-Activated Cell Sorting
MHC	Major-Histokompatibilitäts-Komplex
MOG	Myelin Oligodendrocytes Glykoprotein
mRNA	messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl
NUC	Nukleosomen
NZB/NZW	New Zealand Black/New Zealand White (SLE-Mausmodell)
p	p-Wert
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-a
PFA	Paraformaldehyd
PJ	Propidiumjodid
PRR	Pattern-Recognition-Rezeptoren
r	Korrelationskoeffizient
r ²	Bestimmtheitsmaß
rIL-2	rekombinantes IL-2
RND	Randomisiertes Peptid; Summenformel wie SMD
RNA	Ribonukleinsäure
RPGN	Rasch Progrediente Glomerulonephritis
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
SLAM	Systemic Lupus Activity Measure
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosis Disease Activity Index
SMD	SmD ₁₈₃₋₁₁₉ -Peptid
snRNA	small nuclear RNA
snRNP	small nuclear Ribonukleoprotein
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SSC	Sideward Scatter
syn.	synonym
T _C	Cytotoxische T-Zellen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TET	Tetanus-Toxoid
TGF	Transforming Growth Factor
T _H	T-Helfer-Zellen, Subgruppen: T _H 1, T _H 2, T _H 3, T _H 17, T _H 0
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
TSH	Thyreoidea-Stimulierendes Hormon
T1D	Diabetes mellitus Typ I

UNST	Unstimulierte Probe, Negativkontrolle
UV	Ultraviolett
w/v	weight per volume
ZNS	Zentralnervensystem

Danksagung

Meiner Arbeitsgruppenleiterin Frau Prof. Dr. Riemekasten bin ich zu großem Dank verpflichtet – für die Überlassung des Themas, die kritische Durchsicht des Manuskripts, interessante Anregungen und die exzellente Labor-Infrastruktur im DRFZ.

Einen herzlichen Dank meinem Betreuer Dr. Philipp Enghard für die engagierte Betreuung und Unterstützung sowie die gemeinsamen Diskussionen. Reinmar Undeutsch danke ich für die geduldige Einführung in die Laborarbeit und die hingebungsvolle IT-Beratung. Ebenso möchte ich die übrigen Mitglieder der Arbeitsgruppe (Angela Kill, Jeannine Guenther, Jens Humrich, Olivia Weigert) erwähnen, die stets für gute Stimmung, angenehmes Arbeiten und nötigenfalls schnelle Hilfe sorgten.

Im DRFZ danke ich der AG Thiel für die Überlassung des CD137-Färbeantikörpers und selbstverständlich Dörte Huscher für die brillante statistische Beratung. In der Charité gilt mein Dank Frau Dr. Backhaus für die Blutproben aus der Lupus-Sprechstunde und den Tagesklinik-Schwestern Beate Follendorf und Daniela Krahl für die nette und unkomplizierte Zusammenarbeit. Auf Station 127 war Dr. Udo Schneider mein stets gutgelaunter und hilfsbereiter Ansprechpartner. Herrn Prof. Dr. Hofmann (Virologie CCM) und Herrn Dr. Dr. Egerer (Rheumatologisches Labor) danke ich für die Bestimmung der CMV- und Auto-Antikörper-Titer.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mitbewohnerin und guten Freundin Franziska Weber – für das Redigieren des Manuskripts und die Beratung bei Abbildungsgestaltung, Layout und Satz. Meinem Vater Dr. Friedhelm Engler danke ich für anregende Diskussionen und für die Rückkehr zum bildlichen Verstehen und einer ganzheitlichen Betrachtung.

Lebenslauf

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

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Jan Broder Engler, dass die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: »Autoaggressive und regulatorische T-Zellen beim Systemischen Lupus Erythematoses« von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den

Jan Broder Engler