

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Nephrologie und Internistische Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Antirenale T-Zell Autoreaktivität bei humaner Lupusnephritis

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Tesch

aus Berlin

Datum der Promotion: 17. September 2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	4
Abstract auf Deutsch.....	6
Abstract auf Englisch.....	7
1. Einleitung.....	8
1.1. T-Zellen in der Pathogenese der Lupusnephritis?.....	8
1.2. CD4 ⁺ T-Zellen.....	8
1.2.1. T-Zell Subsets.....	8
1.2.3. T-Zell Aktivierung.....	9
1.3. Probleme und Methoden der Messung antigenspezifischer T-Zellen.....	10
1.3.1. Einführung.....	10
1.3.2. MHC-Multimere.....	10
1.3.3. ARTE-Methode.....	11
1.3.4. T-Zell Bibliotheken.....	11
1.4. Zusammenfassung der Einleitung und Fragestellung dieser Arbeit.....	12
2. Kurzvorstellung der Versuche.....	13
2.1. Identifikation potentieller Antigene.....	13
2.2. Durchflusszytometrie und Zellanreicherung.....	13
2.3. T-Zell Bibliotheken.....	13
3. Verwendete Materialien.....	14
3.1. Verwendete Materialien (Liste).....	14
3.1.1. Materialien zur Blutentnahme.....	14
3.1.2. Gerätschaften im Labor.....	14
3.1.3. Labormaterial.....	15
3.1.4. Reagenzien, und Lösungen.....	15

3.1.5. Antikörper und Microbeads	16
3.1.6. Antigene	16
3.1.7. Software / Datenbanken.....	16
4. Vertiefende Beschreibung der Methoden.....	18
4.1. Allgemeine Arbeitsschritte	18
4.1.1. Steriles Arbeiten.....	18
4.1.2. Gewinnung der peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs).....	18
4.1.3. Zellzählung.....	18
4.1.4.. Zellanreicherung mithilfe magnetischer Microbeads.....	19
4.1.5. Vorbereitung der Antigene	19
4.2. Stimulation und Messung mit der Durchflusszytometrie	20
4.2.1. Allgemeine Funktionsweise der Durchflusszytometrie.....	20
4.2.2. Stimulation	20
4.2.3. Zellernte	21
4.2.4. Zellmarkierung mit CD154-Biotin Microbeads.....	21
4.2.5. Zellanreicherung und Färbung CD154 ⁺ T-Zellen	21
4.2.6. Färbung der originalen Probe	22
4.2.7. Analyse der Zellpopulationen.....	22
4.2.8. Errechnung der Anzahl autoreaktiver T-Zellen	23
4.3. T-Zell Bibliotheken	24
4.3.1.Einführung.....	24
4.3.2. Zellisolierung und Ansetzen der T-Zell Bibliotheken	24
4.3.3. Expansion der T-Zellkulturen	25
4.3.4. Stimulation	26
4.3.5. Zellernte und Messung.....	26
4.3.6. Urin T-Zell Bibliotheken.....	27
4.3.7. Errechnung der Anzahl autoreaktiver T-Zellen in T-Zell Bibliotheken	27

4.4. Statistische Auswertung	28
5. Fazit	29
5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	29
5.2. Spekulation über einen potentiellen Pathomechanismus	29
5.3. Mögliche klinische Anwendung.....	29
5.4. Forschungsausblick.....	30
Literaturverzeichnis	31
Eidesstattliche Versicherung.....	33
Anteilerklärung	34
Auszug aus der Journal Summary List.....	35
Druckexemplar der ausgewählten Publikation	36
Lebenslauf.....	47
Publikationsliste	49
Danksagung	50

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zelle (antigen presenting cell) / Allophycocyanin
ARTE	Antigen-reaktive T cell enrichment
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
CO ₂	Kohlendioxid
cpm	Zählungen pro Minute (counts per minute)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRFZ	Deutsches Rheuma Forschungszentrum
EDTA	Ethylendiamintetrasäure
FSC	Forward Scatter
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HLA	Human leukocyte antigen
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
ICAM-2	Intercellular adhesion molecule 2
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LFA-2	Lymphocyte function-associated antigen 2
LN	Lupusnephritis
mCi	Millicurie
MHC	Major histocompatibility complex
ml	Milliliter
n.a.	nicht anwendbar
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered Saline
PE	Phycoerythin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll Proteinkomplex
PHA	Polyhydroxyalkanoate
PFA	Paraformaldehyd

ROR γ t	RAR-related orphan receptor gamma t
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SEB	Staphylococcal Enterotoxin B
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SLEDAI	SLE disease activity index
SSC	sideward scatter
TGF- β	Transforming growth factor β
Th-Zelle	T-Helferzelle
T-kon	konventionelle T Zelle (hier CD3 und CD4 positive T Zelle)
Z.B.	Zum Beispiel
xg	Maßeinheit für die Zentrifugation (relative Zentrifugalkraft)
μ l	Mikroliter
μ g	Mikrogramm

Liste der CD Moleküle [1]

Name	Funktion
CD2	Bindet an CD58, Adhäsionsmolekül
CD3	Signalweitergabe im T-Zell Rezeptor
CD4	Ko-Rezeptor des T-Zell Rezeptors (bindet an MHC II)
CD8	Ko-Rezeptor des T-Zell Rezeptors (bindet an MHC I)
CD28	Aktivierender T-Zell Rezeptor
CD40	Aktivierender Rezeptor der an CD154 auf T-Zellen bindet
CD58	Adhäsionsmolekül, bindet an CD2
CD80	Vorhanden auf APCs, bindet an CD28 und stimuliert die T-Zelle
CD86	Vorhanden auf APCs, bindet an CD28 und stimuliert die T-Zelle
CD154	Stimulierender Rezeptor, bindet an CD40

Hinweis:

Für personenbezogene Bezeichnungen die inhaltlich nicht eindeutig auf das Geschlecht bezogen sind, wird in dieser Arbeit aus Gründen einer besseren Lesbarkeit die männliche Form genutzt.

Abstract auf Deutsch

Einleitung: CD4⁺ T-Zellen stehen im Zentrum einer normalen adaptiven Immunantwort. Aber auch für die Pathogenese der humanen Lupusnephritis wird antigenspezifischen, autoreaktiven T-Zellen eine potentielle Rolle zugesprochen. Es sind jedoch weder renale Antigene noch die beteiligten T-Zell Subsets bekannt.

Methoden: Potentielle Nierenantigene wurden identifiziert unter der Annahme, dass bei aktiver Lupusnephritis entsprechende Autoantikörper vorhanden sein müssten, deren Ziele im Niereninterstitium besonders exprimiert werden. CD4⁺ T-Zellen wurden nun mit einem Pool aus diesen Antigenen stimuliert, magnetisch für CD154 angereichert und mit der Durchflusszytometrie gemessen. Mit [³H]-Thymidin Inkorporationsassays und T-Zell Bibliotheken wurden dann die jeweiligen Reaktivitäten gegen einzelne Antigene näher bestimmt. Bei drei Patientinnen erfolgte dies auch für das Antigen Vimentin und aus dem Urin isolierte T-Zellen.

Ergebnisse: Es wurden fünf potentielle renale Antigene gefunden. Bei Patientinnen mit aktiver Lupusnephritis konnte eine antigenspezifische, antirenale Immunantwort detektiert werden, die vor allem von IFN- γ produzierenden T-Zellen dominiert wurde. Zusätzlich konnte auch eine signifikante Anzahl IL-10 produzierender Zellen gefunden werden. Die Zellfrequenzen für beide Subsets korrelierten dabei mit der Krankheitsaktivität. In den T-Zell Bibliotheken wurden Vimentin und Annexin A2 als Haupt-Einzelantigene identifiziert, wobei auch hier eine Korrelation mit der Krankheitsaktivität gefunden wurde. Bei drei Patientinnen fanden sich mehr autoreaktive T-Zellen im Urin als im Blut.

Zusammenfassung: Bei der humanen Lupusnephritis treten autoantigen-spezifische, gegen renal-exprimierte Antigene reagierende Th1 Zellen auf, die in der Pathogenese eine zentrale Rolle spielen könnten und sich als Ziel für zukünftige Therapien anbieten.

Abstract auf Englisch

Introduction: In the course of a normal immune response many different immune cells interact with CD4⁺ T cells. In human lupus nephritis antigen-specific CD4⁺ T cells are thought to contribute to local damage in the kidneys. However, no renal target antigens are known at present. Moreover, it is not clear which T cell subsets interact with potential kidney antigens.

Methods: Potential renal antigens were identified based on the assumption that during active lupus nephritis corresponding autoantibodies would be present whose targets show an increased expression in renal interstitium. All antigens were collected in an antigen-pool and used to stimulate blood-derived CD4⁺ T cells, which were then magnetically enriched for the activation marker CD154 and measured with flow cytometry. Reactivity against all single antigens was also independently evaluated in T cell libraries with [³H]-Thymidine incorporation assays. For three patients urinary T cell libraries were also created.

Results: Five potential renal antigens were found. In patients with active lupus nephritis an antigen-specific response against all these antigens was identified, which was dominated by IFN- γ producing CD4⁺ T cells. A significant number of IL-10 producing CD4⁺ T cells was also found. Cell frequencies for both subsets correlated with disease activity. Vimentin and Annexin A2 were identified as the main T cell targets in T cell libraries. Again, frequencies correlated with disease activity. In three patients more auto-reactive T cells were detected in urine compared to blood.

Conclusions: Autoantigen-specific Th1 cells react against renally expressed antigens in human lupus nephritis patients. These cells are likely involved in the pathogenesis of human lupus nephritis and could represent future treatment targets.

1. Einleitung

1.1. T-Zellen in der Pathogenese der Lupusnephritis?

Bei der Lupusnephritis kommt es zur Ablagerung von Immunkomplexen, Komplementfaktoren und Antikörpern in den Glomerula der Nieren, wodurch eine lokale Entzündungsreaktion hervorgerufen wird [2]. Diese führt zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, die weitere Immunzellen aktivieren oder in die Niere locken [3]. Intrarenale Plasmazellen sind außerdem in der Lage dort autoreaktive Antikörper zu produzieren [4]

Aber auch T-Zellen scheinen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der LN zu spielen. Zusätzlich zur glomerulären Beteiligung wurde ein interstitielles Infiltrat beschrieben, welches zwar auch aus CD8⁺ T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen besteht, sich aber vor allem aus CD4⁺ T-Helferzellen zusammensetzt [5]. Dieses Infiltrat korreliert außerdem besonders gut mit der jeweiligen Prognose der Patienten [6]. Bei der Analyse von T-Zell Rezeptoren in der Niere konnte gezeigt werden, dass diese eine eingeschränkte Diversität besitzen [7]. Diese Oligoklonalität könnte auf die selektive Migration bestimmter T-Zellen hindeuten. Darüber hinaus wurde außerdem eine lokale MHC (major histocompatibility complex) II Expression auf Nierenepithelzellen beschrieben, die damit in der Lage wären, infiltrierenden T-Zellen spezifische Nierenantigene zu präsentieren [8].

Oligoklonalität und MHC II Expression deuten auf antigenspezifische T-Zellen hin. Es sind zurzeit aber weder renale Antigene bekannt, noch ist klar, welche T-Zell Subsets eine besondere Rolle spielen könnten.

1.2. CD4⁺ T-Zellen

1.2.1. T-Zell Subsets

CD4⁺ T-Zellen können in verschiedene Subklassen unterteilt werden, die je nach infektiösem Stimulus und vorherrschenden Zytokineinflüssen induziert werden. Zusätzlich kann nach dem T-Zell Rezeptor in $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen unterschieden werden, wobei $\gamma\delta$ T-Zellen in dieser Arbeit nicht untersucht wurden [1].

Zu den Haupt-Subsets der $\alpha\beta$ T-Zellen gehören Th1-Zellen, welche z.B. als Antwort auf Viren oder intrazelluläre Pathogene selektiert werden, Th2-Zellen, die ihre Hauptaufgabe in der Unterstützung der humoralen Immunantwort haben und Th17-Zellen, die häufig bei Bakterien oder Pilzinfektionen auftreten [1]. Die unterschiedlichen Zelllinien aktivieren verschiedene Haupttranskriptionsfaktoren. Für Th1-Zellen ist dies Tbet, für Th2-Zellen GATA-3 und für Th17-Zellen ROR γ t [9].

Die verschiedenen Subsets sind in der Lage viele verschiedene Zytokine zu produzieren. Dabei sind einige jedoch besonders typisch für bestimmte Zelllinien und können daher als Marker-Zytokine genutzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde für Th1-Zellen IFN- γ , für Th2-Zellen IL-4 und für Th17 Zellen IL-17 gewählt [9].

1.2.3. T-Zell Aktivierung

Im Verlauf einer normalen Immunantwort migriert eine Antigen-präsentierende Zelle (APC) in einen lokalen Lymphknoten und zeigt den dort ansässigen CD4⁺ T-Zellen ein Antigen über MHC II Moleküle [10]. Es bildet sich dabei die sogenannte immunologische Synapse zwischen der T-Zelle und der APC [11]. Nun wird überprüft, ob das jeweils präsentierte Antigen zum jeweiligen T-Zell Rezeptor (TCR) passt. Wichtig hierbei ist, dass eine T-Zelle mit ihrem Rezeptor keine freien Antigene erkennen kann (wie es z.B. Antikörper vermögen), sondern diese immer erst über MHC II von einer Zelle präsentiert bekommen muss (MHC-Restriktion) [12].

Die Zellbindung in der immunologischen Synapse erfolgt über den TCR, der das im MHC II Molekül gebundene Antigen erkennt, sowie Bindungs- und Co-Stimulationsrezeptoren [11]. Über LFA-1, LFA-2 und CD2 auf der T-Zelle und ICAM-1, ICAM-2 und CD58 auf der dendritischen Zelle ist die Verbindung der beiden Zellen zunächst nicht besonders fest. Passt der jeweilige T-Zellrezeptor jedoch zum präsentierten Antigen wird diese Bindung durch Konformationsänderungen sehr viel enger [11]. Zusätzlich bilden sich weitere Interaktionen z.B. CD28 (T-Zelle) und CD80 oder CD86 (dendritische Zelle), oder CD40 (B Zelle) und CD40-Ligand (CD154, T-Zelle) aus [11]. Darüber hinaus sezerniert die APC verschiedene Zytokine. Je nach vorherrschendem Signalmuster differenziert sich die T-Zelle dann in verschiedene Subklassen (z.B. Th1, Th2, Th17 etc.), mit ihren jeweiligen Effektorfunktionen [9].

1.3. Probleme und Methoden der Messung antigenspezifischer T-Zellen

1.3.1. Einführung

Das größte Problem der Messung antigenspezifischer T-Zellen liegt in ihrer außerordentlich geringen Frequenz. Im naiven T-Zell Pool kann man z.B. von Frequenzen im Bereich von 0,00002 % bis 0,0006 % ausgehen [13]. Insgesamt liegen die Frequenzen von antigenspezifischen T-Zellen für Tumor-, Umwelt-, Neo- oder Autoantigene meist unter 0.01 %, womit die normale Durchflusszytometrie an ihre Auflösungsgrenze stößt [13].

Zur Detektion dieser T-Zellen waren also weitreichende methodische Neuentwicklungen nötig. Im Prinzip werden dabei zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt: einerseits die Markierung von T-Zell Rezeptoren mit MHC-Multimeren oder andererseits die Messung der T-Zell Reaktivität anhand der Expression von Zellmolekülen oder anhand der Proliferation [13]. Beide Methoden bieten verschiedene Vor- und Nachteile.

1.3.2. MHC-Multimere

Wie bereits dargestellt muss eine T-Zelle zur spezifischen Aktivierung ein mit Antigen(fragment) beladenes MHC II Molekül an ihren Rezeptor binden. Solch ein Antigen-MHC II Komplex kann auch im Labor hergestellt werden. Um Affinitätsprobleme zu umgehen werden dafür MHC-Multimere (auch Tetramere genannt) genutzt [13].

Ein Vorteil dieser Methode ist, dass keine APCs mehr nötig sind und man z.B. durch die Darstellung der immunologischen Synapse eine antigenspezifische Bindung nachvollziehen kann. Damit wird im Gegensatz zu anderen Methoden diese direkt gezeigt und nicht über die Produktion von Zytokinen oder die Expression von Markermolekülen darauf geschlossen [14].

Nachteilig an dieser Methode ist das Problem, dass für jeden HLA-Typ eigene Tetramere hergestellt werden müssen, um keine unspezifischen Reaktionen gegen Fremdproteine auszulösen [14]. Zusätzlich muss das verwendete Antigenepitop klar definiert sein, damit der entsprechende MHC-Multimer damit beladen werden kann [13].

Außerdem ist über die Detektion der Zellbindung zunächst einmal keine Aussage zur Funktionalität der T-Zelle (Subtyp, Zytokinmuster) möglich [13]. Im Vergleich zu den weiter unten dargestellten Verfahren scheint für die Bearbeitung der in dieser Arbeit zu untersuchenden Problematik die Herstellung von MHC-Multimeren weniger geeignet.

1.3.3. ARTE-Methode

Um die Detektionslimitationen der Durchflusszytometrie zu umgehen, wurde die sogenannte „ARTE-Methode“ entwickelt.“ Dies steht für „antigen-reactive T cell enrichment“ und beschreibt den Ansatz antigenspezifische T-Zellen vor der Messung magnetisch aus dem Hintergrund heraus anzureichern [15]. Der dafür zunächst favorisierte Aktivierungsmarker CD69 stellte sich aufgrund von unspezifischer Aktivierung und einer Expression auch auf unstimulierten Zellen als unzureichend heraus [13]. Als bessere Alternative wurde CD154 identifiziert [15]. Dieses wird von CD4⁺ T-Zellen bei der antigenspezifischen Aktivierung in der immunologischen Synapse exprimiert. Die Expression tritt nach Aktivierung nach 4-12 Stunden auf, so dass durchflusszytometrisch sehr gut gleichzeitig Zytokine gemessen werden können [13]. Damit lassen sich Aussagen zu T-Zell Subtypen und Funktionen treffen. Außerdem ist es möglich, die Zellen auch mit komplexeren Antigenen (oder Antigenmischungen) zu stimulieren. Nachteilig an der Methode sind die z.T. hohen benötigten Ausgangszellzahlen und die Gefahr der unspezifischen Aktivierung z.B. durch Bestandteile von Trägerlösungen. In dieser Arbeit wurde die ARTE-Methode genutzt um T-Zellen mit einem Pool möglicher Antigene zu stimulieren.

1.3.4. T-Zell Bibliotheken

Eine weitere Möglichkeit seltene T-Zellen zu erfassen besteht darin, T-Zell Bibliotheken anzulegen [16]. Mit dem Ziel alle Zellen polyklonal zu expandieren werden die Bibliotheken mehrere Wochen lang bebrütet. Wenn die expandierten Kulturen dann stimuliert werden, kann durch die nun auch in größerer Zahl vorhandenen antigenspezifischen Zellen deren Reaktivität besser gemessen werden. Größter Nachteil dieser Methode ist der sehr große Arbeits- und Zeitaufwand. Zusätzlich müssen die Zellen gleichmäßig expandiert werden und je nachdem mit welchen Zellzahlen die Bibliotheken angelegt werden, besteht ein Frequenzfenster, in welchem

sich die zu detektierenden Zellen befinden müssen. Bei der üblichen Messung der Proliferation anhand des Einbaus von [³H]-Thymidin werden zudem keine Subtypen analysiert und es muss mit radioaktivem Material gearbeitet werden. T-Zell Bibliotheken wurden in dieser Arbeit genutzt, um die in der Durchflusszytometrie detektierten Reaktivitäten auch gegen einzelne Antigene näher zu untersuchen und zu bestätigen.

1.4. Zusammenfassung der Einleitung und Fragestellung dieser Arbeit

Für die Pathogenese der Lupusnephritis deuten Oligoklonalität und MHC II Expression auf eine potentielle Rolle antirenaler, antigenspezifischer T-Zellen hin. Es ist jedoch weder bekannt welche Subsets dabei eine besondere Rolle spielen, noch gegen welche Antigene sie reagieren könnten. Ziel dieser Arbeit war es daher, sowohl potentielle renale Antigene als auch die beteiligten T-Zell Subsets zu charakterisieren. Um den Herausforderungen der Messung von autoreaktiven T-Zellen einerseits und der relativen Rarität akuter Schübe der Lupusnephritis andererseits zu begegnen wurden zwei komplementäre Methoden genutzt: die Durchflusszytometrie mit vorheriger Zellanreicherung (ARTE-Methode) und die Proliferationsmessung von in Bibliotheken expandierten T-Zellen.

2. Kurzvorstellung der Versuche

2.1. Identifikation potentieller Antigene

Durch Literaturanalyse wurden zunächst Antikörper gesucht, die eine starke Assoziation mit der Lupusnephritis aufwiesen. In einem zweiten Schritt wurde dann die Genexpression der Antikörperziele in der Niere von Patienten anhand der Geo-Datenbank untersucht. Diejenigen, bei denen eine erhöhte Expression festgestellt werden konnte, wurden ausgewählt.

2.2. Durchflusszytometrie und Zellanreicherung

Nach Stimulation mit einem Pool, der alle identifizierten Antigene enthielt, wurden Zellen magnetisch für CD154 angereichert. Diese antigenspezifischen T-Zellen wurden dann mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. Einzelne Subsets wurden anhand von Markerzytokinen bestimmt.

2.3. T-Zell Bibliotheken

In T-Zell Bibliotheken wurden die Reaktivität der T-Zellen gegen die einzelnen Antigene des Antigenpools näher untersucht. Dabei wurde die Inkorporation von [³H]-Thymidin nach Stimulation mit einzelnen Antigenen gemessen. Anhand der Messdaten wurden die Frequenzen autoreaktiver Zellen errechnet.

Von drei Patientinnen wurden zusätzlich Bibliotheken von T-Zellen aus dem Urin angelegt. In diesen wurde die Reaktivität gegen das Antigen Vimentin untersucht. Dabei konnten zusätzlich die Frequenzen zwischen Blut und Urin verglichen werden.

3. Verwendete Materialien

In der vertiefenden Beschreibung der Versuche wird auf die Nennung der Hersteller der jeweils genutzten Materialien und Geräte zugunsten einer besseren Lesbarkeit verzichtet. Die Hersteller können in der folgenden Liste nachgeschlagen werden.

3.1. Verwendete Materialien (Liste)

3.1.1. Materialien zur Blutentnahme

Softasept® N Desinfektionsmittel	Braun (Melsungen, D)
Vacutainer® Safety-Lok™	BD (Heidelberg, D)
Vacutainer® 10 ml Heparin	BD (Heidelberg, D)

3.1.2. Gerätschaften im Labor

BD FACSAria™ II	BD Biosciences (Heidelberg, D)
CASY® TT	Roche Innovatis AG (Reutlingen, D)
Centrifuge 5804 R	Eppendorf (Hamburg, D)
Cryokonservierer Biosafe®	Cryotherm (Kirchen/ Sieg, D)
Einkanal-Pipetten Research®	Eppendorf (Hamburg, D)
Einkanal-Pipetten Research® plus	Eppendorf (Hamburg, D)
Gammacell® 40 Exactor Best®	Theratronics (Ottawa, Ontario, CA)
Guava® easyCyte	Merck Millipore (Massachusetts, USA)
Heracell™ CO2 Inkubator	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Heraeus® Hybridisierungsöfen, compact line, OV4	Heraeus (Hanau, D)
Heraeus® Megafuge® 1.0	Kendro (Osterode, D)
Heraeus® Multifuge® 3 S-R	Kendro (Osterode, D)
Heraeus® Labofuge® 400R	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Heraeus® Safety cabinet, Class II	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Kühlschrank +4 °C	Liebherr (Bulle, CH)
Kühlschrank -20 °C	Liebherr (Bulle, CH)
Kühlschrank -80 °C	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
MicroBeta FilterMate-96 Harvester	PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA)
MicroBeta2 Plate Counter, 6 Detektoren	PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA)
Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss (Zaventem, B)
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand (Wertheim, D)
Vakuumcontroller CVC 2000	Vacuubrand (Wertheim, D)
Wasserbad, 37 °C	Memmert (Schwabach, D)

3.1.3. Labormaterial

Accu-jet® pro	Brand (Wertheim, D)
Cellstar® Cellculture Microplate, 96 well, U-bottom	Greiner-Bio-One (Frickenhausen, D)
Cellstar® Cellculture Microplate, 12 well, U-bottom	Greiner-Bio-One (Frickenhausen, D)
Cellstar® pipet 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner-Bio-One (Frickenhausen, D)
CryoPure Gefäß, 1 ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Falcon® Round-Bottom Tube, 5 ml	Corning Life Sciences (Amsterdam, NL)
Kassette für feste 96-Well-Platten	PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA)
MACS Multistand	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
MACSQuant® Separation, LS Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
MACSQuant® Separation, LD Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
MACSQuant® Separation, MS Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
MidiMACS Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
MiniMACS™	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1250 µl	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Reagiergefäß 1 ml, 0,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)
TopSeal™-A	Packard (Meriden, Connecticut, USA)
TopSeal™-P	Packard (Meriden, Connecticut, USA)
Tube 15 ml, 50 ml, PP	Sarstedt (Nümbrecht, D)
UniFilter-96 GF/ B, 1 µm	PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA)
Zeba™ Spin Desalting Column 0,5 ml	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)

3.1.4. Reagenzien, und Lösungen

BD FACS™ PermeabilizingSolution 2	BD Biosciences (San Jose, USA)
Brefeldin A	Sigma-Aldrich (München, D)
CASY Flow	DRFZ (Berlin, D)
Ciprofloxacin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Ethanol 70 %	DRFZ (Berlin, D)
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare Europe (Freiburg, D)
Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Kit	Life Technologies (Europe, BV)
HEPES-Lösung, 1 M	Sigma-Aldrich (München, D)
Human AB Serum, heat inactivated	Sigma-Aldrich (München, D)
IMDM mit GlutaMAX™, 25 mM HEPES-Lösung	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Nicht-essentielle Aminosäuren-Lösung (100x)	Sigma-Aldrich (München, D)
Mercaptoethanol 50 mmol/l	Sigma-Aldrich (München, D)
Methyl-3H-Thymidin, 5 mCi (185 mBq), 1 mCi/ ml	GE Healthcare Europe (Freiburg, D)

MicroScint™-O, Szintillationslösung	PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA)
Paraformaldehyd	Carl Roth (Karlsruhe, D)
PBS	DRFZ (Berlin, D)
PBS/BSA (0,5 % BSA (w/ v))	DRFZ (Berlin, D)
PBS/ BSA/ Azid (0,05 % NaN ₃ (v/ v))	DRFZ (Berlin, D)
Penicillin 10 000 U/ ml, Streptomycin 10 000 µg/ ml	Life Technologies (Carlsbad, USA)
PHA, Lektin aus Phaseolus vulgaris, 1 mg/ ml	Sigma-Aldrich (München, D)
Proleukin®, Aldesleukin (IL-2-Analagon), 10 µg/ ml	Novartis (Nürnberg, D)
RPMI 1640 Medium mit GlutaMAX™	Life Technologies (Carlsbad, USA)

3.1.5. Antikörper und Microbeads

Biotin-PE	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD3 Microbeads	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD3-VioGreen (clone BW264/56)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD4 Microbeads	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD4-APC-Vio770 (clone M-T321)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD69-PerCP (clone FN50)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD69-VioBlue (clone FN50)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD154 -Biotin	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD154-PE (clone 24-31)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
IFN-γ-APC (clone 4S.B3)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
IL-4-FITC (clone BS4)	Life Technologies Europe BV (Bleiswijk, NL)
IL-10-PECy7 (clone JES3-9D7)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
IL-17-PerCPCy5.5 (clone eBio64DEC17)	Life Technologies Europe BV (Bleiswijk, NL)

3.1.6. Antigene

Annexin A1	Antibodies online (Aachen, D)
Annexin A2	Antibodies online (Aachen, D)
Ribosomal Protein P1	Antibodies online (Aachen, D)
Ribosomal Protein P2	Antibodies online (Aachen, D)
Transthyretin	Antibodies online (Aachen, D)
Vimentin	Orgentec Diagnostica GmbH (Mainz, D)

3.1.7. Software / Datenbanken

Adobe Illustrator CS7	Adobe Systems (München, D)
FACS®Diva software	BD Biosciences (San Jose, USA)
FlowJo 7.6.5	ThreeStar (Ashland, Oregon, USA)

Geo Database

GraphPad Prism 5

Libre Office 6.3

MicroBeta2 Workstation, Windows

Microsoft Office 2010 (Excel)

PubMed

National Center for Biotechnology Information
(Bethesda, Maryland, USA)

GraphPad (San Diego, Kalifornien, USA)

The Document Foundation

PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA)

Microsoft (Redmond, Washington, USA)

National Center for Biotechnology Information
(Bethesda, Maryland, USA)

4. Vertiefende Beschreibung der Methoden

4.1. Allgemeine Arbeitsschritte

4.1.1. Steriles Arbeiten

Eine Sterilbank wurde für die sterile Verarbeitung der Proben genutzt. Jeweils vor Arbeitsbeginn und wenn erforderlich wurden alle Flächen mit 70 % Ethanol wischdesinfiziert. Die genutzten Nitrilhandschuhe wurden ebenfalls mit 70 % Ethanol desinfiziert.

4.1.2. Gewinnung der peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs)

Für alle Versuche erfolgte zunächst die Gewinnung der PBMCs nach einem standardisierten Protokoll. Zuerst wurden 20 ml Blut in ein 50 ml Tube gefüllt und auf 35 ml PBS/BSA aufgefüllt. Mit einer Pipettierhilfe wurde nun sehr behutsam 15 ml Ficoll-Paque Plus in das schräg gehaltene Tube eingefüllt. Dabei sammelte sich die Ficolllösung am Boden des Röhrchens. Als nächstes wurde das Tube mit 2000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Infolge der besonderen Dichte der Ficolllösung von 1,007 g/ml bildete sich eine charakteristische Schichtung im Röhrchen aus. Erythrozyten und Granulozyten sammelten sich am Boden des Röhrchens, danach folgte eine Ficollschicht. Auf dieser Schicht lagerte sich ein mehr oder minder dünner (je nach Ausgangszellzahl) weißlicher Saum ab. Dieser enthielt die PBMCs, also die T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, sowie natürliche Killer und dendritische Zellen. Über dieser Schicht fand sich der klare PBS/BSA- Rest. Mit Hilfe einer 1 ml Pipette wurde nun vorsichtig die PBMC Schicht abgetragen und in eine neues 50 ml Tube gegeben. Diese wurde dann mit BPS/BSA aufgefüllt und zweimal mit 1300 rpm für acht Minuten gewaschen. Für die Stimulationsexperimente wurden die gewonnenen PBMCs in BPS/BSA über Nacht im Kühlschrank bei 4 Grad Celsius aufbewahrt. PBMCs für die T-Zellbibliotheken wurden direkt weiterverarbeitet.

4.1.3. Zellzählung

Zellen wurden entweder mit einem Guava easyCyte oder einem Casy TT-Zellzähler gezählt. Je nach Protokoll wurde dabei jeweils die gleiche Methode angewandt. Der

Guava easyCyte funktioniert wie ein Durchflusszytometer (s.u.). Im Casy Zellzähler werden nach Verdünnung von 10 µl der zu untersuchenden Probe mit 10 ml Casy Puffer (enthält: 1 l PBS, 9 l destilliertes H₂O und 20 ml 10% NaN₃-Lösung) elektrische Stromflüsse gemessen. Das Gerät gibt danach die Zellzahl pro ml für einen gewissen Größenbereich (eingegrenzt auf PMBCs) aus. Durch Multiplikation mit der jeweiligen ml Zahl der Probe konnte die Zellzahl in der Probe nun errechnet werden.

4.1.4.. Zellanreicherung mithilfe magnetischer Microbeads

Die Methode der magnetischen Zellseparation wurde im deutschen Rheuma-Forschungszentrum erstbeschrieben [17]. Prinzipiell wird dabei ein sogenannter Microbead genutzt, der, ähnlich einem Antikörper, mit einer Seite an bestimmte Zellstrukturen binden kann, auf seiner anderen Seite jedoch an ein magnetisches Teilchen gekoppelt ist. Nach der Bindung an seine Zielstruktur läuft die Zellsuspension, welche die markierte Zelle enthält, langsam durch ein sehr feines Gitternetz, an welches von außen ein Magnet angelegt worden ist. Die markierte Zelle wird dadurch zurückgehalten, während die anderen Zellen ungehindert passieren können. Durch anschließende Spülung können die angereicherten Zellen aus dem Netz gewonnen werden. Für manche Anreicherungen ist eine Zwischenmarkierung nötig. Die Microbeads richten sich dann gegen Biotin, welches seinerseits an den freien Teil des Antikörpers gekoppelt ist, der die jeweilige Zielstruktur erfasst.

4.1.5. Vorbereitung der Antigene

Alle Antigene wurden vor den Stimulationsversuchen einem Entsalzungsprozess mittels Zeba™ Spin Desalting Columns unterworfen. Dieser Schritt wurde eingeführt, um das Risiko einer unspezifischen Reaktion gegen Reste der Trägerlösung zu verringern. Es wurde dabei den in der Betriebsanleitung beschriebenen einzelnen Arbeitsschritten gefolgt. Da die einzelnen Antigene in unterschiedlichen Mengen von Trägerlösung geliefert wurden, wurden die jeweiligen Volumina so angepasst, dass in der Stimulation jeweils 0,5 µg je nach Antigen genutzt werden konnte. Alle Arbeitsschritte erfolgten dabei steril.

4.2. Stimulation und Messung mit der Durchflusszytometrie

4.2.1. Allgemeine Funktionsweise der Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie können mehrere Parameter einzelner Zellen zeitgleich genauer untersucht werden. Dabei werden die Zellen aus einer Zellsuspension in das Durchflusszytometer aufgenommen und passieren dann Laser verschiedener Wellenlängen [18].

Vor der Messung am Gerät kann eine Zelle mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper markiert werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als „färben“. Dabei wird z.B. ein Antikörper gegen CD4 an dieses Molekül einer T-Zelle gebunden. Sobald diese T-Zelle nun das Durchflusszytometer passiert, wird der Fluorochromrest des Antikörpers durch einen der Laser angestrahlt [18]. Die dabei resultierende Lichtemission, deren Wellenlänge von der Wellenlänge des anstrahlenden Lasers und des jeweiligen Fluorochroms abhängt, kann mittels verschiedener Detektoren registriert werden [18]. Jedes Durchflusszytometer kann dabei eine unterschiedliche Anzahl registrieren, ist also auf eine unterschiedliche Anzahl an Kanälen limitiert. Zusätzlich zu den jeweiligen Kanälen der Fluorochrome werden in einem Durchflusszytometer die Größe und Granularität einer Zelle im forward und sideward scatter (FSC und SSC) gemessen [18], um die spätere Zellanalyse auf eine bestimmte Zellpopulation, wie z.B. die Lymphozyten, eingrenzen zu können.

4.2.2. Stimulation

Die PBMCs wurden anhand eines standardisierten Protokolls stimuliert, welches von der originalen Beschreibung der Methode adaptiert wurde [15]. Alle Arbeitsschritte erfolgten steril. Nach Zentrifugation bei 310 xg für 10 Minuten und 4 Grad Celsius wurden die Zellen in jeweils 1 ml Medium resuspendiert und in einer 12 Well Platte verteilt. Das Medium bestand aus RPMI 1640 Medium mit GlutaMAX™ mit 5% inaktiviertem humanem AB Serum und 1 % Penicillin / Streptomycin sowie 2 µg/ml Ciprofloxacin. Zusätzlich wurde 1 µg/ml Anti-CD28 und 1 µg/ml Anti-CD40 hinzugefügt. Wie in der Darstellung der T-Zellaktivierung gezeigt, dient CD28 als zusätzlicher Stimulator. Anti-CD40 soll eine weitere Interaktion von B- und T-Zelle blocken, um eine Internalisierung des Rezeptors zu verhindern. Die Zellen wurden für sieben Stunden bei

37 Grad Celsius und einem CO₂ Gehalt von 5 % entweder ohne Antigene oder mit einem Pool, der alle fünf Antigene jeweils in einer Konzentration von 0,5 µg/ml enthielt, stimuliert. Nach 5 Stunden wurde Brefeldin A in einer Konzentration von 2 µg/ml hinzugefügt. Brefeldin A blockt den Golgi-Apparat und führt dadurch dazu, dass intrazelluläre Zytokine nicht freigesetzt werden und damit später intrazellulär gefärbt und gemessen werden können.

4.2.3. Zellernte

Durch Kratzen und Spülen mit einer 1 ml Pipette wurden die Zellen aus der 12 Well Platte geerntet und in ein 15 ml Röhrchen auf 10 ml PBS/BSA/EDTA aufgenommen. 50 µl Zellsuspension wurde in 450 µl PBS (enthält 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH₂PO₄, 4,3 mM Na₂HPO₄ und H₂O) in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß resuspendiert. Mit dem Guava® Zellzähler wurde die Ausgangszellzahl bestimmt, auf die die späteren Ergebnisse bezogen wurden.

Die Zellen im 15 ml Tube wurden als nächstes bei 310 xg für 10 Minuten bei 4 Grad Celsius zentrifugiert und setzten sich dadurch auf dem Boden ab. Bis auf 50 µl wurde nun der Überstand abgesaugt.

4.2.4. Zellmarkierung mit CD154-Biotin Microbeads

In einem nächsten Schritt wurde die 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Reagenz versetzt. Diese enthielt Antikörper gegen CD154, während der freie Teil aus Biotin bestand. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 4 Grad Celsius inkubiert und danach mit PBS/BSA/EDTA mit 310 xg für 10 Minuten bei 4 Grad Celsius zentrifugiert. Es wurde wieder der Überstand bis auf 50 µl abgesaugt. Nun wurden 50 µl gegen Biotin gerichtete Microbeads hinzugefügt. Die Suspension wurde 15 Minuten bei 4 Grad Celsius inkubiert und anschließend mit 310 xg für 10 Minuten bei 4 Grad Celsius zentrifugiert. Nach Aspiration des Überstandes wurden die Zellen in 500 µl PBS/BSA/EDTA resuspendiert.

4.2.5. Zellanreicherung und Färbung CD154⁺ T-Zellen

MS Säulen wurden zunächst mit 500 µl PBS/BSA/EDTA gespült und in die magnetischen Halterungen eingesteckt. Danach wurde die Zellsuspension auf die Säule

gegeben und diese im Anschluss zweimal mit 500 µl PBS/BSA/EDTA, sowie einmal nur mit 500 µl PBS gewaschen. Nun wurden 60 µl einer Färbelösung hinzugegeben und die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur in der Säule inkubiert. Die Färbelösung enthielt CD3 Vio-Green, CD4 APC-Vio770, CD69 Vio-Blue und Anti-Biotin PE Antikörper in einer Verdünnung von 1:10 und PBS/BSA/EDTA als Trägermedium. Danach wurden die Säulen erneut mit PBS/BSA/EDTA gewaschen und die Zellen vorsichtig mit 500 µl PBS/BSA/EDTA in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäßen eluiert. Zellen wurden nun durch die Zugabe von 500 µl 4 % PFA und eine Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten fixiert. Nach Zentrifugation bei 2000 rpm für 8 Minuten bei 4 Grad Celsius und nochmaliger Waschung, wurde 500 µl Perm2 Puffer in einer Dilution von 1:10 hinzugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde intrazelluläre Färbelösung hinzugegeben. Diese enthielt IL-4 FITC, IL-10 PECy7, IL-17 PerCPCy5.5, IFN-γ APC jeweils in einer Verdünnung von 1:20, sowie CD154 PE in einer Verdünnung von 1:10 in einer Trägerlösung von PBS/BSA/EDTA. Die Zellsuspension wurde für 30 Minuten bei 4 Grad Celsius inkubiert, im Anschluss mit PBS/BSA/Azid gewaschen und in 250 µl PBS/BSA/Azid resuspendiert. Bis zur Akquisition am Durchflusszytometer wurden die Zellen im Kühlschrank bei 4 Grad Celsius aufbewahrt.

4.2.6. Färbung der originalen Probe

Während der Zellernte wurden 100 µl der Probe mit CD3 PacBlue 1 : 50 und CD4 PECy7 1: 20 oberflächlich gefärbt, um spätere Ergebnisse auf die Anzahl an T-Helferzellen in der Originalprobe beziehen zu können. Die einzelnen Färbeschritte entsprachen dabei den Abläufen der konventionellen T-Zellen Färbung, wie sie weiter oben dargestellt wurden.

4.2.7. Analyse der Zellpopulationen

Mithilfe der Software Flowjo wurden die Proben weiter untersucht. Das Programm stellt dabei die einzelnen Kanäle des Durchflusszytometers in Ordinate und Abszisse dar. Als „gating“ bezeichnet man den Vorgang, eine Gruppe dieser Zellwolken anhand ihrer exprimierten Marker auszuwählen. Diese Untergruppe kann danach erneut eingegrenzt werden. Für autoreaktive Zellen wurden zunächst Lymphozyten im FSC/SSC Scatter

ausgewählt. Danach wurden Dubletten im SSC-A/SSC-H Scatter ausgeschlossen. Als nächstes wurden CD3⁺/CD4⁺ Zellen ausgewählt. Von diesen wurde die Gesamtzahl an Zellen bestimmt, die CD154 positiv waren und eines der Zytokine (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17) exprimierten.

4.2.8. Errechnung der Anzahl autoreaktiver T-Zellen

Da autoreaktive T-Zellen nur in sehr geringen Frequenzen vorhanden sind, wurden die verschiedenen Schritte der magnetischen Zellanreicherung durchgeführt. Bei durchflusszytometrischen Messungen allgemein, ist meistens die Analyse prozentualer Anteile von Zellpopulationen an ihrer Elternpopulation von Interesse. Eine solche Analyse ist nach Zellanreicherung nun nicht mehr möglich. Hier ist dagegen die Gesamtzahl an angereicherten Zellen relevant. Mit dieser kann dann auf Frequenzen in der originalen Probe rückgeschlossen werden.

Durch Färbung der Probe kurz vor der Zellanreicherung (original Färbung) und Messung der Gesamtzellzahl, konnte errechnet werden wie viele CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen in der Originalprobe vorhanden waren:

$$GT = G \times A$$

GT = Gesamtzellzahl an CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen in der originalen Probe

G = Gesamtzellzahl in der originalen Probe.

A = Anteil an CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen in der Probe.

Beispiel: Bei einer Zellzahl in der Probe von 3×10^7 Zellen und einem Anteil von 33 % CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen ergibt sich eine Gesamtzellzahl von 1×10^7 CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen.

Die Zellzahl der autoreaktiven Zellen wurde nun auf diese errechnete Gesamtzellzahl in der Probe bezogen und die Ergebnisse in autoreaktive Zellen pro 1×10^6 T-Zellen ausgegeben.

$$AT = AR / GT \times 10^6$$

AT = Frequenz autoreaktiver T-Zellen bezogen auf 10^6 CD3⁺/CD4⁺ T Zellen

AR = Gesamtzellzahl angereicherter, autoreaktiver T-Zellen in der Probe

GT = Gesamtzellzahl an CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen in der originalen Probe

Beispiel: Bei einer Gesamtzellzahl von 100 angereicherten, autoreaktiven T-Zellen und 1×10^7 CD3⁺/CD4⁺ T Zellen in der originalen Probe ergibt sich eine Frequenz von 10 autoreaktiven Zellen in 1×10^6 CD3⁺/CD4⁺ Zellen.

In einem letzten Schritt wurde der Hintergrund (die Anzahl an Zellen in der unstimulierten Probe) abgezogen, wobei negative Ergebnisse als null gezählt wurden.

4.3. T-Zell Bibliotheken

4.3.1. Einführung

T-Zell Bibliotheken wurden genutzt, um die Reaktivität gegen einzelne Antigene zu untersuchen. Dazu wurden CD4⁺ T-Zellen aus der Blutprobe isoliert und zwei Wochen lang in 96-Well Platten expandiert. Nach dieser Zeit erhielten wir acht 96-Well Platten, die alle identische Kulturen beinhalteten. Pro Platte wurde nun mit einem der fünf Antigene, einem Kontrollantigen, Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) oder keinem Antigen stimuliert. Anhand der Proliferation, gemessen als [³H]-Thymidin Aufnahme, wurde nun die jeweilige Reaktivität bestimmt.

4.3.2. Zellisolierung und Ansetzen der T-Zell Bibliotheken

Für die hier durchgeführten Experimente wurde einem standardisierten Protokoll gefolgt, welches aus der Beschreibung der Originalpublikation abgeleitet und angepasst wurde [16]. Nach Isolierung der PBMCs wurden diese zentrifugiert und mit 20 µl Microbeads gegen CD4 und 80 µl PBS für je 10^7 Zellen für 15 Minuten bei 4 Grad Celsius inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss gewaschen und in 1 ml PBS

resuspendiert. Nun wurden die Zellen auf LD Säulen gegeben, welche vorher gespült worden waren. Die Säulen wurden dreimal mit 3 ml PBS gespült und die CD4 negative Fraktion in 10 ml Tubes aufgefangen. Die CD4⁺ T-Zellen wurden aus der Säule eluiert und ihre Gesamtzellzahl bestimmt. Nun wurden 200.000 Zellen in 20 ml Medium resuspendiert und in einer 96-Well Platte verteilt. Das Medium enthielt 1 ml IMDM mit GlutaMAXTM und 25 MM HEPES-Lösung, 1 ml humanes AB Serum, 200 µl Penicillin/Streptomycin, 2 µg/ml Ciprofloxacin, 2 µl nicht essentielle Aminosäuren, 20 µl PHA, 60,5 µl IL-2 und 5 Millionen nicht autologe Fütterzellen (im DRZF selbst hergestellt). Diese wurden von 2 unterschiedlichen gesunden Spendern gewonnen und waren bis zum Einsatz bei -160 Grad Celsius im Kryokonservierer eingefroren. Ohne die Fütterzellen können die T-Zellkulturen nicht expandieren. Um jedoch eine eigene Expansion der Fütterzellen zu verhindern, wurden diese kurz vor ihrer Zugabe zu der Zellkultur durch Bestrahlung mit 35 Gray über 35 Minuten behandelt.

Die gewonnenen CD4 negativen Zellen wurden bei -160 Grad Celsius in jeweils 1 ml Gefriermedium zu höchstens 10⁸ Zellen in einem CryoPure Gefäß eingefroren. Das Medium bestand aus 50 % RPMI 1640 Medium mit GlutaMAXTM, 2,5 % 1 M HEPES-Lösung, 10 % DMSO, 0,05 µmol / ml Mercaptoethanol und 40 % humanem AB Serum. Die Zellen wurden zunächst mit einem Mr. FrostyTM Einfrierbehälter bei -80 Grad langsam heruntergekühlt.

4.3.3. Expansion der T-Zellkulturen

Über die folgenden zwei Wochen wurden die Zellen im Inkubator bei 37 Grad Celsius und 5 % CO₂ expandiert. Dabei wurde jeweils nach circa drei bis vier Tagen das Medium gewechselt. Das Wechselmedium enthielt im Gegensatz zum Anfangsmedium weniger IL-2 (nur 10 ng/ml) und keine weiteren Fütterzellen. Im Verlauf von zwei Wochen wurden die Zellen auf acht 96-Well Platten aufgeteilt. Dabei wurden immer Kulturen aus dem gleichen Well nur in das jeweils gleiche Well (z.B. A1 nur in A1) der neuen Platten übertragen. Dadurch wurde erreicht, dass alle Mikrowells die gleichen T-Zellklone enthielten. Nach der Aufteilung in acht Platten wurden neues Medium zugegeben, welches RPMI 1640 Medium mit GlutaMAXTM, 1 % Penicillin/Streptomycin 0,05 µmol / ml Mercaptoethanol und 1 % humanes AB Serum enthielt. Darin konnten die Zellen nun drei Tage ruhen.

4.3.4. Stimulation

Nach drei Tagen wurden die Platten bei 1300 rpm und 4 Grad Celsius für 3 Minuten zentrifugiert und das alte Medium verworfen. Das neue Medium setzte sich wie das Anfangsmedium zusammen, enthielt jedoch kein IL-2, PHA oder Fütterzellen.

Wie in der Einleitung dargestellt kann eine T-Zelle keine freien Antigene erkennen, sondern muss diese über MHC II Moleküle von einer APC präsentiert bekommen. Als APCs wurden nun die CD3⁺ Zellen genutzt. Diese wurden wieder aufgetaut und in einem Verhältnis von circa 1:100 Zellen dem Medium beigefügt. Pro Well wurden 100 µl Medium genutzt, jede Platte wurde mit jeweils einem Antigen oder Transthyretin in einer Konzentration von 0,5 µg/ml, SEB in einer Konzentration von 1 µg/ml oder keinem Antigen über drei Tage bei 37 Grad Celsius und 5 % CO₂ inkubiert. 16 Stunden vor der Proliferationsmessung am vierten Tag wurde nochmals Medium hinzugefügt, welches [³H]-Thymidin in einer Konzentration von 0,01 mCi/ml enthielt.

4.3.5. Zellernte und Messung

Eine T-Zelle proliferiert, sobald sie ihr jeweiliges Antigen präsentiert bekommt hat. Dabei baut sie das radioaktiv markierte [³H]-Thymidin während des Zellzyklus in ihre DNA ein. Das [³H]-Thymidin ist ein Betastrahler, dessen Strahlungsenergie in einem Szintillationszähler in cpm (counts per minute), also Impulsen pro Minute gemessen werden kann [16].

Die Zellen wurden aus den 96-Well Platten mit Hilfe des Gerätes MicroBeta FilterMate-96 Harvester auf spezielle 96-Well UniFilter Messplatten übertragen. In dem Gerät wird mithilfe von Druckluft die Zellsuspension abgesaugt. Die T-Zellen bleiben dabei in den UniFilter Messplatten hängen. Durch Spülung mit Ethanol wurden die Zellen abgetötet und in ihrem jeweiligen Proliferationsstadium fixiert. In einem nächsten Schritt wurden die Platten bei 56 Grad Celsius für 20 Minuten getrocknet. Die trockenen Platten wurden mit einer Folie abgeklebt und jedes Well mit einer Lösung beschichtet. Diese ist nötig, um die Strahlungsimpulse messbar zu machen. Die Proliferationsaktivität wurde nun mit dem MicroBeta2 Plate Counter gemessen und als cpm ausgegeben.

4.3.6. Urin T-Zell Bibliotheken

Mithilfe von CD4 Microbeads wurden CD4⁺ T-Zellen aus dem Urin von drei Patientinnen mit aktiver Lupusnephritis isoliert. Dabei wurden jeweils 10⁷ Zellen mit 80 µl PBS/BSA/EDTA sowie 20 µl der Microbead-Suspension vermischt. Die Zellisolierung erfolgte über LS Säulen nach dem gleichen Schema, wie bei Blutzellen. Im Anschluss wurden die CD4⁺ T-Zellen auf eine 96-Well Platte, in Anfangsmedium verteilt. Dieses enthielt IMDM Medium mit GlutaMAX™, 5 % humanes AB Serum, 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 µg/ml Ciprofloxacin, 1 % MEM nicht essentielle Aminosäuren, 1 µg/ml PHA, 600 IU/ml IL-2 und 2 x 10⁷ Fütterzellen. Im Gegensatz zu Blutzellen wurde zusätzlich IL-7 in einer Konzentration von 10 ng/ml hinzugefügt, um eine balancierende Wirkung zu erzielen. Das Medium wurde nach jeweils drei Tagen gewechselt. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie bei Blutzellbibliotheken, es wurde jedoch nur mit Vimentin, SEB oder keinem Antigen stimuliert.

4.3.7. Errechnung der Anzahl autoreaktiver T-Zellen in T-Zell Bibliotheken

Zunächst wurde der SEB Proliferationsindex gebildet. Wells, in denen die Proliferation auf den Stimulus mit SEB nicht mindestens fünfmal höher als in den unstimulierten Wells war, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Nun wurde ein individueller Cut-off für jeden Probanden errechnet, indem zum Median der unstimulierten Probe fünfmal der Wert des dritten Quartils minus des ersten Quartils (interquartile range) addiert wurde.

$$\text{Cut-off} = M_u + 5 \times (Q3 - Q1)$$

M_u = Median der unstimulierten Probe

Q3 = Drittes Quartil

Q1 = Erstes Quartil

Im Anschluss wurden alle Wells durch diesen Wert geteilt. Dadurch konnten die Proben besser verglichen werden. Für Mikrowells mit einer cpm Aufnahme über eins wurde nun angenommen, dass sie eine reaktive CD4⁺ T-Zelle in 2.000 enthielten (die Anzahl mit der die T-Zellbibliothek gestartet worden war). Die Gesamtzahl an autoreaktiven Zellen pro 1 Million CD4⁺ konnte nun errechnet werden.

Für Bibliotheken, die aus T-Zellen aus dem Urin von Patientinnen gewonnen wurden, wurde ein Stimulationsindex von mindestens drei akzeptiert, da eine insgesamt geringe Proliferationsrate vorlag.

4.4. Statistische Auswertung

Für alle Versuche wurde Microsoft Excel für die Sortierung der erhobenen Messwerte genutzt. Mit GraphPad-Prism wurde die weitere statistische Auswertung durchgeführt. Die graphische Aufbereitung der Ergebnisse erfolgte mit GraphPad-Prism und dem Adobe Illustrator. Der Mann-Whitney-U-Test wurde genutzt um ungepaarte Proben zu vergleichen. Bei dem Vergleich von Vimentin-spezifischen T-Zell Frequenzen im Blut und Urin wurde der gepaarter t-Test genutzt. Nichtparametrische Korrelationen wurden mithilfe der Rangkorrelation nach Spearman untersucht.

5. Fazit

5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnten autoantigen-spezifische T-Zellen bei Patientinnen mit aktiver Lupusnephritis nachgewiesen werden. Die reaktiven Zellen gehörten dabei vor allem dem Th1-Phänotyp an, wobei ihre Anzahl mit der Krankheitsaktivität korrelierte.

Diese T-Zellantwort erfolgte gegen Antigene, die bei aktiver Erkrankung vermehrt im Niereninterstitium exprimiert werden, wobei sich vor allem Vimentin und Annexin A2 als Ziele darstellten. Die Ergebnisse konnten durch zwei komplementäre Methoden erzielt werden und legen eine Rolle dieser Zellen in der Pathogenese der humanen Lupusnephritis nahe.

5.2. Spekulation über einen potentiellen Pathomechanismus

Aufgrund der dargestellten Ergebnisse lässt sich über einen Pathomechanismus spekulieren. Dieser könnte nun folgendermaßen aussehen: Autoreaktive T-Zellen wandern in die Niere ein und reagieren dort mit ihren jeweiligen, in besonderem Maße exprimierten Antigenen, wobei vor allem Vimentin und Annexin A2 als Ziele fungieren. Besonders Th1-Zellen tragen nun zur lokalen Entzündung bei, möglicherweise über die Aktivierung von Makrophagen. Auch IL-10 produzierende T-Zellen scheinen eine Rolle zu spielen und könnten zu lokalen Entzündungsprozessen beitragen.

Th2- und Th17-Zellen kommt in dieser Modellvorstellung keine entscheidende Rolle zu.

5.3. Mögliche klinische Anwendung

Die für diese Arbeit durchgeführten Experimente sind komplex und zeitaufwendig. Eine Anwendung in der klinischen Routine ist daher schwierig umsetzbar. Dennoch zeigt besonders die Identifikation von autoreaktiven Zellen bei aktiven Patientinnen und die Korrelation mit der Krankheitsaktivität ein Potential als Biomarker. Die identifizierten Zellen sind außerdem für zukünftige Therapien interessant, da mit ihnen ein sehr spezifischer Angriffspunkt gegeben wäre.

5.4. Forschungsausblick

Nach der ersten Detektion und Charakterisierung antirenalere T-Zellen bei humaner Lupusnephritis in dieser Arbeit sind weitergehende Untersuchungen dieser Zellen von besonderem Interesse. Es wäre aufschlussreich auch weitere potentielle Antigene zu untersuchen sowie die Detektion von T-Zellen im Urin zu vertiefen. Dabei ist auch die Anwendung der Durchflusszytometrie als komplementäre Methode zu T-Zell Bibliotheken denkbar.

Wie bereits beschrieben sind verschiedene Zellen in der Niere zur Antigenpräsentation in der Lage. Da renale Epithelzellen bei der humanen Lupusnephritis verstärkt MHC II Moleküle exprimieren, sollten weitere Untersuchungen dieser Zellen erfolgen. Unserer Arbeitsgruppe ist es bereits gelungen Epithelzellen durchflusszytometrisch zu erfassen. Durch Analyse ihrer genaueren Interaktion mit T-Zellen im Modell, könnte sich vielleicht den Vorgängen in der menschlichen Niere noch besser angenähert werden.

Ideal wäre der direkte Nachweis antigenspezifischer T-Zellen in menschlichen Nieren, wie es bereits im Pankreas von Typ 1 Diabetikern gelungen ist [19]. Der Umsetzung solcher Versuche sind aber durch die Verfügbarkeit von Biopsiematerial zurzeit noch sehr enge Grenzen gesetzt.

Als letztes sollten die Frequenzen autoreaktiver T-Zellen bei Patienten über den Verlauf der Erkrankung hinweg gemessen werden. Dabei wären besonders Frequenzänderungen bei Therapie-Ansprechern oder -Versagern, oder bei neuen Schüben von Interesse. In weiteren Untersuchungen könnte dann das Potential autoreaktiver T-Zellen als pharmakologischer Angriffspunkt in der Therapie der Lupusnephritis bestimmt werden.

Literaturverzeichnis

- 1 Murphy, K., Travers, P., Walport, M., & Janeway, C. Janeway's immunobiology. 8th ed. New York; Garland Science, 2012.
- 2 Borchers AT, Leibushor N, Naguwa SM, Cheema GS, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Lupus nephritis: a critical review. *Autoimmun Rev.* 2012 Dec;12(2):174-94.
- 3 Lech M, Anders HJ. The pathogenesis of lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2013 Sep;24(9):1357-66.
- 4 Espeli M, Bökers S, Giannico G, Dickinson HA, Bardsley V, Fogo AB, Smith KG. Local renal autoantibody production in lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2011 Feb;22(2):296-305.
- 5 Jeruc J, Jurčić V, Vizjak A, Hvala A, Babic N, Kveder R, Praprotnik S, Ferluga D. Tubulo-interstitial involvement in lupus nephritis with emphasis on pathogenesis. *Wien Klin Wochenschr.* 2000 Aug 25;112(15-16):702-6.
- 6 Park MH, D'Agati V, Appel GB, Pirani CL. Tubulointerstitial disease in lupus nephritis: relationship to immune deposits, interstitial inflammation, glomerular changes, renal function, and prognosis. *Nephron.* 1986;44(4):309-19.
- 7 Massengill SF, Goodenow MM, Sleasman JW. SLE nephritis is associated with an oligoclonal expansion of intrarenal T cells. *Am J Kidney Dis.* 1998 Mar;31(3):418-26.
- 8 Kelley VR, Singer GG. The antigen presentation function of renal tubular epithelial cells. *Exp Nephrol.* 1993 Mar-Apr;1(2):102-11.
- 9 Zhu J. T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 Oct 1;10(10).
- 10 Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, Freund C. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol.* 2017 Mar 17;8:292.
- 11 Dustin ML. The immunological synapse. *Cancer Immunol Res.* 2014 Nov;2(11):1023-33.
- 12 Parham P. Putting a face to MHC restriction. *J Immunol.* 2005 Jan 1;174(1):3-5.
- 13 Bacher P, Scheffold A. Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells. *Cytometry A.* 2013 Aug;83(8):692-701.

- 14 Phetsouphanh C, Zaunders JJ, Kelleher AD. Detecting Antigen-Specific T Cell Responses: From Bulk Populations to Single Cells. *Int J Mol Sci*. 2015 Aug 12;16(8):18878-93.
- 15 Bacher P, Schink C, Teutschbein J, Kniemeyer O, Assenmacher M, Brakhage AA, Scheffold A. Antigen-reactive T cell enrichment for direct, high-resolution analysis of the human naive and memory Th cell repertoire. *J Immunol*. 2013 Apr 15;190(8):3967-76.
- 16 Geiger R, Duhon T, Lanzavecchia A, Sallusto F. Human naive and memory CD4⁺ T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells. *J Exp Med*. 2009 Jul 6;206(7):1525-34.
- 17 Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 1990;11(2):231-8.
- 18 McKinnon KM1. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018 Feb 21;120:5.1.1-5.1.11.
- 19 Babon JA, DeNicola ME, Blodgett DM, Crèvecoeur I, Buttrick TS, Maehr R, Bottino R, Naji A, Kaddis J, Elyaman W, James EA, Haliyur R, Brissova M, Overbergh L, Mathieu C, DeLong T, Haskins K, Pugliese A, Campbell-Thompson M, Mathews C, Atkinson MA, Powers AC, Harlan DM, Kent SC. Analysis of self-antigen specificity of islet-infiltrating T cells from human donors with type 1 diabetes. *Nat Med*. 2016 Dec;22(12):1482-1487.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sebastian Tesch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Antirenale T-Zell Autoreaktivität bei humaner Lupusnephritis / Antirenal T cell autoreactivity in human lupus nephritis“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung

Publikation:

Sebastian Tesch, Dimas Abdirama, Anna-Sophie Grießbach, Hannah Antonia Brand, Nina Goerlich, Jens Y Humrich, Petra Bacher, Falk Hiepe, Gabriela Riemekasten, Philipp Enghard. Identification and characterization of antigen-specific CD4⁺ T cells targeting renally expressed antigens in human lupus nephritis with two independent methods. Sci Rep. 2020 Dec 4;10(1):21312.doi: 10.1038/s41598-020-78223-3.

Beitrag im Einzelnen:

Probenakquisition aller Blut- und Urinproben von den rheumatologischen und nephrologischen Stationen und Sprechstunden. Identifikation der für diese Arbeit genutzten potentiellen Nierenantigene durch Literaturanalyse. Design, Durchführung und Auswertung aller Experimente mit nierenspezifischen Antigenen im Labor. Erstellung aller Graphiken und Tabellen der Publikation. Dabei wurden Graphik 1 und Tabelle 1 neu aus bereits vorhandenen Daten von Anna-Sophie Grießbach erstellt. Alle weiteren Graphiken wurden aus den neu gewonnenen experimentellen Daten mit nierenspezifischen Antigenen erstellt. Verfassen und Einreichen der Publikation.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"MULTIDISCIPLINARY SCIENCES"** Selected Category
 Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 69 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE	745,692	43.070	1.285010
2	SCIENCE	680,994	41.037	1.070190
3	National Science Review	1,842	13.222	0.006500
4	Science Advances	21,901	12.804	0.110010
5	Nature Communications	243,793	11.878	1.103290
6	Nature Human Behaviour	1,230	10.575	0.006550
7	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA	661,118	9.580	1.022190
8	Science Bulletin	3,569	6.277	0.009840
9	Scientific Data	3,240	5.929	0.015610
10	Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	1,994	5.122	0.006540
11	Journal of Advanced Research	2,691	5.045	0.004780
12	Research Synthesis Methods	1,932	5.043	0.005420
13	GigaScience	2,674	4.688	0.012510
14	Annals of the New York Academy of Sciences	46,385	4.295	0.025840
15	Scientific Reports	302,086	4.011	1.061540
16	Journal of the Royal Society Interface	12,933	3.224	0.029190
17	NPJ Microgravity	203	3.111	0.000670
18	PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY A-MATHEMATICAL PHYSICAL AND ENGINEERING SCIENCES	19,227	3.093	0.028200



OPEN

Identification and characterization of antigen-specific CD4⁺ T cells targeting renally expressed antigens in human lupus nephritis with two independent methods

Sebastian Tesch^{1,2}, Dimas Abdirama^{2,3}, Anna-Sophie Grießbach^{2,3}, Hannah Antonia Brand^{1,2}, Nina Goerlich^{1,2}, Jens Y. Humrich⁴, Petra Bacher^{2,3,5,6}, Falk Hiepe^{2,3}, Gabriela Riemekasten⁴ & Philipp Enghard^{1,2}✉

In the search for anti-renal autoreactivity in human lupus nephritis, we stimulated blood-derived CD4⁺ T cells from patients with systemic lupus erythematosus with various kidney lysates. Although only minor responses were detectable, these experiments led to the development of a search algorithm that combined autoantibody association with human lupus nephritis and target gene expression in inflamed kidneys. Applying this algorithm, five potential T cell antigens were identified. Blood-derived CD4⁺ T cells were then stimulated with these antigens. The cells were magnetically enriched prior to measurement with flow cytometry to facilitate the detection of very rare autoantigen-specific cells. The detected responses were dominated by IFN- γ -producing CD4⁺ T cells. Additionally, IL-10-producing CD4⁺ T cells were found. In a next step, T cell reactivity to each single antigen was independently evaluated with T cell libraries and [³H]-thymidine incorporation assays. Here, Vimentin and Annexin A2 were identified as the main T cell targets. Finally, Vimentin reactive T cells were also found in the urine of three patients with active disease. Overall, our experiments show that antigen-specific CD4⁺ T cells targeting renally expressed antigens arise in human lupus nephritis and correlate with disease activity and are mainly of the Th1 subset.

Lupus nephritis (LN) is one of the most serious complications of systemic lupus erythematosus (SLE)^{1,2}. Affecting approximately 50% of SLE patients, it is a major contributor to disease-associated morbidity and mortality^{3,4}.

In LN immune complexes, complement and antibodies are deposited in the glomeruli of the kidneys, leading to local inflammation. Thus, LN has been recognized as a prototypical glomerulonephritis, with diagnosis and therapy focusing mainly on glomerular involvement^{5–7}. However, in addition to glomerular damage, T cell-rich infiltration in the kidney interstitium takes place^{8,9}. A major part of this infiltrate consists of CD4⁺ T cells, and the amount of infiltration has been shown to correlate with kidney damage^{10,11}. In addition, reports of local MHC class II upregulation on epithelial cells in the kidneys of LN patients and an intrarenal oligoclonal T cell repertoire both suggest the involvement of antigen-specific T cells^{12,13}.

Various mouse studies further strengthen this concept. In one study, B cells of lupus-prone MRL.lpr mice were genetically modified so that they were unable to produce antibodies. Interestingly, these mice still developed LN with a T cell-rich infiltration driving inflammation in the absence of autoantibody production¹⁴. Another study

¹Department of Nephrology and Medical Intensive Care, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität Zu Berlin, Berlin Institute of Health, Berlin, Germany. ²Deutsches Rheuma-Forschungszentrum, A Leibniz Institute, Berlin, Germany. ³Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität Zu Berlin, Berlin Institute of Health, Berlin, Germany. ⁴Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck, Germany. ⁵Institute of Immunology, Christian-Albrechts Universität zu Kiel and Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Kiel, Germany. ⁶Institute of Clinical Molecular Biology, Christian-Albrechts Universität zu Kiel, Kiel, Germany. ✉email: philipp.enghard@charite.de

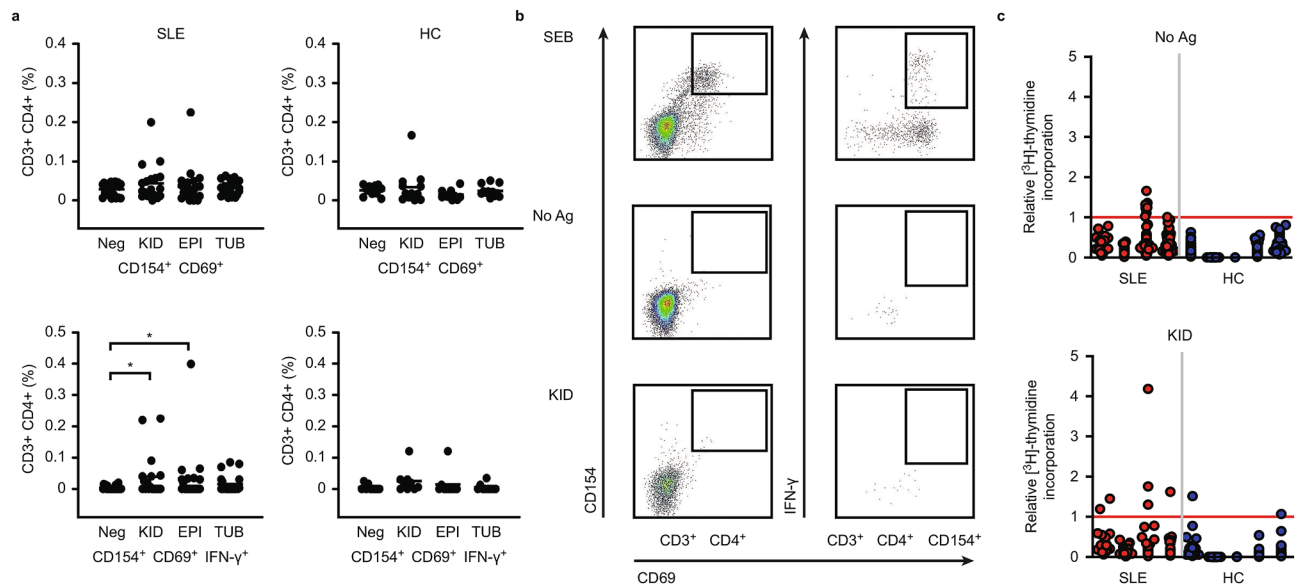


Figure 1. Only marginal reactivity of CD4⁺ T cells from SLE patients against different kidney lysates. **(a)** Respective frequencies of CD3⁺CD4⁺ T cells expressing activation markers CD154, CD69 and IFN- γ after 6 h PBMC stimulation with three different kidney lysates (KID, EPI, TUB) and measurement with flow cytometry ($n = 23$ SLE, $n = 12$ HCs). **(b)** Dot plot from one patient with acute LN after stimulation with SEB (positive control), no Ag and KID **(c)**. CD4⁺ T cell libraries from 4 SLE patients and 5 HCs stimulated with no Ag or KID and measurement of [³H]-thymidine incorporation. Each column shows the relative [³H]-thymidine incorporation from a single patient, and each dot represents one microculture in a 96-well plate. Microcultures with a relative [³H]-thymidine incorporation above one (red line) were assumed to contain one reactive T cell. Libraries were set up with 2000 T cells per well. The Wilcoxon matched-pairs signed ranked test was used for statistical analysis (* $p < 0.05$), ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Horizontal lines depict the median. *SLE* systemic lupus erythematosus, *HC* healthy control, *PBMC* peripheral blood mononuclear cells, *KID* human kidney normal tissue lysate, *EPI* human renal tubular epithelial cell lysate, *TUB* human renal proximal tubular epithelial cell lysate, *SEB* staphylococcal enterotoxin B.

reported the induction of interstitial lesions in recipient mice solely by T cell transfer¹⁵. Additionally, IFN- γ -producing CD4⁺ T cell clones that were isolated from the kidneys of lupus-prone mice were sufficient to elicit nephritis in recipients upon cell transfer¹⁶.

Despite these observations suggestive of an anti-renal CD4⁺ T cell involvement in LN, at present, little is known about their antigen specificity. Here, we report the identification of an antigen-specific CD4⁺ T cell response from patients with active LN against five potential renal antigens utilizing flow cytometry as well as T cell libraries.

Results

Only marginal reactivity of CD4⁺ T cells from SLE patients against kidney lysates. To detect an anti-renal T cell response, we stimulated CD4⁺ T cells from SLE patients with various lysates from healthy kidney tissues. The upregulation of activation markers (CD69 and CD154) and the expression of IFN- γ were assessed to detect antigen-specific T cells.

No differences in the number of CD154/CD69-positive T cells were observed upon stimulation with all kidney lysates (Fig. 1a). However, after stimulation with total kidney lysate and tubular epithelial cell lysate, a marginal increase in the number of CD154/CD69/IFN- γ triple-positive T cells was found ($n = 23$, Wilcoxon matched pairs test, $p = 0.01$ and $p = 0.04$, respectively, Fig. 1a). These differences were not detected in healthy controls (HCs, $n = 12$). The T cell superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB), which was used as a positive control, provoked significant differences from unstimulated samples in all tested individuals (exemplary dot plot in Fig. 1b; frequencies for SLE patients shown in Supplemental Fig. 1h)¹⁷.

To further evaluate the anti-renal reactivity, CD4⁺ T cells from four SLE patients and five HCs were expanded and stimulated with the more promising lysate KID in T cell libraries. Again, only marginal reactivity against KID was detectable (Fig. 1c). The applied analysis algorithm showed no significant differences in terms of autoreactive T cell numbers between SLE patients and HCs (Supplemental Fig. 1h). However, the relative [³H]-thymidine incorporation data shown in Fig. 1c suggest slightly higher reactivity against KID in SLE patients than HCs.

Consequently, we were not able to detect a convincing anti-renal T cell response using kidney lysates. However, the results were still indicative of such a response, possibly below the detection levels of the chosen approaches. Thus, to detect more subtle events, we increased accuracy in a next step by identifying target kidney antigens and applying antigen reactive T cell enrichment via CD154 beads.

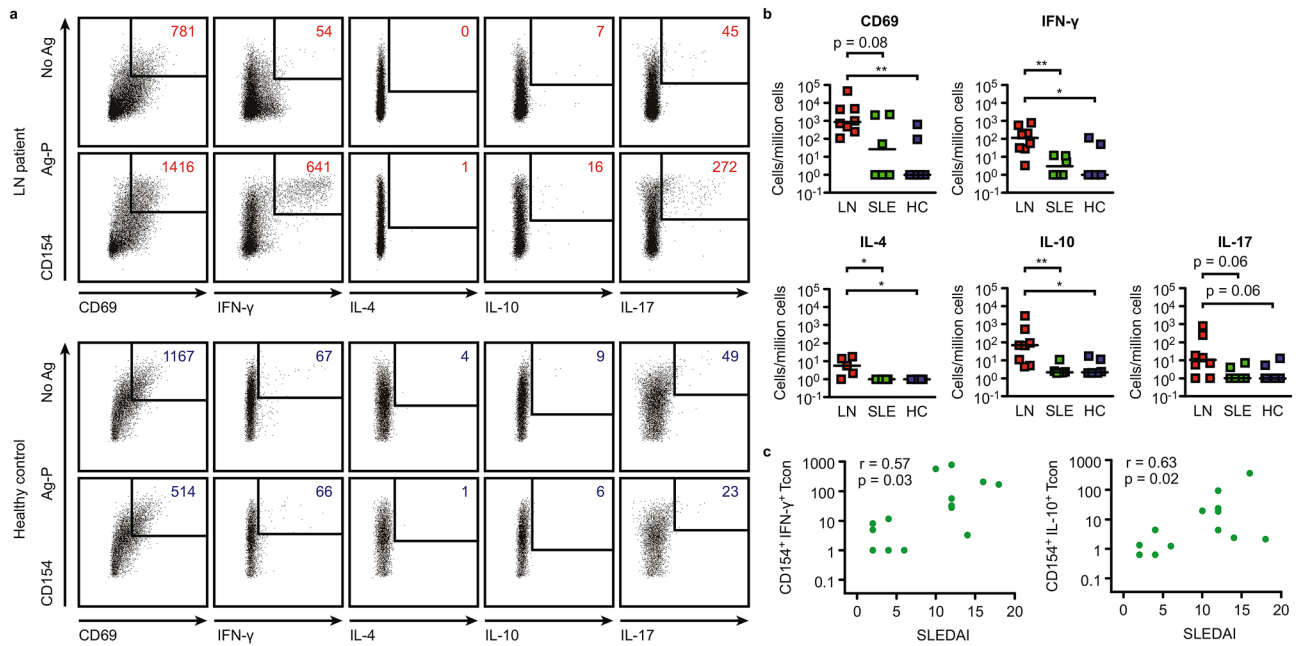


Figure 2. Renal autoantigen reactive CD4⁺ T cells are expanded in active LN patients. (a) Depiction of an example dot plot of CD3⁺CD4⁺ T cells from an active LN patient (top) and an HC (bottom). Cells were stimulated with Ag-P and subsequently enriched for CD154 via magnetic beads (ARTE method). Numbers indicate the cell count. (b) Calculated frequencies of CD69⁺, IFN- γ ⁺, IL-4⁺, IL-10⁺, IL-17⁺ autoreactive CD154⁺ Tcons for active LN patients (n=8), inactive SLE patients (n=6) and HCs (n=6). Horizontal lines depict the median. (c) Correlation of CD154⁺IFN- γ ⁺ and CD154⁺IL-10⁺ Tcons with disease activity (SLEDAI, n=14). The Mann-Whitney test was used for statistical analysis in (b), Spearman's rank correlation in c. (*p<0.05, **p<0.01; r = Spearman's rank correlation coefficient). Ag-P contained VIM, ANXA1, ANXA2, RPLP1 and RPLP2. ARTE antigen reactive T cell enrichment, No Ag no antigen, Ag-P antigen pool, LN lupus nephritis, SLE systemic lupus erythematosus, HC healthy control, SLEDAI systemic lupus disease activity index, PBMC peripheral blood mononuclear cells, Tcon conventional CD3- and CD4-positive T cells, VIM Vimentin, ANXA1 Annexin A1, ANXA2 Annexin A2, RPLP1 Ribosomal Protein P1, RPLP2 Ribosomal Protein P2.

Identification of five potential target antigens. At present, no major T cell targets are known in LN. To identify potential renal T cell antigens, we used two assumptions. First, as SLE is characterized by the production of autoantibodies, we hypothesized that an anti-renal CD4⁺ T cell response would likely be accompanied by antibodies targeting the same antigens. Second, as lysates from healthy kidneys only elicited minor/no T cell responses, we assumed that the relevant T cell antigens are only upregulated upon kidney inflammation, as has been described for autoreactive B cells¹⁸. Applying both assumptions, five target antigens with increased expression and a strong association of the coherent autoantibody with LN development were identified: Vimentin, Annexin A1, Annexin A2, Ribosomal Protein P1, and Ribosomal Protein P2. A flowchart depicting the search algorithm is shown in Supplemental Fig. 1a.

Antigen-specific CD4⁺ T cells arise in LN and are mainly of the Th1 phenotype. Next, we used flow cytometry to characterize the autoreactive T cell response against an antigen pool (Ag-P) containing all five identified antigens. Prior to measurement, cells were magnetically enriched for CD154, which is expressed by CD4⁺ T cells upon interaction with antigen-presenting cells. Thus, CD154 represents a marker for antigen-specific activation. This method has been termed antigen reactive T cell enrichment (ARTE) and enables the detection of low frequency antigen-specific T cells¹⁹.

In addition to CD154 and CD69, lineage determining cytokines for Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4) and Th17 (IL-17) T cells as well as IL-10 were measured²⁰. An exemplary dot plot for one active LN patient and one HC is shown in Fig. 2a. Background cell numbers were subtracted from Ag-P stimulated samples, resulting frequencies are depicted in Fig. 2b, and cell frequencies without subtraction are shown in Supplemental Fig. 1i (n = 8 LN, 6 SLE and HCs).

More conventional CD3- and CD4-positive T cells (Tcons) expressing CD154 and CD69 were detected in active LN patients than in HCs (Mann-Whitney test p = 0.008). Differences between active and inactive patients were numerically different but did not reach statistical significance (Mann-Whitney test p = 0.08). Significantly more CD154⁺IFN- γ ⁺ Tcons were found in LN patients than in inactive SLE patients or HCs (Mann-Whitney test p = 0.008 and p = 0.03, respectively), with a median cell number of 112 cells per million cells in LN patients. The same was true for CD154⁺IL-10⁺ Tcons (Mann-Whitney test p = 0.008 and p = 0.02, respectively) with a median cell number of 70 cells per million cells. Very few CD154⁺IL-4⁺ Tcons were detected in all three groups. Although differences between active LN patients and inactive SLE patients or HCs reached statistical significance (Mann-Whitney test for both p = 0.02), the detection was rather questionable due to extremely low overall cell

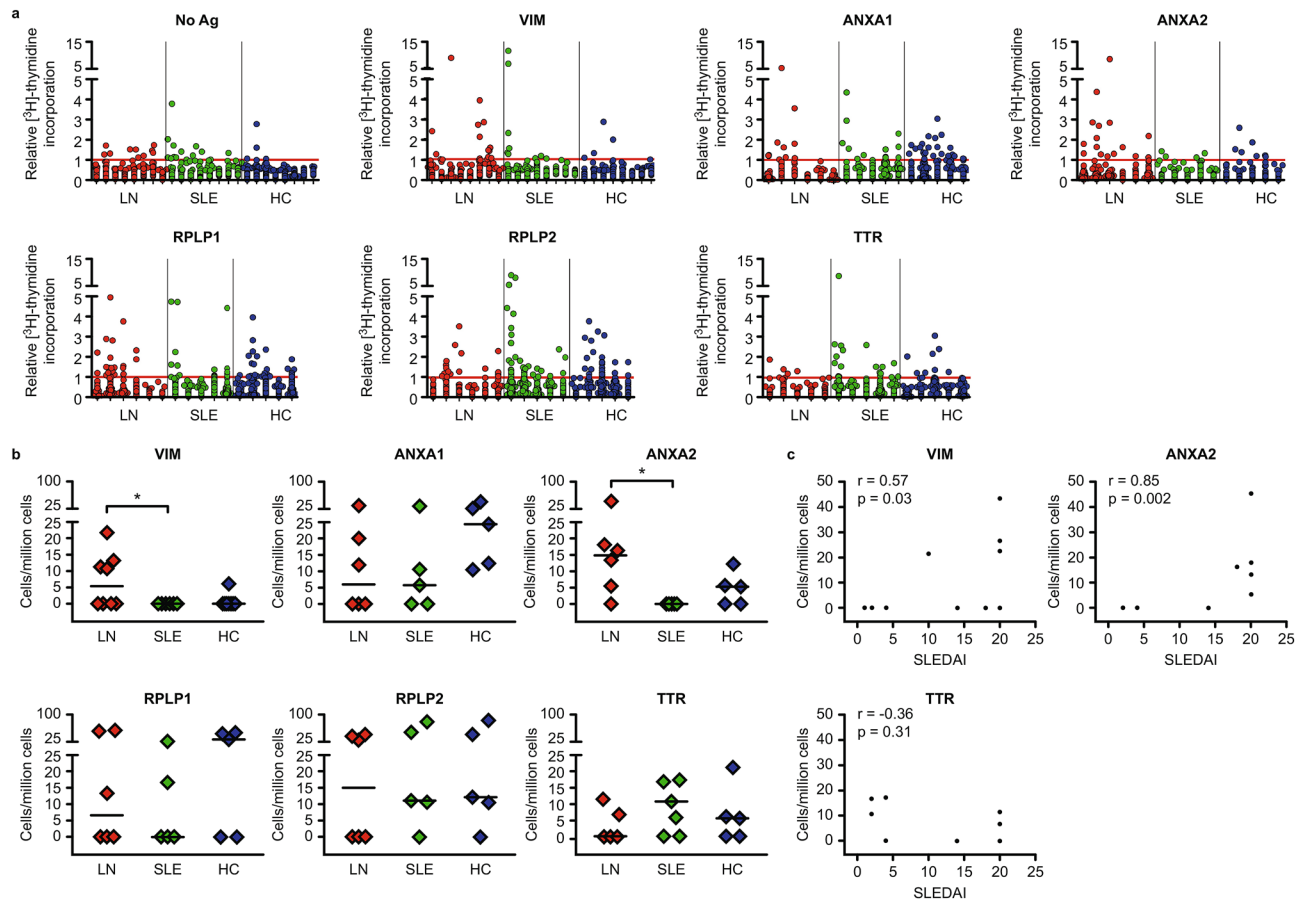


Figure 3. CD4⁺ T cell responses against single antigens. **(a)** CD4⁺ T cell libraries from active LN patients, inactive SLE patients and HCs were stimulated with single antigens. Each column shows the relative [³H]-thymidine incorporation from a single patient, and each dot represents one microculture in a 96-well plate. Microcultures with a relative [³H]-thymidine incorporation above one (red line) were assumed to contain one reactive T cell. Libraries were set up with 2000 T cells per well. **(b)** Estimated frequencies of autoreactive CD4⁺ T cells. Background (no Ag) was subtracted. **(a,b)** VIM n = 8 for LN, SLE and HCs, other antigens n = 6 for LN and n = 5 for SLE, and HCs, for TTR n = 5 for LN, SLE and HCs. **(c)** Correlation of calculated autoreactive T cell frequencies for VIM, ANXA2 and TTR (control Ag) with disease activity (SLEDAI, VIM n = 10, ANXA2 n = 8, TTR n = 8). The Mann–Whitney test was used for statistical analysis in **(b)**, Spearman’s rank correlation in **(c)** (*p < 0.05), **p < 0.01, r = Spearman’s rank correlation coefficient). Horizontal lines depict the median. No Ag no antigen, Ag antigen, VIM Vimentin, ANXA1 Annexin A1, ANXA2 Annexin A2, RPLP1 Ribosomal Protein P1, RPLP2 Ribosomal Protein P2, TTR Transthyretin.

frequencies. Differences in CD154⁺IL-17⁺ Tcon frequencies were almost statistically significant (Mann–Whitney test for both p = 0.07) with a median cell frequency of 10 cells per million cells. The cell frequencies of CD154⁺IFN- γ ⁺ and CD154⁺IL-10⁺ autoreactive Tcons positively correlated with disease activity (systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI, n = 14), as determined by Spearman’s rank correlation coefficients (r = 0.57, p = 0.03 and r = 0.63, p = 0.02, respectively, Fig. 2c).

Vimentin and Annexin A2 are the prominent antigens for active LN patients compared to inactive patients. CD4⁺ T cell libraries were used to dissect the responses detected with flow cytometry and to evaluate the specific T cell reactivity to single antigens (for VIM all n = 8, other antigens n = 6 LN, n = 5 SLE and HCs, TTR all n = 5). Proliferation upon antigen challenge for all patients and antigens is shown in Fig. 3a.

Significant differences in autoreactive T cell frequencies between active LN and inactive SLE patients were found for VIM and ANXA2 (Mann–Whitney test, p = 0.03 and p = 0.02, respectively, Fig. 3b). Numerical differences, but no statistical significance, were observed when patients were compared to HCs (Mann–Whitney test, p = 0.08 and p = 0.1, respectively).

Reactive T cell frequencies for the control Ag TTR were comparable among all three groups. The frequencies of VIM and ANXA2 reactive T cells correlated with disease activity (SLEDAI) as determined by Spearman’s rank correlation coefficients (for VIM r = 0.57, p = 0.03; for ANXA2 r = 0.85, p = 0.002). In contrast, no correlation was found for TTR (r = -0.36, p = 0.31; Fig. 3c).

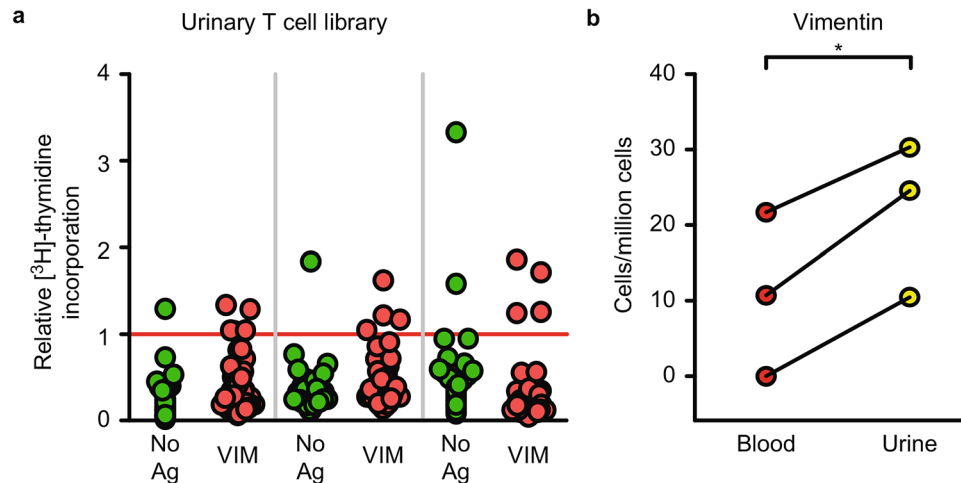


Figure 4. More Vimentin reactive CD4⁺ T cells were found in the urine of three patients with active LN. (a) Urinary CD4⁺ T cell libraries were stimulated with VIM or no Ag. Each column shows the relative [³H]-thymidine incorporation from a single patient, and each dot represents one microculture in a 96-well plate. Microcultures with a relative [³H]-thymidine incorporation above one (red line) were assumed to contain one reactive T cell. Libraries were set up with 2000 T cells per well. (b) Comparison of calculated frequencies of VIM-reactive CD4⁺ T cells in the blood and urine of LN patients (n=3). Background (no Ag) was subtracted from each respective antigen group to calculate frequencies. Paired t test was used for statistical analysis. No Ag no antigen, VIM Vimentin.

Detection of urinary CD4⁺ T cells reactive to Vimentin in active LN patients. CD4⁺ T cells are enriched in the urine of patients with active LN and have been shown to provide a better biomarker than proteinuria or sediment^{21–23}. These cells most likely originate from the kidneys, since they express CXCR3 and seem to have mainly an effector memory phenotype^{21,22}.

We additionally succeeded in establishing urinary CD4⁺ T cell libraries from three patients with active LN. Libraries were stimulated with Vimentin, no antigens or SEB. A generally lower SEB proliferation index in urinary T cell libraries compared to blood was observed, which prompted us to accept a proliferation index of 3 as a criterion for exclusion of “unfit” microcultures (Supplemental Fig. 1f). Proliferation upon antigen challenge for all microcultures is shown in Fig. 4a. Significantly more Vimentin reactive T cells were found in urine than in blood of three LN patients (p = 0.02, paired t test), indicating kidney infiltration at the antigen-specific level (Fig. 4b). These results remained significant when applying the same microculture exclusion criteria as with blood cells (p = 0.02, paired t test, data not shown).

Discussion

The concept of an antigen-specific CD4⁺ T cell response against kidney tissues in LN is favoured by reports of local MHC II upregulation, infiltration of oligoclonal CD4⁺ T cells in the interstitium of kidneys and a restricted renal T cell receptor repertoire^{8,13,24}. Surprisingly, when we stimulated CD4⁺ T cells with kidney lysates from healthy individuals, no clear anti-renal T cell response was detectable with conventional flow cytometry. Additional testing of the most promising lysate in T cell libraries also provoked only marginal reactivity.

However, the lysates were manufactured from kidney tissues of patients who were not affected by SLE. In patients with active LN, the local inflammatory environment possibly provides different antigens. For B cells, this has already been shown in a study that described Vimentin as the major target of in situ humoral immunity in the tubulointerstitium of LN patients¹⁸. Assuming that B cell antigens also represent potential T cell antigens in SLE, we identified autoantibodies that have a strong association with LN development. We selected antibodies whose targets have increased expression in the kidney interstitium of LN patients, thus identifying potential renal antigens.

It needs to be stressed that the selected antigens are not exclusively expressed in the kidneys and therefore do not represent “pure” renal antigens. Additionally, potential further renal antigens may have been excluded in our antigen selection process. Therefore, the choice of antigens used is neither renal exclusive nor comprehensive. Nevertheless, the association of the respective autoantibodies with LN and the renal expression of these antigens, together with the presence of antigen-specific T cells, suggest that the respective autoreactive T cells may very well play a role in LN pathogenesis.

The detected CD4⁺ T cell response was mainly driven by IFN- γ -producing Th1 cells. This is in line with other publications that have also described Th1 cells as having an essential role in LN development^{25,26}. Interestingly, a dominating Th1 response has been identified in humans both in blood and renal tissue²⁵.

Furthermore, we detected IL-10-producing CD4⁺ T cells, which are likely to act as immunosuppressive agents²⁷. However, due to the bipolar role of IL-10, these cells could also contribute to inflammation, possibly by

activating B cells²⁸. Enhanced autoantibody production by autoreactive B cells could then in turn lead to more severe renal inflammation and damage.

Determining the involvement of antigen-specific T cells in human disease pathogenesis in general is still an ongoing scientific challenge, and different approaches have been described in the literature. A recent paper analysed gluten-specific CD4⁺ T cells in patients with celiac disease via gluten tetramer binding and found overlapping clonotypes in gut and peripheral blood, which also persisted over time. During antigen challenge, the observed frequencies of CD4⁺ gluten-specific effector memory cells in blood ranged from approximately 10¹ to 10³ cells per million CD4⁺ T cells, which is remarkably close to the frequencies we observed with kidney antigens in LN patients²⁹.

Recently, the presence of CD4⁺ T cells reactive to citrullinated aggrecan epitopes in patients with rheumatoid arthritis (RA) has been described. In their study, the authors used tetramer staining to show that RA patients had significantly higher numbers of autoantigen-specific CD4⁺ T cells in peripheral blood than HCs³⁰, again indicating a potential role for CD4⁺ T cells in autoimmune disease pathogenesis. Interestingly, frequencies ranged roughly from two to eight cells per million CD4⁺ T cells, which is on the same order of magnitude as our single-antigen T cell library results in LN patients.

With T cell libraries, we identified Vimentin and Annexin A2 as the main, but not exclusive, T cell targets. Given the potential contribution of a SLE associated hyperresponsiveness, cells were also stimulated with the control antigen TTR and no differences in reactive cell numbers were detected. Using the same experimental set-up, previous work from our group also found no differences between active and inactive SLE patients and healthy controls upon stimulation with the recall antigen MP65 from *candida albicans*³¹.

Annexin A2 also mediates the binding of beta 2-glycoprotein I to endothelial cells in antiphospholipid syndrome (APSN)³². In renal histopathological samples from LN and APSN patients, Annexin A2 has been described as being highly expressed in glomerular and peritubular capillaries and thus was associated with vascular lesions³³. As mentioned before, epithelial cells in the kidneys have been described to express MCH II. Therefore, they might be responsible for the antigen presentation of Annexin A2 to autoreactive T cells in human LN. In contrast, Vimentin has been described to be mainly an interstitial antigen¹⁸. It could be speculated that Annexin A2 might particularly represent a vascular T cell target, while Vimentin might be more relevant in the interstitium. Potentially, this could contribute to the observation of intrarenal vascular changes typically associated with APSN in LN biopsies. However, further studies with clear histopathological focus are required to address this issue.

Interestingly, no major T cell response against ribosomal P proteins was detectable in our experiments. However, given the association of autoantibodies directed against these proteins with neuropsychiatric lupus, they might be more relevant in the pathogenesis of this SLE subtype³⁴. An argument for this hypothesis could be that anti-ribosomal autoantibodies have been associated with a favourable renal function in LN if dsDNA antibodies were present³⁵.

We additionally detected more Vimentin reactive T cells in urine than in blood of LN patients, indicating kidney infiltration at the antigen-specific level. Reports of oligoclonal T cell enrichment in LN kidneys determined by Vβ TCR analysis and the detection of CXCR3-positive T cells in the urine of LN patients further support this concept^{13,23}.

It is intriguing to assume that the local microenvironment in the kidneys of LN patients provides these renal antigens, thus driving infiltrating autoreactive CD4⁺ T cells to further boost the inflammatory process. They could then stimulate other immune cells on site, possibly via cytokine production.

Our study has several limitations. Restricted numbers of available PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) per patient forced us to leave out a positive control in the ARTE experiments. Additionally, the number of SLE patients, especially those presenting with new renal involvement, had to remain limited. We used all CD3⁺ cells as antigen-presenting cells in T cell libraries, in contrast to the originally described procedure, which solely relied on monocytes³⁶. Although T cell expanding conditions were used in CD4⁺ T cell libraries, especially in active SLE patients and in urinary T cell libraries, purity was not 100% when cultures were set up. Additionally, we only succeeded in establishing three urinary T cell libraries due to inherent urinary cell death. In contrast to the more or less dichotomous categorisation of T cells in being reactive/non-reactive, future investigations should address gradual stages of reactivity. To this end we are presently cloning different TCRs of potentially autoreactive T cells. Using this approach, we hope to further validate the current findings and better understand the autoantigen recognition process in the future. Finally, although our used controls make it unlikely that a SLE associated general hyperresponsiveness causes the observed results we cannot completely rule out a contribution of unspecific effects.

Nevertheless, we believe that despite these limitations, the consistent detection of renal autoantigen reactive T cells with two complementary methods strengthens our observations and the validity of our main findings.

Altogether, our results demonstrate that CD4⁺ T cells reacting with renally expressed antigens arise in the course of LN. These cells are mainly of the Th1 phenotype, very likely contribute to renal damage and may represent a promising treatment target.

Methods

Patients. Samples were collected after informed consent was obtained from patients with SLE at the Medical Department, Division of Rheumatology and Clinical Immunology and the Division of Nephrology and Internal Intensive Care at the Charité University Hospital. Ethics approval was obtained from the Ethics Commission of the Charité (number EAI/036/16). All experiments were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. Samples from healthy controls were obtained from voluntary donors after informed consent.

	Flow cytometry		T cell library	
	SLE patients	Healthy controls	SLE patients	Healthy controls
Number of patients	23	12	4	5
Sex	20 f/3 m	9 f/3 m	1 f/3 m	2 f/3 m
Median age (range)	34 (22–70)	26 (22–31)	31 (26–62)	28 (23–35)
Disease activity (SLEDAI, median)	4 (0–26)	n.a	12 (8–14)	n.a

Table 1. Stimulation with kidney lysates.

	Active LN	Inactive SLE	Healthy controls
Number of patients	16	14	14
Sex	All female	All female	10 f/4m
Age (median)	32	30	26
Median disease activity (SLEDAI)	17	3	n.a
Treatment	6 × Cyclophosphamide 14 × Prednisone 4 × Azathioprine 6 × Hydroxychloroquine 1 × Rituximab 1 × Belimumab 1 × Mycophenolate-Mofetil	1 × Methotrexate 9 × Prednisone 7 × Azathioprine 10 × Hydroxychloroquine 1 × Rituximab 3 × Belimumab 1 × Mycophenolate-Mofetil	None

Table 2. Stimulation with kidney antigens (flow cytometry and T cell libraries).

Samples from 57 SLE patients and 31 HCs were collected. Blood samples from 23 SLE patients and 12 HCs were used for stimulation with kidney lysates and analysis with flow cytometry. T cells from four SLE patients and five HCs were stimulated with kidney lysates in T cell libraries (Table 1). T cells from 16 active LN patients, 14 inactive SLE patients and 14 HCs were stimulated with kidney antigens and measured either with flow cytometry or T cell libraries (Table 2). For three patients, urinary T cells were also analysed in T cell libraries. The disease activity was determined with the systemic lupus erythematosus disease activity index (SLEDAI)³⁷.

Recruitment. All patients with SLE presenting in our hospital were eligible for this study. For some patients, this was the first presentation of systemic lupus erythematosus. Blood was obtained as soon as possible to minimize potential treatment effects on the experiments. For almost all active cases, this was before histopathological data confirmed the diagnosis. For most inactive patients, blood draws were performed during a routine visit in the outpatient clinic. These patients had been previously diagnosed with SLE. All patients fulfilled the 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus³⁸. Active renal involvement was defined by high overall disease activity (SLEDAI \geq 10) and a current kidney biopsy (not older than 4 weeks) showing LN. In the absence of a current biopsy, active renal involvement was defined by high disease activity (SLEDAI \geq 10) and at least two elements of the renal SLEDAI. Histopathological classification for all patients who were tested in the experiments with potential renal antigens can be found in Supplementary Table 1. Recent information on glomerular vs interstitial involvement is provided, if available.

Stimulation with kidney lysates and measurement with flow cytometry. PBMCs were isolated from 10–40 ml of heparinized blood by Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Europe, Freiburg, Germany) density gradient centrifugation. PBMCs were resuspended in RPMI 1640 medium with GlutaMAX containing 1% penicillin/streptomycin (both Life Technologies, Carlsbad, California, USA), 5% human AB serum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany) and 1 μ g/ml anti-human CD28 antibody (eBioscience, San Diego, California, USA) and distributed in a 96-well round-bottom plate (Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Germany) in 100 μ l medium at a concentration of 5×10^5 PBMCs per well. Cells were then stimulated with three different kidney lysates at a concentration of 10 μ g/ml. Lysates from normal kidney tissue (KID, PromoCell, Heidelberg, Germany), epithelial cells of the tubulus (EPI) and epithelial cells of the proximal tubulus (TUB, both ScienCell, Carlsbad, California, USA) were used. The lysates were dialysed prior to use with Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units and Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Floats (both Thermo Scientific, Braunschweig, Germany). Cells were incubated for 6 h. For the last four hours, 2 μ g/ml Brefeldin A (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) was added. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde. Saponin (0.5%) in PBS/BSA/AZID (Deutsches Rheuma Forschungszentrum, DRFZ, Berlin, Germany) for intracellular staining. The following anti-human antibodies were used: CD3-PE (clone BW264/56), CD69-FITC (clone FN50; both Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Germany), CD3-PE (clone Ucht1), IFN- γ -Cy5 (clone 4SB3, all DRFZ), CD4-Pe-Cy7 (clone SK3), (BD Biosciences, San Jose, USA), CD40L-BV421 (clone 24–31), and IFN- γ -APC (clone 4SB3, both BioLegend Inc., San Diego, USA). Additionally, cells were stained with propidium iodide.

Cells counting. Cells were counted either with a Casy cell counter (Schärfe System GmbH, Reutlingen, Germany) or a Guava easyCyte flow cytometer (Merck Millipore, Massachusetts, USA).

Antigen identification. PubMed was searched for “lupus nephritis autoantibody” on the 8th of June 2015, including papers from 2011 to 2016. A review published in 2015 was used for autoantibodies identified prior to 2011³⁹. In total, 430 papers were found. Evaluation of the abstracts found 33 papers that described potential human kidney antigens. These were chosen and read in detail^{40–72}. Ten articles dealt with autoantibodies that were not already described in the review^{63–72}. In total, 34 autoantibodies were found; 22 autoantibodies were selected for which specific molecular targets were reported, and 12 “autoantibody-hits” were discarded because the targets were not defined on a molecular basis (e.g., endothelial cells). The targets of the remaining 22 autoantibodies (82 genes) were analysed, the gene expression in the tubulointerstitium of patients was compared between patients with LN and HCs. Gene expression data were retrieved from the Geo database⁷³. Twenty-one genes were found to have higher expression in the interstitium of patients with LN ($p < 0.01$; Mann–Whitney test). Nucleus-, blood-, and immune-associated genes were discarded as well as fibronectin, alpha actinin and laminin B1. Five target antigens remained: Vimentin, Ribosomal Protein P1, Ribosomal Protein P2, Annexin A1 and Annexin A2. Transthyretin was chosen as a negative control. With plasma concentrations of 20–40 mg/dl, it is a highly abundant protein in human blood and not differentially expressed in the kidneys of LN patients^{73,74}.

Antigen reactive T cell enrichment (ARTE). Low frequencies and high background have hampered the identification and characterization of antigen-specific autoreactive T cells. Recently, the antigen reactive T cell enrichment (ARTE) method has been developed to overcome these difficulties. We adapted the assay from the originally described procedure¹⁹. PBMCs were isolated from 40–50 ml of heparinized blood by Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Europe) density gradient centrifugation. Cells were rested overnight in PBS/BSA (DRFZ). PBMCs were distributed on a 12-well plate (Greiner-Bio-One) in 1 ml of RPMI 1640 medium per well with GlutaMAX containing 1% penicillin/streptomycin (both Life Technologies), 5% human AB serum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD28 (eBioscience) and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD40 antibody (Miltenyi Biotec GmbH). Either no antigen or an antigen pool (Ag-P) containing Vimentin, Annexin A1, Annexin A2, Ribosomal Protein P1 and Ribosomal Protein P2 each at a concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was added. Because of limitations in available patient samples and the expectation of very few antigen-specific T cells, whole PBMCs were used for Ag-P stimulation only, and no further positive control was included. Cells were incubated for 7 h. A total of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Brefeldin A (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) was added after 5 h of incubation. Cells were harvested, counted with a Guava easyCyte Flow Cytometer (Merck Millipore, Massachusetts, USA) and enriched via CD154 MicroBeads and MS columns (both Miltenyi Biotec GmbH). The enriched fraction was fixed with 2% paraformaldehyde (DRFZ). Intracellular staining was performed with BD FACS Permeabilizing Solution 2 (BD Biosciences). The following anti-human antibodies were used: CD3-VioGreen (clone BW264/56), CD4-APC-Vio770 (clone M-T321), CD69-VioBlue (clone FN50), Biotin-PE, CD154-PE (clone 24–31; all Miltenyi Biotec GmbH), CD69-PerCP (clone FN50), IFN- γ -APC (clone 4S.B3), IL-10-PECy7 (clone JES3-9D7; all BioLegend Inc), IL-4-FITC (clone BS4), IL-17-PerCPCy5.5 (clone eBio64DEC17; both Life Technologies Europe BV), and IL-17-BV786 (clone N49-653, BD Biosciences).

Calculation of cell frequencies. Cell frequencies in original samples were calculated by dividing the cell count of enriched autoreactive T cells by the CD3⁺CD4⁺ cell count in the original sample prior to enrichment, since the enrichment process analysing percentages in flow cytometry makes no sense (one needs to consider whole cell counts in enriched samples, not percentages). Background (no Ag) was then subtracted, whereas negative results were counted as zero. Then, $\log(x + 1)$ transformation was performed.

T cell libraries. Again, the assay was adopted from the originally described procedure³⁶. PBMCs were isolated from 40–50 ml of heparinized blood by Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Europe) density gradient centrifugation. T cells were enriched via CD4 MicroBeads and LS columns. The negative fraction was then depleted via CD3 MicroBeads and LD columns (all Miltenyi Biotec GmbH). Purity was checked afterwards with CD3/CD4 staining and flow cytometry (median purity: LN 0.65; SLE 0.94; HCs 0.97). Because of limited access to patient PBMCs, the whole CD3⁻ fraction was cryopreserved in liquid nitrogen and utilized as antigen-presenting cells. Cells were counted with a Casy cell counter (Schärfe System GmbH). A total of 2,000 CD4⁺ T cells were cultured per well in a 96-well round-bottom plate (Greiner-Bio-One) in 20 ml IMDM with GlutaMAX containing 1% penicillin/streptomycin (both Life Technologies), 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ciprofloxacin, 5% human AB serum, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA, 1% MEM nonessential amino acid solution (all Sigma-Aldrich Chemie GmbH) and 1×10^5 irradiated feeder cells/ml (self-prepared at the DRFZ) and 600 IU/mL IL-2 (Proleukin/Aldesleukin, Novartis Pharma GmbH, Nuremberg, Germany). The medium was exchanged after three and seven days. On day nine, the cultures were split into eight 96-well plates and stimulated once more with PHA and IL-2 for further expansion. After three days, the medium was exchanged, and the cells rested for at least four days. Then, new medium containing the CD3⁻ fraction and either no antigen, Vimentin (Orgentec Diagnostica GmbH, Mainz, Germany), Annexin A1, Annexin A2, Ribosomal Protein P1, Ribosomal Protein P2, or Transthyretin (Antibodies Online, Aachen, Germany) at a concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or staphylococcal enterotoxin B (SEB, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was added. Antigens were desalted with 0.5 ml Zeba Spin Desalting Columns (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) prior to use. T cells from four SLE patients and five HCs were stimulated with lysates from normal kidney tissue (PromoCell) at a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Two days later, [³H]-thymidine (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, United Kingdom) was added, and proliferation was measured 16 h later in a MicroBeta² Plate Counter (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA). For three

patients with active lupus nephritis, urinary T cells were enriched via CD4 MicroBeads (Miltenyi Biotec GmbH) in addition to blood T cells, expanded in libraries and stimulated with no antigen or Vimentin.

Microcultures with an SEB stimulation index below five were excluded from further statistical analysis, with the exception of urine-derived libraries, for which a stimulation index of three was used due to lower overall proliferation (Supplemental Fig. 1f). [³H]-Thymidine incorporation values were not normally distributed; therefore, a new analysis method was used (Supplemental Fig. 1e). Instead of comparing mean cpm values, a threshold was defined by calculating the median of the unstimulated samples and adding 5 × (3rd quartile–1st quartile). All data sets of each individual patient were then divided by the threshold, thus enabling data presentation and comparison with a relative [³H]-thymidine incorporation. Microcultures with a relative [³H]-thymidine incorporation above one were assumed to contain one reactive T cell. Autoreactive T cell frequencies were then calculated, and background (no antigen) was subtracted.

Flow cytometry. Cells were measured using a BD FACSCanto II or BD LSRFortessa (BD Biosciences, San Jose, USA) flow cytometer using FACSDiva software (BD Biosciences) or using a MACSQuant flow cytometer (Miltenyi Biotec GmbH) at the Flow Cytometry Core Facility (FCCF) of the German Rheumatism Research Center (DRFZ) in Berlin, Germany. Data were analysed with FlowJo Analysis software (Three Star, Ashland, USA).

Statistical analysis. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 5 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com). The Mann–Whitney test was used to compare nonpaired samples. The Wilcoxon signed rank test was used to compare samples of single donors in different conditions. For the comparison of Vimentin-specific T cell frequencies in blood and urine, paired t tests were used. Nonparametric correlation was analysed using Spearman's rank correlation coefficients.

Data availability

The datasets generated and analysed during the current study are available from the corresponding author on request.

Received: 18 January 2020; Accepted: 17 November 2020

Published online: 04 December 2020

References

- Mills, J. A. Systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* **330**, 1871–1879 (1994).
- Cervera, R. *et al.* Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1000 patients. *Medicine* **82**, 299–308 (2003).
- Appel, G. B. *et al.* Mycophenolate mofetil versus cyclophosphamide for induction treatment of lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 1103–1112 (2009).
- Moore, R. A. & Derry, S. Systematic review and meta-analysis of randomised trials and cohort studies of mycophenolate mofetil in lupus nephritis. *Arthritis Res. Ther.* **8**, R182 (2006).
- Weening, J. J. *et al.* The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 241–250 (2004).
- Borchers, A. T. *et al.* Lupus nephritis: A critical review. *Autoimmun. Rev.* **12**, 174–194 (2012).
- Hahn, B. H. *et al.* American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis Care Res.* **64**, 797–808 (2012).
- Jeruc, J. *et al.* Tubulo-interstitial involvement in lupus nephritis with emphasis on pathogenesis. *Wien. Klin. Wochenschr.* **112**, 702–706 (2000).
- Brentjens, J. R. *et al.* Interstitial immune complex nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Kidney Int.* **7**, 342–350 (1975).
- Park, M. H., D'Agati, V., Appel, G. B. & Pirani, C. L. Tubulointerstitial disease in lupus nephritis: relationship to immune deposits, interstitial inflammation, glomerular changes, renal function, and prognosis. *Nephron* **44**, 309–319 (1986).
- Schwartz, M. M., Fennell, J. S. & Lewis, E. J. Pathologic changes in the renal tubule in systemic lupus erythematosus. *Hum. Pathol.* **13**, 534–547 (1982).
- Kelley, V. R. & Singer, G. G. The antigen presentation function of renal tubular epithelial cells. *Exp. Nephrol.* **1**, 102–111 (1993).
- Massengill, S. E., Goodenow, M. M. & Sleasman, J. W. SLE nephritis is associated with an oligoclonal expansion of intrarenal T cells. *Am. J. Kidney Dis.* **31**, 418–426 (1998).
- Chan, O. T., Hannum, L. G., Haberman, A. M., Madaio, M. P. & Shlomchik, M. J. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J. Exp. Med.* **189**, 1639–1648 (1999).
- Zakheim, B., McCafferty, E., Phillips, S. M., Clayman, M. & Neilson, E. G. Murine interstitial nephritis. II. The adoptive transfer of disease with immune T lymphocytes produces a phenotypically complex interstitial lesion. *J. Immunol.* **133**, 234–239 (1984).
- Okamoto, A., Fujio, K., Tsuno, N. H., Takahashi, K. & Yamamoto, K. Kidney-infiltrating CD4+ T-cell clones promote nephritis in lupus-prone mice. *Kidney Int.* **82**, 969–979 (2012).
- Meier, S., Stark, R., Frensch, M. & Thiel, A. The influence of different stimulation conditions on the assessment of antigen-induced CD154 expression on CD4+ T cells. *Cytometry A* **73**, 1035–1042 (2008).
- Kinloch, A. J. *et al.* Vimentin is a dominant target of in situ humoral immunity in human lupus tubulointerstitial nephritis. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 3359–3370 (2014).
- Bacher, P. *et al.* Antigen-reactive T cell enrichment for direct, high-resolution analysis of the human naive and memory Th cell repertoire. *J. Immunol.* **190**, 3967–3976 (2013).
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N. & Forsthuber, T. G. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* **74**, 5–17 (2015).
- Dolf, S. *et al.* Urinary T cells in active lupus nephritis show an effector memory phenotype. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 2034–2041 (2010).
- Enghard, P. *et al.* CXCR3+CD4+ T cells are enriched in inflamed kidneys and urine and provide a new biomarker for acute nephritis flares in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum.* **60**, 199–206 (2009).
- Kopetschke, K. *et al.* The cellular signature of urinary immune cells in Lupus nephritis: new insights into potential biomarkers. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 94 (2015).

24. Murata, H. *et al.* T cell receptor repertoire of T cells in the kidneys of patients with lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* **46**, 2141–2147 (2002).
25. Masutani, K. *et al.* Predominance of Th1 immune response in diffuse proliferative lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* **44**, 2097–2106 (2001).
26. Kitching, A. R., Holdsworth, S. R. & Tipping, P. G. Crescentic glomerulonephritis—a manifestation of a nephritogenic Th1 response?. *Histol. Histopathol.* **15**, 993–1003 (2000).
27. Hedrich, C. M. & Bream, J. H. Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. *Immunol. Res.* **47**, 185–206 (2010).
28. Rousset, F. *et al.* Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 1890–1893 (1992).
29. Risnes, L. F. *et al.* Disease-driving CD4+ T cell clonotypes persist for decades in celiac disease. *J. Clin. Invest.* **128**, 2642–2650 (2018).
30. Rims, C. *et al.* Citrullinated aggrecan epitopes as targets of autoreactive CD4+ T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **71**, 518–528 (2019).
31. Abdirama, D. *et al.* Nuclear antigen-reactive CD4+ T cells expand in active systemic lupus erythematosus, produce effector cytokines, and invade the kidneys. *Kidney Int.* online ahead of print: [https://www.kidney-international.org/article/S0085-2538\(20\)30704-3/fulltext](https://www.kidney-international.org/article/S0085-2538(20)30704-3/fulltext) (2020)
32. Ma, K. *et al.* High affinity binding of beta 2-glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II. *J. Biol. Chem.* **275**, 15541–15548 (2000).
33. Salle, V. *et al.* Vascular expression of annexin A2 in lupus nephritis. *J. Clin. Pathol.* **69**, 533–536 (2016).
34. González, A. & Massardo, L. Antibodies and the brain: antiribosomal P protein antibody and the clinical effects in patients with systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Neurol.* **31**, 300–305 (2018).
35. Sarfaraz, S., Anis, S., Ahmed, E. & Muzaffar, R. Clinical significance of anti-ribosomal P protein antibodies in patients with lupus nephritis. *Rev. Recent Clin. Trials* **13**, 281–286 (2018).
36. Geiger, R., Duhon, T., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Human naive and memory CD4+ T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells. *J. Exp. Med.* **206**, 1525–1534 (2009).
37. 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**, 630–640 (1992).
38. Aringer, M. *et al.* 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* **71**, 1400–1412 (2019).
39. Yaniv, G. *et al.* A volcanic explosion of autoantibodies in systemic lupus erythematosus: A diversity of 180 different antibodies found in SLE patients. *Autoimmun. Rev.* **14**, 75–79 (2015).
40. Doe, K. *et al.* Antibody against chromatin assembly factor-1 is a novel autoantibody specifically recognized in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **23**, 1031–1041 (2014).
41. Yin, Y., Wu, X., Shan, G. & Zhang, X. Diagnostic value of serum anti-C1q antibodies in patients with lupus nephritis: A meta-analysis. *Lupus* **21**, 1088–1097 (2012).
42. Hermansen, M. L. *et al.* Increased serum β 2-microglobulin is associated with clinical and immunological markers of disease activity in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* **21**, 1098–1104 (2012).
43. Gullstrand, B. *et al.* Combination of autoantibodies against different histone proteins influences complement-dependent phagocytosis of necrotic cell material by polymorphonuclear leukocytes in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* **39**, 1619–1627 (2012).
44. Vicuña, L. *et al.* Galectin-8 binds to LFA-1, blocks its interaction with ICAM-1 and is counteracted by anti-Gal-8 autoantibodies isolated from lupus patients. *Biol. Res.* **46**, 275–280 (2013).
45. Timofeeva, A. M., Dmitrenok, P. S., Konenkova, L. P., Buneva, V. N. & Nevinsky, G. A. Multiple sites of the cleavage of 21- and 25-mer encephalytogenic oligopeptides corresponding to human myelin basic protein (MBP) by specific anti-MBP antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS ONE* **8**, e51600 (2013).
46. Al-Shobaili, H. A., Al Robaee, A. A., Alzolibani, A. A. & Rasheed, Z. Antibodies against 4-hydroxy-2-nonenal modified epitopes recognized chromatin and its oxidized forms: Role of chromatin, oxidized forms of chromatin and 4-hydroxy-2-nonenal modified epitopes in the etiopathogenesis of SLE. *Dis. Markers* **33**, 19–34 (2012).
47. Alzolibani, A. A., Al Robaee, A. A., Al-Shobaili, H. A. & Rasheed, Z. 4-Hydroxy-2-nonenal modified histone-H2A: A possible antigenic stimulus for systemic lupus erythematosus autoantibodies. *Cell. Immunol.* **284**, 154–162 (2013).
48. Bertolaccini, M. L., Murru, V., Sciascia, S., Sanna, G. & Khamashta, M. A. The clinical value of testing for antibodies to phosphatidylethanolamine (aPE) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Thromb. Res.* **130**, 914–918 (2012).
49. Chen, Z., Wang, G. S., Wang, G. H. & Li, X. P. Anti-C1q antibody is a valuable biological marker for prediction of renal pathological characteristics in lupus nephritis. *Clin. Rheumatol.* **31**, 1323–1329 (2012).
50. Grönwall, C. *et al.* IgM autoantibodies to distinct apoptosis-associated antigens correlate with protection from cardiovascular events and renal disease in patients with SLE. *Clin. Immunol.* **142**, 390–398 (2012).
51. Hagberg, N. *et al.* Anti-NKG2A autoantibodies in a patient with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* **52**, 1818–1823 (2013).
52. Hershko, A. Y., Scheiman-Elazari, A., Aamar, S. & Naparstek, Y. Extracorporeal immunoadsorption of antibodies against the VRT-101 laminin epitope in systemic lupus erythematosus: A feasibility evaluation study. *Immunol. Res.* **56**, 376–381 (2013).
53. Huang, W. *et al.* Novel systemic lupus erythematosus autoantigens identified by human protein microarray technology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **418**, 241–246 (2012).
54. Iaccarino, L. *et al.* Anti-annexins autoantibodies: Their role as biomarkers of autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* **10**, 553–558 (2011).
55. Jenks, S. A. *et al.* 9G4+ autoantibodies are an important source of apoptotic cell reactivity associated with high levels of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **65**, 3165–3175 (2013).
56. Liu, C. *et al.* Carbonic anhydrases III and IV autoantibodies in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, diabetes, hypertensive renal disease, and heart failure. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 354594 (2012).
57. Price, J. V. *et al.* Protein microarray analysis reveals BAFF-binding autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **123**, 5135–5145 (2013).
58. Radanova, M. *et al.* Anti-C1q autoantibodies specific against the globular domain of the C1qB-chain from patient with lupus nephritis inhibit C1q binding to IgG and CRP. *Immunobiology* **217**, 684–691 (2012).
59. Shirai, T. *et al.* A novel autoantibody against fibronectin leucine-rich transmembrane protein 2 expressed on the endothelial cell surface identified by retroviral vector system in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* **14**, R157 (2012).
60. Yang, X. W., Tan, Y., Yu, F. & Zhao, M. H. Combination of anti-C1q and anti-dsDNA antibodies is associated with higher renal disease activity and predicts renal prognosis of patients with lupus nephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27**, 3552–3559 (2012).
61. Yoshio, T., Okamoto, H., Hirohata, S. & Minota, S. IgG anti-NR2 glutamate receptor autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus activate endothelial cells. *Arthritis Rheum.* **65**, 457–463 (2013).
62. Zeng, T. *et al.* The detection of autoantibodies to ATP-binding cassette transporter A1 and its role in the pathogenesis of atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Biochem.* **45**, 1342–1346 (2012).

63. Yung, S. & Chan, T. M. Autoantibodies and resident renal cells in the pathogenesis of lupus nephritis: Getting to know the unknown. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 139365 (2012).
64. Yang, X. W., Tan, Y., Yu, F. & Zhao, M. H. Interference of antimodified C-reactive protein autoantibodies from lupus nephritis in the biofunctions of modified C-reactive protein. *Hum. Immunol.* **73**, 156–163 (2012).
65. Taguchi, T., Nakayama, S., Fujimoto, S. & Terada, Y. Lupus nephritis with positive myeloperoxidase/proteinase 3-antineutrophil cytoplasmic autoantibody that developed after 17 years of propylthiouracil therapy. *Endocrine* **46**, 357–359 (2014).
66. Seret, G., Le Meur, Y., Renaudineau, Y. & Youinou, P. Mesangial cell-specific antibodies are central to the pathogenesis of lupus nephritis. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 579670 (2012).
67. Nozal, P. *et al.* Case report: Lupus nephritis with autoantibodies to complement alternative pathway proteins and C3 gene mutation. *BMC Nephrol.* **16**, 40 (2015).
68. Caster, D. J. *et al.* Autoantibodies targeting glomerular annexin A2 identify patients with proliferative lupus nephritis. *Proteomics Clin. Appl.* **9**, 1012–1020 (2015).
69. Bruschi, M. *et al.* Glomerular autoimmune multicomponents of human lupus nephritis in vivo: α -enolase and annexin AI. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 2483–2498 (2014).
70. Bonanni, A. *et al.* Multi-antibody composition in lupus nephritis: Isotype and antigen specificity make the difference. *Autoimmun. Rev.* **14**, 692–702 (2015).
71. Doria, A. & Gatto, M. Nephritogenic-antinephritogenic antibody network in lupus glomerulonephritis. *Lupus* **21**, 1492–1496 (2012).
72. Sui, M. *et al.* Simultaneous positivity for anti-DNA, anti-nucleosome and anti-histone antibodies is a marker for more severe lupus nephritis. *J. Clin. Immunol.* **33**, 378–387 (2013).
73. Berthier, C. C. *et al.* Cross-species transcriptional network analysis defines shared inflammatory responses in murine and human lupus nephritis. *J. Immunol.* **189**, 988–1001 (2012).
74. Vieira, M. & Saraiva, M. J. Transthyretin: A multifaceted protein. *Biomol. Concepts* **5**, 45–54 (2014).
75. Griebbach, A. S. Analyse der analyse der antigenspezifischen antirenal CD4+ und CD8+ T-Zell-Antwort bei der Lupusnephritis. https://refubium.fu-berlin.de/bitstream/handle/fub188/1548/diss_as_griessbach.pdf?sequence=1&isAllowed=y (2017).

Acknowledgements

The results and figures of the experiments with kidney lysates are based on data that A-S.G. has published online as an MD thesis⁷⁵. The authors would like to thank the FCCF at the DRFZ for assistance with flow cytometry. We thank all patients and healthy donors who provided samples. This study was funded by grants from the German Society of Nephrology, the German Research Foundation (DFG) and the clinical scientist program of the Charité University Hospital Berlin and the Berlin Institute of Health to PE. S.T., A-S.G. and H.A.B were supported by the Leibniz Graduate School for Rheumatology (LGRh).

Author contributions

S.T., D.A., and A-S.G. designed, performed, analysed and interpreted the experiments. H.A.B., N.G., J.Y.H., P.B., F.H., and G.R. designed, analysed and interpreted the experiments. F.H., G.R., and P.E. supervised the human studies. S.T. and P.E. wrote the paper. All authors participated in the preparation of the paper. P.E. supervised the project and designed, analysed and interpreted the experiments.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78223-3>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.E.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

Lebenslauf

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

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

Publikationsliste

Goerlich N, Brand HA, Langhans V, Tesch S, Schachtner T, Koch B, Paliege A, Schneider W, Grützkau A, Reinke P, Enghard P. Kidney transplant monitoring by urinary flow cytometry: Biomarker combination of T cells, renal tubular epithelial cells, and podocalyxin-positive cells detects rejection. *Sci Rep.* 2020 Jan 21;10(1):796.

Journal Impact Factor: 4,0

Dimas Abdirama, Sebastian Tesch, Anna-Sophie Grießbach, Caroline von Spee-Mayer, Jens Y Humrich, Ulrik Stervbo, Nina Babel, Christian Meisel, Tobias Alexander, Robert Biesen, Petra Bacher, Alexander Scheffold, Kai-Uwe Eckardt, Falk Hiepe, Andreas Radbruch, Gerd-Rüdiger Burmester, Gabriela Riemekasten, Philipp Enghard. Nuclear antigen-reactive CD4 + T cells expand in active systemic lupus erythematosus, produce effector cytokines, and invade the kidneys. *Kidney Int.* 2020 Jun 24;S0085-2538(20)30704-3.

Journal Impact Factor: 8,9

Sebastian Tesch, Dimas Abdirama, Anna-Sophie Grießbach, Hannah Antonia Brand, Nina Goerlich, Jens Y Humrich, Petra Bacher, Falk Hiepe, Gabriela Riemekasten, Philipp Enghard. Identification and characterization of antigen-specific CD4 + T cells targeting renally expressed antigens in human lupus nephritis with two independent methods. *Sci Rep.* 2020 Dec 4;10(1):21312.doi: 10.1038/s41598-020-78223-3.

Journal Impact Factor: 4,0

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Kai-Uwe Eckardt danke ich vielmals für die Möglichkeit der Promotion in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und Internistische Intensivmedizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

Außerdem gilt Herrn Prof. Dr. med. Gerd-Rüdiger Burmester großer Dank dafür, dass ein Großteil der Arbeiten in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie erfolgen konnte.

Frau Prof. Dr. med. Gabriela Riemekasten danke ich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Möglichkeit ihre Laborräume für die praktischen Arbeiten zu nutzen.

Des weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Andreas Radbruch dafür danken, dass ich in den Räumlichkeiten des Deutschen Rheuma-Forschungszentrums arbeiten durfte.

Allergrößter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Philipp Enghard für die Überlassung des Promotionsthemas und seine unglaublich engagierte Unterstützung in allen Phasen der Anfertigung dieser Arbeit. Mit ihm zusammen „frickelige“ Methoden und „spannende“ Ergebnisse zu besprechen war eine wunderbare Erfahrung und eine große Freude, die ich sehr vermissen werde.

Größter Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. med. Falk Hiepe für die Mitbetreuung dieser Arbeit und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Herr Prof Hiepe hat außerordentlich viel bei der Probenakquisition geholfen und ohne seine vielfältige Unterstützung wäre die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Besonders großer Dank gilt Herrn Dr. Dimas Abdirama, der mir in meiner Zeit im Labor unglaublich viel beigebracht hat. Mit Dimas zusammen hunderte von T-Zell Bibliotheken zu unterhalten oder 14-stündige Stimulationsexperimente durchführen war eine besondere Erfahrung, die ich nie vergessen werde. Der tägliche Gang zur Mensa und ein kurzes nächtliches Kaffeepäuschen werden mir fehlen.

Allen Mitgliedern der AG Riemekasten gilt großer Dank, besonders Frau Valerie Langhans für die Einarbeitung im Labor. Nina Goerlich und Hannah Antonia Brand danke ich für die tolle Zusammenarbeit.

Großer Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie für die Hilfe bei der Probensammlung. Im besonderen die Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Udo Schneider war eine große

Freude. Wirklich dankbar bin ich auch den Krankenschwestern der rheumatologischen Tagesklinik, die mir sehr bei der Probenakquisition geholfen haben.

Auch allen Mitarbeitern des Deutschen Rheuma-Forschungszentrum möchte ich danken. Die Kollegialität in diesem Institut miterleben zu dürfen, war eine große Freude. Frau Dr. Dörte Huscher gilt großer Dank für ihre Hilfe bei der Beantwortung statistischer Fragestellungen. Frau Dr. Katrin Moser möchte ich für die Unterstützung im Rahmen der Leibniz Graduate School for Rheumatologie (LGRh) danken. Herrn Dr. Quirin Hammer gilt großer Dank für seine Hilfe bei praktischen experimentellen Fragestellungen. Frau Dr. Petra Bacher danke ich für ihre vielfältige methodische Hilfe. Herrn Timo Strönisch möchte ich für verschiedene Verbesserungsvorschläge des Manuskriptes danken.

Ich danke meiner Familie für Liebe und Geborgenheit. Besonders meine Mutter hat mich immer wieder dazu motivieren können durchzuhalten und die Arbeit fertig zu stellen. Meinem Vater danke ich für die Einführung in mir bisher unbekannte Funktionen des Textverarbeitungsprogramms. Meinem Bruder und meinen Freunden danke ich für ihre vielfältige Unterstützung.

Größter Dank gilt allen Patientinnen und Patienten, sowie allen gesunden Spenderinnen und Spendern! Ohne ihre Bereitschaft zur Probenabgabe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.