

## 4. Diskussion

### 4.1 Auswahl und Etablierung der Methode zur Proliferationsmessung von Lymphozyten

#### 4.1.1 Eigenschaften von CFSE

Noch vor einigen Jahren war die am häufigsten angewendete Methode zur Proliferationsmessung der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Assay, der eigentlich die DNA-Syntheserate und nicht die Proliferation direkt misst. Auch jetzt ist er weiterhin Standardmethode in immunologischen Routinelaboren. Für einfache Fragestellungen mag dieser Test gut geeignet sein, aber man erhält keine weiteren Informationen zu den untersuchten Zellen. Möchte man proliferierende Lymphozyten genauer charakterisieren bietet sich daher eine durchflusszytometrische Methode an. Die einheitliche, homogene Färbung, die durch die Bindung von CFSE an sekundäre Aminogruppen intrazellulärer Proteine entsteht und dabei zelluläre Funktionen unbeeinträchtigt lässt, (Weston, 1990), bildet die optimale Grundlage für einen solchen Proliferationstest. Lyons und Parish zeigten an murinen mononukleären Zellen, dass die Halbierung der Farbstoffmenge einer Zellteilung entspricht. Sie stimulierten dazu die Mauszellen mit CD3 und Lipopolysaccharid (LPS) und verglichen die Methode mit dem ebenfalls durchflusszytometrisch messbaren Einbau von BrDU in die DNA (Lyons, 1994).

#### 4.1.2 Vergleich mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin

ANGULO und FULCHER verglichen CFSE mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin bei der Stimulation von humanen PBMC mit *Candida albicans* und fanden eine Korrelation der Stimulationsindizes beider Methoden (Angulo, 1998).

In dieser Arbeit wurde die Technik so weiterentwickelt, dass sich nun ein neues Spektrum an Einsatzmöglichkeiten für Untersuchungen an Lymphozyten bietet. Da bereits gezeigt, wurde der Vergleich mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin nicht erneut geführt. Inzwischen wurden weitere Studien veröffentlicht, die beide Methoden parallel angewendet haben (Popma, 2000; Mannering, 2003a; Turcanu, 2003). Dabei war die Empfindlichkeit von CFSE bezüglich der Detektion antigenspezifischer Lymphozyten im Vergleich mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin je nach Studie gleichwertig bis höher.

### 4.1.3 Modifizierung der Methode

Durch den Einsatz einer niedrigeren Färbekonzentration als bisher üblich konnte erstmals eine Vierfarbanalyse der antigenstimulierten Zellen erreicht werden. Dies ermöglichte die Detektion proliferierender CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- und CD19<sup>+</sup>-Lymphozyten in einem Stimulationsansatz von PBMC. Zusätzlich konnte bei dieser Farbstoffkombination Propidiumjodid eingesetzt werden, das zum Nachweis toter Zellen dient. Der Ausschluss toter Zellen aus der Analyse ist auch deshalb wichtig, weil Zellen mit geschädigter Zellmembran CFSE verlieren (*Weston, 1990; Warren, 1999; Oostendorp, 2000; Sheehy, 2001*) und somit die Auswertung verfälschen könnten.

Die Möglichkeit der Vierfarbanalyse erleichtert die Charakterisierung von Lymphozytensubpopulationen durch Oberflächen- und Intrazellulärfärbungen und spart Spenderblut, was z.B. bei anämischen Patienten oder Kindern von großem Vorteil ist. Bei niedrigerer Färbekonzentration sind allerdings weniger Teilungsgenerationen differenzierbar (vgl. Abb. 3.1 und Abb. 3.4). Während bei einer Färbekonzentration von 1 µmol CFSE fünf bis sechs Teilungsgenerationen unterschieden werden können (vgl. Abb. 3.1, Stimulation mit SEB), kann man bei einer Konzentration von 0,25 µmol die Generationen nur bis zur vierten Zellteilung unterscheiden (vgl. Abb. 3.4, Stimulation mit TT). Danach ist nur noch die Aussage möglich, dass die Zellen sich mehr als viermal geteilt haben. *Mannering et. al* fanden allerdings bei Stimulation mit Tetanustoxoid eine stärkere Proliferation der Zellen bei niedrigeren CFDA-SE-Konzentrationen. Zwar wurde diese Titration nur an einem Spender durchgeführt, dennoch ist dies ein weiteres Argument für den Einsatz einer niedrigen Färbekonzentration (*Mannering, 2003a*).

### 4.1.4 Optimierung des Nährmediums

Die Anpassung der Zellkulturbedingungen durch den Ersatz des gängigen Zusatzes von fetalem Kälberserum durch autologes Spenderserum erbrachte eine starke Reduktion der unspezifischen Hintergrundproliferation in den Kontrollansätzen bei gleichzeitiger Verstärkung der Reaktion der antigenstimulierten Zellen (vgl. Abb. 3.7). Die höhere Hintergrundproliferation unter Verwendung von FCS ist vermutlich auf die darin enthaltenen Fremdproteine zurückzuführen. Auch bei Proliferationsversuchen mit murinen Zellen konnte der Austausch von FCS gegen homologes Serum die Hintergrundproliferation senken (*Chain, 1987*). Welche Faktoren des autologen

Serums für die starke Proliferation nach Antigenstimulation verantwortlich sind, konnte nicht genauer geklärt werden. Die Komplementfaktoren wurden nach dem gleichen Protokoll inaktiviert wie bei FCS. Krause et al. stellten bereits 1991 fest, dass bei Stimulation von PBMC mit TT oder mit *Borrelia burgdorferi* die Proliferationsantworten bei Verwendung von AS gegenüber FCS deutlich stärker waren (Krause, 1991). Sie verwendeten zur Proliferationsmessung den [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Assay. Sie konnten durch Kreuzversuche mit verschiedenen Spenderseren zeigen, dass keine unspezifischen Serumfaktoren für die Proliferationsverstärkung verantwortlich waren. Sie entkräfteten außerdem die These einer Auslösung der Reaktion durch im Serum enthaltene spezifische Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi*. Die eigentlichen verantwortlichen Faktoren konnten jedoch nicht gefunden werden.

Auch wenn die Vorteile des AS augenscheinlich sind, gibt es dennoch auch Nachteile: Beispielsweise beeinträchtigen interindividuell unterschiedliche Serumfaktoren die Vergleichbarkeit in Reihenversuchen. Bei den hier untersuchten SLE-Patienten variieren neben Autoantikörpern und zirkulierenden Autoantigenen auch die Serumkonzentrationen verschiedener Immunsuppressiva und anderer Medikamente. Diese Nachteile des AS könnten durch die alternative Verwendung von gepooltem humanem Serum umgangen werden. Hier eignet sich am besten Serum der Blutgruppe AB (ABS), da es keine Antikörper gegen Erythrozytenantigene enthält. Es wurden daher Proliferationsuntersuchungen nach TT-Stimulation parallel mit AS und mit ABS bei sieben Spendern durchgeführt. Bei Verwendung von ABS zeigte sich hierbei zwar praktisch keine Hintergrundproliferation, jedoch deutlich niedrigere Frequenzen Ag-spezifischer Proliferation bei jedem einzelnen Spender (vgl. Abb. 3.8 und Abb. 3.9). Die Unterschiede der Proliferationsstärke waren signifikant. Auch Krause et al. fanden wesentlich niedrigere Proliferationsraten mit ABS im Gegensatz zu AS (Krause, 1991). Zur Detektion autoantigenspezifischer Zellen scheint deshalb autologes Serum als Zusatz im Nährmedium am besten geeignet. Ob es Unterschiede bei verschiedenen Chargen des ABS oder bei Präparaten von verschiedenen Firmen gibt, wurde nicht untersucht.

## 4.2 Charakterisierung von antigenspezifisch proliferierten Lymphozyten

### 4.2.1 Proliferation von antigenspezifischen T- und B-Zellen

In Stimulationsexperimenten mit dem Impfantigen Tetanustoxoid konnten mittels CFSE bei immunisierten Spendern gleichzeitig proliferierende Th-, Tc- und B-Zellen detektiert werden. Die Markierung erfolgte mittels Fluorochrom-gekoppelten  $\alpha$ CD4-,  $\alpha$ CD8- und  $\alpha$ CD19-Ak. Messungen im zeitlichen Verlauf zeigten dabei die höchsten Frequenzen proliferierter  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -Zellen am Tag 6 nach Stimulation, während das Optimum bei  $CD19^+$ -Zellen am fünften Tag lag und der Anteil proliferierter Zellen danach abnahm (Abb. 3.5). Dieses Ergebnis liefert Hinweise bezüglich der *in vitro* Proliferationseigenschaften TT-spezifischer T- und B-Zellen, da die Kinetik aber nur an Zellen eines Spenders durchgeführt wurde, kann hier keine allgemeingültige Aussage getroffen werden.

### 4.2.2 Tetanustoxoidspezifisch proliferierte Th-Zellen

Sowohl für proliferierte Th- als auch B-Zellen gelang eine weitere Charakterisierung. Proliferierte Th-Zellen wurden dazu nach 6-tägiger Antigenstimulation polyklonal restimuliert, um das Zytokinprofil durchflusszytometrisch nach intrazellulärer Färbung zu bestimmen. Vor der Restimulation mit PMA/Ionomycin wurde eine magnetische Anreicherung der  $CD4^+$ -Zellen durchgeführt, da das  $CD4$ -Molekül nach dieser Stimulation herabreguliert wird und nicht mehr angefärbt werden kann. Mit der MACS-Technologie konnten die  $CD4^+$ -Zellen auf über 99% angereichert werden (vgl. Abb. 2.1). Der Prozentwert bezieht sich dabei auf die Auswertung im Lymphozyten-/Lymphoblasten-Analysefenster, da dieses Fenster auch bei jeder weiteren Auswertung angewendet wurde. Die Reinheit der angereicherten Zellen wurde für jede Zellsortierung einzeln bestimmt und lag immer über 99%. Die Abbildung zeigt auch, dass bei der Sortierung keine proliferierten Zellen verloren gehen.

Die stabile CFSE-Färbung erlaubte nach der Restimulation die getrennte Analyse der Zytokinexpression in antigenspezifisch proliferierten und ruhenden Zellen anhand der unterschiedlichen CFSE-Fluoreszenzstärken (vgl. Abb. 3.6). Je Stimulation wurden dabei acht verschiedene Zytokine markiert. Die parallele Färbung je eines Zytokinpaares pro Ansatz ermöglichte dabei auch die Ermittlung von Doppelproduzenten. In späteren Versuchen wurde die Analyse auf drei Zytokinpaare reduziert.

Die Restimulation mit PMA/Ionomycin hat gegenüber einer antigenspezifischen Restimulation den Vorteil der Unabhängigkeit von autologen APC, die den CD4<sup>+</sup>-Zellen zugesetzt werden müssten. Die Umgehung des TCR gewährleistet zudem eine rasche Zytokinantwort. Trotz polyklonaler Stimulation können dabei anhand des CFSE-Verlustes die antigenspezifischen Zellen untersucht werden. Dies spiegelt zwar nicht exakt die Situation *in vivo* wieder, hat aber gegenüber direkter *ex vivo* Zytokinanalyse den Vorteil, dass durch die antigenreaktiv ausgelöste klonale Expansion mehr Zellen zur Verfügung stehen und so auch seltenere Zellen, wie z.B. IL-10-Produzenten detektiert werden können. Voraussetzung ist dabei das Zugrundeliegen eines Zytokinedächtnisses auf Transkriptionsebene. Man geht davon aus, dass Th-Zellen nach mehrfachem Kontakt mit ihrem Antigen ihre Differenzierung in Th1- oder Th2-Richtung behalten und das Zytokinprogramm immer wieder abgerufen werden kann (Lohning, 2002). Eine Verzerrung des gemessenen Zytokinprofils durch erst *in vitro* aktivierte zuvor naive Th-Zellen ist jedoch nicht gänzlich auszuschließen.

#### 4.2.3 Allergenspezifisch proliferierte Th-Zellen

Mithilfe der CFSE-Proliferationsmessung und anschließender intrazellulärer Zytokinfärbung nach polyklonaler Restimulation konnten bei allergenspezifisch proliferierten Zellen Unterschiede im Zytokinprofil verschiedener Spender ermittelt werden. Verglichen wurden dabei gräserpollenreaktiv proliferierte Zellen eines diagnostizierten Pollenallergikers und eines Nicht-Allergikers. Beide reagierten mit Proliferation von CD4<sup>+</sup>-Zellen in ähnlicher Größenordnung (vgl. Abb. 3.10). Die Zytokinexpressionsmuster der antigenspezifischen Th-Zellen wiesen jedoch deutliche Unterschiede auf (vgl. Abb. 3.11). Unter den Zellen des Allergikers waren deutlich mehr IL-4- und IL-13-Einzelproduzenten, sowie weniger INF- $\gamma$ - und IL-2-Produzenten bei ähnlichen Frequenzen von TNF- $\alpha$ - und IL-10-Produzenten. Interessant ist außerdem die relativ große Zahl von IL-4-/INF- $\gamma$ -Doppelproduzenten des Gesunden. Hier wird die Wichtigkeit der Färbung mehrerer Zytokine in einem Ansatz deutlich. Bei einer alleinigen Färbung von IL-4 hätten sich keine großen Unterschiede zwischen beiden Testpersonen ergeben.

Es wurde hier also eine Methode entwickelt, die gut geeignet ist antigenspezifische Th-Zellen weiter zu charakterisieren. In großem Umfang angewendet könnte sie dazu dienen, bei Allergien, Autoimmunkrankheiten und anderen immunologischen

Erkrankungen Tendenzen in Richtung Th1- und Th2-Antwort zu erkennen. In einer – nach Teilveröffentlichung der hier aufgeführten Ergebnisse erschienenen – Studie konnten auf ähnliche Weise Unterschiede im Zytokinprofil allergenspezifischer Th-Zellen von Kindern mit und ohne Erdnussallergie nachgewiesen werden, die in die gleiche Richtung weisen, wie die Ergebnisse dieses exemplarischen Versuchs (*Turcanu, 2003*). Im Vergleich zur bloßen Messung der Zytokine im Überstand von Zellkulturen mittels ELISA ist die durchflusszytometrische Messung wesentlich genauer, da die Zytokinproduktion auf Einzelzellebene betrachtet werden kann. Noch direkter und einfacher ist die sofortige intrazelluläre Messung der Zytokinexpression nach einer Kurzzeitstimulation mit dem betreffenden Antigen. Nachteil hierbei sind allerdings die oft sehr niedrigen Frequenzen vor allem der Th2-Zytokine, so daß die Th2-Antworten übersehen werden könnten. Die Technologie der zellulären Affinitätsmatrix ist eine sehr elegante Methode zur Isolierung stimulierter T-Zellen anhand ihrer Zytokinsekretion und kann für die Detektion antigenspezifischer T-Zellen angewendet werden (*Brosterhus, 1999*). Neben dem Problem der niedrigen Frequenzen ist ein Nachteil gegenüber der in dieser Arbeit vorgestellten Methode aber, dass die Zellen nur anhand der Sekretion eines einzelnen Zytokines isoliert werden, dass man sich also vor dem Experiment entscheiden muss, welche Zellen man betrachten möchte. Den beiden zuvor genannten Methoden gemeinsam ist die Abhängigkeit von einer intakten APC-Funktion, die bei Autoimmunerkrankungen nicht immer gewährleistet ist (*Steinbach 2000*).

#### **4.2.4 Tetanustoxoidspezifische B-Lymphozyten – Generierung von Plasmablasten *in vitro***

Neben der näheren Untersuchung von antigenreaktiv proliferierten Th-Zellen konnten auch nach TT-Stimulation proliferierte B-Zellen weiter charakterisiert werden. Hierzu wurden gemeinsam mit CD19 die funktionellen Oberflächenmoleküle CD20 und CD27 für die gemeinsame Vierfarbanalyse mit CFSE markiert. Da die Herabregulation von CD20 zusammen mit der starken Expression von CD27 charakteristisch für Plasmablasten ist ( $CD27^{++}/CD20^{-}$ ; *Odendahl, 2000*), konnte so die *in vitro* Differenzierung der antigenstimulierten B-Zellen in Abhängigkeit von der Zellteilung untersucht werden (vgl. Abb.3.13). Es zeigte sich dabei, dass 83% der  $CD19^{+}$ -Zellen, die nach 6-tägiger TT-Stimulation mehr als vier Zellteilungen durchlaufen hatten, phänotypisch den Plasmablasten angehörten. Auf der anderen

Seite wies nur ein geringer Anteil der ruhenden und weniger als viermal geteilten B-Zellen den CD27<sup>+</sup>/CD20<sup>-</sup>-Phänotyp auf. Die Möglichkeit sich in der Analyse anhand der CFSE-Färbung auf proliferierte Zellen zu beschränken, erleichtert hier deutlich die Detektion der Plasmablasten, da sie zwar einen hohen Prozentsatz der proliferierten, aber nur einen geringen Anteil aller B-Zellen ausmachen. Es wurde hier erstmals Zellteilung und B-Zelldifferenzierung an humanen antigenspezifischen Lymphozyten gemeinsam untersucht. Murine B-Zellen wurden mit Hilfe von CFSE schon früher untersucht, die Stimulation erfolgte jedoch polyklonal (*Hodgkin, 1996; Hasbold, 1998; Lyons, 2000*).

Ab dem fünften Tag der Kultivierung mit TT konnten außerdem CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>-Zellen ausgemacht werden, die das Oberflächenmolekül CD138 (Syndecan-1) trugen, nach siebentägiger Kultur machte deren Anteil immerhin knapp 15% der proliferierten CD19<sup>+</sup>-Zellen aus (Abb. 3.14). CD138 ist ein Differenzierungsmarker für Plasmazellen (*Sanderson, 1989; Kopper, 2000*). Man kann also davon ausgehen, dass hier erstmals antigenspezifische *in vitro* generierte Plasmazellen detektiert wurden, die sich allein durch die Interaktion der PBMC mit dem zugegebenen Ag entwickelt haben. Zwar können humane Plasmazellen schon seit längerem *in vitro* generiert werden (*Arpin, 1995; Choe, 1998; Xu, 2004; Corcoran, 2005*), aber hierzu wurden bisher immer Zytokine und andere Wachstums- und Stimulationsfaktoren eingesetzt. Dies hat zwei Nachteile: Erstens muss immer weiter versucht werden, die Stimulationsbedingungen zu optimieren, da die Zugabe oder das Weglassen eines einzelnen Zytokins deutliche Auswirkungen haben kann (*Choe, 1998; Xu, 2004*), zweitens ist dieses *In-vitro*-Modell durch die Zugabe mehrerer Zusätze unüberschaubar, wenn man die Beteiligung einzelner Faktoren an der Plasmazelldifferenzierung untersuchen will.

In dem hier vorgestellten System, das ohne Zusätze auskommt, können besser und einfacher Wachstums- und Differenzierungsstudien mit einzelnen Faktoren durchgeführt werden. Für verschiedenste Antigene spezifische Plasmazellen könnten zudem generiert und z.B. durch FACS-Sortierung für weitere Untersuchungen isoliert werden.

### 4.3 Messung autoantigenspezifischer Proliferation

#### 4.3.1 Auswahl der Autoantigene

Die zuvor optimierte durchflusszytometrische Proliferationsmessung mittels CFSE wurde zum Nachweis autoantigenspezifischer Th- und B-Zellen angewandt.

Als Autoantigene wurden Nukleosomen und das SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid verwendet. Nukleosomen werden seit einigen Jahren als bedeutend in der Pathogenese des SLE angesehen (*Fournel 2002*). Zwar gibt es zahlreiche Arbeiten zu Autoantikörpern, die gegen Nukleosomen gerichtet sind (*Bruns 2000, Burlingame, 1994; Burlingame, 1993; Chabre, 1995; Massa, 1994; Van Bruggen, 1996*), nukleosomenspezifische Th-Zellen wurden bisher aber immer nur indirekt in Form von T-Zellklonen (*Mohan, 1993; Desai-Metha, 1995; Kaliyaperumal, 1996*) oder T-Zelllinien (*Lu, 1999*) untersucht. Zur Proliferationsmessung nach Nukleosomenstimulation wurde bisher nur die [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Methode angewandt (*Bruns, 2000*). In dieser Arbeit wurden nun erstmals nach Nukleosomenstimulation proliferierte Th- und B-Zellen gemeinsam in PBMC untersucht, die aus dem Blut von SLE-Patienten isoliert wurden (vgl. Abb. 3.14). Da T-Zellen auf Peptidfragmente reagieren, die ihnen von den APC nach Prozessierung von Proteinen präsentiert werden, aber nicht auf freie DNA, sind Nukleosomen als Komplexe aus DNA und Proteinen vermutlich nicht nur die relevanten Auto-Ag für Th-Zellen, die in B-Zellen die Produktion von nukleosomenspezifischen Auto-Ak induzieren, sondern auch für solche, die Anti-ds-DNA-Ak produzierenden B-Zellen T-Zellhilfe geben.

Neben Anti-ds-DNA-Ak sind Anti-Sm-Ak ebenfalls krankheitsspezifisch und ein Marker für die Krankheitsaktivität (*Yasuma, 1990*). Das Sm-Antigen ist Teil des im Zellkern gelegenen Spleißosomen-Komplexes, der eine wichtige Rolle bei der RNA-Prozessierung spielt. Es beinhaltet mindestens 9 verschiedene Polypeptide. Das C-terminale Ende des SmD1-Peptids, auf dem sich die Sequenz 83-119 befindet, hat sich als besonders autoimmunogen erwiesen (*Sabbatini, 1993; James, 1994; Riemekasten, 1998*). Der Einsatz eines kleinen Peptides zur Stimulation von PBMC hat den Vorteil, dass es von den APC schneller aufgearbeitet und präsentiert werden kann als die wesentlich komplexeren Nukleosomen. Nachteil beim Einsatz einer definierten Sequenz von SmD1 ist jedoch, dass T-Zellen, die spezifisch für andere Epitope des SmD1-Peptides sind, nicht erfasst werden. Zu bedenken ist hierbei außerdem, dass die Epitope, die sich an Patientenseren, also für B-Zellen, als



immundominant gezeigt haben, nicht zwingend die gleichen sein müssen, die die autoreaktiven Th-Zellen stimulieren. Anhand des [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbaus konnte aber bei 11 von 28 SLE-Patienten Proliferation in Reaktion auf das SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid gefunden werden (*Riemekasten, 2003*).

#### **4.3.2 Nachweis autoantigenspezifischer Th- und B-Zellen**

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals autoantigenspezifisch proliferierende Th-, Tc- und B-Zellen in einem Stimulationsansatz durchflusszytometrisch analysiert. Zu Beginn der Versuche wurde noch FCS als Nährzusatz im Zellkulturmedium verwendet (vgl. Abb. 3.14 u. 3.15). Mit FCS-Medium wurde die nukleosomenreaktive Proliferation bei fünf SLE-Patienten und die SmD1<sub>83-119</sub>-reaktive Proliferation bei drei Patienten analysiert (vgl. Tab. 3.1 und 3.2). Dabei zeigte sich bei vier von fünf Spendern eine nukleosomenreaktive Th-Zellproliferation und bei einem von dreien eine SmD1<sub>83-119</sub>-reaktive. Da sich später (s.o.) FCS als nachteilig im Vergleich zu AS herausstellte, wurden keine weiteren Versuche mit FCS durchgeführt. In die statistischen Auswertungen wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit nur die Stimulationen einbezogen, bei denen AS verwendet wurde. Insgesamt wurden dabei PBMC von 14 SLE-Patienten mit unterschiedlicher Krankheitsaktivität und von 10 klinisch gesunden Kontrollpersonen analysiert. Interessanterweise wurde sowohl in SLE-Patienten als auch in gesunden Spendern nukleosomen- sowie SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid-spezifische Th- und auch B-Zellproliferation gefunden. Zytotoxische T-Zellen reagierten dagegen nicht maßgeblich mit Proliferation (vgl. Tab. 3.3 bis 3.6). Da auch gesunde Spender mit Proliferation reagierten, konnte keine eindeutige Grenze festgelegt werden für eine eindeutig „positive“ oder „negative“ Reaktion. Als Vergleichswerte konnten lediglich die Frequenzen proliferierter Zellen in den Kontrollansätzen ohne Antigen dienen. Um die Zahl proliferierter Zellen möglichst aussagekräftig darzustellen, wurden daher die Differenz proliferierter Zellen mit und ohne Antigen und zusätzlich der Quotient, der das Ausmaß der Hintergrundproliferation stärker einbezieht, dargestellt.

#### **4.3.3 Schwächere Reaktion auf Autoantigene bei Lupus-Patienten als bei Gesunden**

Das Reaktionsniveau war bei Gesunden sogar insgesamt höher als bei SLE-Patienten. Dies zeigte sich durch die Bestimmung der Unterschiedlichkeit der

Proliferationsstärke mit und ohne Antigen mithilfe des Wilcoxon-Tests (vgl. Kap. 3.2.3.1). Für die Proliferation der CD4<sup>+</sup>-Zellen nach Stimulation mit Nukleosomen waren die Unterschiede zu den nicht stimulierten Proben signifikant (vgl. Tab. 3.7). Dabei war der Unterschied in der Gruppe der Gesunden höher als in der Gruppe der Patienten. Für die Proliferation der CD4<sup>+</sup>-Zellen nach SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid-Stimulation und für die Proliferation der CD19<sup>+</sup>-Zellen nach Stimulation mit beiden Auto-Ag waren die Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten Proben weder für Patienten noch für gesunde Spender signifikant. Dies bedeutet nicht, dass nicht einzelne Probanden mit Proliferation von B-Zellen oder Th-Zellen auf SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid reagierten. Insgesamt war aber die Reaktion von Th-Zellen auf Nukleosomen am deutlichsten.

Für die unterschiedliche Stärke der Reaktion bei Gesunden und Patienten kann zum einen der Einfluss immunsuppressiver Medikamente bei den SLE-Patienten mitverantwortlich sein. Hinweise dafür gibt es auch in der statistischen Auswertung des Verhältnisses der Stärke der immunsuppressiven Therapie zur Stärke der Proliferation. Der Kruskal-Wallis-Test zeigt hier zwar keinen signifikanten Unterschied zwischen den Therapiegruppen, es lässt sich aber zumindest ein Trend erkennen, der für die Abnahme der Th-Zellproliferation bei stärkeren Immunsuppressiva spricht (vgl. Tab. 3.8).

Zum anderen ist es aber auch möglich, dass ein Teil der autoreaktiven Zellen der Lupus-Patienten auf die *in vitro* Stimulation mit den Autoantigenen mit Apoptose reagiert haben und deshalb nicht in der Proliferationsmessung erfasst wurden. Die insgesamt hohe Apoptoserate in den Zellen der SLE-Patienten nach 6-tägiger Kultivierung im Vergleich zu Gesunden ist in Abb. 3.17 dargestellt. Dass PBMC von SLE-Patienten grundsätzlich eine erhöhte Apoptoserate aufweisen, wird in der Literatur häufig beschrieben. (Pitidhamadhorn, 2006; Wang, 2005; Jin, 2005; Bengtsson, 2004). Hier kann die Verwendung des autologen Serums eine Rolle spielen. Möglich ist z.B. eine Beteiligung von löslichen Komponenten wie Fas-Ligand und HLA-Klasse-I-Molekülen, die dann *in vitro* Apoptose induzieren (Puppo, 2002). In Kreuzversuchen mit Serum von SLE-Patienten und PBMC von Gesunden führte das Serum zu einer erhöhten Apoptoserate in den Zellen (Bengtsson, 2004; Pitidhamabhorn, 2006). Bengtsson fand dabei eine Korrelation zu erhöhten Serumkonzentrationen des Komplementfaktors C5a (die Serumtoxizität fand sich aber auch nach Komplementinaktivierung), Pitidhamabhorn fand eine Korrelation

zu erhöhten TNF- $\alpha$ -Spiegeln. Auch das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen Lymphozyten, die bei SLE-Patienten gegen B- und T-Zellen gerichtet sein können (Cappione 2004), könnte an den Apoptoseprozessen beteiligt sein oder die Proliferation hemmen.

Eine weitere Erklärung für fehlende oder geringe Frequenzen autoantigenspezifischer Lymphozyten in PBMC ist der Aufenthalt dieser Zellen in den lymphoiden Organen, dem Ort der Antigenpräsentation, oder am Ort des Entzündungsgeschehens.

#### 4.3.4 Autoreaktive Lymphozyten bei Gesunden

Der Nachweis autoreaktiver T- und B-Lymphozyten bei Gesunden scheint zunächst verwunderlich. Die Daten widersprechen den Ergebnissen von Bruns et al., in deren Arbeit der [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Einbau in PBMC nach Nukleosomenstimulationen bei SLE-Patienten, aber nicht bei gesunden Spendern nachgewiesen wurde (Bruns, 2000). Die Arbeitsgruppe maß die stärkste proliferative Aktivität am Tag 3 nach Stimulation. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der durchflusszytometrischen Analyse zu mehreren Zeitpunkten nach Stimulation eine relevante, nukleosomenreaktive Proliferation erst ab dem fünften Tag (vgl. Abb. 3.16). Dieser Unterschied in der Kinetik der Reaktion könnte am Einsatz von rekombinantem IL-2 in der zitierten Arbeit liegen, das antigenspezifische Proliferation beschleunigt, aber auch die Proliferation nicht antigenspezifischer T-Zellen fördert. Man erhält außerdem mittels [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin keine Aussage darüber, ob die Zellen kurz nach dem Einbau des Stoffes in die DNA Apoptose begangen haben. Dass die proliferative Aktivität an Tag 5, 7, 9 und 12 nur noch sehr gering ist im Vergleich zur Messung am Tag 3, könnte ein Hinweis darauf sein. Solche Zellen würden in der durchflusszytometrischen Messung nach 6 Tagen nicht mehr erfasst, weil sie nicht überlebt hätten. Zu erwähnen ist, dass in der vorliegenden Arbeit die gleichen Nukleosomen, die in demselben Labor aus Hühnererythrozyten nach dem gleichen Verfahren isoliert wurden, verwendet wurden wie in der Arbeit von Bruns et al. Präparationsbedingte Verunreinigungen müssten sich also gleichermaßen auswirken.

Der Nachweis autoreaktiver Lymphozyten bei Gesunden im Vergleich mit SLE-Patienten ist in der Literatur nicht selten. Nach Stimulation mit Nukleohistonen und aufgereinigten Histonen, beides gewonnen aus Kälberthymus, reagierten in einer [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Testung Kontrollpersonen stärker als SLE-Patienten. Bei knapp einem

Drittel der Patienten hatten die Ag sogar einen entgegengesetzten, inhibitorischen Effekt (*Salaman, 2001*). VOLL et al. isolierten nach Stimulation mit autologem apoptotischen Material oder Histonen Th-Zellklone bei zwei von drei Lupus-Patienten und bei einer von zwei Kontrollpersonen. Interessanterweise konnten die Klone beider Gruppen in autologen B-Zellen die Produktion von Anti-ds-DNA-Ak induzieren (*Voll, 1997*). *In vitro* durch Apoptose von Zellen aus Rachentonsillen entstandene Nukleosomen induzierten in normalen murinen und humanen Lymphozyten proliferative Aktivität und Immunglobulinsynthese (*Bell, 1991*). Davies et al. untersuchten mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidin die Proliferation in PBMC nach Stimulation mit dem Kernantigen La/SS-B, das sie in mehrere Peptide aufgetrennt hatten. Auch hier reagierten Kranke wie Gesunde. Eine Assoziation zeigte sich aber mit dem Genotyp der Probanden: Während man bei 19 von 22 HLA-DR3-positiven Spendern eine Reaktion auf die Autoantigenstimulation fand, reagierten nur 2 von 9, die einen HLA-DR1- oder HLA-DR4-Genotyp besaßen (*Davies, 2002a*). Auch in einem früheren Vergleich von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom und gesunden Kontrollpersonen reagierten 10 von 19 Gesunden auf die Stimulation mit rekombinantem Anti-La/SS-B-Antigen und auf weitere Autoantigene (*Helsloot 1997*). Gegen natives  $\beta_2$ -Glycoprotein-I, welches mit dem Antiphospholipid-Syndrom assoziiert ist, reagierten hingegen 15 von 51 SLE-Patienten, aber nur einer von 15 gesunden Spendern (*Davies, 2002b*). In einer anderen Untersuchung dagegen, in der dasselbe Ag in etwas veränderter Form eingesetzt wurde reagierten 10 von 25 Kontrollpersonen. Die Spezifität wurde in diesem Experiment durch Restimulation der Zellen mit einem anders hergestellten Antigen verifiziert (*Hattori, 2000*). Bei Donauer et al. reagierten die Zellen von Patienten und Gesunden auf Stimulation mit rekombinantem ribosomalem Protein L7 mit INF- $\gamma$ -Produktion im ELISPOT (*Donauer, 1999*).

Neben SLE-relevanten Auto-Ag können auch körpereigene Proteine, die mit anderen Autoimmunprozessen in Verbindung stehen, in Lymphozyten von gesunden Spendern eine Reaktion auslösen. Zum Beispiel konnten antigenspezifische T-Zellklone bei Gesunden und bei Patienten mit Pemphigus vulgaris nach der Stimulation mit Desmoglein-3-Peptiden isoliert werden. Auch hier zeigte sich, ähnlich wie bei DAVIES et al. eine Abhängigkeit von dem HLA-Typus des Spenders, nicht aber davon, ob die Krankheit ausgebrochen war oder nicht (*Veldman, 2004*). Mannering et al. fanden bei Gesunden autoantigenspezifische Th-Zellen gegen

Proinsulin und Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD), bedeutend in der Pathogenese des Typ-1-Diabetes. Hier erfolgte der Nachweis, wie in der vorliegenden Arbeit, durchflusszytometrisch mithilfe von CFSE. Sie führten parallel Messungen mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin durch. Interessanterweise konnten mittels CFSE bei 8 von 8 Gesunden GAD-spezifische Th-Zellen nachgewiesen werden, während im [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Assay nur 4 Probanden reagierten (*Mannering, 2003a*).

#### 4.3.5 Die Bedeutung autoreaktiver T- und B-Zellen bei Gesunden

Der Nachweis autoantigenspezifischer T-Zellen bei Gesunden ist somit nicht ungewöhnlich. Zu der Bedeutung dieser Zellen, bzw. zu den Unterschieden, die bestimmte Personen erkranken lassen, aber andere nicht, gibt es verschiedene Vermutungen.

Prinzipiell möglich wäre natürlich, dass diese T-Zellen *in vitro* gar nicht auf das eigentliche Autoantigen reagieren, sondern auf Kontaminationen, wie sie zum Beispiel durch Lipopolysaccharid (LPS), Bestandteil der Zellmembran mancher Bakterien, bei der rekombinanten Herstellung von Proteinen entstehen können. Aber auch bei synthetisch erzeugten Peptiden oder aufgereinigten, natürlich vorkommenden Antigenen sind Verunreinigungen möglich (*Mannering, 2003b; Mannering, 2005*). Der wirkliche Beweis, dass autoantigenspezifische Zellen nachgewiesen wurden, kann deshalb letztendlich nur durch die Restimulation der betreffenden Zellen mit dem Autoantigen aus anderer Herstellung bzw. mit Untereinheiten des Antigens geführt werden. Im Falle der Nukleosomen könnten dies z.B. die einzelnen Histone und das Nicht-Histon-Protein HMG sein. Zu erwähnen ist aber, dass in dieser Arbeit die gleichen Nukleosomen, mit denen die PBMC stimuliert wurden, auch für die Messung der nukleosomenspezifischen Antikörper verwendet wurden. Bei keinem der gesunden Spender wurden im Gegensatz zu 7 von 14 SLE-Patienten Antikörper gegen diese Nukleosomen nachgewiesen.

Geht man davon aus, dass die hier nachgewiesenen nukleosomenreaktiv proliferierten Th-Zellen antigenspezifisch sind, stellt sich die Frage nach der pathogenetischen Relevanz dieser Zellen. Möglich wäre, wie in der Studie mit La/SS-B-spezifischen T-Zellen (*Davies, 2002a*), dass es eine Assoziation zu bestimmten HLA-DR-Genotypen gibt und dass deshalb bei einem Teil der Probanden naive autoreaktive T-Zellen proliferieren, dass also potentiell eine bestimmte Gruppe von Menschen über nukleosomenspezifische T-Zellen verfügt, dass es aber zusätzlicher

Faktoren bedarf, eine Autoimmunerkrankung auszulösen. Betrachtet man den SLE als ein multifaktoriell bedingtes Syndrom, erscheint dies nicht unwahrscheinlich. So könnten normalerweise ignorante nukleosomenspezifische T-Zellen durch die höheren Konzentrationen zirkulierender Nukleosomen bei SLE-Patienten aktiviert werden.

In einer Studie von Ott et al. zeigte sich, dass naive (RA<sup>+</sup>-)T-Zellen nach Stimulation des TCR plus Kostimulation über CD28 schneller expandieren als Antigen-erfahrene (RO<sup>+</sup>-)T-Zellen (Ott, 2005). Die Beteiligung von naiven T-Zellen an der in dieser Arbeit nachgewiesenen nukleosomenreaktiven Proliferation ist also nicht vollständig auszuschließen. Aufschlussreich wäre es, die Nukleosomenstimulationen an RO<sup>+</sup>-T-Zellen zusammen mit autologen APC zu wiederholen. Ferner wäre eine Bestimmung der HLA-DR-Genotypen bei SLE-Patienten und Gesunden interessant.

Handelt es sich bei den Auto-Ag-spezifisch proliferierten T-Zellen der Gesunden jedoch, wie vermutlich bei denen der SLE-Patienten um primär Antigen-erfahrene Zellen, könnte man sich in einer größer angelegten Untersuchung die Zytokinprofile der proliferierten Th-Zellen anschauen. Die Voraussetzungen dafür wurden im ersten Teil dieser Arbeit geschaffen (vgl. Abb. 3.6 u. Abb. 3.11). Die Restimulation nukleosomenspezifisch proliferierter CD4<sup>+</sup>-Zellen von SLE-Patienten gestaltete sich allerdings schwierig: Zusätzlich dazu, dass bei den Patienten meist weniger Zellen proliferierten als bei den Gesunden, überlebten nur wenige Zellen die Restimulation (vgl. Abb. 3.22). Die Zahl der dargestellten restimulierten, proliferierten CD4<sup>+</sup>-Zellen einer SLE-Patientin lag nur bei ca. 300. Die angegebenen Prozentzahlen der Zytokinproduzenten sind deshalb nur unter Vorbehalt interpretierbar. Interessant ist aber, dass trotz der geringen Zellzahl IL-10-Produzenten zu sehen sind, hingegen keine IL-4- oder IL-13-Produzenten.

#### 4.3.6 Statistische Zusammenhänge

Aufgrund der kleinen Untersuchten Fallzahl sind statistische Zusammenhänge in dieser Arbeit sehr kritisch zu werten, sie können aber zumindest Ideen gebend wirken. Als Test für Korrelation diente der Spearman-Test, der keine absoluten Zahlen, sondern Ränge vergleicht. Er wurde verwendet, da die Proliferation der Zellen nicht linear sondern exponentiell ist.

Die Proliferation der nukleosomenreaktiven Th- und B-Zellen wurde mit den gemessenen Anti-Nukleosomen-Ak im Serum der Patienten verglichen. Hier zeigte

sich kein statistischer Zusammenhang (vgl. Kap. 3.2.5.2). Es zeigte sich auch keine Korrelation der Zahl proliferierter Zellen mit der Krankheitsaktivität, egal ob als Maß der SLAM, SLEDAI oder ECLAM zugrunde gelegt wurde (vgl. Kap. 3.2.5.3). Dies steht im Gegensatz zur bekannten Korrelation von Anti-Nukleosomen-Ak zur Krankheitsaktivität (*Bruns, 2000*), die sich auch in dieser Arbeit fand (nicht dargestellt). Die Stärke der immunsuppressiven Therapie wurde in drei Gruppen eingeteilt: Keine Medikation (Gruppe 0), nur Glukokortikoide (Gruppe 1), Glukokortikoide + andere Immunsuppressiva (Gruppe 2). Zwischen einer Bolus-Therapie und einer Erhaltungstherapie mit Glukokortikoiden wurde dabei aufgrund der kleinen Patientenzahl nicht unterschieden. Angewendet wurde hier der Kruskal-Wallis-Test, der Unterschiede zwischen mehreren Gruppen aufzeigen kann. Hiermit konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden, es zeichnete sich aber zumindest ein Trend bezüglich der Proliferationsstärke der Th-Zellen ab: In der Gruppe 2 war die Proliferation im Mittel niedriger als in den anderen beiden Gruppen. Für B-Zellen hingegen war ein solcher Trend nicht erkennbar. (vgl. Kap. 3.2.5.4).

Neben nukleosomenreaktiv proliferierten  $CD4^+$ -Zellen fand sich auch Proliferation nach Stimulation mit dem Smd1<sub>83-119</sub>-Peptid. Die Stärke der Reaktion fiel dabei insgesamt – mit Ausnahme der Stimulation von PBMC eines Patienten in den Vorversuchen mit FCS (vgl. Abb. 3.15) und einer stark reagierenden gesunden Kontrollperson (vgl. Tab. 3.4) – geringer aus als nach Nukleosomenstimulation. Bei den SLE-Patienten fand sich dabei – im Gegensatz zu den Gesunden – ein signifikanter Zusammenhang zwischen Stärke der nukleosomenreaktiven und der Smd1<sub>83-119</sub>-Peptid-reaktiven  $CD4^+$ -Zellproliferation (vgl. Kap. 3.2.3.5). Dies ist insofern interessant, als dass es in Mäusen Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Smd1<sub>83-119</sub>-spezifischen Th-Zellen und der Produktion von Anti-ds-DNA-Ak gibt (*Riemekasten, 2003*). In Anbetracht der wenigen hier untersuchten Patienten ist ein pathogenetischer Zusammenhang zwischen nukleosomen- und Smd1<sub>83-119</sub>-spezifischen Th-Zellen aber nur Spekulation und es bedarf weiterer Untersuchungen.

Erstmals wurden autoantigenspezifische B- und T-Zellproliferation gemeinsam untersucht. Nach Nukleosomenstimulation reagierten 2 von 10 Gesunden und 2 von 14 Patienten mit deutlicher B-Zellproliferation. Auf das Smd1<sub>83-119</sub>-Peptid gab es deutliche Reaktionen bei 3 von 9 Gesunden, aber bei keinem von 9 SLE-Patienten. Hier fällt in der statistischen Auswertung auf, dass bei Gesunden die Proliferationsstärke von T- und B-Zellen für beide Auto-Ag signifikant miteinander

korreliert, bei SLE-Patienten zeigt sich kein statistischer Zusammenhang (vgl. Kap. 3.2.3.6). Das könnte z.B. daran liegen, dass bei manchen SLE-Patienten die autoreaktiven B-Zellen nicht im Blut zirkulieren, sondern sich im Knochenmark oder in sekundären lymphoiden Organen aufhalten.

#### 4.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit geschaffen mithilfe des fluoreszierenden Farbstoffes CFSE gleichzeitig antigenreaktiv proliferierende T- und B-Zellen, auch in niedrigen Frequenzen, *in vitro* zu detektieren. Autoantigenreaktiv proliferierende Th- und B-Zellen fanden sich sowohl bei SLE-Patienten als auch bei Gesunden. Es wurden Möglichkeiten aufgezeigt, die detektierten Zellen weiter zu charakterisieren. Prolifizierte Th-Zellen wurden funktionell anhand ihres Zytokinprofils analysiert, proliferierte B-Zellen wurden phänotypisch genauer untersucht. Hierbei konnte sogar eine *in vitro* Differenzierung von Plasmazellen in Reaktion auf das Impfantigen Tetanustoxoid nachgewiesen werden. Da die Lymphozyten durch die Färbung mit CFSE nicht in ihren Lebensfunktionen beeinträchtigt werden, eröffnet sich ein breites Spektrum an Einsatzmöglichkeiten in der Erforschung pathogenetischer Zusammenhänge bei Autoimmunerkrankungen, aber auch für andere immunologische Fragestellungen. Zum Beispiel könnten autoantigenreaktiv proliferierte Lymphozyten mittels FACS-Sortierung isoliert und klonal expandiert werden. Dieses Verfahren wird mittlerweile in der Diabetesforschung bereits angewendet (*Mannering, 2005*). An so isolierten T-Zellklonen könnten weitere Untersuchungen bezüglich unbekannter immundominanter Epitope durchgeführt werden. Kennt man die entscheidenden Peptide eines Autoantigens, kann mit diesen versucht werden, Toleranz der autoreaktiven Zellen *in vivo* neu zu induzieren. In Mäusen wird dies bereits durchgeführt (*Suen, 2004*). Eine andere Möglichkeit ist der direkte Einsatz der inaktivierten autoreaktiven T-Zellen zur Toleranzinduktion, dies wird zurzeit mit autoreaktiven T-Zellen, die durch dendritische Zellen identifiziert wurden, bei SLE-Patienten in einer Studie in China versucht (*Li, 2005*).

In letzter Zeit rückte aber auch die Rolle der B-Zellen bei systemischen Autoimmunerkrankungen immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses. Der Einsatz von Rituximab, einem aus der Lymphom-Therapie bekannten Ak gegen das B-Zellmolekül CD20, bessert zum Beispiel die klinischen Symptome bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses und anderen Autoimmunerkrankungen



---

(*Thatayatikom, 2006; Yurasow, 2005; Jacobi, 2005*). Auch hier bieten Proliferationsuntersuchungen mit CFSE verschiedene Optionen. Autoreaktive B-Zellen könnten in ihrer Funktion als APC für autoreaktive T-Zellen weiter untersucht werden. *In vitro* generierte Plasmazellen von Lupus-Patienten könnten im Hinblick auf strukturelle oder funktionelle Unterschiede im Vergleich zu Plasmazellen von Gesunden untersucht werden. Aus solchen Untersuchungen können sich die nächsten Schritte im Verständnis von Autoimmunerkrankungen ergeben.