

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Rheumatologie und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Analyse der antigenspezifischen antirenal
CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Antwort bei der Lupusnephritis

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Gertrud Anna-Sophie Grießbach

aus Magdeburg

Datum der Promotion: 08.12.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis.....	X
1 Abstrakt.....	1
1.1 Abstrakt in Deutsch	1
1.2 Abstrakt in Englisch	2
2 Einleitung	4
2.1 Systemischer Lupus erythematodes.....	4
2.1.1 Epidemiologie	4
2.1.2 Ätiologie	5
2.1.3 Pathogenese.....	6
2.1.4 Symptomatik	6
2.1.5 Therapie.....	7
2.1.6 Prognose	7
2.2 Lupusnephritis	8
2.2.1 Epidemiologie	8
2.2.2 Klassifikation.....	8
2.2.3 Pathogenese.....	8
2.2.4 Symptomatik	9
2.2.5 Therapie.....	9
2.2.6 Prognose	9
2.3 Fragestellung.....	10
2.3.1 Forschungsgrundlage	10
2.3.2 Kurzvorstellung der Versuche	12
3 Methodik	14

3.1	Materialien	14
3.2	Rekrutierung der Patienten.....	17
3.3	Rekrutierung der gesunden Kontrollpersonen	19
3.4	Gewinnung von Blutproben	20
3.5	Steriles Arbeiten	20
3.6	Gewinnung von PBMC	20
3.7	Bestimmung der Zellzahl	21
3.8	Durchflusszytometrie	21
3.8.1	MACSQuant® Analyzer	22
3.8.2	BD FACSAria™	24
3.9	TCR β -Analyse.....	25
3.9.1	Zielstellung.....	25
3.9.2	Gewinnung der Zellproben.....	25
3.9.3	Sequenzanalyse der TCR-V β - und TCR-J β -Gene	26
3.10	Stimulationsversuch	27
3.10.1	Zielstellung	27
3.10.2	Stimulationskonditionen.....	27
3.10.3	Dialyse.....	29
3.10.4	Antigenstimulation	29
3.10.5	Zellfixierung	30
3.10.6	Zellfärbung.....	30
3.11	Depletionsversuch.....	31
3.11.1	Zielstellung	31
3.11.2	Stimulationskonditionen.....	31
3.11.3	PBMC ohne CD25 Depletion	31
3.11.4	PBMC mit CD25 Depletion	32
3.11.5	Antigenstimulation	33

3.12	FACS-Analyse.....	33
3.13	Datenauswertung des Stimulationsversuchs.....	33
3.13.1	FlowJo	33
3.13.2	Untergliederung der Patienten.....	34
3.13.3	Microsoft Excel - Bestimmung der Responder.....	34
3.13.4	GraphPad Prism	35
3.14	Datenauswertung des Depletionsversuchs	36
3.14.1	FlowJo	36
3.14.2	Microsoft Excel - Bestimmung der Responder.....	36
3.14.3	GraphPad Prism	36
3.15	Kombinierter Stimulationsversuch	37
3.15.1	Patientencharakteristika	37
3.15.2	Microsoft Excel - Bestimmung der Responder.....	38
3.15.3	GraphPad Prism	38
3.16	Verlauf von vier Patienten des Stimulations- und Depletionsversuchs.....	38
3.17	T Cell Library mit ³ H-Thymidin-Inkorporationsassay	39
3.17.1	T Cell Library	39
3.17.2	³ H-Thymidin-Inkorporationsassay.....	41
3.17.3	Microsoft Excel - Bestimmung der Responder.....	44
4	Ergebnisse	45
4.1	TCR β -Repertoire aktiver Lupusnephritis-Patienten.....	45
4.2	Ergebnisse des Stimulations- und Depletionsversuchs	47
4.2.1	T-Zell-Stimulation mit dem renalen Antigen KID	47
4.2.2	T-Zell-Stimulation mit den renalen Antigenen EPI, GLOM, TUB.....	53
4.2.3	T-Zell-Stimulation mit KID nach CD25 Depletion	56
4.3	Ergebnisse der T Cell Library mit ³ H-Thymidin-Inkorporationsassay.....	59
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	61

5	Diskussion.....	62
5.1	T-Zell-Oligoklonalität im Urin aktiver Lupusnephritis-Patienten	62
5.2	Methodik des Stimulations-, Depletionsversuchs und der T Cell Library	63
5.2.1	Antigenstimulation.....	63
5.2.2	CD25 Depletion.....	66
5.2.3	T Cell Library mit ³ H-Thymidin-Inkorporationsassay	67
5.3	Keine überzeugende antirenale T-Zell-Antwort bei der Lupusnephritis	69
5.4	Forschungsausblick.....	72
5.5	Fazit.....	72
	Literaturverzeichnis	73
	Eidesstattliche Versicherung	83
	Lebenslauf.....	85
	Publikationsliste.....	86
	Danksagung	87

Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
AG	Arbeitsgruppe
ANA	antinukleäre Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zellen
B	Belgien
BD	Becton, Dickinson and Company
Bq	Becquerel
BSA	bovines Serumalbumin
BV421	Brilliant Violet 421 (brilliantes Violett 421)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA	Kanada
CD	cluster of differentiation (Differenzierungsgruppen)
CDR3	complementarity determining region 3 (Komplementarität definierende Region 3)
CH	Schweiz
Ci	Curie
CMV	CMV pp65, rekombinantes Protein vom 65 kDa Phosphoprotein des Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy5	Cyanin-5
Cy7	Cyanin-7
D	Deutschland
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ds	double stranded (Doppelstrang)
DRFZ	Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin
dt.	deutsch
DV	Depletionsversuch

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
EPI	Human Renal Epithelial Cell Lysate (Lysat von humanen Epithelzellen der Nierentubuli)
et al.	et alii (und andere)
Fa.	Firma
FACS	fluorescence-activated cell sorting (Fluoreszenz aktivierte Zell-Sortierung)
Fc	fragment crystallizable (kristallisierbares Fragment)
FI	Finnland
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter channel (Vorwärtsstreuung-Kanal)
GE	General Electric Company
GF	Glas-Faser
ggf.	gegebenenfalls
GLOM	Human Renal Glomerular Endothelial Cell Lysate (Lysat von humanen Endothelzellen des Glomerulums)
Gy	Gray
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HHV	Humanes Herpesvirus
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
H ₂ O	Wasser
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KID	Human Kidney Normal Tissue Lysate (Lysat von Zellen des humanen normalen Nierengewebes, Kidney-Lysat)
L	Ligand
lat.	lateinisch
LMP	low melting point (niedriger Schmelzpunkt)
LN	Lupusnephritis
M	mol/ l

MACS	magnetic-activated cell sorting (magnetisch-aktivierte Zell-Sortierung)
ME	Mercaptoethanol
MEM	Minimum Essential Medium, entwickelt von Harry Eagle
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
Mio.	Millionen
MW	arithmetischer Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NaN ₃	Natriumazid
Neg	Negativkontrolle
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
NL	Niederlande
ns	nicht signifikant
OVA	Ovalbumin
p	p-Wert
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PhD	Philosophical Doctorate (wissenschaftlicher Doktorgrad)
PI	Propidiumiodid
PFA	Paraformaldehyd
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
P/S	Penicillin-Streptomycin
®	registered (registriert)
RCF	relative centrifugal force (relative Zentrifugalbeschleunigung)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RPM	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

s.	siehe
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
SLE	systemischer Lupus erythematosus
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (Krankheitsaktivitäts-Index des SLE)
Sm	Smith-Protein
SmD1	D1-Protein des Smith-Proteins
SmD1 ₍₈₃₋₁₁₉₎	Aminosäuren 83-119 des C-terminalen Peptids vom SmD1-Protein
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein (kleines nukleäres Ribonukleoprotein)
ss	single stranded (Einzelstrang)
SSC	side scatter channel (Seitwärtsstreuung-Kanal)
SV	Stimulationsversuch
TCR	T cell receptor (T-Zell-Rezeptor)
TCR _β	β-Kette des T-Zell-Rezeptors
TCR-J _β	verbindende (engl. joining) Region der β-Kette des T-Zell-Rezeptors
TCR-V _β	variable Region der β-Kette des T-Zell-Rezeptors
TM	trademark (Markenzeichen)
T _H	T-Helfer-Zellen
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
TUB	Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cell Lysate (Lysat von humanen Epithelzellen des proximalen Nierentubulus)
u. a.	unter anderem
USA	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
v. a.	vor allem
VLE	very low endotoxin (sehr niedriges Endotoxin)
(v/ v)	volume/ volume (Volumen/ Volumen)
(w/ v)	weight/ volume (Gewicht/ Volumen)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: SLE-Patienten der TCR β -Analyse und des Stimulationsversuchs.....	18
Tabelle 2: SLE-Patienten des Depletionsversuchs und der T Cell Library	19
Tabelle 3: Gesunde Kontrollpersonen des Stimulationsversuchs und der T Cell Library	20
Tabelle 4: Fluorochrom gekoppelte Antikörper	22
Tabelle 5: Laser des MACSQuant [®] Analyzers mit zugehörigen Kanälen, Fluorochromen und Antikörpern	24
Tabelle 6: Antigene, Negativkontrolle und deren Konzentration	28
Tabelle 7: SLE-Patienten des kombinierten Stimulationsversuchs.....	37
Tabelle 8: Im Stimulations- und Depletionsversuch involvierte SLE-Patienten.....	39

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: TCR β -Repertoire von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen des peripheren Blutes und von T-Zellen des Urins fünf aktiver LN-Patienten	46
Abbildung 2: FACS-Bilder der T-Zellen nach Stimulation mit SEB, Neg oder KID.....	48
Abbildung 3: Frequenzen der CD69, CD40L und IFN γ exprimierenden T-Zellen nach Stimulation mit SEB, Neg oder KID	49
Abbildung 4: Responderraten gegen KID der SLE-Patienten und der gesunden Kontrollpersonen	52
Abbildung 5: Frequenzen der CD69, CD40L und IFN γ exprimierenden T-Zellen nach Stimulation mit CMV, Neg, KID, EPI, GLOM oder TUB	54
Abbildung 6: Vergleich der KID-Daten ohne und mit CD25 Depletion	57
Abbildung 7: Korrelation nach Spearman der KID-Daten mit dem SLEDAI	58
Abbildung 8: ³ H-Thymidin-Aufnahme nach Stimulation mit SEB, Neg oder KID von jeweils drei SLE-Patienten und gesunden Kontrollpersonen der T Cell Library.....	60

1 Abstrakt

1.1 Abstrakt in Deutsch

Einleitung

Die proliferative Lupusnephritis (LN) ist eine der schwerwiegendsten Manifestationen des systemischen Lupus erythematoses (SLE) und durch ein T-Zell-Infiltrat im renalen Interstitium gekennzeichnet. Interessanterweise tritt dieses zelluläre Infiltrat auch in Abwesenheit von tubulointerstitiellen Immunkomplex-Ablagerungen auf und korreliert mit dem Nierenschaden. Die Oligoklonalität der renal infiltrierenden T-Zellen deutet auf eine antigenspezifische antirenale T-Zell-Antwort bei der LN hin.

Methodik

Das T-Zell-Rezeptor-Repertoire im peripheren Blut und Urin von fünf LN-Patienten wurde auf Oligoklonalität analysiert.

Weiterhin wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen des peripheren Blutes von 23 SLE-Patienten und 12 gesunden Kontrollpersonen mit vier verschiedenen humanen Nierenantigenen stimuliert. Danach wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD40L und IFN γ durchflusszytometrisch gemessen. Um eine Unterdrückung der T-Zell-Antwort durch regulatorische T-Zellen zu minimieren, wurden diese in einem zweiten Versuch mit 10 SLE-Patienten vor der Antigenstimulation depletiert.

Zuletzt wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen des peripheren Blutes von vier SLE-Patienten und fünf gesunden Kontrollpersonen in einer T-Zell-Bibliothek polyklonal expandiert. Anschließend wurden die T-Zellen mit einem renalen Antigen stimuliert und die Proliferationsantwort wurde durch einen ³H-Thymidin-Inkorporationsassay detektiert.

Ergebnisse

Durch die T-Zell-Rezeptor-Analyse wurde eine Anreicherung oligoklonaler T-Zellen im Urin von LN-Patienten nachgewiesen. Einige der im Urin angereicherten T-Zell-Klone fanden sich auch im peripheren Blut. Dagegen fand sich kein für alle fünf LN-Patienten übereinstimmender T-Zell-Klon.

Bei der T-Zell-Stimulation mit Nierenantigenen konnte keine überzeugende antigenspezifische antirenale T-Zell-Reaktivität gezeigt werden. Die T-Zell-Antwort auf die renalen Antigene unterschied sich nicht von der Negativkontrolle und korrelierte nicht mit der Krankheitsaktivität. Ferner zeigte sich keine signifikant höhere antirenale T-Zell-

Reaktivität bei den SLE-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Die Depletion der regulatorischen T-Zellen vor der Antigenstimulation ermöglichte ebenfalls nicht die Detektion autoreaktiver antirenalere T-Zellen.

Kongruent zu diesen Ergebnissen ergab die T-Zell-Bibliothek in Kombination mit einem ³H-Thymidin-Inkorporationsassay keinen überzeugenden Nachweis einer T-Zell-Reaktivität gegen das verwendete Nierenantigen.

Schlussfolgerung

Die vorliegenden Versuche zeigten keine überzeugende antigenspezifische antirenale T-Zell-Antwort bei der LN. Die nachgewiesene T-Zell-Oligoklonalität im Urin der LN-Patienten deutet jedoch auf eine Schlüsselrolle der T-Zellen in der Pathogenese der LN hin. Möglicherweise richtet sich die T-Zell-Reaktivität nicht gegen Antigene des gesunden, sondern des entzündeten Nierengewebes. Ferner könnten sich antigenspezifische antirenale T-Zellen bei der LN vorrangig in Nierengewebe und Urin statt im peripheren Blut aufhalten.

1.2 Abstrakt in Englisch

Introduction

Proliferative lupus nephritis (LN) is one of the most serious manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE) and characterised by a T cell infiltrate in the renal interstitium. Interestingly, this infiltrate also occurs in absence of tubulointerstitial immune complex deposits and correlates with renal damage. The oligoclonality of the renal infiltrating T cells suggests an antigen-specific antirenal T cell response in LN.

Methods

The T cell receptor repertoire in peripheral blood and urine of five LN patients was analysed for oligoclonality.

Furthermore, CD4⁺ und CD8⁺ peripheral blood T cells of 23 SLE patients and 12 healthy controls were stimulated with four different human renal antigens. Afterwards, the expression of the activation markers CD69, CD40L und IFN γ was measured by flow cytometry. In a second approach with 10 SLE patients, regulatory T cells were depleted before the antigen stimulation to reduce their suppression of the T cell response.

Finally, CD4⁺ und CD8⁺ peripheral blood T cells of four SLE patients and five healthy controls were polyclonally expanded in a T cell library. Subsequently, T cells were stimulated with a renal antigen and the proliferative response was detected by a ³H-thymidine incorporation assay.

Results

The T cell receptor analysis demonstrated an enrichment of oligoclonal T cells in the urine of LN patients. Some of the enriched T cell clones detected in the urine were also observed in the peripheral blood. In contrast, there was no public T cell clone that was enriched in all five patients.

The T cell stimulation with renal antigens did not show a convincing antigen-specific antirenal T cell reactivity. The T cell response to the renal antigens did not differentiate from the negative control and did not correlate with the disease activity. Besides, SLE patients did not demonstrate a significantly higher antirenal T cell reactivity as healthy controls. The depletion of regulatory T cells before the antigen stimulation did also not enable the detection of autoreactive antirenal T cells.

Corresponding to these results, the T cell library in combination with a ³H-thymidine incorporation assay did not show a convincing T cell reactivity to the applied renal antigen.

Conclusion

The present experiments did not demonstrate a convincing antigen-specific antirenal T cell response in LN. However, the proven T cell oligoclonality in the urine of LN suggests a key role of T cells in the pathogenesis of LN. Possibly, the T cell reactivity is not directed against healthy, but inflamed renal antigens. Moreover, antigen-specific antirenal T cells could be more located in renal tissue and urine than in peripheral blood.

2 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit werden personenbezogene Bezeichnungen, die sich gleichermaßen auf Frauen und Männer beziehen, zur besseren Lesbarkeit nur in der männlichen Form angeführt. Somit werden beispielsweise statt „Patientinnen und Patienten“ nur „Patienten“ genannt.

2.1 Systemischer Lupus erythematoses

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine chronische systemische Autoimmunerkrankung, die jedes Organ bzw. Gewebe betreffen kann^{1,2}. Die Bezeichnung Autoimmunerkrankung nutzt die griechische Vorsilbe *autós* (dt. selbst, eigen) und meint eine gegen körpereigene Strukturen gerichtete Immunantwort^{3,4}.

2.1.1 Epidemiologie

Die Prävalenz des SLE wird mit 40/ 100.000 und die Inzidenz mit 5-10/ 100.000/ Jahr angegeben, wobei diese Zahlen geografischen und ethnischen Differenzen sowie unterschiedlichen Methoden der Datenermittlung unterliegen^{2,5}.

In den Vereinigten Staaten Amerikas (engl. United States of America, USA) tritt SLE häufiger bei Afrikanern, Spaniern und Asiaten als bei Kaukasiern auf⁶. Genauer wird im Vergleich zu Europäern bei Nicht-Europäern, insbesondere bei afrikanischer Abstammung, eine zwei- bis achtfach höhere Frequenz angegeben¹. Interessanterweise ist die SLE-Prävalenz in West-Afrika sehr niedrig². Eine mögliche Erklärung stellt der Schutz vor Autoimmunität durch parasitäre Infektionen wie Malaria dar².

Die Geschlechterverteilung des SLE ist deutlich verschieden mit 10:1 bei Frauen zu Männern, wobei hormonale Faktoren möglicherweise ursächlich sind^{5,6}.

Ebenso ist die Altersverteilung des Krankheitsbeginns sehr variabel von 2 bis über 80 Jahren⁶. Allerdings sind die Inzidenz bei Frauen im gebärfähigen Alter von 15-44 Jahren und die Prävalenz bei Frauen im Alter von 45-64 Jahren am höchsten⁷.

Der spät manifestierende SLE (engl. late onset SLE) beginnt erst ab dem 55. Lebensjahr mit einer unterschiedlichen Verteilung bei Frauen zu Männern von nur noch 2:1⁵.

2.1.2 Ätiologie

Eine Häufung des SLE bei Verwandten Betroffener macht einen genetisch basierenden Einfluss auf die Krankheitsentstehung deutlich². Beispielsweise tritt SLE bei beiden eineiigen Zwillingen zu 24-58 % und bei beiden zweieiigen Zwillingen nur zu 2-5 % auf². Der SLE ist nicht durch einen einzelnen Gendefekt, sondern polygen und durch Umweltfaktoren bedingt⁸. Beispielsweise können ultraviolette Strahlung, Stress, bestimmte Medikamente (z. B. Procainamid, Hydralazin) und Infektionen den Krankheitsausbruch triggern^{8,9}.

In Analysen für sich häufende Genpolymorphismen bei SLE-Patienten zeigten sich ca. 30 den SLE prädisponierende Genregionen, deren Proteinprodukte physiologisch an der suffizienten Immuntoleranz beteiligt sind^{8,10}.

Bei Kaukasiern gelten die beiden Varianten DR2 (= DRB1*1501) und DR3 (= DRB1*0301) des HLA-Klasse-II-Moleküls als SLE fördernd^{5,10-12}. HLA steht für humanes Leukozyten-Antigen und entspricht den humanen Haupthistokompatibilitätskomplexen (engl. major histocompatibility complex, MHC) I und II¹³. MHC sind Plasmamembranproteine und dienen der Antigenpräsentation an T-Zellen¹⁴. Während sich MHC I auf allen kernhaltigen Zellen befindet und der Präsentation von Proteinen der betreffenden Zelle selbst an CD8⁺ T-Zellen dient, findet man MHC II nur auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen, B-Zellen) mit der Aufgabe, Peptide von endozytierten Proteinen an CD4⁺ T-Zellen zu präsentieren¹⁴. Die Differenzierungsgruppen (engl. cluster of differentiation, CD) - Nomenklatur dient der Unterscheidung von Immunzellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle¹⁵.

Zu MHC I gehören die HLA-Merkmale A, B, C und zu MHC II die HLA-Merkmale DP, DQ, DR¹³. Um möglichst unterschiedliche Antigene auf MHC präsentieren zu können, unterliegen die MHC einem starken genetischen Polymorphismus¹³. Somit werden manche MHC I und II von über 800 verschiedenen Allelen kodiert und führen u. a. zu den HLA-Varianten DR2 und DR3¹³.

Neben Genpolymorphismen der Antigenpräsentation finden sich ebenso welche für Oberflächenrezeptoren der Leukozyten, z. B. Integrin α M (ITGAM, ein Teil des C3-Komplement-Rezeptors), oder Transkriptionsfaktoren, z. B. den Interferon (IFN) regulierenden Faktor 5 (IRF5)^{2,16,17}.

2.1.3 Pathogenese

Charakteristisch für den SLE ist der Nachweis von Autoantikörpern gegen Zellkernbestandteile, sogenannten antinukleären Antikörpern (ANA)¹². Über eine Immunkomplexbildung der Autoantikörper mit deren Antigenen kommt es zu einer Aktivierung von Komplementsystem und Fc-Rezeptor tragenden phagozytierenden Zellen (Makrophagen, Neutrophile, dendritische Zellen) mit nachfolgender Entzündungsreaktion und einem Gewebeschaden^{1,9,13,18}.

Autoimmunreaktionen können durch das sogenannte „molecular mimicry“ (dt. molekulare Nachahmung) induziert werden, wobei z. B. virale oder bakterielle Antigene körpereigenen Peptiden ähneln und nachfolgend zu einem Verlust der immunologischen Selbsttoleranz führen¹². Es zeigte sich eine zeitliche Assoziation zwischen der Epstein-Barr-Virus-Infektion und dem Krankheitsausbruch des SLE⁹.

Ebenso finden sich Dysregulationen des Immunsystems, die eine Autoreaktivität bedingen¹³. Beim SLE liegt eine gestörte Elimination autoreaktiver B- und T-Zellen vor^{5,8}. Nachfolgend kommt es im Rahmen einer zeitgleich vorliegenden erhöhten Apotoseneigung zur Freisetzung nukleärer Bestandteile mit Produktion von ANA gegen u. a. Einzelstrang (engl. single stranded, ss) und Doppelstrang (engl. double stranded, ds) -Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid, DNA), Chromatin, Histone, Smith (Sm) -Protein und die Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid, RNA) -bindenden Proteine Ro und La^{1,5,19,20}. Zum Sm-Protein gehören die sieben inneren Proteine B, D1, D2, D3, E, F und G von bestimmten RNA-Komplexen, den kleinen nukleären Ribonukleoproteinen (engl. small nuclear ribonucleoprotein, snRNP) U1, U2, U4 und U5^{21,22}. Beim SLE ist insbesondere SmD1 als Autoantigen identifiziert wurden²³.

2.1.4 Symptomatik

Die klinische Präsentation des SLE ist vielfältig. Der Krankheitsname ist an das lateinische Wort lupus (dt. Wolf) angelehnt und bezieht sich auf charakteristische Hautveränderungen^{5,24}. Ferner kennzeichnen Muskel- und Gelenkbeschwerden, Organmanifestationen und Allgemeinveränderungen wie Fieber, Schwäche, Gewichtsverlust und Lymphadenopathie das Krankheitsbild⁵.

Vom American College of Rheumatology (ACR) werden folgende 11 Kriterien zur Diagnosestellung genannt: Schmetterlingserythem (Rötung von Wangen und Nasenrücken mit Aussparung der Nasolabialfalte), diskoider Lupus (rote Papeln mit Schuppenbildung), Fotosensibilität, orale oder nasale Schleimhautulzera, nicht-erosive

Arthritis von mindestens zwei Gelenken, Serositis, Nephritis, zentralnervöse Beteiligung, hämatologische Befunde (z. B. Leukopenie), Autoantikörper gegen dsDNA/ Sm/ Phospholipide und ANA allgemein⁵. SLE ist bei Vorliegen von mindestens vier dieser ACR-Kriterien wahrscheinlich⁵.

2.1.5 Therapie

Zur symptomatischen Therapie des SLE werden verschiedene antiphlogistische und immunsuppressive Medikamente angewandt, wobei eine kausale Behandlung nicht verfügbar ist⁵. Bei mildem Krankheitsbild ohne viszerale Manifestationen werden nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR), Hydroxychloroquin und ggf. temporär Glukokortikoide (Prednisolon) eingesetzt^{5,25}. Da ultraviolette Strahlung Krankheitsschübe auslösen kann, ist ein Schutz durch Crèmes bzw. Salben mit hohem Lichtschutzfaktor erforderlich⁵. Falls es zu Organbeteiligungen kommt, werden hochdosiertes Prednisolon und/ oder Immunsuppressiva wie Azathioprin, Methotrexat, Ciclosporin A, Mycophenolat-Mofetil und Cyclophosphamid verwendet^{5,25}. Bei Therapierefraktärität werden Versuche mit Biologika, z. B. Rituximab und Belimumab, unternommen^{5,26}. Rituximab ist ein gentechnisch hergestellter monoklonaler Antikörper gegen das Transmembranprotein CD20 auf B-Zellen und führt zu deren Depletion im peripheren Blut^{25,27}. Der ebenfalls gegen B-Zellen gerichtete monoklonale Antikörper Belimumab zielt auf das Zytokin B-Zell-aktivierender Faktor^{5,25}.

Zur Verhütung und Linderung von Organmanifestationen ist weiterhin eine frühzeitige Therapie kardiovaskulärer Risikofaktoren wie Rauchen, arterieller Hypertonus und Dyslipidämie notwendig⁵.

2.1.6 Prognose

In Ländern mit guter medizinischer Versorgung beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate heutzutage mindestens 90 %^{5,28}. Als Haupttodesursachen werden kardiovaskuläre Komplikationen, Infektionen, hohe Krankheitsaktivität, neurologische und thromboembolische Komplikationen genannt^{5,29}. Trotz der mittlerweile verbesserten therapeutischen Möglichkeiten, haben SLE-Patienten im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ein zwei- bis fünffaches Risiko zu versterben²⁹. In einer amerikanischen Studie am Brigham and Women's Hospital Lupus Center in Boston mit 928 Patienten wirkten sich männliches Geschlecht, höheres Alter bei Diagnosestellung (ab 50 Jahren) und schwarze Hautfarbe ungünstig für das 10-Jahres-Überleben aus²⁸.

2.2 Lupusnephritis

Die Lupusnephritis (LN) tritt als klassische Glomerulonephritis, interstitielle Nephritis und/oder intrarenale Vaskulitis auf und ist eine der für den Krankheitsverlauf schwerwiegendsten Manifestationen des SLE^{1,30,31}.

2.2.1 Epidemiologie

Unter den SLE-Patienten erkranken ca. 30-60 % der Erwachsenen und bis zu 70 % der Kinder an der LN³². Inzidenz und Prävalenz sind wie beim SLE abhängig von der untersuchten Population³³. Beispielsweise betrug die LN-Prävalenz einer Studie im nordwestlichen England 4,4/ 100.000, wobei Frauen mit 7,1/ 100.000 deutlich häufiger betroffen waren als Männer mit 1,4/ 100.000³⁴. Die LN-Inzidenz zählte 0,4/ 100.000/ Jahr mit 0,68/ 100.000/ Jahr für Frauen und 0,09/ 100.000/ Jahr für Männer³⁴. In einer kalifornischen Studie zeigten sich männliches Geschlecht, nicht-europäische Abstammung (insbesondere asiatische Abstammung) und junges Alter (unter 33 Jahren bei SLE-Diagnosestellung) als positive Prädiktoren für die Entwicklung einer LN³⁵. Ferner war das Risiko, an der LN zu erkranken, in den ersten Jahren nach SLE-Manifestation am höchsten³⁵.

2.2.2 Klassifikation

Die Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organization), die internationale Gesellschaft für Nephrologie (engl. International Society of Nephrology) und die Gesellschaft für renale Pathologie (engl. Renal Pathology Society) unterteilen die LN nach Licht-, Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie von Nierenbiopsien in die Klassen I bis VI: I - minimale mesangiale LN, II - mesangiale proliferative LN, III - fokale proliferative LN, IV - diffuse proliferative LN, V - membranöse LN, VI - fortgeschrittene sklerosierende LN^{1,5,36}. Goldstandard für die Diagnose der Lupusnephritis ist die Nierenbiopsie, da die klinische Symptomatik wenig mit Klasse und Schweregrad der LN korreliert¹.

2.2.3 Pathogenese

Wie in 2.1.3 erwähnt, sind Autoantikörperkomplexe ursächlich für den Gewebeschaden beim SLE und meist auch bei der LN^{18,32}. Durch subendotheliale Ablagerungen von Immunglobulin G (IgG) und Komplementfaktoren im renalen Glomerulum kommt es zu

einer Verletzung des Endothels mit konsekutiver LN vom Typ III oder IV³². Bei der LN vom Typ V erfolgt dagegen eine subepitheliale Immunkomplexablagerung mit milderer Entzündungsreaktion, solange die glomeruläre Basalmembran nicht durchbrochen wird³².

2.2.4 Symptomatik

Die klinische Präsentation der LN ist vielfältig und kann sich sowohl mit nephritischem als auch nephrotischem Sediment darstellen¹. Somit können u. a. Hämaturie, Proteinurie, Ödeme, Hypertonie und ferner akute oder chronische Niereninsuffizienz auftreten^{1,5}.

2.2.5 Therapie

Die Therapie der LN richtet sich nach der vorliegenden Klasse und dem Schweregrad^{5,37}. In jedem Fall sollte eine optimale antihypertensive und antiproteinurische Therapie (Ziel: Blutdruck < 130/ 80 mmHg und Proteinverlust < 500 mg/ Tag) mit einem Angiotensinkonversionsenzym (engl. angiotensin converting enzyme, ACE) -Hemmer oder Sartanen (Angiotensin-1-Antagonisten) erfolgen^{5,37}. Ebenso ist eine lipidsenkende Medikation mit Statinen (Hydroxy-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase-Hemmern) zur Reduktion des kardiovaskulären Risikos notwendig^{5,37}. Insbesondere bei den LN-Klassen III und IV kommen Glukokortikoide und immunsupprimierende Medikamente wie Cyclophosphamid, Mycophenolat-Mofetil, Hydroxychloroquin, Azathioprin, Chlorambucil, Calcineurin-Inhibitoren (z. B. Ciclosporin A, Tacrolimus) zum Einsatz^{5,37}. Eskalierend können u. a. intravenöse Ig und Biologika (z. B. Rituximab) angewendet werden⁵. Die Therapie gliedert sich in eine Induktionstherapie von drei bis sechs Monaten und eine anschließende Erhaltungstherapie von mindestens einem Jahr⁵.

2.2.6 Prognose

Die komplette Remission der LN erfordert das Fehlen aller initialen klinischen Symptome, das Fehlen eines nephritischen Sediments, eine Proteinurie < 0,5 g/ g Kreatinin und den Rückgang des Kreatinins auf den Normal-/ Ausgangswert⁵. In einer amerikanischen Studie mit 370 weltweit erfassten Patienten, die an LN III, IV oder V litten und über 24 Wochen mit Cyclophosphamid oder Mycophenolat-Mofetil behandelt wurden, erreichten ca. 69 % normale Serum-Kreatinin-Werte, 25 % eine Proteinurie ≤ 0,5 g/ Tag, 28 % ein inaktives Urin-Sediment, aber nur 8 % alle drei der Kriterien³⁸. Weiterhin ergab eine

japanische Studie über 103 Patienten mit LN III oder IV (z. T. in Kombination mit LN V) und einer medianen Verlaufsbeobachtung von 125 Monaten nach der Nierenbiopsie, dass ca. 10 % eine Verdopplung des Serum-Kreatinins über mehr als drei Monate oder ein dialysepflichtiges Nierenversagen erlitten³⁹.

Neben der eigentlichen Nierenerkrankung stellen insbesondere die Nebenwirkungen der stark immunsuppressiven Medikamente wie Cyclophosphamid Limitationen des Therapieerfolgs dar^{1,40}. Haupttodesursachen der LN-Patienten sind demnach Infektionen gefolgt von kardio- und cerebrovaskulären Komplikationen und Malignomen⁴⁰.

2.3 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es bei der LN zu einer antigenspezifischen antirenal CD4⁺ und/ oder CD8⁺ T-Zell-Antwort kommt.

2.3.1 Forschungsgrundlage

Wie in 2.2.1 erwähnt, erkranken bis zu 60 % der erwachsenen SLE-Patienten an der LN³². Inflammatorische Autoimmunkomplexe bilden die Grundlage der Pathogenese des SLE^{12,18}. Da trotz der vorhandenen Immunkomplexe nicht alle SLE-Patienten an der LN leiden, stellt sich die Frage nach einem weiteren Pathomechanismus.

Bei der proliferativen LN befinden sich im renalen Interstitium Infiltrate von v. a. CD4⁺ T-Zellen, aber auch CD8⁺ T-Zellen, Makrophagen, B-Zellen und natürlichen Killer (NK) - Zellen⁴¹. Interessanterweise lassen sich diese Infiltrate auch in Abwesenheit von tubulointerstitiellen Immunkomplex-Ablagerungen nachweisen⁴¹. Dies deutet auf eine eigenständige Pathogenität des T-Zell-dominierten Infiltrates unabhängig von Autoantikörpern hin⁴¹. Das Ausmaß des zellulären Infiltrates korreliert mit dem Nierenschaden und der glomerulären Funktion⁴¹. Weiterhin korreliert der Schweregrad der tubulointerstitiellen Entzündung mit dem Risiko des Nierenversagens⁴².

Das murine Lupusmodell mIgM.MRL/MpJ-Fas^{lpr} enthält funktionsfähige B-Zellen, die jedoch keine Ig sezernieren können³¹. Bemerkenswert ist, dass diese gentechnisch erstellten Mäuse interstitielle Nephritis, Vaskulitis und fokale glomeruläre Atrophien trotz Abwesenheit von zirkulierenden Ig und renalen Antikörper-Ablagerungen entwickeln³¹. Lichtmikroskopisch wurden zelluläre Infiltrate interstitiell und perivaskulär in den murinen Nieren gesehen³¹. Ferner fand sich eine lienale Akkumulation von Gedächtnis-T-Zellen, die die Vermutung einer Generierung autoreaktiver T-Zellen durch antigenpräsentierende B-Zellen unterstützt³¹.

Die bedeutende Rolle von T-Zellen in der Pathogenese der interstitiellen Nephritis wurde bereits folgendermaßen gezeigt: Durch Transfer von T-Zellen eines Mausmodells mit Anti-Basalmembran-Glomerulonephritis wurde in vorher gesunden Mäusen eine interstitielle Nephritis ausgelöst, die nach 12 Wochen > 50 % des renalen Cortex betraf⁴³. Phänotypische Untersuchungen der Läsionen ergaben, dass die entzündlichen Infiltrate aus T-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen und Ig⁺ Zellen bestanden⁴³.

In ähnlicher Weise konnten spezifisch gegen ein renales Antigen reaktive T-Zellen eine Nierenentzündung in einem transgenen Mausmodell auslösen⁴⁴. Dazu wurde die NOH-Maus generiert, die unter der Kontrolle des Nephrin-Promotors in Podozyten Ovalbumin (OVA) und Hühnerei-Lysozym exprimiert⁴⁴. Die anschließende Koinjektion von transgenen OVA-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bewirkte eine tubulointerstitielle Schädigung mit tubulointerstitieller mononukleärer Zell-Infiltration, intratubulären Proteinzylindern, fokaler tubulärer Atrophie, fokaler segmentaler Glomerulosklerose und Beginn einer Fibrosierung⁴⁴.

Die Idee einer antigenspezifischen antirenaln T-Zell-Antwort wird in hohem Maße durch die bei der LN nachgewiesene T-Zell-Oligoklonalität unterstützt^{45,46}. Bei Kindern mit LN wurde eine Genexpressionsanalyse des T-Zell-Rezeptors (engl. T cell receptor, TCR) bzgl. der variablen Region der β -Kette (V_β) an Lymphozyten des Nierengewebes und simultan des peripheren Blutes durchgeführt⁴⁵. Im peripheren Blut fand sich keine selektive Expression oder Deletion bestimmter TCR- V_β -Genfamilien im Vergleich von LN-Patienten und gesunden Kontrollpersonen⁴⁵. Dagegen zeigte sich im intraindividuellen Vergleich der T-Zellen des Nierengewebes mit denen des peripheren Blutes eine selektive Expression bestimmter TCR- V_β -Genfamilien in den renalen T-Zellen⁴⁵. Eine anschließende Sequenzanalyse der expandierten renalen TCR β -Ketten bzgl. der Verbindungsregion (engl. joining region, J_β) ergab eine deutliche Oligoklonalität von > 80 %⁴⁵. Eine entsprechende TCR β -Gen-Analyse an erwachsenen LN-Patienten zeigte kongruente Ergebnisse⁴⁶. Die T-Zell-Oligoklonalität im Nierengewebe bei der LN spricht für eine antigenspezifische T-Zell-Reaktion gegen renale Antigene^{45,46}.

Äußerst bekräftigend für eine antirenale T-Zell-Reaktion ist weiterhin, dass bei der LN eine gesteigerte Expression von MHC II und CD40 auf renalen Tubulus-Epithelzellen und zeitgleich von CD40-Ligand (CD40L = CD154) auf T-Zellen besteht⁴⁷. CD40L wird als kostimulatorischer Rezeptor bei antigenspezifischer Aktivierung von vorwiegend CD4⁺, jedoch auch CD8⁺ T-Zellen induziert^{13,48}.

Der Vergleich des Urins mit dem Blut von SLE-Patienten mit akuter proliferativer LN zeigte, dass CD4⁺ T-Zellen des Urins signifikant gesteigert CD40L exprimieren und dass die Urinzellen aus prozentual mehr Effektor-Gedächtnis-T-Helfer-Zellen und weniger naiven T-Zellen bestehen⁴⁹. Weiterhin wiesen CD4⁺ T-Zellen des Urins eine deutlich gesteigerte Proliferationsrate, gemessen mit dem Proliferationsmarker Ki-67, auf⁴⁹. Der Urin der akuten LN-Patienten enthielt in Gegenüberstellung mit Nicht-LN-Patienten um ein Vielfaches höhere CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Zahlen⁴⁹. Überdies erwies sich die genaue Zahl der CD4⁺ sowie der CD8⁺ T-Zellen im Urin als besserer Indikator zur Diagnostik der akuten proliferativen LN als die etablierten Labor-Marker Proteinurie und Serum-Kreatinin⁴⁹.

In Zusammenschau bekräftigen diese Ergebnisse in hohem Maße die Vermutung einer antigenspezifischen antirenaln T-Zell-Antwort in der LN-Pathogenese.

2.3.2 Kurzvorstellung der Versuche

In der Pathogenese des SLE sind autoreaktive T-Zellen mit der Zielstruktur nukleärer Proteine wesentlich⁵⁰. Aufgrund der ausführlichen Darstellung in 2.3.1 stellt sich aber die Frage nach einer im Kontext der LN zusätzlich auftretenden T-Zell-Autoreaktivität gegen spezifische Nierenantigene. Dieser Fragestellung wurde in vier verschiedenen Versuchen nachgegangen.

TCR β -Analyse

In einem Kooperationsprojekt wurde zunächst das TCR β -Repertoire im peripheren Blut und Urin von fünf aktiven LN-Patienten auf Oligoklonalität als einen weiteren Hinweis auf Antigen-spezifität der T-Zellen bei der LN untersucht.

Stimulationsversuch

Zur Analyse der antigenspezifischen antirenaln T-Zell-Antwort wurden T-Zellen von 23 SLE-Patienten und 12 gesunden Kontrollpersonen mit vier verschiedenen humanen Nierenantigenen stimuliert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Expression von zellulären Aktivierungsmarkern.

Depletionsversuch

Problematisch bei der Detektion antigenspezifischer T-Zellen ist deren niedrige Frequenz im Blut⁵¹. Im Blut befinden sich ca. 1000-2000 T-Zellen/ μ l, wovon bei Kontakt mit einem

starken viralen Antigen ca. 5 % die T-Zell-Antwort ausmachen⁵¹. Eine T-Zell-Reaktion gegen z. B. Tumorzellen kann ohne eine experimentelle Verstärkung nicht aufspürbar sein⁵¹.

Bei der Antigenstimulation könnten regulatorische T-Zellen (T_{reg}-Zellen) die T-Zell-Aktivierung unterdrücken⁵². Entsprechend wurden die T_{reg}-Zellen in einem zweiten Versuch mit 10 SLE-Patienten durch eine Depletion vor der Antigenstimulation entfernt. Auf diese Weise konnte bereits eine Steigerung der antigenspezifischen T-Zell-Antwort gezeigt werden⁵². Die Analyse der Aktivierungsmarker-Induktion erfolgte wie im Stimulationsversuch mittels Durchflusszytometrie.

T Cell Library

Um antigenspezifische T-Zellen mit höherer Sensitivität nachweisen zu können, wurde außerdem eine T-Zell-Bibliothek (engl. T cell library) mit dem Ziel der polyklonalen Expansion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen des peripheren Blutes von vier SLE-Patienten und fünf gesunden Kontrollpersonen angelegt. Anschließend wurde die T-Zell-Aktivierung nach Stimulation mit einem Nierenantigen über Messung der Zellproliferation mittels eines ³H-Thymidin-Inkorporationsassays detektiert.

3 Methodik

3.1 Materialien

Im Folgenden sind die verwendeten Materialien zur Erstellung der vorliegenden Arbeit aufgelistet.

Laborgeräte

BD FACSAria™	BD Biosciences (Heidelberg, D)
CASY® TT	Roche Innovatis AG (Reutlingen, D)
Centrifuge 5804 R	Eppendorf (Hamburg, D)
Cryokonservierer Biosafe®, Stickstoff, -160 °C	Cryotherm (Kirchen/ Sieg, D)
Einkanal-Pipetten mLINe®	Sartorius (Göttingen, D)
Einkanal-Pipetten Research®	Eppendorf (Hamburg, D)
Einkanal-Pipetten Research® plus	Eppendorf (Hamburg, D)
Finnpipette 4510	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Gammacell® 40 Exactor	Best® Theratronics (Ottawa, Ontario, CA)
Heracell™ CO ₂ 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)
Inkubator CB 210	Binder (Tuttlingen, D)
Kühlschrank +4 °C	Liebherr (Bulle, CH)
Kühlschrank -20 °C	Liebherr (Bulle, CH)
Kühlschrank -80 °C	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
MACSQuant® Analyzer	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
MicroBeta FilterMate-96 Harvester	PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA)
MicroBeta ² Plate Counter, 6 Detektoren	PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA)
MidiMACS Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss (Zaventem, B)
Multipipette® plus	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand (Wertheim, D)
Vakuumcontroller CVC 2000	Vacuubrand (Wertheim, D)
Vakuumpumpen-Motor	Marathon Electric (Wausau, Wisconsin, USA)
Wasserbad, 37 °C	Memmert (Schwabach, D)
Zählkammer Neubauer improved, Tiefe 0,1 mm	Carl Roth (Karlsruhe, D)

Labormaterialien

Cellstar® Cellculture Microplate, 96 well, U-bottom	Greiner-Bio-One (Frickenhausen, D)
Cellstar® pipet 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner-Bio-One (Frickenhausen, D)
Combitips advanced® 5 ml	Eppendorf (Hamburg, D)
CryoPure Gefäß, 1 ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)
DURAN® Becher, 1000 ml	DURAN Group (Wertheim, D)
Falcon® Round-Bottom Tube, 5 ml, PS, für FACS	Corning Life Sciences (Amsterdam, NL)
Griffinbecher, PP, 2000 ml	VITLAB (Großostheim, D)
Kassette für feste 96-Well-Platten	PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA)
MACSQuant® Separation, LS Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1250 µl	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Reagiergefäß 0,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Slide-A-Lyzer® MINI Dialysis Float	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Slide-A-Lyzer® MINI Dialysis Units, 2kDa	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
TopSeal™-A	Packard (Meriden, Connecticut, USA)
TopSeal™-P	Packard (Meriden, Connecticut, USA)
Tube 15 ml, 50 ml, PP	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Tube 5 ml, PS, geeignet für FACS	Sarstedt (Nümbrecht, D)
UniFilter-96 GF/ B, 1 µm Porengröße	PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA)

Materialien zur Blutentnahme

Softasept® N Hautdesinfektionsmittel	Braun (Melsungen, D)
Vacutainer® Blutentnahmeröhrchen, Heparin, 10ml	BD (Heidelberg, D)
Vacutainer® One Use Holder	BD (Heidelberg, D)
Vacutainer® Safety-Lok™	BD (Heidelberg, D)

Chemikalien, Lösungen

Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich (München, D)
Brefeldin A	Sigma-Aldrich (München, D)
CASY Flow (1 l PBS, 9 l destilliertes H ₂ O, 20 ml 10%-haltige NaN ₃ -Lösung)	DRFZ (Berlin, D)
DMSO	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Erythrozyten-Lyse-Puffer (10 mM KHCO ₃ , 0,155 M NH ₄ Cl, 0,1 mM EDTA, H ₂ O, pH 7,5)	DRFZ (Berlin, D)
Ethanol 70 %	DRFZ (Berlin, D)
Färbelösung intrazellulär (0,5 % Saponin (w/ v): 0,25 g Saponin, 50 ml PBS/ BSA/ Azid)	DRFZ (Berlin, D)
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare Europe (Freiburg, D)

Fixierlösung (4% PFA (w/ v): 4 g PFA, 100 ml PBS, 2 mM EDTA)	DRFZ (Berlin, D)
Flebogamma	DRFZ (Berlin, D)
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, Kalifornien, USA)
MEM Nicht-essentielle Aminosäuren-Lösung (100x)	Sigma-Aldrich (München, D)
Mercaptoethanol 50 mmol/ l	Sigma-Aldrich (München, D)
Methyl- ³ H-Thymidin, 5 mCi (185 mBq), 1 mCi/ ml	GE Healthcare Europe (Freiburg, D)
MicroScint™-O, Szintillationslösung	PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA)
Pancoll human	PAN-Biotech (Aidenbach, D)
Paraformaldehyd	Carl Roth (Karlsruhe, D)
PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ , H ₂ O)	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-Streptomycin (Penicillin 10 000 U/ ml, Streptomycin 10 000 µg/ ml)	Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)
PHA, Lektin aus Phaseolus vulgaris (Gartenbohne), 1 mg/ ml	Sigma-Aldrich (München, D)
Proleukin®, Aldesleukin (IL-2-Analogon), 10 µg/ ml (= 18 x 10 ⁴ IU/ ml)	Novartis (Nürnberg, D)
RPMI 1640 Medium mit GlutaMAX™	Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Saponin	Sigma-Aldrich (München, D)
Trypanblau-Lösung (0,4 % Trypanblau (w/ v))	Sigma-Aldrich (München, D)
VLE-RPMI 1640 Flüssigmedium mit stabilem Glutamin, 2 g/ l NaHCO ₃	Biochrom (Berlin, D)
Antigene	
CMV pp65 - rekombinantes Protein	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Human Kidney Normal Tissue Lysate	PromoCell (Heidelberg, D)
Human Renal Epithelial Cell Lysate	ScienCell (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Human Renal Glomerular Endothelial Cell Lysate	ScienCell (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cell Lysate	ScienCell (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Staphylokokken-Enterotoxin B von Staphylococcus aureus	Sigma-Aldrich (München, D)

Antikörper

CD3 PE human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD3 PE human	DRFZ (Berlin, D)
CD4 PE-Cy7 conjugated mouse anti-human	BD (Heidelberg, D)
CD4 MicroBeads human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD8 APC-Cy7 conjugated mouse anti-human	BD (Heidelberg, D)
CD8 MicroBeads human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD25 APC human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD25 MicroBeads II human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD28 anti-human	eBioscience (San Diego, Kalifornien, USA)
CD40L BV421 anti-human	BioLegend (San Diego, Kalifornien, USA)
CD69 FITC human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
IFN γ APC anti-human	BioLegend (San Diego, Kalifornien, USA)
IFN γ Cy5 human	DRFZ (Berlin, D)
PI	Sigma-Aldrich (München, D)

Software/ Computerprogramme

Adobe Illustrator CS4	Adobe Systems (München, D)
Citavi 4/ 5	Citavi (Wädenswil, CH)
GraphPad Prism 5	GraphPad (San Diego, Kalifornien, USA)
FlowJo 7.6.5	FlowJo (Ashland, Oregon, USA)
MicroBeta ² Workstation, Windows	PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA)
Microsoft Office 2010 (Excel, PowerPoint, Word)	Microsoft (Redmond, Washington, USA)
PubMed	National Center for Biotechnology Information (Bethesda, Maryland, USA)

3.2 Rekrutierung der Patienten

Die SLE-Patienten wurden über die Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, rekrutiert. Eingeschlossen wurden SLE-Patienten sowohl von der rheumatologisch-klinischen Station 204b als auch von der rheumatologischen Tagesstation.

Im Rahmen der TCR β -Analyse wurden nur SLE-Patienten mit aktiver LN, unabhängig von Alter und Geschlecht, eingeschlossen. Für eine aktive LN musste eine aktuelle renale Beteiligung (bioptischer LN-Nachweis, Proteinurie von mindestens 500 mg/ l oder positives Urinsediment/ Hämaturie) im Rahmen des SLE vorliegen.

Für den Stimulationsversuch wurden Blutproben von SLE-Patienten unabhängig von Krankheitsaktivität, renaler Beteiligung, Alter und Geschlecht untersucht. Dagegen wurden in den Depletionsversuch nur SLE-Patienten mit renaler Beteiligung einbezogen.

Für die T Cell Library wurden schließlich entweder SLE-Patienten mit hoher Krankheitsaktivität und/ oder renaler Beteiligung hinzugezogen.

Zur Einschätzung der Krankheitsaktivität wurde der Krankheitsaktivitäts-Index des SLE (engl. Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, SLEDAI) verwendet. Im SLEDAI werden neun von SLE betroffene Organsysteme - wie z. B. Haut, zentrales Nervensystem, Niere - mit Punkten bewertet⁵³. Bei maximaler Krankheitsaktivität werden 105 Punkte vergeben, bei minimaler 0 Punkte⁵⁴. Die Differenzierung zwischen aktiven und nicht aktiven SLE-Patienten beruhte auf dem SLEDAI-Grenzwert von mindestens 10 Punkten.

Tabelle 1 und Tabelle 2 zeigen die SLE-Patienten der vier Versuche.

TCRβ-Analyse: SLE-Patienten (n = 5)		
Geschlecht (Anzahl)	w	4
	m	1
Alter (Jahre)	Median	42 (18-64)
behandelnde Einrichtung (Anzahl)	Station	5
	Tagesklinik	0
Krankheitsaktivität (Punkte)	SLEDAI Median	16 (8-26)
Nierenbeteiligung (Anzahl)	aktiv	5
	nicht aktiv	0
Stimulationsversuch: SLE-Patienten (n = 23)		
Geschlecht (Anzahl)	w	20
	m	3
Alter (Jahre)	Median	34 (22-70)
behandelnde Einrichtung (Anzahl)	Station	7
	Tagesklinik	16
Krankheitsaktivität (Punkte)	SLEDAI Median	4 (0-26)
Nierenbeteiligung (Anzahl)	aktiv	3
	nicht aktiv	5
keine Nierenbeteiligung (Anzahl)	aktiv	2
	nicht aktiv	13

Tabelle 1: SLE-Patienten der TCR β -Analyse und des Stimulationsversuchs

Depletionsversuch: SLE-Patienten (n = 10)		
Geschlecht (Anzahl)	w	9
	m	1
Alter (Jahre)	Median	30 (18-73)
behandelnde Einrichtung (Anzahl)	Station	7
	Tagesklinik	3
Krankheitsaktivität (Punkte)	SLEDAI Median	8 (0-19)
Nierenbeteiligung (Anzahl)	aktiv	3
	nicht aktiv	7
T Cell Library: SLE-Patienten (n = 4)		
Geschlecht (Anzahl)	w	1
	m	3
Alter (Jahre)	Median	31 (26-62)
behandelnde Einrichtung (Anzahl)	Station	3
	Tagesklinik	1
Krankheitsaktivität (Punkte)	SLEDAI Median	12 (8-14)
Nierenbeteiligung (Anzahl)	aktiv	2
	nicht aktiv	1
keine Nierenbeteiligung (Anzahl)	aktiv	1
	nicht aktiv	0

Tabelle 2: SLE-Patienten des Depletionsversuchs und der T Cell Library

3.3 Rekrutierung der gesunden Kontrollpersonen

Für den Stimulationsversuch und die T Cell Library wurden Probanden, dargestellt in Tabelle 3, als gesunde Kontrollen rekrutiert. Hierzu wurden Mitglieder der Arbeitsgruppen des Deutschen Rheuma-Forschungszentrums Berlin (DRFZ) und der Charité – Universitätsmedizin Berlin eingeschlossen.

Stimulationsversuch: gesunde Kontrollen (n = 12)		
Geschlecht (Anzahl)	w	9
	m	3
Alter (Jahre)	Median	26 (22-31)
T Cell Library: gesunde Kontrollen (n = 5)		
Geschlecht (Anzahl)	w	2
	m	3
Alter (Jahre)	Median	28 (23-35)

Tabelle 3: Gesunde Kontrollpersonen des Stimulationsversuchs und der T Cell Library

3.4 Gewinnung von Blutproben

Die Entnahme von Blutproben erfolgte nach schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten auf der Grundlage der Ethikvota EA1/036/16 und EA1/356/14 von einem zur Blutentnahme befugten Mitglied des medizinischen Personals möglichst im Rahmen einer Routineblutentnahme. Mithilfe eines Vacutainer-Systems wurden 10 bis 40 ml Blut in Natrium-heparinisierte Röhrchen periphervenös abgenommen.

3.5 Steriles Arbeiten

Für den Stimulationsversuch, den Depletionsversuch und die T Cell Library wurde steril an der Sterilbank Heraeus® Safety cabinet nach Desinfektion aller zu benutzenden Materialien mit Ethanol (70 %) gearbeitet.

3.6 Gewinnung von PBMC

Alle Experimente wurden an mononukleären Zellen des peripheren Blutes (engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMC) durchgeführt, zu denen T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten und dendritische Zellen gehören⁵⁵. Zur sterilen Extrahierung der PBMC aus heparinisierem Vollblut erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation mittels der Ficoll-Lösung Ficoll-Paque PLUS oder Pancoll human.

Zunächst wurden maximal 25 ml Vollblut mit 10 ml von entweder Phosphat gepufferter Salzlösung (engl. phosphate buffered saline, PBS, Depletionsversuch & T Cell Library) oder von PBS mit 0,5 % bovinem Serumalbumin (PBS/ BSA, TCR β -Analyse & Stimulationsversuch) verdünnt. Anschließend erfolgte die vorsichtige Auftragung der

Blut-Lösung auf 15 ml Ficoll-Lösung mit Hilfe des Pipettierhelfers accu-jet® pro in einer Polypropylenröhre (engl. tube).

Infolge der spezifischen Dichte der Ficoll-Lösung von 1,077 g/ ml kommt es nach Zentrifugation bei 2000 RCF für 20 min bei 20 °C ohne Bremse zu einer charakteristischen Umverteilung der beiden Lösungen und ihrer Bestandteile⁵⁵. Am Boden des Tubes sammeln sich wegen ihrer höchsten Dichte Erythrozyten und Granulozyten^{55,56}. Diesem Sediment folgen die Ficoll-Lösung und darüber der charakteristische Zwischenring aus PBMC^{55,56}.

Der PBMC-Zwischenring wurde in eisgekühltes PBS bzw. PBS/ BSA pipettiert. Um Reste der Ficoll-Lösung zu entfernen, erfolgte ein Waschschriff mit PBS bzw. PBS/ BSA und Zentrifugation bei 1300 RPM für 8 min bei 4 °C. Das entstandene Sediment wurde nach Absaugen des Überstandes in 10 ml PBS bzw. PBS/ BSA resuspendiert.

Eine Erylyse wurde, wenn möglich, vermieden, um eine vorzeitige Zellaktivierung zu vermeiden. Bei ausgeprägter Hämolyse wurden die PBMC jedoch für 6 min in 5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert, gewaschen und erst dann in 10 ml PBS bzw. PBS/ BSA aufgenommen.

3.7 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde entweder mittels einer Zählkammer mikroskopisch oder häufiger mit Hilfe des Zellzählers CASY® TT bestimmt.

Für die mikroskopische Bestimmung wurden 10 µl Zell-Lösung mit 90 µl Trypanblau-Lösung (0,4 %) verdünnt und auf eine Zählkammer aufgetragen. Auf der Zählkammer befinden sich vier Quadrate, die jeweils 0,1 µl Lösung aufnehmen. In 100-facher Vergrößerung wurden die Zellen in jedem der vier Quadrate gezählt und daraus der arithmetische Mittelwert (MW) gebildet. Die Zellzahl pro ml ergibt sich somit aus der mittleren Zellzahl x 10⁴ x den Verdünnungsfaktor 10.

Der Zellzähler CASY zeigt die Zellzahl pro ml an. Hierzu werden 10 µl Zell-Lösung in 10 ml CASY Flow Puffer-Lösung pipettiert und die Zellgröße für PBMC auf ca. 6,0 - 12,5 µm eingegrenzt.

3.8 Durchflusszytometrie

Wesentlich für die vorliegenden Experimente war die Methode der Durchflusszytometrie bzw. der Fluoreszenz aktivierten Zell-Sortierung (engl. fluorescence-activated cell

sorting, FACS). In der TCR β -Analyse wurde der Zell-Sortierer BD FACSAria™ (Fa. BD Biosciences) und im Stimulations- und Depletionsversuch das Messgerät MACSQuant® Analyzer (Fa. Miltenyi Biotec) genutzt.

Bevor die Durchflusszytometrie angewendet werden kann, müssen die PBMC durch einen Färbeprozess mit Fluorochrom gekoppelten antihumanen Maus-Antikörpern, die an Zellstrukturen binden, markiert werden. Tabelle 4 gibt die verwendeten Antikörper mit ihrer eingesetzten Verdünnung wieder.

Antikörper	Klon	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
CD3	Ucht1	PE	1:200	DRFZ
CD3	BW264/56	PE	1:100	Miltenyi Biotec
CD4	SK3	PE-Cy7	1:50	BD
CD8	SK1	APC-Cy7	1:50	BD
CD25	4E3	APC	1:10	Miltenyi Biotec
CD40L	24-31	BV 421	1:20	BioLegend
CD69	FN50	FITC	1:100	Miltenyi Biotec
DNA toter Zellen	-	PI	1:100	DRFZ
IFN γ	4SB3	Cy5	1:200	DRFZ
IFN γ	4SB3	APC	1:20	BioLegend

Tabelle 4: Fluorochrom gekoppelte Antikörper

3.8.1 MACSQuant® Analyzer

Der MACSQuant® Analyzer bietet die Möglichkeit, bei Fluorochrom markierten Zellen zehn verschiedene optische Zellparameter auf Einzelzellebene über Lichtstreuung und Fluoreszenz zu erfassen⁵⁷. Für die Analyse werden die Zellen über hydrodynamische Fokussierung durch das Strömungssystem des Geräts zunächst in einen laminaren Einzelzellstrom umgewandelt⁵⁸.

Anschließend passieren die Zellen drei verschiedene Laser⁵⁷. Laser strahlen Licht nur einer Wellenlänge aus, an diesem Gerät sind es 405 nm, 488 nm und 635 nm^{57,58}. Durch das monochromatische Licht kommt es einerseits zur Lichtstreuung⁵⁸. Andererseits werden die über Antikörper an die Zelle gebundenen Fluorochrome zur Lichtemission angeregt⁵⁸. Fluorochrome absorbieren Licht eines bestimmten Wellenlängenbereiches⁵⁸. Wenn das passende Laser-Licht auf die Elektronen des Fluorochroms trifft, werden diese angeregt, sodass sie auf ein höheres Energieniveau angehoben werden⁵⁸. Dieser

Zustand kann nur für wenige Nanosekunden gehalten werden⁵⁸. Durch konformationelle Veränderungen innerhalb des Fluorochroms wird thermische Energie abgegeben, sodass die Elektronen kurzzeitig auf ein etwas niedrigeres, aber stabileres Energieniveau fallen⁵⁸. Zuletzt gelangen die Elektronen zurück auf das Ausgangsniveau⁵⁸. Die dabei freiwerdende Energie ist Fluoreszenz, emittiertes Licht, das eine größere Wellenlänge als der exzitierende Laser aufweist⁵⁸.

Das ausgestrahlte Licht trifft auf Photodetektoren, sogenannte Kanäle, wodurch ein Strom von geringer Stärke generiert wird⁵⁸. Der MACSQuant[®] Analyzer besitzt acht Fluoreszenz-Kanäle sowie zwei Kanäle, die das Streulicht detektieren⁵⁷. Die Spannung des erzeugten Stroms ist proportional zur Anzahl der auftreffenden Photonen⁵⁸. Über logarithmische Amplifikation wird die Spannung schließlich in elektrische Signale, die graphisch dargestellt werden, umgewandelt⁵⁸.

Das Streulicht wird geradeaus vom Vorwärtsstreuung-Kanal (engl. forward scatter channel, FSC) aufgenommen, wobei die FSC-Intensität der Zellgröße entspricht. Dagegen wird im Seitwärtsstreuung-Kanal (engl. side scatter channel, SSC) das im 90 ° Winkel gestreute Licht detektiert, welches die Granularität der Zelle wiedergibt⁵⁸. Da jede Zelle ein bestimmtes FSC-SSC-Verhältnis aufweist, kann so zwischen Zellarten unterschieden werden⁵⁸. Granulozyten sind mit einem Durchmesser von ca. 10 µm relativ klein, besitzen aber eine hohe Granularität¹⁴. Dagegen sind Monozyten mit bis zu 20 µm Durchmesser die größten Leukozyten¹⁴. Lymphozyten und so auch T-Zellen liegen von der Größe zwischen Granulozyten und Monozyten und weisen von diesen die geringste Granularität auf⁵⁸.

Die Detektion durch acht verschiedene Kanäle bei nur drei Lasern ist möglich, weil vor die Detektoren Filter geschaltet sind, die nur emittiertes Licht bestimmter Wellenlängen passieren lassen, während sie die übrigen Wellenlängen absorbieren⁵⁸.

Bei der FACS-Analyse untersucht man gewöhnlich mehrere Fluorochrome simultan. Obwohl man versucht, Fluorochrome zu wählen, die Emissionsspektren weit entfernt liegender Wellenlängen aufweisen, passiert es, dass das ausgesandte Licht des Fluorochroms A nicht nur in dem zugehörigen Detektor A, sondern auch in dem eines anderen Fluorochroms B gemessen wird⁵⁸. Ein spektrales Überlappen der Emissionen liegt vor. Der entsprechende Detektor B würde somit eine zusätzliche falsch-positive Emission messen⁵⁸. Um dies zu verhindern, nutzt man die Kompensation, wobei mittels der MACSQuant[®] Analyzer-Software (engl. Computerprogramm) die durch Fluorochrom A hervorgerufene Emission von dem in Detektor B gemessenen Licht abgezogen wird⁵⁸.

Tabelle 5 zeigt die Laser und zugehörigen Kanäle des MACSQuant® Analyzers für die Messung der Fluorochrom gekoppelten Antikörper bzw. Zellgröße und -granularität⁵⁷.

Laser	Kanal	Fluorochrom/ Parameter	Antikörper
Violet 405 nm	V1	BV421	CD40L
	V2	nicht verwendet	
Blau 488 nm	FSC	Zellgröße	CD69 CD3 DNA toter Zellen CD4
	SSC	Zellgranularität	
	B1	FITC	
	B2	PE	
	B3	PI	
	B4	PE-Cy7	
Rot 635 nm	R1	APC	CD25
		APC, Cy5	IFN γ
	R2	APC-Cy7	CD8

Tabelle 5: Laser des MACSQuant® Analyzers mit zugehörigen Kanälen, Fluorochromen und Antikörpern

3.8.2 BD FACSAria™

Der Zell-Sortierer BD FACSAria™ funktioniert ähnlich dem MACSQuant® Analyser, aber ermöglicht außerdem die Selektion gewünschter Zellen.

Auch beim BD FACSAria™ wird die Zellprobe über hydrodynamische Fokussierung in einen Einzelzellstrom umgewandelt und an drei verschiedenen Lasern (407 nm, 488 nm, 633 nm) vorbei geleitet⁵⁹. Detektoren konvertieren die entstehenden Lichtsignale in elektrische Signale um⁵⁹.

Die eigentliche Zellsortierung erfolgt über folgenden Mechanismus: Mittels Energieeinwirkung auf den Einzelzellstrom werden hoch uniforme Tröpfchen gebildet⁵⁹. Wenn ein Partikel (bzw. eine Zelle) im Einzelzellstrom die vorher eingestellten Kriterien (z. B. positiv für CD3-PE) erfüllt, wird der Zellstrom im Moment der Tröpfchen-Bildung geladen⁵⁹. Das entstandene Tröpfchen enthält somit einen geladenen Partikel, der anschließend durch stark geladene Deflektionsplatten seitwärts ausgelenkt und in einem Gefäß aufgefangen wird⁵⁹. Ungeladene Partikel passieren das elektrische Feld dagegen ohne Auslenkung und gelangen in den Abfall-Behälter⁵⁹.

3.9 TCR β -Analyse

Die Analyse des TCR β -Repertoires im peripheren Blut und Urin aktiver LN-Patienten fand in Kooperation und unter wesentlicher Beteiligung der Arbeitsgruppe (AG) von Prof. Dr. med. Nina Babel am Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien der Charité – Universitätsmedizin Berlin statt. Insbesondere sind in der AG Babel die Mitarbeiter Dr. Mikalai Nienen, Dr. Ulrik Stervbo und Patrizia Wehler hervorzuheben.

3.9.1 Zielstellung

Um einen Einblick in das T-Zell-Repertoire von aktiven LN-Patienten zu erhalten, wurden die TCR-V β - und TCR-J β -Gene von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen des peripheren Blutes und von Urinzellen sequenziert und auf Oligoklonalität untersucht.

3.9.2 Gewinnung der Zellproben

Aus dem peripheren Blut von fünf aktiven LN-Patienten wurden möglichst je 50.000 CD3⁺ CD4⁺ und CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen mittels des Gerätes BD FACSAria™ gewonnen. Die Trennung von CD4⁺ T-Helfer (T_H) -Zellen und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen erfolgte unter simultaner Nutzung von Fluorochrom markierten Antikörpern gegen mit dem TCR assoziiertes CD3, MHC II bindendes CD4 und MHC I bindendes CD8¹³. Nach Erhalt der PBMC durch Anwendung der Ficoll-Lösung wurden ca. 4 Mio. PBMC in PBS/ BSA bei 2000 RPM für 8 min bei 4 °C zentrifugiert und nach Absaugen des Überstands zum Färben in 90 μ l PBS/ BSA und 10 μ l Flebogamma auf Eis resuspendiert. Flebogamma ist unspezifisches IgG und wurde im Überschuss verwendet, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Die Färbung mit den Antikörpern erfolgte für 20 min bei 4 °C im Dunkeln. Nach zwei Waschschritten mit PBS/ BSA wurde das Zellpellet in 200 μ l PBS/ BSA aufgenommen. Direkt vor der Zell-Sortierung wurde zusätzlich PI hinzugefügt, um tote Zellen anzufärben und somit auszuschließen. Die durch den BD FACSAria™ jeweils gewonnenen CD3⁺ CD4⁺ bzw. CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen wurden zweimal mit PBS/ BSA gewaschen und nach Absaugen des Überstandes bis zur Weiterreichung an die AG Babel bei -80 °C gelagert.

Ebenfalls wurden Urinzellen von aktiven LN-Patienten gewonnen. Dazu wurden 100 ml Urin bei 1300 RPM für 8 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das entstandene Zellpellet zweimal mittels PBS/ BSA und Zentrifugation gewaschen. Nach Absaugen des Überstands wurde auch hier das Zellpellet bei -80 °C eingefroren.

3.9.3 Sequenzanalyse der TCR-V β - und TCR-J β -Gene

Die weitere Verarbeitung der Blut- und Urin-Zellproben und die anschließende Datenauswertung erfolgte durch die AG Babel, weshalb die angewandten Methoden und Materialien nur kurz unter diesem Kapitel dargestellt werden.

Bei allen drei Zellproben wurden zunächst simultan genomische DNA (gDNA) und RNA mit AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden, D) isoliert⁶⁰. Die Boten-RNA (engl. messenger RNA, mRNA) wurde mit SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Fa. Invitrogen, Carlsbad, CA) revers transkribiert⁶⁰. Für die anschließende DNA-Amplifikation des rekombinanten TCR β -Gens mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) wurden Primer, DNA bindende Oligonukleotide, benötigt. Dazu wurden über das internationale Informationssystem ImMunoGeneTics information system[®] (IMGT[®]) die Sequenzen der funktionalen V β - und J β -Gene abgerufen⁶⁰. Teilweise degenerierte Primer, die an alle funktionellen V β - und J β -Gene binden, wurden mit der Software FastPCR (Fa. PrimerDigital Ltd, Helsinki, FI) designt⁶⁰. Die PCR erfolgte danach mit dem QIAGEN Multiplex PCR Kit (Fa. Qiagen) mit 10 % Q-Lösung, V β - und J β -spezifischen Primern (je 0,25 μ mol/ l) und der DNA-Vorlage (bis zu 1 μ g) in einem Gesamtvolumen von bis zu 100 μ l bei folgenden Zyklen: 95 °C für 5 min, 35 Zyklen bei 95 °C für 15 s, 65 °C für 90 s, 72 °C für 15 s und zuletzt 72 °C für 5 min⁶⁰. Nachfolgend wurden die amplifizierten Produkte auf 2 %-LMP-Agarose (Fa. Sigma-Aldrich, München, D) aufgetrennt, mit dem Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen) gereinigt und mittels des Gerätes GenomeAnalyzer II[®] (Illumina, San Diego, Kalifornien, USA) prozessiert und mit einer Leselänge von 120 Basenpaaren sequenziert⁶⁰. Im Rahmen der Sequenzanalyse wurden Sequenzen mit einer durchschnittlichen Qualitätsbewertung unter 30 verworfen⁶⁰. Außerdem wurde für jede Sequenz die beste Übereinstimmung mit der V β - und J β -Referenzsequenz berechnet⁶⁰. Die Komplementarität definierende Region 3 (engl. complementarity determining region 3, CDR3) -Sequenz wurde zwischen den Basentriplets Cystein an Stelle 104 und Phenylalanin an Stelle 118 definiert⁶⁰. CDR3 mit falschen Leserahmen und Stop-Codons wurden entfernt⁶⁰.

Bei der Datenauswertung wurden die spezifischen Sequenzen gruppiert und in Bezug auf das TCR β -Repertoire analysiert⁶⁰. Antigen-spezifische T-Zell-Klone mit einer Frequenz unter 1 % wurden verworfen, um unspezifische T-Zellen, die durch Unreinheiten beim Sortierungsprozess (s. 3.9.2) oder durch Hintergrundstimulation entstanden waren, auszuschließen⁶⁰. Für jeden LN-Patienten und jede der drei Zellgruppen (CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und Urinzellen) wurden die 25 häufigsten T-Zell-Klone bestimmt.

Anschließend wurde untersucht, ob ein dominierender T-Zell-Klon einer Zellgruppe, ungeachtet seiner Frequenz, auch in einer weiteren Zellgruppe oder sogar bei einem anderen Spender zu finden ist. Ferner wurde nach Alfréd Rényi die Diversität der 25 häufigsten T-Zell-Klone zwischen den drei Zellkompartimenten aller fünf LN-Patienten mit den α -Werten (0/ 0,25/ 0,5/ 1/ 2/ 4/ 8/ 16/ 32/ 64/ unendlich) verglichen.

3.10 Stimulationsversuch

Im Stimulationsversuch erfolgte eine Stimulation der PBMC über sechs Stunden unter sieben verschiedenen Konditionen durch sechs unterschiedliche Antigene, davon vier Lysate von Nierenzellen, und die Negativkontrolle (Neg).

3.10.1 Zielstellung

Ziel war die Analyse der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bzgl. ihrer oberflächlichen und intrazellulären Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD40L und IFN γ .

CD69 als früher Marker der Zellaktivierung findet sich auf T- und B-Zellen sowie auf Makrophagen und NK-Zellen¹³. CD40L wurde unter 2.3.1 vorgestellt. Das Zytokin IFN γ wird vorrangig von T-Zellen und NK-Zellen sezerniert und dient u. a. der Aktivierung von Makrophagen sowie der gesteigerten Expression von MHC-Molekülen¹³.

3.10.2 Stimulationskonditionen

Tabelle 6 gibt die sieben verschiedenen Stimulationskonditionen bzw. die Antigene und ihre jeweils eingesetzte Konzentration wieder.

Funktion	Antigen	Abkürzung	Konzentration
Nierenzell-Lysat	Lysat von Zellen des humanen normalen Nierengewebes (Kidney-Lysat); dialysiert	KID	10 µg/ ml
Nierenzell-Lysat	Lysat von humanen Epithelzellen der Nierentubuli; dialysiert	EPI	10 µg/ ml
Nierenzell-Lysat	Lysat von humanen Endothelzellen des Glomerulums; dialysiert	GLOM	10 µg/ ml
Nierenzell-Lysat	Lysat von humanen Epithelzellen des proximalen Nierentubulus; dialysiert	TUB	10 µg/ ml
Positivkontrolle	Staphylokokken-Enterotoxin B des Staphylococcus aureus	SEB	1 µg/ ml
Positivkontrolle	CMV pp65 – rekombinantes Protein vom 65 kDa Phosphoprotein des Cytomegalievirus (HHV 5)	CMV	10 µl/ ml
Negativkontrolle	VLE-RPMI 1640 Flüssigmedium mit stabilem Glutamin, P/S, ME; dialysiert	Neg	5 µl/ ml

Tabelle 6: Antigene, Negativkontrolle und deren Konzentration

Zur Stimulation der PBMC wurden vier verschiedene, käuflich erworbene humane Nierenzell-Lysate in einer Konzentration von 10 µg/ ml als Nierenantigene verwendet. Das erste Lysat KID stammt von Zellen des gesamten gesunden Nierengewebes (Human Kidney Normal Tissue Lysate, Kidney-Lysat). Dagegen enthält das zweite Lysat EPI nur Epithelzellen des Tubulussystems, also des proximalen und distalen Tubulus, der Henle-Schleife und des Sammelrohrs (Human Renal Epithelial Cell Lysate). Für das dritte Lysat GLOM wurden Endothelzellen des Glomerulums lysiert (Human Renal Glomerular Endothelial Cell Lysate) und für das letzte Nierenzell-Lysat TUB wurden ausschließlich Epithelzellen des proximalen Tubulus (Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cell Lysate) genutzt. Laut Firmenangabe stammen die Nierengewebe aus in der Region der jeweiligen Firma liegenden Krankenhäusern bzw. deren Abteilungen für Pathologie oder Rechtsmedizin.

Als Positivkontrollen wurden sowohl ein bakterielles als auch ein virales Antigen verwendet. Einerseits wurde das Superantigen Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) des Bakteriums *Staphylococcus aureus* in der Konzentration von 1 µg/ ml genutzt. Andererseits fand das rekombinant hergestellte 65 kDa Phosphoprotein des Cytomegalievirus (CMV pp65, CMV) in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration

von 10 µl/ ml Anwendung. Beim Cytomegalievirus, dem humanen Herpesvirus 5 (HHV 5), handelt es sich ein umhülltes DNA-Virus, wobei das pp65-Protein ein virales Protein des Teguments darstellt^{61,62}.

Als Negativkontrolle (Neg) wurden 5 µl/ ml dialysiertes RPMI-Medium (VLE-Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Flüssigmedium mit stabilem Glutamin) mit Penicillin-Streptomycin (P/S) und Mercaptoethanol (ME) genutzt (s. 3.10.4).

3.10.3 Dialyse

Die käuflich erworbenen renalen Antigene KID, EPI, GLOM und TUB befanden sich in unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen und Pufferlösungen. Zur Angleichung wurden die Antigene steril mit den Dialyseeinheiten Slide-A-Lyzer[®] MINI Dialysis Units und dem Schaumstoff-Halter Slide-A-Lyzer[®] MINI Dialysis Float dialysiert.

Ein mit Ethanol (70 %) desinfizierter Glasbecher wurde mit PBS gespült und anschließend mit 500 ml PBS befüllt. Die Dialyseeinheiten wurden in dem Schaumstoff-Halter befestigt, mit 100 µl PBS gewaschen und jeweils mit 100 µl der verschiedenen Antigen-Lysate befüllt. Nachfolgend wurden die Dialyseeinheiten mit der Dialysemembran zweimal für 10 min in je 500 ml PBS des Glasbehälters getaucht.

Abschließend wurden die Lysate in sterile Eppendorfgefäße pipettiert, auf eine Konzentration von 2 mg/ ml durch Hinzugabe von RPMI-Medium (mit P/S und ME, s. 3.10.4) verdünnt und bei -20 °C eingefroren.

Um eine Kontamination bei der Dialyse auszuschließen, wurde ebenfalls das RPMI-P/S-ME-Medium dialysiert, bei -20 °C eingefroren und als Negativkontrolle (Neg) verwendet.

3.10.4 Antigenstimulation

Für die Antigenstimulation wurden 500 ml RPMI-Medium mit 5 ml P/S und 500 µl von 50 mmol/ l ME versetzt. Außerdem wurde das Medium mit humanem AB-Serum 1:10 verdünnt.

Das komplette Kulturmedium bestand schließlich aus RPMI-Medium (mit P/S, ME, humanem AB-Serum), dem direkt vor Antigenzugabe 1 µg/ ml antihumaner CD28-Antikörper zur Steigerung der T-Zell-Aktivierung hinzugefügt wurde. CD28 ist ein T-Zell-Corezeptor und bindet an den Oberflächenrezeptor B7 auf antigenpräsentierenden Zellen (APZ)⁶³. Die Aktivierung von CD28 ist neben der des spezifischen TCR notwendig für die T-Zell-Antwort⁶³.

Die PBMC wurden für die sterile Antigenstimulation nach der Zellzählung nochmals bei 1300 RPM für 8 min zentrifugiert und in dem Kulturmedium zu 0,5 Mio. Zellen je 100 µl resuspendiert. In die 96-Loch (engl. well) -Rundbodenplatte Cellstar® Cellculture Microplate wurden je Well 0,5 Mio. PBMC pipettiert. Bei einer genügenden Zellzahl von mind. 10,5 Mio PBMC (0,5 Mio. PBMC x 7 Stimulationskonditionen x 3 für Triplikate) wurden Triplikate je Antigen angesetzt, sonst nur Duplikate bzw. selten Unikate. Zu den Zellansätzen wurden die Antigen-Lysate und die Negativkontrolle (Neg) pipettiert. Anschließend wurde die Wellplatte für sechs Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, wobei für die letzten vier Stunden Brefeldin A in einer Konzentration von 20 µg/ ml hinzugegeben wurde. Brefeldin A führt über eine Deassemblierung des Golgiapparates zu einer Anhäufung von Produkten der Proteinbiosynthese im Zellinneren⁶⁴. Folglich können die eigentlich oberflächlichen CD-Moleküle auch intrazellulär mit höherer Sensitivität durchflusszytometrisch nachgewiesen werden⁶⁴.

3.10.5 Zellfixierung

Um die PBMC nach der Stimulation sowohl oberflächlich als auch intrazellulär anfärben zu können, wurden die Zellen fixiert. Nach Zentrifugation der Wellplatte bei 1300 RPM für 3 min und Verwerfung des Überstandes wurden die Zellen in 100 µl PBS/ BSA mit 0,05 % Natriumazid und 100 µl Fixierlösung mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) resuspendiert und für 15 min inkubiert. Die Zellfixierung beruht auf der durch PFA verursachten Quervernetzung von Peptidketten⁶⁵.

Nach einem Waschschrift mit PBS/ BSA/ Azid wurden die PBMC in 200 µl PBS/ BSA/ Azid resuspendiert und bis zur Färbung bei 4 °C dunkel für maximal drei Tage gelagert.

3.10.6 Zellfärbung

Für die durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Expression bzgl. der Aktivierungsmarker CD69, CD40L und IFN γ wurden die PBMC mit Fluorochrom gekoppelten Antikörpern (s. Tabelle 4) angefärbt.

Um neben einer oberflächlichen auch eine intrazelluläre Färbung der PBMC zu ermöglichen, wurde Saponin verwendet. Saponin ist eine oberflächenaktive, in der Zellmembran porenbildende Substanz aus der Rinde des Seifenrindenbaums (lat. *Quillaja saponaria* Molina)⁶⁶. Als Färbelösung wurde PBS/ BSA/ Azid mit 0,5 % Saponin verwendet. Der Färbelösung wurden Flebogamma 1:10 und die Fluorochrom gekoppelten Antikörper CD3, CD4, CD8, CD69, CD40L und IFN γ hinzupipettiert.

Vor der Färbung wurde die Well-Platte zentrifugiert (1300 RPM, 3 min) und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die PBMC in der mit Flebogamma und Antikörpern versetzten Färbelösung auf Eis resuspendiert und für 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS/ BSA/ Azid/ Saponin wurden die Zellen in 100 µl PBS/ BSA/ Azid aufgenommen und bis zur durchflusszytometrischen Messung lichtgeschützt bei 4 °C für maximal 12 Stunden aufbewahrt.

Bei einem Patienten und drei gesunden Kontrollpersonen fehlt die Färbung von IFN γ .

3.11 Depletionsversuch

3.11.1 Zielstellung

Ziel des Depletionsversuchs war die Steigerung der antigenspezifischen T-Zell-Antwort über eine vorherige Entfernung (Depletion) der CD25⁺ T_{reg}-Zellen. Die T_{reg}-Zellen wirken einer überschießenden Immunantwort durch Kontrolle der T-Zell-Aktivierung entgegen¹³. CD25 bindet Interleukin-2 (IL-2) und wird von CD4⁺ T_{reg}-Zellen, aber auch aktivierten T-, B-Zellen und Monozyten exprimiert¹³.

Um die Ergebnisse der Antigenstimulation mit und ohne CD25 Depletion vergleichen zu können, wurde ein Drittel der PBMC eines Patienten einschließlich der CD25⁺ T-Zellen der Stimulation zugeführt, wogegen die anderen zwei Drittel zunächst der CD25 Depletion unterzogen und erst danach stimuliert wurden.

3.11.2 Stimulationskonditionen

Aufgrund der höheren erforderlichen Zellzahl wurden im Depletionsversuch nur die Stimulationskonditionen KID, SEB und die Negativkontrolle (Neg) verwendet (s. Tabelle 6).

3.11.3 PBMC ohne CD25 Depletion

Wie im Stimulationsversuch erfolgten zunächst die Extrahierung und Zählung der PBMC. Von den Zellen wurde ein Drittel herunterzentrifugiert (1300 RPM, 8 min, 4 °C), in Kulturmedium (s. 3.10.4, ohne CD28) in einer Konzentration von 5 Mio. Zellen/ ml aufgenommen und bis zur Stimulation am folgenden Tag im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert.

3.11.4 PBMC mit CD25 Depletion

Die CD25 Depletion der übrigen zwei Drittel der PBMC erfolgte unter Verwendung der MACS® Technologie (Fa. Miltenyi Biotec). Dabei werden die CD25 Oberflächenmoleküle der zu depletierenden CD25⁺ T-Zellen mit magnetisch-aktiven antihumanen CD25 Antikörpern, CD25 MicroBeads II, markiert. In einem starken Magnetfeld, das durch die Matrix der Säule MACSQuant® Separation Column und den Magneten MidiMACS Separator aufgebaut wird, werden die CD25 markierten CD25⁺ T-Zellen zurückgehalten, während die CD25⁻ Zellen die Säule passieren⁶⁷.

Zur Markierung der CD25⁺ T-Zellen mit den CD25 MicroBeads II wurden maximal 10 Mio. PBMC zentrifugiert (1300 RPM, 8 min, 4 °C), in 85 µl PBS und 15 µl CD25 MicroBeads II resuspendiert und für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Markierung endete mit einem Waschschriff und der Aufnahme der Zellen in 1 ml PBS.

Vor der Depletion ist eine Kühlung der MACSQuant® Separation Column und des PBS unerlässlich. Die Eis gekühlte Säule wurde in dem MidiMACS Separator positioniert und mit 3 ml PBS gewaschen. Es folgte die Gewinnung der CD25⁻ Zellen, indem die in 1 ml PBS resuspendierten Zellen auf die Säule gegeben wurden und die Säule danach dreimal mit 3 ml PBS gespült wurde. Die CD25⁺ T-Zellen wurden mit einem Ventilkolben durch ein schnelles Hindurchstoßen von 5 ml PBS durch die Säule extrahiert.

Nach der Depletion wurden die CD25⁺ und CD25⁻ Zellen jeweils mit PBS gewaschen und in Kulturmedium (s. 3.10.4, ohne CD28) in einer Konzentration von 5 Mio. Zellen/ ml aufgenommen. Wie bei den PBMC ohne Depletion erfolgte bis zur Stimulation am folgenden Tag eine Lagerung im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂.

Um die erfolgreiche Depletion durchflusszytometrisch zu kontrollieren, wurden vor und nach der Depletion jeweils ca. 10 000 PBMC, CD25⁺ und CD25⁻ Zellen isoliert und mit CD4 und CD25 Antikörpern in PBS mit 10 % Flegogamma für 15 min bei 4 °C gefärbt.

Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden die gefärbten Zellen in PBS gewaschen und jeweils in 100 µl PBS resuspendiert. Mittels des Messgerätes MACSQuant® Analyzer erfolgte die Kontrolle der Depletion über die Messung des prozentualen Anteils der CD25⁺ Zellen. Da T_{reg}-Zellen CD4 und CD25 exprimieren, sollten sich unter den PBMC sowohl CD25⁺ als auch CD25⁻ Zellen, unter den CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen nur CD25⁺ Zellen und unter den CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen keine CD25⁺ Zellen finden. Durchschnittlich wurde bei den CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen eine Zellreinheit von 97,56 % (2,44 % CD4⁺ CD25⁺ Zellen) bzw. bei den Lymphozyten eine Reinheit von 99,54 % (0,46 % CD25⁺ Zellen) erreicht.

3.11.5 Antigenstimulation

Die Stimulation der PBMC ohne Depletion und der CD25⁻ Zellen erfolgte analog zum Stimulationsversuch über sechs Stunden jedoch nur mit KID, SEB und Neg. Wieder wurde für die letzten vier Stunden Brefeldin A in 20 µg/ ml hinzugegeben. Es folgten die Zellfixierung mit PFA sowie die oberflächliche und intrazelluläre Zellfärbung mit Saponin.

3.12 FACS-Analyse

Für die Messung der oberflächlichen und intrazellulären Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD40L und IFN γ auf T-Zellen wurde die FACS-Analyse mittels des MACSQuant[®] Analyzers (s. 3.8.1) genutzt. Dazu wurden aus jedem Well, das 100 µl enthielt, 90 µl entnommen. Die Ergebnisse wurden anschließend an den Arbeitscomputer zur Datenauswertung gesendet.

3.13 Datenauswertung des Stimulationsversuchs

3.13.1 FlowJo

Die FACS-Daten wurden mit dem Programm FlowJo 7.6.5 ausgewertet. Zu ermitteln war, wieviel Prozent der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen CD69, CD40L und IFN γ exprimieren. Beim Gaten (engl. gate - Tor, Schranke) der zweidimensionalen FACS-Bilder grenzt man bestimmte Zellen ein bzw. aus. Auf dem ersten FACS-Bild werden alle vom FACS-Gerät aufgenommenen PBMC dargestellt, wobei die Abszisse (X) dem FSC und die Ordinate (Y) dem SSC entspricht. Lymphozyten wurden über das Lymphozyten-Gate ausgewählt und entsprechend Monozyten ausgeschlossen. Die Eingrenzung war großzügig, um auch Dubletten, zusammenhängende Zellen, zu erfassen. Beim folgenden die Lymphozyten enthaltenden Bild wurden CD3⁺ Zellen eingegrenzt. Nachfolgend konnten auf dem dritten FACS-Bild einerseits CD4⁺ und andererseits CD8⁺ T-Zellen bestimmt werden. Auf dem vierten FACS-Bild wurden jeweils für beide T-Zell-Populationen die CD69⁺, CD40L⁺, IFN γ ⁺, CD69⁺ CD40L⁺, CD69⁺ IFN γ ⁺ und CD40L⁺ IFN γ ⁺ T-Zellen bestimmt. Für das letzte FACS-Bild wurden CD69⁺ T-Zellen eingestellt und CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺ CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen erfasst. Die Ergebnisse der insgesamt 14 Untergruppen (je sieben CD4⁺ und CD8⁺ Gruppen) wurden in das Programm Microsoft Excel übertragen. Einige FACS-Bilder wiesen ein relativ hohes Hintergrundsignal bzw. Zelltrümmer auf. Deshalb erfolgte einerseits bei allen Antigenen ein strenges Gating der Untergruppen, das durch die Negativkontrolle (Neg) bestimmt wurde. Die CD69⁺ CD40L^{+/} IFN γ ⁺ bzw. CD40L⁺ IFN γ ⁺ Zellen durften bei Neg maximal 0,05 % der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen

ausmachen und die entsprechenden Grenzwerte für CD69, CD40L und IFN γ wurden auf alle Antigene bzw. FACS-Bilder eines Blutspenders übertragen.

Andererseits wurden die trotz des strengen Gatings weiterhin betroffenen FACS-Bilder verblindet bewertet und entsprechend einbezogen oder ausgeschlossen. Dies begründete in einzelnen Fällen, dass eine Stimulationskondition (nicht die Kontrollen SEB oder Neg) eines Patienten nicht in die Auswertung involviert werden konnte.

3.13.2 Untergliederung der Patienten

Für die Auswertung wurde das Patientenkollektiv (Anzahl $n = 23$) in fünf Teilgruppen in Bezug zur renalen Beteiligung untergliedert.

Die erste Teilgruppe beinhaltete aktive LN-Patienten ($n = 3$, SLEDAI von mindestens 10 Punkten, renale Beteiligung). Als zweite Gruppe wurden nicht-aktive LN-Patienten ($n = 5$, SLEDAI unter 10 Punkten, renale Beteiligung) gewählt. Aktive und nicht-aktive LN-Patienten ($n = 8$, SLEDAI egal, renale Beteiligung) stellten die dritte Gruppe dar. Weiterhin bildeten SLE-Patienten ohne renale Beteiligung ($n = 15$) und SLE-Patienten ohne aktive renale Beteiligung ($n = 20$, SLEDAI egal und keine renale Beteiligung oder SLEDAI unter 10 Punkten und renale Beteiligung) je eine Teilgruppe.

3.13.3 Microsoft Excel - Bestimmung der Responder

Wie unter 3.10.4 erwähnt, wurden im Fall einer genügenden Ausgangszellzahl Triplikate oder zumindest Duplikate je Stimulationskondition angefertigt. Dies ermöglichte, mittels des Programms Microsoft Excel für jeden Patienten bzw. jede gesunde Kontrolle arithmetische Mittelwerte (MW) für alle erhobenen Prozentzahlen zu berechnen. Nachfolgend wurden sämtliche MW nach Stimulationskondition und CD4 $^+$ oder CD8 $^+$ T-Zell-Untergruppe geordnet in eine Excel-Tabelle der Patienten bzw. gesunden Kontrollen übertragen.

Das erste Ziel der Auswertung war die Bestimmung der Responder (lat. respondere - antworten). Es sollte beantwortet werden, wie viele der Patienten/ gesunden Kontrollen nach Antigenstimulation eine positive Antwort in Bezug zur Negativkontrolle (Neg) zeigen. Eine Antwort (ein MW der Prozentzahlen einer CD4 $^+$ oder CD8 $^+$ T-Zell-Untergruppe) wurde positiv gewertet, wenn sie den entsprechenden MW plus vier Standardabweichungen (engl. standard deviation, SD) der Negativkontrolle übertraf. In

dem Fall, dass der MW der Negativkontrolle 0,0 betrug, wurden alle über dem Grenzwert 0,0 liegenden Antworten positiv gewertet.

Trotz dessen, dass die Daten rechnerisch nicht parametrisch (nicht normalverteilt) waren, wurden für den Grenzwert einer positiven Antwort die parametrisch berechneten Werte MW und SD der Negativkontrolle gewählt. Dies begründet sich in der einerseits üblichen Festlegung des Grenzwertes durch MW und SD der Negativkontrolle und andererseits in der bei einer höheren Anzahl an Patienten bzw. gesunden Kontrollen zu erwartenden Normalverteilung der gemessenen Daten. Bei der weiteren Auswertung (s. 3.13.4) wurden konsequent nicht-parametrische Tests verwendet.

Die Bestimmung der Responder erfolgte für alle Patienten, die Patienten-Teilgruppen und die gesunden Kontrollen.

3.13.4 GraphPad Prism

Die weitere Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software GraphPad Prism 5.

Einbezogen wurden folgende vier CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zell-Untergruppen: CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ T-Zellen, CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺ T-Zellen, CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD40L⁺ T-Zellen und CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ IFN γ ⁺ T-Zellen.

Die Auswahl der statistischen Tests erfolgte in Absprache mit der Mathematikerin Frau Dr. Dörte Huscher des Forschungsbereichs Epidemiologie am DRFZ.

Zuerst wurde unter den Patienten, Patienten-Teilgruppen und gesunden Kontrollen untersucht, ob innerhalb einer T-Zell-Untergruppe signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Antigenen und der Negativkontrolle (Neg) bzgl. der Expression von CD69, CD40L und IFN γ bestehen. Dazu wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (engl. Wilcoxon signed-rank test, Wilcoxon-Test) für nicht-parametrische, gepaarte Daten genutzt. Ein signifikanter Unterschied liegt ab einem p-Wert (p) < 0,05 vor. Ein p < 0,05 ergibt eine Signifikanz auf 5 % -Niveau (*), p < 0,01 eine Signifikanz auf 1 % -Niveau (**) und p < 0,001 eine Signifikanz auf 0,1 % -Niveau (***).

Aufgrund des explorativen Charakters der Arbeit wurde auf eine Kontrolle für multiple Vergleiche verzichtet.

Die zu allen 23 SLE-Patienten bzw. acht LN-Patienten gehörigen KID-Daten der vier T-Zell-Untergruppen wurden auf Korrelation mit dem SLEDAI der einzelnen Patienten geprüft. Hierzu fand die Korrelation nach Spearman für nicht parametrische Daten Anwendung.

Alle KID-Daten der vier T-Zell-Untergruppen wurden mit dem Mann-Whitney Test für nicht parametrische, nicht gepaarte Daten auf signifikante Unterschiede zwischen den Patienten, fünf Patienten-Teilgruppen und gesunden Kontrollen untersucht. Verglichen wurden Patienten mit gesunden Kontrollen, LN-Patienten mit SLE-Patienten ohne renale Beteiligung, aktive LN-Patienten mit SLE-Patienten ohne aktive renale Beteiligung und aktive LN-Patienten mit nicht-aktiven LN-Patienten.

3.14 Datenauswertung des Depletionsversuchs

3.14.1 FlowJo

Analog zum Stimulationsversuch und unter Nutzung der gleichen Gating-Strategie erfolgte die Ermittlung, wieviel Prozent der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen CD69, CD40L und IFN γ exprimieren, mit Hilfe des Programms FlowJo 7.6.5 aus den vom MACSQuant[®] Analyser erhobenen Daten. FACS-Bilder mit hohem Hintergrundsignal wurden verblindet auf Ein- bzw. Ausschluss überprüft.

3.14.2 Microsoft Excel - Bestimmung der Responder

Auch im Depletionsversuch wurden, wenn möglich, Triplikate oder Duplikate je Stimulationskondition angefertigt. Nach Bildung der Prozentzahl-MW jeder CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-Untergruppe für jeden Patienten erfolgte die Übertragung in zwei Excel-Tabellen für Daten ohne bzw. mit CD25 Depletion. Die Responder ohne bzw. mit CD25 Depletion wurden in Bezug zur Negativkontrolle (Neg) bestimmt (s. 3.13.3).

3.14.3 GraphPad Prism

Zur Datenauswertung wurde wieder die Software GraphPad Prism 5 angewendet, wobei wieder die vier T-Zell-Untergruppen CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺, CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺, CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD40L⁺ und CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ IFN γ ⁺ T-Zellen einbezogen wurden.

Als Erstes wurden die Daten der SLE-Patienten ohne bzw. mit CD25 Depletion mit dem Wilcoxon-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Antigenen und der Negativkontrolle (Neg) bzgl. der Expression von CD69, CD40L und IFN γ geprüft.

Weiterhin wurden die KID-Daten mit CD25 Depletion und ohne CD25 Depletion mit dem Wilcoxon-Test verglichen.

Analysiert wurde ferner, ob eine Korrelation nach Spearman zwischen den individuellen SLEDAI-Werten und den Daten der T-Zell-Untergruppen nach KID-Stimulation ohne bzw. mit CD25 Depletion besteht.

3.15 Kombiniertes Stimulationsversuch

Zur Nutzung einer größeren Datenmenge wurden im kombinierten Stimulationsversuch die Daten der drei Konditionen KID, SEB und Neg des Depletionsversuchs ohne CD25 Depletion durch die Daten des Stimulationsversuchs ergänzt.

3.15.1 Patientencharakteristika

Kombiniert wurden die Daten der 10 Patienten des Depletionsversuchs (ohne CD25 Depletion) mit den Daten von 19 Patienten des Stimulationsversuchs, die nicht für beide Versuche Blut gespendet hatten. Die Patientencharakteristika der insgesamt 29 SLE-Patienten gibt Tabelle 7 wieder.

Kombinierter Stimulationsversuch: SLE-Patienten (n = 29)		
Geschlecht (Anzahl)	w	20
	m	3
Alter (Jahre)	Median	34 (18-73)
behandelnde Einrichtung (Anzahl)	Station	14
	Tagesklinik	15
Krankheitsaktivität (Punkte)	SLEDAI Median	4 (0-19)
Nierenbeteiligung (Anzahl)	aktiv	4
	nicht aktiv	10
keine Nierenbeteiligung (Anzahl)	aktiv	2
	nicht aktiv	13

Tabelle 7: SLE-Patienten des kombinierten Stimulationsversuchs

3.15.2 Microsoft Excel - Bestimmung der Responder

Die Bestimmung der Responder unter allen 29 SLE-Patienten sowie den 14 LN-Patienten erfolgte wie in 3.13.3 erläutert. Mittels des Exakten Fisher-Tests wurden die KID-Responderraten der 29 SLE-Patienten bzw. der 14 LN-Patienten mit denen der 12 gesunden Kontrollen des Stimulationsversuchs auf signifikante Unterschiede verglichen.

3.15.3 GraphPad Prism

Mittels GraphPad Prism 5 wurden die Prozentzahl-MW der bekannten vier CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zell-Untergruppen mit dem Wilcoxon-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Antigenen KID bzw. SEB und der Negativkontrolle bzgl. der Expression von CD69, CD40L und IFN γ getestet.

Ferner wurden die KID-Daten hinsichtlich der Korrelation nach Spearman mit den individuellen SLEDAI-Werten der Patienten untersucht.

Als weitere Variante wurden die Daten der 14 LN-Patienten auf signifikante Differenzen bzgl. der Expression von CD69, CD40L und IFN γ zwischen KID bzw. SEB und der Negativkontrolle überprüft.

Der Mann-Whitney Test wurde zur Ermittlung signifikanter Unterschiede der KID-Daten zwischen allen 29 SLE-Patienten bzw. den 14 LN-Patienten (des kombinierten Stimulationsversuchs) und 12 gesunden Kontrollen (des Stimulationsversuchs) sowie zwischen den 15 SLE-Patienten ohne renale Beteiligung und den 14 LN-Patienten (je des kombinierten Stimulationsversuchs) verwendet.

3.16 Verlauf von vier Patienten des Stimulations- und Depletionsversuchs

Vier SLE-Patienten (s. Tabelle 8) spendeten sowohl für den Stimulations- als auch für den Depletionsversuch Blut.

Stimulations- & Depletionsversuch: SLE-Patienten (n = 4)			
Geschlecht (Anzahl)	SV & DV	w	4
		m	0
Alter (Jahre)	SV	Median	29,5 (26-53)
	DV		30,5 (26-54)
behandelnde Einrichtung (Anzahl)	SV	Station	1
		Tagesklinik	3
	DV	Station	2
		Tagesklinik	2
Krankheitsaktivität (Punkte)	SV	SLEDAI Median	10 (0-26)
	DV		5 (0-16)
Nierenbeteiligung (Anzahl)	SV	aktiv	2
		nicht aktiv	2
	DV	aktiv	1
		nicht aktiv	3

*Tabelle 8: Im Stimulations- und Depletionsversuch involvierte SLE-Patienten
SV: Stimulationsversuch. DV: Depletionsversuch.*

Bei diesen vier Patienten wurden die KID-Daten der vier bekannten T-Zell-Untergruppen auf signifikante Unterschiede zu den verschiedenen Zeitpunkten der beiden Versuche mit dem Wilcoxon-Test untersucht. Die Frage war, ob eine Veränderung der Aktivierungsmarker-Expression vorliegt.

3.17 T Cell Library mit ³H-Thymidin-Inkorporationsassay

Ein weiterer Ansatz zum Nachweis einer antigenspezifischen antirenaln T-Zell-Reaktivität war eine T Cell Library in Verbindung mit einem ³H-Thymidin-Inkorporationsassay. Dieser Versuch erfolgte unter der Leitung und wesentlichen Mitarbeit des PhD-Studenten Dimas Abdirama aus der AG Riemekasten.

3.17.1 T Cell Library

Ziel der T Cell Library war die polyklonale Expansion von sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen über zwei Wochen.

Für diesen Versuch wurden mindestens 30 ml peripher-venöses Blut verwendet. Analog zum Stimulationsversuch fanden zuerst die Extrahierung und Zählung der PBMC statt. Um anschließend jeweils mindestens 200.000 CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie APZ zu

gewinnen, wurden eine CD4 und CD8 Depletion durchgeführt, wobei wie im Depletionsversuch die MACS[®] Technologie Einsatz fand.

Für die CD4 Depletion wurden die PBMC im Tube erst herunterzentrifugiert (1300 RPM, 8 min, 4 °C), in 80 µl PBS je 10⁷ PBMC und 20 µl CD4 MicroBeads je 10⁷ PBMC aufgenommen und anschließend für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Wiederaufnahme in 1 ml PBS. Die MACSQuant[®] Separation Column wurde mit 3 ml eisgekühltem PBS gespült. Zur Gewinnung der CD4⁻ Zellen wurden die PBMC-PBS-Lösung (1 ml) und dreimal 3 ml PBS auf die Säule gegeben. Die CD4⁻ Zellen befanden sich somit nach Fluss durch die Säule in 10 ml PBS. Die Extrahierung der CD4⁺ T-Zellen geschah nachfolgend durch zweimaliges Hindurchstoßen von 3 ml PBS durch die Säule mit einem Ventilkolben.

Bei der CD8 Depletion wurden die CD4⁻ Zellen zentrifugiert (1300 RPM, 8 min, 4 °C) und entsprechend der vorherigen Depletion in PBS und CD8 MicroBeads aufgenommen. Das weitere Protokoll entspricht dem der CD4 Depletion. Zuletzt wurde die Zellzahl aller drei Zellgruppen mit Hilfe des Zellzählers CASY bestimmt.

Die autologen APZ wurden erst später benötigt und deshalb in dreimal 1 ml Gefriermedium zu maximal 10⁸ APZ/ ml in einem CryoPure Gefäß bei -160 °C in dem Stickstoff-Cryokonservierer Biosafe[®] eingefroren. Das Gefriermedium bestand aus 50 % RPMI 1640 Medium mit GlutaMAX[™] (Dipeptid L-Alanin-L-Glutamin), 2,5 % 1 M Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure (HEPES) -Lösung, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), 0,05 µmol/ ml ME und 40 % humanem AB Serum. Für ein zellschonendes Einfrieren wurden die APZ mit dem Mr. Frosty[™] Einfrierbehälter bei -80 °C gleichmäßig um -10 °C/ Stunde heruntergekühlt.

Für die T Cell Library wurden je 2000 T-Zellen pro Well benötigt, somit für je eine 96-Well-Platte je 200.000 CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen. Beide T-Zell-Populationen wurden jeweils in 20 ml Expansionsmedium aufgenommen. 20 ml Expansionsmedium enthielten 19 ml Iscoves verändertes Dulbeccos Medium (engl. Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM) mit GlutaMAX[™] und 25 mM HEPES-Lösung, 1 ml humanes AB Serum, 200 µl P/S, 2 µl nicht-essentielle Aminosäuren, 20 µl Phytohämagglutinin (PHA, 1 mg/ ml, Zielkonzentration 1 µg/ ml), 60,5 µl IL-2 (Proleukin[®], 10 µg/ ml, Zielkonzentration 30 ng/ ml) und 5 Mio. nicht-autologe bestrahlte Fütter-Zellen. Fütter-Zellen sind PBMC von zwei bis vier gesunden Spendern, die bis zum Einsatz bei -160 °C im Stickstoff-Cryokonservierer Biosafe[®] eingefroren waren, und dienen über ihre Zytokinproduktion der gesunden polyklonalen T-Zell-Expansion. Die Bestrahlung der Fütter-Zellen mit γ-

Strahlung im Gammacell[®] 40 Exactor mit 35 Gy über 35 min fand statt, um sicherzustellen, dass nur T-Zellen und nicht Fütter-Zellen proliferieren. Das vorherige Auftauen der Fütter-Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C.

Nachdem die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in je 20 ml Expansionsmedium resuspendiert wurden, wurden sie jeweils auf eine 96-Well-Platte zu 200 µl/ Well pipettiert und für zwei Wochen bei 37 °C, 5 % CO₂ im Inkubator expandiert. Dabei wurden nach drei bis vier Tagen 120 µl des alten Expansionsmediums entfernt und durch 150 µl frischen Mediums ersetzt. Das frische Medium entspricht dem Expansionsmedium bis auf, dass nur 10 ng/ml IL-2 und keine weiteren Fütter-Zellen enthalten sind.

Nach der zweiwöchigen Expansion erfolgte die Aufteilung (das Splitten) der T-Zellen auf insgesamt sechs 96-Well-Platten je CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Dazu wurden die beiden Ausgangs-Platten zentrifugiert (1300 RPM, 3 min) und die T-Zellen in 200 µl Ruhe-Medium resuspendiert. Das Ruhe-Medium beinhaltet RPMI 1640 Medium mit GlutaMAX[™], 1 % P/S, 0,05 µmol/ml ME und 1 % humanem AB-Serum. Aus jedem Well der ursprünglichen 96-Well-Platte (z. B. Well A1) wurden je 30 µl in das gleiche Well (dem Beispiel entsprechend A1) der fünf neuen Platten pipettiert. Anschließend wurden zu allen Wells je 150 µl Ruhe-Medium hinzugegeben und die Platten wurden für weitere drei Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert.

3.17.2³H-Thymidin-Inkorporationsassay

Antigenspezifische T-Zellen proliferieren bei Präsentation des spezifischen Antigens durch APZ¹³. Im Rahmen der mitotischen Zellproliferation kommt es in der Replikationsphase des Zellzyklus zur DNA-Verdopplung⁶⁸. Bei Zugabe des radioaktiv-markierten Nukleosids ³H-Thymidin wird dieses in die DNA eingebaut. Somit ist die Menge des inkorporierten ³H-Thymidin bzw. der Grad der Radioaktivität proportional zur T-Zell-Proliferation⁶⁹. ³H-Thymidin setzt Energie als β-Strahlung frei⁷⁰. Diese Strahlungsenergie wird als Lichtimpulse durch einen Szintillationszähler in Impulsen pro Minute (engl. counts per minute, cpm) gemessen⁷¹.

In diesem Versuch wurde untersucht, ob es nach Präsentation der Antigene KID und SEB (s. Tabelle 6) durch APZ zu einer T-Zell-Proliferation kommt. Zur Kontrolle wurde die T-Zell-Proliferation nach Zugabe der Negativkontrolle (Neg, s. Tabelle 6) gemessen. Die Aufteilung der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen auf je sechs Platten erfolgte somit für KID, SEB, Neg und drei Reserve-Platten.

Die polyklonale Expansion der T-Zellen sollte - über eine gesteigerte Proliferationsantwort nach Antigenkontakt - die Wahrscheinlichkeit erhöhen, antigenspezifische T-Zellen zu erfassen.

Nachdem die CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zell-Platten für drei Tage geruht hatten, wurden sie zentrifugiert (1300 RPM, 3 min) und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die T-Zellen je einer CD4⁺/ CD8⁺-T-Zell-Platte in 100 µl einer Antigen-/ Neg-APZ-Medium-Lösung aufgenommen und für vier Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Das Medium entsprach dem Expansionsmedium ohne PHA, IL-2 und Fütter-Zellen. Je Antigen/ Neg wurden eine CD4⁺ und eine CD8⁺ T-Zell-Platte angesetzt. Die Antigenkonzentrationen entsprachen denen des Stimulationsversuchs (s. Tabelle 6).

Für die antigenspezifische Stimulation der T-Zellen wurden bestenfalls 1:100 autologe APZ benötigt, also mindestens eine APZ auf 100 T-Zellen. Die bei -160 °C eingefrorenen APZ wurden dazu im Wärmebad bei 37 °C aufgetaut. Unter optimalen Bedingungen expandiert eine T-Zelle innerhalb von zwei Wochen auf ca. 2000 Tochterzellen. Bei anfangs 2000 T-Zellen pro Well und Aufteilung der T-Zellen auf sechs Platten lagen nach der Expansion rechnerisch ca. 666.667 Zellen pro Well vor. Da mit etwas Zellverlust zu rechnen war, wurde von ca. 600.000 T-Zellen und benötigten 6000 APZ pro Well ausgegangen. Es wurden somit mindestens 600.000 APZ je Platte (100 Wells) der Antigen-/ Neg-Medium-Lösung hinzugefügt. Die Mindestmenge an APZ konnten wegen der begrenzten Ausgangsblutmenge nicht immer gewährleistet werden, sodass teilweise nur ein Verhältnis 1:200 erreicht wurde.

16 Stunden vor Ende der viertägigen Kultur der T-Zellen in der Antigen-/ Neg-APZ-Medium-Lösung wurde Methyl-³H-Thymidin in einer Konzentration von 0,01 mCi/ ml zu der Antigen-/ Neg-APZ-Medium-Lösung hinzugegeben. Dazu wurden 150 µl des Thymidins in 5 ml Medium (entsprach Expansionsmedium ohne PHA, IL-2, Fütter-Zellen) gegeben. Von dem mit Thymidin versetzten Medium wurden wiederum 50 µl jedem Well, das schon 100 µl beinhaltete, hinzugefügt.

Bevor die Messung der Radioaktivität an dem Messgerät MicroBeta² Plate Counter (Fa. PerkinElmer) möglich war, mussten die T-Zellen von dem Methyl-³H-Thymidin enthaltenden Medium gereinigt und auf die speziellen 96-Well-Messplatten UniFilter-96 GF/ B transferiert werden. Dies erfolgte mit dem Gerät MicroBeta FilterMate-96 Harvester (Fa. PerkinElmer, engl. to harvest - ernten). Der Harvester ist mit einem Vakuumpumpen-Motor und einem Leitungswasser-Tank verbunden. Durch die Vakuumpumpe wird Druckluft zum Absaugen der Platten generiert. Die Messplatten tragen auf jedem Well

einen Glasfaser (GF) -Filter mit einer Porengröße von 1 μm (Größe GF/ B), sodass die T-Zellen an dem Filter hängenbleiben, wogegen das Medium abgetrennt werden kann. Vor dem Waschen und Filtern der T-Zell-Platten wurde zunächst eine Messplatte ausschließlich zum Waschen des Geräts mit Leitungswasser genutzt. Der Harvester bietet dabei die Möglichkeit einerseits mit der Taste „Cold vacuum“ (kaltes Vakuum) das genutzte Wasser dem gewöhnlichen Abwasser und andererseits mit „Hot vacuum“ (heißes Vakuum) dem radioaktiven Müll zuzuführen.

Der T-Zell-Transfer verlief folgendermaßen: Eine neue Messplatte wurde dreimalig gewaschen und jeweils mit „Cold vacuum“ abgesaugt. Anschließend wurde die erste der T-Zell-Platten unter der Messplatte installiert und das Medium mit enthaltendem Methyl- ^3H -Thymidin mit „Hot vacuum“ durch die Filter der Messplatte abgesaugt, wodurch die T-Zellen auf die Messplatte gelangten. Danach wurde die Kultur-Platte insgesamt sechsmal mit Wasser gespült und entfernt. Zuletzt erfolgte ein Spülen mit Ethanol, sodass die Zellen starben und in ihrem bis dahin erreichten Proliferationszustand festgehalten wurden. Die erste Messplatte konnte nun entfernt werden und nach einem Waschschrift mit der Waschplatte wurden die T-Zellen der nächsten Platte auf eine weitere Messplatte transferiert.

Bei dem Zell-Transfer gelangten auch die APZ auf die Messplatten. Da diese Zellen allerdings nicht durch Zytokin-Zugabe zur Proliferation angeregt wurden, beeinflussen sie nicht die Messergebnisse.

Nach Transfer aller T-Zellen wurden die Messplatten im Hybridisierungssofen bei 56 °C für 20 min getrocknet. Im Anschluss wurden die Messplatten am Boden mit einer Folie abgeklebt und jedes Well wurde mit 40 μl Szintillationslösung beschichtet. Die Szintillationslösung dient der Umwandlung der Strahlungsquanten in messbare Lichtimpulse⁷¹. Zuletzt wurden die Messplatten auch von oben mit einer Folie abgeklebt und schließlich in einer Messkassette in dem Messgerät MicroBeta² Plate Counter installiert. Die Messung einer 96-Well-Platte dauerte ca. 20 min. Über die zugehörige Software MicroBeta² Workstation wurden die Messergebnisse an den Arbeitscomputer übertragen.

3.17.3 Microsoft Excel - Bestimmung der Responder

Zunächst erfolgte die Übertragung aller nach Patient bzw. Proband, Stimulationskondition und CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen geordneten Daten in Excel-Tabellen. Für jede Stimulationskondition wurden 96 Szintillationswerte aus der 96-Well-Platte erfasst.

Um die Anzahl der Responder, also der positiven Proliferationsantworten, je Antigen zu bestimmen, wurde wieder ein Grenzwert berechnet, der überschritten werden musste. Analog zu 3.13.3 errechnete sich dieser aus dem MW plus vier SD aller 96 Einzelwerte (96 Wells) der Negativkontrolle (Neg).

4 Ergebnisse

4.1 TCR β -Repertoire aktiver Lupusnephritis-Patienten

Über die Sequenzanalyse der TCR-V β - und TCR-J β -Gene von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen des peripheren Blutes und von T-Zellen des Urins fünf aktiver LN-Patienten wurden die 25 häufigsten T-Zell-Klone jeder Zellgruppe bestimmt. Im Urin zeigte sich eine Anreicherung oligoklonaler T-Zellen, die zum Teil auch im peripheren Blut sichtbar waren (s. Abbildung 1, A).

Beim anschließenden Vergleich der dominierenden T-Zell-Klone einer Zellgruppe, die sich unabhängig von ihrer Frequenz in einer weiteren Zellgruppe fanden, ergaben sich interindividuell nur zwei Übereinstimmungen. Es zeigten sich keine für alle SLE-Patienten identischen T-Zell-Klone (s. Abbildung 1, B).

Intraindividuell, also innerhalb eines LN-Patienten, stellten sich die meisten übereinstimmenden TCR β -Sequenzen zwischen den Urinzellen und CD8⁺ T-Zellen des peripheren Blutes dar. Ferner traten bei zwei Patienten auch kongruente TCR β -Rezeptoren zwischen T-Zellen des Urins und CD4⁺ T-Zellen des Blutes auf. T-Zell-Klone des Urins sind bei den LN-Patienten somit im peripheren Blut detektierbar (s. Abbildung 1, B).

Die Untersuchung der Diversität nach Alfréd Rényi der 25 häufigsten T-Zell-Klone je Zellgruppe und LN-Patient ergab unter den Urinzellen die niedrigste Diversität. Die T-Zell-Oligoklonalität war folglich im Urin-Zellkompartiment am stärksten ausgeprägt (s. Abbildung 1, C).

Die Abbildung 1 wurde modifiziert nach einer Vorlage von Herrn Dr. Mikalai Nienen und Herrn Dr. Ulrik Stervbo aus der AG Babel.

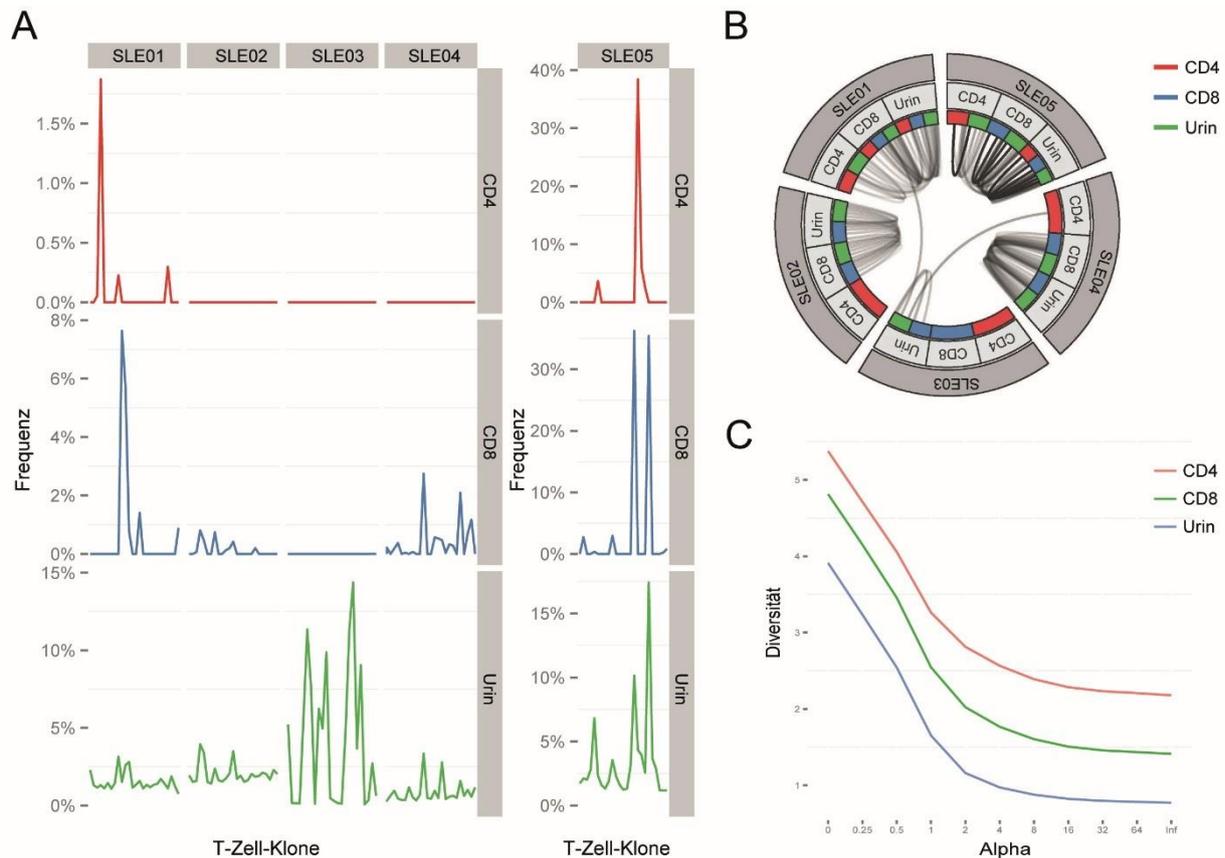


Abbildung 1: TCR β -Repertoire von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen des peripheren Blutes und von T-Zellen des Urins fünf aktiver LN-Patienten

(A) Frequenz der 25 häufigsten T-Zell-Klone je Zellgruppe von fünf aktiven LN-Patienten.
 (B) Vergleich der in einer Zellgruppe (grau/ mittlerer Keis) dominierenden T-Zell-Klone, die sich unabhängig von ihrer Frequenz in mindestens einer weiteren Zellgruppe (bunt/ innerer Kreis) fanden, mit den anderen Zellgruppen (bunt/ innerer Kreis) aller fünf Patienten. Jede Verbindungslinie zeigt eine von zwei Zellgruppen gemeinsam genutzte TCR β -Sequenz.
 (C) TCR β -Diversität der 25 häufigsten T-Zell-Klone der drei Zellgruppen aller fünf LN-Patienten dargestellt mittels des Graphen nach Alfréd Rényi.

Abbildung modifiziert nach einer Vorlage der AG Babel.

4.2 Ergebnisse des Stimulations- und Depletionsversuchs

Für die Auswertung des Stimulations- und Depletionsversuchs wurden die Daten der vier CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zell-Untergruppen CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ T-Zellen, CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺ T-Zellen, CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD40L⁺ T-Zellen und CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ IFN γ ⁺ T-Zellen analysiert.

4.2.1 T-Zell-Stimulation mit dem renalen Antigen KID

Im Stimulationsversuch wurden CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen des peripheren Blutes mit dem renalen Antigen KID (Kidney-Lysat), der Positivkontrolle SEB (Staphylokokken-Enterotoxin B) und der Negativkontrolle (Neg) stimuliert (s. Tabelle 6) und die induzierte Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD40L und IFN γ durchflusszytometrisch gemessen.

Abbildung 2 zeigt beispielhaft die nach Bearbeitung mit dem Programm FlowJo 7.6.5 (s. 3.13.1) entstandenen FACS-Bilder der CD3⁺ CD4⁺, CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ und CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen einer Patientin mit LN III/ V nach Stimulation mit SEB, Neg oder KID. Auf den Beispielbildern ist außerdem die Eingrenzung der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺, CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺, CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD40L⁺ und CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ IFN γ ⁺ T-Zellen dargestellt.

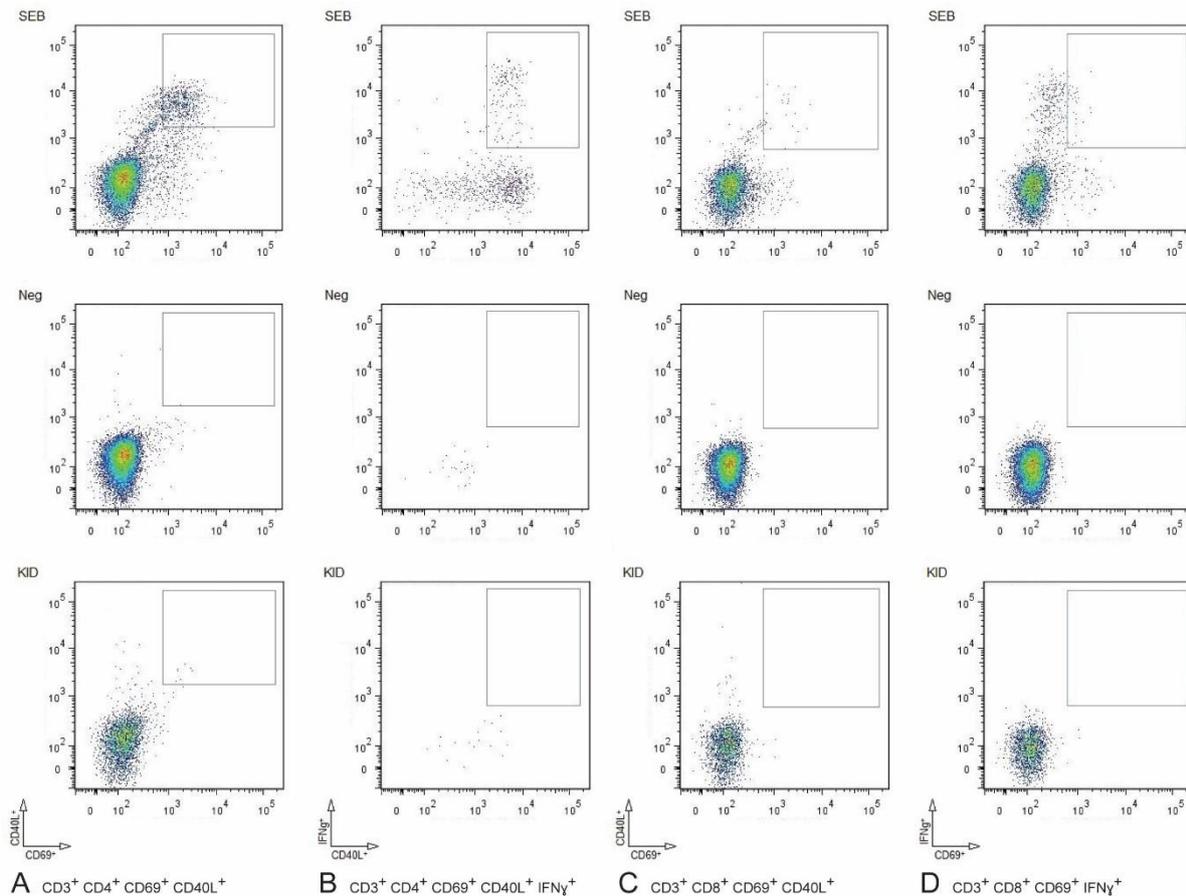


Abbildung 2: FACS-Bilder der T-Zellen nach Stimulation mit SEB, Neg oder KID (A) $CD3^+ CD4^+$, (B) $CD3^+ CD4^+ CD69^+$ und (C, D) $CD3^+ CD8^+$ T-Zellen. Eingegrenzt wurden die (A, C) $CD69^+ CD40L^+$, (B) $CD69^+ CD40L^+ IFN\gamma^+$ und (D) $CD69^+ IFN\gamma^+$ T-Zellen. T-Zellen einer Patientin mit Lupusnephritis III/ V. SEB: Staphylokokken-Enterotoxin B. Neg: Negativkontrolle. KID: Kidney-Lysat.

Durch Kombination des Stimulations- und Depletionsversuchs konnten im kombinierten Stimulationsversuch die Daten (ohne CD25 Depletion) von 29 SLE-Patienten, davon 14 mit Nierenbeteiligung, genutzt werden (s. Tabelle 7). In Abbildung 3 werden die Ergebnisse der Aktivierungsmarker-Expression von den vier T-Zell-Untergruppen bzgl. der Stimulationsbedingungen SEB, Neg und KID dargestellt. Genauer werden die prozentualen Anteile (Frequenzen) der (A) CD69, CD40L oder (B) CD69, CD40L, IFN γ exprimierenden $CD4^+$ T-Zellen sowie der (C) CD69, CD40L oder (D) CD69, IFN γ exprimierenden $CD8^+$ T-Zellen an allen $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen gezeigt. Außerdem sind die mittels des Wilcoxon-Tests berechneten signifikanten Expressionsunterschiede zwischen dem Antigen SEB bzw. KID und Neg markiert.

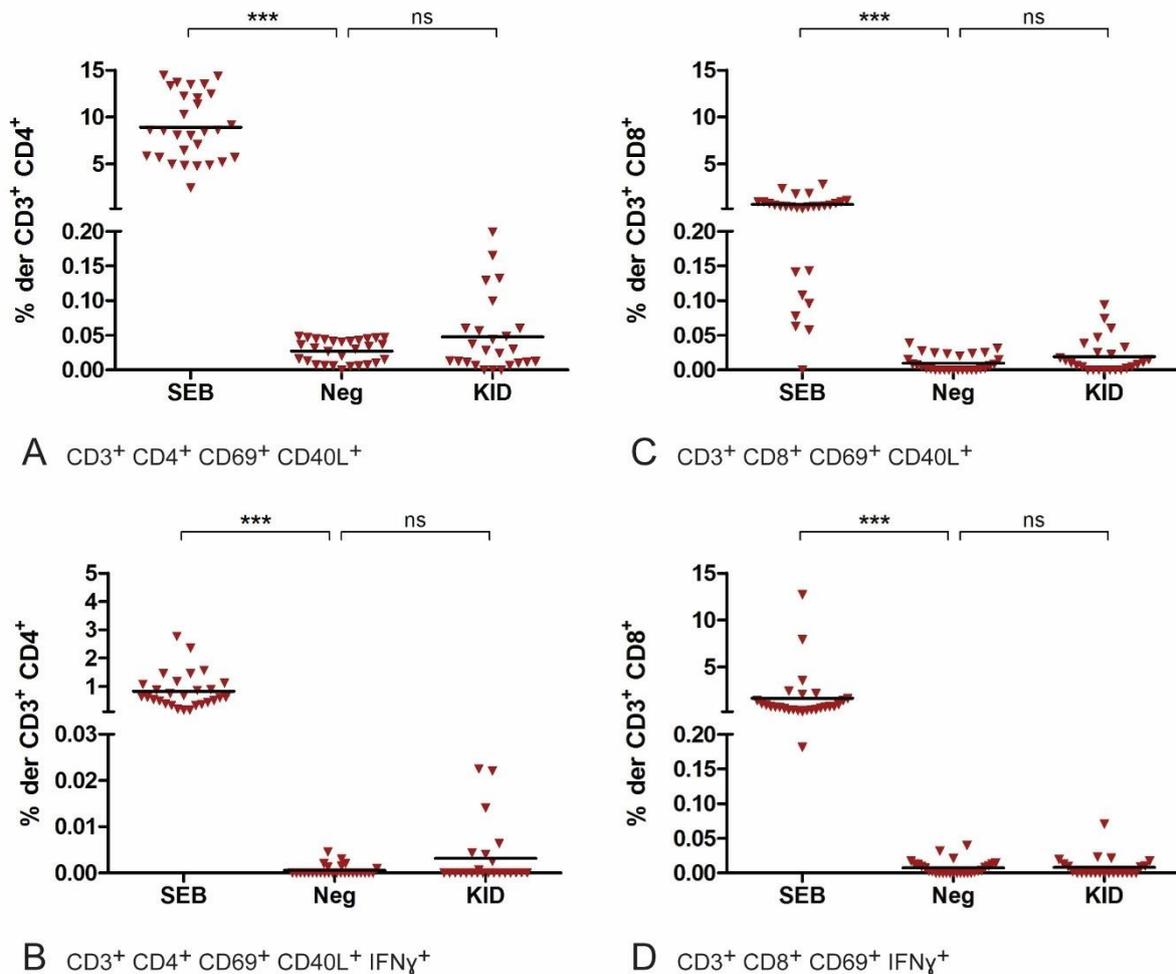


Abbildung 3: Frequenzen der CD69, CD40L und $IFN\gamma$ exprimierenden T-Zellen nach Stimulation mit SEB, Neg oder KID

(A, B) $CD3^+ CD4^+$ und (C, D) $CD3^+ CD8^+$ T-Zellen. Eingeschlossen sind alle 29 SLE-Patienten des kombinierten Stimulationsversuchs. Über den Wilcoxon-Test wurden signifikante Expressionsunterschiede zwischen SEB und Neg bzw. KID und Neg berechnet. SEB: Staphylokokken-Enterotoxin B. Neg: Negativkontrolle. KID: Kidney-Lysat. Querstriche: Median. ***: $p < 0,001$. ns: nicht signifikant.

Vergleich der Aktivierungsmarker-Expression von KID (Kidney-Lysat) und Neg

Sowohl alle 29 SLE-Patienten als auch nur die 14 LN-Patienten des kombinierten Stimulationsversuchs wiesen bei den vier T-Zell-Untergruppen keinen signifikanten Unterschied in der Aktivierungsmarker-Expression zwischen dem Nierenantigen KID und der Negativkontrolle (Neg) berechnet mit dem Wilcoxon-Test auf. Die Positivkontrolle SEB war dagegen immer hochsignifikant verschieden zu Neg (***, $p < 0,001$).

Bei ausschließlicher Betrachtung der 23 SLE-Patienten des Stimulationsversuchs zeigten sich kongruente Ergebnisse. Zwar wiesen alle 23 SLE-Patienten signifikante Unterschiede für KID gegen Neg in den beiden Untergruppen CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺ (*, $p = 0,0128$) und CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD40L⁺ (*, $p = 0,0294$) auf, aber in der größeren Kohorte von 29 SLE-Patienten des kombinierten Stimulationsversuchs konnten diese Daten nicht reproduziert werden. Ferner ergaben sich für die gesunden Kontrollen und die Patienten-Teilgruppen aktive LN-Patienten, nicht-aktive LN-Patienten oder aktive und nicht-aktive LN-Patienten keine signifikanten Ergebnisse.

Vergleich der KID-Daten zwischen den Versuchsgruppen

Die stärksten T-Zell-Antworten gegen KID (Kidney-Lysat) wurden vor der Datenauswertung bei den LN-Patienten vermutet. Der Vergleich der KID-Daten zwischen den Versuchsgruppen unter Nutzung des Mann-Whitney-Tests ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Gegenübergestellt wurden dabei einerseits alle 29 SLE-Patienten bzw. nur die 14 LN-Patienten (je des kombinierten Stimulationsversuchs) und 12 gesunden Kontrollen (des Stimulationsversuchs) und andererseits die 15 SLE-Patienten ohne renale Beteiligung und 14 LN-Patienten (je des kombinierten Stimulationsversuchs). Allein für den Stimulationsversuch ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den 23 SLE-Patienten und 12 gesunden Kontrollen sowie zwischen den Patienten-Teilgruppen.

Korrelation der KID-Daten mit dem SLEDAI

Die Korrelation nach Spearman der KID-Daten mit dem SLEDAI, der Krankheitsaktivität der Patienten, zeigte sich nicht signifikant.

Getestet wurden alle 29 SLE-Patienten des kombinierten Stimulationsversuchs und ferner nur die 23 SLE-Patienten oder acht LN-Patienten des Stimulationsversuchs.

Verlauf von vier im Stimulations- & Depletionsversuch involvierten Patienten

Bei den vier Patienten, die für den Stimulations- und Depletionsversuch Blut gespendet hatten, zeigten sich mit dem Wilcoxon-Test keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der KID-Daten zwischen den Zeitpunkten der beiden Versuche. Die

Krankheitsaktivität war dagegen bei allen vier Patienten deutlich regredient bzw. konstant und nahm bzgl. des SLEDAI-Medians von 10 auf 5 ab.

Responderraten gegen das renale Antigen KID (Kidney-Lysat)

Für die bisherige Datenauswertung wurden die T-Zell-Antworten gegen KID gruppenweise analysiert. Um T-Zell-Aktivierungen einzelner Individuen nicht zu übersehen, wurden in Bezug zu den Daten der Negativkontrolle (Neg) die Responderraten gegen KID bestimmt. Die Grenze für eine positive KID-Antwort war der Mittelwert plus vier Standardabweichungen von Neg.

Die maximale Anzahl n wurde durch das Ausschließen von FACS-Bildern mit hohem Hintergrundsignal (s. 3.13.1) und durch die fehlende IFN γ -Färbung bei einem Patienten und drei gesunden Kontrollen des Stimulationsversuchs teilweise nicht erreicht. Die Positivkontrolle SEB erreichte nahezu immer eine Responderrate von 100 % in allen T-Zell-Untergruppen.

Bei allen 29 SLE-Patienten des kombinierten Stimulationsversuchs antworteten 5/ 25 in der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ Untergruppe, 4/ 24 in der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺ Untergruppe, 3/ 25 in der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD40L⁺ Untergruppe und 1/ 24 in der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ IFN γ ⁺ Untergruppe positiv.

Die Responderraten der 14 LN-Patienten des kombinierten Stimulationsversuchs waren 3/ 13 in der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ Untergruppe und 1/ 13 in den Untergruppen CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺, CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD40L⁺ und CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ IFN γ ⁺.

Nur im Stimulationsversuch reagierten von den 23 SLE-Patienten 3/ 19 Patienten der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ Untergruppe, 6/ 18 der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺ Untergruppe, 2/ 19 der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD40L⁺ Untergruppe und 2/ 18 der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ IFN γ ⁺ Untergruppe positiv.

Für KID ergaben sich bei den 12 gesunden Kontrollen die Responderzahlen 1/ 12 in der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ Untergruppe, 1/ 9 in der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺ Untergruppe, 2/ 12 in der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD40L⁺ Untergruppe und 0/ 9 in der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ IFN γ ⁺ Untergruppe.

Alle aktiven und nicht-aktiven LN-Patienten ($n = 8$) zeigten Positivantworten von 1/ 7 in der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ Untergruppe, 3/ 7 in der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺ Untergruppe, 1/ 7 in der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD40L⁺ Untergruppe und 2/ 7 in der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ IFN γ ⁺ Untergruppe.

Abschließend demonstrierten die SLE-Patienten ohne renale Beteiligung ($n = 15$) Responderraten von 2/ 12 in der $CD3^+ CD4^+ CD69^+ CD40L^+$ Untergruppe, 3/ 11 in der $CD3^+ CD4^+ CD69^+ CD40L^+ IFN\gamma^+$ Untergruppe, 1/ 12 in der $CD3^+ CD8^+ CD69^+ CD40L^+$ Untergruppe und 0/ 11 in der $CD3^+ CD8^+ CD69^+ IFN\gamma^+$ Untergruppe.

Beim Vergleich der Responderzahlen aller 29 SLE-Patienten oder der 14 LN-Patienten des kombinierten Stimulationsversuchs mit denen der 12 gesunden Kontrollen des Stimulationsversuchs durch den Exakten Fisher-Test konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Abbildung 4 stellt die Responderraten der 29 SLE-Patienten und der 12 gesunden Kontrollen graphisch dar.

Zusammenfassend fanden sich bei den SLE-Patienten keine signifikant höheren Responderraten gegen KID als bei den gesunden Kontrollen.

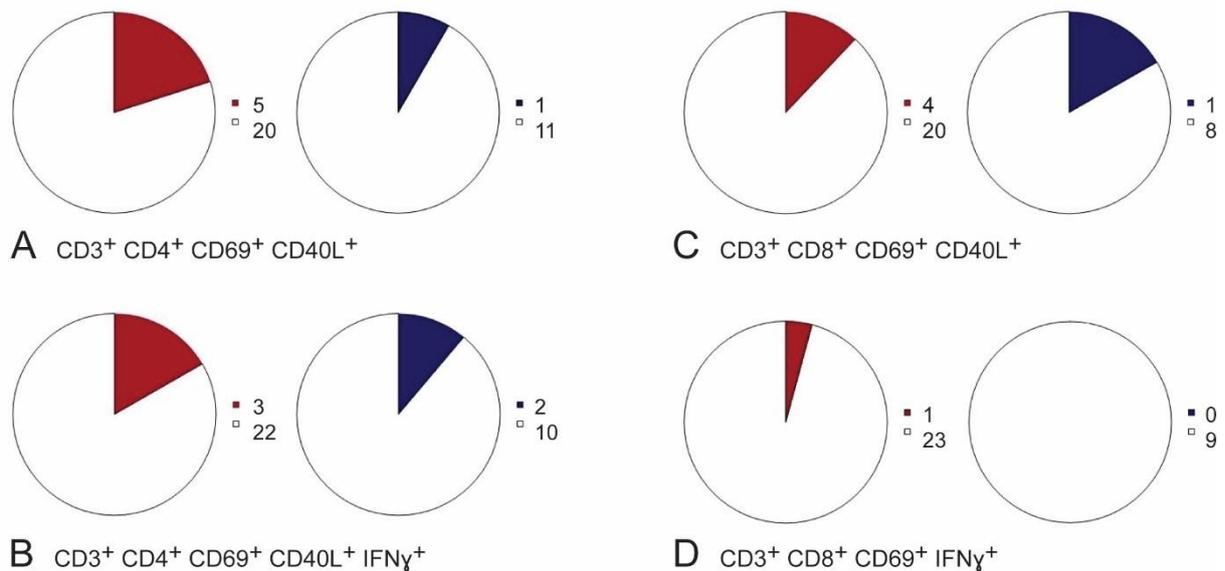


Abbildung 4: Responderraten gegen KID der SLE-Patienten und der gesunden Kontrollpersonen

(A, B) $CD3^+ CD4^+$ und (C, D) $CD3^+ CD8^+$ T-Zellen. SLE-Patienten (rot) und gesunde Kontrollpersonen (blau). Grenzwert der Responder berechnet aus dem Mittelwert plus vier Standardabweichungen der Negativkontrolle. KID: Kidney-Lysat.

4.2.2 T-Zell-Stimulation mit den renalen Antigenen EPI, GLOM, TUB

Neben dem Nierenantigen KID wurden im Stimulationsversuch auch die spezifischeren renalen Antigene EPI, GLOM und TUB zur T-Zell-Stimulation genutzt (s. Tabelle 6). Eine Antigen-spezifität der T-Zellen gegen differenzierte renale Strukturen wäre bei ausschließlicher Untersuchung des allgemeinen Nierenantigens KID sonst möglicherweise nicht detektiert worden.

Abbildung 5 zeigt für alle 23 SLE-Patienten die Aktivierungsmarker-Expression der vier T-Zell-Untergruppen bzgl. CMV (pp65-Protein des Cytomegalievirus, Positivkontrolle), Neg (Negativkontrolle) und den renalen Antigenen KID, EPI, GLOM und TUB.

Erneut werden die prozentualen Anteile (Frequenzen) der CD69, CD40L oder CD69, CD40L, IFN γ exprimierenden CD4⁺ T-Zellen sowie der CD69, CD40L oder CD69, IFN γ exprimierenden CD8⁺ T-Zellen an allen CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen abgebildet.

Ferner wurden signifikante Expressionsunterschiede zwischen den jeweiligen Antigenen und Neg mit dem Wilcoxon-Test berechnet und graphisch dargestellt. Zur besseren Übersicht wurde auf die sehr hohen Werte der weiteren Positivkontrolle SEB (Staphylokokken-Enterotoxin B) verzichtet.

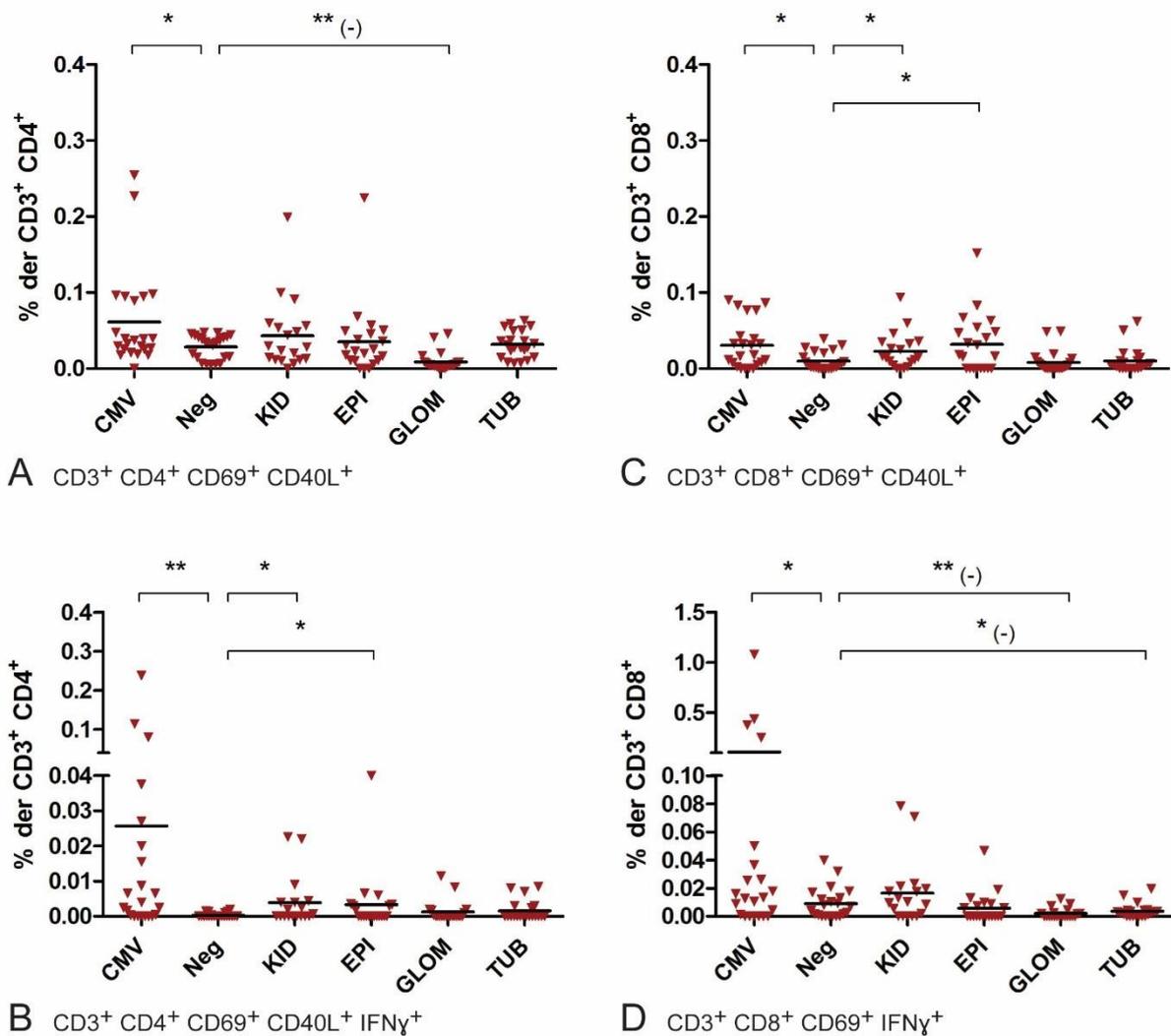


Abbildung 5: Frequenzen der CD69, CD40L und IFN γ exprimierenden T-Zellen nach Stimulation mit CMV, Neg, KID, EPI, GLOM oder TUB

(A, B) CD3⁺ CD4⁺ und (C, D) CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen. Eingeschlossen sind alle 23 SLE-Patienten des Stimulationsversuchs. Über den Wilcoxon-Test wurden signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Antigenen und der Negativkontrolle (Neg) berechnet. CMV: pp65-Protein des Cytomegalievirus. KID/ EPI/ GLOM/ TUB: renale Antigene (Nierenzell-Lysate). Querstriche: Median. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. * (-): signifikant geringer bzw. Signifikanz der Negativkontrolle.

Vergleich der Aktivierungsmarker-Expression von EPI/ GLOM/ TUB mit Neg

Die Aktivierungsmarker-Expression nach T-Zell-Stimulation mit EPI, GLOM oder TUB wurde mittels des Wilcoxon-Tests mit der Negativkontrolle (Neg) verglichen.

Bei Betrachtung aller 23 SLE-Patienten zeigte sich EPI signifikant überlegen in den beiden Untergruppen CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺ (*, p = 0,0365) und CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD40L⁺ (*, p = 0,0178). Für die Gruppen gesunde Kontrollen, aktive LN-Patienten, nicht-aktive LN-Patienten oder aktive und nicht-aktive LN-Patienten konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede zu Neg beobachtet werden.

Die T-Zell-Antwort auf Stimulation mit GLOM bzw. TUB fiel deutlich geringer aus.

Insbesondere GLOM wies keine signifikant stärkere, sondern z. T. sogar eine signifikant geringere T-Zell-Aktivierung im Vergleich zu Neg auf. Die GLOM-Daten waren unterlegen bei allen 23 SLE-Patienten in den Untergruppen CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ (**-, p = 0,0011) und CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ IFN γ ⁺ (**-, p = 0,002) sowie bei den 12 gesunden Kontrollen in der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ Untergruppe (**-, p = 0,0005).

Ebenso waren die TUB-Daten der SLE-Patienten signifikant geringer in der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ IFN γ ⁺ Untergruppe (*-, p = 0,0263). Bei den gesunden Kontrollen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für TUB.

In den drei Teilgruppen der LN-Patienten zeigten sich weder für GLOM noch für TUB signifikante Ergebnisse.

Responderraten gegen die renalen Antigene EPI, GLOM und TUB

Wie schon für KID wurden im Stimulationsversuch die Responderraten gegen EPI, GLOM und TUB für alle SLE-Patienten, die gesunden Kontrollen und die LN-Patienten bestimmt. Von diesen drei Nierenantigenen erreichte EPI die meisten Positivantworten.

Die Responderraten für EPI waren unter allen 23 SLE-Patienten 1/ 21 in der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ Untergruppe, 7/ 20 in der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺ Untergruppe, 4/ 21 in der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD40L⁺ Untergruppe und 0/ 20 in der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ IFN γ ⁺ Untergruppe. Dagegen antwortete unter den 12 gesunden Kontrollen maximal ein Individuum in den Untergruppen CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺ und CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD40L⁺ positiv.

Bei allen aktiven und nicht-aktiven LN-Patienten (n = 8) erreichte EPI Positivantworten von 1/ 7 in der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ Untergruppe, 2/ 7 in der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺ Untergruppe, 2/ 7 in der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD40L⁺ Untergruppe und 1/ 7 in der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ IFN γ ⁺ Untergruppe.

Gegen das Nierenantigen GLOM antworteten deutlich weniger Individuen positiv, sodass GLOM unter allen SLE-Patienten nur in der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺ Untergruppe die Responderrate 2/ 21 erreichte.

TUB erbrachte bei allen SLE-Patienten Responderzahlen von 0/ 22 in der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ Untergruppe, 5/ 21 in der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺ Untergruppe, 1/ 22 in der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD40L⁺ Untergruppe und 0/ 21 in der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ IFN γ ⁺ Untergruppe.

Bei den gesunden Kontrollen erzielten weder GLOM noch TUB positive Resultate.

4.2.3 T-Zell-Stimulation mit KID nach CD25 Depletion

Mittels der CD25 Depletion, also der Entfernung der T_{reg}-Zellen, wurde im Depletionsversuch beabsichtigt, die T-Zell-Aktivierung nach Stimulation mit KID (Kidney-Lysat) zu steigern. Die Detektion SmD1-spezifischer T-Zellen aus dem peripheren Blut von SLE-Patienten konnte mit der CD25 Depletion bereits signifikant gesteigert werden⁵².

Vergleich der Aktivierungsmarker-Expression von KID und Neg

Mit dem Wilcoxon-Test wurde die Aktivierungsmarker-Expression nach T-Zell-Stimulation ohne bzw. mit CD25 Depletion auf signifikante Differenzen zwischen den jeweiligen Antigenen und der Negativkontrolle (Neg) untersucht.

Die KID-Daten unterschieden sich sowohl ohne als auch mit CD25 Depletion nicht signifikant von Neg.

Dagegen war die Positivkontrolle SEB ohne und mit CD25 Depletion stets hochsignifikant verschieden zu Neg (**, $p < 0,01$).

Vergleich der KID-Daten ohne und mit CD25 Depletion

Beim Vergleich der KID-Daten ohne und mit CD25 Depletion durch den Wilcoxon-Test ergaben sich signifikante Unterschiede der Aktivierungsmarker-Expression für die Daten ohne CD25 Depletion bei den Untergruppen CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ (*, $p = 0,0273$) und CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD40L⁺ (*, $p = 0,0313$). Bei den T-Zell-Untergruppen CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺ und CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD40L⁺ zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Abbildung 6 veranschaulicht diese Ergebnisse. Analog zu Abbildung 3 und Abbildung 5 sind die prozentualen Anteile (Frequenzen) der Aktivierungsmarker exprimierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen an allen CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen dargestellt.

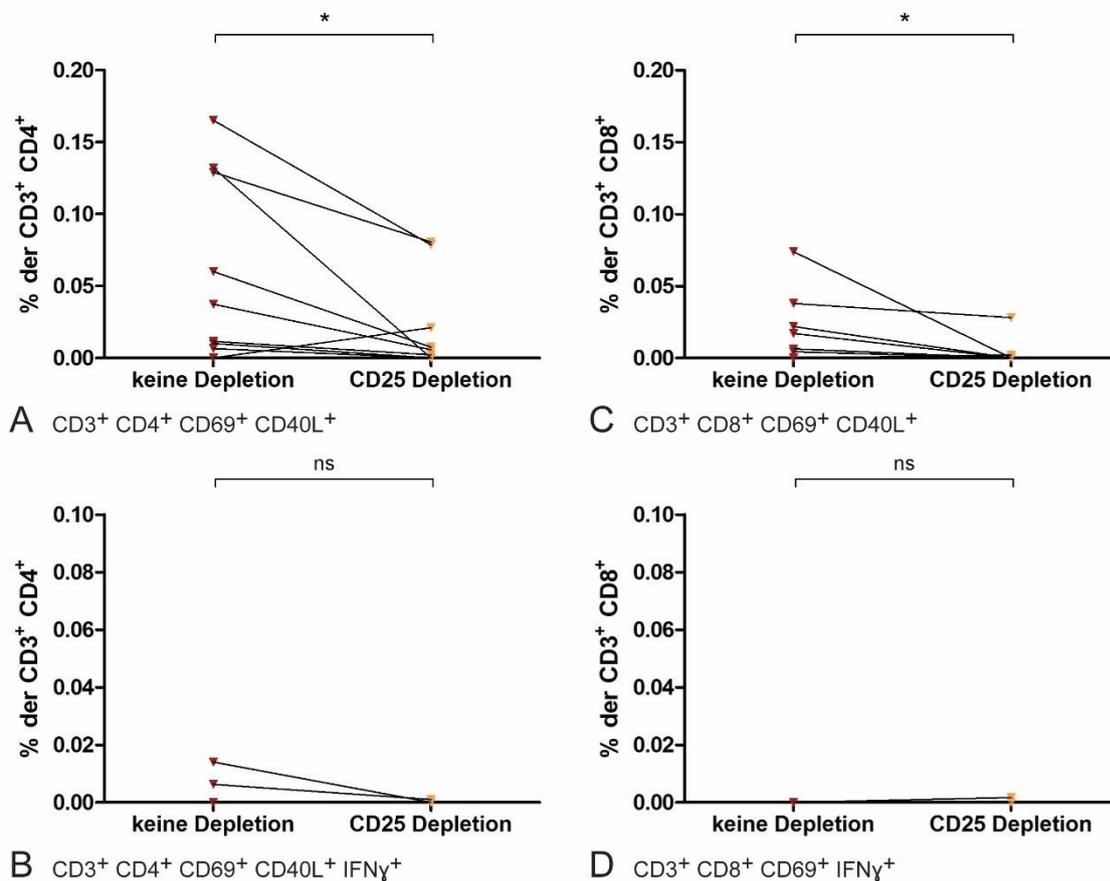


Abbildung 6: Vergleich der KID-Daten ohne und mit CD25 Depletion

(A, B) CD3⁺ CD4⁺ und (C, D) CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen. Frequenzen der CD69, CD40L und IFN γ exprimierenden T-Zellen der 10 LN-Patienten des Depletionsversuchs nach Stimulation mit KID (Kidney-Lysat). Angewandt wurde der Wilcoxon-Test. Linien: Verbindungen gleicher Patienten. *: $p < 0,05$. ns: nicht signifikant.

Korrelation der KID-Daten mit dem SLEDAI

Die Korrelation nach Spearman zwischen den KID-Daten ohne bzw. mit CD25 Depletion und den individuellen SLEDAI-Werten erbrachte keine signifikanten Ergebnisse.

Auch die KID-Daten ohne CD25 Depletion des kombinierten Stimulationsversuchs korrelierten nicht mit dem SLEDAI der 29 SLE-Patienten (s. 4.2.1).

In Abbildung 7 sind die Korrelationen der KID-Daten mit dem SLEDAI aller 29 SLE-Patienten ohne CD25 Depletion des kombinierten Stimulationsversuchs und der 10 LN-Patienten mit CD25 Depletion des Depletionsversuchs veranschaulicht. Wieder werden die Frequenzen der Aktivierungsmarker exprimierenden $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen bezogen auf alle $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen gezeigt.

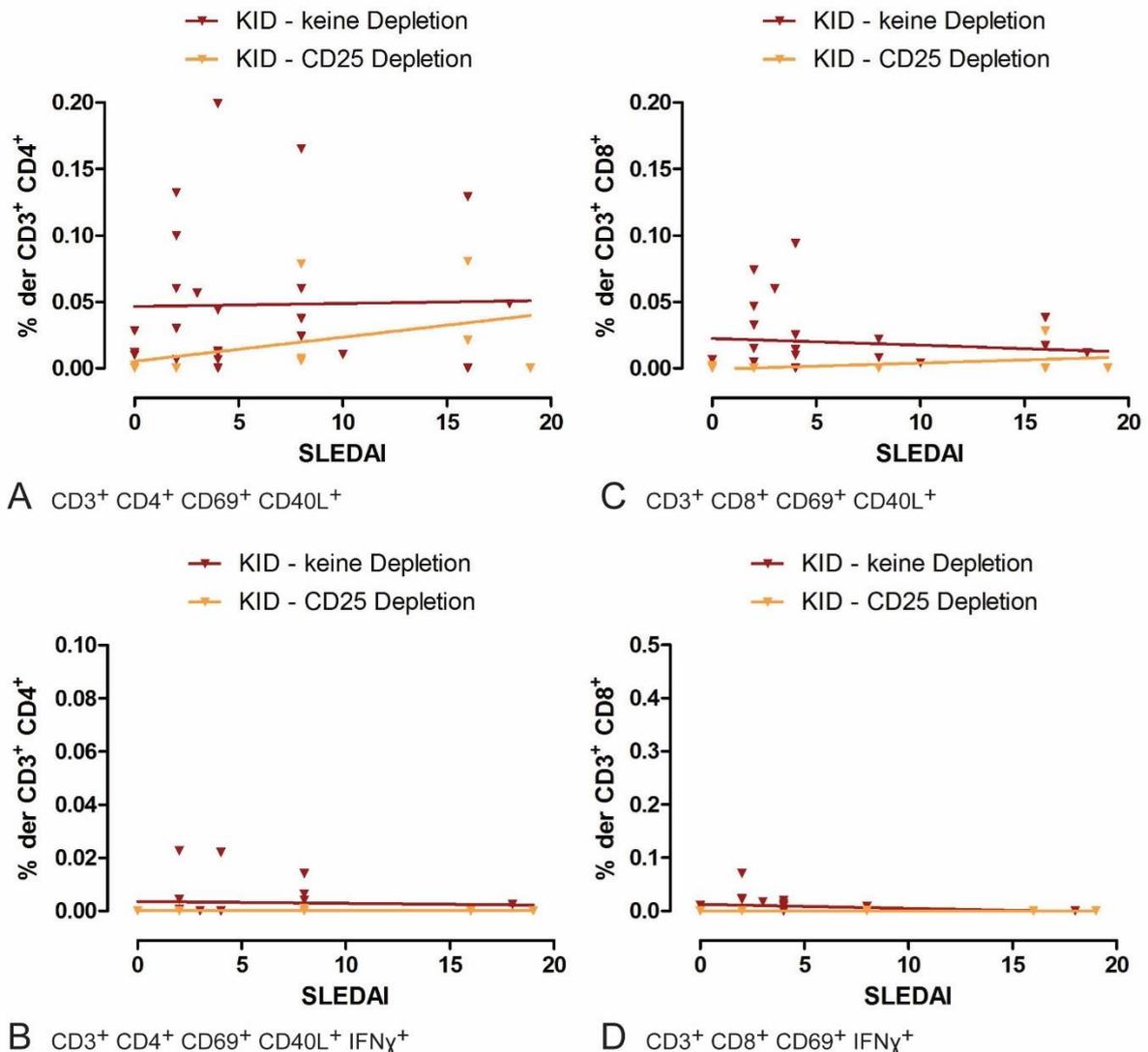


Abbildung 7: Korrelation nach Spearman der KID-Daten mit dem SLEDAI

(A, B) $CD3^+ CD4^+$ und (C, D) $CD3^+ CD8^+$ T-Zellen. KID-Daten aller 29 SLE-Patienten ohne CD25 Depletion des kombinierten Stimulationsversuchs (rot) und der 10 LN-Patienten mit CD25 Depletion des Depletionsversuchs (orange). Es zeigte sich keine signifikante Korrelation der KID-Daten mit dem SLEDAI. KID: Kidney-Lysat. SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index.

Responderraten gegen das renale Antigen KID (Kidney-Lysat)

Bei KID ergab die zusätzliche CD25 Depletion vor der Antigenstimulation keine höheren Responderraten. Ohne CD25 Depletion reagierten 3/ 10 LN-Patienten in der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ Untergruppe, 1/ 10 in der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ CD40L⁺ IFN γ ⁺ Untergruppe, ebenfalls 1/ 10 in der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD40L⁺ Untergruppe und 0/ 10 in der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ IFN γ ⁺ Untergruppe positiv. Dagegen zeigten sich keine (0/ 10) Responder gegen KID mit der CD25 Depletion.

Die Responderzahlen auf die Positivkontrolle SEB waren gleich (mindestens 9/ 10), egal ob ohne oder mit CD25 Depletion.

4.3 Ergebnisse der T Cell Library mit ³H-Thymidin-Inkorporationsassay

In der T Cell Library wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen des peripheren Blutes vor der Antigenstimulation polyklonal expandiert, um antigenreaktive T-Zellen mit höherer Sensitivität nachweisen zu können. Die Detektion der T-Zell-Aktivierung erfolgte im Anschluss durch Messung der Zellproliferation mittels eines ³H-Thymidin-Inkorporationsassays.

Der Grenzwert für die Responder, also die positiven Proliferationsantworten, berechnete sich wieder durch den Mittelwert plus vier Standardabweichungen der Negativkontrolle (Neg).

Die durchschnittliche Responderrate auf die Positivkontrolle SEB war unter den vier SLE-Patienten 74 % bei den CD4⁺ T-Zellen und 98 % bei den CD8⁺ T-Zellen sowie unter den fünf gesunden Kontrollen 89 % bei den CD4⁺ T-Zellen und 77 % bei den CD8⁺ T-Zellen. Bei den vier SLE-Patienten reagierten bis zu 2/ 96 CD4⁺ T-Zellen auf KID positiv. Allerdings fanden sich bei KID keine Responder unter den CD8⁺ T-Zellen.

Die fünf gesunden Kontrollen ergaben als maximale Responderraten bei KID 1/ 96 CD4⁺ T-Zellen und 2/ 96 CD8⁺ T-Zellen.

In der folgenden Abbildung 8 wird die ³H-Thymidin-Aufnahme der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen je Antigen exemplarisch von jeweils drei SLE-Patienten und gesunden Kontrollen dargestellt.

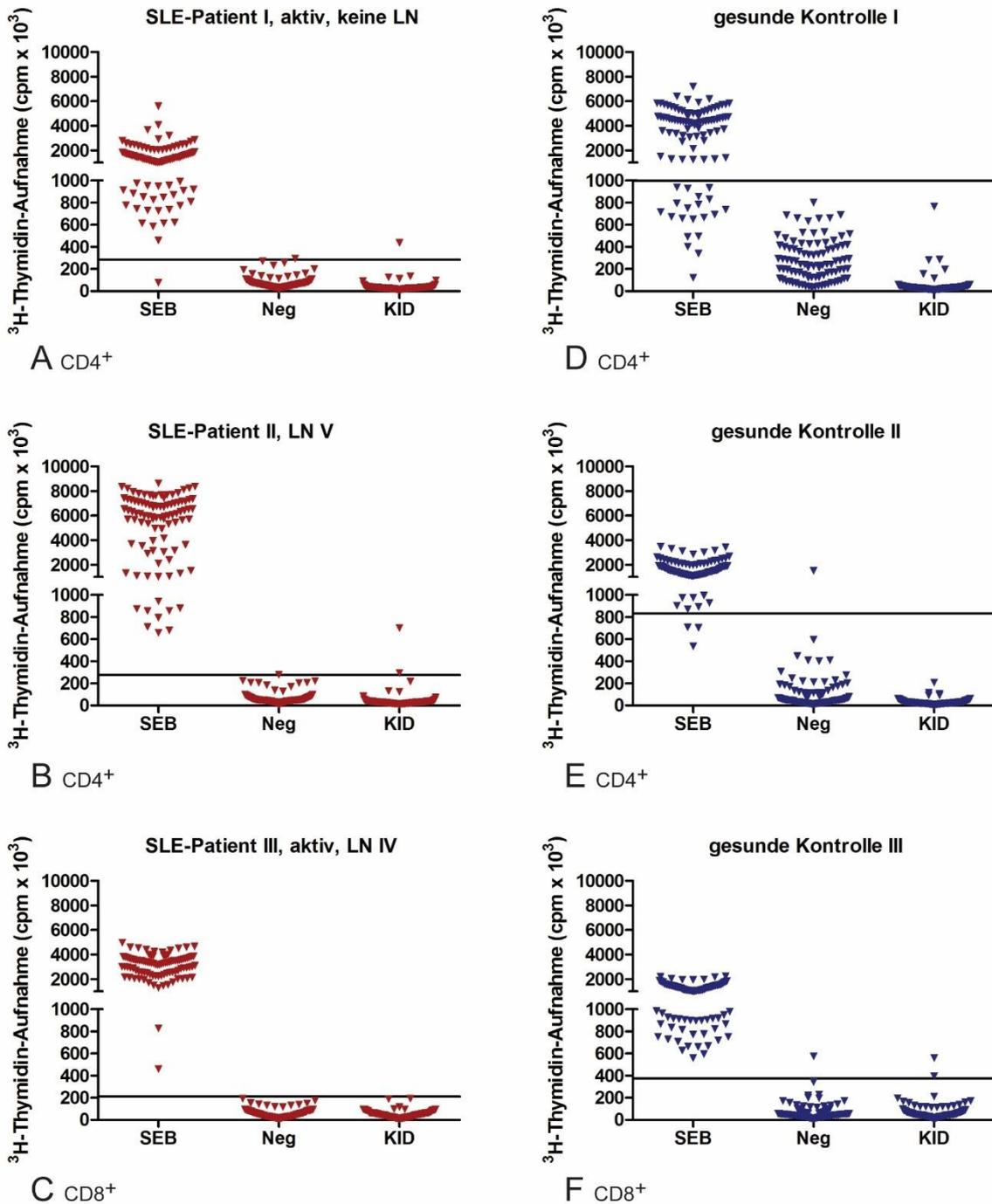


Abbildung 8: ^3H -Thymidin-Aufnahme nach Stimulation mit SEB, Neg oder KID von jeweils drei SLE-Patienten und gesunden Kontrollpersonen der T Cell Library (A, B, D, E) CD4⁺ und (C, F) CD8⁺ T-Zellen. Langer Querstrich: Grenzwert der Responder/ positiven Proliferationsantworten, berechnet aus dem Mittelwert plus vier Standardabweichungen der Negativkontrolle (Neg). SLE: systemischer Lupus erythematodes. LN: Lupusnephritis. SEB: Staphylokokken-Enterotoxin B. KID: Kidney-Lysat.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die TCR β -Analyse zum TCR β -Repertoire im peripheren Blut und Urin fünf aktiver LN-Patienten zeigte eine Anreicherung oligoklonaler T-Zellen im Urin, die intraindividuell teilweise auch im peripheren Blut, unter insbesondere den CD8⁺ T-Zellen, auftraten. Interindividuell fand sich dagegen keine für alle LN-Patienten übereinstimmende TCR β -Sequenz.

Im Stimulationsversuch mit den vier Nierenantigenen KID, EPI, GLOM und TUB erwies sich KID (Kidney-Lysat) als stärkstes aktivierendes T-Zell-Antigen. Bei Einschluss aller 29 SLE-Patienten durch Kombination der Daten des Stimulations- und Depletionsversuchs zeigte sich jedoch keine signifikant stärkere T-Zell-Antwort auf KID im Vergleich zur Negativkontrolle (Neg). T-Zellen von SLE-Patienten reagierten nicht signifikant stärker auf KID als T-Zellen von gesunden Kontrollpersonen. Ferner unterschieden sich die KID-Daten der LN-Patienten nicht signifikant von denen der SLE-Patienten ohne renale Beteiligung. Die T-Zell-Reaktivität auf KID korrelierte nicht mit der Krankheitsaktivität, gemessen mit dem SLEDAI. Entsprechend ergaben sich trotz des deutlich regredienten Krankheitsverlaufs von vier SLE-Patienten keine signifikanten Unterschiede der Aktivierungsmarker-Expression nach KID-Stimulation zu den verschiedenen Zeitpunkten des Stimulations- und Depletionsversuchs. Das renale Antigen GLOM zeigte mehrfach eine signifikant geringere T-Zell-Aktivierung als Neg. Im Depletionsversuch ergab die CD25 Depletion vor der Antigenstimulation keine stärkere T-Zell-Antwort auf KID.

Auch mit der alternativen Methode einer polyklonalen Expansion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mittels der T Cell Library in Kombination mit einem ³H-Thymidin-Inkorporationsassay konnte keine überzeugende T-Zell-Reaktivität gegen KID nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigte sich im Stimulationsversuch, im Depletionsversuch und in der T Cell Library keine überzeugende antirenale T-Zell-Antwort.

5 Diskussion

5.1 T-Zell-Oligoklonalität im Urin aktiver Lupusnephritis-Patienten

Das TCR β -Repertoire im peripheren Blut und Urin fünf aktiver LN-Patienten wurde in Kooperation mit der AG Babel analysiert.

Massengill et al. und Murata et al. zeigten bereits, dass LN-Patienten eine Anreicherung oligoklonaler T-Zellen im Nierengewebe aufweisen^{45,46}. Ein Vorkommen der oligoklonalen TCR β -Sequenzen des Nierengewebes im peripheren Blut konnte nicht beobachtet werden^{45,46}.

Durch die TCR β -Analyse von Urinzellen aktiver LN-Patienten wurde eine Anreicherung oligoklonaler T-Zellen auch im Urin demonstriert (s. Abbildung 1). Außerdem ließen sich TCR β -Sequenzen des Urins unter den vorzugsweise CD8⁺, aber auch den CD4⁺ T-Zellen des peripheren Blutes wiederfinden. Dies entspricht einer Publikation von Winchester et al., in der oligoklonale CD8⁺ T-Zellen aus Nierenbiopsie-Gewebe von LN-Patienten auch im peripheren Blut nachweisbar waren⁷². Über den Vergleich der Oberflächenrezeptoren von CD4⁺ T-Zellen in Nierenbiopsie-Gewebe und Urin von LN-Patienten bewiesen Enghard et al., dass sich CD4⁺ T-Zellen des entzündeten Nierengewebes im Urin wiederfinden⁷³. In ähnlicher Weise zeigten Dolff et al. bei aktiver LN eine Infiltration von CD8⁺ T-Zellen in das renale Gewebe und eine verminderte Anzahl von CD8⁺ Effektor-Gedächtnis-T-Zellen im peripheren Blut zugunsten einer Anreicherung dieses Zelltyps im Urin⁷⁴.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse erscheinen T-Zellen des Urins als Abbild der lokalen Entzündung im Nierengewebe von LN-Patienten. Ferner weist die Oligoklonalität der T-Zellen im Urin und im Nierengewebe auf eine antigenspezifische T-Zell-Reaktivität gegen Nierenstrukturen hin.

Die T-Zell-Stimulationsversuche in dieser Arbeit wurden wegen ihrer deutlich besseren Verfügbarkeit an T-Zellen des peripheren Blutes und nicht des Nierengewebes bzw. des Urins vorgenommen. Dies legitimiert sich durch die Tatsache, dass T-Zell-Klone des Nierengewebes bzw. Urins bei der LN auch im peripheren Blut auftreten.

5.2 Methodik des Stimulations-, Depletionsversuchs und der T Cell Library

5.2.1 Antigenstimulation

Die Arbeitsschritte der Antigenstimulation zum Nachweis antigenspezifischer antirenaher T-Zellen orientieren sich an einer von Frentsch et al. entwickelten Methode, mit der es ihnen gelang, antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen über die Expression von CD40L nach Kurzzeitstimulation über sechs Stunden nachzuweisen⁷⁵.

Wie schon unter 2.3.1 erwähnt, wird CD40L bei antigenspezifischer Aktivierung von vorwiegend CD4⁺, jedoch auch CD8⁺ T-Zellen induziert^{13,48}. Problematisch bei dem Nachweis einer CD40L-Expression ist die einsetzende Degradation dieses Zelloberflächenmoleküls nach Kontakt mit dem zugehörigen Rezeptor CD40 auf APZ⁷⁶. Um den Abbau von CD40L zu umgehen, nutzten Frentsch et al. Brefeldin A, das über eine Deassemblierung des Golgiapparates den intrazellulären Transport des Rezeptors zur Zelloberfläche verhindert^{64,75,77}. Infolgedessen werden CD40L und weitere Produkte der Proteinbiosynthese intrazellulär stabilisiert^{64,75}. CD40L kann auch extrazellulär durch Zugabe eines monoklonalen Antikörpers gegen CD40L stabilisiert werden⁷⁵. Allerdings können durch die intrazelluläre Detektion der CD40L-Induktion verglichen mit der extrazellulären Analyse bis zu 30 % mehr der antigenspezifischen T-Helfer (T_H)-Zellen gemessen werden^{75,78}.

Die Antigenpezifität der CD40L-Expression durch T-Zellen bewiesen Frentsch et al. unter anderem durch eine Stimulation von T_H-Zellen mit SEB⁷⁵. CD40L wurde nahezu ausschließlich durch T_H-Zellen induziert, die SEB-spezifische TCR_β-Ketten exprimierten⁷⁵. Dagegen war der unspezifische, aber frühe T-Zell-Aktivierungsmarker CD69 schon nach sechs Stunden SEB-Stimulation auf über 10 % der SEB-unspezifischen T_H-Zellen nachweisbar⁷⁵.

Die CD40L-Spezifität wird zudem durch die - verglichen mit anderen Aktivierungsmarkern wie z. B. CD137 - schnelle Induktion im Verlauf der T-Zell-Antwort gesteigert⁷⁸. Somit kann durch eine nur kurze Stimulationszeit die falsch-positive Detektion einer unspezifischen T-Zell-Aktivierung umgangen werden⁷⁸.

Neben der hohen Spezifität ist die CD40L-Analyse zum Nachweis antigenspezifischer T-Zellen auch äußerst sensitiv⁷⁵. Nach Injektion von OVA-spezifischen transgenen T_H-Zellen in ein Mausmodell, anschließender Immunisation und Restimulation mit OVA exprimierten nahezu alle der OVA-spezifischen T_H-Zellen CD40L, wohingegen die unspezifischen T-Zellen kein CD40L induzierten⁷⁵.

Meier et al. testeten den Einfluss verschiedener experimenteller Bedingungen auf die Antigenstimulation von CD4⁺ T-Zellen⁷⁸. Während der Methodenetablierung durch Frentsch et al. wurde Vollblut anstelle der isolierten PBMC verwendet⁷⁵. Die höchste Frequenz antigenspezifischer T-Zellen konnte jedoch mittels der Stimulation von PBMC erreicht werden⁷⁸. Ebenso im Hinblick auf immunsupprimierende Medikamente im Vollblut der meisten SLE-Patienten und eine bessere Standardisierung der Ausgangszellzahl je Stimulationskondition sollten PBMC präferiert werden⁷⁸.

Nach der Entscheidung für PBMC als Zellpopulation wurden unterschiedliche Zelldichten von 1×10^5 bis 2×10^7 PBMC/ ml ausprobiert⁷⁸. Die Erhöhung der Zelldichte erbrachte ab einer Dichte von 5 Mio. Zellen/ ml keine weitere Steigerung der Frequenz antigenspezifischer Zellen und das Ausmaß der unspezifischen T-Zell-Aktivierung blieb bis zu diesem Grenzwert konstant⁷⁸. Entsprechend wurde in dieser Arbeit je Stimulationskondition/ Antigen die Zelldichte von 0,5 Mio. Zellen/ 100 μ l (= 5 Mio. Zellen/ ml) genutzt. Kritisch muss angemerkt werden, dass antigenspezifische T-Zellen mit sehr niedriger Frequenz und deren passende APZ möglicherweise erst in einer größeren Zellpopulation (z. B. 5 Mio. versus 0,5 Mio. PBMC) vorhanden sind. Meier et al. schlagen deshalb eine Mindestzellzahl von 1 Mio. PBMC je Antigen vor⁷⁸. Die in den vorliegenden Versuchen zur Verfügung stehende Zellzahl an PBMC war jedoch durch die begrenzten Blutprobenmengen der meist anämischen SLE-Patienten limitiert⁷⁹.

Neben der Zellpopulation wurde auch die Dauer der Antigenstimulation variiert⁷⁸. Verglichen mit der Kurzzeitstimulation über sechs Stunden konnte durch eine längere Stimulation über 16 Stunden keine höhere Frequenz antigenspezifischer T-Zellen erreicht werden⁷⁸. Eine Kurzzeitstimulation genügt somit für eine suffiziente Antigenprozessierung und -präsentation⁷⁸. Eine längere Stimulationsdauer führte nur zu einer Steigerung der unspezifischen T-Zell-Aktivierung⁷⁸. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Frentsch et al., die eine unspezifische T-Zell-Antwort erst nach 12 Stunden beobachteten⁷⁵. Insbesondere beim Versuch niedrigfrequente antigenspezifische T-Zellen aufzuspüren, sollte entsprechend eine kurze Stimulationsdauer gewählt werden, um die Detektion einer unspezifischen Hintergrundaktivierung zu minimieren⁷⁸.

Trotz der kurzen Stimulationsdauer über sechs Stunden im Stimulations- und Depletionsversuch kam es bei der Negativkontrolle, die lediglich dialysiertes Kulturmedium enthielt, zu einem relativ hohen Hintergrundsignal. Um dieses falsch-positive Signal zu umgehen, wurden die Messungen der Aktivierungsmarker-

Expressionen erstens streng gegattet und zweitens verblindet beurteilt (s. 3.13.1). Weiterhin wurden die Aktivierungsmarker (CD69, CD40L, IFN γ) kombiniert, sodass in die endgültige Auswertung nur doppelt- oder sogar dreifach-positive T-Zell-Antworten einbezogen wurden. Ursächlich für den hohen Hintergrund könnten eine unspezifische T-Zell-Aktivierung, trotz der Dialyse (s. 3.10.3) in den Antigenen befindliche Lösungsrückstände oder eine Kontamination der Antigene bei der Dialyse sein. Die Dialyse wurde zwar steril durchgeführt, aber die Dialyse-Materialien waren nur keimarm erhältlich.

Bei den Nierenantigenen muss ebenfalls bedacht werden, dass sie von verschiedenen fremden Spendern stammen und somit eine alloantigene T-Zell-Reaktion wie bei einer Transplantatabstoßung hervorrufen können⁸⁰. Ferner könnten die renalen Antigenlysate durch z. B. intrazelluläre Bakterien kontaminiert sein, da sie aus primären Zellen, also direkt aus menschlichem Gewebe, gewonnen wurden⁸¹. Tumorzelllinien hätten diesbezüglich den Vorteil, unter sterilen Bedingungen im Labor gezüchtet zu sein, sind aber dafür artifiziell modifiziert und immortalisiert, sodass sie die Ergebnisse der T-Zell-Stimulation verfälschen könnten⁸².

Als übliche Negativkontrolle wurde dialysiertes Kulturmedium zur Bewertung des basalen Stimulationshintergrundes verwendet^{75,78,83}.

Eine der beiden Positivkontrollen war das schon bei Frensch et al. verwendete Superantigen SEB⁷⁵. Entgegen normalen Antigenen werden Superantigene nicht durch APZ prozessiert, sondern verknüpfen direkt die Rezeptoren MHC II auf APZ und TCR β auf T-Zellen^{84,85}. Entsprechend kommt es zu einer um ein Vielfaches stärkeren T-Zell-Aktivierung verglichen mit konventionellen Antigenen⁸⁶. Als zu den Nierenantigenen gleichartigere Positivkontrolle wurde deshalb zusätzlich CMV pp65, das T-Zell-Zielantigen gegen das Cytomegalievirus, verwendet^{87,88}. Bedacht werden muss bei CMV allerdings, dass in Deutschland nur ca. 46 % der Bevölkerung seropositiv für das Cytomegalievirus sind und somit nicht bei allen SLE-Patienten bzw. gesunden Kontrollpersonen eine T-Zell-Antwort zu erwarten ist⁸⁹.

Die Antigenkonzentration der Nierenantigene betrug 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wie schon bei Frensch et al. beschrieben⁷⁵. Fraglich ist durch eine höhere Konzentration eine stärkere T-Zell-Aktivierung zu erreichen. Zu beachten ist auch, dass die renalen Antigene jeweils viele verschiedene Peptide enthalten. Entsprechend niedrig ist die Konzentration des singulären renalen Peptids. In Hinblick auf die Finanzierbarkeit der vorliegenden Versuche war eine höhere Dosierung der Antigene jedoch nicht möglich. Ferner gelang

Meier et al. die T-Zell-Stimulation auch mit einem Peptidgemisch einer Konzentration von nur 1 µg/ ml⁷⁸. Darüberhinaus zeigten Kiecker et al., dass eine maximale T-Zell-Antwort schon bei Peptidkonzentrationen ab ca. 100 ng/ ml erreicht wird⁹⁰. Bei einer vorhandenen T-Zell-Antwort sollte die gewählte Konzentration der Nierenantigene somit genügen. Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen erkennen ihr entsprechendes Antigen nach dessen Prozessierung und MHC II-Präsentation durch APZ¹³. Dagegen werden CD8⁺ T-Zellen klassischerweise durch MHC I-Präsentation von intrazellulären, also endogenen, Peptiden infizierter oder anders veränderter Zellen aktiviert¹³. Es stellt sich somit die Frage, wie exogene Antigene während der Antigenstimulation über APZ nicht nur an CD4⁺, sondern auch an CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden. Bekannt ist aber, dass APZ, genauer dendritische Zellen, exogene Peptide im Rahmen der Kreuzpräsentation prozessieren und über MHC I an CD8⁺ T-Zellen präsentieren können^{91–93}. Zudem wurde die erfolgreiche Antigenstimulation von CD8⁺ T-Zellen anhand ihrer beispielsweise CD40L oder IFN γ Expression bereits durch andere Arbeitsgruppen beschrieben^{48,90}.

5.2.2 CD25 Depletion

Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) spielen eine noch nicht vollständig geklärte Rolle in der Pathogenese des SLE⁹⁴. Als Untergruppe der CD4⁺ T-Zellen sollen T_{reg} durch Suppression autoreaktiver Lymphozyten die Selbsttoleranz erhalten⁹⁴. Beim SLE als Autoimmunkrankheit ist diese körpereigene Toleranz jedoch gestört⁹⁴.

Die Daten hinsichtlich Zellzahl und Funktion der T_{reg} sind konträr⁹⁴. Einerseits wird über eine verminderte Anzahl und Funktionalität, andererseits über normale T_{reg}, aber eine Resistenz der Effektor-T-Zellen berichtet^{95–97}. Darüberhinaus wiesen Alexander et al. sogar auf eine Gruppe funktionsfähiger T_{reg} hin, die korrelierend mit der Krankheitsaktivität quantitativ gesteigert war⁹⁸. Ferner konnte gezeigt werden, dass der Transfer von T_{reg} in ein SLE-Mausmodell den Krankheitsverlauf verlangsamt und die Überlebenszeit verlängert⁹⁹.

Entsprechend ist es möglich, dass T_{reg} in den vorliegenden Antigenstimulationen die T-Zell-Antwort unterdrücken. Deswegen sollte über eine vorherige Depletion der CD25⁺ T_{reg} die T-Zell-Reaktivität demaskiert werden. Engler et al. stimulierten CD4⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut von SLE-Patienten und gesunden Kontrollpersonen mit dem Lupusantigen SmD1₍₈₃₋₁₁₉₎⁵². Durch die CD25 Depletion gelang ihnen bei Blutproben von SLE-Patienten die signifikante Steigerung der Detektion SmD1-spezifischer T-Zellen⁵².

Außerdem korrelierten die SmD1-spezifischen T-Zellen nach der CD25 Depletion mit der Krankheitsaktivität⁵².

Die CD25 Depletion birgt den Nachteil, dass auch aktivierte Effektor-T-Zellen CD25 exprimieren, die vorzeitig entfernt zu falsch-negativen Stimulationsergebnissen führen können⁵². Außerdem existieren auch CD25⁻ T_{reg}-Populationen⁹⁹. FoxP3 ist ein weiterer Zellmarker für T_{reg}^{52,94}. Allerdings ist FoxP3 ebenfalls in aktivierten T-Zellen nachweisbar¹⁰⁰. Ferner sind FoxP3⁺ T-Zellen ohne suppressive Wirkung auf Effektor-T-Zellen beschrieben¹⁰¹. Als intrazellulärer Transkriptionsfaktor ist FoxP3 zudem nicht der für die Depletion notwendigen oberflächlichen Zellfärbung zugänglich⁵².

Trotz der genannten Limitationen ist CD25 ein etablierter Marker für T_{reg}⁹⁴. Der bedeutende Einfluss von CD25⁺ T_{reg} wird insbesondere durch ein Mausexperiment von Humrich et al. veranschaulicht⁹⁹. Nach Injektion von CD25 Antikörpern in ein Lupus-Mausmodell mit konsekutiver Reduktion der T_{reg} zeigten die Versuchstiere eine deutliche Krankheitsprogression und Verkürzung der Lebensdauer⁹⁹.

5.2.3 T Cell Library mit ³H-Thymidin-Inkorporationsassay

Für den anspruchsvollen Nachweis antigenspezifischer T-Zellen existieren unterschiedliche Methoden mit jeweiligen Vor- und Nachteilen¹⁰².

Hochspezifisch ist der Einsatz Fluoreszenz markierter MHC-Peptid-Multimere, die an den TCR der entsprechenden antigenspezifischen T-Zellen binden¹⁰². Um diese Methode nutzen zu können, muss das Epitop des spezifischen Antigens jedoch bekannt sein¹⁰². Außerdem kann mit den MHC-Peptiden keine Aussage über die Funktionalität der antigenspezifischen T-Zellen getroffen werden¹⁰².

Weiterhin ist es möglich, antigenspezifische T-Zellen über ihre Cytokinsekretion nach Antigenstimulation zu identifizieren¹⁰². Die meisten Cytokine sind allerdings an bestimmte Effektorfunktionen der T-Zellen gebunden, sodass die Gesamtanzahl der für ein Antigen spezifischen T-Zellen falsch eingeschätzt werden kann¹⁰².

Im Stimulations- und Depletionsversuch wurden die Aktivierungsmarkerexpressionen nach Antigenstimulation der T-Zellen durchflusszytometrisch detektiert. Diese Methode hat den Vorteil, alle gegen ein bestimmtes Antigen spezifische T-Zellen zu erfassen - unabhängig von Funktionalität oder Differenzierungsgrad der T-Zellen und Kenntnis des genauen Antigenepitops¹⁰². Problematisch bei der gewählten Methode ist jedoch, dass antigenspezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gegen Auto-, Tumor- oder Umweltantigene

sehr niedrige Frequenzen von unter 0,01 % der T-Zellen aufweisen¹⁰². Zusammen mit dem auftretenden Färbehintergrund von 0,01 % bis 0,1 % gelangt die FACS-Analyse bei diesen seltenen Zellpopulationen ohne vorherige Zellanreicherung an ihr Detektionslimit¹⁰². Die Sensitivität und Spezifität der Durchflusszytometrie können durch vorherige magnetische Anreicherung gewünschter Zellpopulationen und zusätzlichen Ausschluss von beispielsweise Nicht-T-Zellen, toten Zellen, Dubletten gesteigert werden¹⁰². Letztendlich bleibt die Größe der Ausgangszellpopulation bzw. die maximal gewinnbare Blutmenge der meist anämischen und lymphopenischen SLE-Patienten aber limitierend^{52,79,102}.

Um niedrigfrequente antigenspezifische T-Zellen mit höherer Wahrscheinlichkeit zu erfassen, wurden die T-Zellen für den Versuch der T Cell Library zunächst polyklonal expandiert. Erst danach erfolgte die Stimulation der T-Zellen mit dem Nierenantigen KID und die Messung der Proliferationsantwort durch einen ³H-Thymidin-Inkorporationsassay. Über diese Methode gelang es Geiger et al., antigenspezifische T-Zellen einer Frequenz von ca. 0,001 % der T-Zellen nachzuweisen¹⁰³. Angemerkt werden muss, dass eine unspezifische Zellproliferation nicht vollständig auszuschließen ist¹⁰². Außerdem kann es über die lange Expansionszeit von über zwei Wochen zu einem selektiven Wachstum oder Versterben einzelner T-Zell-Subgruppen je nach ihrem Differenzierungsgrad und Überlebenspotential kommen¹⁰². Trotz dieser Limitationen bietet die T Cell Library den entscheidenden Vorteil einer hohen Sensitivität als Ergänzung zur FACS-Analyse beim Nachweis antigenspezifischer T-Zellen.

5.3 Keine überzeugende antirenale T-Zell-Antwort bei der Lupusnephritis

In Zusammenschau des Stimulations-, Depletionsversuchs und der T Cell Library konnte keine überzeugende antirenale CD4⁺ und/ oder CD8⁺ T-Zell-Antwort gezeigt werden.

Bei Einschluss des gesamten Patientenkollektivs des Stimulations- und Depletionsversuchs im kombinierten Stimulationsversuch antworteten zwar einzelne Responder auf das Nierenantigen KID (Kidney-Lysat), aber im Vergleich zur Negativkontrolle (Neg) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Aktivierungsmarker-Expression (s. 4.2.1).

Ebenfalls konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen erzielt werden. Die T-Zell-Antwort der SLE-Patienten war derjenigen der gesunden Kontrollen nicht signifikant überlegen. Darüber hinaus erreichten die Patienten-Teilgruppen der aktiven bzw. aller aktiven und nicht-aktiven LN-Patienten keine signifikant höheren T-Zell-Reaktionen auf das renale Antigen KID. Die Responderraten der SLE-Patienten auf KID waren nicht signifikant höher als die der gesunden Kontrollen (s. Abbildung 4). Kritisch sind zudem die unterschiedliche Anzahl an eingeschlossenen Individuen je Gruppe mit entsprechend eingeschränkter Vergleichbarkeit und der hohe Stimulationshintergrund anzumerken.

Die Stimulationsantworten auf KID korrelierten nicht mit der Krankheitsaktivität, genauer den individuellen SLEDAI-Werten der Patienten. Konsequenterweise zeigte sich auch beim regredienten Krankheitsverlauf von vier SLE-Patienten keine signifikante Änderung der T-Zell-Aktivierung nach KID-Stimulation.

Im Stimulationsversuch wurden neben dem allgemeinen Nierenantigen KID auch die spezifischeren Antigene EPI, GLOM und TUB untersucht. Keines dieser weiteren renalen Antigene übertraf jedoch KID in der Aktivierungsmarkerexpression.

Die Entfernung der T_{reg} durch die CD25 Depletion im Depletionsversuch erzielte keine stärkeren T-Zell-Antworten auf KID. Im Gegenteil waren die KID-Daten der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit CD25 Depletion teilweise sogar signifikant unterlegen und korrelierten weiterhin nicht mit der Krankheitsaktivität der Patienten (s. Abbildung 6 und Abbildung 7). Schließlich ergab die polyklonale Expansion der T-Zellen mittels der T Cell Library lediglich unter den CD4⁺ T-Zellen einzelne Positivantworten auf KID bei den SLE-Patienten. Bemerkenswert ist, dass die Proliferationsantworten auf KID schon visuell geringer als die von Neg ausfallen (s. Abbildung 8). Aufgrund der Kongruenz dieser Ergebnisse zu den Resultaten des Stimulations- und Depletionsversuchs wurden keine weiteren T Cell Library-Versuche durchgeführt.

In allen drei Versuchen war die Anzahl der eingeschlossenen SLE-Patienten und die Menge der Blutproben durch das im Rahmen des SLE oft anämische und lymphopenische Blutbild limitiert^{52,79}. Infolgedessen war es nicht bei allen im Zeitraum der Experimente an der Charité behandelten SLE-Patienten möglich, überhaupt bzw. eine ausreichende Menge an Blut zu gewinnen. Werden gesunde Individuen untersucht, kann man dagegen, z. B. im Rahmen der Spende von ca. 500 ml Blut, den bei der Gewinnung von Erythrozytenkonzentraten anfallenden Leukozytenfilm (engl. buffy coat) verwenden^{104,105}. Durch die geringe Zellzahl standen für die T-Zell-Stimulationen ggf. nicht genügend antigenspezifische T-Zellen und passende APZ zur Verfügung.

Wie bereits erwähnt, ist zudem die Frequenz der gegen Autoantigene spezifischen T-Zellen mit ca. 0,001 % bis 0,01 % der T-Zellen im peripheren Blut sehr gering¹⁰⁴. Durch den Färbehintergrund gelangt die Durchflusszytometrie bei diesen seltenen Zellpopulationen an ein Detektionslimit¹⁰². Mit der T Cell Library mit ³H-Thymidin-Inkorporationsassay können antigenspezifische T-Zellen nachgewiesen werden¹⁰³. Aber auch bei dieser Methode ist die Ausgangszellzahl limitierend¹⁰². Rechnerisch können - bei einer Frequenz antigenspezifischer T-Zellen von 1 : 100.000 T-Zellen - bei 200.000 Ausgangszellen (2000 Zellen/Well einer 100-Well-Platte) nur zwei Well-Kulturen positive Proliferationsantworten zeigen¹⁰².

Methodisch ist weiterhin nicht vollständig auszuschließen, dass die Stimulationsdauer im Stimulations- und Depletionsversuch zu kurz war (s. 5.2.1). Die Antigene könnten trotz der Dialyse (s. 3.10.3) noch Rückstände des ursprünglichen Lösungsmittels enthalten, die die T-Zell-Aktivierung hemmen. Außerdem könnten die immunsuppressiven Medikamente der SLE-Patienten inhibitorisch wirken.

Ebenfalls problematisch war die relativ hohe Hintergrundaktivierung bei der Negativkontrolle, sodass aktivierte T-Zellen durch das Ausgrenzen des Hintergrundes möglicherweise verlorengingen (s. 3.13.1). Der Grenzwert der Responder ist mit dem Mittelwert plus vier Standardabweichungen der Negativkontrolle relativ hoch gewählt (s. 3.13.3). Nicht beachtet wurden ggf. auch aktivierte CD4⁻ T-Zellen, da bestimmte Gedächtnis-T-Zellen die CD4-Expression bei Aktivierung herunterregulieren¹⁰⁶.

Bei der Depletion der T_{reg} stellt sich die Frage, warum T_{reg} in vitro die autoantigene T-Zell-Antwort suffizient unterdrücken sollten, trotzdem es ihnen in vivo bei der Pathogenese des SLE nicht gelingt⁵². Engler et al. zeigten aber den signifikanten Anstieg der CD40L-Expression von SmD1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen nach CD25 Depletion⁵². Allerdings bewirkte die Depletion eine signifikante Abnahme der T-Zell-Aktivierung gegen das

Superantigen SEB⁵². Möglicherweise werden Antigene unterschiedlich durch T_{reg} kontrolliert⁵². Infolgedessen würde die Entfernung der T_{reg} nicht bei allen Antigenen zu einer gesteigerten Stimulationsantwort führen. Weiterhin könnten durch die CD25 Depletion aktivierte CD25⁺ T-Zellen entfernt werden⁵².

Neben den Limitationen der eingesetzten Methoden kann die geringe bzw. fehlende antirenale T-Zell-Antwort dadurch begründet sein, dass die gewählten Nierenantigene nicht die richtigen Zielantigene waren.

Einerseits liegt möglicherweise keine antirenale T-Zell-Spezifität bei der LN vor. Die T-Zellen könnten sich nur gegen die beim SLE bekannten nukleären Peptide richten (s. 2.1.3). Weiterhin könnten T-Zellen nur durch Cytokine, nicht durch Antigenpräsentation, aktiviert werden³¹. So trat in einem Lupus-Mausmodell mit nicht zur Antikörpersekretion fähigen B-Zellen trotzdem eine massive Entzündungsreaktion mit T-Zell-Infiltration auf³¹. Andererseits könnten die infiltrierenden T-Zellen bei der LN nur gegen krankhaft veränderte Nierenstrukturen oder nur gegen Epitope, die durch entzündlich verändertes Nierengewebe exprimiert werden, reagieren. Beispielsweise konnten Kinloch et al. Vimentin, das im entzündeten Tubulointerstitium stark exprimiert wird, als Autoantigen bei der LN identifizieren¹⁰⁷.

Beim SLE fanden sich übereinstimmende T-Zell-Klone zwischen den Kompartimenten Blut, Nierengewebe und Urin (s. 4.1)⁷². Allerdings muss bedacht werden, dass nur 1 % der Lymphozyten im Blut zirkuliert¹⁰⁸. Die antigenspezifischen antirenalen T-Zellen könnten somit im Blut in zu geringer Frequenz auftreten und sich stattdessen vor allem im Urin bzw. nephritischen Gewebe befinden.

Das Nierenantigen GLOM zeigte eine bemerkenswert geringe T-Zell-Stimulationsantwort (s. 4.2.2). Möglicherweise wirkt GLOM immunmodulatorisch auf T-Zellen und inhibiert die T-Zell-Aktivierung. Dies würde ggf. erklären, warum T-Zell-Infiltrate bei der Lupusnephritis vor allem interstitiell und weniger innerhalb des Glomerulums vorkommen^{1,41}.

Abschließend muss bedacht werden, dass Experimente in vitro nicht die Situation in vivo vollständig darstellen. Somit ist eine antigenspezifische antirenale T-Zell-Antwort weiterhin nicht auszuschließen und bedarf fortgesetzter Forschungsarbeit.

5.4 Forschungsausblick

Für die weitere Analyse der antirenaln T-Zell-Antwort bei der LN sollten Antigene des entzündeten Nierengewebes untersucht werden. Renales Biopsiegewebe von LN-Patienten ist durch den invasiven Eingriff schwer zugänglich. Deshalb ist in der AG Riemekasten ein neuer Ansatz entwickelt worden. Nieren-Epithelzellen können aus dem Urin von LN-Patienten mit einem Fluorochrom gekoppelten Epithelzellmarker über einen Zell-Sortierer gewonnen werden. Dabei werden Urothelzellen aus der Harnblase durch einen entsprechenden Marker ausgeschlossen. Anschließend können die lysierten renalen Epithelzellen als SLE-spezifisches Nierenantigen zur Stimulation von T-Zellen des Blutes oder Urins von LN-Patienten dienen. Außerdem kann die Interaktion der lebenden renalen Epithelzellen mit den T-Zellen des jeweiligen LN-Patienten beobachtet werden. Auf diese Weise gelingt es möglicherweise direkt, eine Schädigung der Nieren-Epithelzellen durch die T-Zellen zu beobachten. Eine allogene T-Zell-Reaktion ist durch den gleichen Spender von Nieren-Epithelzellen und T-Zellen ausgeschlossen.

Neben T-Zellen aus dem Blut von LN-Patienten sollten auch aus dem Nierengewebe oder Urin gewonnene T-Zellen untersucht werden, da diese mit höherer Wahrscheinlichkeit antigenspezifische antirenale T-Zellen beinhalten, deren Detektion somit erleichtert wird. Außer T-Zellen sollten auch B-Zellen bei der Identifikation renaler Antigene einbezogen werden. Entsprechend analysierten Kinloch et al. die Reaktivität der Immunglobulin-Ketten von B-Zellen aus LN-Biopsiegewebe¹⁰⁷. Infolgedessen gelang ihnen die Bestimmung von Vimentin als Autoantigen bei der LN¹⁰⁷.

5.5 Fazit

Durch die vorliegenden Versuche konnte keine überzeugende antigenspezifische antirenale T-Zell-Antwort bei der LN gezeigt werden. Das von T-Zellen dominierte Infiltrat im Nierengewebe sowie deren Oligoklonalität deuten jedoch auf eine Schlüsselrolle der T-Zellen in der LN-Pathogenese hin. Wie in dieser Arbeit gezeigt, sind die T-Zellen des Urins von LN-Patienten ebenfalls oligoklonal und können als Abbild der lokalen Entzündung im Nierengewebe bei der LN dienen. Entsprechend könnte die Untersuchung von T-Zellen des Urins statt des peripheren Blutes sowie die Konzentration auf Antigene des nephritischen Gewebes einen weiteren aufklärenden Beitrag für die Entstehung der LN, als eine der schwerwiegendsten Manifestationen des SLE, leisten.

Literaturverzeichnis

- 1 Borchers AT, Leibushor N, Naguwa SM, Cheema GS, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Lupus nephritis: a critical review. *Autoimmunity reviews* 2012;12:174-94.
- 2 Borchers AT, Naguwa SM, Shoenfeld Y, Gershwin ME. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews* 2010;9:A277-87.
- 3 Bibliographisches Institut GmbH. Duden | au-to-, Au-to-, vor Vokalen meist aut-, aut- | Rechtschreibung, Bedeutung, Definition, Herkunft. 2016. (Accessed May 14, 2016, at http://www.duden.de/rechtschreibung/auto_).
- 4 Smith DA, Germolec DR. Introduction to immunology and autoimmunity. *Environmental Health Perspectives* 1999;107:661-5.
- 5 Herold G. *Innere Medizin* 2013. Köln: Gerd Herold, 2013.
- 6 Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus* 2006;15:308-18.
- 7 Siegel M, Lee SL. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1973;3:1-54.
- 8 Gottschalk TA, Tsantikos E, Hibbs ML. Pathogenic Inflammation and Its Therapeutic Targeting in Systemic Lupus Erythematosus. *Frontiers in immunology* 2015;6:550.
- 9 Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine* 2008;358:929-39.
- 10 Ramos PS, Brown EE, Kimberly RP, Langefeld CD. Genetic factors predisposing to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Seminars in nephrology* 2010;30:164-76.
- 11 Institut für medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam. Klinische Bedeutung des HLA-Systems. 2016. (Accessed May 14, 2016, at <http://www.imd-berlin.de/spezielle-kompetenzen/hla-assoziierte-erkrankungen/klinische-bedeutung-des-hla-systems.html>).
- 12 Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester G-R. *Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen, Labor, Klinik*. 2nd ed. Stuttgart: Thieme, 2007.
- 13 Murphy K. *Janeway's immunobiology*. 8th ed. London, New York: Garland Science, 2012.
- 14 Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie*. 3rd ed. Stuttgart: Thieme, 2009.
- 15 Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie*. 3rd ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2011.

- 16 International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN), Harley JB, Alarcón-Riquelme ME, Criswell LA, Jacob CO, Kimberly RP, Moser KL, Tsao BP, Vyse TJ, Langefeld CD, Nath SK, Guthridge JM, Cobb BL, Mirel DB, Marion MC, Williams AH, Divers J, Wang W, Frank SG, Namjou B, Gabriel SB, Lee AT, Gregersen PK, Behrens TW, Taylor KE, Fernando M, Zidovetzki R, Gaffney PM, Edberg JC, Rioux JD, Ojwang JO, James JA, Merrill JT, Gilkeson GS, Seldin MF, Yin H, Baechler EC, Li QZ, Wakeland EK, Bruner GR, Kaufman KM, Kelly JA. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK23, KIAA1542 and other loci. *Nature genetics* 2008;40:204-10.
- 17 Graham RR, Kozyrev SV, Baechler EC, Reddy MV, Plenge RM, Bauer JW, Ortmann WA, Koeth T, González Escribano MF, Argentine and Spanish Collaborative Groups, Pons-Estel B, Petri M, Daly M, Gregersen PK, Martín J, Altshuler D, Behrens TW, Alarcón-Riquelme ME. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nature genetics* 2006;38:550-5.
- 18 Walport MJ. Complement and systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy* 2002;4:S279.
- 19 Ben-Chetrit E. The molecular basis of the SSA/Ro antigens and the clinical significance of their autoantibodies. *Rheumatology* 1993;32:396-402.
- 20 Francoeur AM, Chan EK, Garrels JI, Mathews MB. Characterization and purification of lupus antigen La, an RNA-binding protein. *Molecular and cellular biology* 1985;5:586-90.
- 21 Zieve GW, Khusial PR. The anti-Sm immune response in autoimmunity and cell biology. *Autoimmunity reviews* 2003;2:235-40.
- 22 Migliorini P, Baldini C, Rocchi V, Bombardieri S. Anti-Sm and anti-RNP antibodies. *Autoimmunity* 2005;38:47-54.
- 23 Hoch SO, Eisenberg RA, Sharp GC. Diverse antibody recognition patterns of the multiple Sm-D antigen polypeptides. *Clinical immunology* 1999;92:203-8.
- 24 Bibliographisches Institut GmbH. Duden | Lu-pus | Rechtschreibung, Bedeutung, Definition, Herkunft. 2017. (Accessed February 17, 2017, at <http://www.duden.de/rechtschreibung/Lupus>).

- 25 Yildirim-Toruner C, Diamond B. Current and novel therapeutics in the treatment of systemic lupus erythematosus. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011;127:303-12; quiz 313-4.
- 26 Shaikh MF, Jordan N, D'Cruz DP. Systemic lupus erythematosus. *Clinical medicine* 2017;17:78-83.
- 27 Roche Pharma AG. Fachinformation MabThera® i.v. (Accessed May 16, 2016, at <http://www.fachinfo.de/pdf/002730>).
- 28 Merola JF, Bermas B, Lu B, Karlson EW, Massarotti E, Schur PH, Costenbader KH. Clinical manifestations and survival among adults with (SLE) according to age at diagnosis. *Lupus* 2014;23:778-84.
- 29 Fors Nieves CE, Izmirly PM. Mortality in Systemic Lupus Erythematosus: an Updated Review. *Current rheumatology reports* 2016;18:21.
- 30 Bagavant H, Fu SM. Pathogenesis of kidney disease in systemic lupus erythematosus. *Current opinion in rheumatology* 2009;21:489-94.
- 31 Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ. A novel mouse with B Cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B Cells in murine lupus. *The Journal of Experimental Medicine* 1999;189:1639-48.
- 32 Davidson A. What is damaging the kidney in lupus nephritis? *Nature reviews. Rheumatology* 2016;12:143-53.
- 33 de Zubiria Salgado A, Herrera-Diaz C. Lupus nephritis: an overview of recent findings. *Autoimmune diseases* 2012;2012:849684.
- 34 Patel M, Clarke AM, Bruce IN, Symmons DPM. The prevalence and incidence of biopsy-proven lupus nephritis in the UK: Evidence of an ethnic gradient. *Arthritis and rheumatism* 2006;54:2963-9.
- 35 Seligman VA, Lum RF, Olson JL, Li H, Criswell LA. Demographic differences in the development of lupus nephritis: A retrospective analysis. *The American Journal of Medicine* 2002;112:726-9.
- 36 Ortega LM, Schultz DR, Lenz O, Pardo V, Contreras GN. Review: Lupus nephritis: pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions. *Lupus* 2010;19:557-74.
- 37 Zubair A, Frieri M. Lupus nephritis: review of the literature. *Current allergy and asthma reports* 2013;13:580-6.
- 38 Appel GB, Contreras G, Dooley MA, Ginzler EM, Isenberg D, Jayne D, Li L-S, Mysler E, Sánchez-Guerrero J, Solomons N, Wofsy D, Aspreva Lupus Management Study

- Group. Mycophenolate mofetil versus cyclophosphamide for induction treatment of lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2009;20:1103-12.
- 39 Ikeuchi H, Hiromura K, Kayakabe K, Tshilela KA, Uchiyama K, Hamatani H, Sakairi T, Kaneko Y, Maeshima A, Nojima Y. Renal outcomes in mixed proliferative and membranous lupus nephritis (Class III/IV + V): A long-term observational study. *Modern rheumatology* 2016;26:1-6.
- 40 Mok CC, Ying KY, Ng WL, Lee KW, To CH, Lau CS, Wong RWS, Au TC. Long-term outcome of diffuse proliferative lupus glomerulonephritis treated with cyclophosphamide. *The American Journal of Medicine* 2006;119:355.e25-33.
- 41 Alexopoulos E, Seron D, Hartley RB, Cameron JS. Lupus nephritis: correlation of interstitial cells with glomerular function. *Kidney International* 1990;37:100-9.
- 42 Hsieh C, Chang A, Brandt D, Guttikonda R, Utset TO, Clark MR. Predicting outcomes of lupus nephritis with tubulointerstitial inflammation and scarring. *Arthritis care & research* 2011;63:865-74.
- 43 Zakheim B, McCafferty E, Phillips SM, Clayman M, Neilson EG. Murine interstitial nephritis. II. The adoptive transfer of disease with immune T lymphocytes produces a phenotypically complex interstitial lesion. *The Journal of Immunology* 1984;133:234-9.
- 44 Heymann F, Meyer-Schwesinger C, Hamilton-Williams EE, Hammerich L, Panzer U, Kaden S, Quaggin SE, Floege J, Grone H-J, Kurts C. Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury. *The Journal of clinical investigation* 2009;119:1286-97.
- 45 Massengill SF, Goodenow MM, Sleasman JW. SLE nephritis is associated with an oligoclonal expansion of intrarenal T cells. *American Journal of Kidney Diseases* 1998;31:418-26.
- 46 Murata H, Matsumura R, Koyama A, Sugiyama T, Sueishi M, Shibuya K, Tsutsumi A, Sumida T. T cell receptor repertoire of T cells in the kidneys of patients with lupus nephritis. *Arthritis and rheumatism* 2002;46:2141-7.
- 47 Kuroiwa T, Lee EG. Cellular interactions in the pathogenesis of lupus nephritis: the role of T cells and macrophages in the amplification of the inflammatory process in the kidney. *Lupus* 1998;7:597-603.
- 48 Frentsch M, Stark R, Matzmohr N, Meier S, Durlanik S, Schulz AR, Stervbo U, Jürchott K, Gebhardt F, Heine G, Reuter MA, Betts MR, Busch D, Thiel A. CD40L

- expression permits CD8+ T cells to execute immunologic helper functions. *Blood* 2013;122:405-12.
- 49 Kopetschke K, Klocke J, Grießbach A-S, Humrich JY, Biesen R, Dragun D, Burmester G-R, Enghard P, Riemekasten G. The cellular signature of urinary immune cells in Lupus nephritis: new insights into potential biomarkers. *Arthritis research & therapy* 2015;17:94.
- 50 Bruns A, Bläss S, Hausdorf G, Burmester GR, Hiepe F. Nucleosomes are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 2000;43:2307-15.
- 51 Slansky JE. Antigen-specific T cells: analyses of the needles in the haystack. *PLoS biology* 2003;1:E78.
- 52 Engler JB, Undeutsch R, Kloke L, Rosenberger S, Backhaus M, Schneider U, Egerer K, Dragun D, Hofmann J, Huscher D, Burmester G-R, Humrich JY, Enghard P, Riemekasten G. Unmasking of autoreactive CD4 T cells by depletion of CD25 regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases* 2011;70:2176-83.
- 53 Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis and rheumatism* 1992;35:630-40.
- 54 Quimby KR, Flower C, Hambleton IR, Landis RC, Hennis AJM. Comparison of the systemic lupus erythematosus activity questionnaire and the systemic lupus erythematosus disease activity index in a black barbadian population. *International journal of rheumatology* 2013;2013:875369.
- 55 Miyahira A. Types of immune cells present in human PBMC. 2012. (Accessed July 04, 2016, at <http://technical.sanguinebio.com/types-of-immune-cells-present-in-human-pbmc/>).
- 56 Fuss IJ, Kanof ME, Smith PD, Zola H. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Current protocols in immunology* 2009;85:7.1.1-8.
- 57 Miltenyi Biotec GmbH. MACSQuant® Instrument: User manual. 6th ed. Bergisch Gladbach: Miltenyi Biotec GmbH, 2015.
- 58 Rahman M. Introduction to Flow Cytometry. Oxford: Serotec Ltd, 2006.
- 59 Gautho K. BD FACSAria: User's Guide, Part No. 333608 Rev. A. San Jose, USA: Becton, Dickinson and Company, 2003.

- 60 Dziubianau M, Hecht J, Kuchenbecker L, Sattler A, Stervbo U, Rödelsperger C, Nickel P, Neumann AU, Robinson PN, Mundlos S, Volk H-D, Thiel A, Reinke P, Babel N. TCR repertoire analysis by next generation sequencing allows complex differential diagnosis of T cell-related pathology. *American journal of transplantation* 2013;13:2842-54.
- 61 Tomtishen JP3. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology journal* 2012;9:22.
- 62 Schottstedt V, Blümel J, Burger R, Drosten C, Gröner A, Gürtler L, Heiden M, Hildebrandt M, Jansen B, Montag-Lessing T, Offergeld R, Pauli G, Seitz R, Schlenkrich U, Strobel J, Willkommen H, von König C-HW. Human Cytomegalovirus (HCMV) - Revised. *Transfusion medicine and hemotherapy* 2010;37:365-75.
- 63 Harris NL, Ronchese F. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunology and cell biology* 1999;77:304-11.
- 64 Thermo Fisher Scientific Inc. Brefeldin A Solution (1000X). 2016. (Accessed July 06, 2016, at <http://www.ebioscience.com/brefeldin-a-solution.htm>).
- 65 Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *Journal of oral and maxillofacial pathology* 2012;16:400-5.
- 66 Goldenthal KL, Hedman K, Chen JW, August JT, Willingham MC. Postfixation detergent treatment for immunofluorescence suppresses localization of some integral membrane proteins. *The journal of histochemistry and cytochemistry* 1985;33:813-20.
- 67 Miltenyi Biotec GmbH. FAQ - MACS Technology for cell separation. 2016. (Accessed July 06, 2016, at <http://www.miltenyibiotec.com/en/support/resources/faq/macs-technology-for-cell-separation.aspx>).
- 68 Stillman B. Cell cycle control of DNA replication. *Science* 1996;274:1659-64.
- 69 Mak TW, Saunders ME. *The immune response: Basic and clinical principles*. Amsterdam: Elsevier, 2006.
- 70 Crane WAJ, Dutta LP. The utilisation of tritiated thymidine for deoxyribonucleic acid synthesis by the lesions of experimental hypertension in rats. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 1963;86:83-97.
- 71 Pingoud A, Urbanke C. *Arbeitsmethoden der Biochemie*. Berlin, New York: Walter de Gruyter, 1997.

- 72 Winchester R, Wiesendanger M, Zhang H-Z, Steshenko V, Peterson K, Geraldino-Pardilla L, Ruiz-Vazquez E, D'Agati V. Immunologic characteristics of intrarenal T cells: trafficking of expanded CD8+ T cell beta-chain clonotypes in progressive lupus nephritis. *Arthritis and rheumatism* 2012;64:1589-600.
- 73 Enghard P, Humrich JY, Rudolph B, Rosenberger S, Biesen R, Kuhn A, Manz R, Hiepe F, Radbruch A, Burmester G-R, Riemekasten G. 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 and rheumatism* 2009;60:199-206.
- 74 Dolff S, Abdulahad WH, van Dijk MCRF, Limburg PC, Kallenberg CGM, Bijl M. Urinary T cells in active lupus nephritis show an effector memory phenotype. *Annals of the rheumatic diseases* 2010;69:2034-41.
- 75 Frentsch M, Arbach O, Kirchhoff D, Moewes B, Worm M, Rothe M, Scheffold A, Thiel A. Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nature medicine* 2005;11:1118-24.
- 76 Yellin MJ, Sippel K, Inghirami G, Covey LR, Lee JJ, Sinning J, Clark EA, Chess L, Lederman S. CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function. *The Journal of Immunology* 1994;152:598-608.
- 77 Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, Tamura G, Ikehara Y. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 1986;261:11398-403.
- 78 Meier S, Stark R, Frentsch M, Thiel A. The influence of different stimulation conditions on the assessment of antigen-induced CD154 expression on CD4+ T cells. *Cytometry Part A* 2008;73A:1035-42.
- 79 Giannouli S, Voulgarelis M, Ziakas PD, Tzioufas AG. Anaemia in systemic lupus erythematosus: from pathophysiology to clinical assessment. *Annals of the rheumatic diseases* 2006;65:144-8.
- 80 Benichou G. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Frontiers in bioscience* 1999;4:D476-80.
- 81 Lonza. Primary Cells vs. Cell Lines. 2017. (Accessed February 20, 2017, at <http://www.lonza.com/products-services/bio-research/primary-cells/primary-cells-vs-cell-lines.aspx>).

- 82 Lifeline Cell Technology. 5 Things to Know about Primary Cells. 2016. (Accessed August 30, 2016, at <http://www.lifelinecelltech.com/5-things-to-know-primary-cells-versus-cell-lines/>).
- 83 Morgan JP, Robins RA, Dua HS, Tighe PJ. S antigen specific effector T cell activation detected by cytokine flow cytometry. *British Journal of Ophthalmology* 2002;86:517-20.
- 84 Fraser JD. Clarifying the mechanism of superantigen toxicity. *PLoS biology* 2011;9:e1001145.
- 85 Sundberg EJ, Deng L, Mariuzza RA. TCR recognition of peptide/MHC class II complexes and superantigens. *Seminars in immunology* 2007;19:262-71.
- 86 Proft T, Fraser JD. Bacterial superantigens. *Clinical and Experimental Immunology* 2003;133:299-306.
- 87 Beninga J, Kropff B, Mach M. Comparative analysis of fourteen individual human cytomegalovirus proteins for helper T cell response. *The Journal of general virology* 1995;76:153-60.
- 88 Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, Jin X, Weekes MP, Plachter B, Sissons JG. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *Journal of Virology* 1996;70:7569-79.
- 89 Robert-Koch-Institut. RKI-Ratgeber für Ärzte - Zytomegalievirus-Infektion. 2014. (Accessed August 27, 2016, at https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Zytomegalievirus.html).
- 90 Kiecker F, Streitz M, Ay B, Cherepnev G, Volk H-D, Volkmer-Engert R, Kern F. Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides--what kind of peptide for which purpose? *Human immunology* 2004;65:523-36.
- 91 Coico R, Sunshine G. *Immunology: A short course*. 7th ed. Chichester: Wiley Blackwell, 2015.
- 92 Das M, Kaveri SV, Bayry J. Cross-presentation of antigens by dendritic cells: role of autophagy. *Oncotarget* 2015;6:28527-8.
- 93 Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature reviews. Immunology* 2012;12:557-69.
- 94 Ohi K, Tenbrock K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *European journal of immunology* 2015;45:344-55.

- 95 Crispin JC, Martínez A, Alcocer-Varela J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of autoimmunity* 2003;21:273-6.
- 96 Valencia X, Yarboro C, Illei G, Lipsky PE. Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology* 2007;178:2579-88.
- 97 Vargas-Rojas MI, Crispín JC, Richaud-Patin Y, Alcocer-Varela J. Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus* 2008;17:289-94.
- 98 Alexander T, Sattler A, Templin L, Kohler S, Groß C, Meisel A, Sawitzki B, Burmester G-R, Arnold R, Radbruch A, Thiel A, Hiepe F. Foxp3+ Helios+ regulatory T cells are expanded in active systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases* 2013;72:1549-58.
- 99 Humrich JY, Morbach H, Undeutsch R, Enghard P, Rosenberger S, Weigert O, Kloke L, Heimann J, Gaber T, Brandenburg S, Scheffold A, Huehn J, Radbruch A, Burmester G-R, Riemekasten G. Homeostatic imbalance of regulatory and effector T cells due to IL-2 deprivation amplifies murine lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:204-9.
- 100 Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* 2007;110:2983-90.
- 101 Scheinecker C, Bonelli M, Smolen JS. Pathogenetic aspects of systemic lupus erythematosus with an emphasis on regulatory T cells. *Journal of autoimmunity* 2010;35:269-75.
- 102 Bacher P, Scheffold A. Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells. *Cytometry Part A* 2013;83A:692-701.
- 103 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. *The Journal of experimental medicine* 2009;206:1525-34.
- 104 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. *The Journal of Immunology* 2013;190:3967-76.
- 105 Universitätsklinikum Würzburg. Vorlesung Transfusionsmedizin: Herstellung/ Indikation von Erythrozytenkonzentraten. 2015. (Accessed September 02, 2016, at

<http://www.transfusionsmedizin.ukw.de/studenten/hauptvorlesung/herstellung-indikation-eks/herstellung.html>).

- 106 Beaumier CM, Harris LD, Goldstein S, Klatt NR, Whitted S, McGinty J, Apetrei C, Pandrea I, Hirsch VM, Brenchley JM. CD4 downregulation by memory CD4+ T cells in vivo renders African green monkeys resistant to progressive SIVagm infection. *Nature medicine* 2009;15:879-85.
- 107 Kinloch AJ, Chang A, Ko K, Dunand CJH, Henderson S, Maienschein-Cline M, Kaverina N, Rovin BH, Salgado Ferrer M, Wolfgeher D, Liarski V, Haddon DJ, Utz PJ, Wilson PC, Clark MR. Vimentin is a dominant target of in situ humoral immunity in human lupus tubulointerstitial nephritis. *Arthritis & rheumatology* 2014;66:3359-70.
- 108 Georg Thieme Verlag KG. *Lymphozyten: Histologie - via medici*. 2016. (Accessed August 30, 2016, at <https://viamedici.thieme.de/lernmodule/histologie/lymphozyten+histologie#>).

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anna-Sophie Grießbach, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Analyse der antigenspezifischen antirenaln CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Antwort bei der Lupusnephritis** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Anna-Sophie Grießbach hatte folgenden Anteil an den nachfolgenden Publikationen:

Publikation 1:

Kopetschke K, Klocke J, **Grießbach A-S**, Humrich JY, Biesen R, Dragun D, Burmester G-R, Enghard P, Riemekasten G. The cellular signature of urinary immune cells in Lupus nephritis: new insights into potential biomarkers. *Arthritis Research & Therapy* 2015;17:94.

Impact-Faktor: 3,8

Beitrag im Einzelnen: Mithilfe bei der Interpretation der Ergebnisse. Beteiligung an der Überarbeitung der Publikation.

Publikation 2:

Klocke J, Kopetschke K, **Grießbach A-S**, Langhans V, Humrich JY, Biesen R, Dragun D, Radbruch A, Burmester G-R, Riemekasten G, Enghard P. Mapping urinary chemokines in human lupus nephritis: Potentially redundant pathways recruit CD4⁺ and CD8⁺ T cells and macrophages. *European Journal of Immunology* 2017;47:180-192.

Impact-Faktor: 4,179

Beitrag im Einzelnen: Beteiligung bei der Datendiskussion, insbesondere bei der Diskussion von Hintergrundsignalen der Durchflusszytometrie. Kritikgabe beim Schreiben der Publikation.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Publikationen

Kopetschke K, Klocke J, Griebach A-S, Humrich JY, Biesen R, Dragun D, Burmester G-R, Enghard P, Riemekasten G. The cellular signature of urinary immune cells in Lupus nephritis: new insights into potential biomarkers. *Arthritis Research & Therapy* 2015;17:94.

Klocke J, Kopetschke K, Griebach A-S, Langhans V, Humrich JY, Biesen R, Dragun D, Radbruch A, Burmester G-R, Riemekasten G, Enghard P. Mapping urinary chemokines in human lupus nephritis: Potentially redundant pathways recruit CD4⁺ and CD8⁺ T cells and macrophages. *European Journal of Immunology* 2017;47:180-192.

Posterpräsentation

Griebach A-S, Abdirama D, Enghard P, Riemekasten G. Analysis of the antigen-specific antirenal CD4⁺ and CD8⁺ T cell response in Lupus nephritis. 6th Autumn School. *Current Concepts in Immunology*. Merseburg. 2014.

Danksagung

Sehr herzlich bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden medizinischen Doktorarbeit!

Herrn Prof. Dr. Gerd-Rüdiger Burmester danke ich vielmals für die Ermöglichung der Promotion an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Frau Prof. Dr. Gabriela Riemekasten danke ich sehr herzlich für die Überlassung des spannenden Promotionsthemas, die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die konstruktive Kritik und für die motivierende Unterstützung und Begleitung dieser Doktorarbeit.

Herrn Dr. Philipp Enghard danke ich ganz herzlich für die Supervision des gesamten Arbeitsprozesses mit außergewöhnlich großem Engagement. Jederzeit unterstützte er mich durch richtungsweisende Ideen, anregende Diskussionen und wertvolle Ratschläge.

Der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Nina Babel am Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien der Charité – Universitätsmedizin Berlin danke ich sehr herzlich für die Kooperation bei der TCR β -Analyse. Insbesondere danke ich Frau Prof. Dr. Nina Babel, Herrn Dr. Mikalai Nienen, Herrn Dr. Ulrik Stervbo und Frau Patrizia Wehler.

Herrn Dimas Abdirama aus der Arbeitsgruppe Riemekasten danke ich ganz besonders für die Zusammenarbeit bei der T Cell Library. Außerdem danke ich ihm sehr herzlich für seine wertvollen Anregungen und stetige Hilfsbereitschaft während der Arbeit im Labor.

Herrn Prof. Dr. Andreas Radbruch danke ich für die Möglichkeit, in den Räumen des Deutschen Rheuma-Forschungszentrums Berlin als Mitglied der Arbeitsgruppe Riemekasten zu arbeiten und fachlich mit den anderen Arbeitsgruppen auszutauschen.

Der Humboldt-Universität zu Berlin danke ich vielmals für die Unterstützung dieser Promotion im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 650.

Sehr herzlich danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Riemekasten. Für die Einarbeitung im Labor danke ich insbesondere Herrn Dimas Abdirama, Frau Anika Klaus, Herrn Jan Klocke und Frau Dr. Judith Rademacher. Ebenso danke ich allen aktuellen und ehemaligen Arbeitsgruppen-Mitgliedern sehr für die fachliche Unterstützung und die schöne Zeit im Labor.

Vielmals bedanke ich mich bei den Mitgliedern des Deutschen Rheuma-Forschungszentrums Berlin. Ganz besonders danke ich Frau Dr. Dörte Huscher für die Hilfestellung bei der Auswahl der statistischen Tests sowie Herrn Toralf Kaiser und Frau Jenny Kirsch für die Unterstützung bei der Arbeit mit den Durchflusszytometern.

Den Beschäftigten der Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin danke ich herzlich für die Hilfe bei der Organisation von Blut- und Urinproben.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei allen SLE-Patienten und den gesunden Kontrollpersonen für die Blut- und Urinspenden, die diese Forschungsarbeit ermöglicht haben.

Meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden danke ich von Herzen für ihren motivierenden Beistand und liebevollen Rückhalt.