

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Isolierung der Lymphozyten aus den Nieren

Voraussetzung für die durchgeführten Untersuchungen war die Isolation der T-Zellen aus dem nephritischen Nierengewebe. Da sich im Nierengewebe verhältnismäßig wenig Leukozyten finden und isolieren lassen, sind die Leukozyten im Blut der renalen Blutgefäße eine potentielle Störgröße: Es ist unklar, ob die aus den Nieren isolierten Zellen aus dem Nierengewebe oder aus den intrarenalen Blutgefäßen stammen. Um diese Ungewissheit zu minimieren bzw. auszuschalten, wurde das Blut durch Spülen des Kreislaufs aus den Blutgefäßen entfernt. Dass dieses Vorgehen erfolgreich war und die isolierten Lymphozyten tatsächlich aus dem Nierengewebe stammen, wurde auf zweierlei Weisen kontrolliert:

- I. Zur Überprüfung, ob das Spülen des Kreislaufs und insbesondere der Nieren erfolgreich war, wurde die in den Nieren nach dem Spülen verbleibende Hämoglobinkonzentration ermittelt. Es wurden 3 Nierenpaare nach Spülen des Kreislaufs und 2 Nierenpaare ohne vorheriges Spülen entnommen. Die Organe wurden separat in Erylyse-Puffer homogenisiert, und anschließend die freie Hämoglobinkonzentration in der Lösung mit Hilfe der Abteilung der klinischen Chemie der Charité bestimmt. Durch das Spülen wurden 85-87,5% des Hämoglobins (also des Blutes) aus den Nieren entfernt. Es ist anzunehmen, dass das in den Nieren verbleibende Hämoglobin zum Teil aus Blutresten in den intrarenalen Blutgefäßen und zum Teil aus Tubulusblutungen der entzündeten Nieren stammt.
- II. Es wurde getestet, ob mit der angewandten Vorgehensweise auch aus normalen, nicht entzündeten Nieren Leukozyten isoliert werden können. Es wurden nach Spülen des Kreislaufs die Nieren von „normalen“, gesunden Mäusen (Balb/c) entnommen. Da diese Tiere keine Nephritis entwickeln, ist davon auszugehen, dass sich im Nierengewebe keine nennenswerten Leukozytenansammlungen finden. Aus den Nieren gesunder Mäuse liessen sich ~20.000 CD4<sup>+</sup> T-Zellen/Nierenpaar isolieren, während aus den Nieren von erkrankten BWF1-Lupus-Mäusen ~400.000 CD4<sup>+</sup> T-Zellen/Nierenpaar gewonnen wurden.

### 4.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung der die Nieren infiltrierenden T-Zellen

Ziel war es zu Anfang der Untersuchungen, eine Vorstellung zu erlangen, was für eine Art T-Zellen sich im Nierengewebe findet. Über die in das entzündete Nierengewebe einwandernden T-Zellen bei der Lupusnephritis und beim Lupus-like Syndrom der Mausmodelle für den SLE ist wenig bekannt. Der Großteil dessen, was wir über diese Zellen wissen, stammt aus immunhistochemischen Arbeiten – wurde also mit einer Technik ermittelt, deren Schwachpunkt

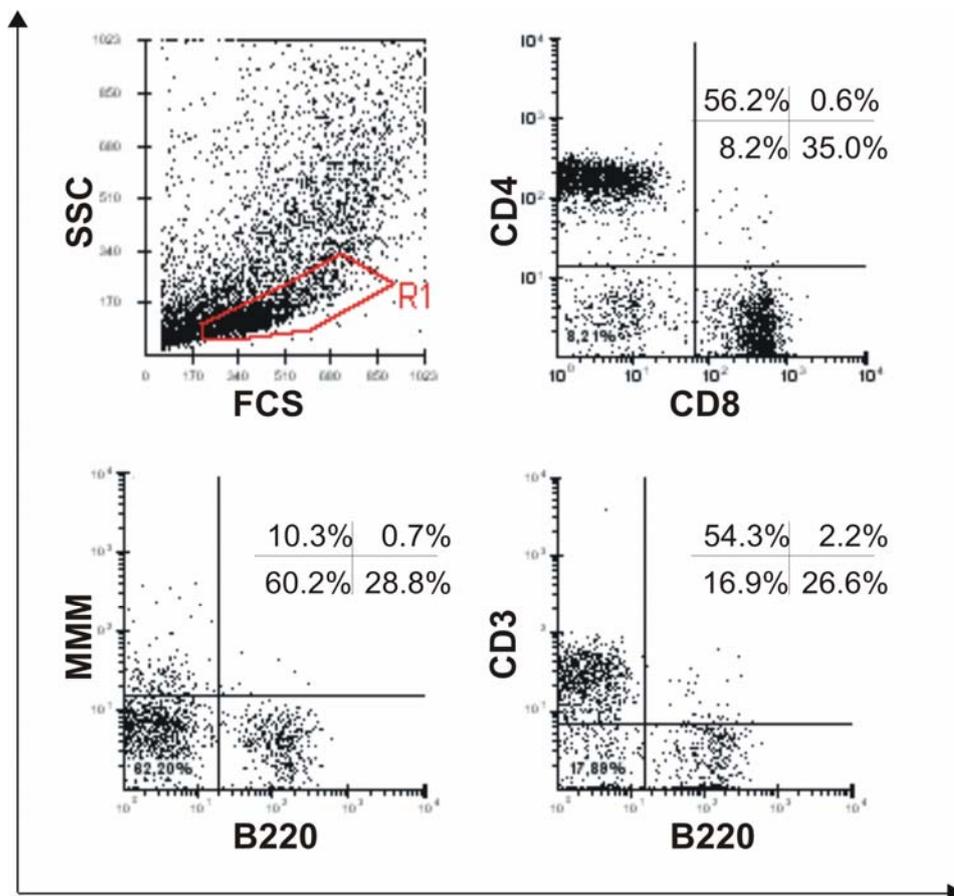
die Quantifizierung von Unterschieden ist. Da also über den Phänotyp der renalen T-Zellen kaum etwas bekannt ist und da die bestehenden immunhistochemischen Arbeiten in Hinblick auf die Quantifizierung von Merkmalen der Durchflusszytometrie unterlegen sind, lag eine durchflusszytometrische Charakterisierung dieser Zellen nahe.

Es wurden jeweils die Zellen aus den Nieren von mehreren nephritischen BWF1-Mäusen gepoolt. Die verwendeten Mäuse waren 7-9 Monate alt und hatten eine Proteinurie von 300-2000 mg/dl. Parallel wurden die T-Zellen aus der Milz der jeweiligen BWF1-Mäuse untersucht (ebenfalls gepoolte Zellen).

#### 4.2.1 Charakterisierung der T-Zellen anhand von Oberflächenmarkern

##### 4.2.1.1 Zellzusammensetzung

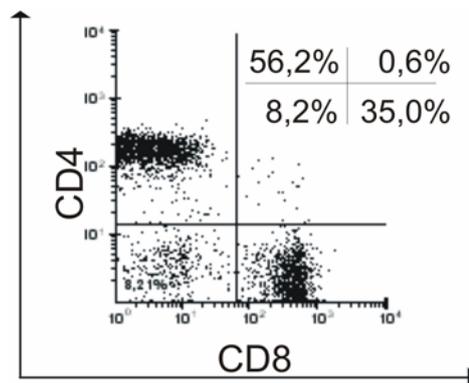
Es wurde untersucht, aus welchen Zelltypen sich die Leukozyten zusammensetzen, die mit Hilfe der Percoll-Dichtezentrifugation aus dem Nierengewebe isoliert wurden.



**Abbildung 8:** Aus dem Nierengewebe isolierte Zellen nach Percoll-Dichtezentrifugation. Mit Forward- und Sideward-Scatter wurde Zelldetritus und mit PJ tote Zellen ausgegattet. Mit MMM (Maus Makrophagen Marker) wurden Makrophagen identifiziert, mit B220 B-Zellen und mit CD3 T-Zellen. Die Zellen stammen aus 7-9 Monate alten BWF1 mit einer Proteinurie von 2000mg/dl.

Es zeigte sich, dass ungefähr 1/3 der aus dem Nierengewebe isolierten Zellen B-Zellen (B220<sup>+</sup>), fast 2/3 T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) und 10% Makrophagen sind (MMM<sup>+</sup> = Maus Makrophagen Marker). Bei Milzzellen fanden sich nach gleicher Vorgehensweise 2/3 B-Zellen, 1/3 T-Zellen und nur wenige Makrophagen.

Bei dem Großteil (ca. 2/3) der T-Zellen aus dem Nierengewebe handelte es sich um CD4<sup>+</sup> „T-Helferzellen“ und nur zu einem geringeren Anteil um CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen. Da die CD4<sup>+</sup> T-Zellen überwogen und insbesondere diesen Zellen bei der Pathogenese der Lupusnephritis eine Schlüsselrolle zukommen könnte (siehe Einleitung), fokussierten die folgenden Experimente auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellen.



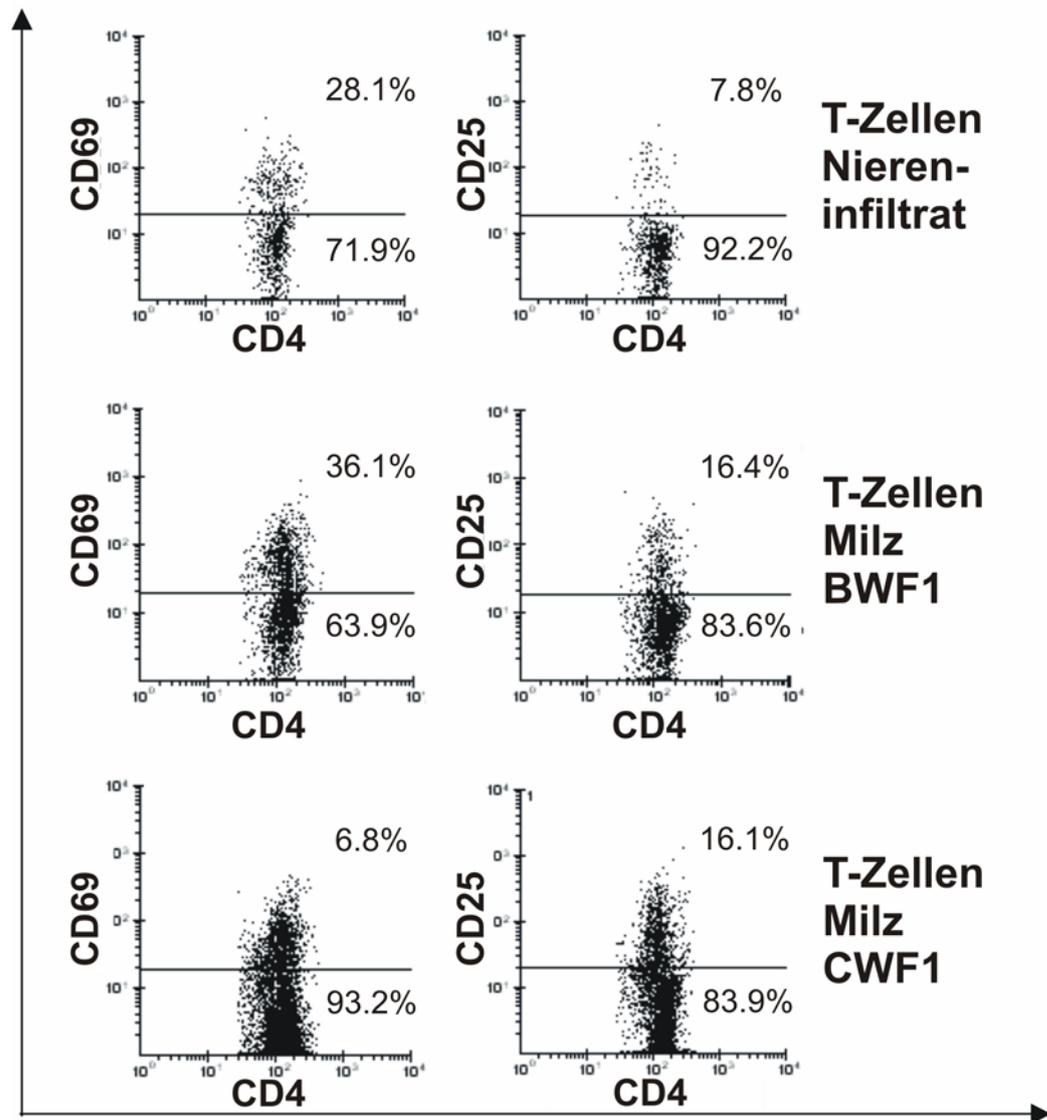
**Abbildung 9:** CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Nierengewebe. Zellen aus 4 7-9 Monate alten BWF1 mit einer Proteinurie von 300mg/dl. Gezeigt sind nur CD3<sup>+</sup> Zellen, also T-Zellen.

#### 4.2.1.2 Aktivierungszustand der T-Zellen

I. Die Zellen wurden im Hinblick auf verschiedene Aktivierungsmarker untersucht:

- CD69 (Very early activation antigen) wird innerhalb von Stunden nach T-Zell Aktivierung hochreguliert. Die Expression hält nur kurz an, dann verlieren die Zellen die CD69 Oberflächenexpression<sup>[113]</sup>.
- CD25 ist die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors. CD25 wird mit circa 1-5d Latenz nach Zellaktivierung auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert. Auf bestimmten regulatorischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen wird CD25 konstitutiv exprimiert, CD25 ist also auch ein Marker für regulatorische T-Zellen<sup>[114]</sup>.

Es wurden BWF1-Mäuse untersucht (7-9 Monate alt, Proteinurie 300-2000mg/dl) und als Kontrollgruppe 2mal 2 Mäuse vom CWF1-Stamm (7-9 Monate alt, Proteinurie nur in Spuren nachweisbar). Jede Messung erfolgte zweimal an separaten Mausgruppen, die Ergebnisse wurden gemittelt.

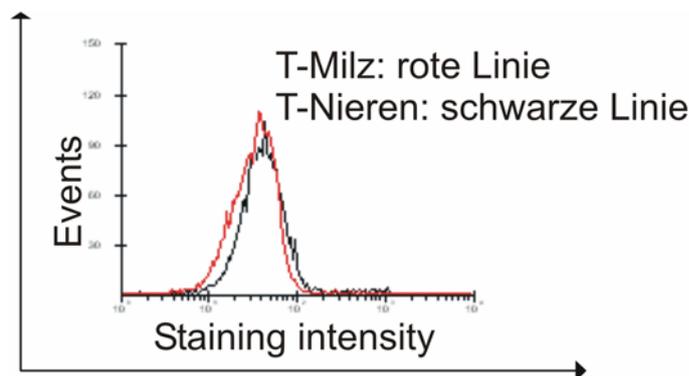


**Abbildung 10:** CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus dem entzündeten Nierengewebe und aus den Milzen von BWF1-Mäusen (7-9 Monate alt, Proteinurie 300-2000 mg/dl) und aus den Milzen von CWF1-Mäusen (7-9 Monate alt, Proteinurie: in Spuren). Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25, gezeigt ist eines von mehreren Experimenten.

Insbesondere die hohe **CD69**-Expression der renalen T-Zellen (MW 28,4% ±0,3) weist auf einen aktivierten T-Zell-Phänotyp hin. Überraschenderweise war die CD69-Expression der T-Zellen aus der Milz (MW 39,4% ±3,3) signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als die Expression der renalen T-Zellen – eigentlich hatten wir erwartet, dass die in das entzündete Nierengewebe einwandernden T-Zellen besonders aktiviert sind, stattdessen fanden sich auf den T-Zellen aus der Milz noch höhere Expressionsraten. Das kann auf die systemische Autoimmunerkrankung zurückgeführt werden, im Rahmen welcher T-Zellen in der Milz ebenfalls stark aktiviert sind. Auf den Milzzellen der gesunden CWF1-Kontrollgruppe fand sich eine CD69-Expression von MW 7,5% ±0,7, was den im Vergleich dazu massiven Aktivierungszustand der T-Zellen aus den BWF1-Mäusen unterstreicht ( $p < 0,05$ ).

Der Oberflächenmarker **CD25** war auf  $8,6\% \pm 0,8$  (MW) der T-Zellen aus den Nieren der BWF1-Mäuse nachzuweisen. Auf den T-Zellen aus der Milz fanden sich mit MW  $15,2\% \pm 1,3$  wesentlich höhere Expressionslevel von CD25 ( $p < 0,05$ ). Diese CD25-Expression der Milzzellen ist vergleichbar mit der Anzahl CD25-positiver Zellen aus den Milzen der CWF1-Kontrollmäuse (MW  $15,6\% \pm 0,6$ ).

II. Werden T-Zellen chronisch aktiviert, können sie den costimulatorischen Rezeptor CD28, der sich normalerweise auf allen T-Zellen findet, runterregulieren und die CD28-Expression komplett verlieren.<sup>[115, 116]</sup> Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis beispielsweise fanden sich vermehrt CD28-negative CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die sich durch Autoreaktivität auszeichnen und in die Gelenke einwandern<sup>[117]</sup>. Auch beim SLE wurde vermehrtes Vorkommen von CD28<sup>-</sup> T-Zellen im Blut beschrieben<sup>[118]</sup>. Da die in das nephritische Nierengewebe einwandernden T-Zellen möglicherweise in einem chronischen Aktivierungszustand sind, wurde überprüft, in welchem Maße die renalen T-Zellen CD28 exprimieren. Es wurde die Expression von CD28 auf den T-Zellen aus Milz und Nieren von BWF1(7-9 Monate, Proteinurie 2000mg/dl) untersucht.



**Abbildung 11:** Expression von CD28 auf renalen T-Zellen und T-Zellen aus der Milz.

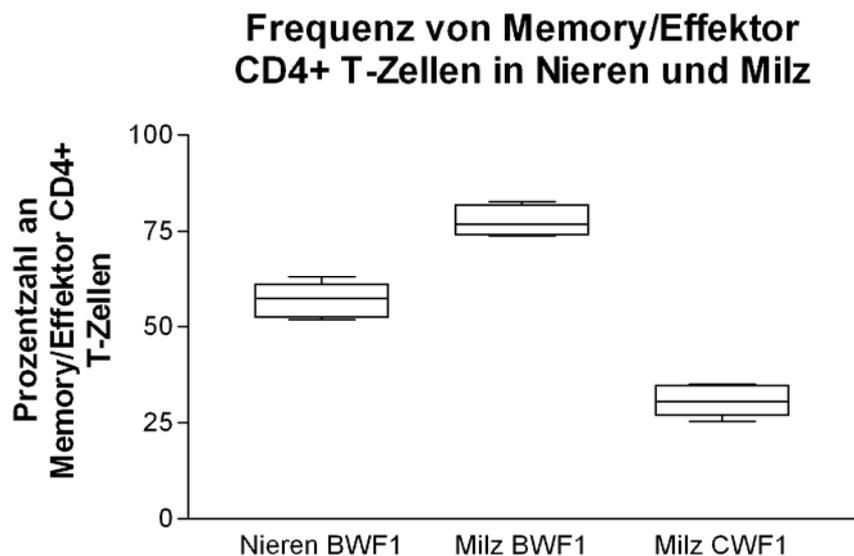
Die T-Zellen aus Milz und Nieren der nephritischen BWF1-Mäuse exprimierten CD28, das Niveau der Expression der renalen T-Zellen lag nicht unterhalb dem Expressionslevel der T-Zellen aus der Milz. Es fand sich demnach kein Verlust der physiologischen CD28-Expression.

#### 4.2.1.3 Naive oder Memory/Effektor T-Zellen

Ob es sich bei den das Nierengewebe infiltrierenden T-Zellen vorwiegend um naive oder um bereits geprimte T-Memory/Effektor Zellen handelt, wurde anhand der Oberflächenmoleküle CD62L, CD45RB und CD44 analysiert.

- CD62L ist ein Selektin, welches für die Einwanderung von Lymphozyten in die Lymphknoten benötigt wird. Es wird auf naiven T-Zellen exprimiert und nach Aktivierung der Zellen runterreguliert. Es ist also ein Marker für naive T-Zellen<sup>[119]</sup>.
- CD45RB ist eine Isoform des CD45 Antigens. Während naive T-Zellen CD45RB<sup>+</sup> sind, exprimieren T-Effektor- und Memoryzellen nur wenig CD45RB, sind also im CD45RB<sup>-</sup> Kompartiment zu finden<sup>[120]</sup>.
- CD44 ist ein Adhäsionsrezeptor, welcher infolge von Zellaktivierung auf T-Zellen hochreguliert wird. Memory-Zellen sind demnach CD44<sup>+</sup><sup>[121]</sup>.

Es wurden BWF1-Mäuse untersucht (7-9 Monate alt, Proteinurie 300-2000mg/dl) und als Kontrollgruppe Mäuse vom CWF1-Stamm (7-9 Monate alt, Proteinurie nur in Spuren nachweisbar). Jede Messung erfolgte zweimal an separaten Mausgruppen, die Ergebnisse wurden gemittelt.



**Abbildung 12:** CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus den Nieren und Milz von BWF1-Mäusen (7-9 Monate alt, Proteinurie 300-2000 mg/dl) und der Milz von CWF1-Mäusen (7-9 Monate alt, Proteinurie: in Spuren). Dargestellt ist die Prozentzahl an Memory/Effektor-T-Zellen gemessen an der Expression der Oberflächenmarker CD62L, CD45RB und CD44. Die restlichen T-Zellen (Differenz zu 100%) sind naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Ungefähr 55-60% der renalen T-Zellen zeigten einen Memory/Effektor-Phänotyp (CD62L<sup>-</sup> CD45RB<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) und ca. 40-45% waren naive T-Zellen (CD62L<sup>+</sup>CD45RB<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>) (MW 42,4% ±1,6 CD62L<sup>+</sup>, MW 47,8%±0,5 CD45RB<sup>+</sup>, MW 39,1% ±2,1 CD44<sup>-</sup>). Überraschenderweise fand sich in der Milz der BWF1-Mäuse ein signifikant (p<0,05) höherer Anteil an Memory/Effektor-Zellen (~75%) als in den Nieren, und nur zu ~25% naive T-Zellen (MW 22,6% ±3,5 CD62L<sup>+</sup>, MW 23,3%±2,4 CD45RB<sup>+</sup>, MW 21,7% ±4,4 CD44<sup>-</sup>). In der Milz der gesunden CWF1-Kontrollmäuse waren ~30% der T-Zellen Memory/Effektor-Zellen und die Mehrzahl der Zellen naive T-Zellen (~70%) (MW 70,9% ±0,8 CD62L<sup>+</sup>, MW 71,7%±2,9 CD45RB<sup>+</sup>, MW 65,3% ±0,3

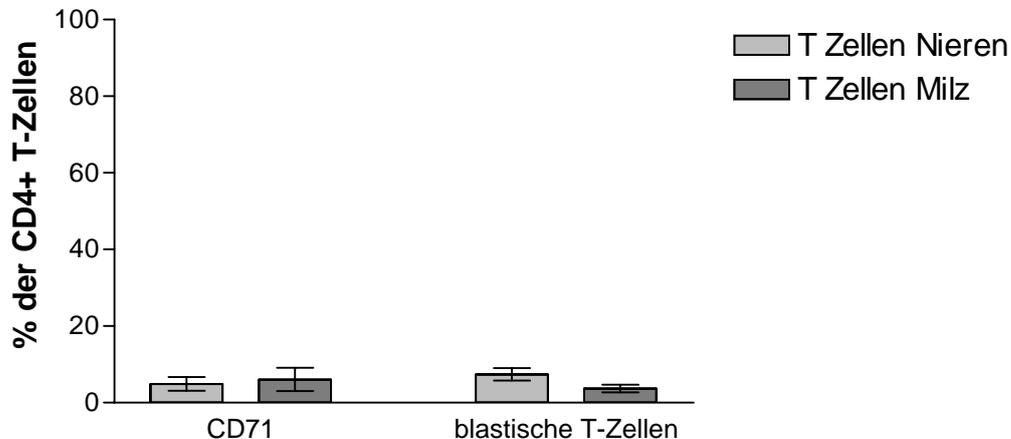
CD44). Dieser Unterschied ist verglichen mit den T-Zellen aus Milz und Nieren der BWF1-Tiere signifikant (jeweils  $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1.4 Marker für Proliferation

Da proliferierende Zellen auf Eisen angewiesen sind, wird der Transferrinrezeptor CD71 auf proliferierenden Zellen exprimiert<sup>[109]</sup>. Demzufolge lassen sich proliferierende Zellen anhand von CD71-Expression identifizieren. Eine weitere Eigenschaft von proliferierenden Zellen ist ihre Größe: Proliferierende Zellen werden groß und blastisch. Da sich die Zellgröße bei der Durchflusszytometrie im Forwardscatter (FCS) widerspiegelt, kann mit FCS die Anzahl blastischer Zellen ermittelt werden.

Es wurden die CD71-Expression auf den Zellen aus Milz und Nieren von BWF1-Mäusen (7-9 Monate alt, Proteinurie 300-2000mg/dl) analysiert. Der Anteil an blastischen T-Zellen wurde darüber hinaus in den verschiedenen anderen Messungen zur Charakterisierung der T-Zellen mitbestimmt.

### Prozentzahl CD71 exprimierender und blastischer T-Zellen aus Nieren und Milz von BWF1



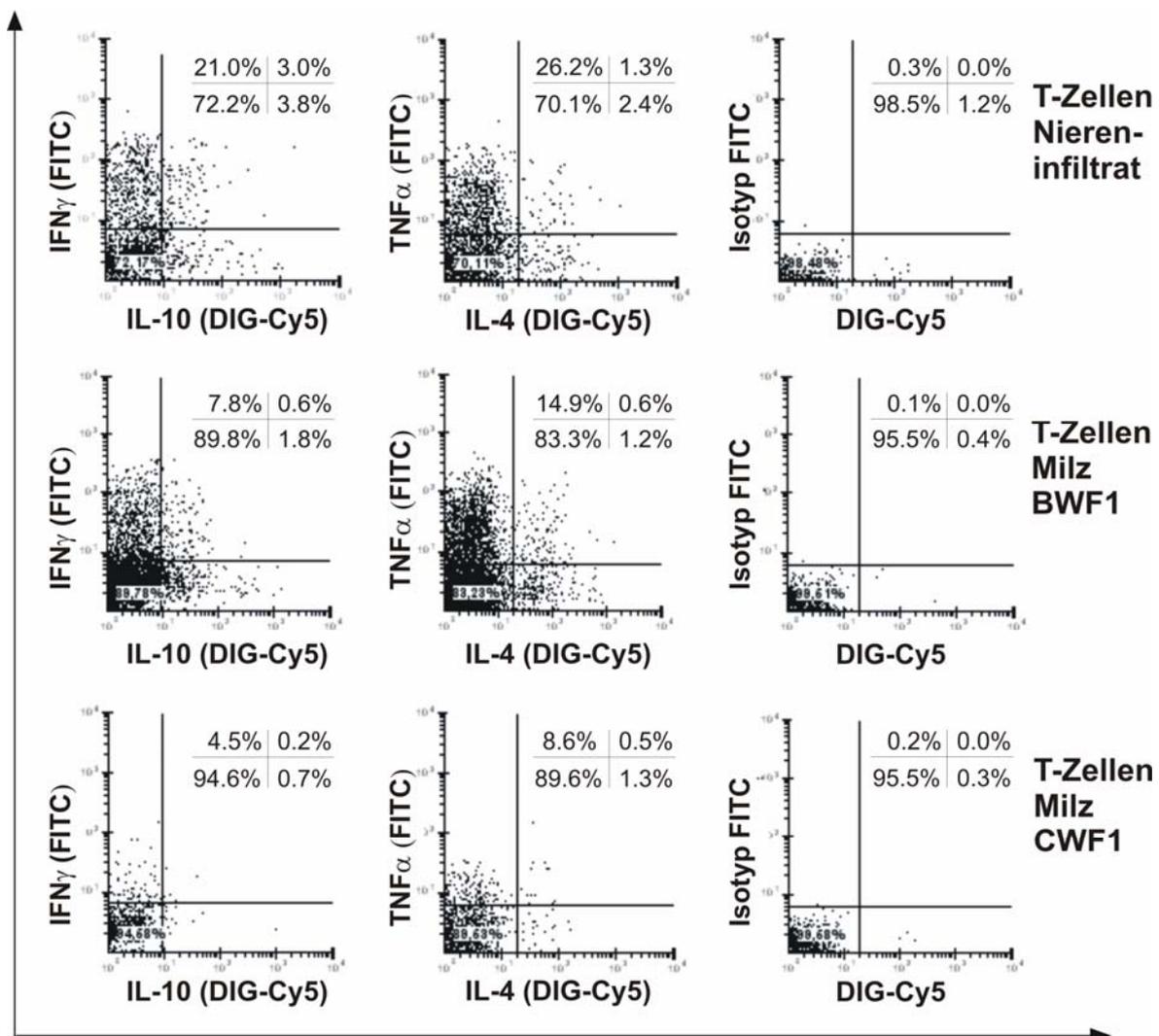
**Abbildung 13:** CD71-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Anzahl von blastischen T-Zellen aus den Nieren und aus der Milz von nephritischen BWF1-Mäusen.

Nach der CD71-Expression (MW 4,9%  $\pm$ 1,8) und dem Anteil von blastischen T-Lymphozyten (MW 7,4%  $\pm$ 2,3) zu urteilen, proliferieren die T-Zellen gering im entzündetem Nierengewebe. Die T-Zellen aus der Milz der entsprechenden BWF1-Mäuse zeigten eine vergleichbare CD71-Expression (MW 6,1%  $\pm$ 3,1) und waren zu MW 3,7%  $\pm$ 1,4 blastisch (kein signifikanter Unterschied). Bei alten CWF1-Mäusen waren MW 7,9%  $\pm$ 2,5 der T-Zellen Blasten (kein signifikanter Unterschied).

#### 4.2.2 Charakterisierung der Zellen anhand ihrer Zytokinproduktion

Werden  $CD4^+$  T-Effektorzellen aktiviert, wird ihr Zytokingedächtnis aufgerufen. Anhand der infolgedessen produzierten Zytokine können  $CD4^+$  T-Effektorzellen in zwei Gruppen eingeteilt werden: Th1 Zellen zeichnen sich durch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie  $IFN\gamma$ , IL-12 und  $TNF\alpha$  aus. Th2 Zellen hingegen produzieren Zytokine wie IL-4 und IL-5<sup>[122]</sup>. IL-10 wird ebenfalls zu den Th2 Zytokinen gezählt, allerdings ist die IL-10-Produktion nicht strikt auf Th2 Zellen begrenzt. Beispielsweise gibt es eine Subpopulation von  $IFN\gamma$  und IL-10 produzierenden Zellen, denen eine regulatorische Funktion zugeschrieben wird<sup>[123]</sup>.

Die Zytokinproduktion der T-Zellen aus Milz und Nieren von alten BWF1 und aus der Milz von alten CWF1 (Kontrollgruppe) wurden nach Stimulation der Zellen mit PMA/Ionomycin bestimmt.



**Abbildung 14:** Zytokinproduktion der T-Zellen aus Milz und Nieren nach Stimulation mit PMA/Ionomycin. Die Färbekontrolle (Färbung mit Isotypkontrolle FITC bzw. anti-DIG-Cy5 ohne Primärantikörper) zeigt den Hintergrund an unspezifischer Antikörper- oder Farbstoff-Bindung. Dargestellt sind die Ergebnisse eines Experimentes.

Die T-Zellen aus den Nieren zeichneten sich in erster Linie durch Produktion der proinflammatorischen Th1 Zytokine  $\text{IFN}\gamma$  (MW 16,8%  $\pm$ 4,9%) und  $\text{TNF}\alpha$  (MW 11,8%  $\pm$ 4,5%) aus. IL-4 (MW 1,1%  $\pm$ 0,1%) und IL-10 (MW 5,8%  $\pm$ 1,3%) wurden in wesentlich geringerem Ausmaß produziert, und die Anzahl der Produzenten dieser Zytokine wurde durch den höheren Hintergrund der IL-4 und IL-10 Färbung zusätzlich relativiert (der jeweilige Färbehintergrund wurde von den Daten abgezogen). Der Quotient der Th1 bzw. Th2 Markerzytokine  $\text{IFN}\gamma$  und IL-4 betrug 15,3  $\pm$ 5,1. Die in das Nierengewebe einwandernden T-Zellen zeichneten sich demnach durch ein deutliches Überwiegen von Th1-T-Zellen aus.

Auch in den Milzzellen der nephritischen BWF1-Mäuse zeigte sich ein deutliches Überwiegen der Th1-Antwort ( $\text{IFN}\gamma/\text{IL-4}$  Quotient: 2,8  $\pm$ 1,4). Bei den T-Zellen aus der Milz von CWF1 liessen sich ebenfalls mehr Th1-Zytokinproduzenten als Th2-Zytokinproduzenten nachweisen ( $\text{IFN}\gamma/\text{IL-4}$  Quotient: 2,7  $\pm$ 0,2), allerdings war das Überwiegen von Th1 T-Zellen nicht so ausgeprägt wie bei den BWF1-Mäusen. Allerdings ist hier nur Raum für eine Momentaufnahme der Zytokinproduktion der T-Lymphozyten aus der Milz von alten BWF1- und CWF1-Mäusen. Kinetische Studien unter anderem von unserer Arbeitsgruppe zeigen ein zunehmendes Überwiegen von Th1-Zellen mit dem Alter und Krankheitsverlauf bei BWF1-Mäusen, welches sich so beim CWF1 Mausstamm nicht findet (Enghard et al., Publikation eingereicht).

Demnach fand sich ein rein quantitatives Überwiegen von Th1 T-Zellen und gemessen am  $\text{IFN}\gamma/\text{IL-4}$  Quotient eine deutliche Dominanz der proinflammatorischen Th1 Antwort im Nierengewebe.

#### 4.2.3 Zusammenfassung

Im entzündeten Nierengewebe fand sich eine gemessen an der CD69-Expression hochaktivierte  $\text{CD4}^+$ -T-Zellpopulation (MW 28,4%  $\text{CD69}^+$ ). Die Expression von CD25 der  $\text{CD4}^+$  T-Zellen war eher gering (MW 8,6%  $\text{CD25}^+$ ). T-Zellen vom Memory/Effektorphänotyp (~55-60%) überwogen gegenüber naiven  $\text{CD4}^+$  T-Zellen (~40-45%). Gemessen an der CD71-Expression (MW 3,1%  $\text{CD71}^+$ ) und der Anzahl blastischer Zellen (MW 7,4% ) proliferiert nur eine geringe Anzahl der T-Zellen im Nierengewebe. Die T-Zellen exprimierten das costimulatorische Molekül CD28 in vergleichbarem Ausmaß wie die Milzzellen. T-Zellen von Th1 Typ (Markerzytokin  $\text{IFN}\gamma$ ) dominierten im Nierengewebe. Es fanden sich in geringem Ausmaß auch Zellen von Th2 Typ (Markerzytokin IL-4), ebenso wurden IL-10 produzierende Zellen im Nierengewebe nachgewiesen.

In den Milzen der jeweiligen BWF1-Mäuse präsentierten die  $\text{CD4}^+$  T-Zellen einen noch aktivierteren Phänotyp (MW 39,4%  $\text{CD69}^+$ ) und ~15%  $\text{CD25}^+$  Positive. Es zeigte sich ein deutliches Überwiegen von T-Zellen vom Memory/Effektortyp (~70-80%), während in der Milz der CWF1-Kontrollmäuse nur ~30% diesen Phänotyp aufwiesen. Auch bei den splenalen Zellen fand sich ein Überwiegen von Th1 T-Zellen.

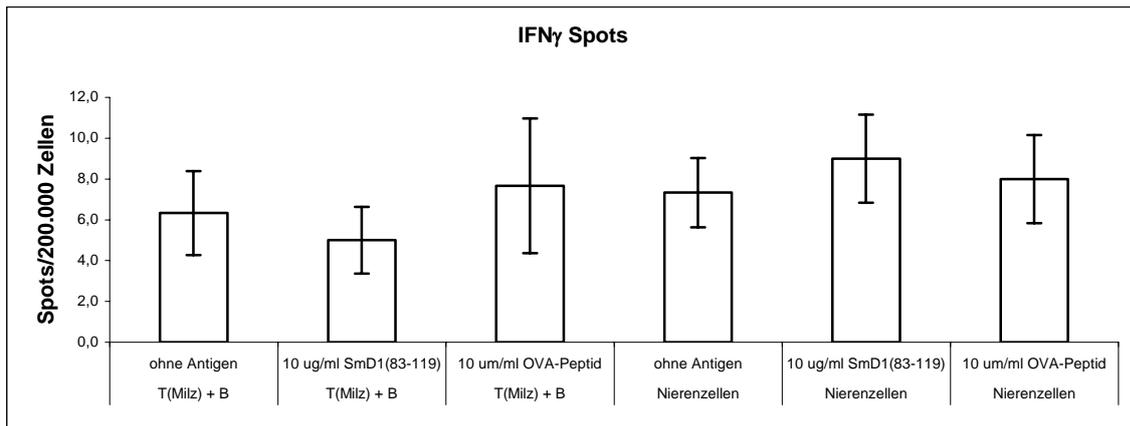
### 4.3 Funktionelle Charakterisierung der die Nieren infiltrierenden T-Zellen mit IFN $\gamma$ -ELISPOT

Es wurde die Hypothese überprüft, ob die in die Nieren infiltrierenden T-Zellen auf ihnen präsentiertes Smd1<sub>(83-119)</sub> mit einer IFN $\gamma$ -Sekretion reagieren. Eine solche Th1 Antwort der T-Zellen erscheint nicht unplausibel: Bei den T-Zellen im renalen Nierengewebe fand sich ein Überwiegen von Th1 Zellen; ferner würde eine Th1 proinflammatorische Reaktion der renalen T-Zellen in das in der Einleitung skizzierte Modell einer T-Zell-vermittelten Nephritispathogenese passen. In den folgenden Experimenten wurden T-Zellen mit APC's kokultiviert und mit dem IFN $\gamma$ -ZytokinELISPOT IFN $\gamma$  sezernierende Zellen nachgewiesen. Zum Überprüfen der Funktion des Essaysystems wurden T-Zellen aus der Milz von mit Smd1<sub>(83-119)</sub> Antigen immunisierten BWF1-Mäusen untersucht, bei welchen sich Reaktivität auf das Smd1<sub>(83-119)</sub> Peptid nachweisen liess (signifikante Zunahme der IFN $\gamma$  Spots bei Zugabe von Smd1<sub>(83-119)</sub>, Daten nicht gezeigt).

#### 4.3.1 Untersuchung der Reaktivität von renalen T-Zellen mit IFN $\gamma$ -ZytokinELISPOT

In den folgenden Experimenten wurden die mit Percoll-Dichtezentrifugation aus den Nieren isolierten Leukozyten ohne MACS-Sort auf den IFN $\gamma$ -Nachweisplatten mit oder ohne Antigen kultiviert. Bei den Zellen handelte es sich um eine Mischung aus T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen. Hinter dieser Vorgehensweise stand die Überlegung, die T-Zell-Antwort auf das Antigen am besten in dem APC-Milieu zu untersuchen, in dem sich diese Zellen auch *in vivo* finden. Parallel wurden aus der Milz isolierte T- und B-Zellen für den IFN $\gamma$ -ZytokinELISPOT kokultiviert, was der Zusammensetzung der Zellen in der Milz (v.a. T- und B-Zellen) annähernd entspricht.

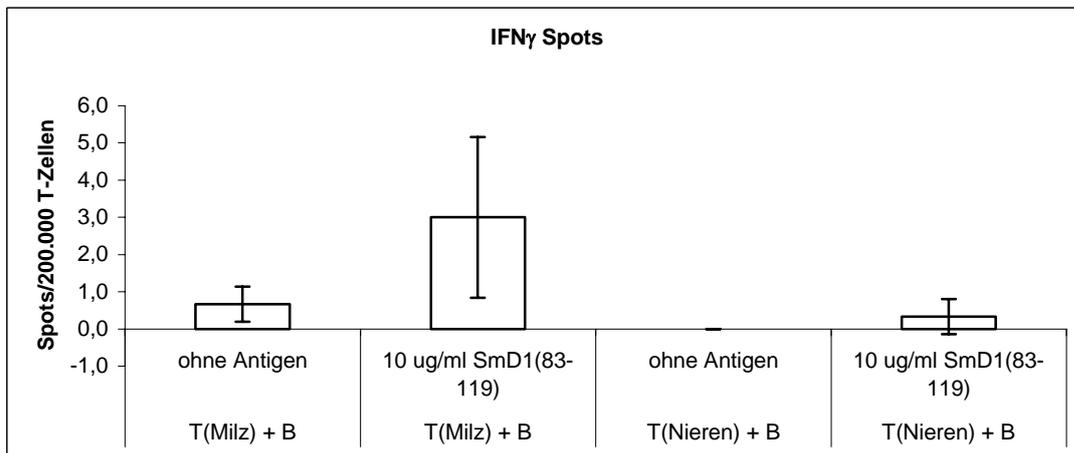
In insgesamt vier separaten Experimenten wurden auf diese Weise die Smd1<sub>(83-119)</sub>-Reaktivität der Zellen aus Milz und Nieren von BWF1-Mäusen (7-9 Monate alt, Proteinurie 300-2000mg/dl) untersucht. In keinem der Experimente konnte eine signifikante Zunahme der IFN $\gamma$  sezernierenden Zellen bei Antigenzugabe (Smd1<sub>(83-119)</sub> oder Kontrollpeptid) gezeigt werden. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes dargestellt.



**Abbildung 15:** IFN $\gamma$ -ZytokinELISPOT mit Leukozyten aus dem Nierengewebe und Milzzellen von nephritischen BWF1.

#### 4.3.2 IFN $\gamma$ -ZytokinELISPOT mit MACS sortierten Zellen aus Milz und Nieren

Um auszuschließen, dass die renalen Zellen aufgrund einer mangelnden Antigenpräsentation durch die aus dem Nierengewebe isolierten B-Zellen und Makrophagen nicht auf Antigenzugabe reagieren, wurden mit MACS sortierte T-Zellen aus den Nieren mit B-Zellen aus der Milz kokultiviert. Aufgrund anderer Experimente war anzunehmen, dass die B-Zellen aus der Milz das SmD1<sub>(83-119)</sub> Antigen T-Zellen präsentieren (Siehe AutoantikörperELISPOT: SmD1<sub>(83-119)</sub>-abhängige Stimulation von B-Zellen aus der Milz von nephritischen BWF1 durch T-Zellen aus jungen BWF1). Mit IFN $\gamma$ -ZytokinELISPOT wurde die Reaktivität von T-Zellen aus Milz und Nieren in Cokultur mit B-Zellen aus der Milz untersucht.



**Abbildung 16:** IFN $\gamma$ -ZytokinELISPOT mit Cokulturen bestehend aus T-Zellen aus der Milz bzw. renalen T-Zellen und B-Zellen aus der Milz. Zellen aus sechs BWF1-Mäusen, 8 Monate alt und Proteinurie von 300mg/dl.

Auch bei Verwendung von B-Zellen aus der Milz als Antigen-präsentierende-Zellen fand sich bei den T-Zellen aus den Nieren allenfalls eine geringe Stimulation der IFN $\gamma$ -Produktion, die jedoch

nicht das Signifikanzniveau erreichte. Bei den Milzzellen fand sich wie bei den vorhergehenden Experimenten ebenfalls keine signifikante ( $p=0,21$ ) Zunahme der  $IFN\gamma$  Spots.

#### 4.3.3 $IFN\gamma$ -ZytokinELISPOT mit Zellen aus MRL/lpr

Um der Hypothese nachzugehen, dass die Zellen im MRL/lpr-Mausmodell auf das  $SmD1_{(83-119)}$  Peptid mit einer  $IFN\gamma$ -Sekretion reagieren, wurden Zellen aus MRL/lpr mit  $IFN\gamma$ -ZytokinELISPOT analysiert. Leukozyten aus dem Nierengewebe und Splenozyten wurden aus alten, nephritischen MRL/lpr isoliert und mit oder ohne Antigenzugabe kultiviert und per ZytokinELISPOT analysiert. In zwei separaten Experimenten wurden die unsortierten renalen Leukozyten und Splenozyten aus MRL/lpr-Mäusen (Alter: 4-5 Monaten, Weibchen, Proteinurie:300) untersucht. Allerdings zeigte sich wie bei den BWF1-Mäusen bei Antigenzugabe keine Vermehrung der  $IFN\gamma$ -sezernierenden Zellen, weder bei den Splenozyten noch bei den aus dem Nierengewebe isolierten Leukozyten. In einem Versuchsansatz mit MACS-sortierten Milzzellen (T- und B-Zellen) aus MRL/lpr-Mäusen fand sich ebenfalls keine Reaktivität der Zellen auf  $SmD1_{(83-119)}$  im Sinne einer signifikanten Zunahme der  $IFN\gamma$ -Spots.

#### 4.3.4 Zusammenfassung

Es wurde versucht, mit  $IFN\gamma$ -ZytokinELISPOT eine Reaktivität der T-Zellen aus Milz und Nieren von bereits erkrankten SLE-Mäusen auf das  $SmD1_{(83-119)}$  Peptid nachzuweisen. Eine solche Th1 Reaktivität der T-Zellen aus nephritischer Mäuse konnte weder bei BWF1- noch MRL/lpr-Mäusen in verschiedenen Zellzusammensetzungen (unsortierte Zellen, MACS-sortierte Zellen und Kultivierung von B-Zellen aus der Milz mit T-Zellen aus den Nieren) gezeigt werden.

### 4.4 Funktionelle Charakterisierung der die Nieren infiltrierenden T-Zellen mit Autoantikörper-ELISPOT und ELISA

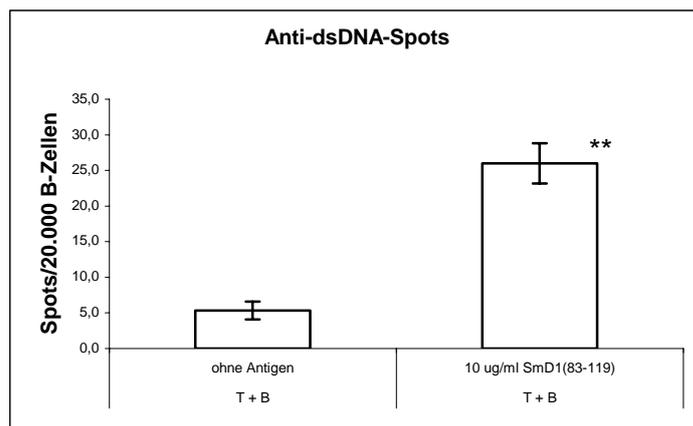
Ziel dieser Untersuchungen war zu prüfen, ob die T-Zellen aus den Nieren  $SmD1_{(83-119)}$ -abhängig B-Zellen zur Autoantikörperproduktion induzieren. Wie im Methodenteil beschrieben, wurden T- und B-Zellen für 5 Tage kokultiviert und anschließend die Anzahl an Anti-dsDNA-Antikörper produzierenden B-Zellen (ELISPOT) und die Konzentration an Autoantikörpern (Anti-dsDNA-IgG und Anti- $SmD1_{(83-119)}$ -IgG) im Kulturüberstand (ELISA) bestimmt.

#### 4.4.1 Etablierung des Essays mit T-Zellen aus jungen BWF1-Mäusen

Es ist bereits bekannt und publiziert, dass sich Milzzellen von BWF1-Mäusen durch Zugabe des Anti- $SmD1_{(83-119)}$  Antigens zur Produktion von Anti-ds-DNA-Ak's stimulieren lassen, was anhand

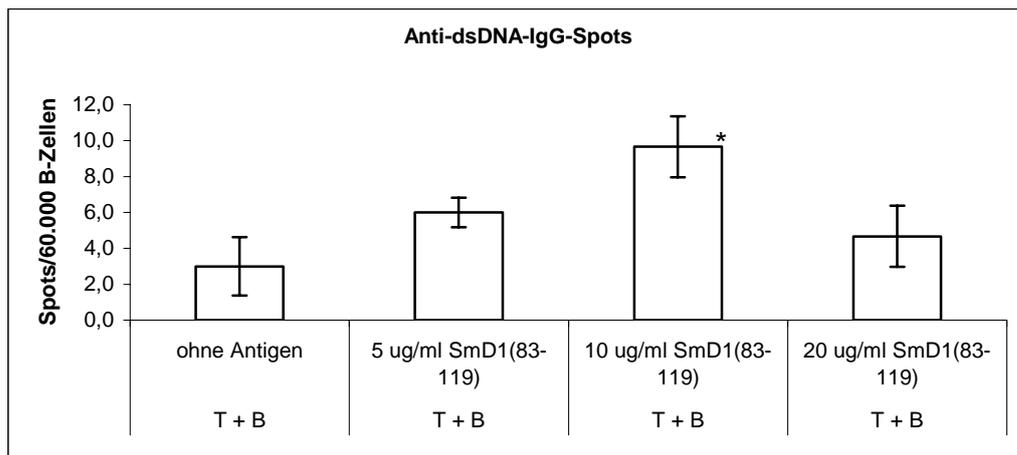
einer Zunahme an Anti-ds-DNA-Ak produzierenden Zellen gezeigt wurde<sup>[51]</sup>. Am effektivsten funktioniert diese Stimulierung in Cokulturen mit T-Zellen aus jungen BWF1 (8-15 Wochen alte Mäuse, in diesem Alter gelten die T-Zellen als am reaktivsten) und B-Zellen aus alten, bereits nephritischen BWF1-Mäusen (bei diesen älteren, nephritischen Tieren kann das Vorhandensein einer ausreichenden Zahl von Anti-dsDNA-spezifischen B-Zellen vorausgesetzt werden). Um zu überprüfen, ob sich diese Ergebnisse in unserem Labor reproduzieren lassen, wurden in zwei separaten Experimenten, T-Zellen aus der Milz junger und B-Zellen aus der Milz alter, nephritischer Mäuse mit oder ohne Antigen kokultiviert und die Anzahl an Anti-ds-DNA-Antikörpern produzierenden B-Zellen bestimmt (Experiment I und II).

**Experiment I:** Es wurden T-Zellen aus der Milz von 2 jungen BWF1-Mäusen (3-4 Monate alt, Proteinurie von 30mg/dl) mit B-Zellen aus 2 alten, nephritischen Tieren (7-9 Monate alt, Proteinurie von 2000mg/dl) kokultiviert und nach 5 Tagen die Anzahl an Anti-dsDNA-IgG AFC's bestimmt. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Anzahl an autoantikörperproduzierenden Zellen nach Kokultivierung mit dem Smd1<sub>(83-119)</sub> Antigen.



**Abbildung 17:** ELISPOT nach Cokultur mit T-Zellen aus jungen BWF1 und B-Zellen aus nephritischen BWF1 (je  $2 \cdot 10^6$  T-Zellen mit  $2 \cdot 10^5$  B-Zellen). \*\* $p < 0,01$

**Experiment II:** Es wurde ermittelt, mit welcher Antigenkonzentration sich die Zellen optimal zur Autoantikörperproduktion stimulieren lassen. T-Zellen aus jungen BWF1-Mäusen (3-4 Monate alt, Proteinurie von 30mg/dl) wurden 5 Tage unter Zugabe von verschiedenen Antigendosen mit aufgereinigten B-Zellen aus alten BWF1-Mäusen (7-9 Monate alt, Proteinurie von 2000mg/dl) kokultiviert. Die ELISPOT-Analyse zeigte, dass die meisten B-Zellen zur Anti-dsDNA-Antikörperproduktion bei einer Antigenkonzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  angeregt wurden. Die Abnahme der Anzahl an Anti-dsDNA-AFC's bei höherer Antigenkonzentration war im Übrigen nicht überraschend: Die präaktivierten autoreaktiven T-Zellen beim murinen lupus-like Syndrom werden durch hohe Antigendosen hyperaktiviert und gehen durch Apoptose zugrunde<sup>[50]</sup>.



**Abbildung 18:** ELISPOT nach Cokultivierung mit verschiedenen Autoantigenkonzentrationen. \* $p < 0,05$

In beiden Versuchen zeigte sich eine Zunahme der Anti-dsDNA-produzierenden B-Zellen durch Zugabe des SmD1<sub>(83-119)</sub> Antigens. T-Zellen aus jungen, pränephritischen BWF1-Mäusen geben demzufolge T-Zellhilfe für die Produktion von Anti-dsDNA-Antikörpern. Die Antigenkonzentration mit der besten Stimulationswirkung lag bei 10 ug/ml.

#### 4.4.2 Experimente mit aus den Nieren isolierten T-Zellen (BWF1)

Es wurde die Hypothese überprüft, ob auch die T-Zellen aus dem entzündeten Nierengewebe B-Zell-Hilfe zur Autoantikörperproduktion leisten und mit SmD1<sub>(83-119)</sub> reagieren. In den folgenden Experimenten wurden T-Zellen aus dem Nierengewebe isoliert und mit B-Zellen aus der Milz kokultiviert. Da die Nephritis und damit die Infiltration von T-Zellen in das Nierengewebe erst bei älteren Tieren auftritt, stammen sowohl die T- als auch die B-Zellen in diesen Experimenten aus alten (7-9 Monate) BWF1-Mäusen. Als klinischer Marker für Nephritis wurde die Proteinurie der Tiere herangezogen: Zur Isolierung von T-Zellen aus den Nieren wurden nur Mäuse mit einer starken Proteinurie von 300-2000 mg/dl als Spender ausgewählt. Trotz dieser Vorauswahl und dem Poolen der Zellen aus mehreren Tieren konnte nicht immer eine so große Anzahl an T-Zellen aus den Nieren isoliert werden, um je  $2 \cdot 10^6$  T-Zellen mit B-Zellen zu kokultivieren. In diesen Fällen wurden  $1 \cdot 10^6$  T-Zellen mit B-Zellen kokultiviert (in den entsprechenden Experimenten sind die Zellzahlen angemerkt).

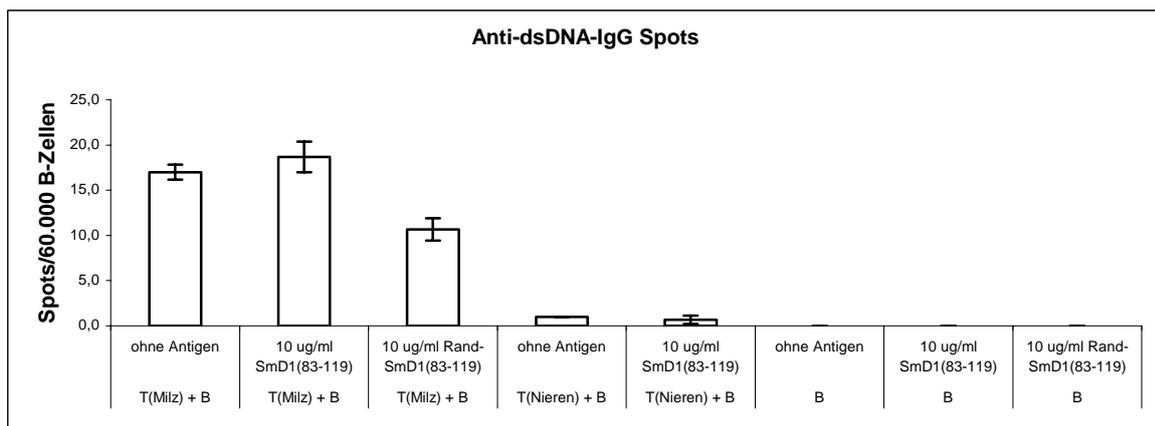
Jeweils parallel zu den T-Zellen aus den Nieren wurden T-Zellen aus der Milz der Mäuse isoliert und mit B-Zellen (aus der Milz) kokultiviert und die Anzahl an Anti-DNA-Autoantikörperproduzenten bestimmt. Diese parallele Untersuchung von T-Zellen aus der Milz diente zum Vergleich der Stimulierbarkeit durch T-Zellen aus Milz und Nieren und zur internen Kontrolle des Essays. In den Experimenten, in denen lediglich  $1 \cdot 10^6$  renale T-Zellen pro Cokultur zur Verfügung standen, wurden sowohl Coculturen mit  $1 \cdot 10^6$  als auch  $2 \cdot 10^6$  T-Zellen

aus der Milz plus B-Zellen analysiert.

In zwei separaten Experimenten wurden die Zellen aus nephritischen BWF1-Mäusen (7-9 Monate alt, Proteinurie: 300-2000 mg/dl) isoliert und T- und B-Zellen mit MACS aufgereinigt. Es wurden T-Zellen aus der Milz und aus den Nieren jeweils mit B-Zellen aus der Milz kokultiviert und die Anzahl an Anti-dsDNA-Autoantikörperproduzenten mit ELISPOT bestimmt. Als „Low“-Kontrolle wurden B-Zellen ohne T-Zellen mit und ohne Antigenzugabe kultiviert.

#### 4.4.2.1 IgG Anti-dsDNA-Antikörper-ELISPOT

In zwei separaten Experimenten wurden die Zellen aus nephritischen BWF1-Mäusen (7-9 Monate alt, Proteinurie: 300-2000 mg/dl) isoliert und T- und B-Zellen mit MACS aufgereinigt. Es wurden T-Zellen aus der Milz und aus den Nieren jeweils mit B-Zellen aus der Milz kokultiviert und die Anzahl an Anti-dsDNA-Autoantikörperproduzenten mit ELISPOT bestimmt. Als „Low“-Kontrolle wurden B-Zellen ohne T-Zellen mit und ohne Antigenzugabe kultiviert.



**Abbildung 19:** Nachweis von IgG-Autoantikörperproduzenten nach Kokultivierung von je  $2 \cdot 10^6$  T-Zellen aus Milz bzw. Nieren mit B-Zellen. Zellen gepoolt aus 12 BWF1-Mäusen.

Es zeigte sich keine signifikante Zunahme der Anti-dsDNA-AFC's durch Zugabe des SmD1<sub>(83-119)</sub> Antigens. Auffällig war, dass sich in den Kokulturen mit T(Nieren) wesentlich weniger Anti-dsDNA-Produzenten fanden, als in den Kokulturen mit T(Milz)-Zellen. T-Zellen aus der Milz scheinen demnach verglichen mit den renalen T-Zellen eher ein Milieu darzustellen, in welchem B-Zellen zur Autoantikörperproduktion angeregt werden. Eine Reaktivität auf das Autoantigen konnte nicht nachgewiesen werden.

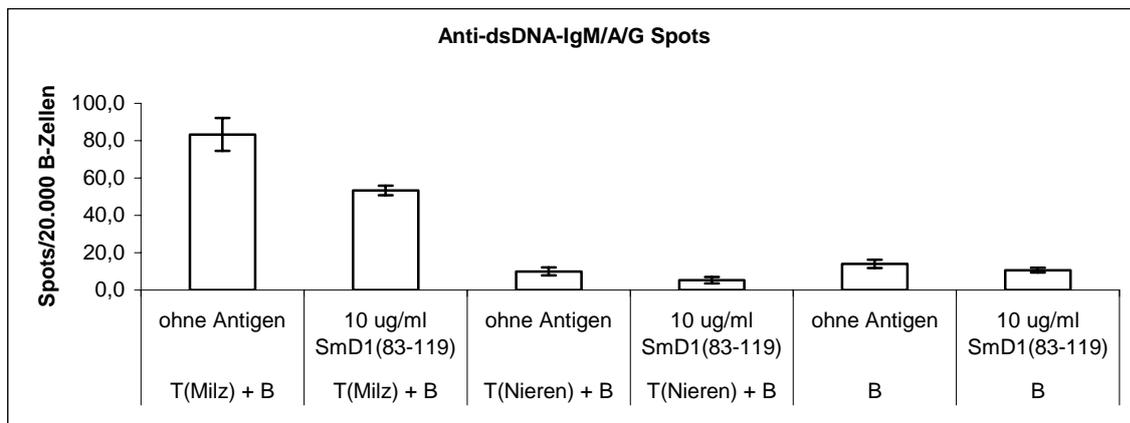
#### 4.4.2.2 IgM/G/A Anti-dsDNA-Antikörper-ELISPOT

Da sich beim Nachweis von IgG-Autoantikörperproduzenten bei alten, nephritischen Mäusen

keine Stimulierbarkeit durch SmD1(83-119) zeigen ließ, sollte geprüft werden, ob die Zellen zur Produktion von anderen Antikörperisotypen angeregt werden.

Werden naive B-Zellen zur Antikörperproduktion aktiviert, so sind die ersten produzierten Antikörper vom IgM-Isotyp. In den folgenden Experimenten sollte geklärt werden, ob sich eine Zunahme der Anzahl an Anti-dsDNA-AFC's findet, wenn nicht nur selektiv IgG-Antikörper, sondern auch andere Antikörperisotypen inklusive IgM nachgewiesen werden.

In zwei Experimenten (BWF1 im Alter von 7-9 Monaten) wurden nach 5d-Cokultivierung mit ELISPOT die Anzahl an Anti-dsDNA-AFC's mit Hilfe eines Nachweisantikörpers gegen IgG, IgA und IgM bestimmt. Exemplarisch sind die Ergebnisse eines Experimentes dargestellt.



**Abbildung 20:** Je  $1 \cdot 10^6$  T-Zellen aus Milz bzw. Nieren wurden mit  $2 \cdot 10^5$  B-Zellen aus der Milz kokultiviert; Nachweis von IgG, IgA und IgM Anti-dsDNA-AFC's.

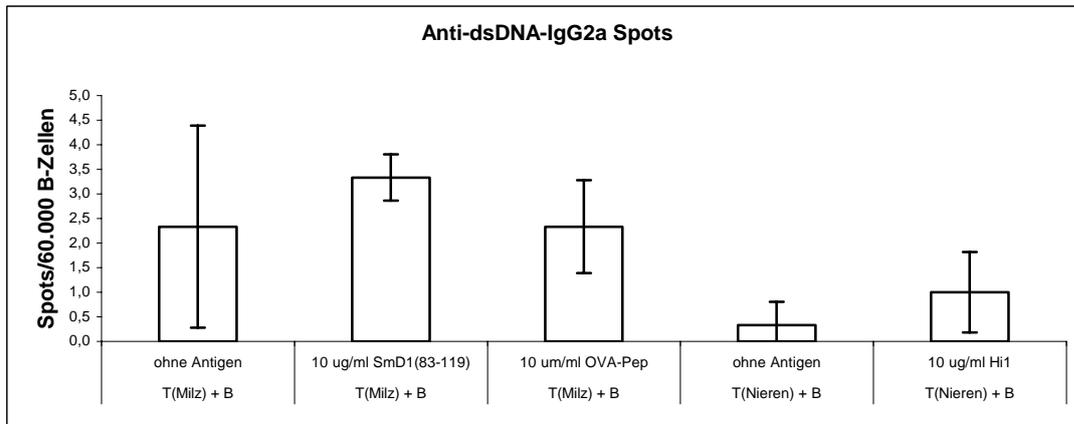
In den Versuchen zeigte sich auch bei Einbeziehung von IgM, IgA und IgG-Antikörpern kein Ansteigen der Anzahl an Anti-dsDNA-AFC's durch Zugabe des SmD1<sub>(83-119)</sub> Antigens. Auch in diesen Experimenten war die Anzahl an Autoantikörperproduzenten nach Cokultur mit T-Zellen aus der Milz entschieden höher als nach Cokultur mit renalen T-Zellen. Erwartungsgemäß fanden sich insgesamt höhere Zahlen an antikörperproduzierenden Zellen (anti-dsDNA), da nicht nur IgG- sondern auch IgM- und IgA-Produzenten nachgewiesen wurden.

#### 4.4.2.3 IgG2a Anti-dsDNA-Antikörper-ELISPOT

Gegen DNA gerichtete Antikörper vom IgG2a Subtyp spielen in murinen Modellen für den SLE eine besondere Rolle. Beispielsweise finden sich im Eluat der Antikörperablagerungen aus nephritischen Nieren bei SLE insbesondere Autoantikörper vom IgG2a Subtyp<sup>[124]</sup>. Interessant ist auch, dass der Antikörperklassenwechsel zum IgG2a Subtyp nicht unter dem Einfluss der klassischen Th2 T-Zellen stattfindet, sondern durch Wechselwirkung mit Th1 T-Zellen induziert wird<sup>[109]</sup>.

In zwei Experimenten (Zellen aus BWF1, 7-9 Monate alt, Proteinurie von 300-2000mg/dl) wurde

untersucht, ob sich eine Stimulierung der Menge an Anti-dsDNA-AFC's findet, wenn selektiv IgG2a Autoantikörper nachgewiesen werden.

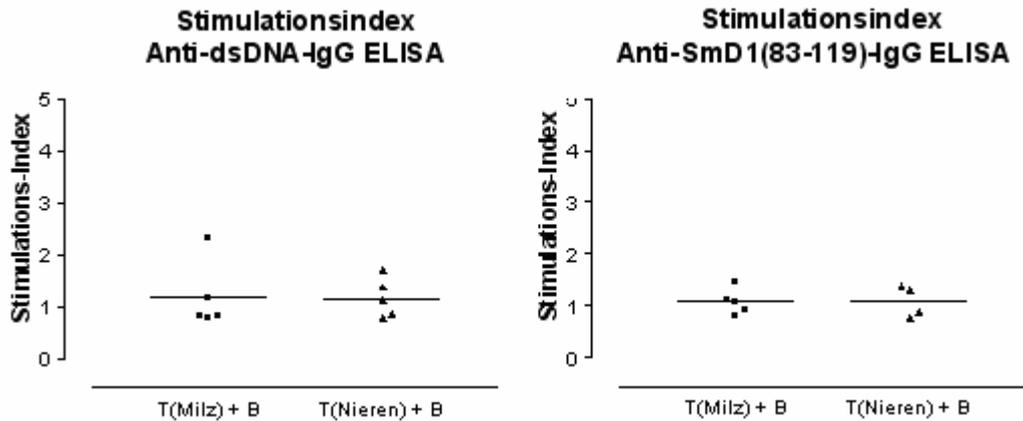


**Abbildung 21:** Nach Cokultivierung von  $1 \cdot 10^6$  T-Zellen aus alten nephritischen BWF1 wurden im ELISPOT die IgG2a Anti-dsDNA-Produzenten nachgewiesen.

Auch bei selektivem Nachweis von IgG2a fand sich in keinem der Versuche eine signifikante Zunahme der Anzahl der Anti-dsDNA-AFC's, weder in Cokulturen mit T(Milz), noch in Cokulturen mit T(Nieren).

#### 4.4.3 IgG-Autoantikörper-ELISA (BWF1)

Parallel zu den ELISPOT-Essays wurden mit ELISA die Anti-dsDNA-IgG und die Anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgG Autoantikörperkonzentration in den Kulturüberständen nach 5tägiger Cokultur bestimmt. Die ELISA-Ergebnisse deckten sich mit den ELISPOT Ergebnissen insofern, dass sich sowohl in Cokulturen mit T-Zellen aus der Milz als auch in Cokulturen mit renalen T-Zellen keine signifikante Zunahme der Autoantikörperkonzentration durch Antigenzugabe fand. Nur ein Experiment fiel aus diesem Muster heraus, und zeigte eine signifikante Zunahme der IgG-Autoantikörperkonzentration sowohl für Anti-dsDNA als auch für Anti-SmD1-IgG. Da es sich um ein einziges Ergebnis handelte, welches im Widerspruch zu den ELISA-Daten der anderen Versuche und den ELISPOT-Ergebnissen steht, wurde es als Ausreisser gewertet. Die Ergebnisse als Ganzes analysiert, fand sich bei den Cokulturen mit T-Zellen aus der Milz und den Ansätzen mit T-Zellen aus den Nieren keine signifikante Zunahme der Autoantikörperkonzentration im Kulturüberstand (kein Stimulationsindex signifikant ungleich 1).



**Abbildung 22:** Stimulationsindices, errechnet aus den Autoantikörperkonzentrationen mit SmD1<sub>(83-119)</sub> Zugabe dividiert durch Autoantikörperkonzentration ohne Antigenzugabe. Von einem Ausreisser abgesehen, liegen alle Stimulationsindices ungefähr bei 1 (Stimulationsindex bei T-Zellen aus der Milz Anti-dsDNA-IgG: 1,18, Anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgG: 1,08; T-Zellen aus den Nieren Anti-dsDNA-IgG: 1,17, Anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgG: 1,08), was einem Gleichbleiben der Autoantikörperkonzentration in den Kulturen bei SmD1<sub>(83-119)</sub> Zugabe entspricht.

#### 4.4.4 Zusammenfassung

Es wurde untersucht, ob T-Zellen aus den Nieren und der Milz von alten, nephritischen BWF1-Mäusen unter Zugabe von SmD1<sub>(83-119)</sub> Peptid B-Zellen zur Autoantikörperproduktion anregen. Während mit den Zellen aus jungen BWF1-Tieren eine solche Reaktivität gezeigt werden konnte, gelang dies im Fall der T-Zellen aus alten BWF1 nicht. Weder bei den T-Zellen aus der Milz, noch bei den T-Zellen aus den Nieren der nephritischen BWF1-Mäusen konnte unter Einbeziehung verschiedener Antikörperisotypen (IgG, IgG2a, IgG/IgM/IgA) eine signifikante Zunahme der Anti-dsDNA-Spots bei SmD1<sub>(83-119)</sub> Zugabe beobachtet werden. Im parallel durchgeführten ELISA zeigte sich ebenfalls keine Zunahme der Autoantikörperkonzentration bei SmD1<sub>(83-119)</sub> Zugabe. Dementsprechend konnte keine SmD1<sub>(83-119)</sub>-abhängige B-Zell-Hilfe durch die T-Zellen zur Antikörperproduktion (Th2), noch eine antigenabhängige Modifikation der Antikörperproduktion (Klassenwechsel zu IgG2a, Th1) nachgewiesen werden.

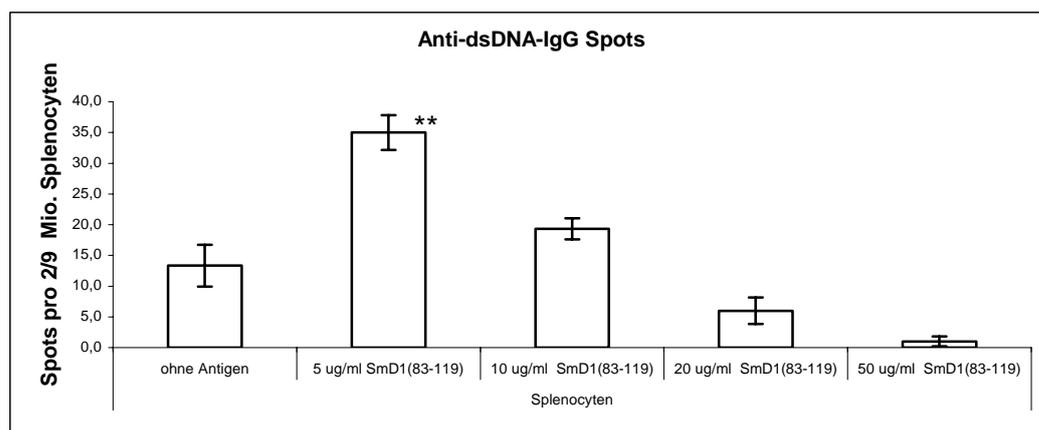
#### 4.4.5 Etablierung des *in vitro* Nachweises der Reaktivität auf SmD1<sub>(83-119)</sub> im MRL/lpr-Modell

Die Ergebnisse der Versuche mit Zellen aus BWF1-Mäusen weisen zwar in die Richtung, dass die T(Nieren)-Zellen nicht im Sinne einer B-Zell-Hilfe mit dem SmD1<sub>(83-119)</sub> Peptid reagieren. Allerdings ließ sich in diesen Experimenten eine Stimulierung der B-Zellen durch T(Milz) aus alten BWF1-Mäusen ebenfalls nicht nachweisen, was unseren Erwartungen hinsichtlich der Reaktivität von Milzzellen auf das SmD1<sub>(83-119)</sub> Peptid widersprach.

Es wurde versucht, die Reaktivität auf das SmD1<sub>(83-119)</sub> Peptid in einem anderen Mausmodell, dem MRL/lpr-Stamm, nachzuweisen. Kennzeichnend für diese Mäuse ist unter anderem, dass sie in wesentlich jüngerem Alter an einem Lupussyndrom erkranken. Ziel war, die Etablierung des *in vitro* Nachweises der Reaktivität auf SmD1<sub>(83-119)</sub> von MRL/lpr-Zellen, um in diesem Modell die Reaktivität oder Nichtreaktivität der in das Nierengewebe einwandernden T-Zellen zu analysieren.

In zwei separaten Experimenten wurden die Splenozyten (ohne MACS-Sortierung) von jeweils zwei phänotypisch bereits erkrankten MRL/lpr-Mäusen (4-5 Monate alt, Männchen, Proteinurie 30-300mg/dl) mit oder ohne Antigenzugabe kultiviert und im Anschluss mit Anti-dsDNA-ELISPOT analysiert.

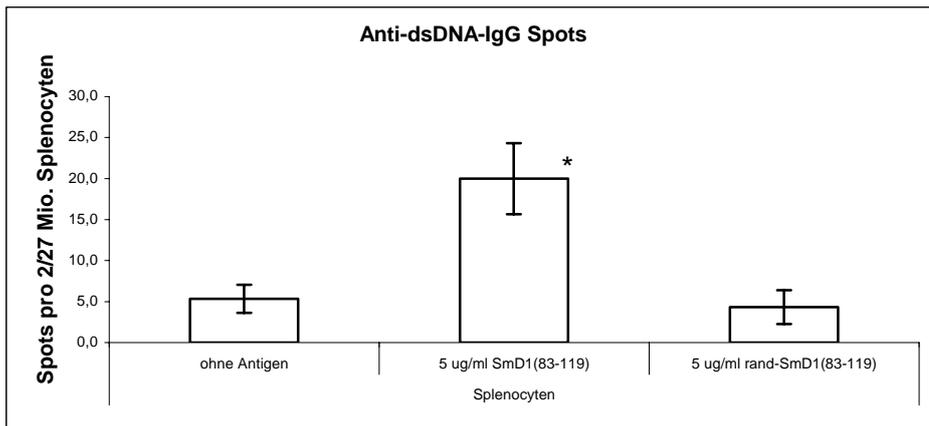
Zuerst wurde in einem ersten Experiment geprüft, ob sich MRL/lpr-Milzzellen mit SmD1<sub>(83-119)</sub> Peptid zur Autoantikörperproduktion stimulieren lassen. Es wurden verschiedene Peptidkonzentrationen zwischen 5-50µg/ml ausprobiert, um die optimale Antigenkonzentration zu ermitteln.



**Abbildung 23:** Kultur von  $2 \cdot 10^6$  Splenozyten mit verschiedenen Antigenkonzentrationen und ELISPOT-Analyse. Spots pro  $2/9 \cdot 10^6$  Splenozyten. \*\* $p < 0,01$

Splenozyten aus MRL/lpr-Mäusen ließen sich durch Zugabe des SmD1<sub>(83-119)</sub> Antigens zur Anti-dsDNA-IgG Produktion anregen. Optimale Konzentration zur Stimulierung der Autoantikörperproduktion war 5µg/ml Antigen.

In einem zweiten Experiment wurde geprüft, ob die Stimulierbarkeit der Autoantikörperproduktion reproduzierbar und antigenspezifisch ist. Es wurden Splenozyten aus nephritischen MRL/lpr mit Antigen kultiviert. Als Kontrollpeptid wurde randomisiertes SmD1<sub>(83-119)</sub> Peptid (zusammengesetzt aus den selben Aminosäuren wie das SmD1<sub>(83-119)</sub> Peptid, allerdings in zufälliger Sequenz) verwendet.



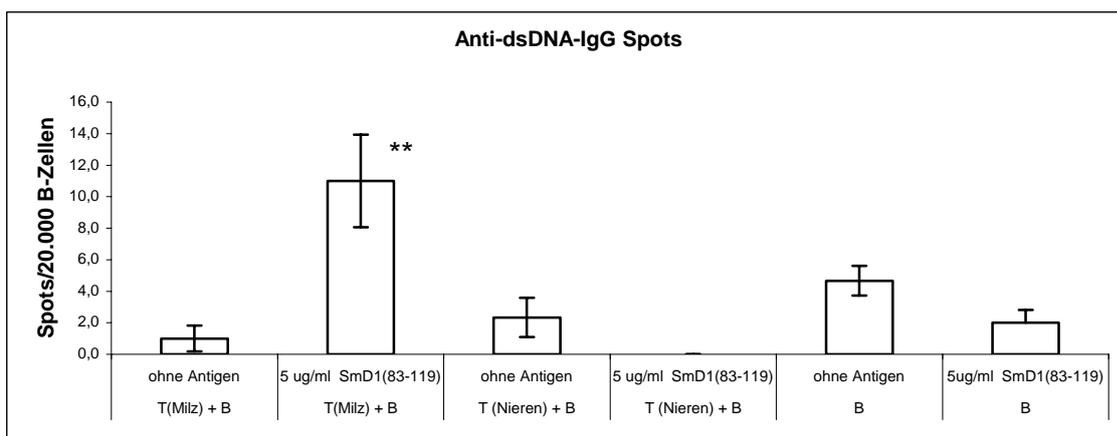
**Abbildung 24:** Kultur von Splenocyten (je  $2 \cdot 10^6$ ) mit Autoantigen und Kontrollpeptid. Spots pro  $2/27 \cdot 10^6$  Splenocyten. \* $p < 0,05$

Die SmD1<sub>(83-119)</sub>-abhängige Stimulierbarkeit war reproduzierbar, die Zugabe von randomisiertem SmD1<sub>(83-119)</sub> Peptid hingegen führte nicht zur Zunahme der Anti-dsDNA-Antikörperproduzenten.

In beiden Experimenten zeigte sich eine signifikante Steigerung der Anzahl von Anti-dsDNA-AFC's bei Zugabe von  $5 \mu\text{g/ml}$  SmD1<sub>(83-119)</sub>, sowohl verglichen mit den Kulturen ohne Antigenzugabe als auch verglichen mit den Kulturen mit Kontrollpeptid.

#### 4.4.6 Experimente mit aus den Nieren isolierten T-Zellen (MRL/lpr)

Es wurden T-Zellen aus der Milz und den Nieren von nephritischen MRL/lpr (4-5 Monate alt, Weibchen, Proteinurie von 300mg/dl) isoliert und mit B-Zellen aus der Milz cocultiviert. Mit Anti-dsDNA-ELISPOT wurde die Anzahl an autoantikörperproduzierenden B-Zellen analysiert.



**Abbildung 25:** ELISPOT nach 5d Cokultur mit T-Zellen aus der Milz und renalen T-Zellen (jeweils  $2 \cdot 10^6$  T-Zellen mit  $2 \cdot 10^5$  B-Zellen). \*\* $p < 0,01$

Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Anzahl Anti-dsDNA-AFC's bei Zugabe des

SmD1<sub>(83-119)</sub> Peptids zu der Cokultur mit T-Zellen aus der Milz. Im Fall der renalen T-Zellen zeigte sich hingegen keine Zunahme der Anti-dsDNA-Spots.

#### 4.4.7 Anti-dsDNA IgG ELISA-Daten (MRL/lpr)

In den Kulturüberständen der Cokulturen nach 5d wurde die Anti-dsDNA-IgG und die Anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgG Autoantikörperkonzentration bestimmt. Es wurde der Stimulationsindex der einzelnen Experimente errechnet, das heisst die Konzentration der Autoantikörper in Cokulturen mit SmD1<sub>(83-119)</sub> Zugabe dividiert durch die Konzentration der Cokulturen ohne Antigenzugabe.

In den Überständen der Kulturen mit Milzzellen fand sich reproduzierbar eine Zunahme der Anti-dsDNA-IgG und der Anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgG Konzentration (Mittelwert Stimulationsindices Anti-dsDNA-IgG: 1,43; Mittelwert Stimulationsindices Anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgG: 1,23). Die Zunahme der Anti-dsDNA-IgG-Konzentration bei Antigenzugabe war signifikant (Stimulationsindex > 1, p < 0,05). Allerdings war die Zunahme der Autoantikörperkonzentration weit weniger ausgeprägt, als die Zunahme der Anzahl Anti-dsDNA-AFC's im ELISPOT.

In den Cokulturen mit T-Zellen aus den Nieren zeigte sich wie schon beim dsDNA-ELISPOT keine Zunahme der Autoantikörperkonzentration durch Antigenzugabe (Stimulationsindex Anti-dsDNA-IgG: 0,98; Stimulationsindex Anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgG: 0,92).

#### 4.4.8 Zusammenfassung

Es konnte erstmals eine Reaktivität von T-Zellen aus der Milz von nephritischen MRL/lpr-Mäusen mit dem SmD1<sub>(83-119)</sub> Peptid im Sinne einer B-Zell-Hilfe zur Antikörperproduktion nachgewiesen werden. Sowohl im Autoantikörper-ELISPOT als auch im ELISA zeigte sich eine Zunahme der Autoantikörperproduktion durch die Zugabe von SmD1<sub>(83-119)</sub>. Diese Stimulierbarkeit ist antigenspezifisch und T-Zell-abhängig. Aus dem entzündeten Nierengewebe von MRL/lpr isolierte T-Zellen gaben keine SmD1<sub>(83-119)</sub>-abhängige B-Zell-Hilfe zur Autoantikörperproduktion.