

## 5 Diskussion

Eine der charakteristischen Organmanifestationen des systemischen Lupus erythematoses ist die Lupusnephritis. Im Rahmen dieser Nephritis kommt es zu einer Infiltration von Leukozyten in das entzündete Nierengewebe. Die Rolle dieses vor allem aus T-Lymphozyten bestehenden Infiltrates bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Nierenentzündung ist unklar.

In der vorliegenden Arbeit findet sich erstmals eine zusammenhängende durchflusszytometrische Analyse der in die Nieren infiltrierenden T-Zellen hinsichtlich grundlegender T-Zell Charakteristika - wie Aktivierungszustand, dem Phänotyp bezüglich naive oder Memory/Effektor-Zellen, der Proliferationsaktivität im Gewebe und die Zuordnung zum Th1/Th2 Typ. Über die Funktion der renalen T-Zellen bei der Lupusnephritis gibt es kaum Daten, über ihre Antigenreaktivität gibt es lediglich Spekulationen. Die von uns aus den Nieren isolierten T-Zellen wurden funktionell im Hinblick auf ihre Reaktivität mit dem SmD1<sub>(83-119)</sub> SLE-Autoantigen untersucht.

Grundlage für die Validität der Ergebnisse ist, dass bei der Gewinnung der Zellen tatsächlich die infiltrierenden Leukozyten isoliert wurden und nicht etwa Blutleukozyten aus den intrarenalen Gefäßen. Um die Gefahr einer solchen „Kontamination“ der isolierten Zellen mit Blutleukozyten zu minimieren, wurde das Blut aus dem Kreislauf und den Nieren durch *in situ* Spülen entfernt. Durch den Spülvorgang wurde 85-87,5% des Blutes (gemessen am Hb-Gehalt) aus den Nieren gewaschen. Ferner ist anzunehmen, dass das in den Nieren verbleibende Hämoglobin nicht ausschließlich von Blutresten aus den intrarenalen Gefäßen stammt, sondern zum Teil aus Blutablagerung in den entzündeten Nierentubuli (Hämaturie). Mit dem gewählten Vorgehen zur Zellisolierung ließen sich aus den nicht-entzündeten Nieren von gesunden, nicht-autoimmunen Mäusen lediglich 5% der Menge an T-Zellen isolieren, die aus nephritischen Nieren gewonnen wurden. Demnach stammen rund ~95% der T-Zellen, die aus den Nieren der autoimmunen, nephritischen Mäuse isoliert wurden, aus dem Infiltrat des Nierengewebes. Die für die Experimente aus den Nieren isolierten Leukozyten können also weitgehend als Zellen des intrarenalen Entzündungsinfiltrates angesehen werden. Allerdings muß davon ausgegangen werden, dass trotz Spülens des Kreislaufs ein gewisser Teil der gewonnenen Leukozyten nicht aus dem Nierengewebe, sondern aus intrarenalen Blutgefäßen stammte. Diese „Unschärfe“ der Zellisolation konnte minimiert, nicht jedoch völlig ausgeschlossen werden.

### 5.1 FACS Analyse des renalen Leukozyteninfiltrats

Mit Hilfe der FACS-Technik wurde die Zellzusammensetzung des renalen Leukozyteninfiltrates von BWF1-Lupusmäusen untersucht. Mit über 50% waren die Mehrheit der Zellen T-Zellen, gemessen an der Expression des T-Zell-Markers CD3. Fast 30% des Zellinfiltrates waren B220<sup>+</sup> B-Zellen, Makrophagen machten rund 10% der Zellen aus. Die Anzahl der B220<sup>-</sup> Plasmazellen wurde nicht untersucht.

Der hohe Anteil an B-Zellen steht im Widerspruch zu verschiedenen immunhistochemischen Arbeiten, welche in Nierenbiopsiematerial von SLE Patienten kaum („rare“ bzw. ~3%)<sup>[87, 88]</sup> bis maximal 20%<sup>[86]</sup> B-Zellen fanden. Eine Publikation zu den Zellen im Nierengewebe von nephritischen BWF1-Mäusen berichtet, dass B-Zellen in den Nieren nahezu nicht nachweisbar („virtually absent“) waren<sup>[95]</sup>. Dass es sich bei einem Teil der B220 positiven Zellen um atypische B220<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> T-Zellen handelt, wie sie beispielsweise massenhaft im MRL/lpr-Mausmodell auftreten, ist aufgrund der fehlenden CD3-Expression dieser Zellen auszuschließen. Wie es zu der Diskrepanz der eigenen Untersuchungen und den Publikationen anderer Arbeitsgruppen kommt, ist unklar. Es ist allerdings zu bedenken, dass fast alle publizierten Arbeiten an Biopsieproben von SLE Patienten durchgeführt wurden und nur eine Arbeit an BWF1-Mäusen.

Der Grund für die Akkumulation von B-Zellen im Nierengewebe ist unklar: Sind die B-Zellen an der lokalen Entzündungsreaktion beteiligt? Oder kommt es möglicherweise an dieser dafür untypischen Lokalisation zur Reifung der B-Zellen auf dem Weg zu antikörperproduzierenden Plasmazellen, ein Prozess, der normalerweise in den Lymphfollikeln stattfindet?

Der mit 10% deutliche Anteil an Makrophagen im Leukozyteninfiltrat fiel etwas geringer aus, als die Angaben der meisten bisher publizierten immunhistochemischen Arbeiten. In diesen Berichten machten die Makrophagen nach den T-Zellen die zweithäufigste infiltrierende Leukozytenart im Nierengewebe aus (Mengenangaben: ~40% der Gesamtzellen bzw. ~50% der Anzahl an T-Zellen; semiquantitative Angaben immunhistochemischer Untersuchungen)<sup>[88, 89]</sup>. Nur eine Arbeitsgruppe observierte nur „selten“ Makrophagen in den entzündeten Nieren<sup>[87]</sup>. Die vorgefundene deutliche Präsenz von Makrophagen im Nierengewebe spricht für eine Rolle dieser Zellen in der Vermittlung des lokalen Entzündungsprozesses.

Die renale T-Zell-Population setzte sich zu ~2/3 aus CD4<sup>+</sup> und zu ~1/3 aus CD8<sup>+</sup> T-Zellen zusammen. Das von uns aufgrund verschiedener Publikationen erwartete Überwiegen von CD4<sup>+</sup>T-Zellen wurde demnach bestätigt. Das vorgefundene CD4:CD8 Verhältnis von 2:1 fällt ungefähr in die Mitte der in den Berichten anderer Arbeitsgruppen recht schwankenden Angaben zur CD4:CD8 Ratio im Nierengewebe. Möglicherweise findet sich unter den renalen T-Zellen auch eine CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> T-Zell-Population, die in Abbildung 9 ungefähr 8% der Zellen ausmacht.

Die Prädominanz der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im renalen Leukozyteninfiltrat deutet auf eine besondere Rolle dieser T-Zellen in der Pathogenese der Lupusnephritis hin. Zusammen mit anderen Beobachtungen, wie der Hochregulation von MHCII Molekülen im Nierengewebe<sup>[94, 100]</sup> und der Akkumulation von T-Zellen mit oligoklonalen T-Zell-Rezeptoren<sup>[101, 102]</sup>, lässt das eine MHCII-CD4<sup>+</sup> T-Zell vermittelte, antigenspezifische Immunreaktion im Nierengewebe wahrscheinlich erscheinen. Aufgrund der wahrscheinlichen Schlüsselrolle von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in diesem Prozess wurden von uns selektiv die CD4<sup>+</sup> T-Zellen analysiert.

Die renalen T-Zellen wurden hinsichtlich Aktivierungszustand, Proliferationsaktivität, naiver oder Memory-/Effektor-Phänotyp und Zuordnung zum Th1-Th2 Typ untersucht. Parallel zu den renalen T-Zellen wurden jeweils T-Zellen aus der Milz der gleichen Spendertiere untersucht, um sich auch ein Bild von den nicht-renalen T-Zellen der nephritischen BWF1-Mäuse zu machen. Ob es sich dabei um einen geeigneten Maßstab und eine Vergleichsmöglichkeit für die renalen T-Zellen handelt, ist jedoch fraglich: Im Kontext der generalisierten Immunpathologie des SLE findet sich in der Milz keine „normale“ T-Zellpopulation, sondern die Milz ist miteinbezogen in die Immundysregulation. Als Kontrollgruppe wurden deshalb die T-Zellen aus der Milz von CWF1-Mäusen vergleichbaren Alters untersucht. Dabei handelt es sich um mit dem BWF1-Stamm verwandte und MHC-kompatible Mäuse, die allerdings nicht an einem SLE-Syndrom erkranken und allenfalls im Alter eine leichte Proteinurie entwickeln.

Bei der Interpretation der FACS-Daten ist ferner zu bedenken, dass im Rahmen des SLE die Expression von Oberflächenmolekülen dysreguliert sein könnte, wie es beispielsweise von CD40L bei SLE bekannt ist<sup>[125]</sup>. Deshalb hat die Expression gewisser Oberflächenmarker auf den untersuchten Zellen möglicherweise nicht dieselbe Bedeutung wie im Fall „normaler“ T-Zellen.

#### 5.1.1 Aktivierungszustand der Zellen

Nach Aktivierung von T-Zellen erscheinen einige zuvor nicht nachweisbare Moleküle auf ihrer Zelloberfläche, die daher auch Aktivierungsmarker genannt werden. Eines der ersten nach Zellaktivierung nachweisbaren Oberflächenmoleküle ist das „very-early-activation-antigen“ CD69<sup>[126, 127]</sup>. CD69 ist bereits wenige Stunden nach Aktivierung der Zellen nachweisbar, wird aber auch schnell wieder (mit einer Halbwertszeit von ~8h) von der Zelloberfläche eliminiert<sup>[113, 128]</sup>. In dem Niereninfiltrat exprimierten 28% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD69. Dieser große Anteil von CD69 positiven T-Lymphozyten an den *ex vivo* analysierten Zellen weist auf einen aktiven Entzündungsprozess im Nierengewebe hin, im Rahmen dessen ~1/3 der CD4<sup>+</sup> T-Zellen kürzlich aktiviert wurde. Die von uns gefundene CD69-Expression ist ähnlich dem Bericht einer anderen Arbeitsgruppe, die auf rund ~40% der T-Zellen in den Nieren CD69 nachweisen konnte<sup>[129]</sup>. In den Nieren findet sich demnach eine deutlich aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation, die anhand der starken CD69-Expression die Merkmale kürzlich aktivierter Zellen aufweist. Das passt zu der in einer immunhistochemischen Arbeit beschriebenen Expression von HLA-Dr auf der Mehrzahl der renalen T-Zellen (semiquantitative Angabe)<sup>[87]</sup>, was für einen aktivierten Phänotyp spricht.

Die vorgefundene CD69-Expression ist vergleichbar mit Daten von anderen chronischen Entzündungen. Rund 30% der T-Zellen in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit aktiver RA Gelenkentzündung sind CD69<sup>+</sup><sup>[130]</sup>, während ~20-40% der bei chronischer Hepatitis in der Leber zu findenden T-Zellen CD69 tragen<sup>[131]</sup>. Interessanterweise kann man bei der letzteren anhand der Anzahl CD69<sup>+</sup> T-Zellen zwischen der chronisch persistierenden und der chronisch

aktiven Form unterscheiden<sup>[131]</sup>. Diese Korrelation mit aktiver Organentzündung zeigt, dass die CD69-Expression das Ausmaß der tatsächlich stattfindenden Immunreaktion (und Organschädigung) widerspiegelt.

Die hohe Anzahl CD69<sup>+</sup> T-Zellen in den Nieren kann mit verschiedenen Hypothesen erklärt werden: Die CD69-Expression spiegelt möglicherweise kürzliche Aktivierung der Zellen im Nierengewebe wieder. Diese Zellaktivierung könnte durch antigenspezifische Zell-Zell Wechselwirkung oder auch durch antigenunspezifische „bystander activation“ über Zytokine vermittelt werden<sup>[132]</sup>. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit ist, dass die T-Zellen außerhalb der Nieren aktiviert werden und als präaktivierte Zellen in das entzündete Nierengewebe einwandern. Beispielsweise könnten die T-Zellen in der Milz aktiviert werden und über die Blutbahn in die Nieren einwandern und dort verbleiben.

Beim Vergleich des Aktivierungsmarker CD69 auf den Zellen aus Milz und Nieren der untersuchten BWF1-Mäuse fällt eine stärkere Präsenz (39,4% CD69 positiv) aktivierter T-Zellen in der Milz auf. Ähnliche Ergebnisse berichtet die Arbeitsgruppe um Ishikawa et al.: Während sich bei jungen BWF1-Mäusen (2 Monate) kaum CD69<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen ließen (~4%), waren bei alten BWF1 (8-12 Monate) ~50% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz CD69 positiv. In den Nieren von alten BWF1 fand diese Arbeitsgruppe ~40% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD69<sup>+</sup><sup>[129]</sup>. Die hohe Frequenz aktivierter T-Zellen in der Milz der BWF1-Mäuse erklärt sich am plausibelsten im Kontext der systemischen Immundysregulation bei SLE. Bedenkt man, dass in der Milz (Auto-)Antigene aus dem Blut gefiltert werden und Blutzellen durch Apoptose eliminiert werden und die Milz eine der Schaltstellen der Interaktion zwischen T-Zellen, B-Zellen und APC's ist, verwundert die vorgefundene starke Zellaktivierung nicht. Die in der Milz der CWF1-Kontrollmäuse gefundene CD69-Expression von 7,5% unterstreicht den massiven Aktivierungszustand der BWF1-Zellen.

Interessanterweise fanden sich im peripheren Blut von BWF1-Lupusmäusen und im Blut von SLE Patienten keine erhöhte Frequenzen von CD69<sup>+</sup> T-Zellen<sup>[129, 130]</sup>. Demnach ist das vermehrte Vorkommen von CD69<sup>+</sup> aktivierten T-Zellen nicht im gesamten Körper generalisiert, sondern beschränkt auf direkt in den Autoimmunprozess involvierte Organe wie Milz und Nieren. Hinsichtlich der Herkunft der hohen CD69-Expression in den Nieren macht diese Beobachtung ein Einwandern von aktivierten T-Zellen in das Gewebe unwahrscheinlich, wenn auch nicht unmöglich. In diesem Zusammenhang erscheint allerdings eine Aktivierung der T-Zellen lokal im Nierengewebe plausibler.

Für die funktionelle Einschätzung dieser Zellen könnte relevant sein, dass kürzlich-aktivierte CD69<sup>+</sup> T-Zellen wahrscheinlich nicht sehr antigenreaktiv sind: Wie Untersuchungen zur Reaktivität von T-Zellen zeigen, sind vor kurzem aktivierte T-Zellen gegenüber erneuter Antigenstimulation wesentlich unsensibler als T-Zellen, die schon längere Zeit keinen Antigenkontakt hatten<sup>[133]</sup>. In Experimenten mit T-Zellen aus der Milz von alten BWF1-Mäusen zeigte sich eine wesentlich geringere Zytokinproduktion der CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> Zellen nach

Restimulation verglichen mit den CD4<sup>+</sup>CD69<sup>-</sup> Zellen<sup>[129]</sup>. Die CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> Zellen zeigten sich nicht nur weniger reaktiv, sondern hemmten in Kokulturen sogar die Zytokinproduktion durch anderen T-Zellen<sup>[129]</sup>. Der von uns gefundene starke Aktivierungszustand der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Milz und Nieren gemessen an der CD69-Expression ist also nicht gleichzusetzen mit einer starken Reaktionsfreudigkeit dieser Zellen. Im Gegenteil sprechen verschiedene Beobachtungen für einen stimulationsrefraktären Zustand dieser Zellen.

Ein weiterer Aktivierungsmarker ist das Oberflächenmolekül CD25. CD25, die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors, wird 1-5d nach Zellaktivierung auf der Zelloberfläche von T-Zellen exprimiert, und die Zellen bleiben für einige Tage CD25 positiv<sup>[126, 127]</sup>. Des Weiteren wird CD25 aktivationsunabhängig von einer Subpopulation von T-Zellen konstitutiv exprimiert, den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen<sup>[134]</sup>. Von den renalen CD4<sup>+</sup> T-Zellen waren 8,6% CD25<sup>+</sup>. Die gefundene CD25-Expression steht im Widerspruch zu einer Publikation, die lediglich inkonsistente (nur in der Hälfte der untersuchten Biopsieproben) und nur auf wenigen interstitiellen Zellen nachweisbare CD25-Expression fand<sup>[88]</sup>. Interpretiert man die vorgefundene CD25-Expression als Aktivierungsmarker, so ist mit 8,6% ein weitaus geringerer Anteil der Zellen aktiviert als die CD69-Expression von 28% anzeigt.

Prinzipiell ebenso denkbar wäre, die renalen CD25<sup>+</sup> T-Zellen als regulatorische Zellen zu interpretieren, die im Endorgan Niere vergeblich dem Autoimmunprozess entgegensteuern. Andererseits scheint ein zahlenmäßig relevantes Vorkommen von regulatorischen T-Zellen in den Nieren abwegig, da die vorhandene Autoimmunerkrankung eher an einen Mangel an regulatorischen Zellen denken lässt. Da in dieser Arbeit keine funktionelle Analyse der CD25<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte, bleibt dies spekulativ.

Bemerkenswerterweise war die CD25-Expression auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz von BWF1 (15,2%) vergleichbar mit den CWF1-Kontrollmäusen (15,6%). Dieses Ergebnis widerspricht jüngeren Studien, die von einer erniedrigten Frequenz von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen beim SLE im Vergleich zu Kontrollen berichten<sup>[135, 136]</sup>. Diese Studien interpretieren das verminderte Vorkommen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen als Mangel an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen, welcher zur Autoimmunität beitragen könnte. Unsere Studien zeigen keine verminderte Anzahl von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz der autoimmunen BWF1 im Vergleich zu den gesunden CWF1.

Auch Zellproliferation ist mit Zellaktivierung assoziiert. Ein indirekter Marker für Zellaktivierung und Proliferation ist die Zellgröße: Aktivierte Zellen werden blastisch, also größer, und teilen sich. 7,4% der renalen CD4<sup>+</sup> T-Zellen waren gemessen am Forwards Scatter blastisch. Ein weiterer Marker für Zellproliferation ist der Transferrinrezeptor CD71. Sich teilende Zellen benötigen Eisen, also exprimieren diese Zellen Transferrinrezeptoren auf der Zelloberfläche<sup>[137-139]</sup>. Von den renalen CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimierten 4,9% CD71. Gemeinsam mit dem Blastenanteil spricht die CD71-Expression für eine gewisse Proliferationsaktivität der renalen T-

Zellen. Der Blastenanteil (3,7%) und die CD71-Expression (6,1%) der BWF1-T-Zellen aus der Milz war den renalen Zellen ähnlich (kein signifikanter Unterschied). Ferner fand sich kein signifikanter Unterschied zu dem Anteil blastischer T-Zellen aus der Milz von CWF1 (7,9%).

Betrachtet man die analysierten Aktivierungsmarker gemeinsam, fällt auf, dass die von uns gefundene hohe Anzahl von CD69 exprimierenden T-Zellen in scheinbarem Widerspruch zu der nur mäßigen Anzahl an CD25 und CD71 exprimierenden T-Zellen steht. Allerdings finden sich ähnliche Konstellationen auch bei anderen chronischen Entzündungen wie RA und chronischer Hepatitis<sup>[130, 131]</sup>. Demzufolge scheinen CD25 und CD71 im Kontext chronischer Entzündungen ihre Aussagekraft bezüglich der Zellaktivierung einzubüßen.

CD28 ist ein costimulatorischer Rezeptor, der sich auf allen T-Zellen findet. Zur vollen T-Zell-Aktivierung sind neben der Stimulation des T-Zell-Rezeptors Signale über costimulatorische Moleküle nötig, von denen CD28 einer der wichtigsten Vertreter ist. Im Zuge chronischer T-Zell-Aktivierung kann es zum Verlust der Expression von CD28 kommen<sup>[115, 116]</sup>, wahrscheinlich mit dem Ziel, die T-Zell-Antwort zu dämpfen. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis beispielsweise fanden sich im Blut vermehrt CD28 negative CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche in die Gelenke einwandern und mit Autoreaktivität assoziiert werden<sup>[117]</sup>. Ebenso soll es bei SLE zum vermehrten Vorkommen von CD28<sup>-</sup> T-Zellen im Blut kommen<sup>[118]</sup>, wobei andere Studien diesem Punkt widersprechen<sup>[140]</sup>. Wir haben die CD28-Expression der T-Zellen aus den chronisch-entzündeten Nieren des BWF1-Lupusmodells untersucht: Alle T-Zellen exprimierten CD28 und die Intensität der CD28-Expression war vergleichbar mit den T-Zellen aus der Milz. Es fand sich also kein Verlust des costimulatorischen CD28 auf den renalen oder splenalen T-Zellen. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit Untersuchungen an T-Zellen in SLE Hautmanifestationen, die keinen Verlust der CD28-Expression auf T-Zellen finden konnten<sup>[141]</sup>.

Allerdings kann eine chronische Zellaktivierung nur aufgrund normaler CD28-Expression nicht vollständig ausgeschlossen werden. Beispielsweise finden sich bei der rheumatoiden Arthritis synoviale T-Zellen, die im Zuge chronischer Zell-Aktivierung Proteine des T-Zell-Rezeptorkomplexes verlagern und hypophosphorylieren, infolgedessen die Zellen hyporeaktiv werden<sup>[142, 143]</sup>. Wie bereits bei der CD69-Expression diskutiert, ist es also durchaus möglich, dass sich die T-Zellen der nephritischen BWF1-Mäuse durch kürzliche oder auch chronische Aktivierung in einem reaktionsrefraktären Zustand befinden, was konsistent mit unseren funktionellen Untersuchungen wäre.

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

CD4<sup>+</sup> T-Zellen können unterschieden werden in naive T-Zellen und Memory/Effektor-T-Zellen. Memory/Effektor-T-Zellen zeichnen sich dadurch aus, bereits mit „ihrem“ Antigen konfrontiert worden zu sein. Naive T-Zellen exprimieren CD62L und CD45RB und kaum CD44. Nach Antigenkontakt verlieren diese T-Zellen ihre CD62L und CD45RB-Expression, dafür erscheint

CD44 auf ihrer Zelloberfläche<sup>[119-121]</sup>.

Von den renalen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten 55-60% einen Memory/Effektor-Phänotyp (CD62L<sup>-</sup>CD45RB<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>), 40-45% zeigten die Charakteristika naiver T-Zellen (CD62L<sup>+</sup>CD45RB<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>). Der relativ hohe Anteil an naiven T-Zellen im nephritischen Gewebe überrascht. Unsere Erwartung war eher eine Akkumulation von T-Effektorzellen im Nierengewebe, zumal Effektor-T-Zellen aufgrund ihres Expressionsprofils von Adhäsionsmolekülen bevorzugt in entzündetes Gewebe einwandern<sup>[144]</sup>. Der recht hohe Prozentsatz an naiven Zellen könnte dafür sprechen, dass auch ungeprimte, naive Zellen unspezifisch in das nephritische Gewebe wandern. Ungewiss ist allerdings, ob die eingewanderten Zellen dort auch dauerhaft verbleiben: Möglicherweise kommt es zu einem permanenten Ein- und Auswandern von T-Zellen im Nierengewebe. Denkbar ist eine unspezifische Migration von T-Zellen durch das Nierengewebe, und solche T-Zellen, die dort auf ihr Antigen treffen, verbleiben im Gewebe. Es sollte auch bedacht werden, dass die Einteilung der T-Zellen in naive und Memory/Effektor-T-Zellen weder absolut noch final ist: T-Zellen vom Memory/Effektor-Typ können sich phänotypisch in naive T-Zellen zurückverwandeln<sup>[145, 146]</sup>. Daher müssen die im Nierengewebe vorgefundenen „naiven“ T-Zellen nicht unbedingt als naive T-Zellen in die Nieren eingewandert sein.

In der Milz fand sich ein wesentlich höherer Anteil an Memory/Effektor-T-Zellen. Rund 75% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz wiesen einen Memory/Effektor-Phänotyp auf und nur 25% die für naive Zellen typische Markerkonstellation. Zum Vergleich zeigten die T-Zellen der CWF1-Mäuse in 70% einen naiven Phänotyp. Diese starke Präsenz von Memory/Effektor-T-Zellen bei alten BWF1-Mäusen passt zu dem ebenfalls vorgefundenen, massiven Aktivierungszustand in der Milz und verweist auf die Beteiligung dieses Organs an der generalisierten Immundysregulation. Verschiedene Publikationen berichten bei Patienten mit SLE ebenfalls eine im Krankheitsverlauf zunehmende Expansion der T-Memory/Effektor-Zellpopulation<sup>[147, 148]</sup>. Ähnlich demonstriert eine Arbeit mit dem Lupusmausstamm BXSB/MpJScR eine Zunahme des Memory/Effektor-T-Zell-Phänotyps bei erkrankten Mäusen<sup>[149]</sup>.

### 5.1.3 Charakterisierung der Zellen anhand ihrer Zytokinproduktion

CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen können anhand ihrer Zytokinproduktion zwei distinkten Subpopulationen zugeordnet werden, den Th1 und Th2 T-Zellen<sup>[122]</sup>. Th1 T-Zellen sind Teil der zellvermittelten, inflammatorischen Immunabwehr, während Th2 T-Zellen die humorale Abwehr über B-Zellen und Antikörperproduktion fördern. Um die renalen CD4<sup>+</sup> T-Zellen hinsichtlich ihrer Zuordnung zum Th1-Th2 Typ zu untersuchen, wurde die Produktion einer Reihe von Zytokinen nach PMA/Ionomycin Stimulation untersucht. Markerzytokin für Th1-Zellen ist IFN $\gamma$ , die Produktion von TNF $\alpha$  ist ebenfalls Th1 Zellen zuzurechnen. Charakteristisches Th2 Zytokin ist IL-4. IL-10 ist weniger paradigmatisch für Th2 Zellen, wird aber ebenfalls von vielen Autoren den Th2 Zytokinen zugerechnet. IL-10 wird ebenso von regulatorischen T-Zellen produziert<sup>[134]</sup>, die via

IL-10 eine pathologische Immunantwort supprimieren/modifizieren können.

Das vorgefundene Überwiegen von Th1 Zellen passt in das Konzept einer T-Zell-vermittelten Zellschädigung im Nierengewebe und zu dem in Abbildung 4 (Seite 21) postulierten Mechanismus der Nephritispathogenese. Allerdings lassen die ebenfalls nachweisbaren IL-4 und IL-10 produzierenden T-Zellen auch an eine Beteiligung von Th2 T-Zellen denken.

## 5.2 Funktionelle Charakterisierung der renalen T-Zellen

Wie bereits dargestellt, sprechen einige Beobachtungen (Akkumulation von vorwiegend CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit oligoklonalen T-Zell-Rezeptoren<sup>[101, 102]</sup>, Hochregulation von MHCII Molekülen im Nierengewebe<sup>[94, 100]</sup>) für einen CD4 T-Zell-abhängigen und antigenspezifischen Entzündungsprozess in den Nieren. Allerdings konnte bisher kein entsprechendes Antigen identifiziert werden, welches Ziel der Autoimmunantwort in den Nieren ist. Zahlreiche Spekulationen vermuten ein renales Antigen. Diese Hypothese ist nicht unwahrscheinlich, schließlich findet sich bei verschiedenen Nierenerkrankungen ein Infiltrat von Leukozyten ähnlich dem der Lupusnephritis. Eine antigenabhängige, T-Zell-vermittelte Entzündung im Nierengewebe könnte die gemeinsame Endstrecke verschiedener Nierenpathologien nach initialer Organschädigung und Sensibilisierung gegenüber renalen Antigenen sein.

In den vorliegenden funktionellen Untersuchungen wurde eine andere Hypothese untersucht: Reagieren die renalen T-Zellen auf ein typisches SLE Autoantigen? Im Kontext des SLE kommt es zur Aktivierung und Expansion autoreaktiver T-Zellen. Zielstruktur dieser T-Zellen sind zum Großteil nukleäre Peptidantigene, welche ubiquitär in allen Zellen in den verschiedenen Geweben des Körpers enthalten sind. Diese autoreaktiven Zellen könnten also auch in den Nieren – primär oder nach initialer Gewebsschädigung durch Autoantikörper – auf „ihr“ Antigen treffen. Bedenkt man, dass autoantigenspezifische T-Zell-Klone beim SLE systemisch nachweisbar sind, ist es nicht unwahrscheinlich, dass diese Zellen auch in das Nierengewebe einwandern und dort mit ihrem Autoantigen konfrontiert werden. In diesem Fall wären die typischen intranukleären Lupus-Autoantigene auch treibende Kraft der SLE-Nephritis.

In einer Reihe von funktionellen Untersuchungen wurde überprüft, ob die renalen T-Zellen auf das Lupus-Autoantigen SmD1<sub>(83-119)</sub> reagieren. Eine Reaktivität der T-Zellen mit diesem Autoantigen in diesem Mausmodell konnte bereits anhand von Milzzellen von jungen BWF1 demonstriert werden. In den Nieren von nephritischen BWF1 fanden sich vorwiegend Th1 T-Zellen, aber durchaus auch Th2 T-Zellen. Deshalb wurden die Zellen sowohl in Hinblick auf eine Th1 als auch auf eine Th2 Antwort auf Reaktivität mit dem SmD1<sub>(83-119)</sub> Antigen untersucht. Zur funktionellen Analyse der Zellen wurde in erster Linie die ELISPOT-Technik gewählt. Vorteil dieser Methode ist, dass der Nachweis der Reaktivität einzelner Zellen möglich ist. Die ELISPOT Methode ist für den Nachweis antigenspezifischer Zellen wesentlich sensitiver als Durchflusszytometrie oder Proliferationsassays.



In den funktionellen Experimenten gelang es nicht, eine Reaktivität der renalen T-Zellen mit dem SmD1<sub>(83-119)</sub> Peptid nachzuweisen. Allerdings zeigten die T-Zellen aus der Milz von alten BWF1 ebenfalls keine Stimulierbarkeit mit dem SmD1<sub>(83-119)</sub> Peptid. Wie bereits im Zusammenhang mit dem Aktivierungszustand der Zellen diskutiert, ist eine prinzipielle Interpretationsmöglichkeit dieser Ergebnisse, dass die T-Zellen reaktionsrefraktär sind. Die untersuchten Zellen exprimierten in hohem Maße CD69, was für einen hochaktivierten Zustand der Zellen spricht. Es ist bekannt, dass kürzlich aktivierte Zellen im Allgemeinen<sup>[133]</sup> und speziell auch die CD69<sup>+</sup> T-Zellen aus alten BWF1-Mäusen hyporeaktiv sind<sup>[129]</sup>. Ferner kann auch eine Reaktionsrefraktärität der T-Zellen infolge Veränderung der T-Zell-Rezeptor-Signaltransduktionskette im Zuge chronischer Zellaktivierung nicht ausgeschlossen werden, wie sie beispielsweise bei den chronisch aktivierten synovialen T-Zellen bei der rheumatoiden Arthritis beschrieben ist<sup>[142, 143, 150]</sup>. Gut belegt ist ferner eine generelle Abnahme der Reaktionsfreudigkeit des Immunsystems mit steigendem Alter<sup>[151]</sup>. Insbesondere der Nachweis von Reaktivität auf SmD1<sub>(83-119)</sub> bei T-Zellen aus der Milz von jungen BWF1, während dieses bei alten BWF1-Mäusen hingegen nicht gelang, legt die Vermutung nahe, dass die T-Zellen mit Alter und Krankheitsverlauf Reaktivität einbüßen. Die hier vorgestellten funktionellen Ergebnisse können also auf die Aussage reduziert werden, dass sich bei *ex vivo* isolierten renalen T-Zellen keine Reaktivität auf SmD1<sub>(83-119)</sub> findet. Ob die fehlende Reaktivität auf eine allgemeine Reaktionsrefraktärität der Zellen oder auf das Fehlen von T-Zellen mit entsprechendem T-Zell-Rezeptorrepertoire zurückzuführen ist, bleibt ungewiss und sollte durch weitere Untersuchungen (beispielsweise Zellkultur, Proliferationsassays) analysiert werden.

### 5.2.1 Th1 Antwort auf SmD1<sub>(83-119)</sub>

Die überwiegende Präsenz von Th1 T-Zellen in den Nieren lässt an die Möglichkeit einer Antwort solchen Typs auf das SmD1<sub>(83-119)</sub> Antigen denken. Eine solche Reaktivität passt zu dem in Abbildung 4 (Seite 21) skizzierten Modell einer Th1 vermittelten Nephritispathogenese. Treffen Th1 Zellen auf ihnen präsentiertes, passendes Antigen, so sezernieren sie unter anderem IFN $\gamma$ . Dieses funktionelle Merkmal wurde mit Hilfe von IFN $\gamma$ -ZytokinELISPOTs untersucht. Th1 T-Zellen können aber auch in Wechselwirkung mit B-Zellen treten: Hierbei induzieren sie keine Neuproduktion von Immunglobulinen, sondern bewirken einen Klassenwechsel der produzierten Antikörper zu Isotypen wie IgG2a. Diese antigenspezifische Modifikation der Antikörperproduktion wurde mit dsDNA-ELISPOT und dem selektiven Nachweis von IgG2a Antikörpern analysiert.

In unseren Experimenten konnte keine signifikante Reaktivität im Sinne einer Th1 Antwort nachgewiesen werden. Der Nachweis gelang auch nicht durch Modifikation des APC-Milieus in den Cokulturen (B-Zellen aus der Milz, B-Zellen und Makrophagen aus den Nieren); ebenso erfolglos war der Nachweis einer entsprechenden Reaktivität in dem MRL/lpr-Lupusmausmodell. Die Ursache für den fehlenden Nachweis einer Th1-Reaktivität könnte an

einer fehlenden Reaktivität mit dem das SmD1<sub>(83-119)</sub> Antigen liegen oder an allgemeiner Reaktionsrefraktärität.

### 5.2.2 Th2 Antwort auf SmD1<sub>(83-119)</sub>

Die Aufgabe von Th2 T-Zellen ist die antigenspezifische Stimulation der Reifung von B-Zellen zu Antikörperproduzenten. Neben dieser Neuinduktion von Antikörperproduktion bewirken Th2 T-Zellen Klassenwechsel der produzierten Antikörperisotypen, unter anderem zu IgG. Die Reifung von B-Zellen zu Antikörperproduzenten findet normalerweise in Keimfollikeln statt.

Man weiß aus Untersuchungen über die rheumatoide Arthritis, dass sich in chronisch entzündeten Geweben Keimzentren bilden können, in denen B-Zellen zu Antikörperproduzenten reifen<sup>[105]</sup>. Solche Strukturen lassen sich in den chronische entzündeten Nieren von alten BWF1-Mäusen nicht nachweisen<sup>[95]</sup>. Allerdings gibt es Berichte aus Untersuchungen mit autoimmunen Lupusmäusen (MRL/lpr), dass autoreaktive B-Zellen in atypische Areale einwandern und außerhalb von Keimzentrumsstrukturen reifen können<sup>[106, 107]</sup>. Zu bedenken ist auch die vorgefundene Menge an B-Zellen in den Nieren von BWF1-Mäusen (~30% des Leukozyteninfiltrates) und der Nachweis von Th2 Zellen. Des weiteren findet sich im entzündetem Nierengewebe von BWF1-Mäusen eine relevante Akkumulation von Plasmazellen<sup>[95]</sup>, die sowohl in die Nieren eingewandert als auch vor Ort aus B-Zellen entstanden sein könnten. In Folgeexperimenten unserer Arbeitsgruppe wurde inzwischen gezeigt, dass sich in den Nieren Anti-dsDNA- und Anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-spezifische Plasmazellen finden. Zusammengenommen erscheint eine Interaktion von Th2- und B-Zellen mit Induktion von Autoantikörperproduktion bzw. Plasmazellen nicht abwegig.

Eine Eigenschaft von SmD1<sub>(83-119)</sub> spezifischen T-Zellen ist die Fähigkeit, die Produktion von Anti-dsDNA-Autoantikörpern durch die entsprechenden B-Zellen zu induzieren<sup>[51, 52]</sup>. Ferner können sie die Produktion von Anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-Autoantikörpern induzieren<sup>[52]</sup>. Um diese SmD1<sub>(83-119)</sub>-spezifische Funktion der renalen T-Zellen zu untersuchen, wurde die Autoantikörperproduktion durch B-Zellen nach Cokultur mit den renalen T-Zellen mit ELISPOT und ELISA bestimmt.

Nach Überprüfung des ELISPOT-Essays und Ermittlung der optimalen Antigenkonzentration mit jungen, pränephritischen BWF1-Mäusen wurde die Reaktivität der T-Zellen aus Nierengewebe und Milz von alten, nephritischen BWF1-Tieren untersucht. Es konnte allerdings keine Reaktivität der T-Zellen auf das SmD1<sub>(83-119)</sub> Antigen nachgewiesen werden.

Neben der fehlenden Stimulierbarkeit fiel auf, dass in den BWF1-Cokulturen mit T-Zellen aus der Milz regelhaft mehr Anti-dsDNA-AFC's induziert wurden als in den Cokulturen mit renalen T-Zellen. Scheinbar stellen die T-Zellen aus der Milz, verglichen mit den renalen T-Zellen, eher ein Milieu dar, in welchem B-Zell-Reifung und Antikörperbildung gefördert wird. Möglicherweise

steht dies im Zusammenhang mit dem höheren Anteil von T-Zellen in der Milz, welche die Antikörperbildung fördernde Zytokine wie IL-4 und IL-10 produzieren.

Da die T-Zellen aus nephritischen BWF1 keine Reaktivität auf das SmD1<sub>(83-119)</sub> Antigen zeigten, wurde versucht, die Reaktivität oder Nicht-Reaktivität in einem anderen Lupus-Mausmodell nachzuweisen. Bis dato gab es noch keinen *in vitro* Nachweis einer Reaktivität auf das SmD1<sub>(83-119)</sub> Antigen in dem MRL/lpr-SLE-Modell. Das MRL/lpr-Mausmodell zeichnet sich unter anderem durch ein Erkranken der Mäuse in wesentlich jüngerem Alter als bei BWF1-Mäusen aus. In zwei separaten Experimenten konnte erstmals eine Stimulierbarkeit der Anti-dsDNA-Antikörperproduktion mit MRL/lpr-Zellen (Splenozyten) *in vitro* direkt nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte die Antigenspezifität der Stimulation gezeigt werden: Während die Zugabe des SmD1<sub>(83-119)</sub> Peptids zur Zunahme der Anti-dsDNA-AFC's führte, kam es bei Zugabe randomisierten Peptids (zusammengesetzt aus denselben Aminosäuren wie das SmD1<sub>(83-119)</sub> Peptid, allerdings in zufälliger Sequenz) zu keiner Stimulation der Anti-dsDNA-Autoantikörperproduktion.

In den vorliegenden Experimenten wurden renale T-Zellen aus nephritischen MRL/lpr-Mäusen isoliert und parallel zu Milzzellen auf eine Reaktivität mit SmD1<sub>(83-119)</sub> untersucht: Während sich eine Stimulierbarkeit der T-Zellen aus der Milz reproduzieren ließ, fand sich bei den renalen T-Zellen keine Reaktivität auf SmD1<sub>(83-119)</sub>.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die renalen T-Zellen nicht SmD1<sub>(83-119)</sub>-abhängig B-Zellen zur Autoantikörperproduktion stimulieren. Es fand sich keine SmD1<sub>(83-119)</sub> Reaktivität der renalen T-Zellen im Sinne einer Th2 Antwort. Es ist allerdings unklar, ob diese mangelnde Reaktivität auf eine allgemeine Hyporeaktivität der Zellen oder auf das Fehlen von T-Zellen mit „passendem“ T-Zell-Rezeptor zurückzuführen ist. Des Weiteren konnte erstmals *in vitro* Reaktivität der MRL/lpr T- und B-Zellen auf das SmD1<sub>(83-119)</sub> Antigen gezeigt werden.

### **5.3 Hypothetisches Modell zur Rolle der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Nephritispathogenese und Ausblick**

Unsere Ergebnisse können zu dem folgenden **hypothetischen Modell** der Rolle von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lupusnephritis zusammengefasst werden: Zumindest ein Teil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wandert als naive T-Zellen in das Nierengewebe ein, trifft dort auf „ihr“ Antigen, wird geprimt und entwickelt sich in dem proinflammatorischen Milieu zu einer Th1 Effektorzelle. Andere Th1 T-Zellen könnten selektiv in das Nierengewebe einwandern, die Expansion des lokalen T-Zellenpools durch Proliferation scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die prädominierenden Th1 Zellen halten die lokale Inflammation im Nierengewebe aufrecht und vermitteln antikörperunabhängig Zell- und Gewebsschädigung. Die Rolle der B-Zellen im Nierengewebe ist ungewiss, lokale T-Zellhilfe zur Antikörperproduktion findet sich nicht. Möglicherweise fungieren die B-Zellen als Antigen-präsentierende Zellen oder über die

Sekretion von Zytokinen. Die in den Nieren anzutreffenden Plasmazellen wandern wahrscheinlich als solche in die Nieren ein und entstehen nicht vor Ort aus B-Zellen.

In Folgeexperimenten sollte mit Zelltransfer- und Migrationsversuchen geklärt werden, welche Zellen in das Nierengewebe ein- und eventuell wieder abwandern. Weiterhin sollte nach Zielantigenen der renalen T-Zellen gefahndet und die Frage adressiert werden, ob diese Zellen prinzipiell reaktiv oder reaktionsrefraktär sind. Zukünftige Erkenntnisse über den Pathomechanismus der Nierenschädigung beim SLE bergen das Potential, neue Therapieansätze zu ermöglichen, die effektiver und spezifischer als bisherige Behandlungsschemata sind.