

Claudius Gottschalk

Dr. med.

Durchflusszytometrische und funktionelle Analysen von Regulatorischen T Zellen im peripheren Blut von Patienten mit Systemischen Lupus Erythematoses

Fach/Einrichtung: Gynäkologie und Geburtshilfe

Doktormutter: Prof. Dr. rer. nat. Andrea Steinborn-Kröhl

Der Systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine schubartig verlaufende Autoimmunerkrankung, bei der Immunkomplexe aus Autoantikörpern entstehen und zu entzündlichen Schäden zahlreicher Gewebe führen. Die Ätiologie des SLE beruht auf einem Verlust der Immuntoleranz gegenüber nukleären Autoantigenen. Regulatorische T Zellen (Tregs) sind essenziell für den Erhalt der Selbsttoleranz. Die Mechanismen, die zum Verlust der Immuntoleranz führen, wurden bis heute nicht vollständig aufgeklärt, und die Datenlage hinsichtlich quantitativer und qualitativer Veränderungen des T Helferzellpools beim SLE ist kontrovers. Die regelrechte Ausschüttung von CD31⁺ CD45RA⁺ *Recent Thymic Emigrant* (RTE) T Zellen aus dem Thymus und die post-thymische Differenzierung über entweder CD31⁻ CD45RA⁺ *Mature Naive* (MN) T Zellen oder CD31⁺ CD45RA⁻ Memory T Zellen in CD31⁺ Memory T Zellen ist für deren ordnungsgemäße Funktionalität notwendig. Im Rahmen dieser Dissertation sollte daher die Differenzierung von Tregs und Responder T Zellen (Tresp), sowie die Funktionalität von Tregs als Antagonisten von Tresp untersucht werden.

Für die Untersuchung der Differenzierung von RTE Tregs und Tresp wurde peripher-venöses Blut von gesunden Probanden und SLE Patienten in Remission entnommen und die Zusammensetzung des CD4⁺ T Helferzellpools aus CD4⁺ CD127^{low+/-} FoxP3⁺ Tregs und CD4⁺ CD127⁺ FoxP3⁻ Tresp mittels 6-Farben-Durchflusszytometrie analysiert. Hierbei wurde deren Zusammensetzung aus RTE, MN, CD31⁺ Memory und CD31⁻ Memory Tregs und Tresp quantifiziert. Deren jeweilige Proliferationskapazität wurde anhand der Expression von Ki67 bestimmt. Die Funktionalität des Treg Pools wurde mittels Suppressionsassays von naiven CD45RA⁺ Tregs und CD45RA⁻ Memory Tregs von SLE Patienten mit autologen Tresp und allogenen Tresp aus dem Blut von gesunden Individuen gleichen Alters untersucht.

Die Ergebnisse zeigen für gesunde Probanden eine verstärkte altersabhängige Differenzierung von RTE Tregs über CD31⁺ Memory Tregs und für RTE Tresp über MN Tresp in CD31⁻ Memory Tregs/Tresp. Diese Veränderung der Differenzierung geht mit einer altersabhängig erhöhten suppressiven Aktivität von naiven und Memory Tregs einher. RTE Tregs von SLE Patienten in Remission differenzieren mit zunehmendem Alter ebenso verstärkt über CD31⁺ Memory Tregs. Demgegenüber gelingt bei SLE Patienten in Remission die altersabhängige Homöostase der CD31⁻ Memory Tresp nur über eine aberrante Differenzierung von RTE Tresp über CD31⁺ Memory Tresp. Die über diesen Differenzierungsweg entstehenden CD31⁻ Memory Tresp akkumulieren altersabhängig und sind weniger empfänglich für eine Suppression durch Tregs. Die Suppressionsassays der naiven CD45RA⁺ Tregs und CD45RA⁻ Memory Tregs von SLE Patienten mit autologen Tresp und allogenen Tresp aus dem Blut von gesunden Individuen zeigen, dass die verminderte suppressive Aktivität beider Treg Subpopulationen von SLE Patienten jedoch nicht ausschließlich auf einer verminderten

Supprimierbarkeit von Tregs beruht. Die Subgruppenanalyse hinsichtlich der verschiedenen immunsuppressiven Medikamente zeigt, dass die Einnahme von Azathioprin und Mykophenolat Mofetil beim SLE zu einer therapeutischen Hemmung von RTE Tregs führt, aber mit einer übermäßigen Hemmung von RTE Tregs einhergeht.

Während der Entwicklung im Thymus entstehen ICOS⁺ (*inducible T cell costimulator*) Tregs, die sich gegenüber ICOS⁻ Tregs durch ein hohes proliferatives und immunsuppressives Potential auszeichnen und eine hohe Resistenz gegenüber einem aktivierungsinduzierten Zelltod aufweisen. Der ICOS Signalweg spielt eine wichtige Rolle für die Funktionalität von Tregs und Tregs im Rahmen der physiologischen Keimzentrumsreaktion und die Erhaltung der Toleranz. Veränderungen der Homöostase von ICOS⁺ und ICOS⁻ Tregs und Tregs angesichts von Krankheitsschüben des SLE wurden bislang kaum erforscht. Im zweiten Teil dieser Dissertation wurde daher die Zusammensetzung des CD4⁺ Zellpools aus ICOS⁺ und ICOS⁻ Tregs und Tregs, sowie die Differenzierung von ICOS⁺ und ICOS⁻ naiven CD45RA⁺ Tregs und Tregs in ICOS⁺ und ICOS⁻ CD45RA⁻ Memory Tregs und Tregs bei SLE Patienten in Remission (SLEDAI < 7) und bei SLE Patienten mit aktivem SLE (SLEDAI ≥ 7) untersucht. Mittels Suppressionsassays wurde die suppressive Aktivität von ICOS⁺ Tregs, naiven CD45RA⁺ ICOS⁻ Tregs und ICOS⁻ CD45RA⁻ Memory Tregs untersucht.

Die Untersuchungen zeigen ein altersunabhängig erhöhtes Verhältnis von ICOS⁺ Tregs / ICOS⁺ und von ICOS⁻ Tregs / ICOS⁻ Tregs bei SLE in Remission. Die Suppressionsassays zeigen für SLE Patienten in Remission eine verminderte suppressive Aktivität von naiven ICOS⁻ Tregs und ICOS⁻ Memory Tregs, jedoch nicht von ICOS⁺ Tregs. Bei Patienten mit aktivem SLE wurde eine starke Zunahme von ICOS⁺ Tregs und ICOS⁺ Tregs am CD4⁺ T Helferzellpool beobachtet. Dennoch bleibt das Verhältnis von ICOS⁺ Tregs / ICOS⁺ Tregs beim aktivem SLE gegenüber dem Zustand der Remission unverändert. Dies beruht auf einer verstärkten Differenzierung von naiven ICOS⁺ und ICOS⁻ Tregs beim aktiven SLE, die für ICOS⁺ Tregs jedoch nicht regelrecht aufrechterhalten werden kann. Die Daten demonstrieren, dass eine Expansion von ICOS⁺ Tregs und ICOS⁺ Tregs innerhalb des gesamten CD4⁺ T Zellpools, sowie das empfindliche Verhältnis von ICOS⁺ Tregs / ICOS⁺ Tregs für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase und der Remission beim SLE notwendig sind.