

*The responsive and suppressive activities
of CD4⁺ T cells to neoantigens generated in
procainamide drug-induced Lupus*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Laura Elizabeth Layland

aus

Lancashire

Düsseldorf, 2003

Gedruckt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. med. E. Gleichmann
Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2003

Berichte aus der Biologie

Laura Elizabeth Layland

**The responsive and suppressive activities
of CD4⁺ T cells to neoantigens generated in
procainamide drug-induced Lupus**

D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Shaker Verlag
Aachen 2004

Bibliographic information published by Die Deutsche Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data is available in the internet at <http://dnb.ddb.de>.

Zugl.: Düsseldorf, Univ., Diss., 2003

Copyright Shaker Verlag 2004

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-3556-6

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen

Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

To my family

Quidquid agas, prudenter agas, et respice finem –

Whatever you do, do cautiously, and look to the end.

GESTA ROMANORUM (CAP.103)

ZUSAMMENFASSUNG

Das Arzneimittel Procainamid (PA, p-Aminobenzosäure- β -diäthylaminoäthylamid) kann beim Menschen einen systemischen Lupus erythematosus, eine Autoimmunkrankheit, auslösen. Es wird daher in der Maus als Modellsubstanz zur Untersuchung der Mechanismen arzneimittelinduzierter unerwünschter Immunreaktionen verwendet, auch hier führt die Behandlung mit PA T-Zell-abhängig zur Bildung von antinukleären Autoantikörpern (ANA). PA wird im Körper metabolisiert, wobei proteinreaktive Zwischenprodukte entstehen. T-Zellen reagieren normalerweise nicht auf körpereigene Proteine, deren immunrelevante Peptide auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zellen (APZ) verankert sind. Veränderungen dieser Peptide, sei es durch Addukte mit proteinreaktiven Chemikalien („Neoantigene“), sei es durch Präsentation normalerweise nicht-präsentierter, sogenannter kryptischer Peptide, können zu unerwünschter T-Zell-Aktivität führen. ANA werden sowohl in Patienten als auch in Mäusestämmen, die genetisch bedingt einen langsamen Acetyliererphänotyp besitzen, schneller und in größerer Menge gebildet. In Individuen mit langsamem Acetyliererphänotyp wird der größte Teil des PA im N-Oxidations-Pfad in Zellen des Immunsystems, wie neutrophilen Granulozyten, metabolisiert. Die Produkte dieses Abbaues, der intermediäre Metabolit N-Hydroxylamin-PA (HAPA) und besonders das instabile, reaktive Nitroso-PA, die ineinander umgewandelt werden, können an Proteine binden und somit Neoantigene induzieren, die wiederum T-Zellen stimulieren können. Wie bei den meisten chemikalieninduzierten Immunreaktionen sind auch für PA die exakten Neoantigene noch nicht identifiziert.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden T-Zell-Reaktionen auf PA-induzierte Neoantigene der Maus untersucht. Diese Experimente zeigen, dass die Metabolisierung von PA durch Makrophagen zur Bildung von PA-induzierten Proteinkonjugaten führte. Diese PA-induzierten Neoantigene lösten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* spezifische T-Zell-Antworten aus. Passend hierzu wiesen A/J-Mäuse, die zu den langsamen Acetylierern gehören, nach achtmonatiger Gabe von PA im Trinkwasser erhöhte IgG1 ANA Titer auf. Zudem besaß ein signifikanter Anteil der Seren dieser Mäuse spezifische Antikörper für PA und/ oder HAPA. Weiterhin wiesen einige der PA-behandelten Mäuse Antikörper auf, die mit einem 35 kDa Protein aus Zelllysaten einer humanen Epithelzelllinie reagierten. Auch konnte ein Addukt, bestehend aus einem 35 kDa Protein und PA oder HAPA, mittels PA-spezifischer Antikörper in Zytosolmalysaten von Mausknorpelmarkszellen nachgewiesen werden, die mit PA-vorinkubiert worden waren. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass eins der PA-induzierten Neoantigene ein Addukt aus PA oder seinen Metaboliten und dem obengenannten 35 kDa Protein ist.

CD4⁺ T-Zellen, nicht jedoch CD8⁺ T-Zellen von PA-behandelten A/J-Mäusen reagierten spezifisch gegen PA-gepulste Makrophagen oder auf die direkte Zugabe von HAPA in einem *In-vitro*-System. Zur Identifizierung der CD4⁺ T-Zell-Subpopulation, die für die Induktion der ANA in PA-behandelten Mäusen verantwortlich war, wurden isolierte CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ T-Zell-Subpopulationen in adoptiven Transfers verwendet. Die CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von PA-behandelten Spendermäusen waren überraschenderweise dazu in der Lage, ANA in nicht mit PA behandelten Empfängern zu induzieren. Offenbar waren diese CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in der Lage, autoreaktive (ANA-produzierende) B-Zellen, denen normalerweise die erforderliche T-Zell-Hilfe fehlt, zu aktivieren. Die Tatsache, dass die B-Zellen in diesem Fall reaktiv wurden und ANA produzierten, legt die Schlussfolgerung nahe, dass es im Laufe der PA-Behandlung der T-Zell-Spender zu „epitope spreading“ hin zu unveränderten Selbstproteinen und somit zu einer Aktivierung autoreaktiver T-Helfer-Zellen kam. Der Adoptive Transfer von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (T-Suppressor-Zellen) von PA-behandelten Spendermäusen hingegen unterdrückte die Bildung von ANA in den Empfängermäusen, und zwar unabhängig davon, ob die Empfänger mit PA oder aber mit anderen ANA-induzierenden Substanzen behandelt wurden. In dieser Arbeit konnte somit zum ersten Mal gezeigt werden, dass CD4⁺CD25⁺ T-Zellen einen suppressiven Effekt auf Arzneimittel-induzierte Autoimmunkrankheiten besitzen. Weiterhin wurde gezeigt, dass sich während einer PA-Behandlung die T-Zell-Reaktivität von PA-induzierten Neoantigenen auf Peptide von unveränderten Nukleoproteinen ausweitet, und somit auch auf der T-Zell-Ebene zu einer echten Autoimmunreaktion.

THIS THESIS IS BASED ON THE FOLLOWING ORIGINAL PUBLICATIONS

L. Layland, M. Wulferink, E. Gleichmann. 1999. Production of CD4⁺ T cell hybridomas against procainamide, a drug-inducing Lupus. *Immunobiology*. **C13**: 348-349.

L. Layland, M. Wulferink, E. Gleichmann. 2001. Long term procainamide treatment in the drinking water of A/J mice produces a positive T cell reaction to an unidentified neo-antigen in the lymphocyte transformation test. *Immunobiology*. **H7**: 120.

L. Layland, M. Wulferink, E. Gleichmann. 2002. Prevention of drug-induced antinuclear autoantibody formation by the adoptive transfer of previously exposed CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Immunobiology*. **K8**: 150.

Oral Presentation "Prevention of drug-induced antinuclear autoantibody formation by the adoptive transfer of previously exposed CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells" at 33rd Annual Meeting of the German Society of Immunology, September 25th-28th, 2002 in Marburg Germany.

Oral Presentation "Drug-induced autoimmunity in mice: Analysis of T-cell cross-reactivity: Demonstration of T-Suppressor cells", at the ENDA Meeting, October 19th-20th, 2002, in Aachen Germany.

L. Layland, M. Wulferink, E. Gleichmann. 2003. Prevention of drug-induced antinuclear autoantibody formation by the adoptive transfer of previously exposed CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Archives in Dermatological Research*. **PO70**: 479.

L. Layland, M. Wulferink, S. Dierkes and E. Gleichmann. 2003. Drug-induced autoantibody formation in mice: triggering by primed CD4⁺CD25⁻ T cells, prevention by primed CD4⁺CD25⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* In submission.

ABBREVIATIONS

ACT	ammoniumchloride-tris
AID	autoimmune disease
ANA	antinuclear antibodies
ANOVA	analysis of variance
APC	antigen presenting cell
APS	ammonium persulphate
ATCC	American cell culture
BSS	balanced salt solution
Con A	concanvalin A
CO ₂	carbon dioxide
cpm	counts per minute
°C	degrees centigrade
DDW	double distilled water
DIL	drug-induced Lupus
DMSO	dimethyl sulphoxide
DNFB	2,4-dinitro-fluorobenzene (Sangers Reagent)
DNBS	2,4-dinitrobenzenesulphonic acid
DNA	deoxyribnucleic acid
DTT	dithiothretiol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	ethylene diaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunsorbent assay
FACScan	fluorescence activated cell sorter
FCS	foetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
HAT	hypoxanthin, aminopterin, thymidine
HT	hypoxanthin, thymidine
HAPA	<i>N</i> -hydroxylamino-procainamide
hr	hour
HRP	horse radish peroxidase
H ₂ SO ₄	sulphuric acid
IFA	Incomplete Freund's adjuvant
IFN- γ	interferon-gamma
IIF	indirect immunofluorescence
IEF	isoelectric focusing
IL	Interleukin
ip	intraperitoneal injection
kBq	kiloBequeral
KCl	potassium chloride
KD	kilodalton
LTT	lymphocyte transformation test
mAb	monoclonal antibody
MACS	magnetic activated cell sorter
MHC	major histocompatibility complex
min	minute
ml	millilitre
MW	molecular weight
NaN ₃	sodium azide
ng	nanogram
%	percentage
PA	procainamide
PBS	phosphate buffered saline
PE	phycoerythrine
PEG 1500	Polyethyldiamineglycol

PLN	popliteal lymph node assay
PMA	phorbol myristate acid
PM ϕ	macrophage
PMSF	phenylmethylsulphonylfluoride
POSSEL	AutoMACS positive selection programme
RBC	red blood cell
rpm	rotations per minute
RNA	ribonucleic acid
RT	room temperature
sc	subcutaneous injection
SC	standard cocktail
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SI	stimulation index
SLE	Systemic Lupus Erythematosus
SNSD	self-non-self discrimination
Tc	cytotoxic T cell
TC	tumour cocktail
Th	helper T cell
TCR	T cell receptor
Thd	thymidine
TEMED	N,N,N,N-tetramethylethylenediamine
T _{reg}	T regulatory cell
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
μ l	microlitre
μ M	micromolar
WBMC	white bone marrow cell

1 INTRODUCTION	1
1.1. THE ESSENCE OF IMMUNOLOGY	1
1.2. INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY	1
1.3. LYMPHOCYTE DEVELOPMENT AND DIFFERENTIATION	2
1.4. ANTIGEN RECOGNITION AND PRESENTATION	5
1.5. T CELL ACTIVATION.....	5
1.6. IMMUNOLOGICAL TOLERANCE	6
1.7. IMMUNOREGULATORY T CELL POPULATIONS	8
1.7.1. <i>CD4⁺CD25⁺ T Suppressor Cells</i>	9
1.7.2. <i>Other immunoregulatory subsets</i>	12
1.8. XENOBIOTIC AND AUTOIMMUNE DISEASE	13
1.9. CHEMICALS AS HAPTENS	15
1.9.1. <i>Hapten-Protein Conjugation</i>	15
1.9.2. <i>Prohapten Metabolism</i>	16
1.10. PROCAINAMIDE-INDUCED IMMUNE REACTIONS.....	17
1.10.1. <i>Procainamide, a general introduction</i>	17
1.10.2. <i>The Metabolism of Procainamide</i>	17
1.10.3. <i>The Role of Metabolism in Procainamide-Induced Lupus</i>	18
1.10.4. <i>T Cell Reactivity in Procainamide Investigations</i>	20
1.11. HYPOTHESIS SURROUNDING PROCAINAMIDE DRUG INDUCED LUPUS	21
1.12. AIMS OF THIS THESIS.....	23
2 MATERIALS AND METHODS	25
2.1. MATERIALS	25
2.1.1. <i>Mouse Strains</i>	25
2.1.2. <i>Cell Lines</i>	26
2.1.3. <i>Plastic and Glass ware</i>	26
2.1.4. <i>Antibodies and Microbeads</i>	26
2.1.5. <i>Procainamide and HAPA</i>	26
2.2. CELL IMMUNOLOGY PROCEDURES	27
2.2.1. <i>Cell Counting</i>	27
2.2.2. <i>Cell Centrifugation</i>	27
2.2.3. <i>Cell cultures</i>	27
2.2.4. <i>Cell freezing and thawing</i>	27
2.2.5. <i>Cell Preparations</i>	28
2.3. IMMUNOLOGICAL CELL ASSAYS.....	29
2.3.1. <i>Primary Response PLN Assay</i>	29
2.3.2. <i>Generation of CD4⁺ T cell Hybridomas</i>	29
2.3.3. <i>Subcloning</i>	31
2.3.4. <i>Preparation of Con A Blasts</i>	31
2.3.5. <i>T cell hybridoma stimulation assay (IL-2 Bioassay)</i>	31

2.3.6. MHC-restriction analysis	31
2.3.7. APC Fixation by Paraformaldehyde	32
2.3.8. Time Assay	32
2.3.9. Indirect Determination of WBMC Metabolism of PA by HPLC.....	32
2.3.10. Nitrocellulose Strip IL-2 Bioassay.....	33
2.3.11. Hybridoma responsiveness to cytoplasmic or nuclear fractions	33
2.4. LONG TERM PROCAINAMIDE AND PRISTANE TREATMENT	33
2.4.1. Procainamide Treatment	34
2.4.2. Pristane Treatment	34
2.4.3. DNFB Treatment	34
2.4.4. Lymphocyte Transformation Test	34
2.4.5. Adoptive transfer	37
2.4.6. Proteinuria Concentration.....	38
2.5. FACSCALIBUR ANALYSIS	39
2.5.1. Antibody Concentration.....	39
2.5.2. Surface marker staining.....	39
2.5.3. Intracellular cytokine staining.....	39
2.6. AUTOANTIBODY DETECTION	40
2.6.1. Serum preparation.....	40
2.6.2. Indirect Immunofluorescence Detection of Antinuclear Autoantibodies.....	41
2.7. AUTOANTIBODY CHARACTERISATION BY ELISA	41
2.7.1. IgM, IgG1 and IgG2a antibody concentrations.....	41
2.7.2. Procainamide and HAPA ELISA	42
2.7.3. DNA ELISA.....	42
2.7.4. Histone ELISA	43
2.7.5. Ku, smRNP, snRNP Protein A Elisa.....	43
2.8. MOLECULAR BIOLOGICAL TECHNIQUES.....	43
2.8.1. Sample Preparation.....	43
2.8.2. SDS-PAGE Gel Electrophoresis.....	44
2.8.3. Protein Transfer and Western Blot.....	44
2.8.4. 2D Gel electrophoresis.....	45
2.8.5. Silver Staining Protocol.....	46
3 RESULTS.....	47
3.1. T CELL REACTIVITY TOWARDS PROCAINAMIDE	47
3.1.1. In vitro cytotoxicity of Procainamide and HAPA	47
3.1.2. The Ability of PA-Pulsed WBMC to Elicit a Primary PLN Response	48
3.1.3. Generation of CD4 ⁺ T cell hybridomas specific for a neoantigen produced by PA-pulsed WBMC	50
3.1.4. MHC-restriction analysis of the PA-specific CD4 ⁺ T cell hybridomas	52
3.1.5. PA-related neoantigen formation requires a period of time.....	53
3.1.6. Procainamide-neoantigen recognition by CD4 ⁺ T cell hybridomas requires a lag phase. 54	
3.1.7. Determination of PA metabolism by HPLC.....	55

3.1.8. Investigations to elucidate the specificity of the PA-neoantigens	55
3.2. LONG TERM PA TREATMENT INDUCES T CELL REACTIVITY AND SUPPRESSION	56
3.2.1. Daily water and procainamide intake by A/J mice	57
3.2.2. Protein concentration in the urine of A/J treated mice	58
3.2.3. An Increase in Spleen Weights in Procainamide and Pristane-treated Mice is Accompanied by an Increase in the B Cell Population	58
3.2.4. Are T cells from long term PA-treated A/J mice reactive ex vivo to procainamide pulsed macrophages?	60
3.2.5. CD4 ⁺ T cells from PA-treated A/J mice are the responsive T cell subset	65
3.2.6. Can B cells act as the APC source in the LTT assay?	67
3.2.7. Assessment of ANA production in long term PA-treated A/J mice	69
3.2.8. Serum Immunoglobulin concentrations assessed by ELISA	71
3.2.9. Classification of ANA	73
3.2.10. Procainamide specific antibody production in PA-treated mice	76
3.2.11. Classification of ANA types in PA- and pristane-treated sera	77
3.2.12. Adoptive transfer of CD4 ⁺ CD25 ⁻ T cells from PA-treated mice breaks self-tolerance and induces autoantibody production in naïve recipients	78
3.2.13. Ig fluctuations in the sera from the adoptive transfer A/J recipients	82
3.2.14. Classification of the autoantibody pattern produced in recipient mice after the adoptive transfer of CD4 ⁺ CD25 ⁻ T cells PA-treated donors.	84
3.2.15. CD4 ⁺ CD25 ⁺ T cells from PA-treated donors can partially suppress the ANA formation induced by gold sodium thiomalate	84
3.3. ELUCIDATION OF PA-INDUCED NEOANTIGENS	86
3.3.1. Identification of arising neoantigens in PA-pulsed WBMC	87
3.3.2. PA-pulsed macrophages also produce PA-specific neoantigens	89
3.3.3. 2D separation of procainamide-neoantigens	90
3.3.4. HEp-2 cell identification	92
4 DISCUSSION	95
4.1. IDIOSYNCRATIC DRUG REACTIONS FOLLOW A SIMILAR PATHOGENIC PATHWAY AS GRAFT- VERSUS HOST REACTIONS.....	95
4.2. FURTHER SUPPORT FOR THE HAPTEN THEORY	96
4.3. MODELS OF PA-INDUCED AUTOIMMUNITY	99
4.3.1. Protein Reactive Procainamide Metabolites are Produced upon Incubation with Macrophages	101
4.3.2. APC are Required for PA-Antigen Processing and Presentation	101
4.3.3. Induction of Autoreactive B cells by PA-Primed CD4 ⁺ T cells	101
4.3.4. Other models of PA-induced autoimmunity.....	101
4.4. THE ROLE OF THE INNATE IMMUNE SYSTEM IN DRUG-INDUCED LUPUS	102
4.5. FIGHTING OURSELVES – AUTOANTIGENS AND AUTOREACTIVE T CELLS	105
4.5.1. Epitope Spreading in Immune-Mediated Diseases	106
4.5.2. Cryptic peptides.....	107
4.5.3. Procainamide-neoantigen identification	108

4.6. MANY NEEDLES IN ONE HAYSTACK – ANA DETERMINATION IN PA-INDUCED AUTOIMMUNITY	108
4.7. THE ROLE OF REGULATORY T CELLS IN XENOBIOTIC-INDUCED AUTOIMMUNE DISEASES	110
4.7.1. <i>A Day off for CD8 T_{reg} Cells</i>	111
4.7.2. <i>Recent Updates on the Mechanisms of CD4⁺CD25⁺ T cells</i>	111
4.8. CD25 OR NOT CD25 – THAT IS THE QUESTION	113
4.9. CONCLUDING WORDS	114
5 APPENDIX A: REAGENTS AND CHEMICALS.....	115
6 APPENDIX B: MATERIALS AND SPECIAL SOLUTIONS.....	117
7 APPENDIX C: EQUIPMENT	119
8 APPENDIX D: SUPPLEMENTS.....	121
8.1. FOETAL CALF AND HORSE SERUM.....	121
8.2. PENICILLIN AND STREPTOMYCIN	121
8.3. MEDIUMS.....	121
8.3.1. <i>SC Medium</i>	121
8.3.2. <i>TC Medium</i>	121
8.3.3. <i>Naked RPMI 1640 Medium</i>	122
8.3.4. <i>HAT Medium</i>	122
8.3.5. <i>HT Medium</i>	122
8.3.6. <i>P388 Medium</i>	122
9 APPENDIX E: BUFFERS AND SOLUTIONS:.....	123
9.1. CELL IMMUNOLOGY PROCEDURES	123
9.1.1. <i>PBS (10x)</i>	123
9.1.2. <i>PMA</i>	123
9.1.3. <i>ACT</i>	123
9.1.4. <i>Freezing Medium</i>	123
9.1.5. <i>CASY Buffer (x5)</i>	123
9.1.6. <i>BSS (Balanced Salt Solution)</i>	123
9.1.7. <i>Tryptan Blue Solution</i>	124
9.1.8. <i>Aqueous buffer for Chromatin Preparation</i>	124
9.2. SDS-PAGE GEL ELECTROPHORESIS AND WESTERN BLOT	124
9.2.1. <i>2xSDS gel-loading buffer</i>	124
9.2.2. <i>Resolving Gel buffer</i>	124
9.2.3. <i>Resolving Gel Solution</i>	124
9.2.4. <i>Stacking Gel Buffer</i>	125
9.2.5. <i>Stacking Gel Solution</i>	125
9.2.6. <i>Running Buffer</i>	125
9.2.7. <i>Protein Transfer Buffer</i>	125
9.2.8. <i>Blocking buffer for Western Blot</i>	125
9.3. PROTEIN DETECTION TECHNIQUES	125

9.3.1. Ponceau-S Stock solution	125
9.3.2. Coomassie brilliant blue staining solution	125
9.3.3. SDS-PADE destain solution	126
9.3.4. Silver Staining – Heukeshoven Protocol	126
9.4. 2D GEL ELECTROPHORESIS	126
9.4.1. Rehydration Stock solution	126
9.4.2. SDS Equilibration Buffer	127
9.4.3. x4 Resolving Gel Buffer	127
9.4.4. 12.5% Resolving Gel Solution	127
10 BIBLIOGRAPHY	129