

Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse geben erstmalig die Möglichkeit, nicht nur Patienten mit einer ausgeprägten RA sondern auch die frühe RA serologisch zu diagnostizieren. Eine aberrant vermehrte Expression von vier Autoantigenen wurde in der Synovialmembran an RA erkrankter Patienten nachgewiesen. Die Aktivierung der T-Zellen, die eine Schlüsselrolle bei der Erkrankung spielen, erfolgt im betroffenen Gelenk. Möglicherweise werden auch dort schon B-Zellen zur Antikörperproduktion angeregt.

Verbesserung und Vereinfachung der Diagnostik

Die Untersuchungen der Autoreaktivitäten gegen IgG (RF), Citrullin, Calreticulin, Calpastatin, BiP und RA33 haben gezeigt, daß kein Parameter allein eine ausreichend gute RA-Spezifität aufweist. Mit den hier durchgeführten Cluster-Analysen von Autoreaktivitäten bei der RA wird ein Weg zur Verbesserung der Diagnostik der Erkrankung wie auch zur Differentialdiagnostik zu anderen rheumatischen Erkrankungen aufgezeigt.

Als ein Maß für die diagnostische Bedeutung der einzelnen Parameter dienen die Sensitivität und Spezifität. Die Sensitivität eines Parameters spielt insbesondere bei der Früherkennung einer Erkrankung eine Rolle. Eine hohe Krankheitsspezifität ist für die Differentialdiagnose der rheumatischen Erkrankungen notwendig.

Die Zusammenfassung der ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten für die analysierten Autoreaktivitäten zeigt, daß der RF-Test und der seit kurzem in einigen Labors eingeführte Citrullin-Antikörper-Test jeweils die höchste Sensitivität und Spezifität für RA besitzen, verglichen mit den anderen Erkrankungen.

Für die quantitativen ELISA-Teste kann der Cut-Off berechnet und damit in Richtung erhöhter Sensitivität bzw. Spezifität verändert werden. Die Spezifität der qualitativen Teste wird im wesentlichen durch die analytischen Kenngrößen, wie Empfindlichkeit und Störanfälligkeit beeinflusst. Eine Verbesserung der Analytik, zum Beispiel durch Etablierung quantifizierbarer Methoden wie ELISA-Tests könnten zu einer Verbesserung der diagnostischen Wertigkeit für BiP, Calreticulin und Calpastatin führen.

Für die Anti-RA33 Bestimmung mittels ELISA ist eine Überprüfung der analytischen Qualität und gegebenenfalls eine Optimierung des Tests für die Bestimmung der Reaktivität zu erwägen.

Bisherige Untersuchungen, die in der Literatur beschrieben wurden, beziehen sich auf zum Teil sehr kleine Untersuchungsgruppen und weisen große Schwankungen in der diagnostischen Spezifität und Sensitivität auf.

In der vorliegenden Arbeit wurden für 6 ausgewählte Autoantigene die Immunreaktion in der Synovialflüssigkeit von ca. 200 Patienten und in den Seren von ca. 280 Patienten verschiedener Erkrankungsgruppen untersucht. Es wurde die Immunreaktion gegen die Autoantigene BiP, Calpastatin, Calreticulin, Citrullin, RA33 und den Rheumafaktor (RF) bestimmt. Die ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten sind im Vergleich mit Literaturwerten in den Tabellen dargestellt.

Tab. 8a: Sensitivitäten in % bei RA-Patienten

	RF	Anti-Citrullin	Anti-Calreticulin	Anti-Calpastatin	Anti-BiP	Anti-RA33
Serum (hier)	69	61	55	45	63	27/24
SF (hier)	76	80	71	57	39	24
frühe RA (Serum)	58	41	15	47	51	n.d.
Schellekens	n.d.	76	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Després	n.d.	n.d.	n.d.	46	n.d.	n.d.
Mimori	n.d.	n.d.	n.d.	57	n.d.	n.d.
Bläß	68	n.d.	n.d.	n.d.	66	n.d.
Hassfeld und Meyer	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35

Tab. 8b: Spezifitäten in % bei RA-Patienten

	RF	Anti-Citrullin	Anti-Calreticulin	Anti-Calpastatin	Anti-BiP	Anti-RA33
Serum (hier)	82	94	62	73	60	70/80
SF (hier)	88	69	35	74	75	78
Mimori	n.d.	n.d.	n.d.	72	n.d.	n.d.
Bläß	76	n.d.	n.d.	n.d.	99	n.d.
Schellekens	n.d.	96	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hassfeld und Meyer	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	87

Die Zusammenfassung der ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten für die analysierten Autoreaktivitäten zeigt, daß der RF, Citrullin, Calpastatin, und BiP jeweils die höchste Sensitivität und Spezifität für RA besitzen.

Die hier erzielten Ergebnisse bezüglich der Sensitivität und Spezifität der einzelnen Parameter bei der SF-Analyse unterscheiden sich teilweise erheblich von den publizierten Werten, für andere besteht eine gute Übereinstimmung. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Sensitivitäten und Spezifitäten, wie sie hier ermittelt wurden und wie sie von anderen Arbeitsgruppen publiziert wurden, könnte z.B. aus der unterschiedlichen Zusammensetzung von der hier analysierten Synovialflüssigkeit und dem üblicherweise verwendeten Serum liegen. Die Synovialflüssigkeit zeigt im Vergleich zu Serum eine erheblich andere Zusammensetzung, was auch eine veränderte Dichte und eine veränderte Viskosität zur Folge hat. Der hohe Gehalt an Hyaluronsäure in der Synovialflüssigkeit kann bewirken, daß die analytische Empfindlichkeit in den hier verwendeten Testsystemen beeinflusst wird. Ein weiterer Aspekt stellt die Tatsache dar, daß durch einen möglicherweise hohen Anteil an löslichen Immunkomplexen z.B. auch durch die Anwesenheit von Rheumafaktoren, die spezifische Immunreaktion maskiert oder in anderer Art und Weise modifiziert wird.

Die Werte für die Seren-Analyse stimmen relativ gut mit den in der Literatur angegebenen Werten überein. Die Sensitivitäten für frühe RA-Patienten liegen erwartungsgemäß niedriger. Aber auch hier sind BiP, Calpastatin, Citrullin und der RF die deutlichsten Autoreaktivitäten.

Die für die Einzelparameter errechneten diagnostischen Kenngrößen liegen alle unter 90%. Zur Verbesserung wurde überprüft, ob eine Kombination der Autoreaktivitäten eine Erhöhung der Sensitivität und der Spezifität bewirkt. Die dabei zugrundeliegende Überlegung ist, daß die RA eine multifaktorielle Autoimmunerkrankung ist, in deren Pathogenese Autoimmunreaktionen gegen verschiedene Autoantigene eine Rolle spielen. Dieses sollte sich dann auch in mehreren nachweisbaren Autoreaktivitäten widerspiegeln.

Es wurden alle möglichen Kombinationen von zunächst drei und vier ausgesuchten Autoreaktivitäten gebildet und diesen die Zustände "positiv" und "negativ" zugeordnet. Für die Kombination von drei Autoreaktivitäten wurden die Parameter RF, Citrullin und BiP gewählt, weil sie die höchste Sensitivität bzw. Spezifität für RA aufwiesen. Aus den 8 Kombinationsmustern gab es bereits zwei, die zu 100% spezifisch für RA waren. Berechnet man die Häufigkeiten der einzelnen Befundskonstellationen bei Kombination von 4 Parametern -RF, BiP, Citrullin und Calpastatin- erhält man unter Berücksichtigung der 100%ig RA-spezifischen Muster eine Sensitivität von 54% für die RA in der Synovialflüssigkeit.

Weiterhin ließen sich die Sensitivität und der negative Vorhersagewert bei steigendem Musterumfang zur Fünf- und Sechsfachkombination bei den Seren erhöhen. Die Sensitivität erreichte hier 60%. Diese Beobachtung läßt die Schlußfolgerung zu, daß die Sensitivität und der negative Vorhersagewert mit steigender Größe oder Änderung der Musterzusammensetzung ebenfalls steigen können. Eine Klassifikationsanalyse mit CLASSIF1 berechnete (unter Berücksichtigung, daß für jede Erkrankung nur ein Muster typisch ist) für die Synovialflüssigkeiten eine Spezifität von 88% und eine Sensitivität von 91%. Das ergibt einen positiven Vorhersagewert für die RA von 94% und einen negativen von 83%.

Für die Seren sehen die Werte etwas schlechter aus mit einer Spezifität von 83% und einer Sensitivität von 77%. Der positive Vorhersagewert liegt bei 84% und der negative bei 75%. Unter Berücksichtigung, daß man den Erkrankungen jeweils mehrere Muster zuordnen kann, erreicht man auch mit der logistischen Regressionsanalyse CLASSIF1 eine absolute Spezifität von 100%. Der positive Vorhersagewert beträgt damit 100% und der negative Vorhersagewert fällt auf 67%. Die Darstellung der Ergebnisse mit Hilfe der logistischen Regression zeigte eindeutig einen Gewinn an Trennschärfe bei Kombination mehrerer Autoreaktivitäten. Interessanterweise treten zusätzlich Muster bei der Kombination von 5 Parametern auf, die für andere Erkrankungen spezifisch sind. Für die reaktive Arthritis und Arthrose gibt es solche spezifischen Kombinationen. Weiterführende Analysen der Parameter in dieser Richtung könnten zusätzliche Informationen auch für andere rheumatische Erkrankungen liefern und eine Differentialdiagnostik erleichtern.

Eine rein kombinatorische Analyse der sechs Autoreaktivitäten ermöglicht ebenfalls eine 100%ige RA-Diagnostik. Sie erfaßt aber bisher nur 60% der RA-Patienten und erfordert

darum weitere Parameter. Ein Zusammenhang zwischen Autoreaktivitätsmustern, klinischem Krankheitsbild, Erkrankungsverlauf und Medikation konnte nicht gefunden werden.

Die frühen RA-Seren zeigen ebenfalls RA-spezifische Muster. Ihre Sensitivität beträgt ebenfalls nur 64%. Auffällig ist die enge Korrelation zwischen dem Rheumafaktor und Citrullin-Antikörpern. Citrullin-Antikörper waren nur nachweisbar, wenn gleichzeitig RF auftraten. Es ist damit erstmalig möglich, frühe RA serologisch zu diagnostizieren.

Ausblick

Die hier vorgestellten Ergebnisse legen dar, daß es durch Musterkombination möglich ist, eine RA eindeutig von anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises und Gesunden abzugrenzen. Daraus läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß nicht eine Autoreaktivität, sondern die Kombination mehrerer, die RA am Besten zu beschreiben in der Lage ist. Demnach ist die RA die Summation einer Vielzahl von Autoreaktivitäten, unabhängig davon, ob eine Autoreaktivität spezifisch für die RA ist oder nicht. Dabei mag sich durchaus das Spektrum wie auch die Zusammensetzung der immunologisch relevanten Determinanten im Verlauf der RA ändern, mit der Folge eines veränderten Sets von autoreaktiven T- und B-Zellen. Diese Sets von unterschiedlichen B- und T-Zell-Autoreaktivitäten induzieren die Erkrankung, halten sie aufrecht und beeinflussen den Krankheitsverlauf (Schübe). Dies ist nicht nur von pathogenetischer sondern auch von diagnostischer Relevanz. Bestimmte Autoreaktivitäten werden möglicherweise nur zeitweise beobachtet, ein Phänomen, das man als Auswirkung des Epitope-Spreading kennt. Dies ist die Folge aus der individuellen autoimmunen Historie eines Patienten, mit seinen Umwelt-, Infektions- und genetischen Faktoren. Wie im klinischen Bild stellt die RA auch auf immunologischer Ebene eine multifaktorielle Erscheinung dar und es würde verwundern, einen einzigen Faktor als RA-kontrollierend bzw. -auslösend zu finden.

Zwei Drittel der Patienten mit früher RA wiesen in der Sechsfachkombination RA-spezifische Muster auf. Es liegt anhand dieser Ergebnisse die Tatsache vor, daß absolut RA-spezifische Muster auch schon im Frühstadium der Erkrankung auftreten. Da die ACR Kriterien bei einer Frühdiagnostik sehr schwer greifen, ist eine serologische Erkennung von enormer Bedeutung. Durch kontrollierte prospektive Studien an Patienten mit früher RA oder dem Verdacht auf eine RA, beziehungsweise Hochrisikopatienten (z.B. genetisch veranlagte mit Risiko HLA-Typ oder Verwandten von Erkrankten) sollten diese Ergebnisse untermauert und weiter differenziert werden. Zur Erhöhung der negativen Vorhersagewerte müssen weitere Autoreaktivitäten wie das SA-Antigen als auch Antigene, die speziell im Gelenk vorkommen (HC gp39, Kollagen TypII, CH65) für eine Mustererkennung hinzugezogen werden.

Die diagnostische Güte und die Vorhersagewerte resultieren aus mathematischen Berechnungen und Kombinationen innerhalb der für repräsentativ gehaltenen Stichproben. Bestätigt sich in weiteren und größeren Screenings dieses Modell, so ist der Weg für das Einbeziehen in die klinische Routine geebnet. Eine Vereinfachung der noch experimentell aufwendigen Tests in ELISA, Kombi-Immunoblots oder Chips ist dazu ebenfalls notwendig. Danach kann jeder RA-verdächtige Patient einfach und schnell getestet werden, und bei Vorliegen eines der definierten Muster als absolut positiv gewertet werden.

Besseres Verständnis des Pathomechanismus

Um ein besseres Verständnis der RA zu erreichen, genügt es nicht, nur die humorale Seite der verschiedenen Autoantigene zu betrachten. Deshalb wurden die Autoantigene BiP, Calreticulin, Calpastatin und p205/IgG genauer untersucht. Trotz der weitgehenden Anergie der T-Zellen in der SF, findet man auch antigenspezifische T-Zell-Reaktivität als Kriterium für pathogenetische Relevanz. Da das Vorkommen von T-Zellen und deren Reaktivität typisch für die Erkrankung der RA ist, sollte auch bei der Betrachtung des Pathomechanismus dieser Aspekt mit im Vordergrund stehen.

Zur Überprüfung der T-Zell-Autoreaktivität wurden PBMC unter Bedingungen kultiviert, die eine spezifische Proliferation der autoreaktiven Subpopulationen gut erkennen lassen. Hierzu wurde serumfreies CG-Medium genutzt, das den Vorteil bietet, daß es nicht schon durch das Medium selbst zu einer T-Zell-Stimulation kommt⁹¹. Die gemessene Hintergrundaktivität bleibt niedrig, wodurch die Proliferation der antigenspezifischen T-Zellen erkennbar wird.

Für die Proliferationsassays wurde ein in sich geschlossenes System verwendet, das lediglich aus PBMC (vor allem T-Zellen und APC), Antigen, serumfreiem Medium und Antibiotika zur Bakteriostase bestand. Die zur Immunantwort notwendigen Zytokine mußten von den Zellen selbst sezerniert werden.

Ferner wurde versucht, PBMC und Antigen in vergleichsweise geringen Konzentrationen einzusetzen, um eine spezifische T-Zell-Stimulation durch das Antigen unter annähernd physiologischen Bedingungen nachzuempfinden. $2 \cdot 10^5$ PBMCs wurden pro well in 96-well-Mikrotiterplatten mit Rundböden kultiviert. Dadurch war eine optimale Interaktion der T-Zellen mit den APC möglich. Die T-Zellen und APC wurden dabei in einem physiologischen Verhältnis eingesetzt. So lag die Anzahl der APC annähernd bei 1:10-1:50, die Zahl der Antigen-spezifischen T-Zellen aus dem peripheren Blut liegt laut Literatur bei $1:10^5$ - $1:10^6$ ⁹². Für T-Zellen aus der SF gelten wahrscheinlich höhere Werte. Da zudem jeweils Triplikate gemessen wurden, konnten etwaige unspezifische Schwankungen ausgeschlossen werden. Durch die definierten Zellkulturbedingungen war eine spezifische Erfassung der T-Zell-Proliferation möglich.

Antigen-spezifische T-Zell-Proliferation

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die Antigen-spezifische Proliferationsantwort von T-Zellen aus peripherem Blut gegen Calreticulin, Calpastatin, BiP und p205/IgG hauptsächlich eine sog. Recall-Antwort oder eine Antwort vorstimulierter (geprimter) Zellen ist. Da geprimte T-Zellen bereits MHC Klasse II und den hochaffinen IL-2-Rezeptor exprimieren, sind sie schneller als ungeprimte T-Zellen in der Lage, nach einem Stimulus zu proliferieren. Bei einer akuten spezifischen T-Zell-Reaktivität in dem jeweiligen Patienten würde ein Proliferationsmaximum innerhalb der ersten drei bis fünf Tage erwartet. Ein späteres Proliferationsmaximum spricht für eine Recall-Antwort von spezifischen T-Zellen, die nicht akut stimuliert werden. T-Zellen von RA-Patienten, die mit Calreticulin bzw. Calpastatin stimuliert wurden, zeigen die stärkste Proliferation zwischen Tag drei und Tag fünf, wie es für geprimte T-Zellen typisch ist. Eine Stimulation mit p205 führte zu zwei Proliferationsmaxima am Tag drei und acht, was für die Antwort geprimter Zellen als auch

eine Recall-Antwort spricht. BiP rief ausschließlich eine recall-Antwort hervor. Es konnten keine Unterschiede zwischen PBMC und SFMC bezüglich ihrer zeitlich bedingten Proliferationsantwort festgestellt werden. Die Stimulationsindices erreichten Werte von bis zu fünf. Obwohl sie auch deutlich niedriger sind als bei frisch immunisierten Personen ⁹³, befinden sich die Stimulationsindices in einer Größenordnung, die bei einer Vielzahl von Antigenen ⁹⁴ erreicht wird. Nur p205/IgG erwies sich als ein enorm starkes Autoantigen mit zehnfach höheren Stimulationsindices. Offensichtlich ist die p205/IgG-reaktive Zellpopulation sehr viel größer als bei den anderen Antigenen.

Bei dem Screening von RA-Patienten auf T-Zell-Reaktivität gegen die Autoantigene reagierten bei Calreticulin 11% und bei Calpastatin 17% der Patienten mit einer schnellen Antwort der T-Zellen. p205/IgG-spezifische T-Zellen konnten bei 70% der RA-Patienten nachgewiesen werden. Ebenfalls 59% der RA-Patienten weisen BiP-spezifische T-Zellen auf. Allen Autoantigenen ist eine sehr hohe RA-Spezifität zwischen 93% und 100% gemein. Es traten keine Korrelationen zwischen den einzelnen Antigenen auf.

Trotz der immer zitierten hohen Anzahl nichtreaktiver, aneurer T-Zellen im Gelenk ⁹⁵ und eines durch IL-10 beeinflussten Zytokinmilieus, war es möglich, Calreticulin- und p205/IgG-spezifische autoreaktive T-Zellen in der Synovialflüssigkeit nachzuweisen. Die Stimulationsfähigkeit war in beiden Fällen höher als im peripheren Blut. Wo die Aktivierung der T-Zellen stattfindet, ist aber nicht eindeutig bestimmbar. Einerseits kann es primär am Ort der Entzündung (Gelenk) zu einer Akkumulation autoreaktiver T-Zellen kommen, indem hier über Kontakt mit APCs die Immunantwort induziert wird. Es ist bereits nachgewiesen, daß sich synoviale B-Zellen in lymphatischen Follikeln zu Plasmazellen differenzieren können und hochaffine Antikörper produzieren ⁹⁶. Diese These wird durch p205/IgG-Versuche untermauert, in denen die T-Zellen peripherer Lymphknoten geringer proliferieren als diejenigen aus peripherem Blut. Zellen aus der Synovialflüssigkeit zeigen dabei die höchsten Stimulationsindices. p205/IgG-spezifische T-Zellen können vermutlich im entzündeten Gelenk voraktiviert werden und treten dann in den peripheren Blutstrom ein, der sie weiter zu den sekundären lymphatischen Organen transportiert. Die Proliferationsabnahme gegen p205/IgG und die damit verbundene Abschwächung der klinischen Symptomatik der Erkrankung während der Leukapherese legt die Vermutung nahe, daß p205/IgG-spezifische T-Zellen am Ort der Entzündung voraktiviert werden müssen bevor sie in den Blutstrom eintreten. Um die Effekte der Leukapherese länger zu erhalten, müßten auch und gerade die T-Zellen am Entzündungsort (d.h. im Gelenk) entfernt oder inaktiviert werden. In diesem Zusammenhang ist es klar, daß ein geringes Niveau an autoreaktiven T-Zellen ausreicht, um die Entzündung aufrechtzuerhalten und erneut auszudehnen ^{97, 98, 99}. Andererseits kann aufgrund einer generalisierten Störung der T-Zellhomöostase die T-Zell-Aktivierung in sekundär lymphatischen Organen (z.B. Thymus) vollzogen werden und dann erst eine sekundäre Einwanderung in das Gelenk und dortige Akkumulation stattfinden.

Wie die immunhistochemischen Analysen der Synovialmembran von RA-Patienten zeigen, kommt es im Rahmen der Gelenkdestruktion zur Überexpression von Calreticulin, Calpastatin, BiP und p205/IgG im Bereich der synovialen Deckzellschicht. Makrophagenähnliche (CD68+) und fibroblastenähnliche (CD90+) Synoviozyten bildeten die

verdickte synoviale Deckzellschicht (synovial lining layer), welche den Abschluß des Synovialgewebes in Richtung Gelenklumen bildet. CD68+ Zellen traten in geringerem Umfang und diffuser Verteilung auch in der Sublining-Schicht auf. Eine Kolokalisation der Autoantigene mit follikulären Strukturen in der Sublining-Schicht aus B- und T-Zellen ist nicht nachweisbar. Auch bei der reaktiven Arthritis konnte im Unterschied zur Osteoarthritis eine Überexpression festgestellt werden. Das könnte im Rahmen einer allgemeinen Immunaktivierung und Antigenfreisetzung auftreten, wobei anzunehmen ist, daß eine autoimmune Reaktion gegen die jeweiligen Autoantigene nur bei der RA auftritt, da Vergleichsschnitte von Osteoarthrose- und reaktive Arthritis-Patienten und Gesunden keine B- oder T-Zellen aufwiesen.

Von den 34 RA-Patienten, bei denen neben der T-Zell-Autoreaktivität auch das Auftreten von Autoantikörpern gegen Calreticulin untersucht wurde, waren in 75% der Fälle Calreticulin-spezifische Autoantikörper nachweisbar. Bei den parallel auf B- und T-Zell-Ebene untersuchten Patienten konnte aber keine Übereinstimmung zwischen B- und T-Zellreaktivität festgestellt werden. Da aber eine humorale B-Zell-Antwort auf T-Helferzellen angewiesen ist, werden die beiden Immunantworten eine unterschiedliche Kinetik in vivo aufweisen. Daß bei anderen rheumatischen Erkrankungen (z.B. SLE und Sjögren-Syndrom), denen eine Autoantikörperbildung gegen Calreticulin zugeschrieben wird^{100, 101}, keine entsprechende Autoreaktivität auf T-Zell-Ebene gefunden wurde, mag an der zu geringen Zahl der untersuchten Fälle (SLE n=7, Sjögren-Syndrom n=9) bzw. an der mangelnden Korrelation von B- und T-Zellantwort liegen.

Bei dem Autoantigen BiP wurde ein Epitopmapping durchgeführt. Es konnte ein herausragendes T-Zell reaktives Epitop mit gefunden werden (SYAYSLKNQI). Diese Sequenz stimulierte die T-Zellen der drei RA-Patienten besonders stark. Neun weitere Ansätze erreichten einen Stimulationsindex von über zwei und sind daher auch als reaktiv anzusehen. Eine genauere Analyse steht noch aus.

Die Peptide p205-1, p205-2 und p205-3 wurden synthetisch nach den veröffentlichten Sequenzen⁴¹ hergestellt und an BSA gekoppelt. Das Peptid p205-3 (H₂N-C-Y V D G V E V H N A K-CONH₂), dessen Sequenz identisch zur IgG-Sequenz der schweren Kette ist und in dem Bereich liegt, der als Ziel für Rheumafaktoren bekannt ist (C_H2, C_H3), stimuliert die T-Zellen von fünf der sechs getesteten RA-Patienten. Die Stimulation ist sogar teilweise höher als mit SF. Es wurde schon beschrieben, daß die leichte Kette des IgG und/oder F_{ab}-Fragmente von IgG periphere T-Zellen von RA-Patienten zu einer Proliferationsantwort anregen können¹⁰². T-Zellen jedoch, die gegen RF-Epitope reagieren, sind bislang nicht beschrieben worden. Die unterschiedliche Proliferationskapazität der IgG-haltigen Fraktion im Vergleich zu GF II könnte vielleicht an einer unterschiedlichen Antigenpräsentation liegen, da die Stimulierbarkeit von T-Zellen mit p205/IgG sehr viel stärker ist als mit der IgG-haltigen Fraktion. Andererseits kann dieser Effekt auch auf eine unterschiedliche Menge an p205/IgG oder Verfügbarkeit in der IgG-Fraktion zurückgeführt werden. Es ist erstaunlich, daß trotz einer starken humoralen Anti-IgG-Antwort, die T-Zellantwort auf IgG-Epitope noch nicht vorher entdeckt wurde. Die Erklärung liegt vielleicht darin, daß die Antigenpräsentationen von IgG und p205/IgG unterschiedlich sind. Es wurde gezeigt, daß die

Sequenz der Ferrohydrogenase von *Disulfobivrio desulfuricans* (19 Aminosäuren) und die Sequenz einer Hirudin-sensitiven Proteinase (22 Aminosäuren) ähnlich der Sequenz des p205 sind ¹⁰³. Beide Sequenzen überlappen sich mit p205 in 16 identischen Aminosäuren. Man kann vermuten, daß sie eine funktionell konservierte Domäne bilden. p205-spezifische T-Zellen könnten in der Pathogenese der RA eine wichtige Schlüsselrolle einnehmen, da diese T-Zellen gegen ein RF-Epitop reagierten. Die Immunisierung eines Kaninchens mit dem Peptid p205-3 führt zu einer "RF-Produktion". p205-3 regt ebenfalls menschliche B-Zellen in vitro zur RF-Produktion an. Möglicherweise induzieren T-Zellen die RF-Produktion der B-Zellen. In den Proliferationsversuchen zur genaueren Betrachtung der sich vermehrenden Zellpopulationen wurde gezeigt, daß die p205/IgG-Stimulation hauptsächlich eine T-Zell-Proliferation hervorruft, aber auch, daß sich B-Zellen vermehren. Vielleicht werden nicht nur T-Zellen durch p205/IgG zur Proliferation angeregt, die dann einen Einfluß auf die B-Zellen ausüben, sondern p205/IgG könnte auch direkt an B-Zellen ankoppeln und so die Produktion von RF steuern.

Antigen-spezifische T-Zell-Populationen

Es konnte gezeigt werden, daß die Zellkulturbedingungen gut auf die Untersuchung von T-Zellen abgestimmt waren, da 95% aller Zellen im Test T-Zellen sind. B-Zellen stellen nur einen Anteil von <2% an der Gesamtzellpopulation dar. Das Autoantigen p205/IgG stimuliert sowohl CD4-positive als auch CD8-positive T-Zellen. Da sich der Anteil der proliferierenden CD4⁺-Zellen im Vergleich zu den proliferierenden CD8⁺-Zellen um 25% bis 150% vergrößert, stimuliert p205/IgG die T-Helfer-Zellen stärker als die zytotoxischen T-Zellen. Es konnte bisher nicht genauer analysiert werden, welche Unterpopulationen der CD4⁺-Zellen an der Proliferation beteiligt waren. In unstimulierter Kultur proliferierten CD4-positive und CD8-positive Zellen gleichermaßen, aber insgesamt in achtfach geringerer Anzahl als mit GF II-Stimulation. Es kann davon ausgegangen werden, daß p205 kein Superantigen darstellt, da die Mitogenkontrolle (PHA) um ein Vielfaches stärker proliferierte. Die B-Zellen werden ebenfalls stimuliert. Ihr Anteil an der Gesamtheit der proliferierenden Zellen beträgt jedoch weniger als 3% und kann darum nicht für die beschriebenen Effekte verantwortlich gemacht werden. Die Population der CD3-positiven Zellen ist um ca. 5% größer als die CD4- und CD8-positiven Zellen zusammen. Das liegt daran, daß Gedächtnis-T-Zellen und T-LGL (Thymus-large granular lymphocytes) eine Subpopulation der NK-Zellen (natürliche Killer-Zellen) ebenfalls den CD3-Rezeptor exprimieren, aber nicht den CD4- oder CD8-Rezeptor. Diese Zellen werden auch zur Proliferation angeregt. Das erklärt die größere Anzahl der CD3-positiven gegenüber den CD4-/CD8-positiven Zellen.

Ein Phänomen ist das Vorhandensein von Antigen-spezifischer Suppression der T-Zellantwort bei Calreticulin, Calpastatin und BiP. Die ³H-Methyl-Thymidin-Inkorporation sinkt im Vergleich zur Negativprobe auf die Hälfte der Hintergrundproliferation. Durch Zugabe von Antikörpern, die HLA-Moleküle derart blockieren, daß die Antigenpräsentation inhibiert wird, kam es bei den Patienten mit suppressiver Reaktion zu einer jeweils für die drei Antigene spezifischen Proliferation, was für das Vorhandensein von regulatorischen T-Zellen, die eine Restriktion gegenüber HLA besitzen, spricht. Bei Calreticulin kam es unter Verwendung von Anti-HLA-Antikörpern zu einer verstärkten Proliferation. In der restlichen

Population der RA-Patienten führten die Anti-HLA-Antikörper zu keiner Änderung des Proliferationsverhaltens bzw. durch Inhibition der Antigenpräsentation zu einer verringerten Proliferation. Bei Calpastatin zeigten Anti-HLA-DR- und DQ-Antikörper keinerlei Wirkung. Durch Zugabe von Anti-HLA-DP-Antikörpern kam es bei den Patienten mit erhöhter Reaktion zu einer Suppression der Proliferation. In der Population der RA-Patienten, die durch Calpastatin inhibiert wurden, führten die Anti-HLA-DP-Antikörper zu keiner nennenswerten Änderung des Proliferationsverhaltens. Bei BiP bewirkten die Anti-HLA-DR-Antikörper ebenfalls heterogene Veränderungen der T-Zell-Proliferation, wobei sich hier zwei Reaktionsmuster herauskristallisierten. Bei den Spendern, deren Stimulationsindex größer als eins war, kam es, in mehr oder weniger stark ausgeprägter Form, durch Anti-HLA-DR-Antikörper zu einer Reduzierung des Stimulationsindex. Im Fall von 17 RA-Patienten, die suppressiv auf BiP reagierten, führten dieselben Antikörper zu einer Erhöhung des Stimulationsindex.

Die HLA-Restriktion der regulatorischen T-Zellen unterscheidet sich offenbar von der HLA-Restriktion der Effektor-T-Zellen. Die inhibitorischen Eigenschaften von Suppressorzellen sind antigenspezifisch und stehen im Gleichgewicht zu entsprechenden autoreaktiven T-Zellen.

Das Vorhandensein solch regulatorischer T-Zellen war lange Zeit heftig umstritten. Neuerdings sind aber CD4⁺-Subpopulationen beschrieben, die bestimmte Oberflächenmarker wie CD25⁺, RT 6.1, CD5^{high} oder CD45RB/RC^{low} exprimieren^{104, 105}. Diese Marker treten zwar nicht ausschließlich bei Suppressorzellen auf, entfernt man jedoch diese Zellen bei Versuchstieren und transferiert die verbliebenen CD4⁺-Zellen in syngene T-Zell-defiziente Mäuse, so entwickeln diese verschiedene organspezifische Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus, Autoimmunthyreoiditis und Autoimmungastritis. Ohne die Depletion der beschriebenen Subpopulationen führt ein solcher Transfer nicht zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen. Die präventiven Eigenschaften von CD4⁺-Subpopulationen sind ebenfalls bei der Colitis beschrieben¹⁰⁶, wobei hier die Proliferation von bystander T-Zellen inhibiert wird. Ähnliches wird bei der Lepra angenommen¹⁰⁷.

Autoreaktive T-Zellen können auch bei Gesunden aus dem peripheren Blut isoliert werden, wenn sie in vitro durch Selbstantigene stimuliert werden¹⁰⁷. Diese Stimulation durch Selbstantigen ist auch in vivo möglich, wenn z.B. bei Entzündung vermehrt körpereigene Moleküle freigesetzt oder überexprimiert werden, wie es auch bei Calreticulin bekannt ist und hier in immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt wurde. Die fehlende Regulation der entstehenden autoreaktiven Zellen durch die suppressive Zellpopulation würde eine Progredienz des Entzündungsprozesses bedeuten und ist ein möglicher Pathomechanismus bei Autoimmunerkrankungen wie der RA. So ist im Gegensatz zu autoreaktiven T-Zellen die suppressive T-Zellantwort gegenüber den Autoantigenen Calreticulin, Calpastatin und BiP auch bei allen untersuchten Kontrollgruppen aufgetreten.

Die in den entnommenen Überständen enthaltenen Zytokine sind Produkte der verschiedenen lymphohämatopoetischen Zellen, da keine Zytokinzugabe erfolgte. Ein grundsätzliches Problem dabei ist jedoch, daß es sich bei den bestimmten Zytokinen um eine Akkumulation über den Zeitraum der PBMC-Kultur handelt und nicht um eine "Momentaufnahme".

Andererseits entspricht das aber auch den physiologischen Bedingungen, da einige Zytokine akkumulieren und andere, die kurzlebiger sind, nur in geringen Mengen auftreten. Die Zytokinkonzentration entspricht somit nicht der Zytokinsekretion zum Zeitpunkt der Überstandentnahme, also dem angenommenen Zeitpunkt der maximalen Zellproliferation. Die Kinetik der Expression und Sekretion ist für jedes Zytokin unterschiedlich. Auch beeinflusst durch die Halbwertszeit kann ein verzerrtes Bild des Zytokinmusters zum Zeitpunkt der Proliferationsmessung entstehen. Erschwerend kommt hinzu, daß nicht ersichtlich werden kann, ob eine bestimmte Zytokinkonzentration entstand, weil viele (unspezifische) PBMC geringe Mengen an Zytokin produzieren oder ob es eine kleine PBMC-Population gab, die hochaktiv Zytokine sezernierte. Desweiteren bleibt wie bei allen klassischen Assays unklar, wieviele der in den Überständen vorhandenen Zytokine funktionell wirksam sind, da Zytokine infolge von Inhibitoren biologisch inaktiv, aber immunologisch detektierbar sein können. Abhilfe könnte hier ein Bioassay schaffen, indem nach Zugabe der Probe die Reaktion von Indikatorzellen registriert wird (Proliferation, Antikörperproduktion etc.). Diese Methode besitzt aber aufgrund der redundanten Zytokineigenschaften eine geringe Spezifität. Desweiteren ist seit kurzem eine innerzelluläre Zytokinmessung mittels Markierung und FACS-Analyse möglich. Aber auch hier kann keine funktionelle Wirksamkeit nachgewiesen werden. Die wohl annähernd genauesten Ergebnisse werden durch vergleichende Untersuchungen aller drei Methoden erzielt. Das scheitert aber meist an der geringen Materialmenge und der Verfügbarkeit der Methoden. Trotz der o.g. Einschränkungen ist es möglich, anhand der im ELISA bestimmten Zytokine, einen Überblick über das Zytokinmilieu der PBMC von RA-Patienten zu bekommen.

Die detektierten Quantitäten an IFN- und IL-2 sind abhängig vom Versuchsaufbau (Zellzahl, eingesetzte Stimulanz für die PBMC und Zeitpunkt der Messung) und damit schwer mit Quellenangaben vergleichbar. Zieht man Werte heran, die im Zusammenhang mit PBMC- bzw. Gewebe-Kulturen bei Gesunden, Masern und Malaria gewonnen wurden^{93, 108}, so ist von einer suffizienten IFN- -Sekretion seitens der PBMC zu sprechen, zumal unter entsprechender Stimulation (PHA) deutliche Mengen des Zytokins in den Überständen vorhanden war. In anderen Quellen¹⁰⁹ wiederum liegen die IFN- -Konzentrationen teils deutlich über den hier ermittelten Werten, was mit einer defizienten IFN- -Produktion bei PBMCs von RA-Patienten gleichzusetzen wäre. Solch eine IFN- und IL-2 Defizienz wird bei der RA allgemein angenommen¹¹⁰, zumal auch in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten höchstens Spuren von IFN- und IL-2 gefunden wurden¹¹¹.

Da IFN- vorrangig von T-Zellen sezerniert wird und vor allem für die Interaktion mit Makrophagen verantwortlich ist, könnte diese Defizienz auch als Indiz für eine mangelnde pathogenetische Bedeutung der T-Zellen gewertet werden.

IFN- bewirkt eine Aktivierung der Makrophagen, einhergehend mit der auch bei Lepra beschriebenen Fähigkeit, die HLA-DR-Expression zu verstärken¹¹². So bewirkt eine hochdosierte IFN- -Therapie eine Exazerbation der RA¹¹³. IFN- besitzt aber auch protektive Eigenschaften, wie z.B. eine antiproliferative Wirkung, die es über eine teilweise Antagonisierung von IL-1 und TNF- erzielt¹¹⁴. Letztere Zytokine wirken u.a. auf die Zellproliferation sowie auf die Knorpel- und Knochenresorption. Infolge dieser Fähigkeiten

ist es nachvollziehbar, daß bei der Therapie mit niedrigdosiertem IFN- positive Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf beschrieben sind.

Auch wenn man von vergleichsweise niedriger IFN- -Expression ausgeht, sprechen einige Argumente gegen einen funktionellen IFN- -Mangel. Injiziert man SCID-Mäusen, denen rheumatoides Synovialgewebe transplantiert wurde, Anti-CD2-Antikörper, wodurch 80-90% der infiltrierenden T-Zellen eliminiert werden, so reduziert sich die von CD68⁺-Zellen produzierte TNF- - bzw. IL-15- m-RNA um 86% bzw. 84%. Neben diesem Verlust funktioneller Aktivität der Monocyten und Makrophagen nimmt infolge der T-Zelldpletion auch deren Zahl ab. Die Applikation exogenen IFN- bewahrt die CD68⁺-Zellen jedoch vor diesem Schicksal ¹¹⁵. Unabhängig von der meßbaren IFN- -Konzentration scheint somit im Mikromilieu eine ausreichende IFN- -Konzentration vorzuliegen, um eine regulatorische Wirkung der T-Zellen zu gewährleisten, wie es z.B. bei der Riesenzellvasculitis durch IFN-⁺CD4⁺-Zellen nachgewiesen wurde ¹¹⁶. Abgesehen davon handelt es sich bei vielen der publizierten Zytokinkonzentrationen um artifizielle Systeme mit hohen Antigen- und Zellkonzentrationen, MHC-unabhängiger Stimulation und Immunisierung ^{117,118}, so daß die hier gemessenen -wenn auch geringen- IFN- -Konzentrationen der Behauptung widersprechen, daß bei der RA eine defiziente IFN- -Produktion besteht.

Ähnliches gilt für das Lymphokin IL-2. Es war zwar, in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen ¹¹⁹, nicht in Synovialflüssigkeiten von RA-Patienten nachweisbar, in den Zellkulturüberständen der RA-PBMC kam es jedoch vor. Das Vorhandensein von reaktiven T-Zellen und IL-2 widerlegt somit die Annahme, daß T-Zellen bei der RA generell anerg sind. Die quantitative Bewertung des sezernierten IL-2 zeigt zwar, daß die Konzentration relativ niedrig ist, dafür wurde aber das Zytokin IL-15 in sehr großen Mengen gefunden. IL-2 scheint mit IFN- zu korrelieren. p205/IgG- und Calreticulin-Stimulationen bewirken eine höhere IL-2- und IFN- -Produktion als die Stimulation mit Calpastatin und BiP.

In der Synovialflüssigkeit getesteter RA-Patienten wurden Konzentrationen an IL-15 gefunden, die um das Vielfache über der in Quellen angegebenen Konzentration liegt ¹²⁰. in den Kulturüberständen von Calreticulin-, Calpastatin- und BiP-stimulierten PBMC konnten ebenso teilweise sehr hohe IL-15-Konzentrationen gemessen werden. Auch bei anderen chronischen Erkrankungen wie Lepra, Colitis ulcerosa und chronischen Lungenerkrankungen, bei denen T-Zellen von pathogenetischer Bedeutung sind, wurden hohe IL-15 Expressionen registriert ^{121,122,123}. IL-15 spielt eine zentrale Rolle bei der T-Zell-Rekrutierung und -Aktivierung, besonders bei CD45RO⁺-Zellen. Es induziert eine TNF- -Produktion. Außerdem wird eine Beeinflussung der humoralen IgG-Sekretion, einschließlich der Rheumafaktor-Produktion, durch B-Zellen vermutet. Diese Amplifizierung der Entzündung durch IL-15, das von Monocyten, dendritischen Zellen, Fibroblasten und T-Zellen produziert wird, ist vermutlich auch in relativer Abwesenheit von T-Zell-Zytokinen wie IFN- und IL-2 möglich. Da zwischen IL-2 und IL-15 sich z.T. überlappende Funktionen wie Induktion von T-Zellwachstum und Monozytenaktivierung bestehen, werden sie bei der RA offenbar durch IL-15 wahrgenommen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Zytokinen ist jedoch, daß IL-2 im Verlauf der Entzündungsreaktion zunehmend auch eine Zellapoptose bewirkt,

wohingegen IL-15 anti-apoptotisch ist ¹²⁴, was ein Überleben der T-Zellen ermöglicht und die hohe Anzahl von T-Zellen bei der RA erklärt.

Die o.g. Zytokine IL-2 und IFN- werden benutzt, um in der klassischen Differenzierung der T-Helferzellen die TH1- von der TH2-Antwort zu unterscheiden. Letztere TH2-Zellen sezernieren vor allem IL-4 und IL-5, die in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen nicht in der Synovialflüssigkeit gefunden wurden. Auch in den Kulturüberständen wurden höchstens Spuren dieser Zytokine gefunden. Die protektive Wirkung von IL-4 wird mit einer Hemmung der Makrophagenaktivität, verbunden mit verringerter TNF- -Produktion und Hemmung der Synovialzellproliferation in Verbindung gebracht.

Im Gegensatz zu IL-4 und IL-5 wurde IL-10 in vergleichsweise deutlichen Mengen von PBMC sezerniert ¹²⁵. Das von B- und T-Zellen sowie von Monozyten exprimierte IL-10 inhibiert u.a. die Antigenpräsentation durch Makrophagen infolge einer Suppression der MHC-Klasse II-Moleküle ¹²⁶, begleitet von einer verminderten TNF- -Produktion ¹²⁷. Desweiteren wird die T-Zell-Proliferation sowie die Sekretion von TH1-Zytokinen gehemmt. An der strikten Einordnung von IL-10 in die TH2-Zytokine bestehen zunehmend Zweifel, da seine Expression auch von IL-12, einem wichtigen Förderer der TH1-Antwort, induziert wird ¹²⁸. Außerdem bewirkt IL-10 im Zusammenhang mit IL-2 eine verstärkte Expression von TH1-Zytokinen. Auch eine klassische Einordnung der von den PBMC sezernierten Zytokine in das TH1-TH2-Raster ist nicht möglich. Zwar wurden IL-4 und IL-5 in vernachlässigbaren Mengen sezerniert, was gegen ein TH2-Muster spricht, jedoch waren die typischen TH1-Zytokine wie vor allem IL-2 nur auf relativ niedrigem Niveau nachweisbar. In Übereinstimmung mit den hier gewonnenen Daten wird auch zunehmend angenommen, daß TH1- und TH2-Antwort nur mögliche Eckpunkte bilden, zwischen denen intermediäre Ausprägungen möglich sind. So wird im Einzelfall beschrieben, daß bei der RA ein Übergang von einem TH2- über einen TH0- in einen TH1-Typ möglich ist ¹²⁹.

Mit TNF- konnte in den PBMC-Kulturüberständen eines der wichtigsten Monokine nachgewiesen werden. In über 50% der Synovialflüssigkeiten von rheumatoiden Gelenken ist TNF- ebenso nachweisbar wie im Serum von RA-Patienten ¹³⁰. Neben IL-1, dessen gewebezerstörende Wirkung er potenziert, besitzt TNF- wegen seiner arthritogenen Eigenschaften und der intrinsisch inflammatorischen Aktivität eine zentrale Stellung bei der Ausbildung der RA. TNF- fördert u.a. die Fibroblastenproliferation sowie die Metalloproteinasen- und Prostaglandinsynthese.

Das Mitogen PHA, welches eine starke Proliferation aller Zellpopulationen bewirkt, veranlaßte eine konsekutive Freisetzung aller untersuchten Zytokine. Es wurden regelmäßig die Grenze des maximalen Meßbereiches der ELISAs erreicht. Die höhere Proliferationsrate unter Zugabe von rekombinanten IL-2 führte zu einer deutlich stärkeren Sekretion der T-Zell-Zytokine IL-4, IL-5 und IFN- . TNF- und IL-10 waren von dieser Steigerung nicht betroffen. Unter Einfluß von PHA und IL-2 war demzufolge, aufgrund der erhöhten Proliferation, eine Zunahme der Zytokinsekretion zu verzeichnen. Die Kulturüberstände der unter Autoantigeneinfluß proliferierenden T-Zellen zeigten durchschnittlich höhere Konzentrationen an IFN- , IL-2, TNF- und IL-15, was jedoch im Einzelfall nicht immer mit der Höhe des Stimulationsindex korrelierte. Dies mag an der zu geringen Stimulation durch

das Antigen liegen und an der Tatsache, daß hier im Gegensatz zu o.g. Ansätzen nur kleine spezifische Subpopulationen stimuliert wurden, was eine Registrierung der möglichen Veränderungen des Zytokinmilieus erschwert. Eine weitere mögliche Erklärung ist, daß antigenspezifische Proliferation und Zytokinsekretion von verschiedenen CD4-Subpopulationen ausgehen und daß T-Zell-Subpopulationen auch ohne Effektorfunktion proliferieren können¹³¹. Das sezernierte Zytokinmuster bestand somit vorrangig aus IL-15, IFN- γ , IL-10, TNF- α und in geringerem Maße IL-2, was die pathogenetische Relevanz der T-Zellen für die antigenspezifische Autoreaktivität und für die regulatorischen Wechselwirkungen mit Makrophagen unterstreicht.

Aus der Sicht des Immunologen ist die T-Zell-Autoreaktivität wegen ihrer zentralen Regulationsfunktionen sehr viel bedeutender als die nachgeordnete B-Zell-Reaktivität, jedoch auch weit schwerer zu analysieren. Infolgedessen sind Untersuchungen zu RA-spezifisch auftretenden T-Zellen selten. Um den Pathomechanismus der RA zu verstehen, sind detaillierte Kenntnisse über diejenigen Antigene erforderlich, die als Autoantigene erkannt werden. Wie an den individuellen Reaktivitätsmustern gegenüber den hier vorgestellten Autoantigenen Calreticulin, Calpastatin, BiP und p205 gesehen, ist das Spektrum an Autoantigenen bei RA höchst variabel und ändert sich möglicherweise im Laufe der Erkrankung. Wahrscheinlich infolge des Epitop Spreading kommt es durch dysregulatorische Vorgänge zur Ausbildung von Autoreaktivität gegen körpereigene Moleküle. Die vorgelegten Ergebnisse der vier ubiquitär vorkommenden Antigene lassen den Schluß zu, daß die Suche nach einem einzigen Autoantigen, das die komplexe Erkrankung RA auslösen könnte oder erhält, nicht mehr zeitgemäß ist. Für jedes Antigen existiert eine Subpopulation von RA-Patienten, die Antigen-spezifische T-Zellen aufweisen. Eine Korrelation mit dem klinischen Krankheitsbild oder der Medikation wurde nicht erkannt. Es traten jedoch auch RA-Patienten auf, bei denen keine Antigen-spezifischen T-Zellen für eines der vier Antigene nachweisbar waren. Sehr wahrscheinlich muß hier die Suche nach weiteren Autoantigenen fortgesetzt werden.

Das Vorhandensein reaktiver T-Zellen und die von PBMCs sezernierten pathogenetisch bedeutsamen Zytokine sind Bestandteil eines komplexen Krankheitsbildes. Bei der RA akkumulieren Autoreaktivitäten von B- und T-Zellen gegenüber verschiedensten Antigenen, beeinflusst durch genetische und exogene Einflüsse. Diese komplexen immunologischen Vorgänge spiegeln sich auch im Zytokinmuster der RA wider.

Ausblick

Die derzeitige Therapie der RA ist weitgehend durch eine generalisierte Medikation mit relativ großen Nebenwirkungen geprägt. Die Heterogenität der pathogenetischen Einflüsse bedingt wahrscheinlich auch verschiedene therapeutische Herangehensweisen. Hierbei bietet die Analyse von krankheitswirksamen Zytokinen einen wichtigen Ansatzpunkt. Neben der bereits praktizierten Anti-TNF- α -Therapie eröffnet sich mit dem hier in hohen Konzentrationen nachgewiesenen IL-15 eine weitere Therapieoption.

Wenn mittels der in dieser Arbeit dargestellten Versuche das gesamte Spektrum der für einen RA-Patienten relevanten T-Zellen erkannt wird, könnte auch eine T-Zell-Vakzinierung Erfolg

versprechen. Das Immunsystem wird dahingehend verändert, daß autoreaktive T-Zellen künftig wieder selbständig durch die Heranbildung regulatorischer T-Zellen kontrolliert werden. Diese Therapieform ist sehr individuell und nebenwirkungsarm. Sie erfordert aber eine umfassende Analyse der T-Zell-Subsets.

Eine andere bereits praktizierte Therapieform wäre die Stammzell-Therapie. Sie ist bisher aufgrund der Schwere der Behandlung Patienten mit einer lebensbedrohenden schweren Verlaufsform vorbehalten. Nach Entnahme autologer Stammzellen und Zerstörung sämtlicher immunkompetenter Zellen, werden die Stammzellen reappliziert und es baut sich ein gesundes Immunsystem auf. Diese Form der Therapie bietet sich auch an, wenn bei einem Patienten zu viele Autoreaktivitäten auftreten, die eine Vakzinierung unrealistisch erscheinen lassen.

Zusammenfassung

Die Diagnostik der RA ist durch den Mangel an verfügbaren serologischen Markern erschwert. Die bekannten RA-spezifischen Autoreaktivitäten weisen für eine rechtzeitige Diagnosestellung eine zu geringe Krankheitsspezifität und auch eine zu geringe Häufigkeit auf. Um hier Abhilfe zu schaffen, müssen Parameter definiert werden, die eine sichere Diagnostik schon in der Frühphase der Erkrankung erlauben, um eine entsprechend effektive Therapie einzuleiten.

In dieser Arbeit wurden insgesamt sechs Einzelparameter analysiert, bestehend aus den bedeutendsten Autoreaktivitäten bei der RA. Es handelt sich dabei um die Autoantikörper gerichtet gegen IgG (RF), Citrullin, Calreticulin, Calpastatin, BiP und RA33. Die Antikörper wurden in Synovialflüssigkeit, dem Ort der Entzündung, in Serum von Patienten mit manifestierter RA und in dem Serum von Patienten mit früher RA bestimmt. Nach Kombination der Testergebnisse wurden Autoreaktivitätsmuster gefunden, die absolut RA-spezifisch sind und rund 60% der RA-Patienten, auch der frühen RA-Patienten, erfassen. Die Ergebnisse zeigen, daß es mit Autoantikörpermustern besser möglich ist, eine diagnostische Früherkennung durchzuführen und die Differentialdiagnostik zu anderen rheumatischen Erkrankungen zu verbessern. Damit ist der Grundstein für eine neuartige Diagnostik gelegt, die Autoreaktivitätsprofile anstelle einzelner Parameter erstellt und der Multifaktorialität der RA auf immunologischer Ebene Rechnung trägt.

Zum besseren Verständnis des Pathomechanismus der RA wurden die Calreticulin-, Calpastatin-, BiP- und p205/IgG-spezifischen Autoreaktivitäten genauer betrachtet. Für jedes untersuchte Autoantigen existiert eine bestimmte RA-Patientenpopulation, die antigen-spezifische T-Zellen aufweist. Verschiedene Experimente zeigen, daß diese T-Zellen eine Restriktion gegenüber HLA-Molekülen besitzen.

Mit IL-15 wurde ein bedeutender T-Zell-Rekrutierungs- und -Aktivierungsfaktor in hohen Konzentrationen nachgewiesen, was eine zentrale pathogenetische Bedeutung dieses Zytokins nahelegt. Die weitere Analyse der Zytokinsekretion ergab keine eindeutige Zuordnung der proliferierenden T-Zellen zu TH1 oder TH2, so daß es sich bei den Zellpopulationen um intermediäre Ausbildungen handelt. Die Überexpression der einzelnen Antigene wurde jeweils in der Deckschicht des Synovialgewebes nachgewiesen, die hauptsächlich aus Fibroblasten und Makrophagen besteht. Eine Kolokalisation mit Immunzellen oder follikulären Strukturen konnte nicht festgestellt werden. Für p205/IgG konnte ein direkter Zusammenhang zwischen den T- und B-Zellen aufgezeigt werden, da ein Peptid des p205/IgG Zellkulturen von RA-Patienten *in vitro* zur RF-Produktion anregt.

Das Vorhandensein reaktiver T-Zellen und die von PBMC sezernierten pathogenetisch bedeutsamen Zytokine sind Bestandteil eines komplexen Krankheitsbildes. Die enorm vielseitige klinische Ausprägung der RA spiegelt sich auch auf der immunologischen Ebene wider.