

1 Einleitung

1.1 Grundzüge des Immunsystems

1.1.1 Angeborene und adaptive Immunantwort

Um der ständigen Bedrohung durch pathogene Organismen begegnen zu können, haben höhere Vertebraten komplexe und effektive Abwehrmechanismen entwickelt, welche in ihrer Gesamtheit als Immunsystem bezeichnet werden.

Dieses kann in die angeborene und die erworbene (adaptive) Immunität unterteilt werden, wobei vielfältige Interaktionen zwischen beiden Systemen bestehen. Die angeborene Immunität dient der ersten Abwehr und erkennt konservierte Strukturen von Pathogenen; die Effektormechanismen, die u.a. von phagozytierenden Zellen wie Makrophagen, Dendritischen Zellen (DC) und Granulozyten sowie natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Faktoren des Komplementsystems vermittelt werden, setzen innerhalb von Minuten bis Stunden ein. Viele bei der angeborenen Immunantwort gebildeten Effektormoleküle spielen eine wichtige Rolle als Kostimuli in der adaptiven Phase (s. insb. 1.2.4).

Das Hauptcharakteristikum der adaptiven Antwort ist die spezifische Erkennung von Pathogenen bzw. deren Bestandteilen; die ersten spezifischen, aktivierten Effektorzellen und deren Produkte lassen sich etwa 4 Tage nach einer Infektion nachweisen. Vereinfacht wird zwischen der humoralen, Antikörper-vermittelten Immunantwort, für die die B-Lymphozyten (B-Zellen) verantwortlich sind und der zellvermittelten Immunantwort, die von den T-Lymphozyten (T-Zellen) getragen wird, unterschieden. Beides stützt sich auf die klonale Selektion von B- und T-Lymphozyten, die eine Vielfalt hochspezifischer Antigen-Rezeptoren besitzen und so eine große Diversität von Pathogenen erkennen können. Aus einem breiten Spektrum von Effektormechanismen werden dann, je nach Antigen, angemessene Reaktionen induziert.

Eine der wichtigsten Eigenschaften der adaptiven Immunität ist das immunologische Gedächtnis; es ermöglicht im Falle eines erneuten Zusammentreffens mit einem Pathogen eine schnellere und spezifischere Immunantwort.

1.2 Die Immunologie der T-Zellen

1.2.1 Grundlagen der T-Zell Immunologie

Die Gesamtheit der T-Zellen kann anhand der Expression des CD3-Moleküls identifiziert werden. Etwa 90-95% der T-Lymphozyten exprimieren einen heterodimeren T-Zell-Rezeptor (TCR-) -Komplex, der aus einer α - und einer β -Kette zusammengesetzt ist. Eine Minderheit von bis zu 10% ist durch Expression eines γ/δ -Heterodimers charakterisiert.

Reife, periphere T-Zellen lassen sich phänotypisch und funktionell anhand ihrer Korezeptor-Expression in zwei Klassen unterteilen: CD8-Zellen erkennen antigene Peptide, die ihnen durch ubiquitär exprimierte Haupthistokompatibilitäts- (MHC-) Klasse I-Moleküle präsentiert werden. CD8-Zellen, die auch als zytotoxische Zellen bezeichnet werden, können infizierte Körperzellen und Tumorzellen direkt abtöten.

Die zweite Klasse von T-Zellen, auf die sich auch diese Arbeit konzentriert, machen die CD4 T-Helfer (Th-) -Zellen aus. Sie erkennen Peptide, die im Kontext von MHC-Klasse II-Molekülen präsentiert werden. Im Gegensatz zu MHC-Klasse-I ist die Expression der MHC-II-Moleküle auf spezialisierte Antigen-präsentierende Zellen (APCs) beschränkt. Die Funktion der T-Helfer Zellen umfasst die ihre namensgebende Hilfe bei der Produktion von Antikörpern durch die B-Zellen; ferner ist bereits lange bekannt, dass Th Zellen die Entwicklung zytotoxischer T-Zell-Antworten fördern (Ashman RB & Mullbacher JExMed, 1979). Weiterhin stimulieren Th Zellen Makrophagen dazu, Pathogene zu phagozytieren und abzutöten.

Neben der Signalübermittlung mittels membrangebundener Moleküle ist ein wesentlicher Effektor-Mechanismus der Th-Zellen bei all diesen Vorgängen die Sekretion von Zytokinen; dies sind kleine Polypeptide, denen eine entscheidende Rolle bei der interzellulären Kommunikation zukommt.

1.2.2 Zentrale und periphere T-Zell Toleranz

Im Laufe Ihrer Entwicklung verlassen die aus hämatopoetischen Vorläufern gebildeten Th-Zellen das Knochenmark und wandern in den Thymus ein; dort durchlaufen sie zwei Selektionsschritte: Die positive Selektion überleben nur solche Zellen, die eine ausreichend hohe Affinität für MHC-II-Moleküle besitzen. Der zweite, negative Ausleseschritt ist essentiell zur Eliminierung autoreaktiver T-Zellen, die eine

Spezifität für Selbst-Peptide besitzen, welche ihnen hauptsächlich durch die medullären Thymusepithelzellen (mTECs) präsentiert werden. Ist die Affinität des TCR zu einem mit MHC-II komplexierten Selbst-Peptid zu groß, wird diese Zelle ebenfalls eliminiert; dies wird auch als klonale Deletion bezeichnet.

Trotz der Bandbreite der im Thymus exprimierten Selbst-Proteine und der daraus resultierenden potenziellen negativen Selektion bleibt die zentrale Toleranz unvollständig; obwohl sich in vielen gesunden Individuen T-Zellen gegen Selbst-Proteine in der Peripherie detektieren lassen (Danke et al., 2004; Semana et al., 1999), entwickelt nur ein Bruchteil davon Autoimmunerkrankungen. Es müssen folglich andere Mechanismen in der Peripherie sicherstellen, dass Autoimmunität kontrolliert wird.

1.2.3 CD25⁺ regulatorische T-Zellen (Tregs)

Das Konzept der peripheren Toleranz wurde entscheidend durch die Entdeckung der natürlich vorkommenden CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (Tregs) untermauert. Bei CD25 handelt es sich um die α -Kette des IL-2-Rezeptors. Tregs besitzen die Fähigkeit, Autoimmunreaktionen zu unterdrücken. Sakaguchi und Kollegen konnten zeigen, dass der Transfer von CD25-depletierten T-Zellen in Rezipientenmäuse zu systemischer Autoimmunität führt (Asano et al., 1996; Sakaguchi et al., 1995); im Menschen ziehen Mutationen im FoxP3-Gen, einem für die Suppression scheinbar essentiellen Transkriptionsfaktor (Hori et al., 2003), ebenfalls Autoimmunerkrankungen nach sich (Gambineri et al., 2003). Weitere Studien belegten u.a. die Kontrolle von experimentell induzierten murinen Autoimmunerkrankungen wie Colitis, Typ-I-Diabetes, Thyroiditis und Kollagen-induzierter Arthritis (CIA) durch Tregs (Gonzalez-Rey et al., 2006; Morgan et al., 2005; Mottet et al., 2003; Salomon et al., 2000; Wei et al., 2005).

Im Menschen wird die Rolle der Tregs bei Immunantworten gegen Selbstproteine kontrovers diskutiert; obwohl eine Akkumulation von Tregs z.B. am Ort der Entzündung bei der Rheumatoiden Arthritis nachgewiesen wurde, sprechen einige Untersuchungen dafür, dass Treg-Funktionen hier *in vivo* eingeschränkt sind (Ehrenstein et al., 2004; Ruprecht et al., 2005); andere lieferten Anhaltspunkte dafür, dass sie ihr inhibitorisches Potenzial am Ort der Entzündung einsetzen und so einen mildereren Verlauf von Autoimmunerkrankungen bewirken (de Kleer et al., 2004).

In der Maus umfasst die natürliche Treg-Population etwa 5-10% der peripheren T-Zellen. Im peripheren Blut des Menschen ist sie auf die nur etwa 1-3% umfassende CD25-hoch exprimierende Th-Fraktion beschränkt (Baecher-Allan et al., 2001; Wing et al., 2002).

Untersuchungen zum Mechanismus der Suppression zeigten *in vitro*, dass CD25⁺ Tregs die Proliferation von naiven α CD3-stimulierten Effektorzellen wirkungsvoll inhibieren (Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 1998). Als ein zentraler Mechanismus wurde die Kompetition von regulatorischen Zellen und CD25⁻ Responderzellen um den Wachstumsfaktor IL-2 beschrieben: Tregs besitzen durch hohe CD25-Expression eine größere Bindungskapazität für das Zytokin, was möglicherweise zu einem Mangel auf Seiten der Effektorzellen führt. Steht IL-2 oder ein anderer Vertreter der γ_c -Zytokinfamilie nämlich durch exogene Gabe im Überfluß zur Verfügung, wird das inhibitorische Potenzial der Tregs reduziert oder aufgehoben (de la Rosa et al., 2004).

Untersuchungen zur *in vivo* Funktionsweise von Tregs legen jedoch den Schluss nahe, dass hier die immunsuppressiven Zytokine IL-10 und TGF- β (Annunziato et al., 2002; Nakamura et al., 2001) an der Suppression beteiligt sind, die *in vitro* vermutlich keine Rolle spielen. Ferner sind möglicherweise auch membrangebundene Moleküle wie z.B. der von Tregs verstärkt exprimierte Kostimulator CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen-4) an der Inhibition von Effektorzellen beteiligt (Übersicht s. (Wing et al., 2005).

1.2.4 Die Aktivierung von naiven Th Zellen durch Antigen

T-Zellen, die nach erfolgreicher Selektion den Thymus verlassen, werden auch als „Recent Thymic Emigrants“ (RTEs, Kürzliche Thymus-Emigranten) bezeichnet; sie zeichnen sich durch Expression der CD45RA-Isoform aus, die in dieser Arbeit als Surrogatmarker für naive, Antigen-unerfahrene Th-Zellen verwendet wird. Die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 sowie des L-Selektins (CD62L) ermöglicht es den Zellen, sekundäre lymphatische Organe aufzusuchen (Bradley et al., 1994; Sallusto et al., 1999). Hier migrieren sie in die parakortikal gelegenen T-Zell-Regionen der Lymphknoten (Picker and Siegelmann, 1993) und suchen die dort ansässigen APC nach passenden MHC-II-Peptid-Komplexen ab. Die wichtigste APC-

Population stellen die auch als professionelle APC bezeichneten Dendritischen Zellen dar (Jenkins et al., 2001).

Die Aktivierung der naiven Th-Zellen erfolgt über einen engen Kontakt zwischen T-Zelle und DC unter Ausbildung einer immunologischen Synapse, in deren Zentrum T-Zellrezeptoren und kostimulatorische Moleküle konzentriert werden (Dustin and Cooper, 2000). Neben dem TCR-vermittelten Signal benötigt eine naive Th-Zelle ein zweites Signal, um aktiviert zu werden und klonal expandieren zu können (Allison and Krummel, 1995; Chambers and Allison, 1999). Entscheidende kostimulatorische Signale werden über die Moleküle CD80 und CD86 (Howland et al., 2000; Schweitzer et al., 1997) vermittelt, die mit CD28 auf der T-Zell-Seite interagieren; dadurch wird u.a. die Produktion des Wachstumsfaktors IL-2 induziert (Boise et al., 1995; Lucas et al., 1995; Seder et al., 1994).

Weitere wichtige Interaktionen, die sowohl die Reifung der DCs als auch die Aktivierung der Th Zellen beeinflussen, sind die Ligation von CD40 auf der Oberfläche der DC durch CD40L (CD154) auf Seiten der Th Zelle (Grewal and Flavell, 1998; Kweon et al., 1999; Schoenberger et al., 1998) sowie von 4-1BB auf Th Zellen durch 4-1BB-Ligand (4-1BBL), welches von APCs exprimiert wird (Kwon et al., 1989).

Neben der Beteiligung von membranständigen kostimulatorischen Molekülen geschieht die Einflussnahme der DCs auf Th-Zellen auch über Zytokine (z.B. IL-12, IL-18, IL-10 und IFN γ).

1.2.5 Klassifizierung von Th Zellen anhand sezernierter Zytokine: Das

Th1/Th2-Konzept

Murine, naive Th Zellen können nach antigener oder mitogener Primärstimulation in wenigstens zwei funktionelle Klassen differenzieren; diese wurden anhand des assoziierten Zytokin-Musters mit Th1 und Th2 bezeichnet (Mosmann et al., 1986); die Dichtomie wurde einige Jahre später prinzipiell auch für menschliche Th Zellen bestätigt (Romagnani, 1991). Während Th1 Zellen gemäß aktueller Definition vorwiegend IFN γ produzieren und hauptsächlich für die Zell-vermittelte Immunität verantwortlich sind, wird IL-4 als das wichtigste Th2-Effektor-Zytokin angesehen und vermittelt extrazelluläre Immunantworten (Abb. 1.1, Übersicht s. (Murphy and Reiner, 2002).

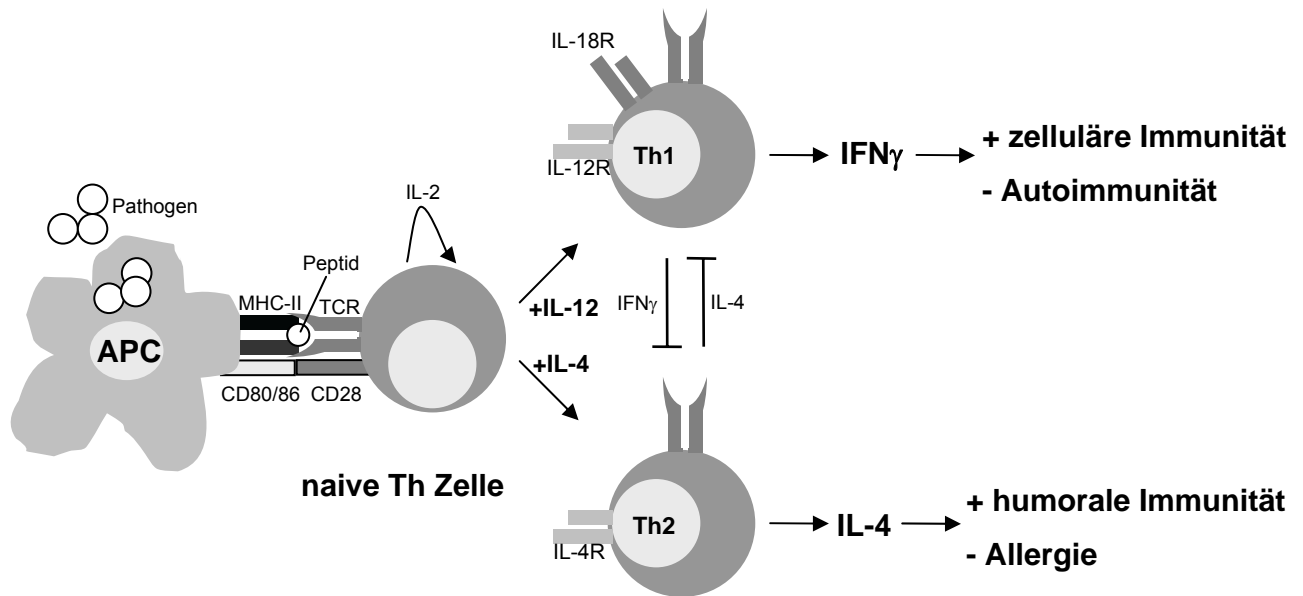


Abb. 1.1: Aktivierung und Polarisierung von naiven Th-Zellen.

Infektionsmodelle konnten belegen, dass die Th1-Antwort einen entscheidenden Beitrag zum Schutz vor intrazellulären Parasiten wie *Leishmania* und *Toxoplasma gondii* (Heinzel et al., 1989; Scott et al., 1988) leistet; demgegenüber ist die Th2-Antwort u.a. bei der Bekämpfung intestinaler Helminthen von Bedeutung (Korenaga et al., 1991; Urban et al., 1991).

Neben der schützenden Rolle in der Pathogen-Abwehr wurde eine Dysregulation von Th1-Antworten mit Organ-spezifischen Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis (s. 1.3) und fehlgesteuerte Th2-Antworten mit der Entwicklung allergischer Erkrankungen in Verbindung gebracht.

Der Prozess, im Verlauf dessen sich eine ungeprägte, naive Th Zelle in eine reife Th1 oder Th2 Zelle entwickelt, wurde detailliert charakterisiert. Die Zytokine IL-12 und IL-4, welche ihr Signal über STAT4 (Signal Transducer and Activator of Transcription 4) bzw. STAT6 vermitteln, wurden als Schlüsselfaktoren des Polarisationsprozesses identifiziert (Hsieh et al., 1993; Le Gros et al., 1990; Seder et al., 1993; Swain et al., 1990). Beide Moleküle werden vermutlich im Verlauf einer vorangegangenen angeborenen Immunantwort freigesetzt. Da im Rahmen dieser Arbeit Th Zellen mit einem Th1-ähnlichen Gedächtnis/Effektor-Phänotyp charakterisiert wurden, werden im nächsten Kapitel die molekularen Vorgänge bei der Th1-Differenzierung und der damit assoziierten IFN γ -Expression näher erläutert.

1.2.6 Molekulare Ereignisse bei der Th1-Differenzierung

Als Th1-spezifischer Transkriptionsfaktor wurde T-bet (T-box Transkription Faktor) identifiziert, der in sich entwickelnden und Th1-vorbestimmten Zellen exprimiert wird (Szabo et al., 2000; Szabo et al., 2002). T-bet scheint durch Signale über STAT1, welches u.a. durch Bindung von $\text{IFN}\gamma$ an seinen Rezeptor aktiviert wird, initiiert zu werden (Lighvani et al., 2001) und ist für die Chromatin-Öffnung des $\text{IFN}\gamma$ -Lokus verantwortlich ist (Mullen et al., 2001). Weiterhin bewirkt T-bet die Expression (Afkarian et al., 2002) der auf naiven und ruhenden Th Zellen nicht nachweisbaren β 2-Kette (Rogge et al., 1997) des IL-12-Rezeptors, die für die hochaffine IL-12-Bindung und Signaltransduktion essentiell ist. Eine Bindung von IL-12 an seinen Rezeptor induziert u.a. die Expression des ebenfalls Th1-assoziierten IL-18-Rezeptors. Reziprok wird die IL-12R β 2-Kettenexpression durch IL-18-Signale verstärkt (Ahn et al., 1997; Chang et al., 2000; Xu et al., 1998; Yoshimoto et al., 1998).

Diese Serie von Ereignissen bringt polarisierte Th1 Zellen hervor, deren vorrangige Aufgabe in der Produktion großer Mengen des Effektorzytokins $\text{IFN}\gamma$ zur Pathogenabwehr zu sehen ist. In Abb. 1.2 sind die Schritte bei der Th1-Entwicklung zusammengefasst. Die ebenfalls gezeigte akute $\text{IFN}\gamma$ -Transkription durch IL-12 und IL-18 ist im nächsten Kapitel erwähnt.

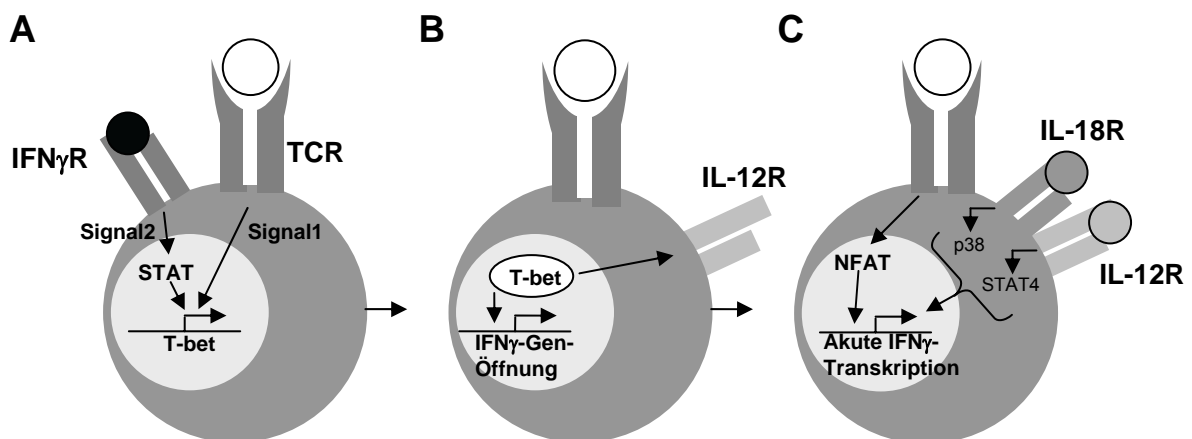


Abb.1.2: Induktion der $\text{IFN}\gamma$ -Transkription in murinen Th1-Zellen. (A) T-bet-Induktion durch TCR- und STAT1-Signale (B) T-bet-vermittelte Chromatinöffnung des $\text{IFN}\gamma$ -Lokus und IL-12R-Induktion (C) Akute $\text{IFN}\gamma$ -Transkription durch TCR- oder Zytokin-Stimulation.

1.2.7 Transkriptionale Kontrolle der IFN γ -Produktion

Die transkriptionale Regulation des IFN γ -Gens ist bisher nur teilweise verstanden. Die TCR-vermittelte IFN γ -Induktion ist abhängig vom zentralen Transkriptionsfaktor Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT), für den verschiedene Bindungsstellen nachgewiesen oder postuliert wurden (Aune et al., 1997; Penix et al., 1993; Sweetser et al., 1998); der Signalweg ist durch die Blockierbarkeit des oberhalb von NFAT aktiven Kalzineurins (CaN) mittels CyclosporinA (CsA) pharmakologisch charakterisierbar.

In murinen TCR-transgenen Th1-Zellen wurde ferner ein zweiter Signalweg beschrieben (vgl. Abb. 1.2): die durch IL-12 und IL-18 induzierbare IFN γ -Sekretion (Robinson et al., 1997) ist NFAT-unabhängig, da CsA-insensitiv (Yang et al., 1999) und abhängig von IL-12-induzierter STAT4-Aktivierung sowie IL-18-abhängiger Phosphorylierung der p38-MAP-Kinase (Yang et al., 2001).

1.2.8 Die Rolle anderer Zytokine bei der IFN γ -Induktion

Zahlreiche Faktoren wurden auf das Potenzial zur Induktion oder Verstärkung der IFN γ -Sekretion durch Th Zellen untersucht.

Während die Rolle von IL-2, IL-7 und IL-15, die ihr Signal über die γ -Kette (γ_c) des IL-2-Rezeptors (CD132) fortleiten, in den letzten Jahren vorrangig im Kontext mit homeostatischer Proliferation von Th-Populationen diskutiert wurde (s. u.a. Geginat et al., 2001), fokussierten einige ältere und wenige aktuelle Studien auf eine mögliche Rolle bei der Regulation der IFN γ -Antwort. Während IL-2 in NK-Zellen eine IFN γ -Synthese induziert (Torres et al., 1982; Ye et al., 1995), konnte in Experimenten mit humanen primären Th Zellen lediglich eine Verstärkung der TCR-abhängigen IFN γ -Produktion in Anwesenheit von IL-7 oder IL-15 beobachtet werden (Jennes et al., 2002; Monteleone et al., 1998; Strengell et al., 2003).

1.2.9 Th1 Effektor- und Gedächtniszellen – zwei Schicksale nach primärer Aktivierung

Durch das Th1-Modell kann die Frage, wie im Verlauf einer primären Th-Aktivierung sowohl potente Effektorzellen, als auch langlebige Gedächtniszellen erzeugt werden,

nicht erklärt werden. Neuere Untersuchungen belegen, dass die Th1-Differenzierung nicht in allen aktivierten Zellen synchron erfolgt; vielmehr lassen sich in Mausmodellen zwei Entwicklungsstadien identifizieren, deren Unterschied in der Produktion des Effektorzytokins $\text{IFN}\gamma$ liegt. So entstehen einerseits $\text{IFN}\gamma$ -sezernierende, T-bet-exprimierende IL-12R^+ Effektorzellen, andererseits $\text{IFN}\gamma^-$ Th1-Zellen, die dieselbe Expression von T-bet und $\text{IL-12R}\beta 2^+$ zeigen. Während erstere bereits wenige Tage nach Abklingen der Immunantwort nicht mehr detektierbar sind, persistieren Th1-Gedächtniszellen über einen langen Zeitraum; $\text{IFN}\gamma$ wird in diesem Zusammenhang nicht nur als Effektorzytokin, sondern auch als Apoptose-induzierender Faktor zur Begrenzung der Immunantwort nach erfolgreicher Bekämpfung einer Infektion diskutiert (Wu et al., 2002).

1.2.10 Zentrale und Effektor-Gedächtniszellen

Als Erweiterung des Konzeptes der Differenzierung von Th1-Zellen in kurzlebige Effektoren und langlebige Gedächtniszellen postulierten Sallusto et al. kürzlich die Existenz zweier Populationen von Gedächtniszellen mit unterschiedlichen Migrationseigenschaften und Effektorfunktionen, dessen Kenntnis für einige Experimente von Bedeutung ist.

Das Konzept der zentralen und Effektor-Gedächtnis-Th Zellen basiert auf der differenziellen Expression des Chemokinrezeptors CCR7 (Sallusto et al., 1999). Während CCR7^- (Effektor-) Gedächtniszellen unmittelbare Effektorfunktionen ausüben können und in entzündete Gewebe migrieren, exprimieren CCR7^+ (zentrale) Gedächtniszellen Rezeptoren, die den Eintritt in sekundäre lymphatische Organe ermöglichen und dort nach wiederholtem Antigenkontakt zu Effektorzellen ausdifferenzieren. Entsprechend der Namensgebung konnte nach mitogener bzw. TCR-Stimulation eine Effektor-Zytokinproduktion hauptsächlich in der CCR7^- Effektor-Fraktion induziert werden.

1.3 Die Rheumatoide Arthritis – eine Autoimmunerkrankung mit ungeklärter Pathogenese

1.3.1 Grundlagen der Rheumatoiden Arthritis

Bei der Rheumatoiden Arthritis (RA) handelt es sich um eine chronisch-entzündliche, systemische Autoimmunerkrankung, die hauptsächlich die kleinen Gelenke der Hände und Füße betrifft. Ungefähr 1% der Bevölkerung der westlichen Welt leidet an der RA, wobei Frauen etwa dreimal häufiger betroffen sind als Männer.

Neben einer Entzündung der Deckzellschicht der Synovialmembran geht die Erkrankung in späten Stadien mit einer tumorartigen Gewebeinvasion, die als Pannus bezeichnet wird, einher, wodurch die Gelenkstruktur samt der knorpeligen und knöchernen Anteile zerstört wird. In synovialen Infiltraten von Patienten im Krankheitsschub lassen sich hauptsächlich Th Zellen, B-Zellen, Granulozyten und Makrophagen nachweisen, die sich oft zu Keimzentrums-ähnlichen Aggregaten organisieren, deren Struktur morphologisch an Lymphknoten erinnert.

Die Krankheitsursache ist trotz intensiver Forschung weitgehend unbekannt; neben Faktoren wie Geschlecht, genetischer Disposition und Umweltfaktoren wurden auch infektiöse Erreger als kausativ postuliert; ein überzeugender Nachweis dafür steht jedoch aus.

1.3.2 Die Rolle der T-Zellen bei der RA

Der wohl überzeugendste Beleg dafür, dass Th Zellen eine bedeutende Funktion als Steuerzellen bei der Erkrankung zukommt, konnte in experimentellen Therapien gewonnen werden, in denen gegen das CD4-Molekül gerichtete Antikörper entweder zur Depletion der Zellpopulation oder funktionalen Inaktivierung durch Maskierung von CD4 eingesetzt wurden; insbesondere der zweite Ansatz führte zu einer Verringerung der Krankheitsaktivität in bis zu 50% der behandelten Patienten (Mason et al., 2002). In Mausmodellen der RA führte die CD4-Depletion zu einer Reduktion von aktivierten Gewebemakrophagen, verbunden mit einer reduzierten Ausschüttung zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren wie IL-1 β , TNF α und IL-15 (Klimiuk et al., 1999).

Weitere Indizien sprechen für eine Rolle von Th Zellen bei der RA: neben der Tatsache, dass insbesondere Gedächtnis-Th-Zellen mit einem aktivierten Phänotyp in synovialen Infiltraten zu finden sind, hat hauptsächlich die Entdeckung einer genetischen Besonderheit bei RA-Patienten zu der Vermutung geführt, dass T-Zellen bei der Erkrankung eine wichtige Funktion ausüben. So konnte gezeigt werden, dass bis zu 80% der Patienten ein bestimmtes Sequenzmotiv innerhalb des MHC-Klasse II Moleküls HLA-DR ausprägen. Das sogenannte „Shared Epitope“ beeinflusst sowohl die Schwere der Erkrankung wie die Wahrscheinlichkeit, extra-artikuläre Manifestationen zu entwickeln. Da den Klasse-II-Molekülen nach heutigem Wissen keine andere Funktion als die der Antigenpräsentation an Th-Zellen zukommt, wurden verschiedene Hypothesen zur Rolle des „Shared Epitope“ bei der Krankheitsentstehung aufgestellt; neben der Bindung und Präsentation von arthritogenen Peptiden wurde u.a auch die Möglichkeit, dass DR-Moleküle autoreaktive T-Zellen im Thymus selektieren, die der negativen Selektion entgehen, in Erwägung gezogen (Gebe et al., 2001; Walser-Kuntz et al., 1995; Zanelli et al., 2000). Im Tiermodell zeigten Experimente mit SKG-Mäusen, die eine spontane Gelenkentzündung mit ähnlichen Symptomen wie bei der RA entwickeln, dass auch auf Seiten der T-Zellen durch eine veränderte TCR-Signalweiterleitung potenziell autoreaktive, arthritogene T-Zellen im Thymus positiv selektiert werden können; dies konnte auf eine Mutation in der TCR-assoziierten Kinase ZAP-70 zurückgeführt werden (Sakaguchi et al., 2003).

1.3.3 Autoantigen-spezifische T-Zell Antworten bei der RA

Einige Hinweise sprechen für eine lokale Erkennung von Autoantigenen durch synoviale T-Zellen bei der Rheumatoiden Arthritis. Neben indirekten Belegen wie dem „Shared-Epitope“, dem aktivierten Gedächtnis-Phänotyp von Th Zellen am Ort der Entzündung sowie einer Kontraktion des TCR-Repertoires, was auf eine Selektion durch Antigen hindeuten könnte (Borgato et al., 1997; Struyk et al., 1996; Wagner et al., 1998), wurde eine Reihe von putativen (Auto-) Antigenen beschrieben; dies schließt sowohl gelenkspezifische Proteine wie Kollagen-Typ-II und Aggrecan, aber auch mikrobielle Produkte wie dnaJ aus *E.coli*, bakterielle Hitzschockproteine oder EBV-Bestandteile ein (Albani et al., 1995; Guerassimov et al., 1998; Life et al., 1991; Londei et al., 1989; Scotet et al., 1996). Einige Autoren machten

posttranskriptionelle Mechanismen dafür verantwortlich, dass Proteine wie Kollagen-Typ-II erst als Immunogene wirken (Dzhambazov et al., 2005; Michaelsson et al., 1994).

Bislang konnte jedoch kein Selbst-Protein identifiziert werden, für das synoviale Th Zellen einer größeren Patientengruppe spezifisch sind; insofern stehen Belege für eine die Krankheit induzierende oder aufrecht erhaltende T-Zell Antwort gegen lokal oder systemisch exprimierte Autoantigene weiterhin aus.

1.3.4 Akkumulation von Th1-ähnlichen CD4 Zellen in Gelenken von RA-Patienten

Trotz nur geringer Konzentrationen von T-Zell-Zytokinen wie IL-2 oder IFN γ im Synovium bzw. Synovialpunktaten (Firestein et al., 1990; Smeets et al., 1998) wurde nach mitogener oder TCR-Stimulation synovialer Th Zellen *in vitro* eine generelle Verschiebung der Zytokin-Balance in Th1-Richtung beobachtet (Dolhain et al., 1996; Isomaki et al., 1999; Simon et al., 1994; Yin et al., 1999). Weiterhin konnte eine positive Assoziation zwischen der Frequenz synovialer IFN γ ⁺ Th-Zellen nach *in vitro*-Restimulation und der Krankheitsaktivität nachgewiesen werden (van der Graaff et al., 1999). Dieselbe Abhängigkeit wurde reziprok für besonders niedrige IL-4- und IL-10-mRNA-Spiegel in SF-MNCs konstatiert (Miyata et al., 2000).

In Übereinstimmung damit beschrieben zahlreiche Studien anhand von Zytokin- und Chemokin-Rezeptoranalysen den Th1-Phänotyp als vorherrschend im entzündeten Gelenk: Auf bis zu 80% der synovialen Th Gedächtniszellen konnte der Th1-assozierte Marker CCR5 angefärbt werden, eine erhöhte Expression wurde auch für den prä-Th1-Marker CXCR3 (Qin et al., 1998; Santiago et al., 2002; Wang and Liu, 2003) sowie die Th1-assozierten Moleküle IL-18R und IL-12R beschrieben (Aita et al., 2004; Kawashima and Miossec, 2003). Ferner konnte in Mausmodellen eine Arthritisinduktion nach Transfer von Th1-polarisierten Zellen verzeichnet werden (Hardung, F, 2006).

Die RA wird dementsprechend als Th1-assozierte Erkrankung angesehen.

1.3.5 Th1-Zellen als Mediatoren innerhalb eines Zytokinnetzwerkes ?

Die Tatsache, dass im entzündeten Gelenk zwar aktivierte Th Zellen mit einer Th1-assoziierten Rezeptorausstattung detektierbar sind, jedoch keine überzeugenden Belege für einen Antigen-getriebenen Prozess vorliegen, führten in den letzten Jahren dazu, ein Hauptaugenmerk auf das Zusammenspiel der in der Synovialmembran und -flüssigkeit detektierbaren Zytokine zu werfen; es wird vermutet, dass viele der typischen Manifestationen der RA ein Resultat der Wechselwirkungen dieser löslichen Mediatoren sind.

Während, wie in 1.3.4 erwähnt, T-Zell-Produkte wie $IFN\gamma$ zumindest nicht systemisch im Gelenk nachweisbar sind und auf Einzelzellebene *ex vivo* bisher nicht untersucht wurden, läßt sich eine Reihe von überexprimierten Zytokinen und Chemokinen am Ort der Entzündung detektieren, deren Produktion hauptsächlich auf Makrophagen und synoviale Fibroblasten zurückgeht, welche in der Deckzellschicht der Synovialmembran angesiedelt sind. Dazu zählen insbesondere IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18 und $TNF\alpha$ (Feldmann et al., 2001; Scheller et al., 2006; Harada et al., 1999; van Roon et al., 2003; Rodenburg et al., 1999; Yokota et al., 2006; Kim et al., 2000; Petrovic-Rackov and Pejnovic, 2006; Lubberts et al., 2005; Stamp et al., 2004; Dayer, 1999; Liew and McInnes, 2002; Hanyuda et al., 2003; Min et al., 2004; Robinson et al., 1995).

Für viele dieser Faktoren konnte eine eindeutige Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und Serum- bzw. Konzentration in der Synovialflüssigkeit aufgezeigt werden (Petrovic-Rackov and Pejnovic, 2006). Die im Gelenk überexprimierten Mediatoren aktivieren vermutlich andere Zellen in der unmittelbaren Umgebung, darunter auch T-Zellen (s. Abb. 1.3), die ihrerseits proinflammatorische Moleküle ausschütten: So konnte u.a. gezeigt werden, dass Th Zellen nicht nur durch IL-15 und IL-16 in entzündete Gelenke rekrutiert und aktiviert werden (Franz et al., 1998; McInnes et al., 1996), sondern die IL-15-abhängige Aktivierung auch zu einer Zellkontakt-abhängigen Induktion der $TNF\alpha$ -Produktion in Makrophagen führt (McInnes et al., 1997). In einer kürzlich durchgeführten ersten klinischen Phase-II Studie mit monoklonalen, neutralisierenden IL-15-Antikörpern wurde eine deutliche Reduktion der Krankheitsaktivität konstatiert (Baslund et al., 2005).

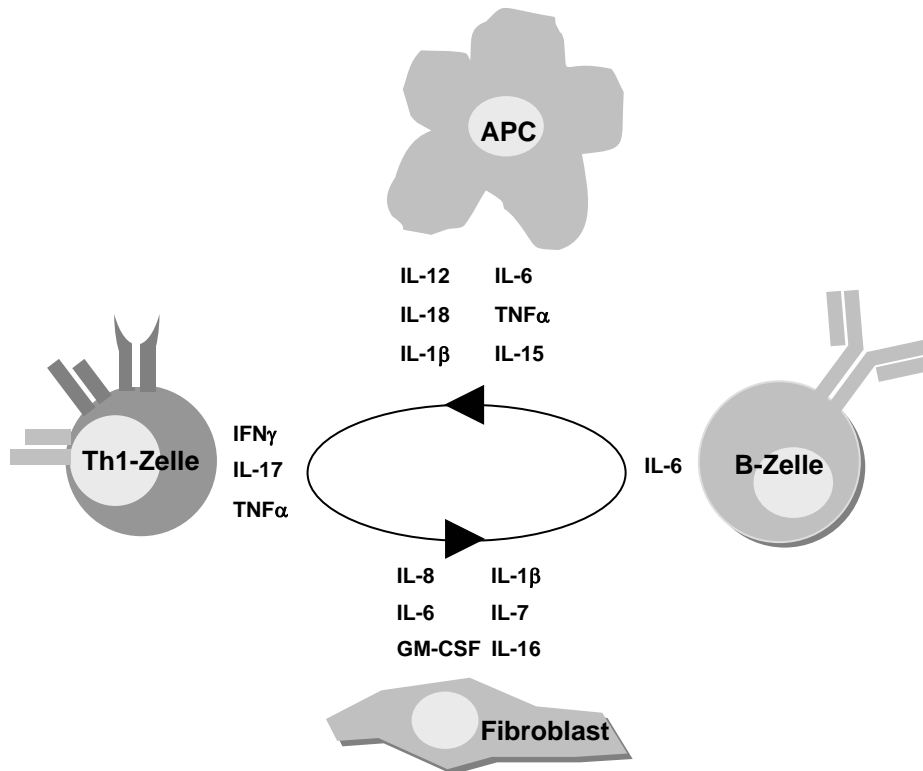


Abb. 1.3: Hypothetisches Zytokin-Netzwerk bei der Rheumatoiden Arthritis. Gezeigt sind die potenziell beteiligten Zellen sowie deren sezernierte Zytokine und Chemokine.

Weiterhin sind durch erhöhte IL-15-Spiegel auch Phänomene erklärbar, die bisher als Argument für einen Antigen-getriebenen Prozess bei der RA herangezogen wurden: Masuko-Hongo et al. (Masuko-Hongo et al., 2000) zeigten, dass die bei Patienten mit RA nachgewiesene Kontraktion des T-Zell-Repertoires *in vitro* durch Kultur in IL-15 nachgeahmt werden kann; dies entkräftigt zumindest teilweise die Theorie, dass bei der Erkrankung bestimmte T-Zellklone durch Antigenerkennung selektiv expandiert werden.

IL-15 induziert ebenso die Sekretion von IL-17 in T-Zellen, welches wiederum IL-15 und IL-16-Produktion in Fibroblasten auslöst und so einen Kreislauf aufrecht erhält (Miranda-Carus et al., 2004). IL-17-Sekretion ist ferner eng mit der Produktion von proinflammatorischen Mediatoren wie IL-6 verbunden (Chabaud et al., 1998) und stimuliert Osteoklasten zum Abbau von Knochenmatrix (Kotake et al., 1999).

Dem mit IL-15 zur γ_c -Familie gehörenden IL-7 wurde ebenfalls eine Rolle bei der TNF α -Produktion zugeschrieben; weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine TCR-vermittelte *in vitro*-Stimulation von synovialen T-Zellen in Gegenwart von IL-7 zu erhöhter IFN γ -Produktion führt (van Roon et al., 2003).

Für IL-12 und IL-18 wurden unterschiedliche, teils widersprüchliche Effekte postuliert. Während Leung et al. (Leung et al., 2000) sowohl nach alleiniger, wie nach kombinierter Gabe von IL-12 und IL-18 einen bösartigeren Verlauf der murinen Kollagen-induzierten Arthritis feststellten, der mit erhöhter Produktion von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ und IL-6 einherging, wurde in anderen Studien in IL-12-defizienten Tieren eine stärkere Krankheitsaktivität als in Wildtypmäusen gemessen (Murphy et al., 2003). Hier bestimmt vermutlich der Zeitpunkt der Applikation bzw. Blockade von IL-12 den Effekt.

IL-18 allein konnte in *in vitro*-Experimenten im humanen System eine direkte $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung in Makrophagen bewirken und potenzierte die $\text{IFN}\gamma$ -Produktion in synovialen mononukleären Zellen zusammen mit IL-12 (Gracie et al., 1999).

Die Effekte von $\text{IFN}\gamma$ im Gelenk sind vielfältig; es existieren zahlreiche Hinweise darauf, dass das Th1-Zytokin bei Autoimmunerkrankungen die Freisetzung von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen in Makrophagen anregt. Während erstere möglicherweise die Knochenresorption durch Osteoklasten beschleunigen (Yang et al., 2002), sind Stickoxyde direkt oder indirekt an der Apoptose von Chondrozyten (Kim et al., 2005), der Inhibition von Knorpelmatrixsynthese (Amin and Abramson, 1998) sowie der Aktivierung von Metalloproteinasen (Hirai et al., 2001) und damit generell an der Gelenkdestruktion beteiligt.

Die Blockierung von Mediatoren innerhalb des postulierten Netzwerkes durch sogenannte „Biologicals“, als deren wichtigste Vertreter die $\text{TNF}\alpha$ -Blocker zu nennen sind, führte zu unerwartet großen Erfolgen bei der Kontrolle der Krankheitsaktivität in Patienten. Die Konsequenzen der $\text{TNF}\alpha$ -Blockade sind komplex und umfassen die Suppression anderer proinflammatorischer Zytokine, eine reduzierte Einwanderung von Zellen in die entzündeten Gelenke und insbesondere eine Inhibition der matrixabbauenden Osteoklasten und eine damit zusammenhängende Reduktion der RA-typischen Knochenerosionen. Ferner wurde eine reduzierte Angiogenese unter α - $\text{TNF}\alpha$ -Therapie beobachtet. (Übersicht in: Feldmann et al., 2005; Feldmann and Maini, 2001). Interessanterweise konnte kürzlich ebenfalls eine Reaktivierung des inhibitorischen Potenzials von regulatorischen T-Zellen nach Gabe von $\text{TNF}\alpha$ -Blockern beobachtet werden (Ehrenstein et al., 2004).

Zusammenfassend scheint die komplexe Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen am Ort der Entzündung zu einer gegenseitigen Potenzierung von Zellaktivierenden und die Gelenkmatrix zerstörenden Signalen zu führen. Möglicherweise sind diese Mechanismen ab einem bestimmten Zeitpunkt von einer ursprünglich als Initialstimulus auftretenden Antigen-spezifischen Antwort entkoppelt; einige Autoren vermuten inzwischen sogar, dass im Verlauf der RA zu keinem Zeitpunkt spezifische, gegen „Selbst“ gerichtete B- und T-Zellantworten eine Rolle spielen (Müller-Ladner et al., 2005).

1.4 Ziele dieser Arbeit

Bei der Rheumatoiden Arthritis (RA) handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung mit bisher ungeklärter Ätiologie und nur in Ansätzen verstandener Pathogenese.

Es liegen Anhaltspunkte dafür vor, dass in den entzündeten Gelenken akkumulierte, proinflammatorisch aktive Gedächtnis-Th-Zellen an den destruktiven Prozessen beteiligt sind. Diese weisen einen Th1-Phänotyp auf, der durch die vorrangige Sekretion des Entzündungsmediators Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) charakterisiert ist.

Der aktivierende Stimulus für solche synovialen Th1-Zellen konnte bislang nicht identifiziert werden; die Suche konzentrierte sich auf putative Autoantigene, da nach bisheriger Vorstellung eine $\text{IFN}\gamma$ -Synthese in humanen Th-Zellen an eine vorangegangene Ligation des T-Zell-Rezeptors (TCR) durch Antigen gekoppelt ist.

Inzwischen postulieren jedoch mehrere Autoren, dass $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion durch synoviale Th-Zellen bei RA-Patienten möglicherweise nicht durch TCR-Stimuli, sondern durch Faktoren innerhalb eines Zytokinnetzwerkes am Ort der Entzündung ausgelöst werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte aufgrund dessen zunächst *in vitro* untersucht werden, ob $\text{IFN}\gamma$ -Produktion durch Th-Zellen auch Antigen-unabhängig, allein durch proinflammatorische Mediatoren, wie sie in den entzündeten Gelenken von bei RA-Patienten nachweisbar sind, induziert werden kann. Darauf aufbauend sollte analysiert werden, ob unterschiedliche Signaltransduktionswege an der $\text{IFN}\gamma$ -Produktion nach Antigen- bzw. Zytokin-Stimulation beteiligt sind. Ferner sollten phänotypische Marker identifiziert werden, die eine Unterscheidung von Antigen- gegenüber Zytokin-aktivierten $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden Th-Zellen zulassen. Schliesslich sollte überprüft werden, ob $\text{CD}25^+$ regulatorische T-Zellen (Tregs) in der Lage sind, die Zytokin-induzierte $\text{IFN}\gamma$ -Produktion zu supprimieren.

Mit den gewonnenen Informationen zum Phänotyp von Antigen- bzw. Zytokin-aktivierten $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden Th-Zellen sollte dann die Aktivierungshistorie von *ex vivo* isolierten, spontan $\text{IFN}\gamma$ -sezernierenden Th1-Zellen aus Gelenksinfiltraten von RA-Patienten analysiert werden. Sollten Th Zellen in den entzündeten Gelenken einen Phänotyp aufweisen, der auf eine $\text{IFN}\gamma$ -Induktion allein durch das proinflammatorische Zytokinmilieu schließen lässt, könnten durch die selektive

pharmakologische Blockade des involvierten Signaltransduktionsweges möglicherweise neue therapeutische Ansätze entwickelt werden, um die Entzündungsvorgänge bei der Erkrankung zielgerichtet behandeln zu können.