

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der menschliche Organismus setzt sich mit einer Vielzahl von Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten auseinander, bei deren Abwehr Haut und Schleimhäute eine erste, äußere Schutzbarriere bilden. Gelingt es Infektionserregern weiter in den Organismus vorzudringen, so wird das Immunsystem aktiviert, welches über zwei eng miteinander verbundene Abwehrsysteme verfügt:

Die unspezifische oder auch angeborene Immunabwehr bildet den ersten inneren Schutzmechanismus¹. Durch Einfluss der Pathogene geschädigte Gewebe oder Immunzellen setzen durchblutungssteigernde Substanzen frei, welche ebenfalls die Gefäßpermeabilität erhöhen und somit vermehrt Immunzellen aus dem Blut erlauben, in das entzündete Gewebe einzuwandern. Es handelt sich vorrangig um phagozytierende Zellen wie Granulozyten, Monozyten und Gewebsmakrophagen, die allgemein vorkommende Bausteine wie Bestandteile von bakteriellen Oberflächen erkennen, aufnehmen und prozessieren. Die insbesondere von Monozyten und Makrophagen sezernierten löslichen Faktoren ziehen weitere Immunzellen an und führen zu deren Aktivierung. Neben den genannten Zellpopulationen können natürliche Killerzellen (NK-Zellen) an veränderten Oberflächenstrukturen infizierter Zellen binden und diese zerstören.

Die unspezifische Abwehr wird sowohl durch lösliche Faktoren wie Lysozym, als auch durch die Proteine des Komplementsystems ergänzt, von denen einige, wie auch die Zytokine, der Kommunikation zwischen verschiedenen Zellsystemen dienen².

Die Zellen der spezifischen oder auch adaptiven Immunabwehr werden durch die Lymphozyten repräsentiert. Es lassen sich zwei Typen von Lymphozyten unterscheiden: T-Zellen und B-Zellen. Im Gegensatz zu den Zellen des unspezifischen Systems sind sie durch spezifische Rezeptoren und Bindungsstellen befähigt, fast jede Fremdsubstanz zu erkennen, eine gerichtete Immunantwort einzuleiten und ein immunologisches Gedächtnis auszubilden². Jeder Lymphozyt kann nur ein bestimmtes Antigen erkennen und binden. Ist dies geschehen, proliferiert er, bis eine Vielzahl von Lymphozyten mit der gleichen Antigenspezifität vorhanden ist. Dieser Vorgang wird als klonale Selektion bezeichnet.

B-Zellen differenzieren zu antikörperproduzierenden Plasmazellen und sind für die humorale Immunantwort verantwortlich. T-Zellen können je nach Subpopulation zu T-Helferzellen

(CD4) oder zytotoxischen T-Zellen (CTL, CD8) reifen und vermitteln die zelluläre Immunantwort. Für die Modulierung und Beendigung der Immunantwort sind T-Suppressorzellen verantwortlich.

Die Fähigkeit der Lymphozyten, eine Immunantwort gegen körpereigene Strukturen zu unterbinden, wird als immunologische Toleranz bezeichnet und ist durch klonale Deletion bedingt, ein Vorgang, der die Eliminierung autoreaktiver Lymphozyten im Thymus zum Ziel hat³.

1.2 Der Haupt-Histokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex, MHC)

T-Zellen sind nur dann in der Lage, Fremd- von Selbstantigenen zu unterscheiden, wenn ihnen diese von MHC-Molekülen präsentiert werden; ein Phänomen, welches als MHC-Restriktion bezeichnet wird⁴⁻⁸.

MHC-Moleküle sind Glykoproteine, die innerhalb der Zelle endogene und exogene Peptide binden und an die Zelloberfläche transportieren, wo sie über die Präsentation an T-Zellen die Antigenerkennung ermöglichen.

Beim Menschen werden MHC-Moleküle als HLA (Humanes Leukozyten Antigen) bezeichnet.

Der die MHC-Moleküle kodierende Genkomplex liegt auf Chromosom 6, ist polygen und hochpolymorph, was bedeutet, dass einerseits mehrere MHC-Klasse-I-und-II-Gene existieren, die jeweils Proteine mit unterschiedlicher Peptidbindungsspezifität kodieren, und andererseits für jedes Gen multiple Allele vorhanden sind. Aufgrund dieser Tatsachen wird die Bindung einer beinahe unbegrenzten Anzahl von Peptiden möglich, weshalb auch auf schnelle Strukturveränderungen von Pathogenen angemessen reagiert werden kann.

Immunzellen wie dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten, die darauf spezialisiert sind, Antigene zu präsentieren (Antigen präsentierende Zellen, APZ), nehmen zunächst das Antigen auf und prozessieren es. Die resultierenden Peptide werden innerhalb der Zelle während der Neusynthese von MHC-Molekülen an diese gebunden und an die Oberfläche der Zelle transportiert, wo der MHC-Peptid-Komplex den T-Zellen präsentiert wird. Die Erkennung erfolgt durch den T-Zell-Rezeptor (TZR)⁹, der aufgrund der ihm angebotenen Kombination aus MHC-Molekül („selbst“) und Peptid („selbst“ oder „fremd“?) differenziert, ob es sich um eine körpereigene oder körperfremde Struktur handelt.

Es lassen sich zwei Klassen von MHC-Molekülen unterscheiden, Klasse-I- und Klasse-II-Moleküle. MHC-I-Moleküle bestehen aus einer schweren α -Kette und einer kleineren, nichtkovalent angelagerten leichten Kette, dem β_2 -Mikroglobulin. Die schwere Kette setzt sich aus drei extrazellulären Domänen ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) zusammen, von denen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ die für die Peptidbindung verantwortliche Vertiefung bilden.

MHC-II-Moleküle hingegen bestehen aus zwei schweren Ketten, α und β , jeweils aufgebaut aus je zwei Domänen ($\alpha 1$, $\alpha 2$; $\beta 1$, $\beta 2$); der peptidbindende Spalt wird hier durch $\alpha 1$ und $\beta 1$ gebildet. Ein entscheidender Unterschied zwischen MHC-I- und MHC-II-Molekülen besteht in der unterschiedlichen Aufnahme, dem Transport und der Präsentation ihrer Peptide:

MHC-I-Moleküle nehmen im Zytosol generierte Peptide auf, um sie an der Oberfläche zu präsentieren, wogegen MHC-II-Moleküle Peptide von Proteinen binden, die durch Endozytose aufgenommen und prozessiert wurden¹⁰⁻¹⁵. Diese Einteilung darf allerdings nicht rigide betrachtet werden, da auch alternative Wege der Peptidbeladung bestehen¹⁶⁻¹⁸.

Nachdem die MHC-Moleküle mit dem gebundenem Peptid die Zelloberfläche erreicht haben, interagieren sie mit unterschiedlichen T-Zell-Klassen. MHC-I-Moleküle werden von CTL (CD8) erkannt, die die Abtötung der infizierten Zelle bewirken. Die Erkennung der MHC-II-Moleküle erfolgt durch naive T-Zellen (CD4), die zu T_H1 - oder T_H2 -Zellen differenzieren können. T_H1 -Zellen aktivieren den das Antigen präsentierenden Makrophagen und befähigen ihn, die in seinen intrazellulären Vesikeln vorhandenen Pathogene zu zerstören. T_H2 -Zellen stimulieren die Proliferation der präsentierenden B-Zelle und bewirken die Differenzierung zur antikörperproduzierenden Plasmazelle.

MHC-I-Moleküle werden von der Mehrzahl kernhaltiger Zellen exprimiert, wohingegen MHC-II-Moleküle nur von Zellen des Immunsystems gebildet werden - einerseits durch B-Lymphozyten und aktivierte T-Lymphozyten, die MHC-II konstitutiv exprimieren, und andererseits durch MHC-II-induzierbare Zellen wie Monozyten, dendritische Zellen und Langerhanszellen der Haut.

1.3 Generierung von Peptiden zur Präsentation durch MHC-I-Moleküle

Die Prozessierung von Proteinen zu Peptiden zur Präsentation durch MHC-I-Moleküle erfolgt durch das Proteasom, eine multikatalytischen Protease, die sich im Zytosol befindet¹⁹⁻²¹.

Aufgrund ihrer Lokalisation werden neben körpereigenen auch von Viren synthetisierte Proteine und Proteine von im Zytosol lebenden Bakterien, wie beispielsweise *Shigella* und *Listeria*, abgebaut. Anschließend transportiert der TAP-Transporter (Transporters associated with Antigen Processing) die generierten Peptide in das endoplasmatische Retikulum (ER), wo die Synthese der MHC-Moleküle erfolgt. Nach Bindung des Peptids an das MHC-I-Molekül wird dieses gefaltet, wodurch es sich vom TAP lösen und an die Zelloberfläche transportiert werden kann.

Der TAP-Transporter bevorzugt Peptide mit einer Länge von acht bis fünfzehn Aminosäuren^{22, 23}, was sich mit den von MHC-I-Molekülen bevorzugt gebundenen Peptiden einer Länge von neun bis elf Aminosäuren deckt^{24, 25}.

1.4 Generierung von Peptiden zur Präsentation durch MHC-II-Moleküle

MHC-II-Moleküle werden ebenfalls im ER synthetisiert. Die von ihnen gebundenen Peptide stammen nicht aus dem Zytosol, sondern aus intrazellulären Vesikeln. Dabei kann es sich sowohl um Parasiten und Bakterien handeln, die sich in Vesikeln der Zelle vermehren, als auch um von APZ endozytotisch aufgenommene extrazelluläre Proteine. Diese werden von Proteasen in den Vesikeln während des Transportes in Richtung ER zu Peptiden abgebaut. Um zu verhindern, dass das MHC-II-Molekül bereits im ER ein Peptid aufnimmt, ist seine Bindungsstelle auf dem Transport zur Zelloberfläche durch die sogenannte invariante Kette blockiert²⁶. Erst bei Kontakt zu mit Peptiden beladenen Endosomen wird sie abgebaut, wobei die Bindungsstelle zunächst durch das verbleibende CLIP-Fragment (Class-II-associated Invariant chain Peptide) besetzt bleibt. Die Bindung eines Peptids erfolgt nach Abdissoziation des CLIP-Fragments, was durch das Antigenprozessierungs-Hilfsmolekül HLA-DM durch den Austausch von CLIPs gegen Peptide aus der endosomalen Proteolyse gewährleistet wird²⁷. MHC-II-Moleküle binden Peptide mit einer Länge von 13 bis über 20 Aminosäuren²⁸⁻³⁰.

1.5 Entstehung von Autoimmunerkrankungen

Die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen ist vielfach ungeklärt. Durch die Entdeckung des HLA-Systems ließ sich jedoch die Assoziation von bestimmten HLA-Typen zu einigen Immunerkrankungen herstellen, was die Bedeutung einer genetischen Prädisposition betont.

Als auslösende Mechanismen kommen neben das „Selbst“ verändernden Faktoren wie Mutation eines HLA-Moleküls oder physikochemische Einflüsse auch hormonelle und insbesondere infektionsbedingte Faktoren in Frage. Letztere charakterisieren den Schwerpunkt der heutigen Forschung, wobei sich die Verbindung zwischen Infektion und nachfolgender Erkrankung häufig nur schwer herstellen lässt, da die Autoimmunerkrankung in der Regel erst nach Abklingen der Infektion auftritt.

Bei der infektionsbedingten Genese können verschiedene Pathomechanismen unterschieden werden:

1. Molekulares Mimikry bezeichnet die Anpassungsreaktion eines Mikroorganismus an seine Umwelt³¹. Durch die Ähnlichkeit zu körpereigenen Strukturen wird die Identifikation des Erregers durch die Immunabwehr als Fremdkörper erschwert, was ihn vor dessen Zugriff bewahrt. Gelingt dies nicht, wird eine Immunreaktion eingeleitet und der Erreger eliminiert, wobei eine Folgereaktion gegen körpereigene, dem Erreger ähnliche Strukturen im Sinne einer Kreuzreaktion die Selbsttoleranz durchbrechen kann.
2. Eine solche Durchbrechung der Selbsttoleranz ist auch durch eine gesteigerte HLA-Expression induzierbar. Wenn sich das Immunsystem mit einem Erreger auseinandersetzt, fördert vor allem das Zytokin IFN- γ die Synthese von HLA-Molekülen³², was eine vermehrte Präsentation antigener Strukturen gegenüber T-Zellen zur Folge hat. Gelingt keine schnelle Eliminierung des Erregers, kann es infolge der persistierenden Infektion durch eine HLA-Überexpression zu einer pathologischen Stimulation des Immunsystems kommen, was die Gefahr von Autoimmunität mit einer Reaktion gegen den eigenen Organismus birgt.
3. Auch eine oligo- oder polyklonale B- oder T-Zellaktivierung kann Autoimmunität induzieren, ausgelöst z. B. durch sogenannte Superantigene wie das Toxische-Schock-Syndrom-Toxin-1 des grampositiven Bakteriums *Staphylokokkus aureus*. Superantigene werden nicht von APZ prozessiert und gebunden an die peptidbindende Spalte des MHC-Moleküls präsentiert, sondern sie gehen eine Bindung außerhalb der MHC-Bindungsstelle ein. Die Erkennung und Bindung des Komplexes aus MHC-Molekül und Superantigen durch den T-Zell-Rezeptor erfolgt dann unabhängig von der Antigen-spezifität des TZR.

1.6 Reaktive Arthritis

Der Begriff „Reaktive Arthritis“ (ReA) beschreibt eine nichteitrige Gelenkerkrankung, die sich nach Infektion eines gelenkfernen Ortes entwickelt.

Wenige Tage bis einige Wochen nach einem gastrointestinalen (enterale ReA) oder urogenitalen Infekt (urogenitale ReA) tritt akut eine Synovitis, meist in Form einer Oligoarthritis, auf, die bevorzugt einen asymmetrischen Gelenkbefall im Bereich der unteren Extremität zeigt³³. Vor allem größere Gelenke wie Knie- und Sprunggelenke sind betroffen und es finden sich auch Affektionen der Hüft- und Iliosakralgelenke. Es können Daktylitiden sowie extraartikuläre Manifestationen in Form von Enthesiopathien, Urethritiden, Konjunktividen und Hauterscheinungen wie Aphten, Balanitis erosiva circinata und Keratoma blennorrhagica beobachtet werden. Die mittlere Krankheitsdauer beträgt 3 bis 6 Monate.

In 20 % der Fälle kommt es zu chronischen und schweren Verläufen mit einer Krankheitsdauer von mehr als 12 Monaten^{34, 35}, die bevorzugt HLA-B27-positive Patienten betreffen³⁶.

Aufgrund der ähnlichen klinischen Symptomatik und der Assoziation mit dem MHC-I-Molekül HLA-B27³⁷ wird die ReA zur Gruppe der Spondyloarthritiden (SpA) gezählt, zu der auch die ankylosierende Spondylitis (AS), die Arthritis bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, die Arthritis bei Psoriasis und die undifferenzierte Spondyloarthritis gerechnet werden³⁸.

Innerhalb dieser Gruppe gebührt der ReA eine Sonderstellung, da in ihrem Fall krankheitsassoziierte Erreger der resultierenden Arthritis identifiziert werden konnten: Die wesentlichen Mikroorganismen sind *Chlamydia trachomatis* und die Enterobakterien *Shigella*, *Yersinia*, *Salmonella* und *Campylobacter*.

Bereits in der Antike wurde der zeitliche Zusammenhang einer sich nach dem Geschlechtsverkehr oder nach einer Diarrhoe manifestierenden Arthritis beschrieben. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts beobachtete der Militärarzt Hans Reiter, dass sich bei einigen Soldaten nach einer blutigen Diarrhoe die Trias Arthritis, Urethritis und Konjunktivitis manifestierte und prägte den Begriff des Reiter-Syndroms, einer Sonderform der ReA³⁹. Reiter war jedoch nicht der Erstbeschreiber, da bereits ein Jahrhundert zuvor Sir Benjamin Brodie diese Trias klinischer Symptome beschrieben hatte⁴⁰.

Der Zusammenhang zwischen auslösendem Bakterium und resultierender Manifestation ließ sich schließlich durch den Nachweis von bakteriellem Antigen in der Synovialmembran und Synovialflüssigkeit betroffener Gelenke erbringen⁴¹⁻⁴⁴. Die Beobachtung, dass synoviale T-Zellen (SFMNZ) von ReA-Patienten spezifisch auf das die Arthritis auslösende Bakterium proliferieren, lieferte darüber hinaus neben der nur während der akuten Phase des Infektes

einsetzbaren Stuhl Diagnostik und der Serologie ein weiteres diagnostisches Werkzeug zur Erregeridentifikation⁴⁵⁻⁴⁷.

Studien, die durch arthritogene Bakterienstämme verursachte epi- oder pandemisch auftretende Durchfallerkrankungen untersuchen, weisen nach, dass 2-6 % der Erkrankten eine ReA entwickeln. Infizierte HLA-B27-positive Patienten dagegen tragen ein sehr viel höheres Risiko, an einer ReA zu erkranken⁴⁸. Bei der durch *Chlamydia trachomatis* verursachten Urethritis tritt in 1-4 % eine ReA auf, bei HLA-B27-positiven Patienten lässt sich diese Komplikation in 20-25 % der Fälle beobachten⁴⁹.

Diese Untersuchungen und die Erkenntnis, dass die ReA bei 20 % der HLA-B27-positiven Patienten nach 10 bis 20 Jahren in eine AS übergeht⁵⁰, welche eine HLA-B27-Assoziation von über 90 % aufweist⁵¹, betonen die Bedeutung einer Interaktion zwischen Bakterium und dem MHC-Klasse-I-Molekül HLA-B27 bei der Pathogenese.

1.7 Biologie des Bakteriums *Shigella*

Shigellen sind unbegeißelte, gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien, die zur Familie der Enterobacteriaceae gehören^{52, 53}. Bei bekannter phylogenetisch enger Verwandtschaft mit *Escherichia coli* konnte jüngst der Nachweis erbracht werden, dass es sich bei den bisher als *Shigella*-Spezies` bezeichneten Isolaten um *E. coli*-Klone handelt^{54, 55}.

Traditionell werden vier *Shigella*-Spezies` unterschieden: *S.dysenteriae*, *S.flexneri*, *S.boydii* und *S.sonnei*. Die weitere Unterteilung in Serovare erfolgt aufgrund spezifischer O-Antigene.

Der natürliche Lebensraum der Shigellen ist der Darm des Menschen. *Shigella* ist der Erreger der Bakterienruhr (Shigellose), einer Kolitis, die durch blutig-schleimige Durchfälle, abdominelle Krämpfe, Tenesmen und Fieber charakterisiert ist. Gefäßläsionen, Mikroabszesse und membranartig belegte Ulzera der Kolonschleimhaut sowie herdförmige Blutungen ausgedehnter Geschwüre charakterisieren histopathologisch das Vollbild der Infektion⁵⁶⁻⁵⁸. Bereits sehr geringe Infektionsdosen von 10-100 virulenten Bakterien, fäkal-oral übertragen, können das Vollbild der Erkrankung hervorrufen⁵⁹.

Nach Inokulation passiert *Shigella* dank erhöhter Säureresistenz unbeschadet das saure Milieu des Magens und erreicht das Kolon, den eigentlichen Ort der Infektion⁶⁰.

Da Shigellen nicht in der Lage sind, Enterozyten vom apikalen, dem Darmlumen zugewandten Pol her zu infizieren, müssen sie zum basolateralen Pol gelangen⁶¹. Dieser Zellpol ist unter physiologischen Bedingungen jedoch durch die dicht verbundenen

Epithelzellen nicht erreichbar. Die Barriere wird überwunden, indem *Shigella* M-Zellen, spezialisierte Darmepithelzellen der Peyerschen Plaques, als Eintrittspforte nutzt⁶². M-Zellen nehmen Antigene aus dem Darmlumen auf, transportieren sie durch das Epithel und übergeben sie an Makrophagen, B-Lymphozyten oder dendritische Zellen. Nach Durchwanderung der M-Zellen wird *Shigella* durch Makrophagen phagozytiert, in denen sie nach Auflösung der Phagosomenmembran über Aktivierung des Interleukin-1 β converting enzyme die Apoptose der Makrophagen induzieren^{63, 64}.

Die anschließende Infektion der Enterozyten über den basolateralen Pol kann sowohl von benachbarten M-Zellen aus als auch nach Freisetzung aus Makrophagen erfolgen.

Eine dritte Möglichkeit des bakteriellen Zugangs zum basolateralen Pol der Enterozyten bietet die durch Interleukin-1 β ausgelöste Einwanderung von Granulozyten in das Infektionsgebiet. Die Granulozytenmigration in Richtung des Darmlumens bewirkt eine Öffnung epithelialer Zell-Zell-Verbindungen, die es luminalen Shigellen ermöglicht, den basolateralen Pol der Enterozyten auf direktem Weg zu erreichen⁶⁵.

Die in Enterozyten eingedrungenen Shigellen lysieren die Vakuolenmembran und gelangen in das Zytoplasma der Zelle, wo sie sich vermehren. Unter Ausnutzung physiologischer Funktionen der Epithelzelle werden die unbegeißelten Shigellen bewegt⁶⁶⁻⁶⁸. Die Infektion der Nachbarzelle erfolgt über die Ausbildung hochorganisierter Zell-Zell-Kontakte mit bakteriellen Protrusionen von der infizierten in die zu infizierende Zelle⁶⁹. Durch Lyse der aus Zellmembran der infizierten Zelle und Membran der Nachbarzelle bestehenden Doppelmembran erhält *Shigella* Zugang zum Zytoplasma der Nachbarzelle.

Die bakterielle Ruhr, vorwiegend verursacht durch *S. sonnei* und *S. flexneri*, ist weltweit endemisch verbreitet. Hervorgerufen durch *S. dysenteriae* kann sie aber auch in epidemischer Form auftreten. In den Industriestaaten Mitteleuropas gehören die Shigellen mit einer Inzidenz von etwa 10 Fällen/100000 Einwohner/Jahr zu den eher seltenen Erregern bakterieller Durchfallerkrankungen.

Als postinfektiöse Spätkomplikation, die innerhalb weniger Tage bis zu mehreren Wochen nach Beginn der intestinalen Symptomatik auftreten kann, wird die ReA beschrieben.

1.8 *Shigella*-induzierte ReA

Die *Shigella*-induzierte ReA weist mit über 80 % die höchste HLA-B27-Assoziation der bakterieninduzierten reaktiven Arthritiden auf^{70, 71} und zeigt am häufigsten chronische Verläufe und das Vollbild des Reiter-Syndroms³³.

Trotz dieser hohen Assoziation zu HLA-B27, die eher als Indikator für schwere und chronische Verläufe anzusehen ist^{36, 72}, erscheint Positivität für HLA-B27 bei der Entwicklung einer ReA nicht erforderlich zu sein: Frühere Untersuchungen zur HLA-B27-Assoziation hatten sich häufig auf hospitalisierte Patienten bezogen und somit eher die schwereren Verläufe erfasst, die eine hohe Assoziation aufweisen. Dagegen zeigen jüngere Analysen, welche sich auf Epidemien oder Gesellschaftserhebungen beziehen, eine Assoziation von ca. 50 %^{73, 74}.

Aufgrund der Biologie von *Shigella* mit dem Zytosol als Ort der Vermehrung erscheint dem MHC-I-Pfad bei der Präsentation bakterieller Peptide eine wichtige Rolle zuzukommen. Diese Tatsache betont die Bedeutung einer zytotoxischen T-Zell-Reaktion (CD8) bei der Abwehr von Shigellen, was umso plausibler erscheint, da bei Listerien, die eine den Shigellen sehr ähnliche Biologie aufweisen, ebenfalls eine MHC-I-restringierte Immunreaktion im Vordergrund steht⁷⁵. Dabei ist für eine effektive zytotoxische T-Zell-Reaktion die Interaktion mit CD4-Zellen und dendritischen Zellen erforderlich. Obgleich die zugrunde liegenden Mechanismen nicht aufgeklärt sind, scheint es durch die CD4-Zellen zu einer optimalen Unterstützung von Antigen-aktivierten zytotoxischen T-Zellen zu kommen, welche insbesondere in der Phase der extensiven klonalen Expansion und der genetischen Neuprogrammierung von großer Bedeutung für eine effektive zytotoxische T-Zell-Reaktion ist⁷⁶.

Reaktive Arthritiden werden nicht nach Infektion mit allen Shigellenstämmen beobachtet. So lassen sich Arthritiden nach Infektion mit *Shigella flexneri* und *Shigella dysenteriae* nachweisen, wogegen das Auftreten einer Arthritis nach Infektion mit *Shigella sonnei* bei Shigelloseausbrüchen trotz einzelner Fallberichte^{77, 78} nicht eindeutig belegt werden konnte^{70, 79}. Auch sichere Hinweise auf eine Assoziation von *Shigella boydii* zur ReA liegen nicht vor. Zur Unterscheidung zwischen arthritogenen und nichtarthritogenen Stämmen lässt sich eine Untersuchung aus dem Jahr 1989 heranziehen, die ein bei arthritogenen Shigellenstämmen

vorhandenes 2 Md-Plasmid mit Namen pHS-2 beschreibt⁸⁰. Diese Ergebnisse erfuhren sowohl in einer zweiten erweiterten Studie⁸¹ als auch in einer aktuellen Untersuchung Bestätigung, in der gezeigt werden konnte, dass sich pHS-2 bei allen getesteten *S.flexneri*-Isolaten 1a, 1b, 2a und 2b nachweisen ließ⁸². Dieses Resultat korrespondiert gut mit Daten, die das Auftreten einer ReA am häufigsten nach Infektion mit dem Serotyp 2a^{54, 83-88} sowie den Serotypen 1b⁸³ und 2b und 3a^{89, 90} assoziiert.

Das pHS-2 Plasmid enthält ein Gen, welches einen Kettenlängendeterminator (chain length determinator, cld) der O-Seitenkette des Lipopolysaccharids (LPS) kodiert. Die Regulation der O-Seitenkette stellt einen wichtigen Virulenzfaktor dar⁹¹ und das vom Plasmid getragene cld-Gen könnte dem Bakterium mit Hilfe eines unbekanntes Mechanismus seine Arthritogenizität verleihen. Zusätzlich kodiert das Plasmid ein Epitop, welches Homologien zur α 1-Domäne von HLA-B27 aufweist. Die Translation dieser Sequenz in das vorhergesagte Peptid wurde bisher jedoch nicht demonstriert.

Durch den Nachweis bakterieller Bestandteile von *Shigella* in arthritischen Gelenken⁴³ wurde der Zusammenhang zwischen vorausgehender Darminfektion und resultierender Arthritis hergestellt und es lässt sich folgern, dass auf bisher nicht geklärte Weise Erreger oder Erregerbestandteile vom Darm in das Gelenk gelangen müssen, wo es durch eine Interaktion zwischen bakteriellen Peptiden und, zumindest zum Teil, dem MHC-Klasse-I-Molekül HLA-B27 zur Induktion einer T-Zell-Immunreaktion kommt.

Es wird diskutiert, ob durch den Körper patrouillierende Makrophagen für den Transport von im lymphatischen Gewebe des Darms persistierenden Bakterien verantwortlich sind, was im Fall einiger Erreger der ReA, wie z. B. Salmonellen und Chlamydien, plausibel erscheint: Sie leben und vermehren sich in Vesikeln von Makrophagen und der Nachweis von Chlamydien-DNA und -RNA in arthritischen Gelenken ist bereits gelungen, was das Vorhandensein lebender Chlamydien im Gelenk wahrscheinlich macht^{44, 92}.

Shigella hingegen induziert in Makrophagen Apoptose, was für sie diesen Weg des Antigentransportes eher ausschließt und somit eine gute Erklärung für den bisher gescheiterten Nachweis von *Shigella*-DNA im Gelenk darstellt⁸⁶. Es erscheint daher auch wahrscheinlicher, dass in das Gelenk transportierte bakterielle Bestandteile im Gegensatz zu intakten, lebenden Bakterien eine lokale Immunreaktion provozieren - eine Hypothese, die durch den Nachweis von *Shigella*-LPS mittels Anti-LPS-Antikörpern in der Synovia gestützt

wird⁴³.

Die Aufklärung dieser Frage wird durch die Tatsache erschwert, dass der Mensch der einzige Wirt für *Shigella* ist und somit im Gegensatz zu den anderen ReA-assoziierten Bakterien keine Tiermodelle existieren, mittels derer ein tieferer Einblick in Pathogenese gewonnen werden kann.

1.9 Pathogenese der ReA

Es existieren mehrere Hypothesen, die die Interaktion zwischen auslösendem Bakterium, HLA-B27 und T-Zelle beschreiben⁹³. Neben einem molekularen Mimikry von HLA-B27 mit Enterobakterien, der Präsentation von arthritogenen Peptiden, welche aus Antigenen der Umwelt generiert werden und durch HLA-B27 an zytotoxische T-Zellen präsentiert werden sowie der Präsentation von exogenen Antigenen durch leere HLA-B27-Moleküle^{94, 95} vermuten einige Forscher, dass vom B27-Molekül abgeleitete Selbstpeptide eine Rolle bei der Pathogenese spielen⁹⁶. Die Bindung solcher Selbstpeptide an HLA-B27 wurde in vitro demonstriert⁹⁷. Andererseits könnten auch von HLA-B27 abgeleitete Peptide durch MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert werden^{36, 98}.

Die chronische Immunantwort, die schließlich zur Schädigung der betroffenen Gelenke führt, könnte einerseits bei insuffizienter Erregerelimination durch im Gelenk persistierendes bakterielles Antigen bedingt sein bzw. durch ein in einem gelenkfernen Gewebe lokalisiertes, persistierendes Reservoir an Bakterien mit sukzessiver Ausschwemmung in das Gelenk. Dabei ist unklar, welche Subpopulation der T-Zellen für die Gelenkschädigung ursächlich verantwortlich ist. Einige Autoren gehen davon aus, dass es nach erfolgter Infektion durch molekulares Mimikry zu einer Kreuzreaktion zwischen bakteriellen Peptiden und Selbstantigenen mit konsekutiv andauernder T-Zell-Immunantwort kommt. Der Nachweis von Kreuzerkennungen von Epitopen durch virusspezifische zytotoxische T-Zellen⁹⁹ und die Demonstration, dass MHC-I-restringierte zytotoxische T-Zell-Klone in der Lage sind, Peptidliganden mit gleicher linearer Homologie in viralen, bakteriellen und Selbstpeptiden zu erkennen¹⁰⁰, lässt ein molekulares Mimikry möglich erscheinen.

Dabei bindet das MHC-I-Molekül HLA-B27 bevorzugt Nonamere, welche an Position 2 des Nonamers ein Arginin besitzen. Dieses fungiert als „Anker“ bei der Bindung an die

Peptidbindungsstelle des MHC-Moleküls und diesem Charakteristikum wird durch die Selektion von Peptiden eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der ReA eingeräumt¹⁰¹.

Eine von Scofield durchgeführte strukturelle Analyse des HLA-B27-Moleküls zeigt, dass HLA-B27 signifikant häufiger Aminosäuresequenzen mit Proteinen von Enterobakterien teilt als alle anderen HLA-B-Allele und darüber hinaus eine Sequenz in seiner hypervariablen Region besitzt, die von HLA-B27-Molekülen gebunden werden kann. Somit resultiere eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass Enterobakterien im Vergleich zu anderen Bakterien ein Peptid enthalten, welches von HLA-B27 gebunden und präsentiert werde⁹⁷.

Die Bedeutung eines infektiösen Triggers lässt sich zudem durch Untersuchungen mit HLA-B27-transgenen Tiermodellen belegen, die zeigen, dass eine Arthritis nur bei Tieren induziert werden kann, die eine normale bakterielle Umgebung besitzen, wohingegen in keimfreier Umgebung keine Arthritis ausgelöst wird¹⁰².

Untersuchungen, die sich mit der Frage nach den für die Gelenkschädigung pathogenetisch verantwortlichen Zellen beschäftigten, konnten zunächst nur CD4-Zellen nachweisen, bis verbesserte Analysemethoden den Nachweis spezifisch auf Bakterien oder Autoantigene reagierender HLA-B27-restringierter zytotoxischer T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit von ReA-Patienten ermöglichten¹⁰³.

Gegenwärtig kann nicht beantwortet werden, welche der beiden T-Zell-Subpopulationen für die nachfolgende Gelenkschädigung hauptsächlich verantwortlich ist.

Die Beobachtung, dass in HLA-B27-transgenen Mäusen eine Arthritis ausgelöst werden kann, bei denen die Expression der B27-Moleküle und zytotoxischen T-Zellen sehr stark eingeschränkt ($B27^+ \beta_2m^0$ Mäuse), die der MHC-II-Moleküle und CD4-Zellen jedoch normal ausgeprägt ist¹⁰⁴, eröffnete mehrere Theorien zur möglichen Pathogenese. Eine dieser alternativen Theorien geht davon aus, dass Selbstpeptide des B27-Moleküls über MHC-II-Moleküle CD4-Zellen präsentiert werden und somit die Bedeutung von MHC-I und zytotoxischen T-Zellen untergeordnet sei⁹⁸.

Diese Annahme wurde im Tierexperiment widerlegt, indem es gelang, in HLA-B27-transgenen Mäusen eine Arthritis zu induzieren, bei denen gleichfalls die Expression der B27-Moleküle und zytotoxischen T-Zellen sehr eingeschränkt ($B27^+ \beta_2m^0$ Mäuse) und zusätzlich der MHC-II-Pfad vollkommen ausgeschaltet ist (MHC class II knockout gene, $A\beta^0$)¹⁰⁵.

Die Entwicklung der Erkrankung erscheint nach dieser Untersuchung also unabhängig von MHC-Klasse-II-Molekülen und CD4-Zellen zu erfolgen. Darüber hinaus ist die Bedeutung der schweren Kette des B27-Moleküls zu betonen, die offenbar in der Lage ist, auch in Abwesenheit des β_2 -Mikroglobulins (β_2m^0), dem zweiten Bestandteil des B27-Moleküls, Peptide zu präsentieren.

Diese Beobachtung führte zu der umstrittenen Hypothese, dass sich zwei schwere Ketten des B27-Moleküls zu einem Homodimer zusammenlagern können, das seinerseits in der Lage ist, Peptide zu präsentieren. In einem in-vitro-Assay gelang es, die postulierten Homodimere (HC-B27) zu synthetisieren und in einer humanen Zelllinie zu exprimieren. Es wird spekuliert, dass die Assoziation der beiden schweren Ketten eine teilweise Streckung der $\alpha 1$ -Helix bewirkt, was einerseits durch Veränderung der peptidbindenden Spalte in einem unterschiedlichem Bindungsverhalten resultiert und andererseits dem Homodimer eine starke Ähnlichkeit zu MHC-II-Molekülen verleiht, deren Erkennung dann durch CD4-Zellen erfolgen könnte^{105, 106}.

Durch die Analyse der an HLA-B27-Moleküle gebundenen Peptide gelang darüber hinaus der Nachweis, dass auch Selbstpeptide des HLA-B27-Moleküls über HLA-B27-Moleküle präsentiert werden¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass bei Assoziation zu bestimmten Bakterien die Pathogenese der ReA ungeklärt ist, wie auch die Frage, welche T-Zell-Subpopulation für Initiation der Immunreaktion und anschließende Gelenkschädigung pathogenetisch verantwortlich ist.

Die Frage, ob die gelenkschädigende T-Zell-Reaktion Folge von Erregerpersistenz oder überschießender Immunantwort nach molekularem Mimikry bzw. ob dem HLA-B27-Molekül eine Rolle als Präsentator oder auch Donor von Peptiden zukommt, stellt dabei den Schlüssel zum Verständnis der Erkrankung dar.

1.10 Charakterisierung möglicher T-Zell-stimulierender Antigene

Um die Pathogenese der ReA besser verstehen zu lernen, wird der Suche nach immundominanten, arthritogenen Proteinen oder Peptiden größte Bedeutung beigemessen.

Die Beobachtung, dass die intrazellulären Bakterien *Shigella*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Campylobacter* und *Chlamydia* in der Lage sind, eine Arthritis zu induzieren, führte zu der Vorstellung, dass sie eine die Arthritis auslösende gemeinsame antigene Struktur teilen. Eine solche gemeinsame Struktur sei vor allem unter hoch konservierten Proteinen zu erwarten.

Eine gängige Annahme geht davon aus, dass sich - wenngleich auf extrazelluläre Proteine bezogen - unter stark exprimierten Proteinen mit höherer Wahrscheinlichkeit ein signifikantes Antigen findet¹¹⁰. Dies wird durch Untersuchungen gestützt, die Immunreaktionen gegen Stressproteine wie Hitzeschockproteine (hsp) nach Infektionen durch die intrazellulären Bakterien *Salmonella typhimurium*, *Mykobakterium tuberculosis*, *Coxiella burnetti* und *Legionella pneumophila* nachweisen¹¹⁰⁻¹¹⁴. Ihre erhöhte Expression, der Grad der Konservierung und bestehende Homologien unter Prokaryonten und auch zwischen Prokaryonten und Eukaryonten qualifizieren hsp, die auf molekularer Ebene eine Vielzahl von Funktionen wahrnehmen, als mögliche Kandidatenproteine.

Untersuchungen, die sich mit der Immundominanz von hsp bei rheumatischen Erkrankungen beschäftigen, kommen jedoch zu widersprüchlichen Aussagen: Es existieren keine einheitlichen Daten sowohl in Bezug auf die Immundominanz des hsp60 von *Yersinia* als auch im Hinblick auf eine mögliche Kreuzreaktion und damit immunstimulatorische Rolle zwischen bakteriellem und humanem hsp60¹¹⁵⁻¹¹⁸. Ergebnisse einer holländischen Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass das humane hsp60 durch die Stimulation von T-Suppressorzellen als protektiver Faktor zur Verhütung einer Arthritis dienen kann^{119, 120}.

Eine weitere Quelle möglicher immunogener Proteine stellen die Ribosomen dar. Ribosomale Proteine weisen ebenfalls einen hohen Grad an Konservierung und Homologien zwischen Prokaryonten und Eukaryonten auf und einzelne ribosomale Proteine konnten bereits als immundominante Antigene identifiziert werden: Beim systemischen Lupus erythematodes, dem Prototyp einer systemischen Autoimmunerkrankung, sind die drei ribosomalen Proteine P₀ (L11), P₁ (L10) und P₂ (L7/L12) als IgG-Antikörper induzierende Antigene bekannt^{121, 122}.

Untersuchungen mit synovialen MNZ von Patienten mit ReA resultierten in der Identifizierung mehrerer immundominanter konservierter Proteine von *Yersinia enterocolitica* 0:3, einerseits den ribosomalen Proteinen L2 und L23 und andererseits der β -Urease-Untereinheit, welche in immunisierten Ratten bei intraartikulärer Injektion eine Arthritis induziert^{117, 123, 124}.

Gegen das ribosomale Protein P₂ lassen sich bei der chronischen *Aspergillus-fumigatus*-

Allergie humorale und zelluläre Autoimmunreaktionen nachweisen: So wird das *Aspergillus-fumigatus*-P₂ durch IgE-Antikörper von sensibilisierten Patienten erkannt und es zeigt eine signifikante Kreuzreaktivität gegen das humane P₂. Beide Proteine induzieren starke Hautreaktionen und Proliferationen im Lymphozytenproliferationsassay mit MNZ aus dem peripheren Blut (PBMNZ) sensibilisierter Individuen¹²⁵.

Im Laufe der florierenden bakteriellen Infektion fallen ribosomale Proteine in sehr großen Mengen an und ihr Anteil an der Proteintrockenmasse der sich exponentiell vermehrenden Bakterien beträgt über 30 %. Neben einer möglichen HLA-Überexpression durch das Anfluten sehr großer Antigenmengen ist molekulares Mimikry mit resultierender Kreuzreaktion zwischen bakteriellen und humanen Proteinen als weiterer potentieller Auslöser einer überbordenden Immunreaktion zu betrachten.

Untersuchungen mit dem intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* konnten in diesem Zusammenhang eine direkte Korrelation zwischen intrazellulär sezernierter Antigenmenge und Produktion von durch zytotoxische T-Zellen erkannten Epitopen nachweisen¹²⁶. Folgeuntersuchungen zeigten jedoch, dass das Ausmaß der T-Zell-Antwort auf verschiedene Epitope keinen direkten Rückschluss auf die relative Anzahl der Epitope zulässt. Trotz in dieser Untersuchung fehlenden Hinweisen auf eine Korrelation zwischen Epitopmenge und Immundominanz scheint jedoch eine Korrelation zwischen Epitopstabilität und Ausmaß der T-Zell-Antwort zu existieren^{127, 128}.

Neben den bereits genannten Faktoren machen einige Autoren auch die Basizität eines Antigens für dessen mögliche arthritogene Potenz verantwortlich. Aufgrund ihrer positiven Ladungseigenschaften sollen diese mit negativ geladenen Gruppen des Gelenkknorpels interagieren und einen länger im Gelenk persistierenden Antigenreiz als saure Proteine darstellen¹²⁹⁻¹³¹; eine Voraussetzung, die die ribosomalen Proteine durch ihre überwiegend weit im basischen Bereich liegenden isoelektrischen Punkte ebenfalls erfüllen.

Zusammenfassend gilt, dass ribosomale Proteine eine Vielzahl immunogener und möglicherweise arthritogener Charakteristika aufweisen, weshalb sie eine Rolle bei der Pathogenese der ReA spielen könnten und als außerordentlich interessante Kandidatenproteine einzuordnen sind.

1.11 Zielsetzung

Bei bekannter Assoziation zu den auslösenden Bakterien *Chlamydia*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Campylobacter* und *Shigella* ist die Pathogenese der ReA unklar. Die ribosomalen Proteine stellen innerhalb der Zelle eine homogene Gruppe von Proteinen dar, die über eine Vielzahl möglicher arthritogener Charakteristika verfügt und daher eine Rolle bei der Pathogenese der ReA spielen könnte. Bisher sind keine immundominanten Proteine des ReA-assoziierten Bakteriums *Shigella* bekannt.

Ziel dieser Arbeit ist es, erstmalig immundominante, T-Zell-Stimulation induzierende Proteine von *Shigella flexneri* zu identifizieren.

Dazu soll die Gesamtheit der ribosomalen Proteine nach deren Präparation hinsichtlich ihres immunogenen Potentials untersucht und insbesondere nach interindividueller, T-Zell-stimulatorischer Potenz gefahndet werden. Auch ein Vergleich von Ribosomenfraktion und im Rahmen der Präparation anfallender Nicht-Ribosom-Proteinfraktion soll hinsichtlich unterschiedlicher zellulärer Immunogenität vorgenommen werden.

Die Biologie des Bakteriums *Shigella* mit dem Zytosol als Ort der Vermehrung deutet darauf hin, dass zytotoxischen T-Zellen bei der Initiation der Abwehr eine wichtige Rolle zukommt, wobei unklar ist, ob zytotoxische T-Zellen oder CD4-Zellen für die resultierende Gelenkschädigung bei der ReA verantwortlich sind. Für eine effektive zytotoxische T-Zell-Reaktion (CD8) ist in jedem Fall die Interaktion mit CD4-Zellen essentiell und eine zytotoxische T-Zell-Reaktion bei negativer CD4-Immunantwort ist nicht denkbar. Die Analyse der CD4-Immunantwort auf antigene Strukturen bietet darüber hinaus den Vorteil, nicht nur kleine Peptide, wie bei einer CD8-Immunreaktion, sondern komplexe Proteine hinsichtlich ihrer Immunogenität untersuchen zu können. In einem ersten Schritt im Sinne einer Vorselektion zur Identifikation von arthritogenen Epitopen aus der Vielzahl von Proteinen von *Shigella flexneri* ist somit die CD4-Immunantwort zu untersuchen.

Als Detektionssystem dienen synoviale mononukleäre Zellen von HLA-B27-positiven Patienten mit *Shigella*-getriggelter ReA, die im Lymphozytenproliferationsassay mit den zu untersuchenden Antigenen in Kultur genommen werden. Finden sich übereinstimmend erhöhte T-Zell-Stimulationen auf die gleichen ribosomalen Antigene, so deutet dies auf ein

„Wiedererkennen“ derselben durch die synovialen T-Zellen hin und könnte einen Hinweis auf deren Rolle bei der Pathogenese der ReA darstellen.

Zur Durchführung dieser Untersuchung sind ein Konzept zu entwerfen und Methoden zu etablieren, die zunächst eine besonders hohe Ausbeute von 70S-Ribosomen aus *Shigella flexneri* gewährleisten und in der Folge über die Separierung in ribosomale Untereinheiten und weiter in Proteinfractionen eine hohe Auflösung derselben mit möglichst wenigen ribosomalen Proteinen pro Proteinfraction erzielen.

Daneben soll untersucht werden, ob T-Zell-Stimulation induzierende ribosomale Proteine von *Shigella* auch auf humoraler Ebene erkannt werden, ob sich unterschiedliche Antikörperprofile gegen die ribosomalen Proteine im Serum von an *Shigella*-getriggelter ReA leidender Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden beobachten lassen und ob bei auftretenden Differenzen diese als diagnostisches Werkzeug hinsichtlich eines stattgehabten Infekts einsetzbar sind.