

**Analyse von (immundominanten) HLA-B27-restringierten  
bakteriellen und autologen gelenkspezifischen Peptiden und die  
Beteiligung von Chondrozyten an der Antigenpräsentation: Neue  
Erkenntnisse zur Immunpathologie der Spondyloarthritis**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Maren Kuhne**

aus Neuruppin

März 2009

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2003 bis März 2009 im Forschungslabor für Rheumatologie der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie am Campus Benjamin Franklin der Charité - Universitätsmedizin Berlin unter Leitung von PD Dr. med. Heiner Appel angefertigt.

1. Gutachter: **Prof. Dr. med. Joachim Sieper**

2. Gutachter: **Prof. Dr. rer. nat. Thomas Blankenstein**

Disputation am: 17.07.2009

**Für Adele und Johannes**

## Danksagung

PD Dr. Heiner Appel und Prof. Dr. Joachim Sieper danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit im Forschungslabor für Rheumatologie am Campus Benjamin Franklin der Charité anfertigen zu dürfen. PD Dr. Heiner Appel bin ich für die Betreuung meiner Dissertation zu Dank verpflichtet. Mit seinem Leitspruch nach Abraham Lincoln „Man hilft den Menschen nicht, wenn man für sie tut, was sie selbst tun können“ half er mir letztlich sehr, meinen wissenschaftlichen Weg zu gehen.

Prof. Dr. Thomas Blankenstein danke ich für die Begutachtung der Arbeit und seine zusprechenden Worte.

Weiter danken möchte meinen lieben Kollegen im Labor, die mir immer hilfreich zur Seite standen: Dorothee Köhler, die mich bei den immunhistochemischen Färbungen unterstützt hat, Stefanie Kuhlmann, die mir bei den zahllosen FACS-Färbungen half, Peihua Wu, die wertvolle Hilfestellungen im Umgang und Kultivierung von T-Zellen gab sowie Rebecca Scheer und René Heidrich, deren Unterstützung ich stets hatte. Danke für die nette Atmosphäre im täglichen Laboralltag.

Prof. Dr. Christoph Loddenkemper sei für die Unterstützung in histopathologischen Fragestellungen sehr herzlich gedankt, Dr. Jan Richter für seine Einweisung und Unterstützung bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie und Dr. Paul Bowness für die Bereitstellung HLA-B27 spezifischer Antikörper. Prof. Dr. Andreas Radbruch und Dr. Andreas Thiel danke ich für die wertvollen Diskussionen im CI-Club im DRFZ.

Bedanken möchte ich mich herzlich bei Dr. Wolfgang Kuon, auf dessen fachliches Urteil ich mich immer verlassen konnte, dessen B27-transgene Mäuse essenziell für die Arbeit waren und der die Arbeit in der Endphase durch wertvolle Hinweise – über zahlreiche Telefonate aus München – bereichert hat.

Dr. Gundula Schulze-Tanzil hat mich die Kultivierung von Chondrozyten gelehrt. Sie hat mich überdies sehr herzlich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen, mir Freiräume für die Anfertigung der Arbeit eingeräumt und immer Verständnis für meine Situation gezeigt. Ich bin ihr auch für ihr Korrekturlesen sehr verbunden.

Gar nicht genug danken kann ich Dr. Ulrike Erben. Uneigennützig hat sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Sie hat mir geholfen, den Horizont in Richtung Naturwissenschaft zu erweitern und mich daran erinnert, wo ich fachlich zuhause bin. Mit ihrem fachlichen, „seelischen und moralischen“ Beistand war sie letztlich die treibende

Kraft, dass alle Ergebnisse auch aufs Papier gekommen sind. Sie hat viele wichtige Anregungen für die Arbeit gegeben und sehr viel Zeit für mich investiert.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meiner Familie, die mir diesen Weg ermöglicht und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt hat. Ich danke vor allem meinem lieben Mann Clemens, der am intensivsten die Höhen und Tiefen mit mir durchlebte und mir immer mit aller Kraft den Rücken stärkte. Meinen Kindern Johannes und Adele danke ich für ihre Geduld, auch wenn es hieß: „Mama niich aarbeiten soll.“ Jetzt bin ich wieder voll für euch da!!!

Meinen Eltern und meinen Schwiegereltern danke ich für die Betreuung unserer Kinder wenn es zeitlich eng wurde, und dass sie immer uneingeschränkt für uns alle da waren. Danke!

## Publikationsverzeichnis

**Kuhne M**, Erben U, Schulze-Tanzil G, Köhler D, Wu P, Richter J, John T, Radbruch A, Sieper J, Appel H. HLA-B27 restricted antigen presentation by human chondrocytes to CD8+ T cells: Potential contribution to local immunopathology in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2009, 60:1635-46.

Appel H, **Kuhne M**, Spieckermann S, Ebhardt H, Grozdanovic Z, Köhler D, Dreimann M, Hempfing A, Rudwaleit M, Stein H, Metz-Stavenhagen P, Sieper J, Loddenkemper C. Immunohistologic analysis of zygapophyseal joints in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:2845-51.

Appel H, **Kuhne M**, Spieckermann S, Köhler D, Zacher J, Sieper J, Loddenkemper C. Immunohistochemical analysis of hip arthritis in ankylosing spondylitis: evaluation of the bone-cartilage interface and subchondral bone marrow. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:1805-13.

Appel H, Kuon W, **Kuhne M**, Hulsmeyer M, Kollnberger S, Kuhlmann S, Weiss E, Zeitz M, Wucherpfennig K, Bowness P, Sieper J. The solvent-inaccessible Cys67 residue of HLA-B27 contributes to T cell recognition of HLA-B27/peptide complexes. *J Immunol.* 2004; 173:6564-73.

Appel H, Kuon W, **Kuhne M**, Wu P, Kuhlmann S, Kollnberger S, Thiel A, Bowness P, Sieper J. Use of HLA-B27 tetramers to identify low-frequency antigen-specific T cells in Chlamydia-triggered reactive arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004; 6:R521-34.

Kuon W, **Kuhne M**, Busch DH, Atagunduz P, Seipel M, Wu P, Morawietz L, Fernahl G, Appel H, Weiss EH, Krenn V, Sieper J. Identification of novel human aggrecan T cell epitopes in HLA-B27 transgenic mice associated with spondyloarthritis. *J Immunol.* 2004; 173:4859-66.

Appel H, Neure L, **Kuhne M**, Braun J, Rudwaleit M, Sieper J. An elevated level of IL-10 and TGFbeta-secreting T cells, B cells and macrophages in the synovial membrane of patients with reactive arthritis compared to rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2004; 23:435-40.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Komponenten des adaptiven Immunsystems	1
1.2	Antigenpräsentation und Immunantwort	1
1.2.1	Zelluläre Antigenpräsentation	1
1.2.2	Struktur und Herkunft von HLA-Molekülen	3
1.2.3	Intrazelluläre Prozessierung und Präsentation von Antigenen	4
1.2.4	Aktivierung einer zytotoxischen Immunantwort	5
1.3	Die Spondyloarthritiden (SpA)	6
1.3.1	Grundlagen und Klassifikation	6
1.3.2	<i>Chlamydia</i> -getriggerte reaktive Arthritis (ReA)	7
1.3.3	Ankylosierende Spondylitis (AS)	8
1.4	Das HLA-B27-Molekül	9
1.4.1	Assoziation von HLA-B27 mit SpA	9
1.4.2	Bedeutung von HLA-B27 für die Entstehung von ReA und AS	10
1.4.3	HLA-B27 und immundominante Antigene in der Pathogenese von ReA und AS	11
1.5	Anatomie des primären Entzündungsortes bei AS	13
1.5.1	Die Knorpel-Knochen-Grenze	13
1.5.2	Extrazelluläre Knorpelmatrix	15
1.5.3	Chondrozyten	18
1.6	Fragestellung	19
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1	Material	20
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	20
2.1.2	Materialien und Geräte	23
2.1.3	Antikörper	25
2.1.4	Rekombinante humane Zytokine	27
2.1.5	HLA-B27-bindende Peptide	27
2.1.6	Patientenmaterial	28
2.1.7	Mäuse	30
2.1.8	Vektoren für die Expression von Komponenten für die Herstellung von HLA-B27-Tetrameren in <i>E. coli</i>	31
2.2	Zellbiologische Methoden	32
2.2.1	Medien und Lösungen für die Zellkultur	32
2.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	33

---

2.2.3	Zellzahlbestimmung.....	33
2.2.4	Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut und Synovialflüssigkeit .....	33
2.2.5	Murine Antigen-spezifische T-Zelllinien .....	34
2.2.6	Humane lymphoblastoide (B-)Zelllinien .....	34
2.2.7	Humane dendritische Zellen .....	35
2.2.8	Humane Antigen-spezifische T-Zelllinien .....	35
2.2.9	Alginatkultur humaner artikulärer Chondrozyten .....	36
2.2.10	Monolayerkultur humaner artikulärer Chondrozyten .....	37
2.2.11	Induktion der Expression von HLA-B27 in humanen artikulären Chondrozyten .....	38
2.2.12	Gemischte Chondrozyten/T-Zellkulturen (MCTC) .....	38
<b>2.3</b>	<b>Herstellung von HLA-B27-Tetrameren .....</b>	<b>39</b>
2.3.1	Bakterienkultur.....	39
2.3.2	Präparation von <i>Inclusion bodies</i> .....	40
2.3.3	Präparation zytoplasmatischer Proteine .....	41
2.3.4	Auffaltung und Biotinylierung von HLA-B27/Peptid-Tetrameren.....	42
2.3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	44
2.3.6	Darstellung von Proteinen in der SDS-PAGE .....	45
<b>2.4</b>	<b>Durchflusszytometrie .....</b>	<b>46</b>
2.4.1	Standardlösungen und Puffer .....	46
2.4.2	Nachweis von Antigen-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	46
2.4.3	Nachweis intrazellulärer Zytokine .....	47
<b>2.5</b>	<b>Magnetische Zellisolierung (MACS).....</b>	<b>48</b>
<b>2.6</b>	<b>Immunhistologische Methoden .....</b>	<b>49</b>
2.6.1	Standardlösungen und -puffer.....	49
2.6.2	Zytozentrifugation von Zellen.....	49
2.6.3	Herstellung von Gewebeschnitten aus dem Milzgewebe der Maus.....	49
2.6.4	Präparation und immunhistochemische Färbung von entkalktem Knochen ..	50
2.6.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbungen).....	50
2.6.6	Präparation von schockgefrorenem unentkalktem Knochen .....	50
2.6.7	Immunfluoreszenz .....	51
2.6.8	Färbung der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP) .....	52
<b>2.7</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>53</b>



<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
<b>3.1</b>	<b>Histopathologie des Knorpel/Knochen-Übergangs in Femurköpfen aus AS-Patienten mit Bezug auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen .....</b>	<b>54</b>
3.1.1	Histomorphologie.....	54
3.1.2	Subchondrale T-Zell-Infiltrate.....	56
3.1.3	Verteilung und Funktionalität von Osteoklasten und Osteoblasten .....	60
3.1.4	HLA-B27 im Knorpelgewebe von AS-Patienten .....	66
3.1.5	Induzieren Peptide aus Proteinen von <i>Chlamydia trachomatis</i> bei Patienten mit SpA HLA-B27-restringierte CD8 <sup>+</sup> T-Zellantworten? .....	69
3.1.6	Etablierung von HLA-B27-Tetrameren mit immundominantem Peptid aus dem Epstein-Barr-Virus .....	69
3.1.7	HLA-B27-Tetramere mit aus <i>Chlamydia trachomatis</i> -Proteinen abgeleiteten Peptiden .....	71
3.1.8	Frequenz <i>Chlamydia</i> -spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in Synovialflüssigkeit und peripherem Blut von Patienten mit <i>Chlamydia</i> -getriggelter ReA und AS.....	74
<b>3.2</b>	<b>Welche Knorpelantigene könnten Targets für Autoimmunprozesse bei AS-Patienten sein?.....</b>	<b>79</b>
3.2.1	Zytokinexpression muriner CD8 <sup>+</sup> T-Zellen nach <i>Priming</i> mit Peptiden aus humanem Aggrecan .....	79
3.2.2	HLA-B27-Tetramere mit Peptiden aus humanem Aggrecan .....	81
3.2.3	Frequenzen Antigen-spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in B27-transgenen Mäusen nach Immunisierung. ....	84
3.2.4	Anreicherung Antigen-spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen durch magnetische Zellsortierung mit HLA-B27/#A67-Tetrameren. ....	85
3.2.5	Mikroskopische Darstellung Antigen-spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	86
3.2.6	Etablierung der Tetramerfärbung <i>in situ</i> .....	89
3.2.7	<i>In situ</i> -Tetramerfärbung HLA-B27-restringierte CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Milz B27-transgener Mäuse .....	92
3.2.8	Zytokinexpression humaner CD8 <sup>+</sup> T-Zellen von AS-Patienten nach <i>Priming</i> mit Peptiden aus humanem Aggrecan .....	94
3.2.9	HLA-B27/Aggrecan-Peptid-spezifische CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Synovialflüssigkeit von AS-Patienten.....	96
<b>3.3</b>	<b>Interaktionen von Chondrozyten und Peptid-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen ...</b>	<b>104</b>
3.3.1	Expression von CD80 und HLA-B27 durch Chondrozyten in der <i>in vitro</i> -Kultur .....	104
3.3.2	Herstellung einer Antigen-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Linie .....	109

---

3.3.3	Etablierung der Bedingungen für die Kokultur von Chondrozyten und T-Zellen .....	110
3.3.4	HLA-B27-abhängige Aktivierung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen durch humane Chondrozyten .....	113
3.3.5	Histologische Analyse spezifischer Zell/Zell-Interaktionen zwischen aktivierten Chondrozyten und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	114
3.3.6	Induktion zytotoxischer Moleküle in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen mit Hilfe von EBNA <sub>258-266</sub> -Peptid beladenen, autologen humanen Chondrozyten.....	115
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>119</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>137</b>
	<b>Summary .....</b>	<b>139</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>141</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>157</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>160</b>

## **1 Einleitung**

### **1.1 Die Komponenten des adaptiven Immunsystems**

Das Immunsystem stellt ein hoch komplexes System des Körpers zur eigenen Gefahrenabwehr dar. Neben dem angeborenen Immunsystem, welches eine erste unspezifische Abwehr gegen Infektionserreger aufbaut, stellt das adaptive Immunsystem ein hoch anpassungs- und erinnerungsfähiges, körpereigenes Schutzsystem dar. Im Rahmen dieser Anpassung sind die Zellen des adaptiven Immunsystems (T- und B-Zellen) in der Lage, spezifische Strukturen der Angreifer zu erkennen und gezielt Abwehrmechanismen zu generieren und abzurufen. B-Zellen sind für die humorale Immunantwort verantwortlich und bilden nach Antigenkontakt spezifische Antikörper. T-Zellen erkennen spezifische Antigene, die im Komplex mit Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) auf den Oberflächen von körpereigenen Zellen präsentiert werden. Der MHC-Komplex wird beim Menschen als humanes Leukozytenantigen (HLA)-System bezeichnet. Nach Antigenerkennung setzen die T-Zellen Botenstoffe, Zytokine, und/oder zytolytische Mediatoren frei. Nach der Infektion bleiben die spezifischen Antikörper und die sogenannten Gedächtniszellen erhalten, um zukünftig den gleichen Angreifer mit kürzerer Reaktionszeit effektiver unschädlich zu machen. Damit das adaptive Immunsystem vom Angreifer überhaupt Kenntnis erlangt, bedient es sich der Antigenpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen (APC).

### **1.2 Antigenpräsentation und Immunantwort**

#### **1.2.1 Zelluläre Antigenpräsentation**

Die APC vermitteln durch den intrazellulären Abbau komplexer antigenen Strukturen die Erkennung von eingedrungenen Erregern oder veränderten Körperzellen und leiten so deren wirkungsvolle Beseitigung durch eine spezifische zelluläre Immunantwort ein.

Professionelle APC sind hämatopoetischen Ursprungs, exprimieren die HLA der Klassen-I (HLA-I) und -II (HLA-II) und sind in der Lage, kostimulatorische Signale zu generieren, um naive T-Zellen und Gedächtniszellen zu aktivieren. Naive T-Zellen hatten noch keinen Kontakt mit dem Antigen und zirkulieren in Blut und Lymphe. Die Migration naiver T-Zellen wird durch die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren bestimmt. Nach erfolgreicher Stimulation durch spezifische Antigene im Kontext mit HLA und kostimulatorischen Molekülen auf APC, beginnen die naiven T-Zellen zu proliferieren und sich in Effektorzellen zu differenzieren. Durch die Veränderung der Expression der Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren erlangen die Effektorzellen die Fähigkeit, auch in nicht-lymphatische Organe, z.B. an den Ort einer Entzündung zu gelangen. Zu den

professionellen APC des Immunsystems zählen dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Zellen.

Unter bestimmten Voraussetzungen, z. B. beim Vorhandensein eines inflammatorischen Milieus, können auch Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprunges die Funktion der Antigenpräsentation übernehmen und eine Immunantwort in Abwesenheit professioneller APC auslösen. Die Fähigkeit zur T-Zellstimulation ist dabei ausschließlich auf die spezifische Reaktivierung von Gedächtnis-T-Zellen beschränkt. Nicht-professionelle APC können keine primären Antworten in naiven T-Zellen auslösen, was für vaskuläre Endothelzellen gezeigt wurde (1-3). Die Fähigkeit zur nicht-professionellen Antigenpräsentation konnte beim Menschen z. B. bereits für Keratinozyten in der Haut (4, 5), Microglia im Gehirn (6) und Endothelzellen verschiedener Lokalisationen (1, 2, 7-10) nachgewiesen werden.

Auf der Oberfläche der professionellen APC befinden sich kostimulatorische Moleküle wie CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2), die mit ihren Liganden CD28 oder *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4) auf den T-Zellen in Kontakt treten. Die Bindung von CD80/CD86 an CD28 induziert zusammen mit dem Komplex aus T-Zellrezeptor (TCR), HLA-Molekül und spezifischem Peptid eine Aktivierung dieser Zellen (11-13). Die Bindung von CD80/CD86 an CTLA-4 löst inhibitorische Signale aus und die T-Zell-Aktivierung wird verhindert (14). Die kostimulatorischen Signale sind für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen gleich. CD80 und CD86 sind Mitglieder der Immunglobulin-Supergen-Familie. Beide Moleküle können eine Aktivierung von naiven und Gedächtnis-T-Zellen (15) auslösen. Sowohl CD80 als auch CD86 für sich allein sind in der Lage, das kostimulatorische Signal bereitzustellen (16). Die Expression, Steuerung und Kinetik der Induktion von CD80 und CD86 unterscheiden sich innerhalb der professionellen APC (16, 17), sowie auch bei nicht-professionellen APC. Beispielsweise exprimieren Microglia konstitutiv CD86, während CD80 erst durch IFN $\gamma$  oder Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) induziert werden kann (18). Keratinozyten hingegen exprimieren CD80 (19).

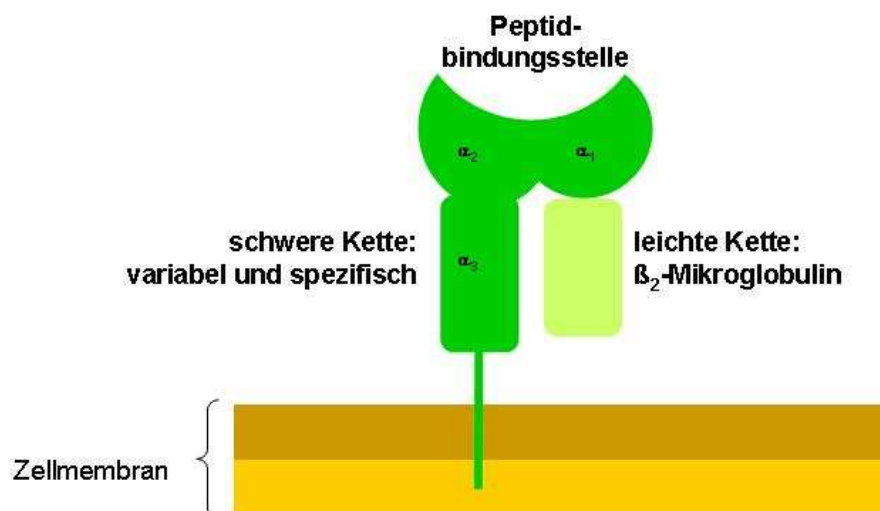
Während früher angenommen wurde, dass sich die Liganden für CD28 nur auf Zellen mit hämatopoetischem Ursprung befinden (20, 21) und Gewebszellen keine Kostimulatoren besitzen (22), konnten spätere Untersuchungen zeigen, dass sich auch die oben genannten nicht-professionellen APC durch die Expression von CD80/CD86 auszeichnen, wie Keratinozyten (19, 23, 24) oder Mikroglia (18, 25, 26).

### 1.2.2 Struktur und Herkunft von HLA-Molekülen

Der gesamte HLA-Komplex umfasst eine Reihe von Genen, deren Produkte bei der Prozessierung und Präsentation exogener und endogener Antigene eine wichtige Rolle spielen. Ein funktionsbestimmendes Merkmal der HLA-Gene ist ihr ausgeprägter Polymorphismus, der die Variabilität und Flexibilität der HLA-Moleküle ermöglicht, die für die Vielzahl unterschiedlicher spezifischer Kombinationen Bedingung sind. Nur bestimmte HLA-Allele binden und präsentieren spezifische Antigene, die von Krankheitserregern und Parasiten stammen, und signalisieren damit den T-Zellen deren Anwesenheit. Auf der Basis dieses Erkennungsmechanismus wird die Immunabwehr gestartet. Die meisten HLA-Allele unterscheiden sich voneinander durch mehrfache Aminosäuresubstitutionen. Diese Unterschiede kommen gehäuft an der Peptid-bindenden Tasche und in benachbarten Regionen vor, die einen direkten Kontakt mit dem TCR eingehen.

HLA-Antigene haben wesentliche Bedeutung in der Antigenpräsentation, Ausreifung und Aktivierung von T-Zellen und damit in der Regulation von Immunreaktionen. Es gibt zwei funktionell unterschiedliche Klassen von HLA-Molekülen: HLA-I und HLA-II-Moleküle.

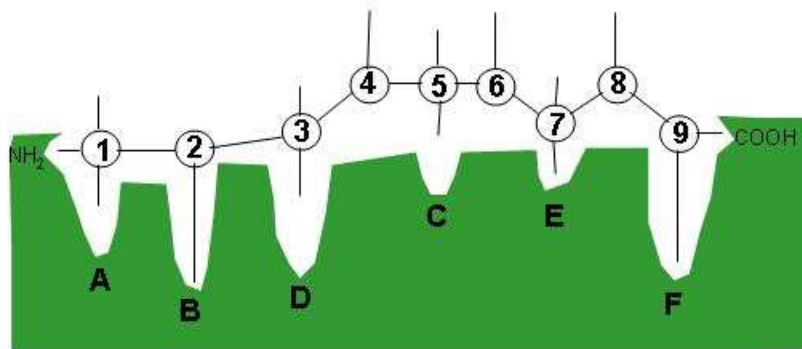
HLA-I-Moleküle binden selektiv Antigene, die aus der intrazellulären Prozessierung von viralen und endogenen bakteriellen Proteinen hervorgehen. Diese HLA-I-gebundenen Antigene werden auf der Oberfläche der APC präsentiert und vom TCR auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt (27, 28). HLA-I-Moleküle (HLA-A, -B, -C) kommen in unterschiedlicher Quantität auf der Oberfläche nahezu aller kernhaltigen Zellen vor. HLA-I-Moleküle sind heterodimere Transmembran-Glycoproteine und bestehen aus einer schweren Proteinkette mit drei Domänen ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ) und einer leichten Kette, dem angelagerten  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2$ M), das zur Stabilisierung der HLA-I-Moleküle dient (Abb. 1).



**Abb. 1: Schematische Struktur eines HLA-Klasse-I-Moleküls.** Das HLA-I-Molekül ist ein Heterodimer einer  $\alpha$ -Kette mit drei Domänen ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ), die sich durch die Membran

erstreckt und nicht-kovalent mit dem  $\beta_2M$  assoziiert. Die Faltung der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domänen erzeugt einen langen Spalt, in dem die Peptidantigene binden.

Die HLA-I-Moleküle besitzen eine definierte Peptidbindungsstelle, die von der  $\alpha_1$ - und der  $\alpha_2$ -Domäne gebildet wird, den Strukturen mit der größten polymorphen Variation (Abb. 2) (29, 30) aufweisen. Die Peptidbindungsstelle von HLA-I-Molekülen besteht aus 6 sog. Taschen (A-F), die sich in Form, Tiefe und biochemischer Zusammensetzung unterscheiden und damit den unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften der zu bindenden Peptide Platz bieten (Abb. 2) (30-32). Peptide, die an HLA-I-Moleküle binden, sind gewöhnlich 8 - 10 Aminosäuren lang.



**Abb. 2: Schematische Darstellung eines Nonamerpeptides (P1 - P9) in der Peptidbindungsstelle eines HLA-I-Moleküls.** Die Taschen A und F sind an den Enden der Peptidbindungsstelle lokalisiert und gehen Bindungen über Sauerstoffbrücken mit der Aminogruppe ( $\text{NH}_2$ ) und der Carboxylgruppe ( $\text{COOH}$ ) des Peptides ein. Die Taschen B - E enthalten viele polymorphe Peptidseitenketten, die als zusätzliche Verankerung dienen (Ankerposition) und damit beeinflussen, welches Peptid an das HLA-I-Molekül binden kann. Sowohl in der Position, als auch in der Aminosäure selbst, können sich die Ankerpositionen je nach der bestimmten HLA-I-Variante unterscheiden. (nach 33)

HLA-II-Moleküle binden Peptide, die von in zellulären Vesikeln abgebauten exogenen Proteinen stammen und präsentieren diese den  $\text{CD4}^+$  T-Zellen. Sie werden hauptsächlich von professionellen APC konstitutiv exprimiert, aber auch von aktivierten T-Zellen, Endothel- oder Epithelzellen (34). HLA-II-Moleküle bestehen aus zwei nicht-kovalent assoziierten, membranverankerten Polypeptidketten, einer schweren  $\alpha$ -Kette und einer schweren  $\beta$ -Kette.

### 1.2.3 Intrazelluläre Prozessierung und Präsentation von Antigenen

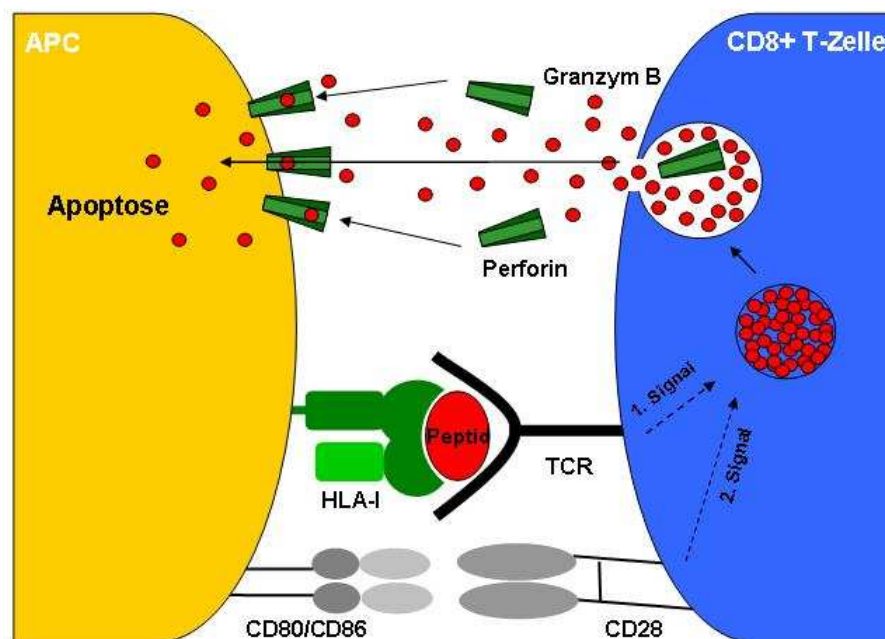
Zur funktionellen Integrität des Immunsystems ist die kontrollierte proteolytische Bearbeitung (Prozessierung) von Peptidantigenen und deren anschließende Präsentation auf HLA-Molekülen von grundsätzlicher Bedeutung.

Peptide, die durch HLA-I-Moleküle präsentiert werden, stammen von zytosolischen Proteinen (35). Viren und Bakterien, die ins Zytosol gelangen, werden dort durch Proteasomen prozessiert (36-38) und gelangen über Peptid-Transportproteine ins endoplasmatische Retikulum. Dort binden die Peptide mit 8 - 10 Aminosäureresten an HLA-I-Moleküle und der resultierende Komplex wird über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. HLA-I-Peptidkomplexe binden an spezifische TCR auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen und vermitteln so eine HLA-I-restringierte Immunreaktion.

Es gibt eine Reihe von Erkrankungen, die mit bestimmten Allelen des HLA-Systems assoziiert sind. Für MHC-II sollen exemplarisch Rheumatoide Arthritis (HLA-DR4), Zöliakie (HLA-DQ2, 8), Typ-I-Diabetes (HLA-DR4) oder die Schlafkrankheit (Narkolepsie, HLA-DQ6) erwähnt werden. Eine der stärksten Assoziationen zwischen einem HLA-I-Molekül, dem HLA-B27, und einem Krankheitsbild liegt bei der Ankylosierenden Spondylitis (AS) vor.

#### 1.2.4 Aktivierung einer zytotoxischen Immunantwort

Die Aktivierung von T-Zellen zur Zytokinproduktion und Proliferation benötigt mindestens zwei verschiedene Signale (39, 40). Das Antigen-spezifische Signal wird bereitgestellt, wenn der TCR mit einem HLA/Peptid-Komplex interagiert. Das kostimulatorische Signal umfasst die Interaktion von CD28 auf der T-Zelle mit CD80 oder CD86 auf den APC (Abb. 3).



**Abb 3: Spezifische Aktivierung und zytotoxische T-Zellantwort von CD8<sup>+</sup> T-Zellen.** CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen Fremdpeptide, wenn sie über HLA-I-Moleküle auf der Oberfläche von APC präsentiert werden. CD8<sup>+</sup> T-Zellen töten ihre Zielzellen, indem sie zytotoxische

Proteine freisetzen. Perforin permeabilisiert die Zellmembran der Zielzelle, so dass Granzym B in die Zielzelle gelangt und dort den programmierten Zelltod auslöst.

Die zytotoxische Aktivität, Apoptose, der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird durch die Freisetzung zytolytischer Mediatoren aus lysosomalen Granula, die Serinproteasen, u. a. Granzym B, und das porenformende Protein Perforin enthalten, vermittelt (41). Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen selbst zeigen eine gewisse Resistenz gegen die lytischen Effekte der zytotoxischen Mediatoren (42). Nach dem Antigen-spezifischen Kontakt schütten die CD8<sup>+</sup> T-Zellen nur so viel Mediatoren aus, dass es ausreicht die Zielzelle zu zerstören, aber die CD8<sup>+</sup> T-Zellen selbst unbeschädigt bleiben.

Nach der Erkennung des spezifischen Antigens polarisieren die CD8<sup>+</sup> T-Zellen, d. h., die zytotoxischen Granula werden auf der Seite der Zelle konzentriert, auf der der Antigenkontakt stattgefunden hat. Danach werden die Granula durch lokale Exocytose in den interzellulären Raum zwischen CD8<sup>+</sup> T-Zelle und Zielzelle freigesetzt. Perforin und Granzym B induzieren in der Zielzelle Apoptose (43-45). Granzym B kann außerdem Komponenten der extrazellulären Knorpelmatrix zu spalten (46, 47). Es führt beispielsweise zur Proteolyse des *Link*-Proteins und des Aggrecan-Proteinrückgrates in viele kleine Fragmente. Diese können aus der extrazellulären Matrix freigesetzt werden (46). Die Abbauprodukte zirkulieren im Blut und stehen der Antigenprozessierung zur Verfügung. Durch den Abbau der extrazellulären Knorpelmatrix ist Granzym B vermutlich an der Zerstörung des Gelenkknorpels bei rheumatoider Arthritis mit beteiligt (48).

### **1.3 Die Spondyloarthritiden (SpA)**

#### **1.3.1 Grundlagen und Klassifikation**

Die Spondyloarthritiden (SpA) sind eine heterogene Gruppe chronisch entzündlicher Gelenkerkrankungen mit einer Prävalenz von 0,5 % in Europa (49). Die klinischen Bilder der unterschiedlichen Erkrankungen sind sehr heterogen, zeigen aber immer wieder überlappende Symptome und Manifestationen. Diesen Erkrankungen gemeinsam sind akute und chronische Entzündungszustände in Sehnenansätzen und Gelenken der Wirbelsäule, daraus folgend entzündlicher Rückenschmerz, und/oder eine asymmetrische Arthritis im Bereich der unteren Extremitäten. Zudem besteht bei den SpA eine erhöhte Assoziation mit dem HLA-I-Molekül HLA-B27, die jedoch in den verschiedenen SpA-Untergruppen unterschiedlich stark ausfällt (Tab. 1).

Zu den SpA zählen die AS, die reaktive Arthritis (ReA) nach einer vorausgegangenen bakteriellen Infektion des Magen-Darm-Traktes oder der ableitenden Harnwege, die Psoriasis-Arthritis, Gelenkentzündungen, die im Zusammenhang mit chronisch-



entzündlichen Darmerkrankungen auftreten sowie auch undifferenzierte SpA. Die AS und undifferenzierte SpA sind die am häufigsten vorkommenden Subtypen dieser Erkrankungsgruppe (50, 51). Die SpA-Untergruppen sind nicht scharf voneinander abgrenzbar. So kann eine ReA zu einer AS münden, vor allem, wenn der Patient positiv für HLA-B27 ist (52) (Tab. 1).

**Tab. 1: Häufigkeit von HLA-B27 bei SpA (aus 53)**

<b>Entität</b>	<b>Anteil HLA-B27 positiver Personen</b>
AS	85 – 95 %
ReA	30 – 70 %
Undifferenzierte SpA	50 – 80 %
Darmerkrankungen-assoziierte Arthritis	15 – 25 % <sup>1</sup>
Psoriasis-Arthritis	10 – 15 %
Normalbevölkerung	6 – 9 %

<sup>1</sup> bei axialer Beteiligung bis 50 % Assoziation mit HLA-B27

In der vorliegenden Arbeit sollen mit Hilfe von Untersuchungsmaterial aus AS- und ReA-Patienten Mechanismen untersucht werden, wie und auf welchen Ebenen eine HLA-B27-vermittelte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort zum Krankheitsgeschehen unmittelbar in den Gelenken beiträgt. Dabei könnte der Identifizierung von Epitopen peripherer und vor allem synovialer T-Zellen große Bedeutung für die Aufklärung der Pathogenese der ReA und der AS zufallen. Auf beide Krankheitsbilder soll daher kurz eingegangen werden.

### **1.3.2 Chlamydia-getriggerte reaktive Arthritis (ReA)**

Die ReA tritt meist wenige Tage bis Wochen nach einer auslösenden Infektion des Magen-Darm-Traktes oder der Harn- und Geschlechtsorgane auf (54). Diese Infektionen können allerdings sehr leicht verlaufen und nicht immer werden sie bemerkt. Der häufigste Erreger, der eine ReA induzieren kann ist in Deutschland *Chlamydia trachomatis*. Im Vordergrund dieser Erkrankung selbst stehen Mon- oder Oligoarthritis im Bereich der unteren Extremitäten. Das Vorhandensein des genetischen Merkmals HLA-B27 stellt dabei ein Risiko für einen schweren und chronischen Verlauf dar. Bei 30 – 70 % der Patienten mit *Chlamydien*-getriggelter ReA liegt eine Assoziation mit HLA-B27 vor (55, 56). Die Mehrzahl

der ReA-Patienten ist jünger als 40 Jahre. Männer und Frauen sind etwa gleich häufig betroffen.

Die genauen Mechanismen, die zu einer ReA führen, sind noch unklar. Bei Patienten mit ReA konnten in der Synovialflüssigkeit oder -membran bakterielle Bestandteile aus *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* und *Shigella* oder aber auch intakte Bakterien wie *Chlamydia trachomatis* nachgewiesen werden (57-60). In HLA-B27-transgenen Mäusen konnten 12 Peptide, abgeleitet aus Proteinen von *Chlamydia trachomatis*, als immunogen identifiziert werden (61, 62).

Daher stellte sich die Frage, ob diese Peptide auch immunogen für periphere und/oder synoviale CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit *Chlamydien*-induzierter ReA sind. Da 20 – 40 % der HLA-B27<sup>+</sup> Patienten mit ReA in das Vollbild einer AS übergehen können (52), wurde die Suche nach *Chlamydien*-Antigenen hier fortgesetzt.

### 1.3.3 Ankylosierende Spondylitis (AS)

Die AS, im deutschen Sprachraum auch als *Morbus Bechterew* bezeichnet, ist die häufigste Form der SpA und zeichnet sich durch entzündliche Veränderungen aus, die vor allem das Achsenskelett betreffen. In frühen Krankheitsphasen sind hauptsächlich die Kreuz-Dambein-Gelenke (Sacroiliakalgelenke) betroffen, wobei Sehnenansätze und Gelenke entzündlich verändert sind. Erosive Veränderungen in den Sacroiliakalgelenken werden möglicherweise durch Faserknorpel ersetzt (63) und verknöchern sukzessive, wodurch das Gelenk versteift. In der Wirbelsäule kommt es bei einem Teil der Patienten durch diesen Prozess zur Bildung von Knochenspangen, den Syndesmophyten, die benachbarte Wirbel überbrücken. Dies führt im Endstadium der Erkrankung zur vollständigen, häufig bambusartigen Versteifung der Wirbelsäule und der damit einhergehenden, charakteristischen gebeugten Körperhaltung der Patienten.

Periphere Gelenke können ebenfalls in das Krankheitsgeschehen involviert sein (25 – 35 % der Patienten), wobei häufig eine Arthritis in den Hüft-, Knie- und Sprunggelenken auftritt und/oder eine Entzündung der Sehnenansätze (Enthesitis). Zu den Begleiterscheinungen zählen weiterhin Entzündungen der mittleren Augenhaut (Uveitis, 20 – 40 % der Patienten) und im Spätstadium können auch innere Organe wie Lunge, Herz, Niere und Nervensystem betroffen sein. Die Krankheit beginnt meist zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr. Sie verläuft individuell unterschiedlich und in Schüben. Bei Frauen verläuft die AS häufig milder, eine Versteifung der Wirbelsäule tritt hier seltener auf. Männer sind im Verhältnis 2:1 häufiger betroffen als Frauen (64). 85 – 95 % aller AS-Patienten sind HLA-B27<sup>+</sup> (65-67). Durch die Mannigfaltigkeit ihrer Ausprägungen, Verläufe und Manifestationsorgane ist die

Diagnose einer AS oft schwer zu stellen. An AS sind etwa 0,1 - 0,9 % der allgemeinen Bevölkerung erkrankt (49).

## **1.4 Das HLA-B27-Molekül**

### **1.4.1 Assoziation von HLA-B27 mit SpA**

Das HLA-I-Molekül HLA-B27 wurde bei ca. 90 % der AS-Patienten nachgewiesen. Die Aufgabe von HLA-B27, wie aller anderen HLA-Moleküle besteht darin, HLA-I-restringierte Antigene gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu präsentieren (56, 68). Das könnte auf eine besondere Rolle von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der Pathogenese der SpA hindeuten. Obwohl die hohe Assoziation mit HLA-B27 seit über 25 Jahren bekannt ist, ist die genaue Rolle dieses Moleküls in der Pathophysiologie der SpA bisher unklar (69, 70).

Die Krankheitshäufigkeit von AS spiegelt sich in der Verteilung von HLA-B27 wider. Epidemiologische Studien zeigen, dass Populationen mit einer höheren Frequenz von HLA-B27 auch eine höhere Prävalenz für AS und andere SpA haben (71). In Deutschland sind 9 % aller Menschen positiv für HLA-B27, in Berlin 9,3 %, während die Prävalenz für AS 0,86 % beträgt (49). Die Häufigkeit von HLA-B27 steigt auf bis zu 25 – 50 %, je weiter man sich dem Nordpol nähert, ebenso die Prävalenz der AS auf bis zu 2,5 % (72). HLA-B27 findet man nicht in genetisch isolierten Bevölkerungsgruppen von Ureinwohnern in Südamerika, in Australien sowie in Afrika (73). Das Auftreten einer AS ist dort relativ selten.

Bis heute wurden 38 verschiedene allele Subtypen der HLA-B27-Moleküls (B\*2701-B\*2738) identifiziert (74), die sich in einzelnen Aminosäureaustauschen des Peptid-bindenden Bereiches voneinander unterscheiden. Die Frequenz der Subtypen ist weltweit sehr variabel. 90 % aller HLA-B27<sup>+</sup> Europäer tragen den Subtyp B\*2705, der wie auch B\*2702 und B\*2704 eindeutig mit der SpA assoziiert ist (75, 76). Andere Subtypen wie B\*2706 in Südost-Asien und B\*2709 auf Sardinien stehen nicht mit AS in Verbindung (77). Die Gründe für die unterschiedliche Krankheitsassoziation sind nicht bekannt. Der Subtyp B\*2705 unterscheidet sich beispielsweise von B\*2709 nur durch Austausch vom Asparaginsäurerest zum Histidinrest an Position 116 in der F-Tasche und beeinflusst die Peptidspezifität und T-Zellerkennung (78). Insgesamt ist das Risiko, eine AS zu entwickeln, bei HLA-B27<sup>+</sup> Individuen um das 10-fache erhöht, im Vergleich zu Individuen mit einem anderen HLA-B-Komplex.

#### 1.4.2 Bedeutung von HLA-B27 für die Entstehung von ReA und AS

Die Assoziation von AS und ReA mit HLA-B27 ist eine der stärksten zwischen der Expression eines MHC-Genes und einer Erkrankung (65). Diese starke Assoziation hat zu der Annahme geführt, dass das Molekül selbst bei der Pathogenese dieser Erkrankungen eine Rolle spielt. Dies würde bedeuten, dass spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch bakterielle und/oder körpereigene Peptide, die von HLA-B27-Molekülen präsentiert werden, aktiviert werden und damit an systemischen und lokalen Immunreaktionen beteiligt sind.

Die Basis dieser Assoziation bleibt bislang ungeklärt. Vier verschiedene Hypothesen haben sich im Verlauf der letzten Jahre herausgebildet, um die mögliche pathogenetische Rolle des HLA-B27-Moleküls zu beschreiben.

**(A): Arthritogene Peptide** (56, 79). Bei diesem Modell stehen die Peptide im Vordergrund. Antigene Peptide werden selektiv von HLA-B27 präsentiert, aufgrund der sehr spezifischen Peptid-Bindungseigenschaften der verschiedenen HLA-B27-Subtypen. Diese Peptide aktivieren im Kontext mit HLA-B27 naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Durch molekulares *Mimikry* kommt es nach Auslösung der Immunantwort durch ein bakterielles oder virales Antigen zur Kreuzreaktion mit einem strukturell ähnlichen „Selbst-Antigen“ (80, 81). „Arthritogene Peptide“ könnten beispielsweise exogene Antigene sein, die aufgrund ihrer potentiellen Kreuzaktivität z. B. mit gelenkspezifischen Knorpelantigenen Gedächtnis-T-Zellen stimulieren, die in einem entzündlichen Milieu zur lokalen Immunantwort führen.

**(B): Misfolding** (82-84). HLA-B27-Moleküle werden häufig fehlgefaltet und Proteinaggregate von schweren Ketten entstehen durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den sehr reaktionsfreudigen Sulfhydrylgruppen. Als Folge kommt es zu einer Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum und Auslösung einer Stressreaktion der betroffenen Zellen („*endoplasmatic reticulum overload*“). Die fehlgefalteten HLA-B27-Moleküle können keine Peptide binden und folglich auch keine Antigene präsentieren. Stattdessen werden intrazelluläre Signalwege beeinflusst und proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet.

**(C): Oberflächen-Homodimere** (85-87). Bei der Fehlfaltung der schweren Ketten von HLA-B27 im endoplasmatischen Retikulum können Homodimere aus zwei schweren Ketten von HLA-B27 gebildet werden, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Sie sind nicht mit  $\beta_2M$  und einem Peptid assoziiert. HLA-B27-Homodimere werden auf der Zelloberfläche exprimiert. Bindungspartner der HLA-B27 Homodimere auf der Oberfläche sind die so genannten *paired Immunglobulin-like-Rezeptors* aus der Immunglobulin-Superfamilie. Solch eine Interaktion würde eine Antigen-unabhängige Immunantwort induzieren (88). Eine andere Möglichkeit wäre, dass die HLA-B27-Homodimere fälschlicherweise von CD4<sup>+</sup>

T-Zellen erkannt werden, da ihre Konformation der von MHC-II-Molekülen vergleichbar ist (89).

**(D): Ausfällung von  $\beta_2M$**  (90). Diese Hypothese geht davon aus, dass HLA-B27 Heterodimere auf der Zelloberfläche aufgespalten werden und freigesetztes  $\beta_2M$  in der Synovialmembran den Anstoß zum inflammatorischen Prozess der AS geben kann. Die AS-assoziierten HLA-B27-Subtypen haben eine größere  $\beta_2M$ -Dissoziationsrate als die nicht-AS-assoziierten wie B\*2706 oder B\*2709.

Keine der oben beschriebenen Theorien ist allein zur Erklärung der Assoziation zwischen HLA-B27 und AS bzw. ReA ausreichend und erklärt nicht alle Krankheitserscheinungen, und auch nicht, dass nicht alle HLA-B27<sup>+</sup> Individuen eine Erkrankung entwickeln. Andere prädisponierende Faktoren müssen eine Rolle spielen, deren Einfluss bei der Krankheitsentstehung von AS im Vergleich zu HLA-B27 jedoch weniger bedeutend ist. Mehrere Arbeiten deuten darauf hin, dass eine Assoziation vom Interleukin (IL)-1 Gen und AS besteht (91, 92). Zwei Genvarianten wurden mit dem Krankheitsbild in Verbindung gebracht. (93, 94). IL-1 ist auf dem Chromosom 2 lokalisiert und zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen. IL-1 hat die Fähigkeit, an Chondrozyten zu binden und bewirkt in den Chondrozyten die Freisetzung knorpelzerstörender Enzyme, die zum Abbau von Knorpelsubstanz und letztendlich zur Zerstörung der Gelenke führen.

Viel diskutiert wird im Moment ein weiteres Nicht-HLA Gen, das die Expression des IL-23-Rezeptor auf T<sub>H</sub>17-Zellen kodiert (95). T<sub>H</sub>17-Zellen sind eine Untergruppe der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (96). Die Expression des IL-23-Rezeptors ist ein bedeutender Schritt in der Differenzierung der T<sub>H</sub>17-Zellen, der Antigen-unabhängigen Proliferation von T<sub>H</sub>17-Gedächtniszellen und der Induktion proinflammatorischer Zytokine (97). Der IL-23-Rezeptor wird mit verschiedenen Autoimmunkrankheiten und der AS (95) in Verbindung gebracht. T<sub>H</sub>17-Zellen produzieren das proinflammatorische Zytokin IL-17. Die IL-17-Expression ist mit einigen entzündlichen Erkrankungen, wie rheumatoider Arthritis (98), assoziiert (97). Die kontinuierliche IL-17 Expression in Kniegelenken von Mäusen verursacht eine starke Einwanderung entzündlicher Zellinfiltrate und eine massive Schädigung des Gelenkknorpels (99). Dieser Mechanismus steht mit einer MHC-vermittelten Antigenpräsentation nicht im Zusammenhang.

### 1.4.3 HLA-B27 und immundominante Antigene in der Pathogenese von ReA und AS

Potentiell arthritogene Peptide, entweder von Bakterien und/oder gelenkspezifischen autologen Antigenen, können HLA-B27-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren, was im

Rahmen einer Gelenkentzündung zur Zerstörung der Knorpelstrukturen im Gelenk beitragen könnte (100).

Wie bereits erwähnt, sind bakterielle Erreger wie *Chlamydia trachomatis*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium* und andere Auslöser der ReA. Diese Bakterien sind entweder obligat (*Chlamydia*) oder fakultativ intrazellulär (*Yersinia*, *Salmonella*). Gemeinsam ist diesen bakteriellen Erregern, dass sie durch Endozytose in die Wirtszellen aufgenommen werden und dort in Vakuolen leben. Antigene daraus sollen normalerweise über den HLA-II präsentiert werden. *Chlamydia trachomatis* stellt aufgrund seiner physiologischen Besonderheiten einen Grenzfall dar. Es existiert in zwei Organisationsformen: den extrazellulären Elementarkörperchen und den Retikularkörperchen, in denen sich die Bakterien intrazellulär vermehren, womit sie einer Präsentation über HLA-I-Moleküle zugänglich werden.

Es gibt Hinweise darauf, dass bakterielle Infektionen oder zumindest der Kontakt des Immunsystems mit bakteriellen Bestandteilen auch bei der AS eine Rolle spielen können. Dafür spricht, dass 20 – 40 % der Patienten mit ReA im chronischen Verlauf eine AS entwickeln (52). Ein weiterer Anhaltspunkt dafür könnte sein, dass in Ländern mit schlechten Hygienestandards bei gehäuft auftretenden bakteriellen Infektionen die SpA deutlich schwerer verläuft (101) und zum Beispiel in Mexiko (102) und China (103) deutlich früher und stärker auftritt als zum Beispiel in Mitteleuropa.

Aufgrund dieser Zusammenhänge stellte sich die Frage, ob Peptide, abgeleitet aus Proteinen beispielsweise von *Chlamydia trachomatis* (61, 62), eine HLA-B27-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort bei Patienten mit ReA und AS induzieren.

Ein charakteristisches Merkmal der AS ist die Entzündung der Gelenke, häufig im Bereich des Sehnen-Knochen-Ansatzes und anderer Knorpelstrukturen (104). Das Proteoglycan Aggrecan ist ein wichtiger Bestandteil dieser Region. Verschiedene Autoren stellen die Theorie auf, dass Proteine aus dem Aggrecan-Proteinrückgrat primäres Ziel einer Immunantwort in SpA sein könnten (100, 104-106). Eine T-Zellantwort gegen Aggrecan konnte bei verschiedenen rheumatischen Erkrankungen, unter anderem AS, rheumatoide Arthritis und Psoriasis Arthritis, gezeigt werden (107, 108). Bislang gab es jedoch weder Daten aus Mausmodellen, noch aus Untersuchungen mit Patientenmaterial die Antwort darauf geben, welche Rolle HLA-B27-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen als Antwort auf Aggrecan als Autoantigen spielen können.

Ebenso sind Kollagene wichtige Bestandteile des Knorpels. In einer früheren Studie konnte bei einem Patienten mit ReA eine HLA-B27-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort gegen Peptide aus dem Kollagen Typ II nachgewiesen werden (109). Daher wurden im weiteren Verlauf

dieser Arbeit neben dem Aggrecan auch weitere Knorpelbestandteile (siehe auch Tab. 2) in Hinsicht auf ihre HLA-B27-Bindungskapazitäten und Fähigkeit zur Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht.

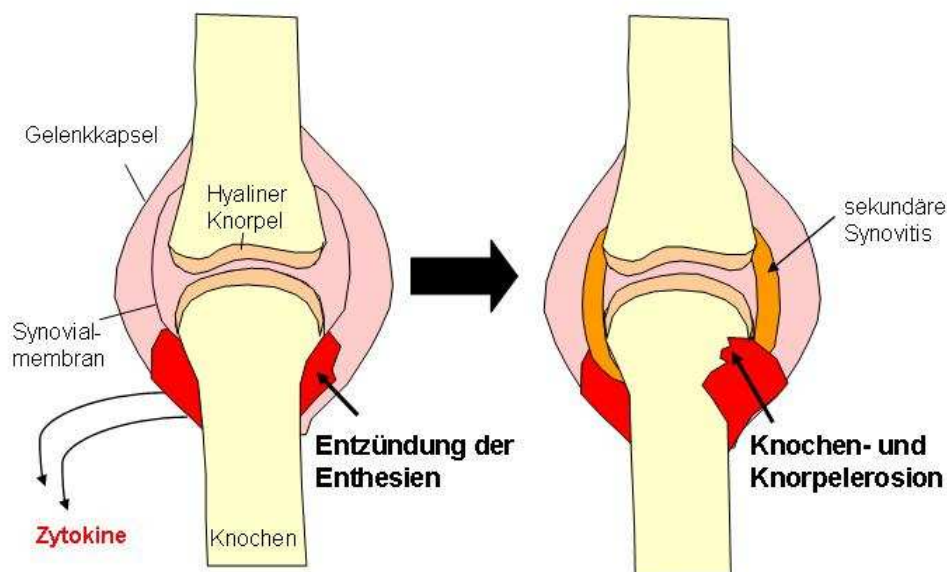
## 1.5 Anatomie des primären Entzündungsortes bei AS

### 1.5.1 Die Knorpel-Knochen-Grenze

Magnetresonanztomographische und immunhistologische Untersuchungen geben zu der Vermutung Anlass, dass der primäre Entzündungsort bei der AS an der Knorpel-Knochen-Grenze liegt, genauer im Bereich von hyalinem Gelenkknorpel und den Enthesien, der Verbindungsstelle zwischen Sehnen/Bändern und dem Knochen (100, 104, 106). Histopathologische Untersuchungen von Enthesien zeigen infiltrierende CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie Makrophagen im subchondralen Knochenmark (110, 111).

Trotz einiger Einzelfallberichte gibt es bislang keine systematischen Untersuchungen zur Histopathologie des Oberschenkelkopfes bei AS-Coxitis, obwohl etwa 5 % der AS-Patienten eine schwere Coxitis erleiden, die nicht selten schon im jungen Alter zu einer Hüftgelenksersatzoperation führt.

Bei der Gelenkentzündung kommt es unter anderem zur Zerstörung verschiedener Knorpelstrukturen (100). Hier freigesetzte extrazelluläre Matrixbestandteile könnten bei der AS als Antigene aus dem Knorpel das primäre Ziel einer Immunantwort sein (100, 112). Daher soll an dieser Stelle der Aufbau der verschiedenen Knorpelstrukturen, des Gelenkknorpels und des Faserknorpels, näher erläutert werden (Abb. 4).

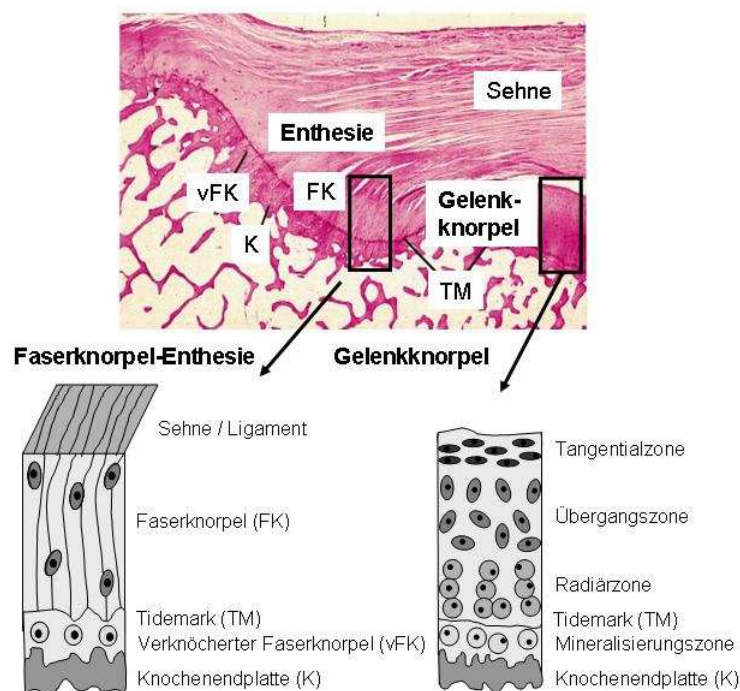


**Abb. 4: Schematische Darstellung eines Mechanismus der Knorpelzerstörung in SpA.**  
Die Entzündung der Enthesien am Übergang zwischen Knorpel und Knochen ist der

primäre Entzündungsort bei AS. Im Verlauf der Erkrankung wird Knorpel- und Knochengewebe zerstört. Durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine kommt es sekundär zu einer Entzündung der Synovialmembran (Synovitis). Modifiziert nach (104).

Der Knorpel ist ein festes druckelastisches Stützgewebe, das frei von Blut- und Lymphgefäßen ist. Er besteht aus den Knorpelzellen, den Chondrozyten, die in der Knorpelmatrix, die von ihnen selbst synthetisiert wird, eingebettet sind. Der Knorpel ist ein relativ zellarmes Gewebe. Die Anzahl, Lage und Dichte der Chondrozyten ist für jede Knorpelart spezifisch.

Im Bereich der Epiphysen der langen Knochen und kurzen Knochen der Hände und Füße findet man Enthesien aus Faserknorpel vor (105). Ein besonderes Merkmal des Faserknorpels ist die Zugfestigkeit und deshalb findet sich dieser Knorpeltyp vor allem an den Ansätzen von Sehnen und Bändern. Das dichte faserige Gewebe der Sehnen geht in Faserknorpel über. Dieser ist durch die Tidemark vom verkalkten Faserknorpel getrennt, dem der subchondrale Knochen folgt. Der Faserknorpel zeichnet sich durch dichte unregelmäßige Kollagenfaserbündel aus, zwischen denen die einzelnen Chondrozyten in längs verlaufenden Reihen liegen (Abb. 5).



**Abb. 5: Struktur einer Faserknorpel-Enthese und Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels.** Dargestellt sind die Zonen der Faserknorpel-Enthese am Ansatz der *Supraspinatus*-Sehne am Oberarmknochen in HE-Färbung (Originalvergrößerung x8, nach 113). Links: der Faserknorpel (FK) besteht aus parallelen Reihen von Kollagenfaserbündeln und wird vom verkalkten Faserknorpel (vFK) durch die *Tidemark* (TM) getrennt. Diese ist mit der TM im Gelenkknorpel vergleichbar. Auf die Zone des vFK folgt die Knochenendplatte (K). Rechts: Schematischer Aufbau der Zonen des hyalinen Gelenkknorpels. In der Tangentialzone sind die Chondrozyten spindelförmig und parallel

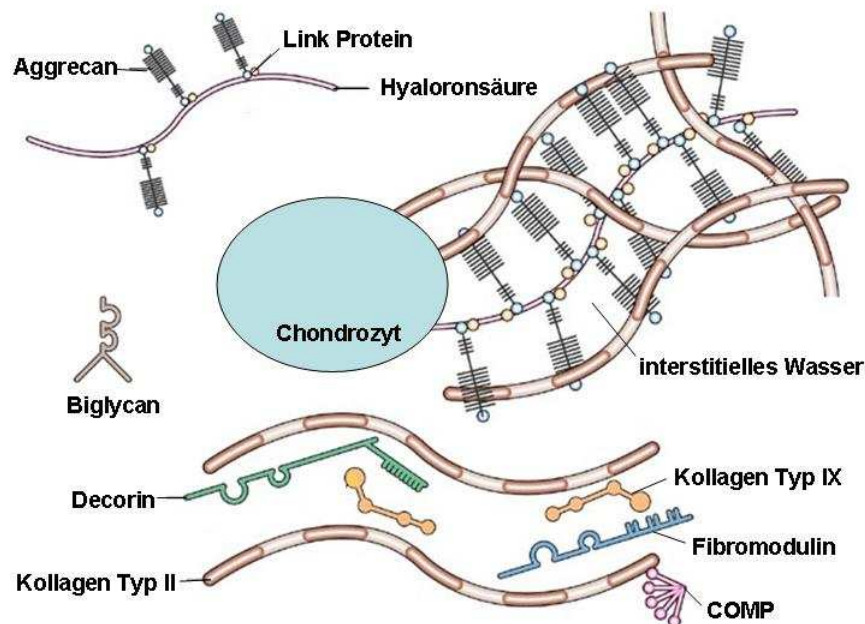


zur Oberfläche ausgerichtet. In der Übergangszone nehmen die Chondrozyten eine kugelige Form an und ordnen sich in der Radiärzone untereinander in Säulen an. Die *Tidemark* (TM) trennt nicht-kalzifizierten Knorpel vom verkalkten Knorpel. Der verkalkte Knorpel der Mineralisierungszone ist fest mit dem subchondralen Knochenmark (K) verzahnt.

Die Knochenendflächen der beweglichen Gelenke selbst sind mit einer Schicht hyalinen Knorpels überzogen, der durch seinen komplexen Aufbau einen praktisch reibungsfreien Ablauf von Bewegungen ermöglicht. Die Struktur, die Anordnung und die mechanische Beschaffenheit des hyalinen Knorpels ändern sich in Abhängigkeit von der Gelenkflächenentfernung. In verschiedenen Zonen des hyalinen Knorpels sind Chondrozyten unterschiedlicher Größe, Form und metabolischer Aktivität vorzufinden, die alle die zur Herstellung von extrazellulärer Matrix notwendigen Organellen besitzen (114).

### 1.5.2 Extrazelluläre Knorpelmatrix

Die funktionellen Eigenschaften des Knorpels werden durch die extrazelluläre Matrix vermittelt. Die extrazelluläre Matrix besteht als Hauptkomponente aus Wasser und einem Netzwerk von strukturellen Makromolekülen, die dem Gewebe seine Form und Eigenschaften verleihen (Abb. 6).



**Abb. 6: Komponenten der extrazellulären Knorpelmatrix** (Abbildung modifiziert nach 115). Die Kollagene Typ II-Fibrillen werden von den Chondrozyten in den extrazellulären Raum sezerniert und bilden ein dreidimensionales Netzwerk. Die Aggrecanmoleküle sind über ihr N-terminales Ende an Hyaluronsäure gebunden. Diese Bindung wird über ein *Link*-Protein stabilisiert. Außerdem kann Aggrecan im Bereich der Chondroitinsulfate mit Kollagen Typ II-Fibrillen Wechselwirkungen eingehen. Als Folge entstehen große

Aggregate mit supramolekularen Strukturen, welche der extrazellulären Matrix ihre funktionstragenden Eigenschaften verleihen. COMP (*Cartilage oligomeric matrix protein*).

Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix bestimmt seine funktionellen Eigenschaften. In der Tabelle 2 sind einige wichtige Proteine der extrazellulären Matrix des Faserknorpels und hyalinen Knorpels dargestellt.

**Tab. 2: Übersicht einiger wichtiger Proteine der extrazellulären Knorpelmatrix**

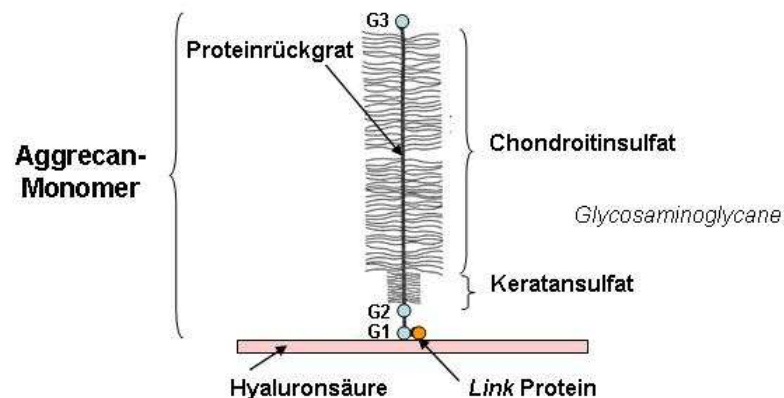
<b>Stoffklasse</b>	<b>Untergruppe</b>	<b>Vertreter (Beispiele)</b>
Kollagene	Fibrillär	Kollagen Typ I, II, III, V und XI
	Fibrillen-assoziiert	Kollagen Typ IX
	perlschnurartig	Kollagen Typ VI
Proteoglycane	aggregierend	Aggrecan, Versican
	Leucin-reiche <i>Repeats</i>	Biglycan, Asporin, Fibromodulin
andere Proteine		<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i> (COMP), <i>Cartilage matrix protein</i> (CMP), Fibronectin, <i>Link</i> -Protein, Anchorin

Kollagene bilden das strukturelle Netzwerk, das dem Knorpel seine Form und biomechanische Beschaffenheit verleiht (116). Das feine Netzwerk von Kollagenfasern ist verantwortlich für die Aufnahme von Scherkräften und vermittelt so die Verbiegungsbelastbarkeit des Knorpels.

Die Kollagene (60 % des Knorpeltrockengewichtes) werden abhängig von ihren strukturellen Eigenschaften und der supramolekularen Organisation in verschiedene Typen eingeteilt. Der hyaline Gelenkknorpel enthält zahlreiche unterschiedliche Kollagentypen wie II, VI, IX, X und XI. Kollagen Typ II ist mit einem Anteil von 90 - 95 % Hauptkomponente der Kollagen-Fibrillen und interagiert mit dem Integrin-Rezeptor der Chondrozyten und dem Anchorin-Protein (117). Im Faserknorpel ist im Gegensatz zum Gelenkknorpel vorrangig Kollagen Typ I zu finden.

Die Proteoglycane (25 - 35 % des Knorpeltrockengewichtes) füllen fast den kompletten interfibrillären Raum aus. Sie vermitteln durch ihre außergewöhnliche Wasserbindung die Elastizität und Tragkraft des Knorpels (118). Zur Gruppe der Proteoglycane zählt Aggrecan als häufigster Vertreter, sowie Decorin, Biglycan, Asporin, Fibromodulin, Lumican und Versican. Aggrecan-Monomere bestehen aus einem Kernprotein mit den drei globulären

Domänen G1, G2 und G3 (Abb. 7). Die G1-Domäne ist über das *Link protein* an Hyaluronsäure gebunden. Darauf folgt eine Keratansulfat-reiche Domäne mit einer Bindungsaffinität zu Kollagen. Weiterhin sind an das Kernprotein oft über hundert Chondroitinsulfatketten gebunden, die im Knorpelgewebe zum Widerstand gegen Kompressionen beitragen. Die G3-Domäne beeinflusst die Freisetzung der Aggrecan-Monomere. Aggrecan-Monomere spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Chondrozyten-Matrix-Interaktionen durch ihre Fähigkeit, an Hyaluronsäure zu binden.



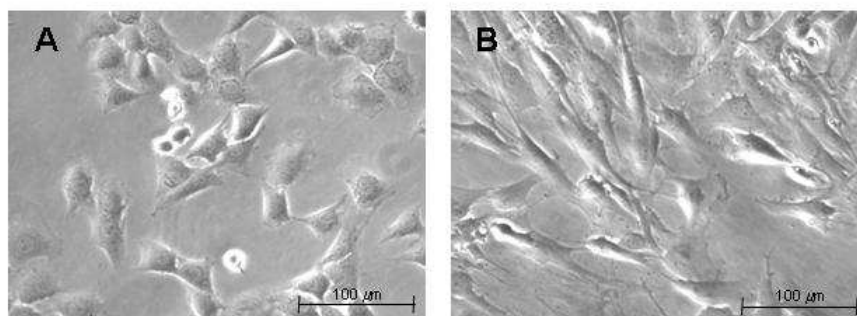
**Abb. 7: Struktur eines Aggrecan-Monomers.** Aggrecan besteht aus einem Kernprotein, an das Glycosaminoglycane mit unterschiedlicher Zusammensetzung gebunden sind. Der Anteil von Chondroitinsulfat und Keratansulfat variiert in Abhängigkeit von der Lokalisation des Knorpels.

Nicht-kollagene Proteine und Glykoproteine stellen ca. 15 - 20 % des Knorpel-Trockengewichts dar. Sie binden wie die Proteoglycane das interstitielle Wasser und helfen außerdem das makromolekulare Netzwerk zu organisieren, zu stabilisieren und die Chondrozyten anzubinden (114). Am besten untersucht ist das *Link-Protein*, das die Aggregate der Proteoglycane stabilisiert und deren Größe und Struktur beeinflusst. Anchorin ist ein Kollagen-bindendes Oberflächenprotein, das die Anbindung der Chondrozyten an die Kollagenfibrillen der Matrix unterstützt. Funktionelle Studien zeigten, dass COMP an die Kollagene Typ II und Typ IX bindet. Bei Knorpelzerstörung, während eines Gelenktraumas oder Osteoarthritis, degradiert das COMP, seine Fragmente werden in die Synovialflüssigkeit abgegeben und gelten als Marker für diese Krankheiten (119, 120). Die genaue Funktion von COMP in der extrazellulären Matrix bleibt noch offen (121). Die Funktion anderer Matrixproteine wie Fibronectin und CMP, die als mitwirkende Faktoren bei Zell-Matrix-Interaktionen oder bei pathologischen Prozessen diskutiert werden, muss noch weiter untersucht werden.

### 1.5.3 Chondrozyten

Sowohl im hyalinen Gelenkknorpel als auch im Faserknorpel gibt es nur einen einzigen Zelltyp, die hochdifferenzierten Chondrozyten. Je nach Lokalisation beträgt das Zellvolumen lediglich 1 - 3 % des Knorpelgesamtvolumens. Trotz des geringen Volumenanteils sind die Chondrozyten entscheidend für die Erhaltung und Funktion der extrazellulären Matrix. Sie sind sowohl für die Synthese als auch für den Abbau der Kollagene und Proteoglykane zuständig. Ausgereifte hyaline Gelenk-Knorpelzellen sind durch ihre runde bis ovale Form und Produktion von Kollagen Typ II sowie von großen Proteoglykan-Aggregaten charakterisiert. Im Faserknorpel haben die Chondrozyten eine spindelförmige Form und liegen in längsverlaufenden Reihen zwischen den Kollagenfaserbündeln. Da die Chondrozyten eingebettet in der extrazellulären Matrix, ohne interzelluläre Kontakte und abgetrennt von der Blutzufuhr sind, ist der Stoffwechsel von chemischen Substanzen wie z. B. Wachstumsfaktoren oder Interleukinen, die durch die extrazelluläre Matrix diffundieren, und von äußeren mechanischen Faktoren abhängig.

Chondrozyten sezernieren knorpelspezifische Moleküle, wie Kollagen Typ II, Typ IX und Typ XI (122) und aggregierende Proteoglycane wie Aggrecan (123). Problematisch bei der Knorpelzellkultur ist, dass die Chondrozyten aus hyalinem Knorpel in der Monolayerkultur ihren spezifischen Phänotyp verlieren und dedifferenzieren (124, 125). Bei der Dedifferenzierung nehmen die sonst runden Chondrozyten eine fibroblastenähnliche Form an (Abb. 8) und synthetisieren die Kollagene Typ I, Typ III und Typ V und das Proteoglycan Versican (126). Um die phänotypische Stabilität der Chondrozyten zu erhalten, werden die Zellen in einer dreidimensionalen Matrix kultiviert (127, 128). Das Alginat, ein aus Braunalgen isoliertes Polysaccharid, eignet sich sehr gut für die Kultivierung von Chondrozyten (129).



**Abb. 8: Knorpelzellen vom hyalinen Gelenkknorpel eines Femurkopfes in der Zellkultur.** Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von A: kultivierten Chondrozyten in der Passage 0 (keine Dedifferenzierung) und B: dedifferenzierten Chondrozyten der Passage 4 einer Monolayer-Kultur. Originalvergrößerung x200.

## 1.6 Fragestellung

Das an der Präsentation spezifischer antigener Peptide beteiligte Molekül HLA-B27 ist mit der Pathogenese von SpA stark assoziiert. Bakterielle Antigene, die in einem molekularen Mimikry körpereigenen Antigenen stark ähneln, und/oder gelenkspezifische autologe Antigene sind potentielle Quellen arthritogener Peptide, die durch HLA-B27 präsentiert werden und schließlich zur Induktion Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen führen können. Diese CD8<sup>+</sup> T-Zellen könnten durch direkte zytotoxische Wirkung zur Destruktion von Knorpelstrukturen im Gelenk und damit zu den arthritischen Reaktionen beitragen. In diesen Prozessen könnten Chondrozyten als nicht-professionelle APC beteiligt sein.

Daraus ergaben sich folgende Fragen:

1. Wie ist unter besonderer Berücksichtigung von Entzündungszellen die zelluläre Zusammensetzung am Übergang zwischen Knorpel und Knochen, dem primären Ort der Entzündung bei AS?
2. Induzieren Peptide, abgeleitet aus Proteinen von *Chlamydia trachomatis*, eine HLA-B27-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort in Patienten mit SpA?
3. Welche Knorpelantigene können Autoimmunprozesse bei AS-Patienten fördern?
4. Stimulieren Chondrozyten im Sinne nicht-professioneller APC in einem Modell mit HLA-B27-restringierter Präsentation eines immundominanten Peptids spezifische zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	Sigma, Deisenhofen, DE
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, DE
2-Methylbutan $\triangleq$ Isopentan	Merck, Darmstadt, DE
4',6-Diamidino-2-phenylindol	Roche, Mannheim, DE
Aceton	Dako, Hamburg, DE
Acrylamid, 30 %/ N,N'-Methylenbis(acrylamid), 2,6 % (Acrylamid/bis-Lösung)	BioRad, München, DE
Adenosintriphosphat (ATP)	Merck, Darmstadt, DE
Albumin-Standard; 2 mg/ml	Pierce, Bonn, DE
Alginat	Sigma, Deisenhofen, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen, DE
Amphotericin B; 250 $\mu$ g/ml, steril	Biochrom, Berlin, DE
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen, DE
Annexin V, AlexaFluor®488 Konjugat	Molecular Probes, Karlsruhe, DE
APAAP Detection System	Dako, Hamburg, DE
Ascorbinsäure	Sigma, Deisenhofen, DE
Beriglobin	Centeon, Wien, AT
Bicine	Sigma, Deisenhofen, DE
Bio-Rad Protein Assay dye reagent concentrate	Bio-Rad, München, DE
Biotin	Sigma, Deisenhofen, DE
Brefeldin A	Sigma, Deisenhofen, DE
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, DE
CFDA	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Coomassie-Brilliant Blue R-250 (Coomassie)	Merck, Darmstadt, DE
Cyclosporin A	Sigma, Deisenhofen, DE
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Roche, Mannheim, DE
D-Glukose	Merck, Darmstadt, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg, DE
DL-Dithiothreitol (DTT)	Merck, Darmstadt, DE
DNase I	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Einbettungsmedium: Tissue-Tek® Cryomold™ Intermediate, Tissue-Tek® Cryomold™ Standard, Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
ELF®97 Substrat	Molecular Probes, Karlsruhe, DE
Enthelan	Merck, Darmstadt, DE

Ethanol; absolut	Merck, Darmstadt, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen, DE
Eosin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
FACS™ <i>Permeabilizing solution</i> ; 10x	BD Pharmingen, Heidelberg, DE
Fast Red Substrat Chromogen-System	Dako, Hamburg, DE
Ficoll-Lösung; Hypaque-Ficoll™; $\rho = 1,078 \text{ g/ml}$	GE Healthcare, München, DE
Fluoromount G	Southern Biotech, Birmingham, US
Formaldehyd (Phosphat-gepuffert)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Formaldehyd; 35 %	J.T. Baker, Deventer, NL
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, AT
Gelatine	Sigma, Deisenhofen, DE
Glutathion, oxidiert bzw. reduziert	Sigma, Deisenhofen, DE
Glycerol	Merck, Darmstadt, DE
Glycin	Sigma, Deisenhofen, DE
Grundmedium: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Grundmedium: Ham's F-12	Biochrom, Berlin, DE
Grundmedium: RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Guanidin-HCl	Sigma, Deisenhofen, DE
Hämalaun	Merck, Darmstadt, DE
Hanks' <i>balanced salt solution</i> (HBSS)	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Hanks' <i>salt solution</i>	Biochrom, Berlin, DE
Harnstoff	Invitrogen, Karlsruhe, DE
HCl	Merck, Darmstadt, DE
Humanserum	PAA Laboratories GmbH
Imidazol	Sigma, Deisenhofen, DE
Ionomycin	Sigma, Deisenhofen, DE
Isolations-Kit für humane CD4 <sup>+</sup> T-Zellen durch Magnet-aktivierte Zellsortierung (MACS)	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, DE
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem, Gatersleben, DE
Kit zum Nachweis der sauren Phosphatase (TRAP)	Sigma, Deisenhofen, DE
Kollagenase IV	Sigma, Deisenhofen, DE
L-Arginin	Sigma, Deisenhofen, DE
L-Glutamin; 200 mM, steril	Biochrom, Berlin, DE
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma, Deisenhofen, DE
<i>Lysogeny broth</i> nach Lennox (LB-Medium)	Sigma, Deisenhofen, DE
Lysozym	Neolab, heidelberg, DE
Magermilchpulver; Glücksklee	Nestlé, Vevey, CH
Methanol	Merck, Darmstadt, DE
MgCl <sub>2</sub>	Sigma, Deisenhofen, DE
<i>Minimal essential medium</i> (MEM)-Aminosäuren	Biochrom, Berlin, DE

Mitomycin C aus <i>Streptomyces caespitosus</i>	Sigma, Deisenhofen, DE
Molekulargewichtsstandard für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	BioRad, München, DE
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRad, München, DE
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , Dihydrat	Merck, Darmstadt, DE
NaCl	Merck, Darmstadt, DE
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Monohydrat	Merck, Darmstadt, DE
Natriumazid	Merck, Darmstadt, DE
NaOH	Merck, Darmstadt, DE
Natriumacetat	Sigma, Deisenhofen, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS); 10 %	Fluka, Buchs, CH
Natriumpyruvat; 100 mM, steril	Biochrom, Berlin, DE
Normalserum: Esel	Chemicon, Temecula, US
Normalserum: Kaninchen	Sigma, Deisenhofen, DE
O-[4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenyl]-decaoxyethylen (Triton®X-100)	Sigma, Deisenhofen, DE
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, DE
Penicillin, 10 <sup>5</sup> U/ml/Streptomycin, 10 mg/ml; steril	Biochrom, Berlin, DE
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Mannheim, DE
Phorbolmyristatacetat (PMA)	Sigma, Deisenhofen, DE
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin, DE
Poly-L-Lysine	Biochrom, Berlin, DE
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma, Deisenhofen, DE
Popidiumjodid (PI)	ICN Biochemicals
Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim, DE
Pronase	Roche, Mannheim, DE
Rinderserumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg, DE
<i>Staphylococcus</i> Enterotoxin B (SEB)	Sigma, Deisenhofen, DE
Streptavidin/Biotin <i>blocking kit</i>	Vector Laboratories, Burlingame, US
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Base	Sigma, Deisenhofen, DE
Tris-HCl	Sigma, Deisenhofen, DE
Trockeneis	Messer Griesheim, Sulzbach, DE
Trypanblaulösung, 0,05 %; steril	Biochrom, Berlin, DE
Trypsin/EDTA-Lösung; 0,05 %/0,02 %, steril	Biochrom, Berlin, DE
Zellkulturüberstand B95/8	eigene Herstellung



### 2.1.2 Materialien und Geräte

Analysenwaage; Typ 2662	Sartorius, Göttingen, DE
Autoklav; Varioklav 500E	H+P Labortechnik, Oberschleissheim, DE
Begasungsbrutschrank; B-5060 EK	Heraeus, Hanau, DE
Begrenzungsstift; <i>Dako pen</i>	Dako, Hamburg, DE
Chromatographieranlage für <i>High pressure-liquid chromatography</i> (HPLC); Äkta basic mit Unicorn Software, Version 4	Amersham Biosciences, Freiburg, DE
Chromatographiesäulen:	
Superose 12 10/300GL	Amersham Biosciences, München, DE
Mono-S®-FPLC™ HR5/5	GE Healthcare, Freiburg, DE
Cytospin-Zentrifuge; Cytospin 3	Thermo Shandon, Frankfurt/M., DE
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Dialyseschlauch, Ausschlussgröße 3,5 kDa	Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA
Digitalkamera Nikon Coolpix5400	Nikon, Düsseldorf, DE
Durchflusszytometer; FACS Calibur mit CellQuest® Pro Software	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Durchlichtmikroskop	Olympus, Hamburg, DE
Einmalküvetten	Brand, Wertheim, DE
Fluoreszenzmikroskop BX60	Olympus, Hamburg, DE
Flüssigstickstoff-Gefrierbehälter; BSR-390	Consarctic, Schöllkrippen, DE
Glasplättchen; Ø 12 mm	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hämocytometer; Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim, DE
Heparinröhrchen für die Blutabnahme	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Horizontal-Schüttler; GFL 3015	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, DE
Kammer für vertikale PAGE; Mini-Protean II mit Gelgießeinrichtung	BioRad, München, DE
Kammern für die horizontale Agarose-Gelelektrophorese	BioRad, München, DE
Klebeband, durchsichtig	Clear tape Klebesysteme, Frankfurt/M., DE
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 META	Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, DE
Kryomikrotom	Microm Laborgeräte, Walldorf, DE
Kühlschrank und Tiefkühler -20 °C; Kühl-Gefrierschrank-Kombination KGE 3414	Bosch, Stuttgart, DE
Kühlzentrifuge/groß; RC-5B mit Rotor GSA	Du Pont Instruments, Boston, US
Kühlzentrifuge/klein; 5402 mit Rotor F-45-18-11	Eppendorf, Hamburg, DE
Kühlzentrifuge/mittel; GPKR mit Rotor GH-3.7	Beckman Instruments, Krefeld, DE

Magnetrührer; Ikamag RH	Ika Labortechnik, Staufen, DE
Mikrowelle; 750 W	Philips Electronics, Amsterdam, NL
MiniMACS™ Separator	Miltenyi, Bergisch Gladbach, DE
Oberschalenwaage	Ohaus, Pine Brook, US
Objekträger: Standard	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Objekträger: Super Frost®Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Parafilm	American National Can, Chicago, US
Pericyclische Pumpe; Roth Cyclo I	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Petrischalen	Nunc, Roskilde, DK
Phasenkontrast-Mikroskop, Wilovert AFL invers	Hund, Wetzlar, DE
pH-Meter mit Einstab-Meßelektrode	Schott Instruments, Mainz, DE
Photometer, Ultraspec III	Pharmacia Biotech, Uppsala, SE
Säule für MACS: MS Columns MACS®	Miltenyi, Bergisch Gladbach, DE
Schüttelinkubator; Certomat S mit Certomat H	B.Braun, Melsungen, DE
Sicherheitswerkbank; Klasse II	Nuaire, Plymouth, US
Sieb, Edelstahl	VWR, Darmstadt, DE
Spektrophotometer; DU®62	Beckman Coulter, Krefeld, DE
Stahlmesser für Kryomikrotom; Typ d, 16 cm	Microm Laborgeräte, Walldorf, DE
TALON™Metal Affinity Resin	Clontech Laboratories, Mountain View, USA
Tiefkühler -80 °C; Forma 900 ULT Plus	Forma Scienti fic, Marietta, US
Tischzentrifuge 5415C mit Rotor F-45-18-11	Eppendorf, Hamburg, DE
Trockenschrank; EED	WTB Binder, Tuttlingen, DE
Ultrafiltrationseinheit: Tangentialflow-Rezirkulationsmodul Vivaflow 50, Ausschlussgröße: 30 kDa	Vivascience, Aubagne, FR
Ultrafiltrationseinheit: Zentrifugalkonzentrator Vivaspin 6, Ausschlussgröße: 10 kDa	Vivascience, Aubagne, FR
Ultraschallgerät mit Sonde; Vibra cell	Sonics & Materials, Meyrin/Satigny, CH
Vortex; Reax 1DR	Heidolph, Schwabach, DE
Wasserbad; Typ 1002	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, DE
Zellkulturplatten: 6-well, 24-well, 96-well (Rund- bzw. Flachboden)	Nunc, Roskilde, DK

### 2.1.3 Antikörper

#### Primäre Antikörper gegen humane Antigene

<b>Antigen</b>	<b>Klon</b>	<b>Herkunft, Subtyp</b>	<b>Markierung</b>	<b>Verdünnung</b>
CD3	polyklonal <sup>1</sup>	Kaninchen, IgG	ohne	1 : 25
	UCHT1 <sup>2</sup>	Maus, IgG	Cy5	1 : 400
	F7.2.38 <sup>1</sup>	Maus, IgG1, $\kappa$	ohne	1 : 100
CD8	C8/144B <sup>1</sup>	Maus, IgG1, $\kappa$	ohne	1 : 100
	SK1 <sup>3</sup>	Maus, IgG1, $\kappa$	PerCP	1 : 10
CD20	L26 <sup>1</sup>	Maus, IgG2a, $\kappa$	ohne	1 : 200
CD28	CD28.2 <sup>3</sup>	Maus, IgG1, $\kappa$	ohne	1 $\mu$ g/ml
CD34	QBend10 <sup>4</sup>	Maus, IgG1	ohne	1 : 100
CD56	123 C3 <sup>5</sup>	Maus, IgG1	ohne	1:5 (IF), 1:50 (H)
CD61	Y2/51 <sup>1</sup>	Maus, IgG1, $\kappa$	ohne	1 : 50
CD68	KP1 <sup>1</sup>	Maus, IgG1, $\kappa$	ohne	1 : 100
	Mac3 <sup>6</sup>	Maus	ohne	1 : 20
	PG-M1 <sup>1</sup>	Maus, IgG3, $\kappa$	ohne	1 : 50
CD69	L78 <sup>3</sup>	Maus, IgG1, $\kappa$	PE	1 : 10
CD80	polyklonal <sup>7</sup>	Ziege, IgG	ohne	1 : 5
CD86	BU63 <sup>8</sup>	Maus, IgG1	PE	1 : 100
Granzym B	GB11 <sup>3</sup>	Maus, IgG1, $\kappa$	FITC	1 : 2,5
HLA-B27	HLA-ABC-m3 <sup>9</sup>	Maus, IgG2a	FITC	1 : 25
	ME-1 <sup>15</sup>	Maus	ohne	1 : 25
	HC 10 <sup>15</sup>	Maus	ohne	1 : 50
	EP-4 <sup>16</sup>	Maus, IgM	ohne	1 : 50
IFN $\gamma$	B27 <sup>3</sup>	Maus, IgG1	Allophycocyanin	1 : 300
Kollagen II	polyklonal <sup>9</sup>	Kaninchen, IgG	ohne	1 : 25
S-100	polyklonal <sup>1</sup>	Kaninchen	ohne	1 : 1.000 (IF), 1 : 500 (H)
RANK	polyklonal <sup>7</sup>	Ziege, IgG	ohne	1 : 75
RANKL	polyklonal <sup>7</sup>	Ziege, IgG	ohne	1 : 50
Perforin	$\delta$ G9 <sup>3</sup>	Maus, IgG2b	ohne	1 : 10
OPG	polyklonal <sup>7</sup>	Ziege, IgG	ohne	1 : 7,5
Isotypkontrolle	X40 <sup>3</sup>	Maus, IgG1	FITC	
	MRC OX-34 <sup>10</sup>	Maus, IgG2a	FITC	1 : 25
	27-35 <sup>3</sup>	Maus, IgG2b	FITC	
	133316 <sup>7</sup>	Maus, IgG3	ohne	

**Primäre Antikörper gegen murine Antigene**

<b>Antigen</b>	<b>Klon</b>	<b>Herkunft, Subtyp</b>	<b>Markierung</b>	<b>Verdünnung</b>
B220	RA3.6B2 <sup>2</sup>		FITC	1 : 300
CD3	145-2C11 <sup>3</sup>	Hamster, IgG1, $\lambda$	PerCP	1 : 50
CD4	GK1.5 <sup>2</sup>		Biotin	1 : 400
CD8	53-6.7 <sup>3</sup>	Ratte, IgG2a, $\kappa$	ohne	1 : 250
	KT15 <sup>4</sup>	Ratte, IgG2a	FITC	1 : 2 – 1 : 5
	53-6.7 <sup>3</sup>	Ratte, IgG2a, $\kappa$	Allophycocyanin	1 : 100
CD28	37.51 <sup>3</sup>	Hamster, IgG2, $\lambda$	ohne	1 $\mu$ g/ml
CD69	H1.2F3 <sup>3</sup>	Hamster, IgG1, $\lambda$	FITC	1 : 100
IFN $\gamma$	XMG1.2 <sup>3</sup>	Ratte, IgG1	PE	1 : 100

**Antikörper gegen andere Antigene**

<b>Antigen</b>	<b>Klon</b>	<b>Herkunft, Subtyp</b>	<b>Markierung</b>	<b>Verdünnung</b>
Allophycocyanin	polyklonal <sup>11</sup>	Kaninchen	ohne	1 : 500
PE	monoklonal <sup>17</sup>	Maus IgG1	MicroBeads	20 $\mu$ l/10 <sup>7</sup> Zellen
PE	polyklonal <sup>11</sup>	Ziege	ohne	1 : 500

**Sekundäre Antikörper und Streptavidin**

<b>Antigen</b>	<b>Herkunft, Subtyp</b>	<b>Markierung</b>	<b>Verdünnung</b>
murines IgG(H+L)	Esel, IgG gesamt <sup>12</sup>	AlexaFluor®488	1 : 200
	Esel, IgG, F(ab) <sup>2</sup> <sup>13</sup>	Allophycocyanin	1 : 200
	Esel, IgG, F(ab) <sup>2</sup> <sup>13</sup>	Cy3	1 : 200
IgG(H+L) des Kaninchens	Esel, IgG gesamt <sup>12</sup>	AlexaFluor®488	1 : 200
	Esel, IgG gesamt <sup>14</sup>	Alexa-647	1 : 200
	Esel, IgG gesamt <sup>13</sup>	Cy3	1 : 200
IgG (H+L) der Ratte	Esel, IgG gesamt <sup>13</sup>	Cy2	1 : 200
IgG(H+L) der Ziege	Esel, IgG ges <sup>12</sup>	AlexaFluor®488	1 : 200
	Esel, IgG gesamt <sup>13</sup>	Cy3	1 : 200
	Esel, IgG, F(ab) <sup>2</sup> <sup>13</sup>	PE	1 : 200
Biotin	Streptavidin <sup>12</sup>	PE	
	Streptavidin <sup>13</sup>	Cy3	
	Streptavidin <sup>12</sup>	AlexaFluor®488	
	Streptavidin <sup>12</sup>	AlexaFluor®555	
	Streptavidin <sup>13</sup>	Allophycocyanin	

**Abkürzungen:** RANK, *Receptor-Activator of Nuclear Factor kappa B*; RANKL, *Receptor-Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand*; OPG, *Osteoprotegerin*; Ig, *Immunglobulin*; FITC, *Fluoresceinisothiocyanat*; PE, *Phycoerythrin*; Cy2, *Carbocyanin*; Cy3,

Indocarbocyanin; Cy5, Indodicarbocyanin; PerCP, Peridininchlorophyll-Proteinkomplex; IF, Immunfluoreszenz; H, Immunhistochemie; Hersteller: <sup>1</sup>Dako, Hamburg, DE; <sup>2</sup>Deutsches Rheumaforschungszentrum, Berlin, DE; <sup>3</sup>BD Biosciences, Heidelberg, DE; <sup>4</sup>Immunotech, Marseille, FR; <sup>5</sup>Monosan, Uden, NL; <sup>6</sup>Institut für Pathologie, Charité - Universitätsmedizin, Berlin, DE; <sup>7</sup>R&D Systems, Minneapolis, US; <sup>8</sup>Caltag, Burlingame, US; <sup>9</sup>Acris, Hiddenhausen, DE; <sup>10</sup>AbD Serotec, Düsseldorf, DE; <sup>11</sup>Biomedica, Burlingame, US; <sup>12</sup>Molecular Probes, Karlsruhe, DE; <sup>13</sup>Dianova, Hamburg, DE; <sup>14</sup>Mobitec, Göttingen, DE; <sup>15</sup>von Paul Bowness; <sup>16</sup>Abcam, Cambridge, US; <sup>17</sup>Miltenyi, Bergisch Gladbach, DE

Für die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen wurde ein monoklonaler Antikörper spezifisch für Maus-Fcγ-Rezeptor, Klon 2.4G2/75<sup>2</sup>, mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml eingesetzt.

#### 2.1.4 Rekombinante humane Zytokine

<b>Zytokin</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Gebrauchs- konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
GM-CSF	1 µg/ml	50 ng/ml	PeproTech, Hamburg, DE
IFN <sub>γ</sub>	10 µg/ml	0,5 - 100 ng/ml	PeproTech, Hamburg, DE
IFN <sub>α,2a</sub>	10 µg/ml	0,5 - 100 ng/ml	Strathmann, Hamburg, DE
IL-2	1000 U/ml	20 U/ml	Roche, München, DE; Boehringer Mannheim, Mannheim, DE
IL-4	25.000 U/ml	10.000 U/ml	Roche, München, DE
IL-6	10 µg/ml	1 - 100 ng/ml	PeproTech, Hamburg, DE
TNF <sub>α</sub>	10 µg/ml	10 - 50 ng/ml	PeproTech, Hamburg, DE

TNF, Tumornekrosefaktor

Alle Zytokine wurden als hochgereinigte, in *Escherichia coli* (*E. coli*) produzierte Proteine verwendet.

#### 2.1.5 HLA-B27-bindende Peptide

<b>Herkunft Referenz</b>	<b>Name</b>	<b>Sequenz<sup>&amp;</sup></b>	<b>Bindungs- score</b>
<i>Chlamydia</i> (62)	#ChI8	NRFSVAYML	26
	#ChI68	NRAKQVIKL	26
	#ChI80	IRMFKILPL	26
	#ChI131	KRLAETLAL	26
	#ChI133	IRSSVQNKL	27
	#ChI138	ARKLLLDNL	26
	#ChI144	MRDHTITLL	25
	#ChI145	DRLALLANL	27
	#ChI146	YRLLLTRVL	25
	#ChI194	EREQTLNQL	25

<b>Herkunft Referenz</b>	<b>Name</b>	<b>Sequenz<sup>&amp;</sup></b>	<b>Bindungs- score</b>
	#ChI195	NRELIQQEL	25
	#ChI196	ERFLAQEQL	27
Humanes Aggrecan (130)	#A47	*	31
	#A57	*	25
	#A59	*	24
	#A67	SRHHAF CFR	20
Nukleäres Antigen 3C des Epstein- Barr-Virus (EBV) (EBNA) (131)	EBNA <sub>258-266</sub>	RRIYDLIEL	28

<sup>&</sup>Sequenzangaben im Einbuchstaben-Code nach IUPAC-IUB-Vereinbarungen (1969) (132),

\*Sequenz nicht spezifiziert, persönliche Mitteilung Wolfgang Kuon

Alle Peptide wurden vom Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen (Reutlingen, DE) synthetisiert und in DMSO gelöst. Diese Stammlösungen wurden in Serum freiem RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin, 10<sup>3</sup> U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zu Peptidkonzentrationen von 10 µg/ml weiter verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

### 2.1.6 Patientenmaterial

Einverständniserklärung der Patienten und Genehmigung der Studien durch Ethikkommission der Charité, Campus Benjamin Franklin.

<b>Ziel Untersuchungsmaterial</b>	<b>Patient Nr.</b>	<b>HLA-B27</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Diagnose</b>
Test <i>Chlamydia</i> -Antigene	1	+	47	m	ReA
Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut und/oder Synovialflüssigkeit (Versuch 3.2)	2	+	50	w	ReA
	3	+	25	w	ReA
	4	+	39	m	ReA
	5	+	23	m	ReA
	6	+	29	m	ReA (Monarthritis)
	7	+	21	m	ReA (UOA)
	8	+	33	m	ReA (UOA)
	9	-	51	m	ReA (UOA)
	10	-	23	w	ReA
	11	+	47	m	AS
	12	+	24	w	AS
	13	+	20	m	AS
	14	-	51	w	RA
	15	-	62	w	RA
	16	-	67	w	RA

<b>Ziel Untersuchungsmaterial</b>	<b>Patient Nr.</b>	<b>HLA-B27</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Diagnose</b>
Kontrollen	17	+	28	w	gesund
Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut und/oder Synovialflüssigkeit (Versuch 3.2)	18	+	35	m	gesund
	19	+	36	w	gesund
	20	+	51	m	gesund
	21	+	53	m	AS
Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut und/oder Synovialflüssigkeit (Versuch 3.3)	22	n.d.	47	m	AS
	23	+	31	m	AS
	24	+	35	m	AS
	25	+	32	m	AS
	26	+	24	w	AS
	27	+	45	m	ReA
	28	n.d.	37	w	AS
	29	n.d.	26	m	AS
	30	+	32	m	AS
	31	+	36	w	AS
	32	-	71	m	AS
	33	+	50	m	AS
	34	+	36	m	AS
	35	+	29	m	AS
	36	+	26	m	AS
	37	+	29	m	AS
	38	+	65	m	AS
	39	+	21	m	UOA
	40	+	26	m	AS
	41	n.d.	41	w	AS
	42	+	37	m	AS
	43	+	44	m	AS
	44	+	44	m	AS
	45	+	60	w	AS
	46	+	54	w	AS
	47	+	71	m	AS
	48	+	51	w	AS
49	+	23	m	AS	
50	+	46	w	AS	
51	+	24	m	AS	
52	+	41	w	AS	
53	+	35	m	AS	
54	+	39	m	AS	
55	+	25	m	AS	
56	+	43	m	AS	

<b>Ziel</b>	<b>Patient Nr.</b>	<b>HLA-B27</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Diagnose</b>
<b>Untersuchungsmaterial</b>	57	n.d.	17	m	ReA
	58	+	27	m	AS
	59	+	20	m	AS
	60	+	45	m	UOA
	61	+	22	w	uSpA
	62	-	19	m	AS
Immunhistopathologie Hüftköpfe (Versuch 3.1)	63	n.d.	57	m	AS
	64	+	73	m	AS
	65	n.d.	n.d.	n.d.	AS
	66	+	73	m	AS
	67	+	73	m	AS
	68	n.d.	51	m	AS
	69	+	32	m	AS
	70	+	39	m	AS
	71	+	38	m	AS
	72	+	56	w	AS
	73	n.d.	70	m	SpA
	74	n.d.	50	m	AS
	75	n.d.	63	w	AS
	76	n.d.	64	m	AS
	77	n.d.	32	m	AS
	78	n.d.	62	m	AS

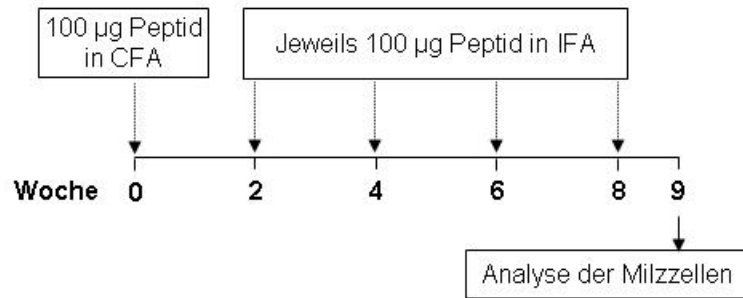
n.d. – nicht bestimmt; w – weiblich; m – männlich; undifferenzierte Oligoarthritis (UOA); undifferenzierte SpA (uSpA); rheumatoide Arthritis (RA)

### 2.1.7 Mäuse

Die Mäuse wurden in den Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin am Campus Benjamin Franklin unter spezifischen Pathogen-freien Bedingungen unter Verantwortung von Wolfgang Kuon gezüchtet und gehalten. Die Untersuchungen wurden mit 6 - 12 Wochen alten weiblichen BALB/c Wildtyp-Mäusen bzw. B27h $\beta_2$ m-transgenen (B27-transgen) Mäusen auf einem BALB/c-Hintergrund (133, 134) dort durchgeführt (Tierschutzantrag Nummer: Reg 0209/03).

Die Tiere wurden von Wolfgang Kuon immunisiert (Abb. 9) und für die anschließenden Experimente freundlicherweise zur Verfügung gestellt.





**Abb. 9: Schema der Immunisierung von Mäusen mit HLA-B27-spezifischen Peptiden.** Freund's komplettes Adjuvans (CFA), Freund's inkomplettes Adjuvans (IFA).

Nach einer ersten Injektion des entsprechenden Peptids wurden die Mäuse vier weitere Male im Abstand von jeweils zwei Wochen behandelt. Eine Woche nach der letzten Injektion wurde die Milz der Tiere steril entnommen, ein Teil der Milz durch ein Sieb suspendiert und die Milzzellen in Kultur genommen. Der andere Teil der Milz wurde für immunhistochemische Untersuchungen an Gefrierschnitten in Tissue-Tec® tiefgefroren.

### 2.1.8 Vektoren für die Expression von Komponenten für die Herstellung von HLA-B27-Tetrameren in *E. coli*

<b>Vektor</b>	<b>Protein</b>		<b>Referenz</b>
pET22b-w	Biotinligase (BirA)	mit aminoternalem <i>Tag</i> von sechs Histidinresten für die affinitätschromatographische Reinigung aus Bakterienlysaten	Heiner Appel Kai Wucherpfnig
pLM1-HLA-B27	HLA-B27, schwere Kette	mit carboxyterminaler Erkennungssequenz für BirA	(135)
pLM1-HLA-B27mut	HLA-B27, schwere Kette, mutiert	mit carboxyterminaler Erkennungssequenz für BirA und Aminosäureaustausch Cys67 -> Ser67	(136)
pHN1-β <sub>2</sub> m	humanes β <sub>2</sub> M		Heiner Appel Kai Wucherpfnig

Die Proteine wurden nach Transformation mit dem entsprechenden Vektor durch *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (*E. coli* BL21) - Genotyp: F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3) pLysS(cm<sup>R</sup>) - produziert. Transformierte Bakterien wurden bis zur Verwendung als Glycerolkonzentrat bei -20°C aufbewahrt. Die Selektion erfolgte über die Ampicillinresistenz,

die durch die o. g. Vektoren vermittelt wird. Alle Arbeiten erfolgten nach Sicherheitsstufe 1 Gentechnikgesetz und wurden in der gentechnischen Anlage (Nr. 527/97) der Charité - Campus Benjamin Franklin durchgeführt.

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Das FCS wurde bei 37°C aufgetaut und durch Hitzebehandlung für 30 min bei 56°C wurde das Komplement inaktiviert. Aliquots à 5 ml wurden bei -20°C aufbewahrt.

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Zentrifugationsschritte jeweils 10 min bei 350 g und 4°C durchgeführt.

PBS; pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Einfriermedium	80 % FCS 20 % DMSO
Auftaumedium	Grundmedium: RPMI 1640 20 % FCS
AB-Medium	Grundmedium: RPMI 1640 10 % AB-Serum 2 mM L-Glutamin 10 <sup>3</sup> U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
B-Zellmedium	Grundmedium: RPMI 1640 10 % FCS 2 mM L-Glutamin 1 mM Na-Pyruvat
Mauszellmedium	Grundmedium: RPMI 1640 10 % FCS 2 mM L-Glutamin 10 <sup>3</sup> U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Chondrozytenmedium	Grundmedien: DMEM und Ham's F-12 im Verhältnis 1 : 2 25 µg/ml Ascorbinsäure 2,5 µg/ml Amphotericin B 1 % MEM-Aminosäuren 2 mM L-Glutamin 10 <sup>3</sup> U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

### **2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zellen können in der Gasphase über flüssigem Stickstoff lange Zeit aufbewahrt werden. Glycerol oder DMSO als Schutzmittel, das die Kristallisationsgeschwindigkeit verändert, verhindert die Kristallbildung inner- und außerhalb der Zellen und die Dehydratation des Zytoplasmas. DMSO ist ein reduzierendes Agens (137) und damit ein wirksames Zellgift. Während beim Einfrieren von Zellen diese schrittweise dem nächsten Kältegrad zugeführt wurden, sollte der umgekehrte Prozess des Auftauens möglichst rasch ablaufen.

Zellen aus der Kultur oder frisch isolierte Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 350 g, 4°C) und der Überstand dekantiert. Die sedimentierten Zellen wurden mit einer Dichte von  $1 - 5 \times 10^6$  c/ml in dem entsprechenden Kulturmedium aufgenommen und auf Eis gestellt. Die Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen eisgekühlten Einfriermediums gemischt. *Aliquots* wurden umgehend in Kryoröhrchen pipettiert und diese fraktioniert eingefroren: über Nacht bis mehrere Tage bei -70°C und danach bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C angetaut, die Zellsuspension mit der Pipette herausgenommen und anschließend in 10 ml auf 37°C vortemperiertem Auftaumedium resuspendiert. Nach Zentrifugation der Zellen wurde das Pellet in dem entsprechenden Kulturmedium aufgenommen und die Zellen unter den für sie geeigneten Bedingungen weiter kultiviert.

### **2.2.3 Zellzahlbestimmung**

Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde in 5 ml frischem Medium gut resuspendiert und 20 µl Zellsuspension mit 80 µl Trypanblaulösung versetzt. Dieses Gemisch wurde in eine Neubauer-Zählkammer gebracht und am Lichtmikroskop die Zellen gezählt. Daraus wurde die Zelldichte der Suspension unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und des Volumens ermittelt.

### **2.2.4 Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut und Synovialflüssigkeit**

Bei der Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll sedimentieren die Zelltypen des peripheren Blutes oder der Synovialflüssigkeit entsprechend ihrer Dichte. Granulozyten und durch das Ficoll aggregierte Erythrozyten sammeln sich am Boden des Zentrifugenröhrchens. Monozyten und Thrombozyten liegen in der oberen Phase. Mononukleäre Zellen des

peripheren Blutes (PBMNC) oder der Synovialflüssigkeit (SFMNC) einschließlich der T- und B-Zellen finden sich in der Interphase zwischen Plasma und Ficollschicht (138, 139).

In einem Zentrifugenröhrchen wurde heparinisieretes Vollblut mit dem gleichen Volumen PBS gemischt. In einem anderen Zentrifugenröhrchen wurden 20 ml Ficoll-Lösung vorgelegt, 20 ml des verdünnten Vollblutes oder der Synovialflüssigkeit mit einer Stabpipette vorsichtig darüber geschichtet und das Röhrchen zentrifugiert (20 min, 800 g ohne Bremse, Raumtemperatur). Die Interphase wurde mit einer Stabpipette abgenommen, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert (10 min, 350 g, +4°C). Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Diese Zellen wurden entweder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt oder direkt in Kultur genommen.

### **2.2.5 Murine Antigen-spezifische T-Zelllinien**

Immunisierten Mäusen wurde die Milz entnommen. Ein Drittel des Organs wurde für histologische Färbungen eingebettet und der restliche Teil wurde durch ein Sieb homogenisiert und zweimal mit jeweils 20 ml PBS gewaschen. Aus dieser Milzzellsuspension wurden jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen mit 7 ml Mauszellmedium und 10 µg/ml des entsprechenden Peptides in kleinen Kulturflaschen inkubiert. Nach sechs Tagen wurden die Zellen gesammelt, die vitalen Zellen durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation angereichert und direkt in den Experimenten verwendet.

Für den Test der Antigen-spezifität der T-Zelllinien mittels Nachweis intrazellulärer Zytokine (Abschnitt 2.4.3) wurden autologe murine Milzzellen als APC mit Carboxyfluoresceindiacetat (CFDA) markiert. Dafür wurden die Zellen in PBS gewaschen und mit 1 ml PBS und 2 µl CFDA/ $1 \times 10^7$  Zellen im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 4 min wurde der Markierungsschritt mit Mausmedium gestoppt. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen. Für den Nachweis intrazellulärer Zytokine wurden Zellen der Antigen-spezifischen T-Zelllinie mit CFDA-markierten Milzzellen im Verhältnis 1:5 gemischt.

### **2.2.6 Humane lymphoblastoide (B-)Zelllinien**

Durch Infektion mit dem EBV werden primäre humane B-Zellen immortalisiert. Dazu werden PBMC mit einem Zellkulturüberstand der Zelllinie B95/8, die EBV-Partikel produziert, inkubiert, und in Gegenwart von Cyclosporin A, das zur Unterdrückung der Proliferation von T-Zellen führt, zu lymphoblastoiden Zelllinien (B-Zelllinie) transformiert (140).

Jeweils  $2 \times 10^6$  PBMNC wurden mit 1 ml B-Zellmedium in eine 24-well-Platte gegeben. In jedes Well wurde 1 ml Kulturüberstand der Zelllinie B95/8 pipettiert, die Kulturen zunächst

2 h bei 37°C inkubiert und danach Cyclosporin A zu einer Endkonzentration von 600 ng/ml dazu gegeben. Einmal wöchentlich wurde jeweils die Hälfte des Kulturmediums abgenommen und durch frisches B-Zellmedium mit 1,2 µg/ml Cyclosporin A ersetzt. Nach vier Wochen wurde erstmalig durchflusszytometrisch der Anteil CD19<sup>+</sup> B-Zellen bestimmt, der zu diesem Zeitpunkt typischerweise bei ~ 99 % lag. Sukzessive wurden diese B-Zelllinien kryokonserviert und als autologe APC zur Herstellung Antigen-spezifischer T-Zelllinien verwendet.

### 2.2.7 Humane dendritische Zellen

Im Gegensatz zu T-Zellen, die in der *in vitro*-Kultur mit serumhaltigen Medien ausschließlich in Suspension vorliegen, heften sich Monozyten aufgrund der Expression ihrer zahlreichen Adhäsionsmoleküle, wie z. B. Integrine, *Cell Adhesion Molecules*, Fibronectin und Selektine, unter diesen Bedingungen an Zellkulturoberflächen an (141, 142). Eine Differenzierung monozytärer Zellen aus den PBMNC in dendritische Zellen kann in der Kultur durch die Zytokine TNF $\alpha$ , IL-4 und GM-CSF in verschiedenen Kombinationen erreicht werden (143).

Jeweils  $2 \times 10^6$  PBMNC/ml wurden in einer 24-well-Platte für 90 min bei 37°C in AB-Medium inkubiert. Nicht-adhärenente Zellen wurden durch vorsichtiges zweimaliges Spülen mit 1 ml PBS entfernt. Die adhärenente monozytären Zellen wurden mit 1 ml AB-Medium, das 1.000 U IL-4 und 50 ng GM-CSF enthielt, überschichtet. Nach 6 Tagen wurde TNF $\alpha$  zu einer Endkonzentration von 50 ng/ml dazugegeben und die Zellen weitere 3 - 4 Tage inkubiert. Die reifen dendritischen Zellen wurden für die Austestung der Bedingungen für die Antigen-spezifische Kostimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen verwendet.

### 2.2.8 Humane Antigen-spezifische T-Zelllinien

Der Anteil CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der PBMNC-Fraktion liegt typischerweise bei 30 % (144, 145). In Abhängigkeit von der immunologischen Vorgeschichte, der Immunogenität des Peptids, des individuellen HLA-Musters und anderer Faktoren können CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die spezifisch für ein bestimmtes antigenes Peptid sind, mit Frequenzen ab  $10^{-5}$  und in Einzelfällen bis zu 5 % vorkommen (146, 147). Um diese Zellen experimentell für *in vitro*-Versuche verfügbar zu machen, können diese Zellen in Gegenwart professioneller APC und des entsprechenden Peptids durch Kulturverfahren angereichert werden.

Von HLA-B27<sup>+</sup>-Spendern wurden jeweils  $1 \times 10^6$  PBMNC in 1 ml AB-Medium in 24-well-Platten pipettiert. Die entsprechenden HLA-B27-restringierten Peptide wurden in Konzentrationen von 10 µg/ml zugegeben. Nach 14 Tagen wurden erneut 10 µg/ml des

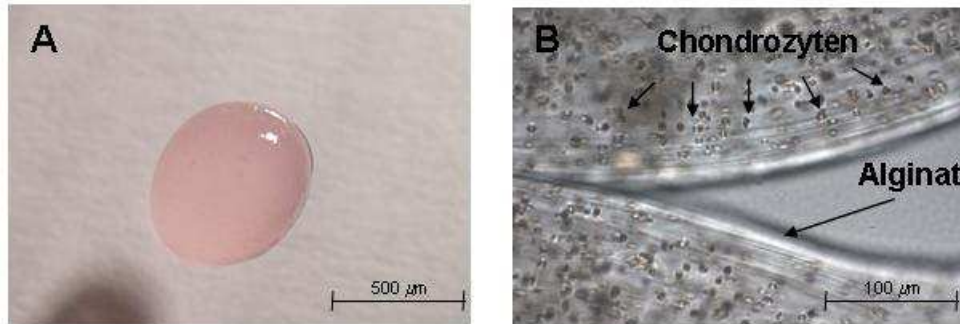
entsprechenden Peptides und  $2 \times 10^5$  Mitomycin C-inaktivierte autologe PBMNC oder B-Zelllinien in jede Kultur gegeben. Von Beginn an erhielten die Kulturen alle zwei Tage rekombinantes humanes IL-2 mit einer Endkonzentration von 20 U/ml. Insgesamt wurden die T-Zelllinien bis zu vier Wochen inkubiert. Sie wurden direkt als Effektoren eingesetzt oder kryopräserviert. Der Anteil Antigen-spezifischer T-Zellen wurde durchflusszytometrisch nach Färbung mit dem entsprechenden Tetramer und einem CD8-spezifischen Antikörper bestimmt. Für den Test der Antigen-spezifität der T-Zelllinien mittels Nachweis intrazellulärer Zytokine wurden autologe PBMNC oder B-Zellen als APC mit CFDA markiert, wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben.

### 2.2.9 Alginatkultur humaner artikulärer Chondrozyten

Um den charakteristischen Phänotyp von Chondrozyten, der durch die Expression von Kollagen Typ II definiert ist, zu erhalten, benötigen Chondrozyten auch *in vitro* die Möglichkeit eines Wachstums in drei Dimensionen (129, 148). Eine Alginatmatrix mit einer grobporigen, netzartigen molekularen Struktur und einer inerten, großen inneren Innenoberfläche gewährleistet ein solches dreidimensionales Kultursystem (149). Während ihres Wachstums wandern Chondrozyten kontinuierlich aus Alginatkügelchen aus und bilden Monolayer von Zellen, die dem Phänotyp primärer Chondrozyten entsprechen (150).

Für die Herstellung von Chondrozytenkulturen wurden etwa  $15 \text{ mm}^3$  große Stücke von der Knorpeloberfläche entnommener Femurköpfe gewonnen. Diese wurden einmal in 12 ml Ham's F-12 gespült bevor sie in 20 ml Hams F12-Medium mit 10 mg/ml Pronase 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert wurden. Nach Zugabe von Kollagenase IV zu einer Endkonzentration von 5 mg/ml wurden die Gewebestücke weitere zwei bis vier Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die so vorbehandelten Zellverbände wurden in Chondrozytenmedium aufgenommen, mehrmals auf und ab pipettiert und anschließend durch ein Sieb passiert. Die Zellsuspensionen wurden bei 400 g für 5 min zentrifugiert und jeweils  $3 \times 10^6$  Zellen/ml in Chondrozytenmedium resuspendiert.

Für die dreidimensionale Kultivierung in Alginatkügelchen wurde das Zellpellet in 2 % Alginat resuspendiert und luftblasenfrei in eine 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung getropft. Innerhalb von 10 min polymerisierte das Alginat durch die Anwesenheit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Die  $\text{CaCl}_2$ -Lösung wurde entfernt und die Alginatkügelchen wurden dreimal in 150 mM NaCl-Lösung und zweimal in Chondrozytenmedium gespült und anschließend in eine Petrischale mit 20 ml Chondrozytenmedium überführt. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt.



**Abb. 10: Alginatkultur.** Frisch isolierte Chondrocyten ( $2 \times 10^5$ ) wurden in Alginatkügelchen eingeschlossen und 14 Tage in Chondrozytenmedium inkubiert. **(A)** Makroskopische Aufnahme eines Alginatkügelchens. **(B)** Grenzflächen zweier Alginatkügelchen mit eingebetteten Chondrozyten. Auflichtmikroskopie, Originalvergrößerung x200.

Nach 1-2 Wochen beginnen die Zellen kontinuierlich aus den Alginatkügelchen auszuwandern (150) und adhäreren am Boden des Kulturgefäßes. Nach Erreichen einer Konfluenz von 70-90 % wurden die Zellen durch 0,05 % Trypsin/1,0 % EDTA abgelöst und in entsprechende Kulturgefäße überführt.

Im Laufe der Kultur wurde die Dichte des Zellrasens täglich unter dem Lichtmikroskop kontrolliert, alle 2-3 Tage das Kulturmedium komplett entfernt und durch frisches Medium mit allen Zusätzen ausgetauscht. In allen Experimenten wurden Chondrozyten aus der zweiten Passage nach dem Auswandern aus der Alginatmatrix verwendet.

### 2.2.10 Monolayerkultur humaner artikulärer Chondrozyten

Trypsin ist eine Serinprotease, die gezielt hinter den Aminosäureresten Lysin und Arginin spaltet und so Proteine in definierte Abschnitte zerlegt. Durch diese Spezifität ist sie zur schonenden Auflösung von Zell/Zell- und Zell/Matrix-Kontakten in der Zellkultur geeignet (151).

Nach Ausbildung konfluenten Zellrasen in den Zellkulturflaschen wurde das Medium abgesaugt, der adhären Zellen zweimal mit je 10 ml *Hanks' salt solution* gespült und mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung 3 - 5 min bei 37°C inkubiert. Der Ablöseprozess der Zellen vom Boden der Kulturflasche wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Nach Zugabe von 10 ml Chondrozytenmedium wurde die Zellsuspension bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in frischem Chondrozytenmedium aufgenommen. Die Zellen wurden gezählt und in der gewünschten Zelldichte in sterile Zellkulturgefäßen ausgebracht.

### 2.2.11 Induktion der Expression von HLA-B27 in humanen artikulären Chondrozyten

HLA-II Antigene können durch Inkubation der Chondrozyten mit rekombinanten humanen IFN $\gamma$  induziert werden (152-154). Andere proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  oder IL-6 haben ebenfalls eine Wirkung auf die Expression dieser Oberflächenmoleküle. Für IFN $\alpha$  ist bekannt, dass es bei verschiedenen Zelltypen die HLA-I Antigene hochregulieren kann (155-158).

Jeweils  $5 \times 10^4$  Chondrozyten wurden in 24-well-Platten mit jeweils einem Glasplättchen und 1 ml Chondrozytenmedium für 24 h inkubiert. Danach wurden den Kulturen die folgenden Zytokine mit den folgenden Endkonzentrationen zugesetzt: 500 pg/ml-100 ng/ml IFN $\gamma$ ; 10 - 50 ng/ml TNF $\alpha$ ; 0,5 - 100 ng/ml IFN $\alpha$  oder 1 - 100 ng/ml IL-6.

Nach jeweils 48 h Inkubation wurden die Zellen auf den Glasplättchen mit PBS gespült und 15 min mit 4 % PFA fixiert. Die Expression von HLA-B27 wurde nach Färbung mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern bestimmt. Als Kriterium für die optimale Aktivierung der Chondrozyten wurden die HLA-B27 $^+$  Zellen im Fluoreszenzmikroskop gezählt. Damit wurde eine optimale Aktivierung durch Zugabe von 0,5 ng/ml IFN $\gamma$  für 48 h etabliert.

### 2.2.12 Gemischte Chondrozyten/T-Zellkulturen (MCTC)

Zur Untersuchung des CD8 $^+$  T-Zell-stimulatorischen Potentials von Chondrozyten wurden aktivierte Chondrozyten gemeinsam mit Antigen-spezifischen CD8 $^+$  T-Zellen kultiviert.

Aktivierte Chondrozyten wurden mit 10  $\mu$ g/ml Peptiden EBNA<sub>258-266</sub> bzw. #Ch1138 als Negativkontrolle in 24-well-Platten 16 h bei 37°C inkubiert. Freies Peptid wurde durch dreimaliges Spülen mit jeweils 1 ml Chondrozytenmedium ausgewaschen. Für die gemischten Chondrozyten/T-Zellkulturen (MCTC) wurden die so vorbehandelten Chondrozyten-Monolayer mit  $3 \times 10^5$  CD8 $^+$  T-Zellen inkubiert. Um Zell/Zell-Kontakte zwischen CD8 $^+$  T-Zellen und Chondrozyten zu erleichtern, wurde ein hohes T-Zell/Chondrozyten-Verhältnis von 6 : 1 eingesetzt, das Kulturvolumen mit 500  $\mu$ l klein gehalten und die T-Zellen vor Beginn der Koinkubation mit 100 g für 2 min auf die Chondrozyten-Monolayer zentrifugiert. Nach 2 h wurden 10  $\mu$ l Brefeldin A zugegeben und nach weiteren 4 h Ko-Inkubation wurden die Antigen-spezifischen Interaktionen durchflusszytometrisch über die Produktion von IFN $\gamma$  durch EBNA<sub>258-266</sub>-spezifische CD8 $^+$  T-Zellen ermittelt.

Zudem wurden zytologische Untersuchungen der Zell/Zell-Kontakte in den MCTC mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) durchgeführt. Dieses Vorgehen wurde



äquivalent zum oben beschriebenen Ansatz durchgeführt, nur mit dem Unterschied, dass die Chondrozyten in den 24-well-Platten direkt auf den Glasplättchen wuchsen. Nach 6 h Koinkubation von T-Zellen und Chondrozyten wurde das Medium vorsichtig zur Hälfte abgenommen. Die Zellen wurden mit 4 % PFA 15 min fixiert, mit TBS gespült und bis zur immunhistochemischen Färbung in TBS bei 4°C aufbewahrt.

Für die Austestung der gemischten DC/T-Zell-Kulturen wurden DC in 24-well-Platten mit bzw. ohne Glasplättchen herangezüchtet ( $1 \times 10^6$  pro Well) und über Nacht bei 37°C mit 10 µg/ml EBNA<sub>258-266</sub> inkubiert. Die Kulturplatte wurde für 5 min bei 350 g zentrifugiert und überschüssiges Peptid mit PBS gewaschen und einem weiteren Zentrifugationsschritt abgespült. Pro Ansatz wurden  $5 \times 10^5$  EBNA<sub>258-266</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen hinzugefügt. Die Zellen wurden bei 37°C ko-kultiviert. Nach 2 h wurden 10 µl Brefeldin A zugegeben und nach weiteren 4 h Ko-Inkubation wurde die Produktion von IFN $\gamma$  durchflusszytometrisch bestimmt bzw. wurden die Glasplättchen mit der DC/T-Zell-Kultur für 15 min in 4 % PFA fixiert und anschließend immunhistochemisch untersucht.

## 2.3 Herstellung von HLA-B27-Tetrameren

### 2.3.1 Bakterienkultur

Die Produktion rekombinanter Genprodukte, wie die der Ketten von HLA-Komplexen, kann in *E. coli* über das lac-System reguliert werden. In mit einem entsprechenden Vektor transformierten Bakterien wird die Expression in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase durch die Zugabe des Substratanalogons IPTG induziert (159).

Selektionsmedium	20 mg/ml LB-Medium 100 µg/ml Ampicillin
IPTG-Lösung	100 mM IPTG
Lysepuffer	50 mM Tris-HCl 25 % Sucrose 1 mM EDTA 0,1 % Natriumazid      pH 8,0 10 mM DTT (frisch hinzugeben)

Aus einer Glycerolkonserve des mit dem entsprechenden Expressionsvektor transformierten *E. coli* BL21 wurde mit einer Impföse ca. 10 µl Bakteriensuspension in 50 ml Selektionsmedium angeimpft und diese Kultur über Nacht bei 220 rpm und 37°C auf einem Rundschtüttler inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 10 ml in eine 400 ml Hauptkultur mit frischem Selektionsmedium übertragen. Diese Kultur wurde bei 200 rpm und 37°C

geschüttelt und das Wachstum halbstündlich über die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm und einem Messweg von 1 cm ( $OD_{600}$ ) spektrophotometrisch bestimmt. Bei einer  $OD_{600}$  von 1,0 wurde IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM zur Kultur gegeben. Nach weiteren 4 h Inkubation wurden die Bakterien bei 14.000 g für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 - 2 ml Lysepuffer resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Der Erfolg der Induktion wurde durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen bestätigt.

### 2.3.2 Präparation von *Inclusion bodies*

Die Expressionsvektoren für die schwere Kette von HLA-B27 und für das  $\beta_2M$  gestatten eine hohe Expression des Fremdgens durch *E. coli* BL21. Die Bakterien bilden *Inclusion bodies*, in denen die Proteine in denaturierter Form vorliegen. Durch Präparation der Partikel liegt die Reinheit des gewünschten Proteins nach einem Schritt typischerweise bei über 95 %. Die Proteine müssen anschließend mit Hilfe chaotroper Salze effizient rückgefaltet werden (135).

Lysozymlösung	1 mg/ml Lysozym
MgCl <sub>2</sub> -Lösung	5 mM MgCl <sub>2</sub>
DNase I-Lösung	30 µg/ml DNase I
DTT-Lösung	10 mM DTT
Waschpuffer	50 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 1 mM EDTA 0,1 % Natriumazid, pH 8,0 10 mM DTT (frisch hinzugeben)
Triton-Waschpuffer	Waschpuffer 0,5 % Triton X-100
Harnstofflösung	25 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure 8 M Harnstoff 10 mM EDTA 100 µM DTT (frisch hinzugeben)

Das Bakterienpellet wurde aufgetaut und in ein 100 ml-Becherglas überführt. Unter Rühren wurden zu 60 ml Lysat tropfenweise folgende Lösungen hinzugegeben: 1,2 ml Lysozymlösung, 300 µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 1,0 ml DNase I-Lösung, 600 µl Triton X-100 und 60 µl DTT-Lösung. Nach 15-minütigem Rühren wurden jeweils 15 ml Lysat in ein 50 ml-Röhrchen überführt und zweimal 1 min beschallt (40 – 50 % Leistung). Das Lysat wurde 12 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1 - 2 ml Triton-Waschpuffer resuspendiert und auf 15 ml mit Triton-

Waschpuffer aufgefüllt. Ultraschall und Waschschrift wurden dreimal wiederholt. Der 5. Beschallungs- und Waschschrift erfolgte in Waschpuffer. Das Pellet wurde mit Harnstofflösung zu einem Endvolumen von 20 ml aufgefüllt und über Nacht bei 4°C gelöst. Die resultierende Lösung wurde 30 min bei 35000 g und 4°C zentrifugiert und die Konzentration der gelösten Proteine photometrisch bestimmt.

### 2.3.3 Präparation zytoplasmatischer Proteine

Die Biotin-Ligase BirA wurde durch Überexpression in *E. coli* (Vektor: pET22b, w/6(His)tag, modifiziert mit der BirA-Erkennungssequenz) selbst hergestellt.

Lysis-Puffer	30 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM PMSF, pH 8,0
Elutions-Puffer	30 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 100 mM Imidazol, pH 8,0
Puffer A	20 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 µg/ml Natriumazid
Puffer B	20 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM NaCl 1 µg/ml Natriumazid

Das Bakterienpellet wurde bei 37°C aufgetaut und in 50 ml Lysis-Puffer resuspendiert. Das Lysat wurde 10-mal 30 s beschallt (30 % Leistung) und anschließend 10 min bei 14.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine TALON™ Metal Affinity Säule geladen, bei der das Histidin-Tag der Biotinligase an die Säule bindet. Das nicht-absorbierte Material wurde mit 50 ml Lysis-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution der Biotinligase BirA mittels 50 ml Elutions-Puffer. Das eluierte Material wurde in 12 Fraktionen aufgefangen.

Durch photometrische Messung der Absorption bei 280 nm wurden die Fraktionen ausgewählt, in denen sich die größte Proteinmenge befand, und einer Dialyse gegen Aqua dest. unterzogen. Das eluierte Material wurde in einen 10 cm langen Dialyseschlauch gefüllt. Dieser Dialyseschlauch wurde in ein Gefäß mit Wasser gegeben und auf dem Schüttler bei 4°C inkubiert. Alle 2 h wurde das Wasser ausgetauscht.

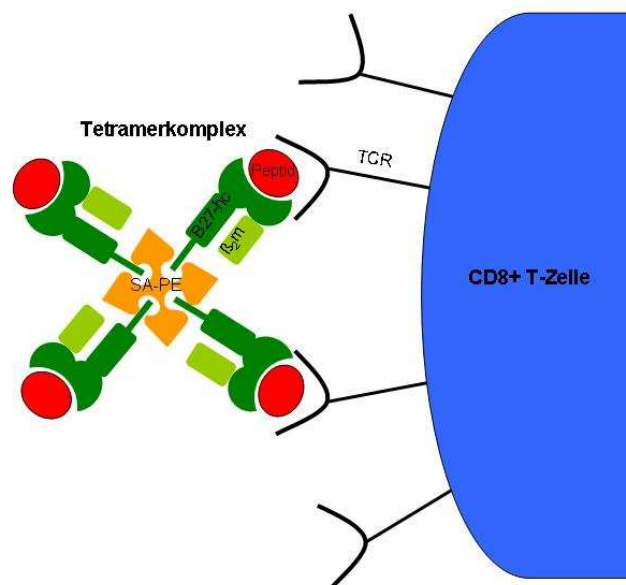
Um die Biotinligase von verunreinigten Proteinen zu befreien, wurde im Anschluss an die Dialyse eine Ionenaustauschchromatographie mit einer Mono-S® Säule durchgeführt:

<b>Schritt</b>	<b>Zeit bei 1 ml/min (min)</b>	<b>Anteil Puffer B (%)</b>
Laden der Probe:	0 - 10	0
Elutionsgradient:	10 - 30	1 - 50
	30 - 31	50 - 100
	31 - 31	100 - 0
Säule waschen:	32 - 40	0

Die eluierten Peaks wurden durch SDS-Page analysiert und die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt. Die biochemische Aktivität des Enzyms wurde an einem aufgefalteten HLA-B27/Peptid-Komplex getestet.

#### 2.3.4 Auffaltung und Biotinylierung von HLA-B27/Peptid-Tetrameren

Ein HLA-I/Peptid-Komplex besteht aus drei unterschiedlichen Komponenten: einer variablen, die Spezifität bestimmenden schweren Kette, dem  $\beta_2M$  als konstantem Bestandteil und einem ebenfalls variablen entsprechenden Peptid. Für die Generierung von HLA-B27/Peptid-Tetrameren können diese drei Komponenten unabhängig voneinander rekombinant oder synthetisch hergestellt werden, bevor sie während eines Renaturierungsschrittes gemeinsam die gewünschte Konformation eines HLA-I/Peptid-Monomeres herstellen. Dieser Vorgang wird Auffaltung genannt. Mit Hilfe der Biotinligase BirA wird an jedes Monomer gezielt ein Biotinmolekül geknüpft über das die HLA-I/Peptid-Monomere mit fluoreszenzmarkierten Streptavidin multimerisiert werden (135).



**Abb. 11.: Schematischer Aufbau eines HLA-I/Peptid-Tetramer-Komplexes.** Ein HLA-I/Peptid-Tetramer-Komplex besteht aus einer schweren Kette (*heavy chain*, B27-hc),

einer leichten Kette ( $\beta_2$ M) und dem Peptid von Interesse. Einzelne HLA-I/Peptid-Monomere werden nur schwach von den spezifischen TCR gebunden und dissoziieren schnell von der Oberfläche. Durch Multimerisierung kann diese Bindung stabilisiert werden. Die Tetramerisierung erfolgt durch ein Fluoreszenz-markiertes Streptavidin (SA-PE), an das jeweils vier Biotin-Moleküle binden.

HLA-B27-Lösung:	$\geq 10$ mg/ml HLA-B27 in Harnstofflösung
$\beta_2$ M-Lösung:	$\geq 10$ mg/ml $\beta_2$ M in Harnstofflösung
Peptidlösungen:	jeweils 10 mg/ml der Peptide #ChI8, #ChI68, #ChIC80, #ChI131, #ChI133, #ChI138, #ChI144, #ChI145, #ChI146, #ChI194, #ChI195, #ChI196, #A47, #A57, #A59, #A67, EBNA <sub>258-266</sub>
Auffaltungspuffer:	100 mM Tris-HCl, pH 8,3 400 mM L-Arginin 2 mM EDTA 20 %Glycerol
Injektionspuffer:	3 M Guanidin-HCl, pH 4,2 10 mM Natriumacetat 10 mM EDTA
Bicinpuffer	50 mM Bicin, pH 8,3
MgCl <sub>2</sub> -Lösung	1 M MgCl <sub>2</sub>
Biotinlösung:	40 mM Biotin in 20 mM Tris, pH 10,0
BirA-Lösung:	0,5 mg/ml rekombinante Bir A
ATP-Lösung:	0,2 M ATP in 20 mM Tris, pH 7,0
Puffer für Gelfiltration:	PBS

In ein autoklaviertes 500 ml Becherglas wurden 100 ml Auffaltungspuffer mit Rührmagnet gegeben und folgende eingewogene Substanzen darin gelöst: 200  $\mu$ M PMSF; 5 mM reduziertes Glutathion; 0,5 mM oxidiertes Glutathion und 3 mg Peptid.

Die  $\beta_2$ M-Lösung wurde mit Injektionspuffer soweit verdünnt, dass 2,4 mg  $\beta_2$ M in 500  $\mu$ l vorlagen. Aus der HLA-B27-Lösung wurden insgesamt 9,3 mg Protein mit dem Injektionspuffer gemischt, so dass insgesamt ein Volumen von 1,5 ml erreicht wurde. Die verdünnte  $\beta_2$ M-Lösung wurde mit einer Injektionsnadel (27G) direkt in den gerührten Puffer gegeben und unmittelbar darauf 500  $\mu$ l der verdünnten HLA-B27-Lösung auf die gleiche Weise appliziert. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei 4°C kontinuierlich gerührt. Am Folgetag wurde die Injektion von jeweils 500  $\mu$ l verdünnter HLA-B27-Lösung zweimal im Abstand von 6 h wiederholt und dabei das Gemisch weiter bei 4°C gerührt.

Das Volumen der Auffaltungsansätze wurde mit dem Tangentialflow-Rezirkulationsmodul reduziert. Dabei wurde der Puffer gleichzeitig gegen den Bicinpuffer für die

Biotinylierungsreaktion ausgetauscht. In das verbliebende Volumen von 6 ml wurden aus Stammlösungen folgende Reagenzien zu den entsprechenden Endkonzentrationen hinzugefügt: 8,4 mM MgCl<sub>2</sub>; 700 µM Biotin; 2,5 µg/ml Bir A; 8 mM ATP und 0,8 % Proteaseinhibitor-Cocktail. Dieser Biotinylierungsansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und anschließend durch Ultrafiltration mit dem Zentrifugalkonzentrator bei 2.000 g auf 1 ml konzentriert. Dieses Konzentrat wurde in einem Chromatographiesystem mit 1 ml/min des Puffers für die Gelfiltration auf eine Superose 12-Säule geladen und eluiert. Aus dem Elutionsprofil wurden Proteinkonzentrationen in den Peaks zwischen 12 und 16 ml bestimmt. Die Tetramerisierung der so hergestellten biotinylierten HLA-B27/Peptid-Komplexe erfolgte durch die schrittweise Zugabe von PE-markiertem Streptavidin in einem Verhältnis von 1,5 : 1. Der Erfolg der Multimerisierung wurde im SDS-PAGE überprüft.

Die Darstellung der Auffaltungsprofile und prozentuale Bestimmung der Anteile aufgefalteter HLA-B27/Peptid-Monomere bezogen auf alle Proteinaggregat erfolgte mit der UNICORN™-Software (GE Healthcare, München, DE).

### 2.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Nach der Bindung an ein Protein verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue R-250 von einer Wellenlänge von 465 nm auf 595 nm. Der bei 595 nm gemessene Extinktionskoeffizient (OD<sub>595</sub>) ist abhängig von der Proteinkonzentration einer Lösung. Eine unbekannte Proteinkonzentration wird im Vergleich zu einer Eichgeraden mit Proteinen einheitlicher Größe, wie z. B. Albumin, im gleichen Lösungsmittel wie die zu messende Probe bestimmt (160, 161).

Reaktionslösung: Bio-Rad Protein Assay dye reagent concentrate

Standardlösungen: 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/ml Albumin im Lösungsmittel der Probe unbekannter Konzentration

Duplikate von 780 µl PBS mit 0,1 % Natriumazid und 20 µl jeder Standard- bzw. Probenverdünnung wurden in Einmalküvetten vorgelegt. Für den Nullwert wurden 20 µl proteinfreies Lösungsmittel verwendet. Jeder Ansatz wurde durch Pipettieren mit 200 µl Reaktionslösung gemischt und mindestens 5 min, jedoch höchstens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die OD<sub>595</sub> wurde gegen den Nullwert gemessen und die Mittelwerte der Standardkonzentrationen graphisch korreliert. Die Bestimmtheit der so erhaltenen Geraden lag im Bereich zwischen OD<sub>595</sub> 0,1 - 1,0 bei R<sup>2</sup> ≥ 0,95. Die unbekannt Konzentrationen der Proben wurden aus Gleichung dieser Regressionsgeraden ermittelt.

### 2.3.6 Darstellung von Proteinen in der SDS-PAGE

Die SDS-PAGE trennt Proteine unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihrem Molekulargewicht. Dazu wurde ein weitporiges Sammelgel (pH 6,8) über ein engmaschiges Trenngel (pH 8,8) gegossen (162).

SDS-Lösung:	10 % SDS
APS-Lösung:	5 % APS
Trenngel, 12,5 %	4,2 ml Acrylamid/bis-Lösung 2 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 100 µl SDS-Lösung 3,6 ml <i>A. dest.</i> 100 µl APS-Lösung 10 µl TEMED
Sammelgel, 3 %:	333 µl Acrylamid/bis-Lösung 625 µl 500 mM Tris-HCl, pH 6,8 25 µl SDS-Lösung 1,32 ml <i>A. dest.</i> 25 µl APS-Lösung 2,5 µl TEMED
5x Laufpuffer:	15 g Tris, Base 72 g Glycin 5 ml SDS-Lösung <i>ad</i> 1 l mit <i>A. dest.</i> mit HCl auf pH 8,3
4x Ladepuffer:	1,6 ml SDS-Lösung 1 ml 500 mM Tris-HCl, pH 6,8 800 µl Glycerol 400 µl 1 % Bromphenolblau 4,2 ml <i>A. dest.</i>
Waschlösung	15 % Methanol 5 % Essigsäure
Färbelösung	0,1 % Coomassie in Waschlösung

Die BioRad-Kammern wurden zusammengebaut und mit dem Trenngel gefüllt. Für die Polymerisationsdauer (30 min, RT) wurde die Matrix mit *Aqua dest.* überschichtet. Vor dem Einfüllen des Sammelgels, wurde das *Aqua dest.* möglichst vollständig entfernt. Der Kamm für die Auftragesaschen wurde eingeschoben und nach 30 min das fertige Gel in die Elektrophoresekammer eingehängt. Die Proben wurden mit 4 x Ladepuffer gemischt und 10 µl in jede Auftragesache pipettiert. In jedem Gel wurde ein gefärbter Protein-Standard (5 µl) mit aufgetragen. Die Proteine wurden bei einer Spannung von 100 V aufgetrennt.

Der Farbstoff Coomassie-Brilliant Blue R-250 lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäurereste und färbt damit Proteine an. Unspezifisch in die Gelmatrix eingelagerter Farbstoff wurde in mehreren Schritten ausgewaschen (160).

Das SDS-Gel wurde nach der Auftrennung der Proteine in 50 ml Färbelösung überführt und darin unter Schütteln über Nacht inkubiert. Die Färbelösung wurde abgegossen, das Gel drei- bis viermal mit 10 ml Waschlösung für je 15 - 20 min gespült. Die Dokumentation der SDS-Gele erfolgte mittels Digitalkamera.

## 2.4 Durchflusszytometrie

### 2.4.1 Standardlösungen und Puffer

FACS-Puffer	5 mg/ml BSA 0,01 % NaN <sub>3</sub> in PBS
Fixierungspuffer	2 % Formaldehyd in PBS
EDTA-Lösung	500 mM EDTA; pH 8,0
Permeabilisierungslösung	FACS™ <i>Permeabilization Solution</i>
Annexin V-Bindungspuffer	10 mM HEPES, pH 7,4 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl <sub>2</sub>

### 2.4.2 Nachweis von Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Die Durchflusszytometrie erfasst phänotypische und funktionelle Eigenschaften von Zellen, indem sie in einem Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert nacheinander an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden. Durch Einzelzellen gestreutes Licht korreliert mit der Zellgröße und reflektiertes mit der Granularität und der Membranfaltung der Zelle. Mit Hilfe Fluoreszenz-markierter Antikörper werden Zelltyp-spezifische Strukturen dargestellt. Die Anzahl Antikörper-tragender Zellen und die Intensität der Fluoreszenz geben Auskunft über die Verbreitung und Expressionshöhe eines Antigens. (163). Fluoreszenzmarkierte HLA I/Peptid-Tetramere binden an spezifische TCR auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die das entsprechende Peptid z.B. aus *Chlamydia trachomatis* oder humanem Aggrecan EBNA<sub>258-266</sub> im Kontext des HLA-Moleküls erkennen. In Kombination mit Antikörpern für Markermoleküle von T-Zellsubpopulationen können Antigen-spezifische T-Zellen durchflusszytometrisch beschrieben werden (135).

PBMNC oder Zellen einer Antigen-spezifischen T-Zell-Linie wurden in PBS gewaschen und jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen mit 10 µg/ml der entsprechenden HLA-B27/Peptid-Tetramere



in einem Volumen von 50 µl bei Raumtemperatur 20 min im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden in FACS-Puffer gewaschen und anschließend 10 min im Dunkeln mit 50 µl der folgenden Antikörperkombinationen gefärbt:

<b>Antigen</b>	<b>Maus-spezifisch</b>		<b>Mensch-spezifisch</b>	
	<b>Klon</b>	<b>Markierung</b>	<b>Klon</b>	<b>Markierung</b>
CD8	53-6.7	Allophycocyanin	SK1	PerCP
CD3	145-2C11	PerCP	UCHT1	Cy5

Nach dem Waschen in FACS-Puffer wurde das Zellpellet mit 1 µl Annexin V-AlexaFluor®488 in 50 µl Annexin V-Bindungspuffer aufgenommen, 15 min im Dunkeln inkubiert und mit 200 µl Annexin V-Bindungspuffer aufgefüllt. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte im direkten Anschluss an die Färbung. In der Regel wurden aus jeder Probe  $2 \times 10^5$  Zellen durchflusszytometrisch erfasst. Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Daten mit der Software CellQuest™ wurde die Lymphozytenpopulation zunächst über die Größe und Granularität der Einzelzellen definiert, bevor mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern definierte Parameter einbezogen und kombiniert wurden.

### 2.4.3 Nachweis intrazellulärer Zytokine

T-Zellen können über die Induktion der IFN $\gamma$ -Produktion nach unspezifischer Stimulation oder nach Stimulation mit einem entsprechenden Antigen analysiert werden (164, 165). Brefeldin A inhibiert den Vesikel-Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat und so akkumulieren induzierte Proteine in der Zelle (166). Zur Darstellung intrazellulärer Proteine mit Hilfe von Antikörpern müssen die Membranen permeabilisiert werden ohne, dass die Integrität der Einzelzelle verloren geht. Das kann durch das Detergenz Saponin erreicht werden (167).

Vollblut (200 µl),  $1 \times 10^6$  isolierte PBMNC bzw. SFMNC,  $1 \times 10^6$  murine Milzzellen oder  $2 \times 10^5$  Zellen der Antigen-spezifischen T-Zelllinie mit  $1 \times 10^6$  CFDA-markierten autologen APC wurden in 1 ml AB-Medium mit 10 µg/ml der entsprechenden HLA-B27-restringierten Peptide und 1 µg/ml anti-CD28 bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrollen dienten Ansätze mit 5 µg/ml SEB bzw. mit 50 ng/ml PMA in Kombination mit 1 µg/ml Ionomycin. Nach 2 h wurde zu den Proben 10 µg/ml Brefeldin A gegeben und die Inkubation für weitere 4 h fortgesetzt. Alle Ansätze erhielten 2 mM EDTA, wurden gut gemischt und für 15 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in 1 ml Fixierungspuffer für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer erfolgte die Inkubation mit Permeabilisierungslösung für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln und die Zellen wurden mit 50 µl folgenden Antikörperkombinationen 30 min ebenfalls im Dunkeln inkubiert:

<b>Antigen</b>	<b>Maus-spezifisch</b>		<b>Mensch-spezifisch</b>	
	<b>Klon</b>	<b>Markierung</b>	<b>Klon</b>	<b>Markierung</b>
CD8	53-6.7	Allophycocyanin	SK1	PerCP
CD69	H1.2F3	FITC	L78	PE
IFN $\gamma$	XMG1.2	PE	B27	Allophycocyanin
CD3	145-2C11	PerCP	UCHT1	Cy5

Nach dem Waschen in FACS-Puffer wurde das Zellpellet mit 500 µl FACS-Puffer und durch FACS wie oben beschreiben analysiert.

## 2.5 Magnetische Zellisolierung (MACS)

Bei der magnetischen Zellsortierung werden die Zielzellen durch Konjugate aus monoklonalen Antikörpern und kleinen superparamagnetischen Partikeln (*Microbeads*) markiert (168) und über eine spezielle Trennsäule, die sich in einem starken Magnetfeld befindet, gegeben. Die unmarkierten Zellen passieren die Säule ungehindert, während die markierten Ziel-Zellen erst außerhalb des Magnetfeldes ausgespült werden (169).

MACS-Puffer:                    PBS, pH 7,2  
                                      0,5 % BSA  
                                      2 mM EDTA

5 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden, wie unter Punkt 2.4.2 beschrieben, mit 10 µg/ml des entsprechenden Tetramers für 20 min bei Dunkelheit inkubiert, mit MACS-Puffer bei 300 g 10 min gewaschen und in 80 µl MACS-Puffer resuspendiert. Dazu wurden 20 µl Anti-PE-MicroBeads gegeben, gut gemischt und 15 min im Kühlschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit MACS-Puffer bei 300 g 10 min gewaschen und das Pellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert.

Die Säule wurde in den Magneten eingesetzt und mit 500 µl MACS-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Die unmarkierten Zellen wurden dreimal mit MACS-Puffer gewaschen und als Negativfraktion gesammelt.

Die Säule wurde vom Magneten entfernt und in der Säule zurückgehaltene Zellen wurden mit 1 ml MACS-Puffer eluiert. Um eine größere Reinheit zu erzielen, wurde der Schritt der magnetischen Zell-Separation wiederholt. Der Erfolg der MACS-Isolierung wurde in der Durchflusszytometrie überprüft. Die Methode kam bei der Anreicherung von #A67-Peptid-spezifischen CD8+ T-Zellen zum Einsatz.

## 2.6 Immunhistologische Methoden

### 2.6.1 Standardlösungen und -puffer

PFA-Stammlösung	241,66 ml A. dest. (60°C) 20 g PFA 40 µl 1 M NaOH
Phosphatpuffer	23 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5,244 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> auf 1 l mit A. dest., pH 7,4
2% PFA-Lösung	25 ml PFA-Stammlösung 75 ml Phosphatpuffer
10 x TBS	132,2 g Tris-HCl 19,4 g Tris, Base 90 g NaCl 855 ml A. dest.

### 2.6.2 Zytozentrifugation von Zellen

Zellen lassen sich durch Zentrifugation auf Objektträger bringen und sind anschließend unmittelbar (immun)histologischen Techniken zugänglich.

Die Zellen wurden in PBS gewaschen und anschließend auf eine Konzentration von  $0,5 \cdot 10^5$  Zellen in 50 µl PBS mit 4% BSA eingestellt. Das Filterpapier wurde mit 50 µl PBS/4%BSA angefeuchtet und 3 min bei 80 g zentrifugiert. Anschließend wurden 50 µl der Zellsuspension aufgetragen und 3 min bei 80 g zentrifugiert. Die Objektträger wurden luftgetrocknet und die Zellen 10 min in Aceton fixiert. Für nachfolgende Untersuchungen konnten sie entweder sofort verwendet oder in Alufolie eingewickelt eingefroren werden (-80°C).

### 2.6.3 Herstellung von Gewebeschnitten aus dem Milzgewebe der Maus

Das Milzgewebe immunisierter Mäuse wurde in Tissue-Tek<sup>®</sup> eingebettet und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. 5 - 7 µm dicke Schnitte wurden bei einer Temperatur von -14°C

angefertigt und auf beschichtete Objektträger (Super Frost®Plus) überführt. Die Schnitte wurden 5 min getrocknet und sofort für die *in situ* Tetramerfärbung verwendet.

#### 2.6.4 Präparation und immunhistochemische Färbung von entkalktem Knochen

Ein Teil der Hüftköpfe wurde in 4 % Phosphat-gepuffertem Formaldehyd fixiert und mit 100 mM EDTA pH 7,4 für 4 - 14 Tage bei 40°C entkalkt. Das Gewebe wurde in Paraffin eingeblockt. Es wurden 4 - 6 µm dicke Schnitte angefertigt und über Nacht bei 37°C getrocknet.

Vor der Färbung wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und Antigene mittels Wärmebehandlung wieder freigelegt.

<b>Antigen</b>	<b>Behandlung</b>
CD3 (F7.2.38)	5 min, 121°C, 1 atm Überdruck
CD8 (C8/144B), CD56 (123C3)	2 min, 121°C, 1 atm Überdruck
CD34 (QBend10), CD68 (PG-M1), S100	10 min, 70°C

Der sekundäre Alkalische Phosphatase–anti–Alkalische Phosphatase Komplex wurde mit *Fast Red* visualisiert. Die Schnitte wurden im Lichtmikroskop analysiert.

#### 2.6.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbungen)

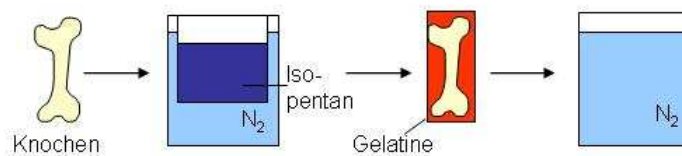
Entparaffinierte Knochenschnitte wurden 5 min mit Hämalaun inkubiert und anschließend in Leitungswasser gespült. Hämalaun färbt alle basophilen Strukturen blau, insbesondere Zellkerne. Die anschließende Färbung mit Eosin für 4 min führte zur Markierung der Zytoplasmaproteine. Die Schnitte wurden anschließend in Aqua dest. gespült. Durch weitere Spülschritte über Alkohollösungen in aufsteigender Konzentration wurden die Schnitte entwässert. Das Eindecken erfolgte mit Enthelan.

#### 2.6.6 Präparation von schockgefrorenem unentkalktem Knochen

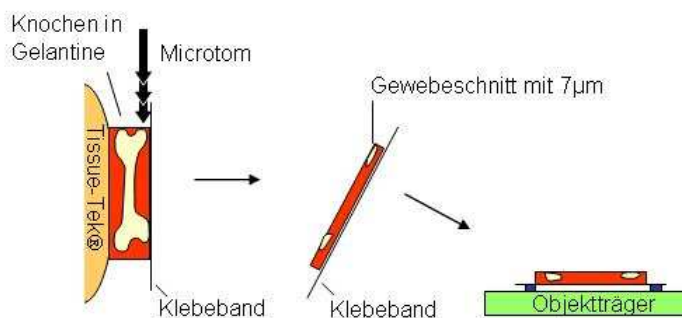
Das Knochenmaterial wurde direkt nach der Entnahme in 5 mm dicke Scheiben zersägt. Ein Teil der Hüftköpfe wurde in Isopentan unter flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Zum Schneiden wurde das gefrorene Knochengewebe in 8 %iger Gelatine eingebettet und wieder langsam in flüssigem Stickstoff eingefroren (Abb. 12 A).

Cryoschnitte wurden im Mikrotom bei  $-23^{\circ}\text{C}$  und mit Stahl-D-Messern unter einem Winkel von  $14^{\circ}$  angefertigt. Das Knochengewebe wurde mit Tissue-Tek<sup>®</sup> auf den Objektisch aufgefroren und an der Oberfläche wurde ein Tesafilmstreifen befestigt. Bei langsamer Geschwindigkeit wurde ein  $7\mu\text{m}$ -dicker Schnitt angefertigt, der sich danach auf dem Tesafilm befand. Der Tesafilm wurde mit klebender Seite nach oben auf einem Objektträger befestigt (Abb. 12 B). Die Schnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und am folgenden Tag fixiert und gefärbt.

### A Einbettung



### B Gefrierschnitte



**Abb. 12: Präparation von schockgefrorenem unentkalktem Knochenmaterial**

#### 2.6.7 Immunfluoreszenz

Das über Nacht getrocknete unentkalkte Knochengewebe wurde mit einem Fettstift umkreist, um mit möglichst geringen Mengen Antikörpern bei der Färbung auszukommen. Die Schnitte wurden 2 min in 2 % PFA-Lösung fixiert und anschließend in TBS rehydriert. Unspezifische Antikörperbindungen wurden mit 5 % Esel-Serum für 20 min blockiert. Für intrazelluläre Färbungen wurde diesem Blockierungsschritt noch 0,1 % Triton-X100 zugefügt. Die Schnitte wurden 1 h bei Raumtemperatur mit den primären Antikörpern inkubiert. Nach drei-maligem Waschen für 5 min in TBS folgte eine 45-minütige Inkubation mit den jeweiligen sekundären Antikörpern. Die Schnitte wurden in TBS gewaschen, 3 min

mit DAPI (1 : 3000) versetzt und in TBS gespült. Der Tesafilm wurde auf einem neuen Objektträger transferiert und die Schnitte mit Fluoromount G eingedeckt. Die Fluoreszenzen wurden mittels Fluoreszenzmikroskop und der Soft Imaging Software oder mittels LSM und der AIM 3.2 Software analysiert.

### 2.6.8 Färbung der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP)

Die Bildung einer TRAP ist ein typisches Merkmal von Osteoklasten. Der Nachweis der TRAP hat sich deshalb als Standardverfahren zur Detektion dieses Zelltyps durchgesetzt (170, 171). Zur Kombination des TRAP-Nachweises mit anderen Markern wird in der Immunfluoreszenz ELF®97 verwendet, ein Substrat, das durch die TRAP in ein stark gelbgrün fluoreszierendes Reaktionsprodukt umgewandelt wird (172).

Fixierlösung	25 ml Citrat-Lösung 65 ml Aceton 8 ml 37 % Formaldehyd
TRAP-Färbelösung	45 ml ionisiertes Wasser, auf 37°C vorgewärmt 0,5 ml <i>Fast Garnet GBC</i> -Lösung 0,5 ml Natriumnitrit-Lösung 0,5 ml Naphthol AS-BI Phosphat-Lösung 2,0 ml Azetatlösung 1,0 ml Tartratlösung
ELF®97-Färbelösung	10 µl ELF®97 Substrat 44 µl Azetatlösung 11 µl Natriumnitrit-Lösung 22 µl Tartratlösung 913 µl entionisiertes Wasser

Für die Immunhistochemie wurden die Objektträger mit den Gefrierschnitten der Knochen 30 s in Fixierlösung fixiert und in Leitungswasser gespült. Die Objektträger wurden in Küvetten mit der TRAP-Färbelösung bei 37°C ins Wasserbad gestellt, nach 1 h in entionisiertem Wasser gespült und die Zellkerne mit Hämalaun gegengefärbt.

Für die Fluoreszenzdoppelmarkierung wurden die Knochen-Gefrierschnitte 30 s in eiskaltem Aceton fixiert und in TBS gespült. Die Gewebeschnitte wurden 15 min bei 37°C mit 100 µl der ELF®97-Färbelösung inkubiert, mit TBS gespült, und anschließend wurden wie unter 2.6.7 beschrieben, die Fluoreszenzfärbungen durchgeführt.

## 2.7 Statistische Auswertung

Bei mehr als einem Messwert in einer Gruppe wurde der Mittelwert berechnet und die Standardabweichung (SD) nach folgender Formel ermittelt:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

(s: Standardabweichung, n: Anzahl der Messwerte einer Gruppe,  $X_i$ : Messwert X: Mittelwert)

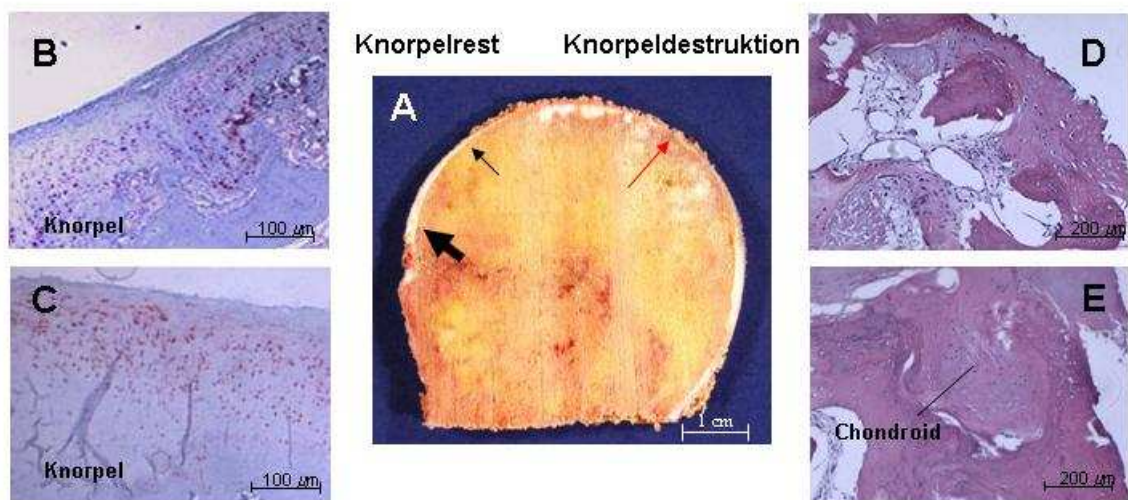
Der statistische Vergleich mehrerer Versuchsgruppen erfolgte mit dem Programm SigmaStat 3.0 Software (Systat Software, Erkrath, Deutschland). Wenn nichts anders erwähnt ist, wurden die  $p$ -Werte durch einen nicht-parametrischen Test nach Mann-Whitney ermittelt.  $P$ -Werte  $> 0,05$  wurden als nicht-signifikant (n.s.) gewertet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Histopathologie des Knorpel/Knochen-Übergangs in Femurköpfen aus AS-Patienten mit Bezug auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen

##### 3.1.1 Histomorphologie

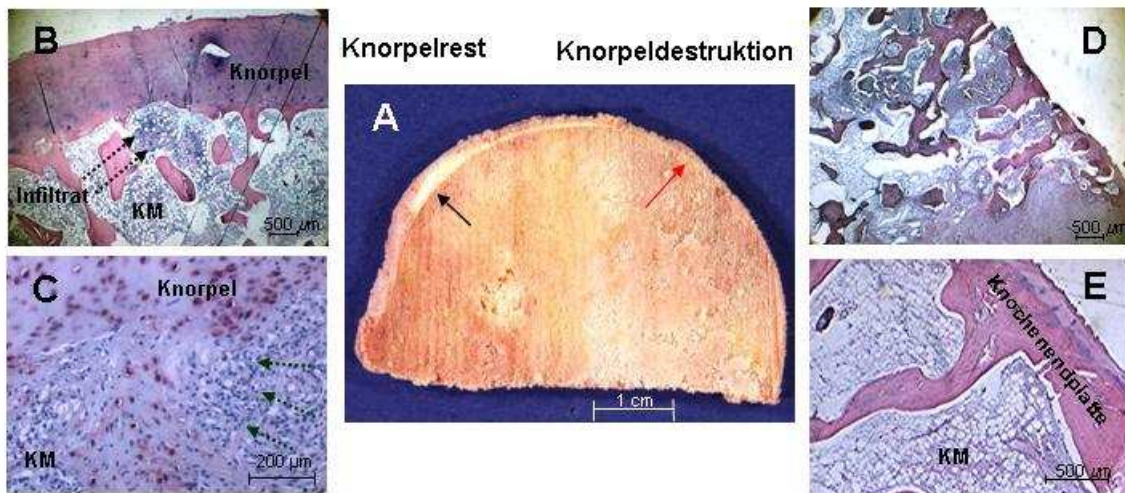
Bei AS-Patienten mit einer fortgeschrittenen Hüftarthrititis wurden die Hüftgelenke durch Endoprothesen ersetzt. Insgesamt standen 16 operativ entfernte Hüftgelenke für histologische Untersuchungen zur Verfügung. Zunächst wurde der Grad der Veränderung des Knorpels auf der Gelenkoberfläche bewertet. Die Abb. 13 und 14 zeigen exemplarisch die Makro- und Histopathologie der Femurköpfe.



**Abb. 13: Histologie des Gelenkknorpels eines Femurkopfes von einem AS-Patienten.**

(A) Der explantierte Femurkopf eines AS-Patienten wurde in Scheiben (2 mm Dicke) geschnitten und makroskopisch dokumentiert. Bereiche mit Knorpelresten (schwarze Pfeile) und Areale mit völliger Knorpelzerstörung (rote Pfeile) auf der Gelenkoberfläche sind angezeigt. (B, C) Paraffinschnitte (4 µm) von Arealen mit Resten von Knorpel auf der Gelenkoberfläche wurden mit anti-S100 gefärbt. Originalvergrößerung: x200. (D, E) Bereiche mit kompletter Knorpelzerstörung wurden mit HE gefärbt. Originalvergrößerung: x100. Alle Schnitte aus B - E wurden mittels Durchlichtmikroskopie untersucht. Abgebildete Bereiche stehen exemplarisch für Proben aus 16 untersuchten Femurköpfen.





**Abb. 14: Histologische Besonderheiten im Knochengewebe des Femurkopfes eines AS-Patienten.** (A) Ein Femurkopf wurde wie für Abb. 13A beschrieben makroskopisch beurteilt. Bereiche mit Knorpelresten (schwarze Pfeile) und Areale mit völliger Knorpelzerstörung (rote Pfeile) auf der Gelenkoberfläche sind angezeigt. (B, D und E) Dünne Schnitte (4 µm) von entkalktem und Formalin-fixierten Hüftknochen wurden mit HE gefärbt. (C) Paraffinschnitte von Arealen mit Resten von Knorpel auf der Gelenkoberfläche wurden mit anti-S100 gefärbt. Bereiche mit (B, C) und ohne Knorpel auf der Oberfläche (D, E) wurden in der Durchlichtmikroskopie histologisch beurteilt. Originalvergrößerung: x50 (B, D, E) bzw. x100 (C). Abgebildete Bereiche sind exemplarisch für Proben aus 16 untersuchten Femurköpfen. Die Pfeile markieren lymphozytäre Aggregate.

Die makroskopischen Aufnahmen der Hüftgelenke von AS-Patienten (Abb. 13 A und 14 A) zeigen ein typisches Bild von Bereichen mit Knorpelresten und Arealen mit völliger Knorpelzerstörung auf der Gelenkoberfläche. Untersuchte man die Gelenkknorpel immunhistologisch durch Färbung für S100 als Marker für Chondrozyten, so zeigten sich im Bereich mit breiter Knorpelzone auf der Gelenkoberfläche zahlreiche homogen gefärbte Knorpelzellen (Abb. 13 C), während die Knorpelzellen im Bereich mit schmalen Knorpelsaum heterogen verteilt sind und diese Zellen teilweise atroph erschienen (Abb. 13 B). Dagegen zeigte das Gewebe mit völliger Knorpelzerstörung häufig eine chondroide Metaplasie des Bindegewebes vom Knochenmark ausgehend als Reaktion auf die andauernden Druckbelastungen (Abb. 13 D). Die Abb. 13 E stellt einen Bereich mit chondroider Metaplasie dar.

In den subchondralen Bereichen des Knochenmarkes, wurden in Bereichen mit Knorpel auf der Oberfläche in allen Hüftgelenken subchondrale lymphozytäre Infiltrate, Knochenmarksödeme und eine Ausdünnung der subchondralen Knochenendplatte gefunden. Regelmäßig wurden lymphozytäre Aggregate im zellreichen subchondralen Knochenmark beobachtet (Abb. 14 B). In anderen Bereichen mit Knorpel waren mononukleäre Zellen zu finden, die vom subchondralen Knochenmark aus den Knorpel infiltrierten (Abb. 14 C).

In der Histologie der Hüftgelenke in Bereichen ohne Knorpel war das Bild anders. Völlige Knorpelzerstörung führte zur sogenannten Knorpelglatze mit teilweiser Freilegung des subchondralen Knochens (Abb. 14 D). Interessanterweise war in diesen Bereichen die Dichte mononukleärer Zellinfiltrate im subchondralen Knochenmark deutlich geringer bzw. waren keine Ansammlungen lymphozytärer Aggregate zu finden (Abb. 14 E). Man sah in diesem Bereich eine dicke Knochenendplatte.

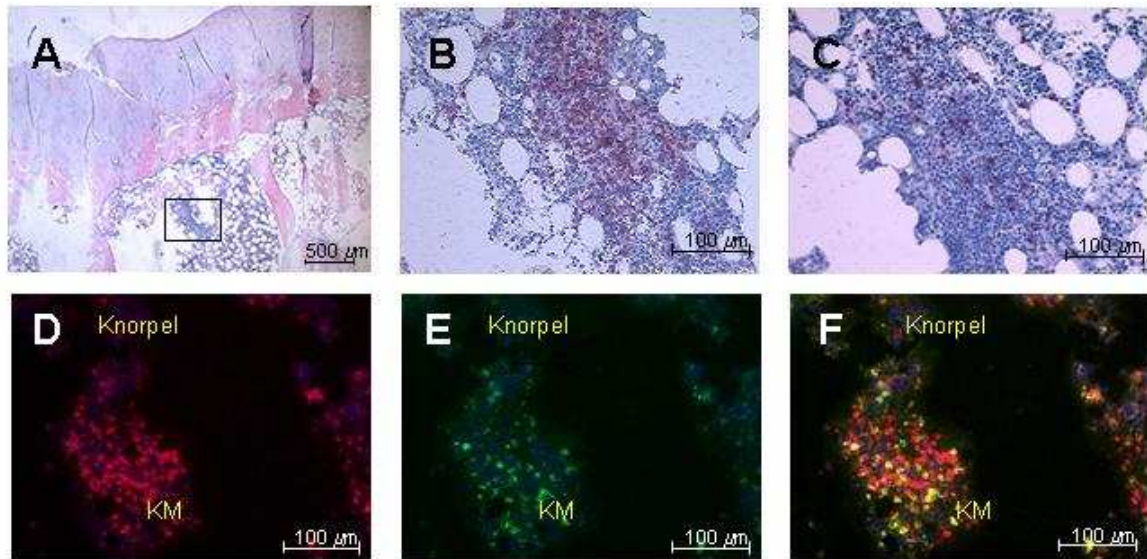
Mit nachfolgenden Zelltyp-spezifischen immunhistologischen Färbungen wurde die *in-situ*-Verteilung verschiedener Zell(sub)populationen aus den Bereichen der Femurköpfe mit Knorpel mit denen aus Bereichen ohne aufliegenden Knorpel verglichen.

### **3.1.2 Subchondrale T-Zell-Infiltrate**

In den vorangegangenen Schnitten wurde das Knochenmaterial vor den Färbungen schrittweise mit Formalin fixiert, durch Behandlung mit EDTA entmineralisiert, in Paraffin eingebettet und schließlich die Antigene durch Hitzebehandlung demaskiert. Durch die frühe Fixierung nach der Probennahme werden einerseits zelluläre Strukturen sehr gut erhalten, andererseits sind viele Antikörper weniger sensitiv für Markermoleküle in formalinfixiertem Gewebe, im Vergleich zu Gefrierschnitten (173, 174).

Eine im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Methode zur Präparation von Knochenmaterial machte schockgefrorenes, unentkalktes Knochengewebe für die Immunhistologie zugänglich. Diese Prozedur war nicht nur schonend für das Gewebe, sondern ermöglichte immunhistochemische Mehrfachfärbungen und Mehrfachanalysen *in situ* durch die Immunfluoreszenz.

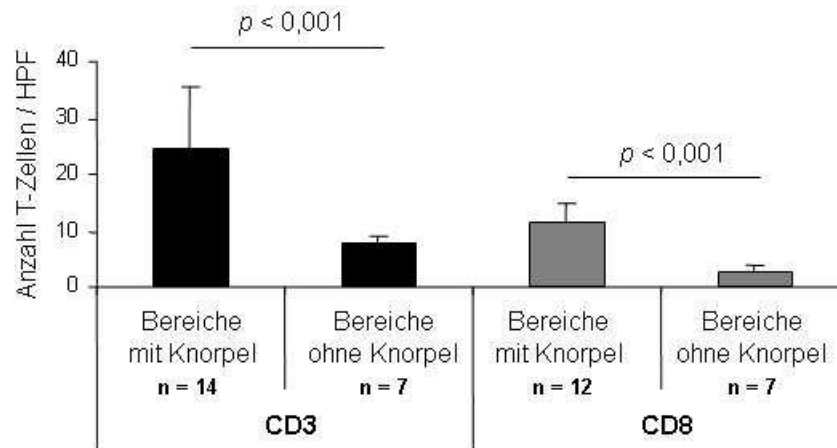
Zunächst wurde die Zusammensetzung der Infiltrate mononukleärer Zellen hinsichtlich der T-Zellen untersucht. Dabei wurden vorrangig potentiell zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen betrachtet, die über spezifische Peptide im Kontext von HLA-I-Molekülen induziert und/oder aktiviert werden können und damit vermutlich ursächlich an der Entstehung und Aufrechterhaltung lokaler Entzündungen bei der AS beteiligt sind (Abb. 15).



**Abb. 15: Identifizierung subchondraler CD8<sup>+</sup> T-Zell-Infiltrate im Hüftgelenk bei AS-Patienten.** (A) Dünne Schnitte (4 µm) von entkalkten und Formalin-fixierten Hüftknochen wurden mit HE gefärbt. Eine Übersicht eines Oberflächenbereiches mit Knorpel ist exemplarisch gezeigt. Konsekutive Schnitte wurden immunhistochemisch mit anti-CD3 (B) und anti-CD8 (C) gefärbt. Gefrierschnitte (7 µm) aus vergleichbaren Bereichen mit Knorpel auf der Oberfläche wurden mit Doppelfärbungen in der Immunfluoreszenz mit anti-CD3 (D, rot), anti-CD8 (E, grün) gefärbt und CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Übereinanderlagerung der beiden Fluoreszenzen dargestellt (F, gelb). Die Analyse erfolgte in der Durchlicht- und in der Fluoreszenzmikroskopie. Alle abgebildeten Bereiche sind exemplarisch für Proben aus 14 von 16 untersuchten Femurköpfen. Originalvergrößerungen: x50 (A) bzw. x200 (B - F).

Mononukleäre Infiltrate (Abb. 15 A) wurden immunhistochemisch T-Zell-Follikel identifiziert (Abb. 15 B). Der Anteil von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den beurteilten follikulären Strukturen betrug bis zu 47 % (Abb. 15 C). Die Verteilung subchondraler Aggregate, die hier in Formalin-fixiertem Gewebe gefunden wurde, wurde auch durch Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von Gefriermaterial bestätigt (Abb. 15 D - E). Diese Doppelfärbungen gestatteten die gleichzeitige Beurteilung beider Oberflächenmarker auf einer Zelle.

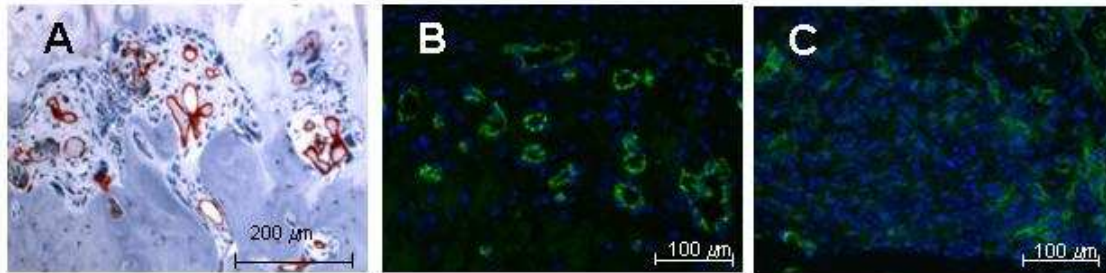
Die T-Zellen in subchondralen Aggregaten aus Femurköpfen von Patienten mit AS wurden aus der immunhistochemischen Färbung quantifiziert. Dabei wurden Bereiche mit und ohne Knorpel verglichen (Abb. 16).



**Abb. 16: Quantitativer Vergleich der zellulären Zusammensetzung subchondraler T-Zell-Aggregate in Abhängigkeit von der Knorpeldicke.** Wie für **Abb. 15 B, C** beschrieben, wurden Schnitte von Formalin-fixiertem Knochengewebe von Femurköpfen bei Patienten mit AS immunhistochemisch mit anti-CD3 (rot) bzw. anti-CD8 (grün) gefärbt. Für jeden Patienten wurden die CD3<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen jeweils aus einem HPF aus Bereichen mit und ohne Knorpel auf der Oberfläche gezählt. Mittelwerte ± SD aus Proben von mindestens 7 und maximal 14 AS-Patienten.

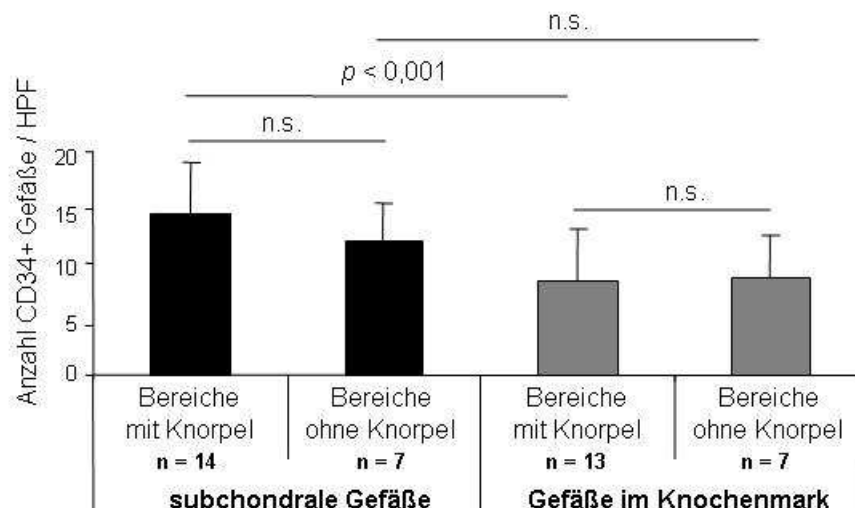
Der quantitative Vergleich subchondraler T-Zell-Aggregate zeigte im Bereich mit Knorpel auf der Gelenkoberfläche  $24,43 \pm 11,04$  CD3<sup>+</sup> T-Zellen pro HPF. Im Vergleich dazu war die Anzahl der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in Bereichen mit völliger Knorpelzerstörung signifikant um etwa den Faktor 3 reduziert ( $p < 0,001$ ). Im subchondralen Knochenmark waren etwa die Hälfte aller CD3<sup>+</sup> T-Zellen auch CD8<sup>+</sup>, was für eine lokale Anreicherung potentiell zytotoxischer T-Zellen sprach. Wie für die T-Zellen insgesamt, war auch die Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Bereichen mit Knorpel auf der Oberfläche wesentlich größer ( $11,33 \pm 3,58$  pro HPF) und bei fehlendem Knorpel auf der Oberfläche in vergleichbarem Maße wie Gesamt-T-Zellpopulation signifikant verringert ( $p < 0,001$ ).

Sollen zirkulierende T-Zellen in Gewebe einwandern, sind Blutgefäße eine wichtige Voraussetzung. Der Gelenkknorpel wird unter physiologischen Bedingungen nicht durch Blutgefäße versorgt. In den betroffenen Knorpel/Knochen-Übergängen bei Patienten mit AS wurden aber neugebildete Blutgefäße gefunden. Diese im Zwischenraum vom Knochen und Knorpel, sowie im subchondralen Knochenmark befindlichen Gefäße wurden mit anti-CD34 Antikörper als Endothelzellmarker in den extrahierten Femurköpfen untersucht (Abb. 17).



**Abb. 17: *In situ*-Darstellung von Blutgefäßen im Knochenmark in Bereichen mit Knorpel auf der Oberfläche von Femurköpfen bei AS-Patienten.** (A) Dünne Schnitte (4 µm) von entkalkten und Formalin-fixierten Hüftknochen wurden immunhistochemisch mit anti-CD34 gefärbt. Gefrierschnitte (7 µm) aus vergleichbaren Regionen wurden in der Immunfluoreszenz mit anti-CD34 (grün) gefärbt und die Zellkerne durch DAPI (blau) dargestellt. Doppelfärbung im subchondralen (B) bzw. im tiefergelegenen Knochenmark (C). Die Analyse erfolgte in der Durchlicht- und in der Fluoreszenzmikroskopie. Alle abgebildeten Bereiche sind exemplarisch für Proben aus 14 von 16 untersuchten Femurköpfen. Originalvergrößerungen: x200.

In Bereichen des Femurkopfes, in denen sich noch Knorpel auf der Oberfläche befanden, wurden Blutgefäße beobachtet, die in den Knorpel invadieren und ihren Ursprung im subchondralen Knochenmark hatten. Der Grad der Gefäßneubildung wurde aus der Immunfluoreszenz-mikroskopischen Darstellung an Hand der CD34<sup>+</sup> Zellen quantifiziert (Abb. 18).

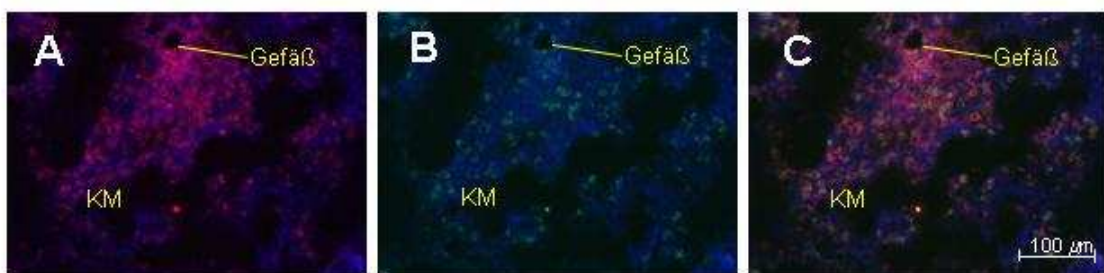


**Abb. 18: Quantitativer Vergleich CD34<sup>+</sup> Gefäße in Bereichen mit und ohne Knorpel auf der Oberfläche von Femurköpfen bei Patienten mit AS.** Wie für Abb. 17 A beschrieben, wurden Schnitte von Formalin-fixiertem Knochengewebe immunhistochemisch mit anti-CD34 gefärbt. Für jeden Patienten wurden die den Gefäßen zugeordneten CD34<sup>+</sup> Zellen jeweils aus einem HPF aus Bereichen mit und ohne Knorpel auf der Oberfläche gezählt. Dabei wurde zwischen subchondralen Gefäßen und Gefäßen aus dem tieferen



Knochenmark unterschieden. Mittelwerte  $\pm$  SD aus Proben von mindestens 7 und maximal 14 AS-Patienten.

Die Anzahl subchondraler Blutgefäße war in Bereichen mit Knorpel auf der Oberfläche leicht, aber nicht signifikant im Vergleich zu den Regionen mit völliger Knorpelzerstörung erhöht. Im Knochenmark war die Anzahl der Gefäße unabhängig von der Anwesenheit von Knorpelgewebe. Interessanterweise war in Bereichen mit Knorpel auf der Gelenkoberfläche die Anzahl subchondraler Gefäße im Vergleich zum darunter liegenden Knochenmark, signifikant erhöht ( $p > 0,001$ ). Ob die starke Vaskularisierung unter diesen Bedingungen unmittelbar die Einwanderung von T-Zellen in den Knorpel begünstigt, wurde im Folgenden analysiert (Abb. 19).



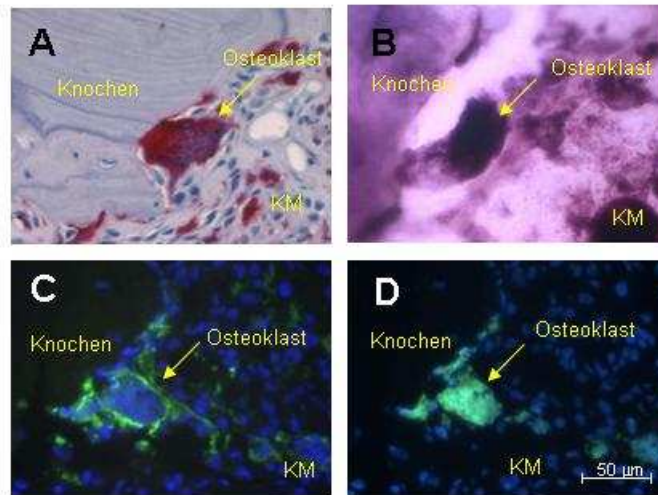
**Abb. 19: Perivaskuläres T-Zellinfiltrat im subchondralen Knochenmark des Femurkopfes von AS-Patienten.** Wie für Abb. 15 B, C beschrieben wurden Schnitte von Formalin-fixiertem Knochengewebe von Femurköpfen bei Patienten mit AS immunhistochemisch mit anti-CD3 (A; rot) bzw. anti-CD8 (B; grün) gefärbt. CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind in der Übereinanderlagerung der beiden Fluoreszenzen dargestellt (C; gelb). In allen Darstellungen sind die Zellkerne DAPI gegengefärbt (blau). Exemplarische Darstellung aus dem Femurkopf eines AS-Patienten. Originalvergrößerung: x200.

Diese deutliche perivaskuläre Anordnung infiltrierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen gab einen Hinweis darauf, dass die Einwanderung von T-Zellen im Zusammenhang mit der Vaskularisierung der entsprechenden Knorpelbereiche stehen könnte.

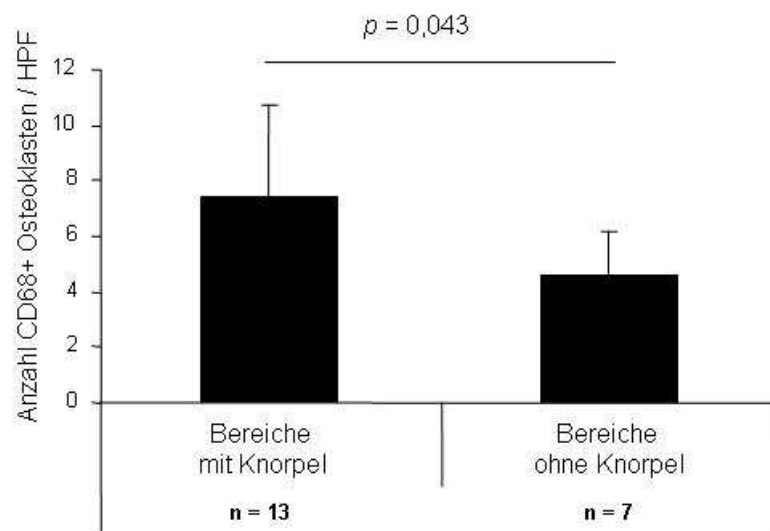
### 3.1.3 Verteilung und Funktionalität von Osteoklasten und Osteoblasten

Der Knochenmetabolismus wird maßgeblich durch die am Knochenabbau beteiligten mehrkernigen Riesenzellen, die Osteoklasten, und die für den Knochenaufbau verantwortlichen Osteoblasten bestimmt. Zentrale Moleküle im Zusammenspiel dieser Zellen sind RANKL, RANK und OPG. Die Interaktion von RANKL mit RANK induziert die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten, was den Knochenabbau fördert. OPG blockiert die stimulierenden Effekte auf die Osteoklastenentwicklung und begünstigt somit den Knochenaufbau. Das RANK/RANKL/OPG-System ist ein biochemischer Regelkreislauf, der ein gesundes Gleichgewicht zwischen Knochenab- und -aufbau bewirkt.

Ob der Anteil und der Aktivierungsstatus von Osteoklasten mit dem Vorhandensein von Knorpelgewebe auf den Femurköpfen korreliert, wurde durch (immun)histologische Färbungen für CD68, TRAP, RANK und CD61 untersucht (Abb. 20-22).

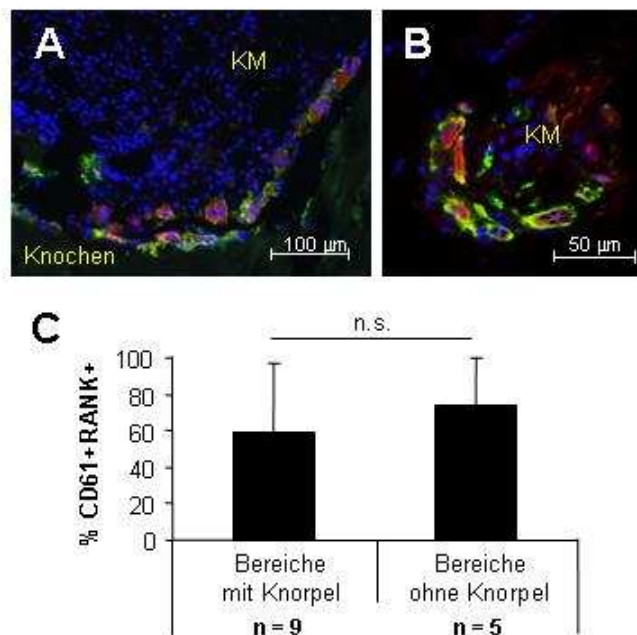


**Abb. 20: Vergleich histologischer Methoden für die spezifische Darstellung von Osteoklasten im subchondralen Knochenmark vom Femurkopf eines AS-Patienten.** Schnitte von Formalin-fixiertem Knochengewebe wurden immunhistochemisch mit anti-CD68 (A) und konsekutive Gefrierschnitte histochemisch für TRAP (B), mit fluoreszenzmarkiertem anti-CD61 (C; grün) oder mit TRAP-ELF 97 gefärbt (D; grün). Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellkerne mit DAPI dargestellt (C, D; blau). Die Analyse erfolgte in der Durchlicht- und in der Fluoreszenzmikroskopie. Alle abgebildeten Bereiche sind exemplarisch für Proben aus 13 von 16 untersuchten Femurköpfen. Originalvergrößerungen: x400.



**Abb. 21: Quantitativer Vergleich von CD68<sup>+</sup> Osteoklasten in Bereichen mit und ohne Knorpel auf der Oberfläche von Femurköpfen bei Patienten mit AS.** Wie für Abb. 20 A beschrieben, wurden Schnitte von Formalin-fixiertem Knochengewebe immunhistochemisch mit anti-CD68 gefärbt. Für jeden Patienten wurden die CD68<sup>+</sup>

Osteoklasten jeweils aus einem HPF aus Bereichen mit und ohne Knorpel auf der Oberfläche gezählt. Mittelwerte  $\pm$  SD aus Proben von 7 und 13 AS-Patienten.  $p$ -Werte mittels T-Test ermittelt.



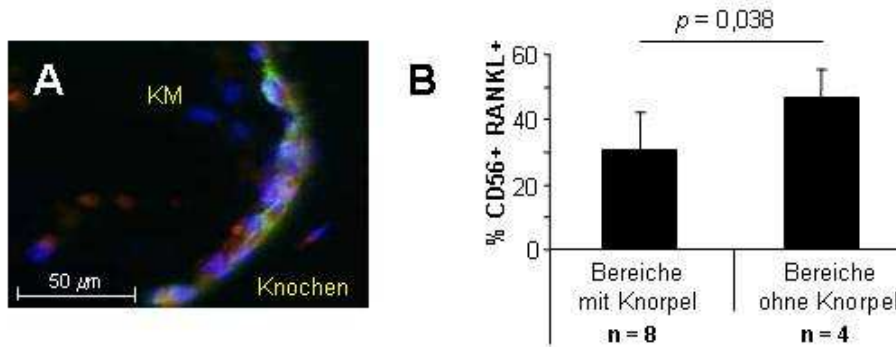
**Abb. 22: Aktivierung von Osteoklasten im subchondralen Knochenmark im Femurkopf von AS-Patienten.** (A, B) Gefrierschnitte wurden mit fluoreszenzmarkiertem anti-CD61 (grün) und anti-RANK (rot) gefärbt und die Zellkerne mit DAPI dargestellt (blau). Die Analyse erfolgte in der Fluoreszenzmikroskopie (A) und mittels LSM (B). (C) Für jeden Patienten wurden RANK<sup>+</sup> CD61<sup>+</sup> Osteoklasten jeweils aus einem HPF aus Bereichen mit und ohne Knorpel auf der Oberfläche gezählt. Mittelwerte  $\pm$  SD aus Proben von 5 und 9 AS-Patienten.

In der immunhistochemischen Färbung mit anti-CD68 wurden am Knochenaum vermehrt vielkernige Zellen gefunden (Abb. 20 A) und ihre Identität als Osteoklasten dadurch bestätigt, dass sie gleichzeitig TRAP<sup>+</sup> (Abb. 20 B, D) und CD61<sup>+</sup> (Abb. 20 C) waren. Mehrkernige CD68<sup>+</sup> Zellen mit der Morphologie von Osteoklasten wurden signifikant häufiger in Bereichen mit ( $7,46 \pm 3,31$ ) als ohne Knorpel auf der Oberfläche ( $4,57 \pm 1,62$ ) gesehen (Abb. 21). Bei AS-Patienten war der Anteil von aktivierten RANK<sup>+</sup> Osteoklasten in Abwesenheit von Knorpel geringfügig höher als in Bereichen mit noch aufliegender Knorpel, was auf eine Veränderung im Knochenumbau hinwies (Abb. 22).

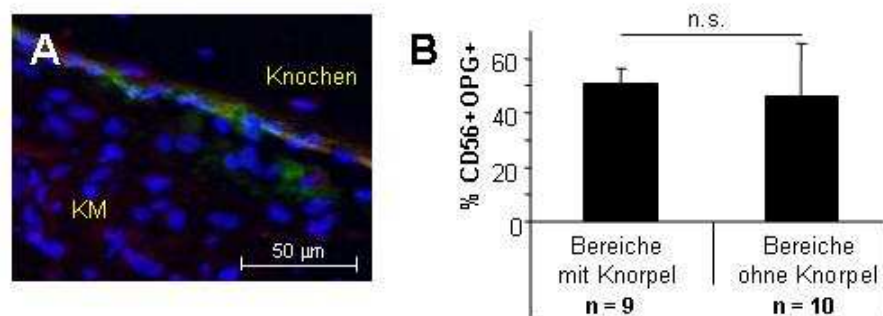
Nach den Beobachtungen für die Osteoklasten war es daher interessant, ob auch die funktionell gegenläufigen Osteoblasten im Hüftgelenk von AS-Patienten von der Anwesenheit von Knorpelgewebe auf dem Femurkopf beeinflusst waren. Als histologische Marker dienten hier CD56, RANKL und OPG (Abb. 23-26).







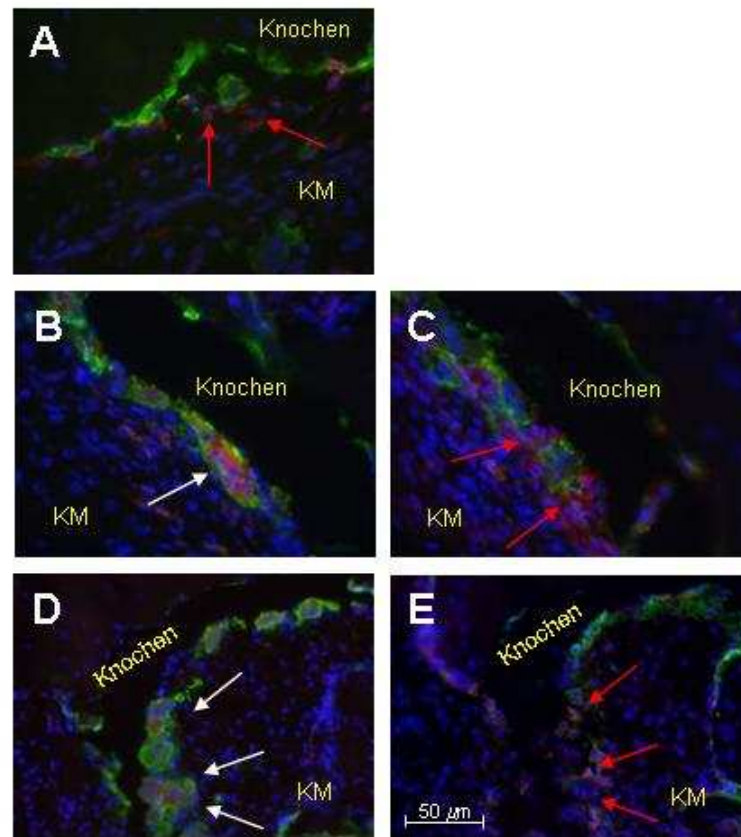
**Abb. 25: Expression von RANKL durch Osteoblasten im subchondralen Knochenmark im Femurkopf von AS-Patienten.** (A) Gefrierschnitte wurden mit fluoreszenzmarkiertem anti-CD56 (grün) und anti-RANKL (rot) gefärbt. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau) und die Schnitte wurden in der Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Originalvergrößerung: x400 (B) Für jeden Patienten wurde bestimmt, wieviel Prozent der Knochen trabekel mit CD56<sup>+</sup> RANKL<sup>+</sup> Osteoblasten umsäumt waren, jeweils aus Bereichen mit und ohne Knorpel auf der Oberfläche. Mittelwerte  $\pm$  SD aus Proben von 4 und 8 AS-Patienten.  $p$ -Werte mittels T-Test ermittelt.



**Abb. 26: Expression von OPG durch Osteoblasten im subchondralen Knochenmark im Femurkopf von AS-Patienten.** (A) Gefrierschnitte wurden mit fluoreszenzmarkiertem anti-CD56 (grün) und anti-OPG (rot) gefärbt. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau) und die Schnitte wurden in der Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Originalvergrößerung: x400. (B) Für jeden Patienten wurde bestimmt, wieviel Prozent der Knochen trabekel mit CD56<sup>+</sup> OPG<sup>+</sup> Osteoblasten umsäumt waren, jeweils aus Bereichen mit und ohne Knorpel auf der Oberfläche. Mittelwerte  $\pm$  SD aus Proben von 9 und 10 AS-Patienten.  $p$ -Werte mittels T-Test ermittelt.

Im subchondralen Knochenmark in Bereichen ohne Knorpel auf der Gelenkoberfläche wurde ein dichter Saum von Osteoblasten entlang der Knochen trabekel gefunden (Abb. 23). In Bereichen ohne Knorpel auf der Oberfläche war der Anteil von Knochensäumen, die mit Osteoblasten bedeckt waren, signifikant erhöht im Vergleich zu solchen Gelenkbereichen, in denen noch Knorpelgewebe nachgewiesen wurde ( $p=0,018$ ; Abb. 24).

Wie bei den Osteoklasten für den Rezeptor RANK war der Ligand RANKL in den Bereichen ohne Knorpel signifikant erhöht ( $p = 0,038$ ; Abb. 25). Beides waren deutliche Anzeichen dafür, dass Reparaturmechanismen für das Knochengewebe im Gang waren, wenn sich kein Knorpel mehr auf der Oberfläche befand. War der Knorpel noch intakt, waren diese Prozesse offenbar noch nicht zwingend. Bei der Färbung der Osteoblasten mit OPG wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Bereichen mit und ohne Knorpel auf der Gelenkoberfläche gefunden ( $p > 0,05$ ; Abb. 26).



**Abb. 27: Kontakte von T-Zellen mit Osteoklasten im Femurkopf von AS-Patienten stellen.** Konsekutive Gefrierschnitte aus Femurköpfen wurden mit fluoreszenzmarkiertem (A) anti-CD3 (rot) und anti-CD61 (grün), (B, C) anti-RANKL (rot) und anti-CD61 (grün) sowie (D, E) anti-RANK (rot) und anti-CD56 (grün) gefärbt. In allen Schnitten wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) gegengefärbt und die Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. (A) Rote Pfeile weisen auf T-Zellen in Nachbarschaft zu Osteoklasten. (B, D) Weiße Pfeile weisen auf Osteoklasten. (C, E) Rote Pfeile weisen auf RANKL-positive Zellen. Alle abgebildeten Bereiche sind exemplarisch für Proben aus 8 von 16 untersuchten Femurköpfen. Originalvergrößerung: 400x.

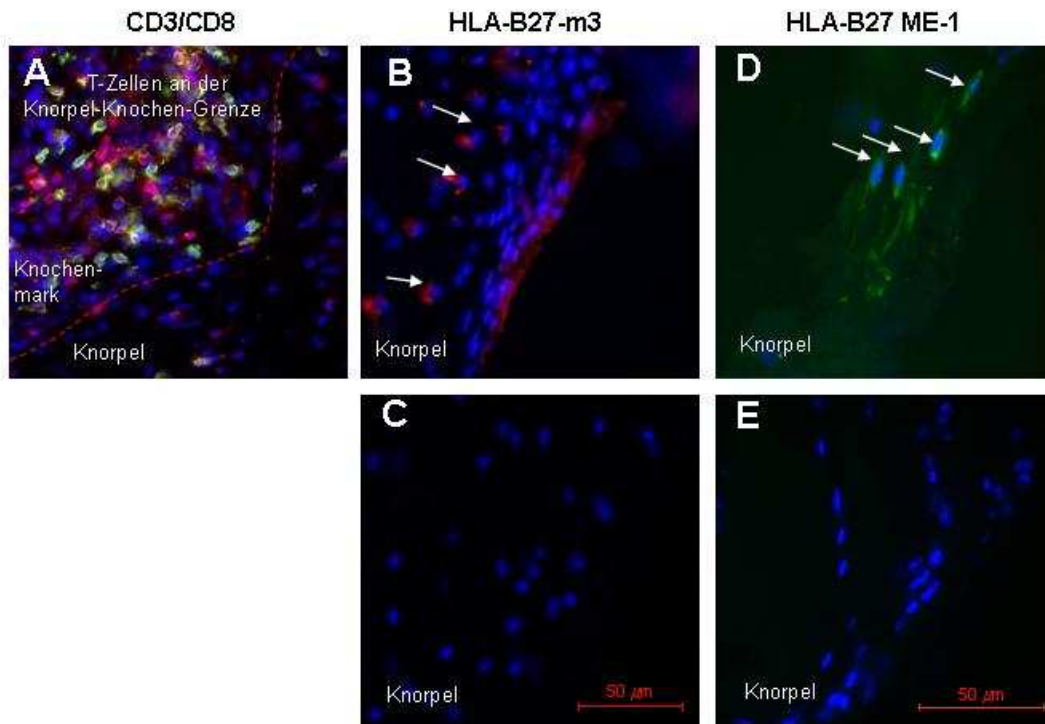
Es wurde angenommen, dass T-Zellen RANKL exprimieren und das Immunsystem damit direkt in den Knochenstoffwechsel eingreifen kann. In den histologischen Untersuchungen konnten Kontakte zwischen T-Zellen und Osteoklasten direkt dargestellt werden (Abb. 27 A). Es wurden RANKL<sup>+</sup> Zellen gezeigt, die in unmittelbarer Nähe zu den

Osteoklasten liegen (Abb. 27 C, E). Doppelfärbungen mit RANKL und CD3 (T-Zellen), CD8 (T-Zellen), CD20 (B-Zellen), CD34 (Endothelzellen der Gefäße), CD68 (Klon MAC3, Osteoklasten, Makrophagen) oder CD68 (Klon KP1, Makrophagen, Osteoklasten, Granulozyten) stellten keine doppelpositiven Zellen dar (Daten nicht gezeigt), so dass der Ursprung dieser RANKL<sup>+</sup> Zellen unklar bleibt.

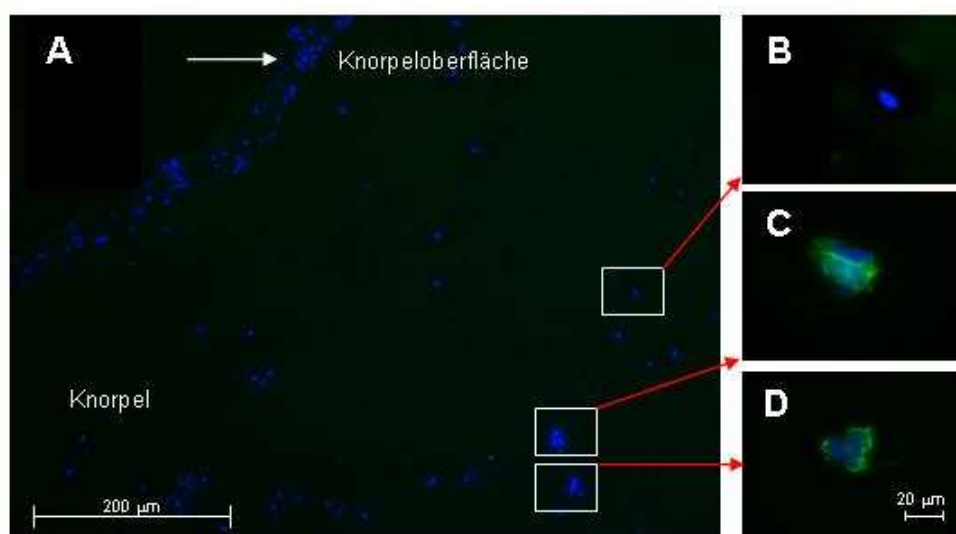
Die hier hergestellten immunhistochemischen Untersuchungen haben zu der Schlussfolgerung geführt, dass es einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Knorpel und dem Nachweis einer akuten Entzündungspathologie gibt (175). So resultierte die Frage, welche Eigenschaften der Chondrozyten, die den der Gelenkoberfläche aufliegenden Knorpel ausmachen, könnten den Knorpelabbau bei AS vermitteln?

#### **3.1.4 HLA-B27 im Knorpelgewebe von AS-Patienten**

Die Histopathologie von Hüftgelenken aus AS-Patienten legte nahe, dass an der Aufrechterhaltung einer lokalen Entzündung verschiedene Faktoren aus dem Knorpel beteiligt waren. Chondrozyten könnten eine wichtige Rolle in der Interaktion mit T-Zellen spielen. Im Zusammenhang mit zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei AS war insbesondere die Expression des HLA-I-Moleküls HLA-B27 durch Chondrozyten in den Gelenkentzündungen interessant. Dazu wurden immunhistochemische Untersuchungen an Femurköpfen von 6 AS-Patienten durchgeführt und es wurden verschiedene Antikörper für HLA-B27 in der Immunhistologie getestet, die unterschiedliche Epitope dieses HLA-I-Moleküls erkennen (Abb. 28 - 29).



**Abb. 28: Immunhistologischer Nachweis der Expression von HLA-B27 durch Chondrozyten in Femurköpfen von AS-Patienten.** Gefrierschnitte von unentkalktem Knorpel/Knochengewebe von Oberschenkelköpfen wurden mit anti-CD3 (rot) und anti-CD8 (grün) für T-Zellen (A) und mit anti-HLA-B27, Klon HLA-ABC-m<sup>3</sup> (B; rot) bzw. mit Klon ME-1 (D; grün) für Chondrozyten gefärbt. (C, E) Färbungen auf konsekutiven Schnitten mit IgG2a-Isotypkontrollen. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau) und die Schnitte wurden in der Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Alle abgebildeten Bereiche sind exemplarisch für Proben aus 6 untersuchten Femurköpfen. Originalvergrößerung: x400.



**Abb. 29: Verteilung von HLA-B27<sup>+</sup> Chondrozyten in Femurköpfen von AS-Patienten.** Chondrozyten auf Gefrierschnitten von unentkalktem Knorpel/Knochengewebe von Oberschenkelköpfen wurden mit anti-HLA-B27,

Klon ME-1 (grün) gefärbt. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). **(A)** Übersichtsaufnahme des hyalinen Gelenkknorpels mit Chondrozyten. Originalvergrößerung: x100. **(B)** Normale Chondrozyten in der extrazellulären Knorpelmatrix. **(C, D)** Nur dicht beeinanderliegende Chondrozyten exprimieren HLA-B27. Originalvergrößerung: x1000. Die Schnitte wurden in der Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Alle abgebildeten Bereiche sind exemplarisch für Proben aus 6 untersuchten Femurköpfen.

Die Antikörper der Klone HC-10 und EP-4 färbten Strukturen und Zellen, die eindeutig nicht mit der Expression von HLA-B27 korrelierten (Daten nicht gezeigt). Sie wurden wegen dieser starken unspezifischen Bindungen nicht weiter verwendet. Im Gegensatz dazu zeigten die Antikörper der Klone HLA-ABC-m<sup>3</sup> (rot, Abb. 28 B) und ME-1 (grün, Abb. 28 D) eine spezifische Färbung. Ihre *in situ*-Färbeeigenschaften waren vergleichbar und die Ansätze mit den entsprechenden Isotypkontrollen waren negativ (Abb. 28 C, E).

Interessanterweise exprimierten nur die Chondrozyten HLA-B27, die sich in unmittelbarer Nähe infiltrierender T-Zellen und insbesondere von CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen befanden. Darüber hinaus waren in den Regionen mit HLA-B27<sup>+</sup> Chondrozyten die Zellen dicht gepackt und homogen verteilt (Abb. 29) - eine Morphologie, die an das *Clustering* von Chondrozyten, d.h. die lokale Proliferation von Chondrozyten als Regenerationsversuch bei einem Knorpelschaden, erinnerte.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so waren in Hüftgelenken von AS-Patienten CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit HLA-B27<sup>+</sup> Chondrozyten *in situ* assoziiert und T-Zellinfiltrationen an die Anwesenheit von Knorpel auf der Gelenkoberfläche gebunden. Dieser histomorphologische Befund, warf die Frage auf, ob Chondrozyten im Sinne nicht-professioneller APC durch Antigen-Präsentation direkt die lokale Entzündung beeinflussen? In den weiteren Experimenten wurde daher besonders untersucht, wie mögliche Antigene aussehen könnten. Dazu wurde das stimulatorische Potential von HLA-B27-restringierten Fremd- und Selbstantigenen untersucht. Darüber hinaus sollte analysiert werden, ob HLA-B27<sup>+</sup> Chondrozyten in der Tat potentiell Antigen-spezifische zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren.

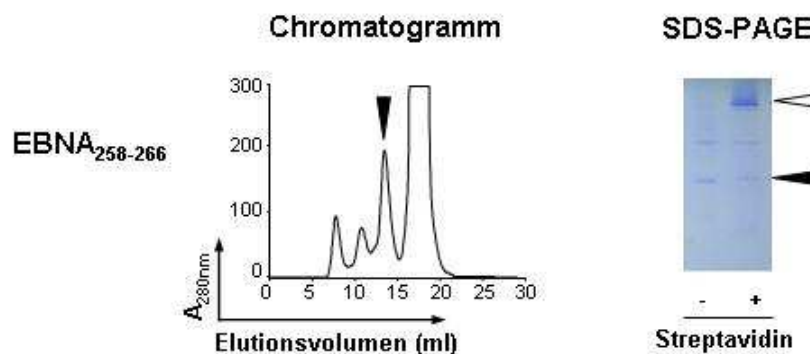


### 3.1.5 Induzieren Peptide aus Proteinen von *Chlamydia trachomatis* bei Patienten mit SpA HLA-B27-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten?

### 3.1.6 Etablierung von HLA-B27-Tetrameren mit immundominantem Peptid aus dem Epstein-Barr-Virus

Für die Etablierung der HLA-B27/Peptid-Tetramer-Technologie wurde zunächst ein immundominantes virales Peptid für die Auffaltung der in Einschlusskörpern vorliegenden schweren Kette von HLA-B27 und  $\beta_2M$  benutzt. Es wurden daher HLA-B27-Tetramere mit einem Peptid aus einem Nukleoproteinantigen des EBV, EBNA<sub>258-266</sub>, hergestellt. Dieses Peptid besitzt ein typisches, immundominantes HLA-B27 Bindungsmotiv (131). Diese Arbeiten wurden mit einer Variante der schweren Kette von HLA-B27 durchgeführt, bei der an Position 67 der Cysteinrest (Cys67) gegen einen Serinrest (Ser67) ausgetauscht war (136, 176).

Die HLA-B27/EBNA<sub>258-266</sub>-Monomere wurden mittels Gelfiltration gereinigt. Durch die Hinzugabe von Streptavidin entstanden HLA-B27/EBNA<sub>258-266</sub>-Tetramere, die in der SDS-PAGE biochemisch charakterisiert wurden (Abb. 30).

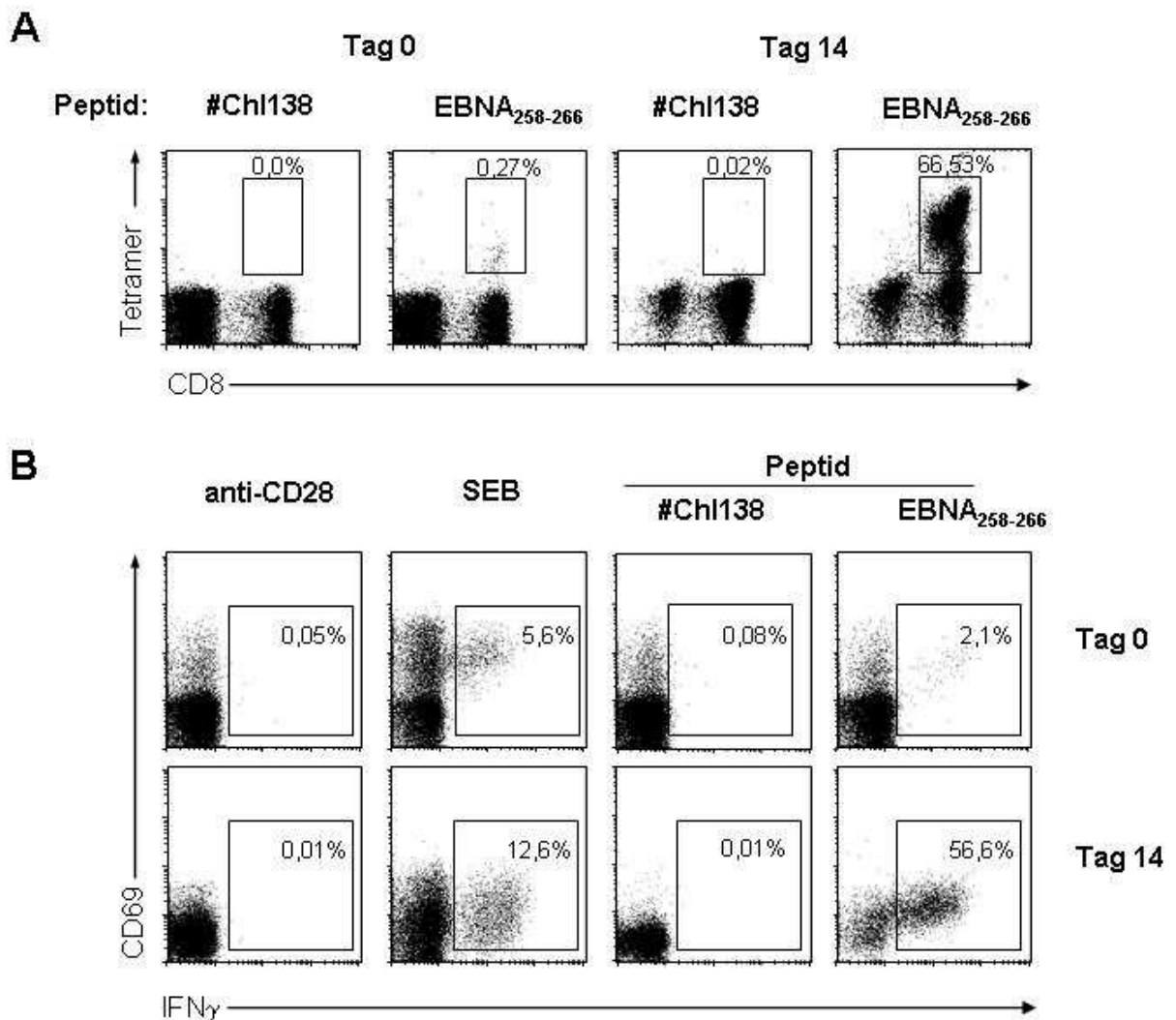


**Abb. 30: Auffaltung von HLA-B27/EBNA<sub>258-266</sub>-Komplexen.** Protein der schweren Kette von HLA-B27 (Ser67),  $\beta_2M$  und das Peptid EBNA<sub>258-266</sub> wurden unter renaturierenden Bedingungen schrittweise gemischt, anschließend biotinyliert und die konzentrierte Lösung durch Gelfiltration fraktioniert. Im Chromatogramm ist der eluierte Peak, der die HLA-B27/Peptid-Komplexe enthielt, markiert (schwarzer Pfeil). Die SDS-PAGE (Spalte rechts) unter nicht-reduzierenden Bedingungen nach Färbung mit Coomassie zeigt gereinigte HLA-B27/Peptid-Monomere ohne (schwarzer Pfeil) und mit Tetramerisierung durch Streptavidin-PE (weißer Pfeil). Beispiel aus insgesamt fünf unabhängigen Präparationen für das HLA-B27/EBNA<sub>258-266</sub>-Tetramer.

Um optimale Bedingungen für den Auffaltungsprozess von löslichen HLA-B27/Peptid-Monomeren zu etablieren, wurde das EBV-Peptid EBNA<sub>258-266</sub> mit dem relativen Bindungsscore von 29 (SYFPEITHI) experimentell weiter verwendet. Aus der Gelfiltration eluierte das Maximum des gefalteten HLA-B27/EBNA<sub>258-266</sub>-Monomers bei 13,63 ml. Der Anteil korrekt gefalteter HLA-B27/Peptid-Monomere am Gesamtproteingehalt lag bei einer

typischen Präparation bei 60 - 86 %. Links davon liegende Peaks (7 - 13 ml) markierten Proteinaggregate und rechts (16 ml) nicht in die Faltung einbezogenes Ausgangsmaterial und Biotin. Durch schrittweise Zugabe von Streptavidin, wurde das 35 kDa HLA-B27/EBNA<sub>258-266</sub>-Monomer fast vollständig tetramerisiert und erschien überwiegend bei einem  $M_r$  ~200 kDa.

Die Eignung dieser HLA-B27/Peptid-Komplexe zum Nachweis Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup>T-Zellen wurde in durchflusszytometrischen Analysen mit PBMC von Blutspendern mit vorausgegangener EBV-Infektion dokumentiert (Abb. 31).



**Abb. 31: Durchflusszytometrischer Nachweis spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit dem HLA-B27/EBNA<sub>258-266</sub>-Tetramer. A:** Jeweils  $5 \times 10^5$  PBMC, unmittelbar nach der Präparation oder nach 14 Tagen Kultur in Gegenwart von  $10 \mu\text{g/ml}$  EBNA<sub>258-266</sub> wurden mit dem HLA-B27/EBNA<sub>258-266</sub>-Tetramer-Komplex inkubiert. Als unspezifische Kontrolle diente das HLA-B27/#Ch138-Tetramer (vgl. Abb. 32). Alle Ansätze wurden anschließend mit anti-CD3, anti-CD8 und Annexin V gefärbt. Die Zahlen stehen für die Anteile Annexin V<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, EBNA<sub>258-266</sub><sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Repräsentative Darstellung für 6 unabhängige Experimente. **(B)** Jeweils  $5 \times 10^5$  PBMC aus **(A)** wurden *in vitro* 6 h mit  $1 \mu\text{g/ml}$  anti-CD28 oder jeweils  $10 \mu\text{g/ml}$  SEB, #Ch138 oder EBNA<sub>258-266</sub> kultiviert. Die Aktivierung der



CD8<sup>+</sup>T-Zellen wurde als Anteil CD69<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population dargestellt. Repräsentative Darstellung für 10 unabhängige Experimente.

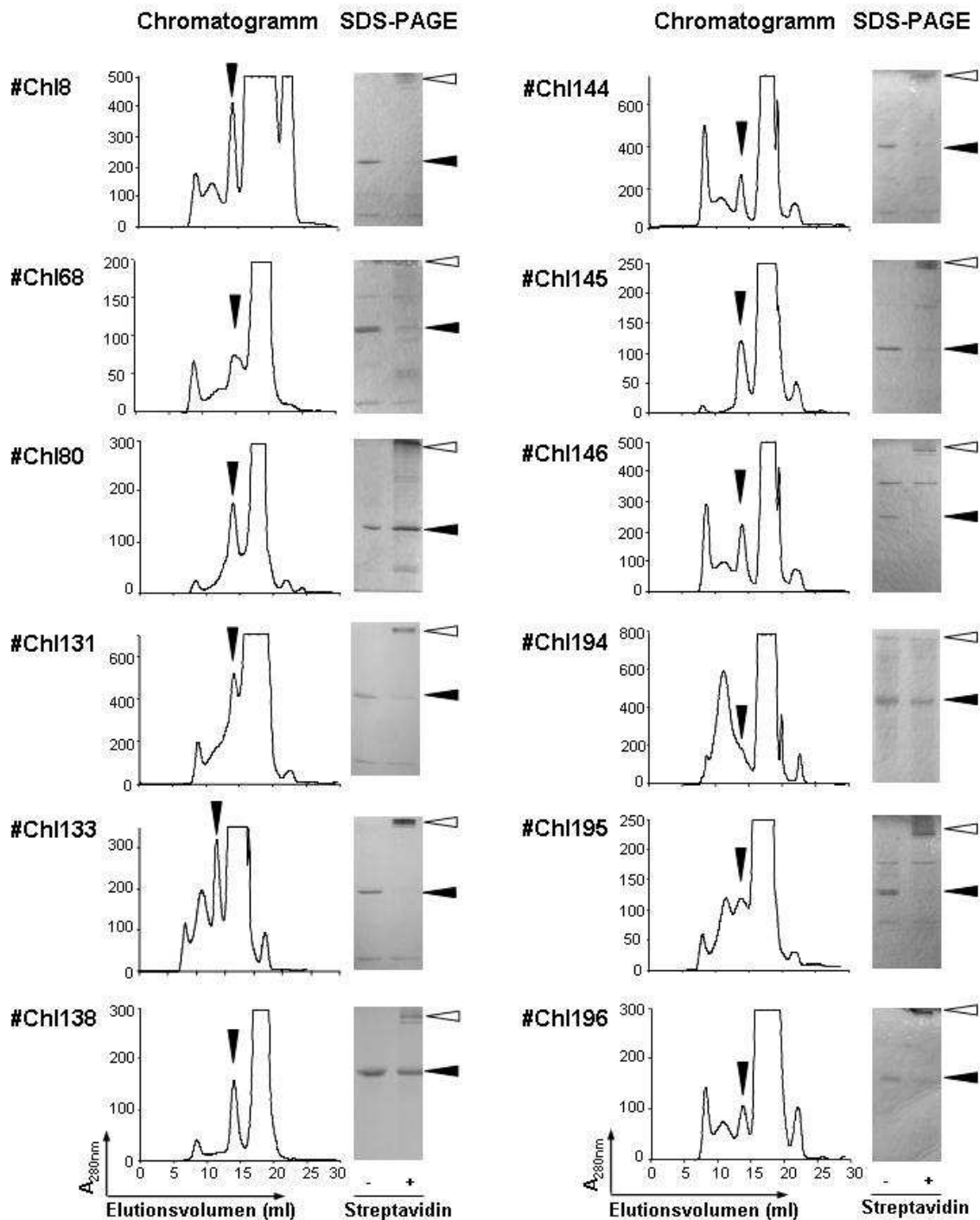
In PBMNC von HLA-B27<sup>-</sup>-Spendern konnten auch nach Inkubation mit 10  $\mu$ g/ml EBNA<sub>258-266</sub><sup>-</sup> Peptid über 14 Tage keine CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden, die sich durch das HLA-B27/EBNA<sub>258-266</sub><sup>-</sup>-Tetramer darstellen ließen oder nach Kurzzeit-Restimulation mit dem Peptid IFN $\gamma$  exprimierten (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu war in den PBMNC von HLA-B27<sup>+</sup>-Spendern in der durchflusszytometrischen Analyse eine Population EBNA<sub>258-266</sub><sup>-</sup> spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen von  $0,25 \pm 0,07$  % darstellbar. Durch Kultivierung der Zellen in Anwesenheit des Peptides EBNA<sub>258-266</sub> konnte nach 14 Tagen die Frequenz Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die durch das Tetramer nachweisbar waren, auf bis zu  $66,46 \pm 10,96$  % erhöht werden (Abb. 31 A). Diese Ergebnisse korrelierten mit denen der intrazellulären IFN $\gamma$ -Färbung als Zeichen für Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Mit  $56,6 \pm 5,25$  % vs.  $9,75 \pm 3,08$  % war in dieser Darstellung die spezifische Stimulation mit dem EBNA<sub>258-266</sub> effizienter als eine unspezifische Aktivierung vergleichbarer Populationen mit SEB (Abb. 31 B). Diese Ergebnisse ließen sich in 10 unabhängigen Experimenten bestätigen.

Insgesamt konnte hier gezeigt werden, dass bei einem hohen Score für die Bindung des Peptides in die Bindungstasche des HLA-B27-Komplexes die Effizienz der Rückfaltung des HLA-B27/Peptid-Monomeres gut war. Mit den so gewonnenen HLA-B27/Peptid-Komplexen und PE-markiertem Streptavidin wurden HLA-B27/Peptid-Tetramere hergestellt. Diese waren in der Lage, die Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus gemischten T-Zell-Populationen in der Durchflusszytometrie reproduzierbar darzustellen. Damit waren die Bedingungen für die Tetramerherstellung im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert und konnten auf andere Komplexe übertragen werden. Zunächst wurden HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetramere generiert. Für diese HLA-B27/Peptid-Komplexe wurde die Variante der schweren Kette von HLA-B27 mit einem Serinrest in Position 67 genutzt.

### 3.1.7 HLA-B27-Tetramere mit aus *Chlamydia trachomatis*-Proteinen abgeleiteten Peptiden

*Chlamydia trachomatis* ist in Deutschland am häufigsten mit dem Krankheitsbild der ReA assoziiert. Auf der Basis bereits identifizierter immundominanter Peptide aus *Chlamydia trachomatis* (62) wurden neun verschiedene HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetramere synthetisiert. Die Effizienzen der Auffaltung von HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Monomeren

und der Tetramerisierung wurden zunächst mit Bezug auf die Bindungsaffinität der ausgewählten Einzelpeptide zu HLA-B27 untersucht (Abb. 32, Tab. 3).



**Abb. 32: Herstellung von HLA-B27/Peptid-Monomeren mit aus *Chlamydia trachomatis*-Proteinen abgeleiteten Peptiden.** Protein der schweren Kette von HLA-B27 (Ser67),  $\beta_2\text{M}$  und die entsprechenden aus *Chlamydia trachomatis*-Proteinen abgeleiteten Einzelpeptide wurden unter renaturierenden Bedingungen schrittweise gemischt. Die Komplexe wurden biotinyliert, die konzentrierte Proteinlösung durch Gelfiltration fraktioniert. In den Chromatogrammen ist der eluierte Peak, der die

HLA-B27/Peptid-Monomere enthielt, markiert (schwarzer Pfeil). Links von diesem monomeren HLA-B27/Peptid-Komplex liegende Peaks markieren unspezifische Proteinaggregate und rechts nicht in die Faltung einbezogenes Ausgangsmaterial und Biotin. Die SDS-PAGE (Spalte rechts) unter nicht-reduzierenden Bedingungen nach Färbung mit Coomassie zeigt gereinigte HLA-B27/Peptid-Monomere ohne (schwarzer Pfeil) und mit Tetramerisierung mit Streptavidin-PE (weißer Pfeil). Beispiele aus 1 - 3 unabhängigen Präparationen für das entsprechende HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetramer.

**Tab. 3: Korrelation der Bindungsscores der *Chlamydia trachomatis*-Peptide zu HLA-B27 und Effizienz der Auffaltung der HLA-B27/Peptid-Komplexe.** Wie für Abb. 32. beschrieben, wurden verschiedene HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetramere hergestellt. Der Bindungsscore nach SYFPEITHI, die Lage des Peaks mit dem HLA-B27/Peptid-Monomer aus der Gelfiltration und der Proteinanteil dieses Peaks im Vergleich zum Gesamtproteingehalt der Proteinlösung nach der Auffaltung wurden ermittelt. Die Daten stehen für 1 - 3 unabhängige Präparationen für das entsprechende HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Monomer.

Bindungsscore nach SYFPEITHI	Peptid	Aufgefaltetes HLA-B27/Peptid-Monomer	
		Lage des Peak (ml)	Anteil bezogen auf alle Proteinaggregate (%)
25	#Ch1144	13,59	22,2 - 40,4
	#Ch1146	13,74	34,9
	#Ch1194	13,79	5,0
	#Ch1195	13,81	29,5
26	#Ch18	13,54	88,0
	#Ch168	13,59	49,4
	#Ch180	13,86	88,1
	#Ch1131	13,54	80,9
	#Ch1138	13,62	63,4 - 84,0
27	#Ch1133	13,69	19,8 - 43,3
	#Ch1145	13,63	97,7
	#Ch1196	13,76	23,6

Bei der Herstellung von HLA-B27/Peptid-Tetramer-Komplexen mit bakteriellen Peptiden von *Chlamydia trachomatis* verursachte die Auffaltung im Vergleich zu dem viralen Peptid EBNA<sub>258-266</sub> eine stärkere unspezifische Proteinaggregation und verringerte damit den Ertrag löslicher Moleküle. Im Wesentlichen korrelierte der Bindungsscore nach SYFPEITHI im Bereich zwischen 25 und 27 auch mit der Effizienz der Auffaltung. Bei dem niedrigsten

einbezogenen Score von 25 waren nur 5 - 40 % der Proteine in die HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Monomere eingegangen. Bei den beiden anderen Score-Bereichen von 26 und 27 war die Auffaltung mit 50 - 88 % bzw. 20 - 98 % deutlich effizienter aber insgesamt war auch die Streuung bei den Einzelpeptiden größer. Das Peptid #Chl194 zeigte während der Auffaltung der HLA-B27-Monomere eine so ausgeprägte Aggregation, dass dieses nicht als Tetramer in FACS-Analysen verwendet werden konnte.

Mit insgesamt 12 verschiedenen Peptiden aus *Chlamydia trachomatis* wurden HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetramere hergestellt, von denen 9 in weiteren durchflusszytometrischen Analysen eingesetzt wurden.

### **3.1.8 Frequenz *Chlamydia*-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Synovialflüssigkeit und peripherem Blut von Patienten mit *Chlamydia*-getriggelter ReA und AS**

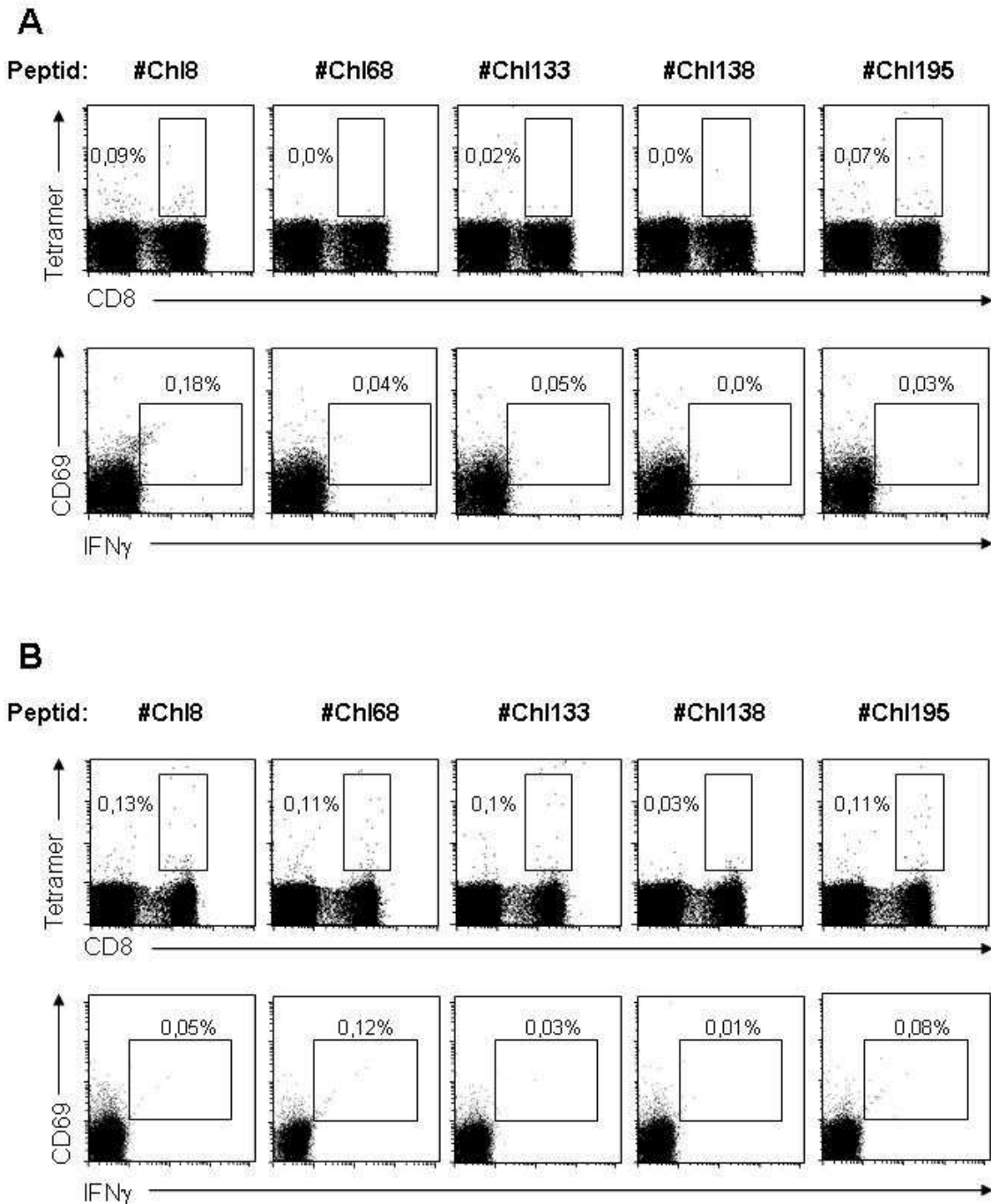
Mit den oben beschriebenen HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetrameren wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen hinsichtlich ihrer Antigen-spezifität untersucht. Die HLA-B27-Tetramere mit den Peptiden #Chl144 und #Chl146 wurden von der durchflusszytometrischen Analyse ebenfalls ausgeschlossen, da es bei diesen Tetrameren zu zahlreichen unspezifischen Färbungen kam, was durch Kontrollen mit Zellen aus HLA-B27-Patienten deutlich wurde (Daten nicht gezeigt). Für das HLA-B27-Tetramer mit dem Peptid #Chl138 wurden keine spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen gefunden.

Mit den verbliebenen fünf unterschiedlichen HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetrameren wurden PBMNC aus Patienten mit *Chlamydia*-getriggelter SpA auf das Vorhandensein Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht und dabei gleichzeitig die Bindungseigenschaften der Tetramere bewertet (Tab. 4, Abb. 32).

**Tab. 4: Färbung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetrameren.**  
 Jeweils  $5 \times 10^5$  SFMNC oder PBMNC wurden unmittelbar nach der Präparation mit den entsprechenden HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetrameren inkubiert und anschließend mit anti-CD3, anti-CD8 und Annexin V gefärbt. War der durchflusszytometrisch bestimmte Anteil Annexin V<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die ein HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetramer gebunden hatten  $\geq 0,05$  %, wurden die Ansätze als positiv (+) bewertet. Waren die Anteile  $< 0,05$  % galten diese Proben als negativ (-).

Diagnose	Untersuchungs- material	HLA- B27	Lfd. #	HLA-B27/ <i>Chlamyda</i> -Peptid-Tetramer			
				#ChI8	#ChI68	#ChI133	#ChI195
ReA	SFMNC	+	1	+	-	+	-
			2	-	-	-	-
			3	+	-	-	+
			4	-	-	-	-
			5	+	+	-	+
			6	-	-	-	-
			7	+	-	+	+
			8	-	-	-	+
AS	PBMNC	+	11	-	+	+	-
	SFMNC	+	12	-	-	-	-
		+	13	-	-	-	-
ReA	SFMNC	-	9	-	-	-	-
		-	10	-	-	-	-
RA <sup>1</sup>	SFMNC	-	14	-	-	-	-
		-	15	-	-	-	-
		-	16	-	-	-	-
ohne	PBMNC	+	17	-	-	-	-
		+	18	-	-	-	-
		+	19	-	-	-	-
		+	20	-	-	-	-

<sup>1</sup>rheumatoide Arthritis



**Abb. 33: HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit ReA.** Jeweils  $5 \times 10^5$  SFMNC aus Patient 3 (A) und Patient 5 (B) wurden in der oberen Abbildung unmittelbar nach der Präparation mit den entsprechenden HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetrameren inkubiert und anschließend mit anti-CD3, anti-CD8 und Annexin V gefärbt. Die Zahlen stehen für die Anteile Annexin V<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>, *Chlamydia*<sup>+</sup>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen. In der unteren Abbildung wurden jeweils  $5 \times 10^5$  PBMNC *in vitro* 6 h mit 10  $\mu$ g/ml der jeweiligen *Chlamydia*-Peptide kultiviert. Die Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde als Anteil CD69<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population dargestellt.

Es konnten bei 5 der 8 untersuchten HLA-B27<sup>+</sup>-Patienten mit ReA direkt aus der Synovialflüssigkeit im Kontext von HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetramer-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden. Insgesamt waren die Frequenzen dieser Tetramer-positiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit 0,05 - 0,19 % aller untersuchten CD8<sup>+</sup> T-Zellen gering. Die SFMNC von zwei Patienten reagierten jeweils auf drei bzw. auf zwei der eingesetzten Peptide. In einem Fall reagierten die CD8<sup>+</sup> T-Zellen eines Patienten spezifisch auf nur ein Peptid. Mit den Peptiden #Chl80, #Chl131, #Chl138, #Chl145 und #Chl196 konnten keine spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert werden. In der kleinen Gruppe von Patienten mit ReA und mit den übrigen *Chlamydia*-Peptiden gab es keine deutliche Präferenz eines Peptids (#Chl8: 4x; #Chl68: 2x; #Chl133: 4x; #Chl195: 4x). Von den drei AS-Patienten zeigte nur einer spezifische Reaktion und nur auf die Peptide #Chl68 und #Chl133. In Kontrollexperimenten wurden periphere CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 2 HLA-B27<sup>-</sup> Patienten mit ReA, 3 HLA-B27<sup>-</sup> Patienten mit rheumatoider Arthritis und vier gesunden HLA-B27<sup>+</sup> Kontrollen ebenfalls mit den HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetrameren inkubiert. In den Experimenten wurden keine Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen.

Parallel zu den Färbungen mit HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetrameren wurden Antigen-spezifische Reaktionen in den SFMNC bei 6 ReA-Patienten über die antigenabhängige Expression von Zytokinen untersucht. Nach Kurzzeitaktivierung mit jeweils 10 µg/ml des entsprechenden *Chlamydia*-Peptides wurden die SFMNC intrazellulär für IFN $\gamma$  gefärbt. Die hier erhaltenen Ergebnisse bestätigten die Befunde aus der Tetramerfärbung, dass nur mit den Peptiden, die IFN $\gamma$ -produzierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktivierten, diese auch über HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetramere darstellbar waren (Tab. 5).

**Tab. 5: Vergleich der Ergebnisse der Färbung *Chlamydia*-Peptid-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch das entsprechende Tetramer mit dem Nachweis der Expression von IFN $\gamma$ .** SFMNC von Patienten mit ReA wurden wie für Abb. 33 beschrieben für HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetramer<sup>+</sup> bzw. IFN $\gamma$ -produzierende CD8<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> T-Zellen untersucht und anschließend wie für Tab. 4 beschrieben ausgewertet. grün: Übereinstimmung zwischen positiver Tetramerfärbung und IFN $\gamma$ -Produktion; rot: keine Übereinstimmung; weiß: keine Tetramer-Analyse zum Vergleich vorliegend.

Lfd. #	HLA-B27	Chlamydia-Peptide											
		8	68	80	131	133	138	144	145	146	194	195	196
3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
4	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
6	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
8	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Neben den Negativkontrollen bestätigte diese selektive Expression des proinflammatorischen Zytokins einerseits die Spezifität und Sensitivität des Nachweises Antigen-spezifischer Zellen durch die Tetramere, andererseits wiesen sie aber auch darauf hin, dass die über die IFN $\gamma$ -Produktion definierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen im wesentlichen über die Präsentation der Peptide durch zelluläres HLA-B27 induziert wurde.

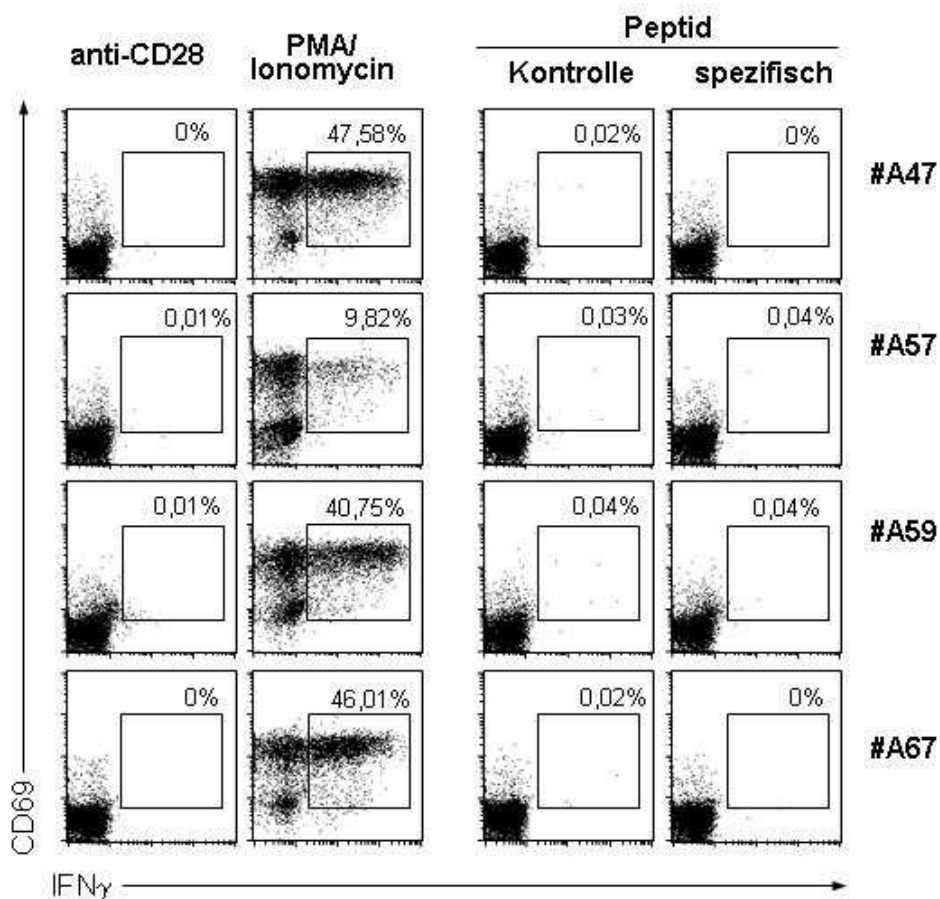
Die Etablierung der HLA-B27-Tetramer-Technologie mit Antigenen abgeleitet aus *Chlamydia trachomatis* hat zu einer Publikation geführt, in der die Frequenz *Chlamydia*-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht wurde (177).



### 3.2 Welche Knorpelantigene könnten Targets für Autoimmunprozesse bei AS-Patienten sein?

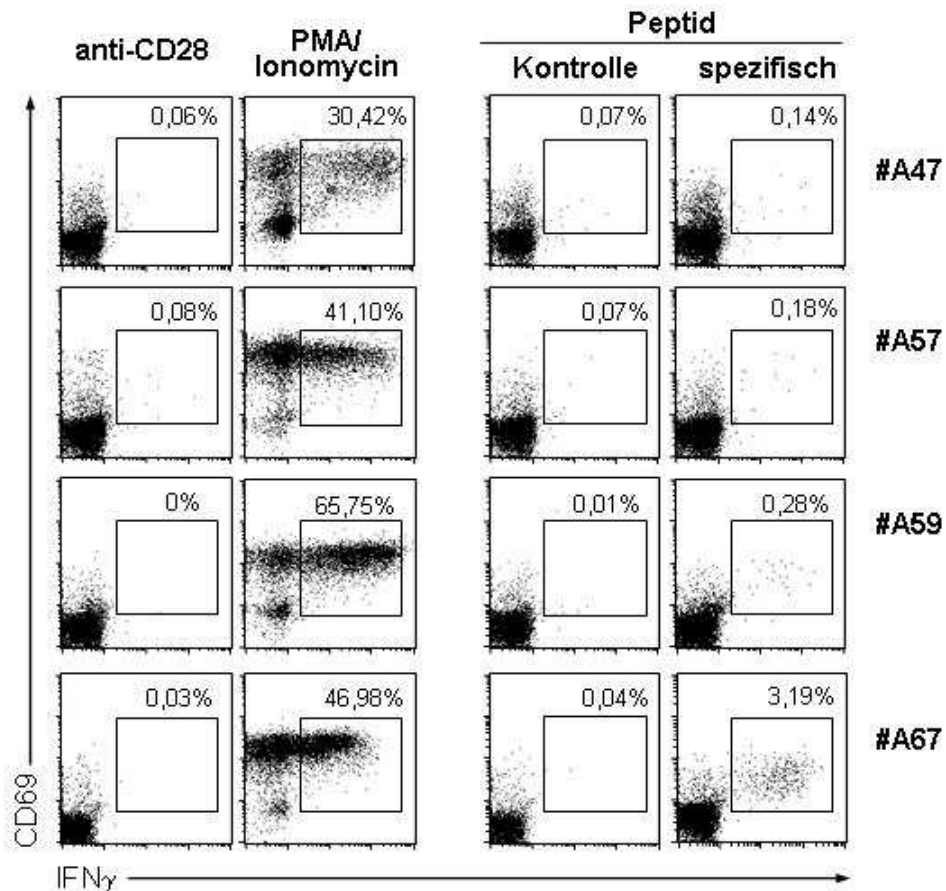
#### 3.2.1 Zytokinexpression muriner CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach *Priming* mit Peptiden aus humanem Aggrecan

Um das Potential von Peptiden, die als mögliche Abbauprodukte von humanem Aggrecan im Zusammenhang mit HLA-B27 *in situ* in HLA-B27-assoziierten SpA immunogen wirken könnten, zu prüfen, wurden B27-transgene Mäuse mit vier aus humanem Aggrecan abgeleiteten und als immunogen identifizierten Peptiden (130) immunisiert. Zur Kontrolle der HLA-B27-Restriktion CD8<sup>+</sup> T-Zellvermittelter Immunantworten wurden parallel Wildtyp-Mäuse immunisiert. Die CD8<sup>+</sup> T-zellstimulatorische Wirkung der Peptide wurde über die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 und die Sekretion von IFN $\gamma$  nach kurzer *in vitro*-Kultur von Zellen aus der Milz durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 34, 35; Tab. 6).



**Abb. 34: Aktivierung und IFN $\gamma$ -Sekretion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz von Wildtyp-Mäusen nach Immunisierung mit Aggrecanpeptiden.** Milzzellen immunisierter Mäuse wurden *in vitro* 6 h mit jeweils 10  $\mu$ g/ml der Peptide #A47, #A57 #A59 bzw. #A67 kultiviert. 1  $\mu$ g/ml anti-CD28, 25 ng/ml PMA mit 1  $\mu$ g/ml Ionomycinsowie 10  $\mu$ g/ml #Ch138 dienten als Kontrollen. Nach der Färbung mit spezifischen Antikörpern für CD8, CD69 und IFN $\gamma$

wurden die Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Der Anteil CD69<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist in jedem Diagramm gezeigt.



**Abb. 35: Aktivierung und IFN $\gamma$ -Sekretion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz nach Immunisierung B27-transgener Mäuse mit Aggrecanpeptiden.** Milzzellen aus immunisierten B27-transgenen Mäusen wurden wie für Abb. 34 beschrieben *in vitro* behandelt und der Anteil CD69<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

**Tab. 6: IFN $\gamma$ -Sekretion muriner CD69<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz nach Immunisierung mit Aggrecanpeptiden.** Wie für Abb. 34 und 35 beschrieben wurde der Anteil CD69<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen immunisierter Wildtyp- und B27-transgener Mäuse durchflusszytometrisch bestimmt.

Peptid für Immunisierung	IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen nach <i>in vitro</i> -Inkubation mit gleichem Peptid (% aller CD8 <sup>+</sup> T-Zellen)	
	Wildtyp	B27-transgen
#A47	0,02	0,14
#A57	0,03	0,18
#A59	0,04	0,28
#A67	0,02	3,19

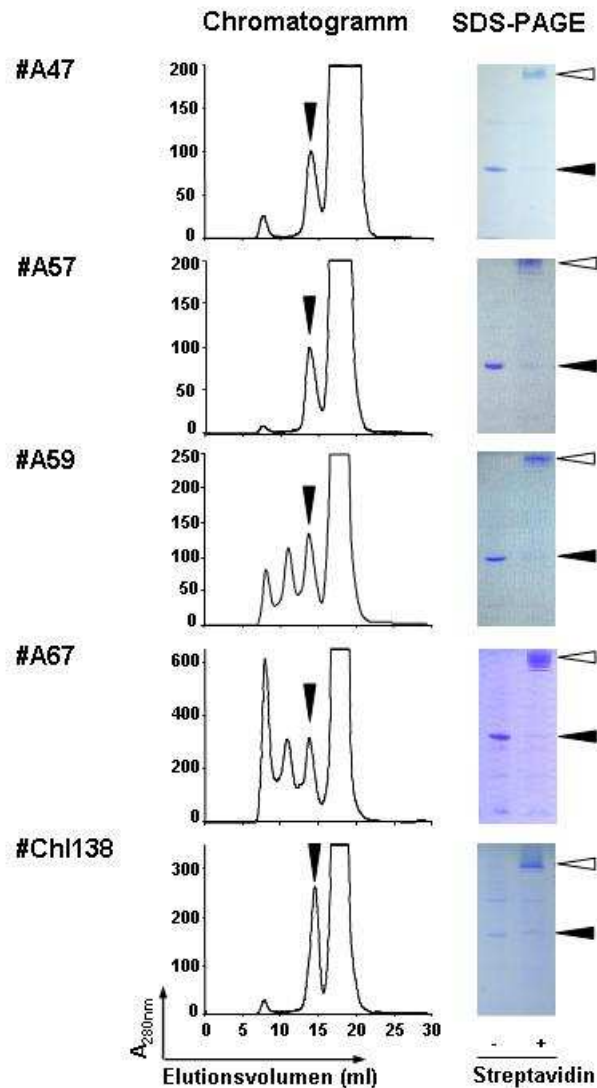
In Anwesenheit von anti-CD28 allein oder des Kontrollpeptids #Ch1138 produzierten maximal 0,08 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen das Zytokin IFN $\gamma$ . Eine unspezifische Stimulation mit PMA/Ionomycin erhöhte den Anteil IFN $\gamma$ -produzierender Zellen auf 9,82 - 65,75 %. Diese Effekte waren unabhängig von der Herkunft der Zellen aus Wildtyp- oder B27-transgenen Mäusen.

Keines der aus Aggrecan abgeleiteten Peptide induzierte IFN $\gamma$  in den Zellen aus der Milz von Wildtyp-Mäusen. Im Gegensatz dazu war der Anteil IFN $\gamma$ -produzierender Zellen bei den aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus B27-transgenen Mäusen signifikant zu den Zellen aus den entsprechend immunisierten Wildtyp-Mäusen erhöht. Besonders deutlich war die Stimulation durch #A59 (0,04 % vs. 0,28 %) und #A67 (0,0 % vs. 3,19 %) aus humanem Aggrecan.

Die Ergebnisse zeigen, dass humane Aggrecan-Peptide potentiell eine Antigen-spezifische Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in diesem murinen B27-transgenen Modellsystem auslösen können (130). Um HLA-B27-restringierte, Aggrecan-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten weiter zu untersuchen, wurden entsprechende HLA-B27-Tetramere hergestellt.

### **3.2.2 HLA-B27-Tetramere mit Peptiden aus humanem Aggrecan**

Mit jedem der vier Aggrecanpeptide bzw. dem Kontrollpeptid #Ch1138 wurden HLA-B27/Peptid-Monomere aufgefaltet und für den Nachweis Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu Tetrameren mit Streptavidin komplexiert. Der Erfolg der Auffaltung, Aufreinigung und Tetramerherstellung (Abb. 36) wurde mit der ermittelten Bindungsstärke für das jeweilige Peptid in die Tasche des HLA-B27-Heterodimers (nach (178)) korreliert (Tab. 7).



**Abb. 36: Herstellung von HLA-B27/Peptid-Komplexen und Tetrameren.** Protein der schweren Kette von HLA-B27(Cys67),  $\beta_2$ M und das entsprechende Peptid wurden unter renaturierenden Bedingungen schrittweise gemischt, biotinyliert, konzentriert und die Lösung durch Gelfiltration fraktioniert. In den Chromatogrammen (Spalte links) ist der eluierte Peak mit den HLA-B27/Peptid-Monomeren markiert (schwarzer Pfeil). Links davon liegende Peaks markieren unspezifische Proteinaggregate und rechts nicht in die Faltung einbezogenes Ausgangsmaterial und Biotin. Die Gelelektrophorese (Spalte rechts) unter nicht-reduzierenden Bedingungen nach Färbung mit Coomassie zeigt gereinigte HLA-B27/Peptid-Monomere ohne (schwarzer Pfeil) und mit Tetramerisierung mit Streptavidin-PE (weißer Pfeil). Darstellungen exemplarisch für 2 - 3 Auffaltungsreaktionen.

**Tab. 7: Korrelation der Bindungsscores der Peptide zu HLA-B27 und Effizienz der Auffaltung der HLA-B27/Peptid-Komplexe.** HLA-B27/Peptid-Monomere wurden wie für Abb. 36. beschrieben mit der (cys)-schweren Kette aufgefaltet, biotinyliert und gereinigt. Der relative Bindungsscore nach SYFPEITHI, die Lage des Peaks mit dem HLA-B27/Peptid-Monomer aus der Gelfiltration und der Proteinanteil diese Peaks im Vergleich zum Gesamtproteingehalt der Proteinlösung nach der Auffaltung wurden bestimmt. Die Daten stehen für 1 - 3 unabhängige Präparationen für das entsprechende HLA-B27/Peptid-Monomer.

<b>Bindungsscore nach SYFPEITHI</b>	<b>Peptid</b>	<b>Aufgefaltetes HLA/Peptid-Monomer</b>	
		<b>Lage des Peaks (ml)</b>	<b>Anteil bezogen auf alle Proteinaggregate (%)</b>
20	#A67	13,82 ml	23,1
24	#A59	13,66 ml	40,9
25	#A57	13,82 ml	96,8
26	#Chl138	14,55 ml	93,8 – 97,1
31	#A47	13,96 ml	73,4 - 80,7

Mit allen ausgewählten Peptiden aus humanem Aggrecan konnten HLA-B27/Peptid-Komplexe aufgefaltet werden. Der Anteil korrekt gefalteter HLA-B27-Monomere war mit den Aggrecanpeptiden #A47 und #A57 größer als der mit #A59 und #A67. Umgekehrt proportional stieg der Anteil unspezifischer Proteinaggregationen. Die Effizienz der Auffaltung korrelierte annähernd mit dem in mathematischen Modellen ermittelten Bindungsscore in der Reihenfolge der Bindungsstärke #A47 > #A57 > #A59 > #A67.

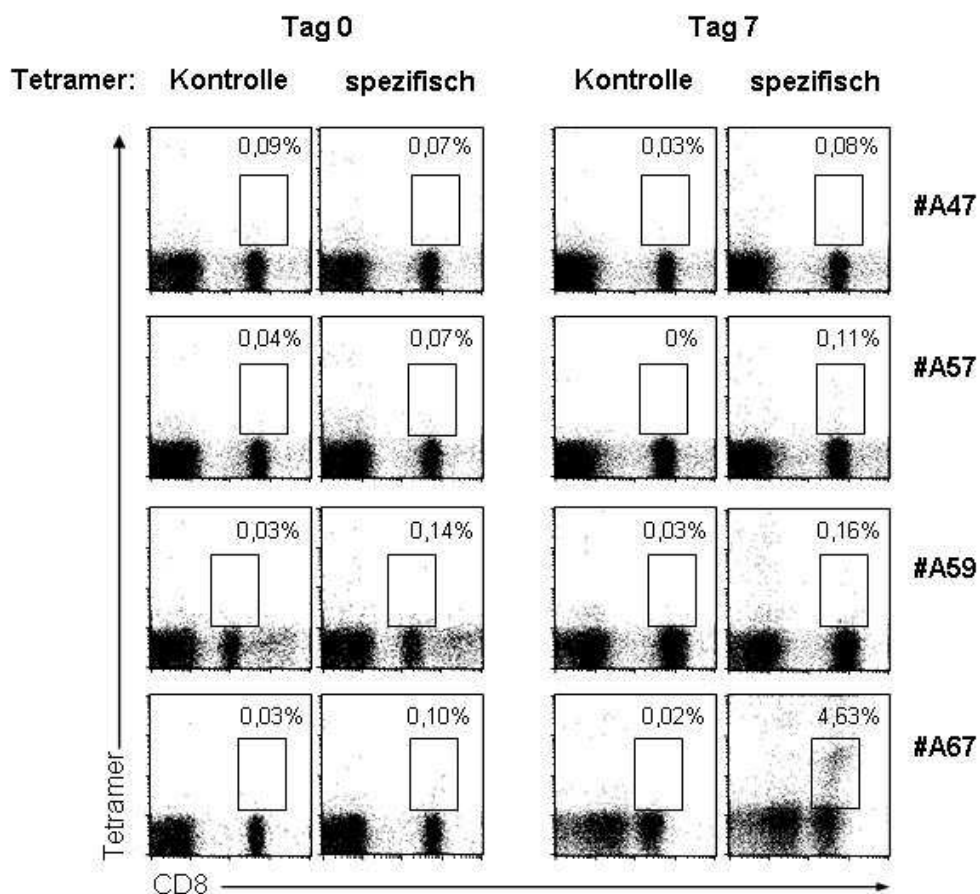
Als Negativkontrolle für alle Färbungen mit HLA-B27-Tetrameren in der Durchflusszytometrie und histologisch *in situ* wurde das HLA-B27/#Chl138-Tetramer mit dem Peptid #Chl138 aus *Chlamydia trachomatis* hergestellt. Der Bindungsscore von 26 dieses Peptids lag zwischen dem von #A47 und #A57. Entsprechend war die Auffaltungseffizienz mit spezifischen monomeren HLA-B27/Peptid-Komplexen und unspezifischer Proteinaggregation vergleichbar (vgl Tab. 3).

Die SDS-PAGE zeigte unter nicht-reduzierenden Bedingungen die nahezu vollständige Tetramerisierung der monomeren HLA-B27/Peptid-Komplexe durch Streptavidin-PE. Während die Monomere charakteristische Banden mit einem Molekulargewicht von ~ 35 kDa zeigten, lag die Bande für das Tetramer erwartungsgemäß bei ~ 200 kDa.

Im nächsten Schritt wurden die Spezifität eines Nachweises Aggrecan-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Hilfe dieser fluoreszenzmarkierten Tetramere in T-Zellen aus der Milz immunisierter B27-transgener Mäuse untersucht.

### 3.2.3 Frequenzen Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in B27-transgenen Mäusen nach Immunisierung.

Für die Bestätigung der HLA-B27-Abhängigkeit der Peptidpräsentation standen B27-transgene Mäuse zur Verfügung. Diese wurden mit Aggrecan-Peptiden immunisiert und die Frequenzen Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Milzzellen nach Färbung mit dem entsprechenden HLA-B27/Aggrecan-Peptid-Tetramer durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 37).



**Abb. 37: Nachweis HLA-B27-restringierte Aggrecan-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit HLA-B27/Aggrecan-Peptid-Tetrameren.** Jeweils  $3 - 5 \times 10^5$  Milzzellen unmittelbar nach der Entnahme oder nach 7 Tagen Kultur in Gegenwart von  $10 \mu\text{g/ml}$  des Peptids #A47, #A57, #A59 bzw. #A67 wurden mit dem entsprechenden HLA-B27/Aggrecan-Peptid-Tetramer inkubiert und für CD8 gegengefärbt. Der Anteil Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist in jedem Diagramm gezeigt.

Die Markierung mit dem HLA-B27/#Ch1138-Tetramer als Kontrolle ergab nur einen geringen Hintergrund (0 - 0,09 %) (Abb. 37). Die Frequenzen Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren nach 7 Tagen mit den Peptiden #A47, #A57 und #A59 unverändert zum Zeitpunkt der Entnahme und mit maximal 0,16 % für das Peptid #A59 nicht erhöht. Im Gegensatz dazu stieg die Frequenz der HLA-B27/#A67-Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach 7 Tagen in Gegenwart des Peptids #A67 signifikant von ursprünglich 0,10 % (0,09 ± 0,06 % in drei unabhängigen Experimenten) im Bereich der Nachweisgrenze der Tetramerfärbung auf 4,63 % (3,64 ± 1,31 % in drei unabhängigen Experimenten)  $p = 0,010$  (T-Test).

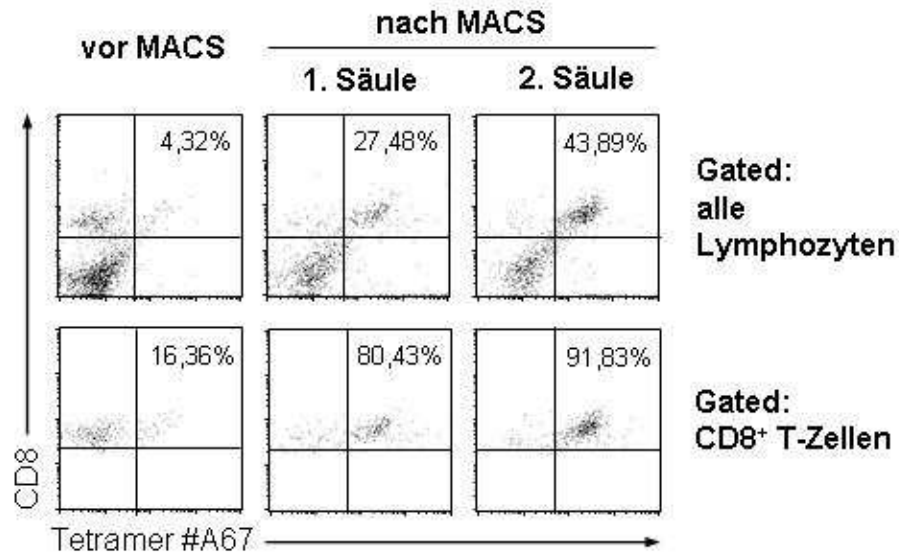
Wurden die gleichen HLA-B27/Aggrecan-Peptid-Tetramere mit Milzzellen aus mit den entsprechenden Peptiden immunisierten Wildtyp-Mäusen verwendet, wurden keine HLA-B27-Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen gefunden (Daten nicht gezeigt).

Mit Hilfe der HLA-B27/Aggrecan-Peptid-Tetramere konnten Aggrecan-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden. Da sich die Milzzellen aus B27-transgenen Mäusen am besten durch das Aggrecan-Peptid #A67 stimulieren ließen, wurde dieses Peptid und das entsprechende HLA-B27-Tetramer für die weiteren histologischen Untersuchungen verwendet.

### **3.2.4 Anreicherung Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch magnetische Zellsortierung mit HLA-B27/#A67-Tetrameren.**

Eine T-Zellkultur in Gegenwart eines spezifischen Antigens war eine Möglichkeit der Anreicherung Antigen-spezifischer T-Zellen. Für funktionelle Untersuchungen waren die erhaltenen Frequenzen dieser HLA-B27/Peptid-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Zellpopulationen noch nicht ausreichend. Deswegen sollten diese in einem weiteren Schritt durch magnetische Zellsortierung erhöht werden (Abb. 38).

Typischerweise lagen die Ausgangsfrequenzen HLA-B27/#A67-Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Gesamtpopulation der Lymphozyten aus der Milz nach Immunisierung der Mäuse mit dem entsprechenden Peptid unter <5 %. Ohne vorherige Depletion anderer Zellen lag nach einer ersten Positivsortierung mit dem Tetramer der Anteil Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Gesamtpräparation bei ~30 % und innerhalb der CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren bereits 80 % HLA-B27/#A67-Tetramer<sup>+</sup>. Wurde diese Positivfraktion unmittelbar auf eine zweite MACS-Säule gegeben, war der Anteil spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen noch größer: ~40 % aller Milzzellen und mehr als 90 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren durch das HLA-B27/#A67-Tetramer durchflusszytometrisch darstellbar.



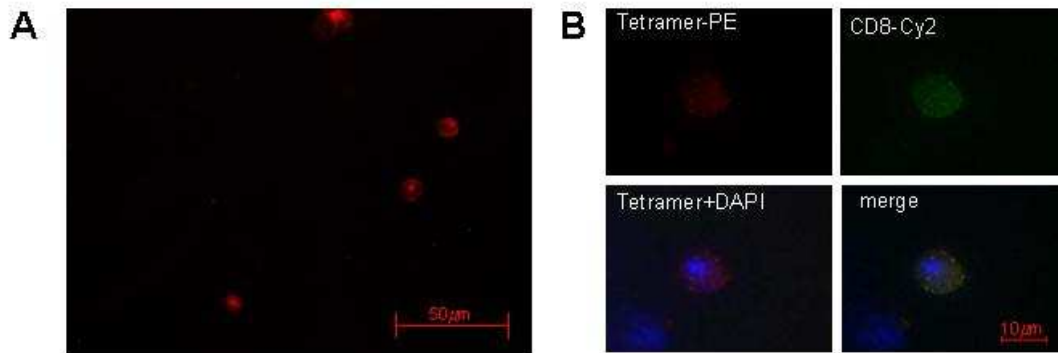
**Abb. 38: Anreicherung von HLA-B27/#A67-Tetramer<sup>+</sup> Zellen durch MACS.** Milzzellen ( $1 \times 10^6$ ) aus B27-transgenen Mäusen, die mit dem Peptid #A67 immunisiert waren, wurden *in vitro* mit  $10 \mu\text{g/ml}$  #A67 restimuliert. Nach 7 Tagen wurden die Milzzellen mit Hilfe des HLA-B27/#A67-Tetramers und PE-spezifischen Microbeads durch MACS angereichert. Die positive Fraktion nach der ersten Säule wurde unmittelbar auf eine zweite Säule gegeben und erneut die Positivfraktion gesammelt. Proben jeder Fraktion mit jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen wurden für CD8 gefärbt und durchflusszytometrisch bewertet. Die Anteile Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Gesamtpopulationen (obere Reihe) und in den CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen (untere Reihe) sind in jedem Diagramm gezeigt.

Diese Methodik der Tetramer-vermittelten Anreicherung peptidspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde schließlich auf humane T-Zellen übertragen und erfolgreich angewendet (177).

### 3.2.5 Mikroskopische Darstellung Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen

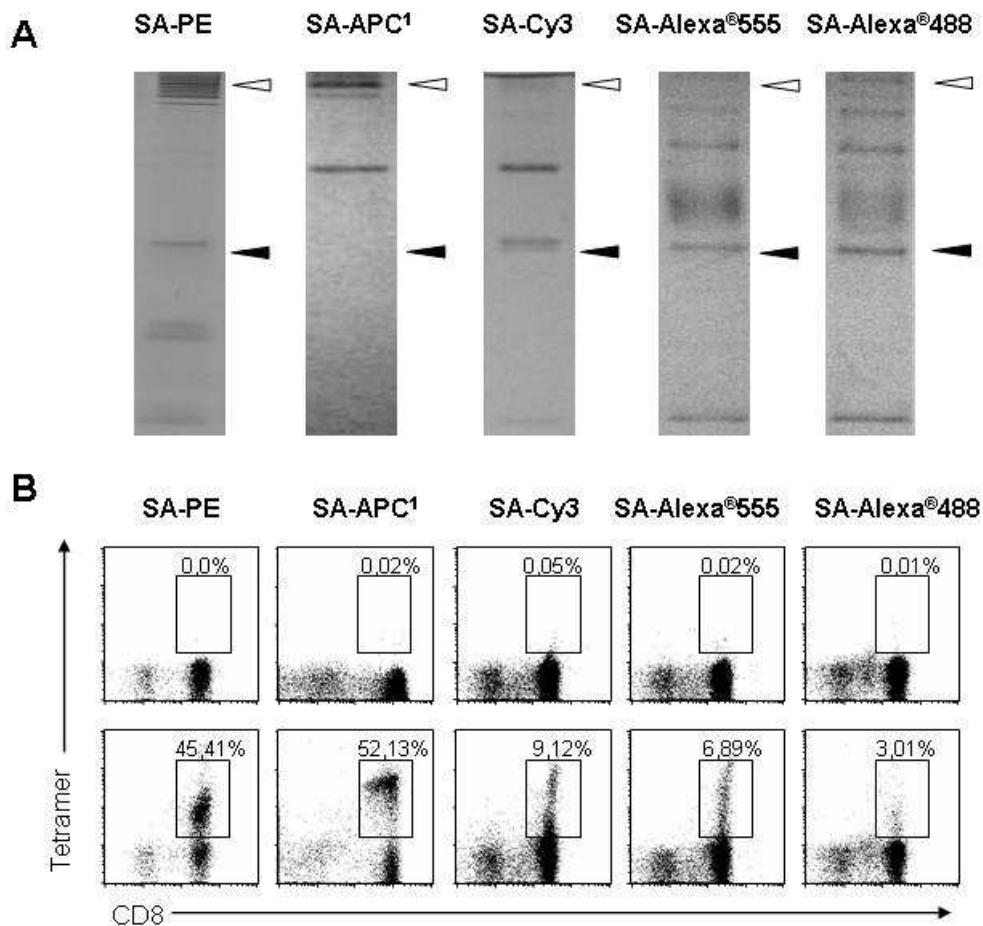
Nach erfolgreicher Anwendung der HLA-B27/#A67-Tetramere mittels Durchflusszytometrie beim Nachweis Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die aus der Milz präpariert und anschließend mittels MACS angereichert worden waren, sollten nun die Tetramere zur *in situ*-Darstellung Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen eingesetzt werden.





**Abb. 39: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung HLA-B27/#A67-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz immunisierter transgener B27-transgener Mäuse.** Wie für Abb. 38 beschrieben, wurden die mit dem HLA-B27/#A67-Tetramer angereicherten CD8<sup>+</sup> T-Zellen erneut mit dem PE-markierten Tetramer und zusätzlich mit anti-CD8 Antikörper gefärbt. Jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen wurden auf Objektträger zentrifugiert und die Cytospins im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Ausschnitte sind exemplarisch für drei unabhängige Experimente. Originalvergrößerungen: x100 (A) bzw. x1000 (B)

Mit Hilfe des HLA-B27/#A67-Tetramers angereicherte und gefärbte CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren nach Zytozentrifugation direkt fluoreszenzmikroskopisch darstellbar (Abb. 39), doch ließ die Fluoreszenzintensität des PE in der Anregung sehr schnell nach. Dieser Effekt beeinträchtigte den Nachweis Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in situ* in Gewebeschnitten. Deswegen wurden, um dieses durch die Proteinnatur des Fluorochroms bedingte Ausbleichen zu umgehen, mit den HLA-B27/Peptid-Monomeren Tetramere unter Verwendung unterschiedlich markierten Streptavidins hergestellt und in der Durchflusszytometrie getestet (Abb. 40). Für diesen Test wurden humane EBNA<sub>258-266</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Abschnitt 3.1.1 und entsprechende HLA-B27/EBNA<sub>258-266</sub>-Tetramer-Komplexe verwendet, da die Anzahl von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz #A67-immunisierter Mäuse doch sehr begrenzt war und für die durchflusszytometrischen Analysen nicht ausreichte.



**Abb. 40: Abhängigkeit der Sensitivität des Nachweises HLA-B27/EBNA<sub>258-266</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen von der Fluoreszenzmarkierung des Streptavidins im verwendeten Tetramer.** (A) Wie für Abb. 30 beschrieben hergestellte HLA-B27/EBNA<sub>258-266</sub>-Monomere wurden mit verschiedenen markierten Streptavidinen tetramerisiert. Die Gelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen nach Färbung mit Coomassie zeigt gereinigte Monomere ohne (schwarzer Pfeil) und mit Tetramerisierung (weißer Pfeil). (B) Jeweils  $5 \times 10^5$  PBMNC nach 7 Tagen Kultur in Gegenwart von  $10 \mu\text{g/ml}$  des Peptids EBNA<sub>258-266</sub> wurden mit dem HLA-B27/EBNA<sub>258-266</sub>-Tetramer (untere Reihe) bzw. dem HLA-B27/#Ch138-Tetramer als Kontrolle (obere Reihe) gefärbt. Nach Gegenfärbung mit anti-CD8 wurden die Antigen-spezifischen T-Zellen durchflusszytometrisch dargestellt. Der Anteil Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist in jedem Diagramm gezeigt. Darstellung für jeweils drei unabhängige Experimente. <sup>1</sup>Allophycocyanin.

Während mit PE- oder Allophycocyanin-konjugiertem Streptavidin nahezu vollständig die HLA-B27/EBNA<sub>258-266</sub>-Monomere in Tetramerkomplexen aufnahmen, war mit den Streptavidin-Präparationen, die direkt mit Cy3, Alexa-Fluor<sup>®</sup>555 und Alexa-Fluor<sup>®</sup>488 gekoppelt waren, die Tetramerisierung nur unvollständig oder minimal (Abb. 40 A). Dieses Ergebnis spiegelte sich auch in der Durchflusszytometrie wider (Abb. 40 B). Im Vergleich zum PE-markierten Tetramer, das in den CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen ~45 % Antigen-spezifische Zellen detektierte, bildeten die Tetramerkomplexe mit Cy3, Alexa-Fluor<sup>®</sup>555

bzw. Alexa-Fluor®488 nur 10 - 20 % der Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen ab. Das Allophycocyanin-markierte Tetramer war in seiner Effizienz der Darstellung der Zellen in der Durchflusszytometrie dem PE-markierten HLA-B27/EBNA<sub>258-266</sub>-Tetramer vergleichbar (~ 50 % vs. ~ 45 %). In der Standardfluoreszenzmikroskopie war dieses Fluorochrom trotz seiner im Vergleich zu PE besseren Lichtstabilität nicht verwendbar, weil ein entsprechender Filter nicht zur Verfügung stand. Das Ausbleiben einer effizienten Darstellung HLA-B27/EBNA<sub>258-266</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch die Tetramerkomplexe mit Cy3, Alexa-Fluor®555 bzw. Alexa-Fluor®488 bestätigte sich in der Fluoreszenzmikroskopie (Daten nicht gezeigt).

Daraus wurde der Schluss gezogen, dass die Verwendung anderer Fluorochrome als PE oder Allophycocyanin keine alternative, geeignete Strategie ist, die Visualisierung einer Tetramerfärbung zu stabilisieren, was für die Durchführung der *in situ* Tetramertechnologie Voraussetzung war.

### 3.2.6 Etablierung der Tetramerfärbung *in situ*

Daher ergab sich nun die Frage, ob PE und Allophycocyanin fluorenszenzmikroskopisch über sekundäre Antikörper mit anderen lichtstabilen Fluorochromen geeignet sind, Tetramere zu visualisieren. Die weiteren variablen Faktoren, die für die Etablierung der Methodik der *in situ*-Tetramerfärbung verwendet wurden, sind in Tab. 8 zusammengefasst.

**Tab. 8: Variable Parameter bei der Etablierung der *in situ*-Tetramerfärbung.**

#### (I) Vorbereiten des Präparates

Typ	Cytospin; Gefrierschnitt von Gewebe (7 - 10 µm dick)
Fixieren	Ohne; PFA, 2 % (w/v) in PBS; 2 min oder 20 min Aceton; 1 min Formaledhyd, 2 % (v/v) in PBS; 20 min
Block	Ohne; Serum aus dem Esel, 5 % (v/v) in PBS; BSA, 3 % (w/v) in PBS; Magermilchpulver, 4 % (w/v) in PBS; Fcγ-Rezeptor-spezifischer Ak (Klon 2.4G2/75), 50 µg/ml in PBS Streptavidin-Biotin-Blockierungslösung

**(II) TCR-spezifische Färbung**

Tetramer (primär)	Fluorochrom (an Streptavidin gekoppelt)	PE, Cy3, Alexa-Fluor <sup>®</sup> 488, Alexa-Fluor <sup>®</sup> 555 oder Allophycocyanin
	Konzentration	0,02 µg/ml, 0,04 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml
	Inkubation	Raumtemperatur: 30, 60 oder 90 min, 3 h; 4°C: üN
Antikörper (sekundär)	Herkunft, Fluorochrom	Ziege-anti-PE, Kaninchen-anti- Allophycocyanin
	Verdünnung	1:100, 1:500, 1:800, 1:1.000 oder 1:2.000
	Inkubation	Raumtemperatur: 30 min
Antikörper (tertiär)	Antigen, Fluorochrom	anti-Ziege-Cy3, anti-Kaninchen-Alexa- Fluor <sup>®</sup> 488
	Verdünnung	1:50, 1:100, 1:300, 1:600 oder 1:800
	Inkubation	Raumtemperatur: 30 min

**(III) Gegenfärbung für CD8**

Antikörper (primär)	Ratte-anti-Maus CD8, unmarkiert, Allophycocyanin (Klon 53-6.7); FITC (Klon KT15)
Antikörper (sekundär)	Kaninchen-anti-Allophycocyanin Verdünnung: 1:100, 1:500, 1:800, 1:1000 oder 1:2000 Inkubation: 30 min
Antikörper (tertiär)	anti-Kaninchen-Alexa-Fluor <sup>®</sup> 488 Verdünnung: 1:100, 1:500, 1:800, 1:1000 oder 1:2000 Inkubation: 30 min

Die in der Tab. 8 angeführten Parameter wurden in verschiedenen Kombinationen in Färbungen mit dem HLA-B27/#A67-Tetrameren getestet. Dabei zeigten sich sowohl der Ziege-anti-PE bzw. Ziege-anti-Allophycocyanin Antikörper als sekundärer Antikörper für das entsprechende Fluorochrom-markierte Streptavidin als geeignet (Daten nicht gezeigt). Unter den getesteten Bedingungen mit unfixiertem Gewebe funktionierte die Gegenfärbung aber nur mit dem direkt mit Allophycocyanin-gekoppelten monoklonalen anti-CD8-Antikörper, der für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet wurde (Abb. 42, 43). Die Analysen der

Parameter führten schließlich zu dem nachfolgend dargestellten Protokoll für die *in situ*-Tetramerfärbung (Tab. 9).

**Tab. 9: Standardprotokoll der *in situ*-Tetramerfärbung.**

***(I) Vorbereiten des Präparates***

Typ	Gefrierschnitt von Gewebe (7 µm dick)
Fixieren	Ohne
Block	Magermilchpulver, 4 % (w/v) in PBS; Fcγ-Rezeptor-spezifischer Antikörper (Klon 2.4G2/75), 50 µg/ml in PBS Streptavidin-Biotin-Blockierungslösung

***(II) TCR-spezifische Färbung***

Tetramer (primär)	HLA- I/Peptid-Tetramer mit PE-gekoppeltem Streptavidin; Konzentration: 50 µg/ml; Inkubation: 60 min, Raumtemperatur
Antikörper (sekundär)	Ziege-anti-PE; Verdünnung: 1:500; Inkubation: 30 min, Raumtemperatur
Antikörper (tertiär)	anti-Ziege-Cy3; Verdünnung: 1:300; Inkubation: 30 min, Raumtemperatur

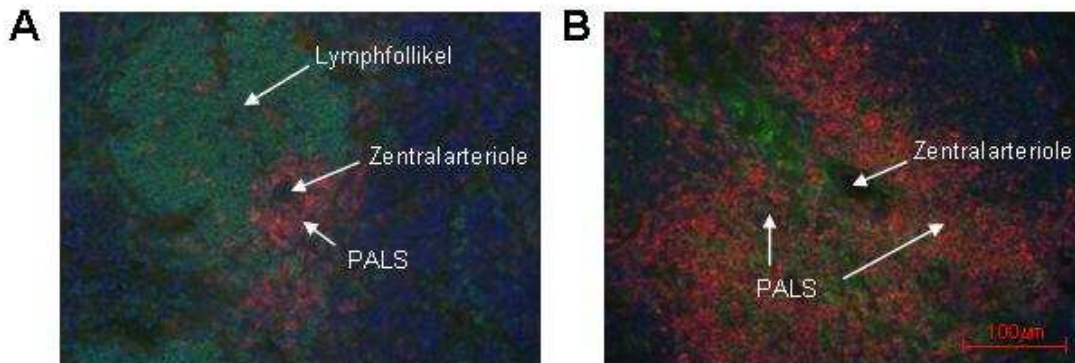
***(III) Gegenfärbung für CD8***

anti-CD8 (primär)	Ratte-anti-Maus, Klon 53-6.7, direkt Allophycocyanin-konjugiert
Antikörper (sekundär)	Kaninchen-anti-Allophycocyanin; Verdünnung: 1:500; Inkubation: 30 min, Raumtemperatur
Antikörper (tertiär)	anti-Kaninchen-Alexa-Fluor <sup>®</sup> 488; Verdünnung: 1:300; Inkubation: 30 min, Raumtemperatur

Die Etablierung dieser Methode fand Anwendung im Zusammenhang mit der Identifikation von humanen Aggrecanpeptiden in B27-transgenen Mäusen (130) und der Frage der T-Zell-Erkennung von HLA-B27/Peptid-Komplexen mit veränderten (Ser67) oder unveränderten (Cys67) schweren Ketten (179).

### 3.2.7 *In situ*-Tetramerfärbung HLA-B27-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz B27-transgener Mäuse

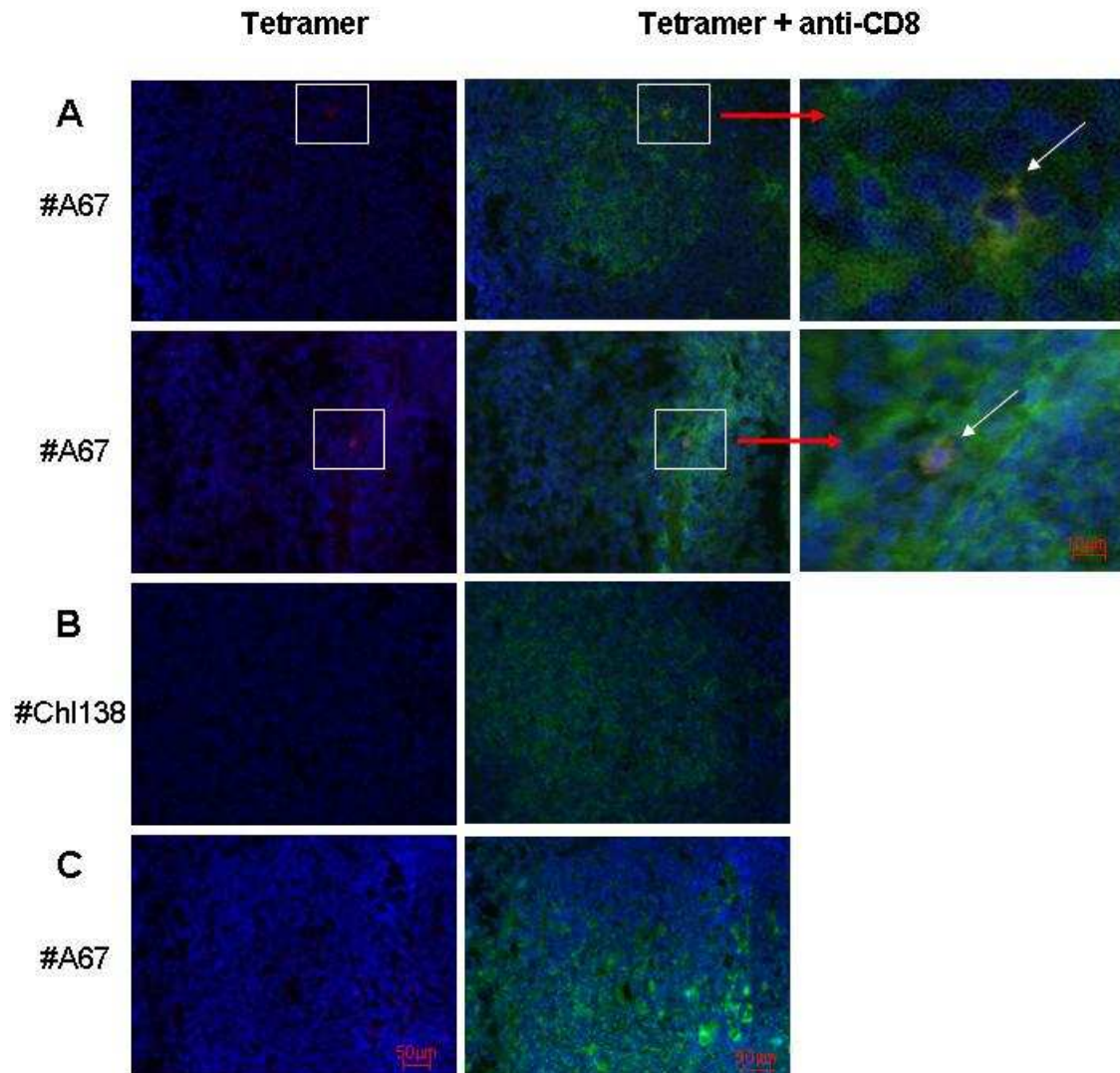
Um Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch im Gewebe nachzuweisen, wurden Gefrierschnitte vom Milzgewebe immunisierter B27-transgener Mäuse histologisch mit HLA-B27/Peptid-Tetrameren untersucht. Zunächst wurden in einer Übersicht T-Zellregionen im Gesamtorgan dargestellt (Abb. 41).



**Abb. 41: Fluoreszenzmikroskopische Übersicht der T-Zellregionen in der Milz immunisierter B27-transgener Mäuse.** Gefrierschnitte (7 µm) von Milzgewebe aus B27-transgenen Mäusen, immunisiert mit dem Peptid #A67, wurden (A) mit anti-CD4 (rot) und anti-B220 (grün) sowie (B) mit anti-CD4 (rot) und anti-CD8 (grün) gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Die Pfeile weisen auf die der periarteriolen lymphatischen Scheide (PALS) benachbarten Lymphfollikel. Die Ausschnitte sind exemplarisch für drei unabhängige Experimente. Originalvergrößerungen: x200.

Die Mehrheit aller T-Zellen, also CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen befand sich in der die Zentralarteriole umgebenden PALS. Dies wurde als Hinweis auf eine dort möglicherweise stattfindende Antigenpräsentation gewertet. Diese T-Zellregionen enthielten mit 70 - 90 % mehr CD4<sup>+</sup> T-Zellen als CD8<sup>+</sup> T-Zellen (10 - 30 %). Die lymphatischen Follikel seitlich der PALS bestanden hauptsächlich aus B220<sup>+</sup> B-Zellen.

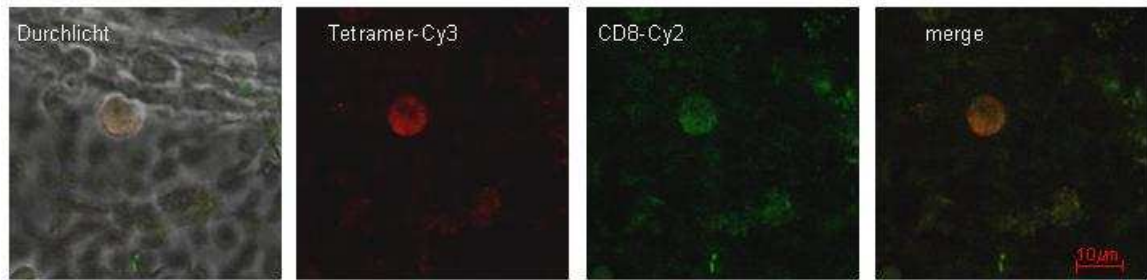
In *in situ*-Tetramerfärbungen wurde untersucht, ob durch die Immunisierung mit dem Peptid #A67 in der PALS auch die #A67-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu finden waren (Abb. 42, 43).



**Abb. 42: *In situ*-Nachweis HLA-B27/#A67-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz immunisierter B27-transgener Mäuse.** Cryoschnitte (7  $\mu$ m) des Milzgewebes mit dem Peptid #A67 immunisierter B27-transgener Mäuse wurden **(A)** mit dem HLA-B27/#A67-Tetramer (Cys67) (rot) bzw. **(B)** mit dem HLA-B27/#ChI138-Tetramer (rot) und mit anti-CD8 (grün) wie in Tab. 9 beschrieben gefärbt. **(C)** Schnitte aus Milzgewebe ebenfalls mit dem Peptid #A67 immunisierter Wildtyp-Mäuse dienten als Kontrollen in der Fluoreszenzmikroskopie. Die Ausschnitte sind exemplarisch für sechs unabhängige Experimente mit drei Mäusen. Originalvergrößerungen: x400, Ausschnitt rechts: x1000.

In allen Schnitten, aus mit dem Peptid #A67 immunisierten B27-transgenen Mäusen, waren HLA-B27/#A67-Tetramer markierte Zellen deutlich nachweisbar (Abb. 42A). Dieser Nachweis war spezifisch, da in dem gleichen Gewebe mit dem HLA-B27/#ChI138-Kontrolltetramer keine Zellen gefunden wurden (Abb. 42B) und auch das HLA-B27/#A67-Tetramer in der Milz Peptid-immunisierter Wildtyp-Mäuse *in situ* keine Zellen anfärbte (Abb. 42C).





**Abb. 43: *In situ*-Nachweis HLA-B27/#A67-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz #A67-immunisierter B27-transgener Mäuse.** Cryoschnitte (7 µm) des Milzgewebes mit dem Peptid #A67 immunisierter B27-transgener Mäuse wurden mit dem HLA-B27/#A67-Tetramer (rot) und mit anti-CD8 (grün) wie in Abb. 42 beschrieben gefärbt. Analyse erfolgte im LSM. Originalvergrößerungen: x640.

Aus der durchflusszytometrischen Analyse der Tetramerfärbung der Milzzellen war bekannt, dass 0,1 % HLA-B27/#A67-Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz vorlagen (Abb. 37). Die Doppelfärbung mit anti-CD8 *in situ* zeigte, dass die Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht gleichmäßig über das gesamte Organ verteilt waren, sondern in den T-Zellregionen, der PALS, vorlagen. Die lokalen Frequenzen der HLA-B27/#A67-Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen lagen bei  $1,5 \pm 1,6$  % aller CD8<sup>+</sup> Zellen in der PALS. Sie waren jedoch nicht in jeder T-Zellregion im entsprechenden Gewebeschnitt zu detektieren, so dass die Gesamtfrequenz auf 1/5 sank.

Diese Experimente zeigten, dass die Ergebnisse der *in situ*-Tetramerfärbung nicht nur die Daten aus der Durchflusszytometrie bestätigten, sondern zusätzliche Informationen über die räumliche Verteilung bzw. eine lokale Anreicherung Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen lieferten. Damit wurde gezeigt, dass Untersuchungen *in situ* mit HLA-B27/Peptid-Tetrameren sehr gut möglich sind und auch den zellulären Kontext dieser spezifischen Population darstellen können.

### 3.2.8 Zytokinexpression humaner CD8<sup>+</sup> T-Zellen von AS-Patienten nach Priming mit Peptiden aus humanem Aggrecan

Auf der Basis der in B27-transgenen Mäusen identifizierten immundominanten Aggrecanpeptide (#A47, #A57, #A59 und #A67) wurde getestet, ob diese auch beim Menschen eine CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort hervorrufen können. In diesem Rahmen wurden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (31 HLA-B27<sup>+</sup> AS-Patienten und 3 HLA-B27<sup>+</sup> Kontrollen) und/oder der Synovialflüssigkeit (3 HLA-B27<sup>+</sup> AS-Patienten) mittels intrazellulärer Färbung von IFN $\gamma$  nach kurzzeitiger Inkubation mit dem entsprechenden Peptid untersucht. Eine CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort gegen Aggrecanpeptide konnte bei keiner der



Kontrollen bei der intrazellulären Zytokinfärbung nachgewiesen werden. Die Analyse des peripheren Blutes von 31 AS-Patienten zeigte nur in drei Fällen eine vermehrte Ausschüttung von IFN $\gamma$ , als Zeichen für Antigen-spezifische Peptidstimulation. Bei zwei von drei AS-Patienten, bei denen die SFMNC untersucht wurden, wurde eine erhöhte IFN $\gamma$ -Sekretion ermittelt. In Tab. 10 sind die positiven Befunde bezüglich der IFN $\gamma$ -Produktion zusammengefasst.

**Tab. 10: Effekt von Aggrecanpeptiden auf die IFN $\gamma$ -Sekretion durch PBMNC oder SFMNC aus Patienten mit AS.** Jeweils  $2 \times 10^5$  mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut oder der Synovialflüssigkeit wurden 6 h mit 10  $\mu$ g/ml des entsprechenden Peptides *in vitro* inkubiert und danach die IFN $\gamma$ -Produktion der CD8 $^+$  T-Zellen nach intrazellulärer Färbung des Zytokins und Gegenfärbung mit anti-CD8 durchflusszytometrisch bestimmt. (+) >0,02 % aller CD8 $^+$  T-Zellen waren auch IFN $\gamma^+$  in der *in vitro*-Stimulation.

<b>Diagnose Untersuchungs- HLA-B27 Lfd. #</b>				<b>Peptid in der <i>in vitro</i>-Stimulation</b>			
				<b>#A47</b>	<b>#A57</b>	<b>#A59</b>	<b>#A67</b>
AS	PBMNC	+	36	-	-	+	-
		+	44	+	-	-	-
		+	50	-	+	-	-
	SFMNC	+	51	-	+	+	-
		+	56	-	-	+	+

Die Antworten auf die einzelnen Aggrecanpeptide waren unterschiedlich verteilt: Die CD8 $^+$  T-Zellen aus drei Patienten reagierten auf das Aggrecanpeptid #A59 (9 %), zwei Patienten (6 %) auf das Peptid #A57 und bei jeweils einem der 34 untersuchten AS-Patienten (3 %) konnte eine Reaktion auf die Aggrecanpeptide #A47 bzw. #A67 gezeigt werden.

Eine präferentielle Immunantwort auf das Peptid #A67 aus humanem Aggrecan, die in den B27-transgenen Mäusen gefunden wurde, konnte in der kleinen untersuchten Kohorte von AS-Patienten nicht bestätigt werden. Hier schien das Peptid #A59 immunogener zu sein. Ob in der Synovialflüssigkeit von AS-Patienten tatsächlich verstärkt HLA-B27/Aggrecan-Peptid-spezifische CD8 $^+$  T-Zellen vorliegen, wurde in weitergehenden Untersuchungen geprüft.

### 3.2.9 HLA-B27/Aggrecan-Peptid-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Synovialflüssigkeit von AS-Patienten

Mit den HLA-B27/Aggrecan-Peptid-Tetrameren wurden mononukleäre Zellen aus der Synovialflüssigkeit von vier weiteren AS-Patienten untersucht und mit den Zellen aus drei Kontrollpatienten verglichen (Tab. 11).

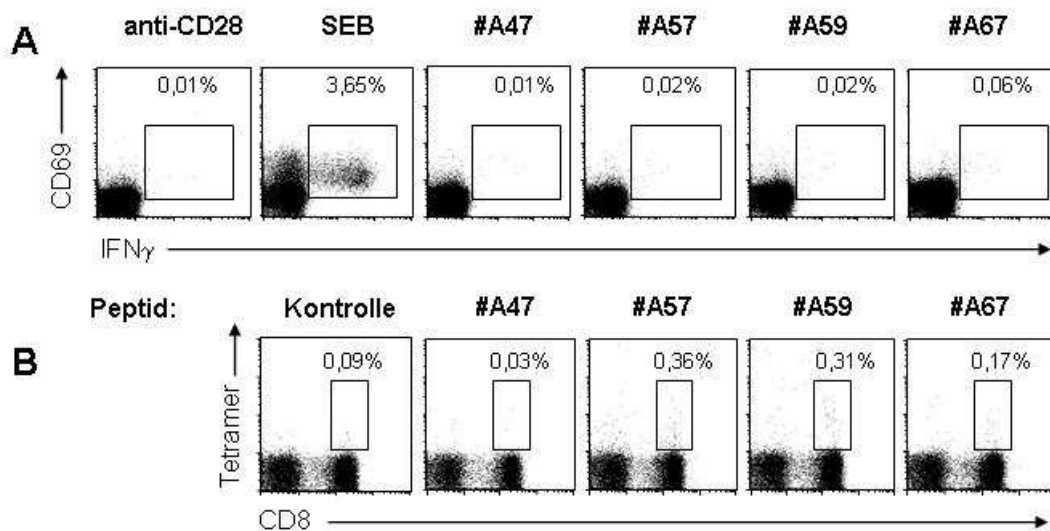
**Tab. 11: HLA-B27/Aggrecan-Peptid-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Synovialflüssigkeit von AS-Patienten.** Jeweils  $2 \times 10^5$  SFMNC wurden direkt mit dem entsprechenden HLA-B27/Aggrecanpeptid-Tetramer gefärbt und nach Gegenfärbung mit anti-CD8 der Anteil peptidspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. (+) >0,1 % aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren auch Tetramer<sup>+</sup>.

Diagnose	HLA-B27	Lfd. #	Peptid im HLA-B27-Tetramer			
			#A47	#A57	#A59	#A67
AS	+	56	-	+	+	+
	+	58	-	-	-	-
	+	59	-	-	-	+
	+	62	-	+	-	+
ReA	n.d.	57	-	-	-	-
UOA	+	60	-	-	-	-
Uspa	+	61	-	-	-	-

Unmittelbar aus der Synovialflüssigkeit und ohne peptidspezifische Kurzzeitstimulation *in vitro* wurden in drei der vier AS-Patienten direkt CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen, die spezifisch für eines der untersuchten Aggrecanpeptide im Kontext von HLA-B27 waren. Im Unterschied zum peripheren Blut war hier das Peptid #A67 wieder dominierend. In Zellpräparationen aus Kontrollpatienten wurden mit den HLA-B27/Aggrecan-Peptid-Tetrameren keine spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen gefunden. Damit wurde die Assoziation dieses HLA-I-Moleküls mit der AS nochmals bestätigt und darüber hinaus auch direkt gezeigt, dass die Präsentation von Aggrecanpeptiden an potentiell zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine Rolle in der lokalen Entzündung spielen kann.

Wegen des großen Zellbedarfes und der seltenen Gelegenheit, gleichzeitig Synovialflüssigkeit und peripheres Blut vom gleichen Patienten für Untersuchungen zur Verfügung zu haben, war die parallele Untersuchung aktivierter Effektorzytokin-

produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit HLA-B27/Aggrecan-Peptid-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen technisch zunächst nur bei wenigen Patienten möglich (Abb. 44).



**Abb. 44: IFN $\gamma$ -Sekretion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in SFMNC bei einem AS-Patienten und Vergleich mit der HLA-B27/#A67-Tetramerfärbung.** (A) Jeweils  $2 \times 10^5$  mononukleäre Zellen aus der Synovialflüssigkeit des Patienten 56 wurden *in vitro* 6 h mit 1  $\mu$ g/ml anti-CD28, 10  $\mu$ g/ml SEB oder je 10  $\mu$ g/ml der Aggrecanpeptide #A47, #A57, #A59 und #A67 kultiviert. Nach Färbung mit anti-CD69, anti-CD8 und intrazellulärer Färbung für IFN $\gamma$  wurde der Anteil der CD69<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>T-Zellen durchflusszytometrisch ermittelt und ist in jedem Diagramm gezeigt. (B) Jeweils  $2 \times 10^5$  SFMNC des Patienten 56 wurden direkt mit dem entsprechenden HLA-B27/Aggrecanpeptid-Tetramer gefärbt und nach Gegenfärbung mit anti-CD8 der Anteil peptidspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

In den SFMNC aus dem untersuchten AS-Patienten wurden aus der intrazellulären Zytokinfärbung nur nach vorheriger Inkubation mit dem Peptid #A67 vermehrt IFN $\gamma$ -produzierende CD69<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet (Abb. 44 A). Zwar waren auch in der Färbung mit dem HLA-B27/#A67-Tetramer peptidspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen darstellbar (0,17%), doch lag ihr Anteil unter dem der für das HLA-B27/#A57- (0,36%) bzw. HLA-B27/#A59-Tetramer (0,31%). Möglicherweise wurden also über die Peptid-spezifische Induktion der IFN $\gamma$ -Produktion eine andere Subpopulation spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt als in den Tetramerfärbungen. Damit waren die Ergebnisse beider Methoden nicht direkt vergleichbar und das wurde in den Folgeversuchen berücksichtigt.

### 3.2.7. Identifikation HLA-B27-restringierter Peptide aus Bestandteilen der extrazellulären Knorpelmatrix bei AS-Patienten

Es wurden zusätzlich zum Aggrecan die Proteinsequenzen von 20 weiteren Bestandteilen der extrazellulären Knorpelmatrix daraufhin geprüft, ob sie nonamere und dekamere Peptide enthalten, die mit hoher Affinität HLA-B27 binden können. Aus den Erfahrungen mit Peptiden aus *Chlamydia trachomatis* und humanem Aggrecan wurde ein Bindungsscore  $> 25$  nach dem Epitopvorhersageprogramm SYFPEITHI als Kriterium für eine hohe Bindungsaffinität definiert (Tab. 12 und Peptid-Sequenzen im Anhang). Die gewählten Parameter unterschieden sich von den von Atagunduz et al (180) untersuchten Peptiden durch einen höheren Bindungsscore und einer erweiterten Anzahl von Knorpelproteinen und Proteoglycanen.

**Tab. 12: Aus humanen Knorpelproteinen und Proteoglycanen abgeleitete nonamere (96) und dekamere (1) Peptide mit einem Bindungsscore  $\geq 25$  für HLA-B27.**

<b>Bestandteile der extrazellulären Knorpelmatrix</b>	<b>Anzahl für die Bindung in HLA-B27 identifizierte Peptide</b>
Aggrecan	9
Anchorin	2
Asporin	1
Biglycan	4
CMP	2
COMP	2
Fibromodulin	3
Fibronectin	9
Kollagen Typ I	4
Typ II	4
Typ III	3
Typ V	18
Typ VI	20
Typ IX	6
Typ X	0
Typ XI	4
Link Protein	2
Lumican	0
Versican	4
<b>insgesamt</b>	<b>97</b>

Insgesamt ergaben sich aus allen geprüften Sequenzen 96 potentielle nonamere Peptide und ein Decamer. Diese synthetischen Peptide wurden in 11 Pools mit je 3 - 10

Einzelpeptiden eingeteilt. Peptide mit vergleichbaren Bindungsaffinitäten wurden in den Pools gruppiert, um zu verhindern, dass Peptide mit hoher Bindungsaffinität eine mögliche Aktivierung von selbst-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Peptide mit niedrigerer Bindungsaffinität überdecken. Die Peptide #K91 und #K94 aus Kollagen Typ I wurden aufgrund ihres sehr hohen Bindungsscores nicht in Pools eingebunden.

Die Fähigkeit der so abgeleiteten Peptide, eine HLA-B27-abhängige CD8<sup>+</sup> T-Zellstimulation zu induzieren, wurde mit PBMNC von 30 HLA-B27<sup>+</sup> AS-Patienten und zwei HLA-B27<sup>+</sup> gesunden Probanden sowie SFMNC von drei HLA-B27<sup>+</sup> AS-Patienten mittels durchflusszytometrischem Nachweises intrazellulären IFN $\gamma$  analysiert (Tab. 13).

**Tab. 13: IFN $\gamma$ -Produktion aus CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit definierten Pools aus Knorpelpeptiden.** Jeweils 2 x 10<sup>5</sup> PBMNC oder SFMNC wurden *in vitro* 6 h mit den aus Knorpelpeptiden abgeleiteten Peptiden so inkubiert, dass für jedes Einzelpeptid die Konzentration bei 10  $\mu$ g/ml lag. In parallelen Kulturen erhielten die PB/SFMNC 1  $\mu$ g/ml anti-CD28. Nach Färbung mit anti-CD69, anti-CD8 und intrazellulärer Färbung für IFN $\gamma$  wurde der Anteil der CD69<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Eine Stimulation aus dem Peptidpool wurde dann als positiv bewertet (+), wenn der Anteil IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen mindestens doppelt so hoch war wie aus dem entsprechenden Ansatz mit anti-CD28 allein.

Diagnose	Unter- suchungs- material	HLA- B27	Lfd. #	Peptid		Pool#											
				#K91	#K94	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
AS	PBMNC	+	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		n.d.	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	<b>24</b>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	<b>26</b>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		n.d.	28	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
		n.d.	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	33	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

Diagnose	Unter- suchungs- material	HLA- B27	Lfd. #	Peptid						Pool							
				#K91	#K91	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
AS	PBMNC	+	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		+	35	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	
		+	<b>36</b>	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
		n.d.	41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
		+	43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	<b>44</b>	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
		+	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	48	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
		+	49	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
		+	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	54	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			SFMNC	+	<b>51</b>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
		+	53	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
ReA	PBMNC	+	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
UOA	SF	+	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

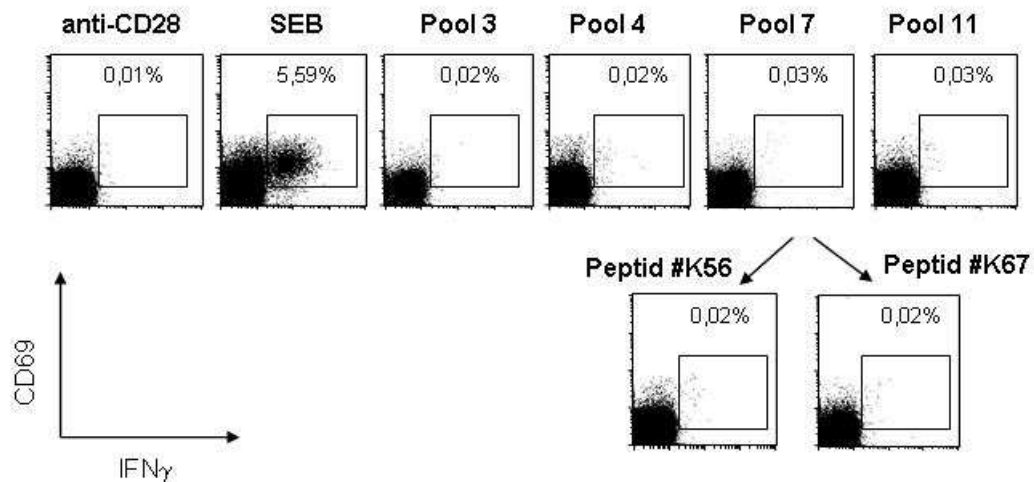
Die Einzelpeptide #K91 und #K94 induzierten bei jeweils drei der 35 untersuchten Patienten eine erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion. Auf die Pools mit den Knorpelpeptiden reagierten die CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut von 11 der 30 AS-Patienten und aus der Synovialflüssigkeit von allen drei untersuchten AS-Patienten. Reaktionen auf die Peptide des Pools 4 waren am häufigsten (20 %), aber auch Peptide aus Pool 1 (14 %), 7 (11 %) und 9 (14 %) waren bei einigen AS-Patienten immunogen. Die Patientenzellen reagierten nicht auf die Bestandteile des Pools 3. Bei den Kontrollpatienten ohne AS (7, 19) war bezogen auf die Produktion von IFN $\gamma$  grundsätzlich keine Reaktion auf gepoolte Knorpelpeptide zu beobachten.

Wurde eine CD8<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung mit einem spezifischen Pool gefunden, wurde ein zweiter Stimulationsassay mit den Einzelpeptiden des jeweiligen Pools durchgeführt, sofern ausreichend mononukleäre Zellen für eine Restimulation zur Verfügung standen. Das war bei 5 der insgesamt 13 positiven Proben möglich (Tab. 14).

**Tab. 14: Effekt der Restimulation IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus mit Peptidpools stimulierten SFMNC durch Einzelpeptide aus humanen Knorpel.** Jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen der Kulturen aus Tab. 13 wurden *in vitro* 6 h mit 10  $\mu$ g/ml des entsprechenden Einzelpeptids inkubiert. Nach Färbung mit anti-CD69, anti-CD8 und intrazellulär für IFN $\gamma$  wurde der Anteil der CD69<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Der Anteil IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der gesamten Kultur wurde dargestellt. Angaben in Prozent.

Diagnose	Unter- suchungs- material	HLA- B27	Lfd.#	Einzelpeptide					
				#K53	#K56	#K67	#K75	#K87	#K89
AS	PBMNC	+	24	-	-	-	-	-	-
			26	-	-	-	-	-	
			36	-	-	-	-	-	0,02
			44	0,02	0,03	0,04	0,04	0,03	-
	SFMNC	+	51	-	0,02	0,02	-	-	-

Bei drei der fünf Proben aus AS-Patienten, bei denen eine Restimulation mit den Einzelpeptiden durchgeführt wurde, konnte auch eine Erhöhung des Anteils IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden. Bis auf die Peptide #K56 und #K67 aus dem Pool 7, die jeweils aus den Zellen von zwei AS-Patienten eine Stimulation der Produktion von IFN $\gamma$  bewirkten, waren die Peptide #K53, #K75, #K87 und #K89 bei jeweils einer Probe wirksam.



**Abb. 45: Identifizierung selbst-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch durchflusszytometrische Analyse der IFN $\gamma$ -Sekretion.** Mononukleäre Zellen aus der Synovialflüssigkeit des AS-Patienten 51 wurden *in vitro* 6 h mit 1  $\mu$ g/ml anti-CD28, 10  $\mu$ g/ml SEB oder je 10  $\mu$ g/ml des Knorpelpeptidpools (obere Reihe) bzw. mit je 10  $\mu$ g/ml der jeweiligen Einzelpeptide (untere Reihe) kultiviert. Der Anteil der CD69<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der Gesamtpopulation wurde durchflusszytometrisch bestimmt und in jedem Diagramm dargestellt.

Die SFMNC von Patient 51 zeigten nach Stimulation mit den Einzelpeptiden eine schwache Reaktion auf die Peptide #K56 und #K67 aus Pool 7, während alle anderen Einzelpeptide keinen Effekt auf die IFN $\gamma$ -Expression hatten (Abb. 45).

**Tab. 15: Aus humanen Knorpelpeptiden abgeleitete Einzelpeptide, die bei AS-Patienten eine Stimulation der IFN $\gamma$ -Produktion induzierten.**

<b>Peptid</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Herkunft, Struktur/Funktion</b>	<b>Pool#</b>
#K53	RRKGKGKGR	Kollagen Typ V ( $\alpha$ 3-Kette), nicht helikal	4
#K56	GRPGADGAR	Kollagen Typ V ( $\alpha$ 3-Kette), tripelhelikal	7
#K67	ARRLTLARR	Kollagen Typ VI ( $\alpha$ 2-Kette), nicht helikal	7
#K75	GRRGDKGPR	Kollagen Typ VI ( $\alpha$ 3-Kette), tripelhelikal und Zellbindungsdomäne (RGD)	7
#K87	GRQGEKGAK	Kollagen Typ XI ( $\alpha$ 1-Kette)	4
#K89	GRPGADGGR	Kollagen Typ XI ( $\alpha$ 1-Kette), tripelhelikal	8
#K91	LRYSKLYRL	Biglycan, <i>Leucine-rich repeats</i> (LRR)-S3	Einzel
#K94	KRAYYNGISL	Biglycan, LRR-T7	Einzel



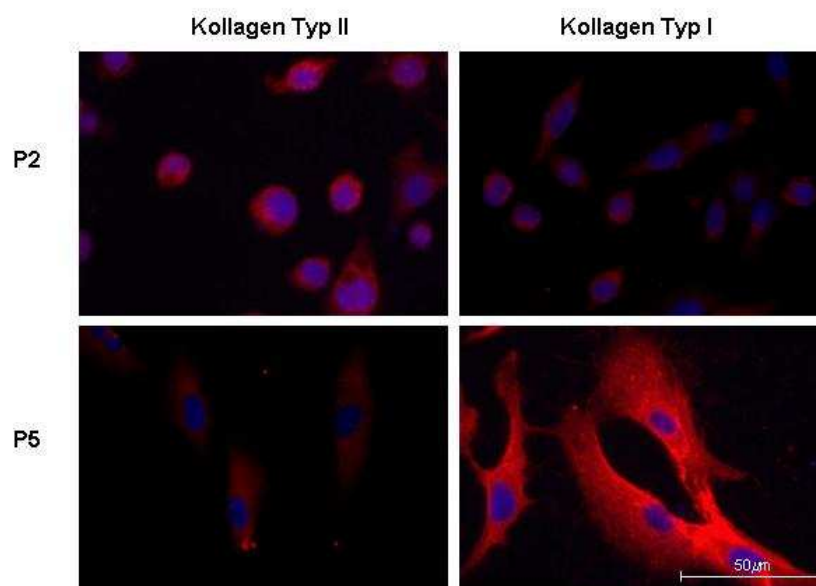
Im Ergebnis wurden 97 Peptide mit hoher Bindungsaffinität für HLA-B27 (178) aus insgesamt 20 Proteinen theoretisch abgeleitet. Davon waren 8 in der Lage *in vitro* spezifisch CD8<sup>+</sup> T-Zellen zur Produktion von IFN $\gamma$  zu stimulieren. Diese Peptide stammten überwiegend aus Kollagenen (Typ V, VI, XI) und Biglycan. Auf diese Weise ist es gelungen, neben den bereits veröffentlichten Knorpelantigenen, weitere immunogene Peptide aus der extrazellulären Knorpelmatrix bei AS-Patienten zu identifizieren.

Die Identifizierung immunogener Knorpelantigene bei AS-Patienten könnte somit eine Erklärung für die Knorpel-abhängige akute Entzündungspathologie bei AS-Patienten sein. Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, inwieweit Chondrozyten dazu beitragen. Es wurde die Fähigkeit von Chondrozyten untersucht, CD8<sup>+</sup> T-Zellen direkt zu stimulieren.

### 3.3 Interaktionen von Chondrozyten und Peptid-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen

#### 3.3.1 Expression von CD80 und HLA-B27 durch Chondrozyten in der *in vitro*-Kultur

Zunächst wurden aus dem Femurkopf eines HLA-B27<sup>+</sup> AS-Patienten Chondrozyten isoliert. Diese wurden in dreidimensionale Alginatekulturen gebracht, um den Chondrozyten-Phänotyp zu stabilisieren. Funktionelle Untersuchungen der Chondrozyten wurden mit aus dem Alginate ausgewanderten Zellen in der Monolayer-Kultur durchgeführt. Über spezifische Färbungen für Kollagen Typ I bzw. Typ II wurde der Differenzierungsgrad der Zellen im Laufe der Monolayer-Kultur bestimmt (Abb. 46).

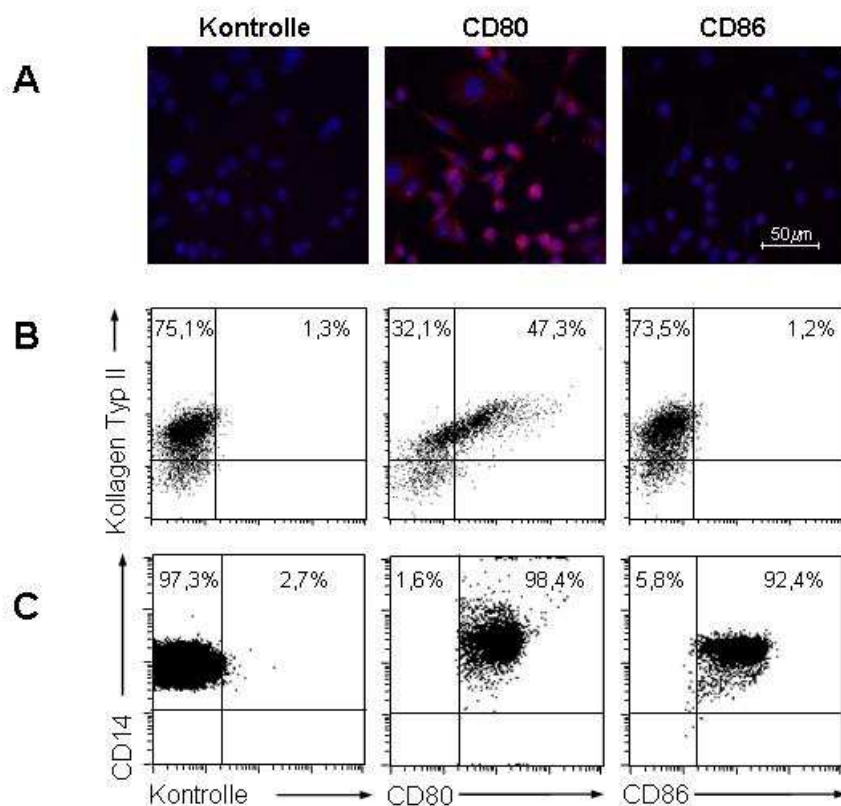


**Abb. 46: *In vitro*-Phänotyp humaner Chondrozyten aus dem Gelenkknorpel.** Chondrozyten ( $3 \times 10^6/\text{ml}$ ) aus dem hyalinen Gelenkknorpel wurden in dreidimensionalen Alginatekulturen angezchtet. Die ausgewanderten Chondrozyten wurden nach der zweiten (P2) und 5. Passage (P5) auf Glasplättchen gebracht. Diese Monolayer-Kulturen der humanen artikulären Chondrozyten wurden mit anti-Kollagen Typ II (rot; linke Seite) bzw. anti-Kollagen Typ I (rot; rechte Seite) gefärbt. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau) und die Zellen wurden in der Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Originalvergrößerung: x400.

Chondrozyten aus der zweiten Passage waren abgerundet und produzierten überwiegend das für differenzierte Chondrozyten charakteristische Kollagen Typ II. Zu diesem Kulturzeitpunkt war die Produktion von Kollagen Typ I gering. Über einen Kultivierungszeitraum von 5 Passagen verloren die Chondrozyten im Monolayer ihren spezifischen Phänotyp. Die Dedifferenzierung machte sich durch ein Fibroblasten-ähnliches Aussehen der Zellen und die starke Produktion von Kollagen Typ I bemerkbar.

Die Kultivierung im Alginat ermöglichte es prinzipiell, Chondrozyten über lange Zeit in Kultur zu halten, wobei Chondrozyten kontinuierlich aus dem Alginat auswanderten. Da eine mögliche langsame aber sukzessive Änderung des Phänotyps auch die Fähigkeiten der Chondrozyten zur Antigenpräsentation betreffen könnte, wurden in allen folgenden funktionellen Experimenten ausschließlich Chondrozyten aus der zweiten Passage, nach Beginn der Kultivierung im Alginat, als Monolayerkulturen eingesetzt.

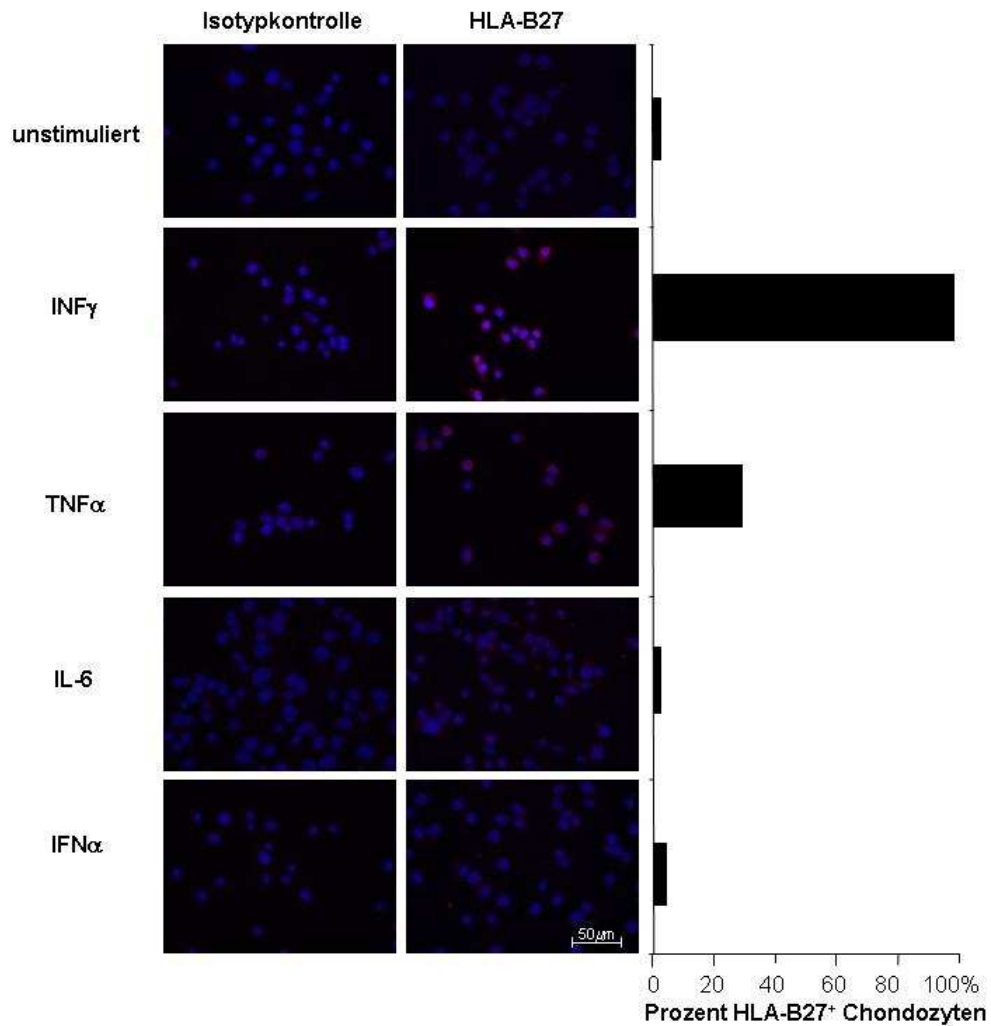
Zunächst sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit und unter welchen Bedingungen Chondrozyten auf ihrer Oberfläche die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 exprimieren (Abb. 47 - 49).



**Abb. 47: Expression kostimulatorischer Moleküle für die T-Zellaktivierung durch Chondrozyten.** Humane artikuläre Chondrozyten wurden in Alginat kultiviert. **(A)** Ausgewanderte Zellen der 2. Passage wuchsen auf Glasplättchen und wurden mit anti-CD80, anti-CD86 oder einem entsprechenden Kontrollantikörper gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Originalvergrößerung: x400. **(B)** Parallel wurden adhärenente Zellen in Suspension gebracht und mit Antikörpern gegen Kollagen Typ II, CD80, CD86 oder mit einem Kontrollantikörper gefärbt. Die Antikörperbindung wurde mittels Vielfarben-Durchflusszytometrie ermittelt. Alle Plots stehen exemplarisch für Chondrozyten aus 5 verschiedenen Hüfköpfen. **(C)** Als positive Kontrolle in der Durchflusszytometrie wurde die Färbung für die Kostimulatoren CD80 und CD86 bei CD14<sup>+</sup> dendritischen Zellen durchgeführt.

Der chondroide Phänotyp *in vitro* expandierter Chondrozyten wurde über die Expression von Kollagen Typ II bestätigt. Während eine CD86-Expression in den Chondrozyten nicht beobachtet werden konnte (nur  $0,9 \% \pm 0,9 \%$  der Kollagen Typ II<sup>+</sup> Zellen waren auch CD86<sup>+</sup>), exprimierten etwa die Hälfte der Kollagen Typ II<sup>+</sup> Chondrozyten das kostimulatorische Molekül CD80 ( $45 \% \pm 5 \%$ ) (Abb. 47 B). Die Kontrollansätze mit dendritischen Zellen als Beispiel für professionelle APC bestätigten die Spezifität der für die Darstellung von CD80 bzw. CD86 verwendeten Antikörper (Abb. 47 C).

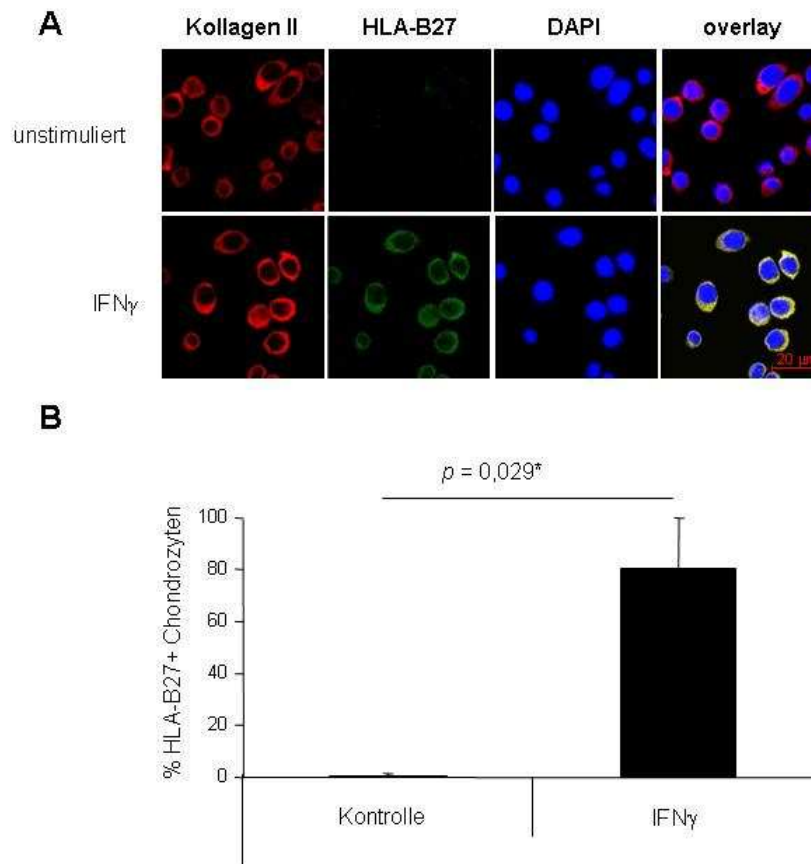
In *in situ*-Schnitten des Gelenkknorpels von Femurköpfen von AS-Patienten wurde gezeigt, dass naive Chondrozyten kein HLA-B27 produzierten (Abb. 28, 29). In Bereichen, die morphologisch Zell-Cluster (proliferierende Chondrozyten) zeigten, waren die Chondrozyten HLA-B27<sup>+</sup> (vgl. Abb. 28, 29). Die *in situ* Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass durch die knorpelnahe akute Entzündungspathologie die Expression von HLA-B27 auf den Chondrozyten hochreguliert werden könnte. Daher wurde mit verschiedenen rekombinanten pro-inflammatorischen Zytokinen getestet, ob sich die Expression von HLA-B27 *in vitro* induzieren lässt (Abb. 48).



**Abb. 48: Expression von HLA-B27 durch humane Chondrozyten *in vitro*.** Artikuläre Chondrozyten auf Glasplättchen (wie für Abb. 47 A beschrieben), wurden *in vitro* mit 0,5 ng/ml IFN $\gamma$ , 50 ng/ml TNF $\alpha$ , 50 ng/ml IL-6 oder 100 ng/ml IFN $\alpha$  für 48 h behandelt. Danach wurden die Chondrozyten mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen HLA-B27, Klon HLA-ABC-m3 (rot, rechte Seite) bzw. der Isotypkontrolle IgG2a (rot, linke Seite) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt und die Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Originalvergrößerung: x400.

Nach 48 h *in vitro*-Stimulation mit 0,5 ng/ml IFN $\gamma$  waren 98 % aller Chondrozyten aus einer Kultur HLA-B27<sup>+</sup>. Unter vergleichbaren Kulturbedingungen waren die anderen untersuchten proinflammatorischen Zytokine weniger effizient als das IFN $\gamma$ . Die Stimulation mit TNF $\alpha$  erbrachte in 29 % der Chondrozyten eine detektierbare Expression von HLA-B27. Mit maximal 4 % war die Expression von HLA-B27 durch humane Chondrozyten in Gegenwart von 50 ng/ml IL-6 oder 100 ng/ml IFN $\alpha$  jeweils deutlich niedriger als bei den anderen untersuchten Zytokinen, so dass in den folgenden funktionellen Untersuchungen die Chondrozyten mit 0,5 ng/ml IFN $\gamma$  vorbehandelt wurden.

Die histologische Auswertung von mit IFN $\gamma$  stimulierten Chondrozyten wurde durch die Darstellung der Zellen in der LSM ergänzt (Abb. 49).



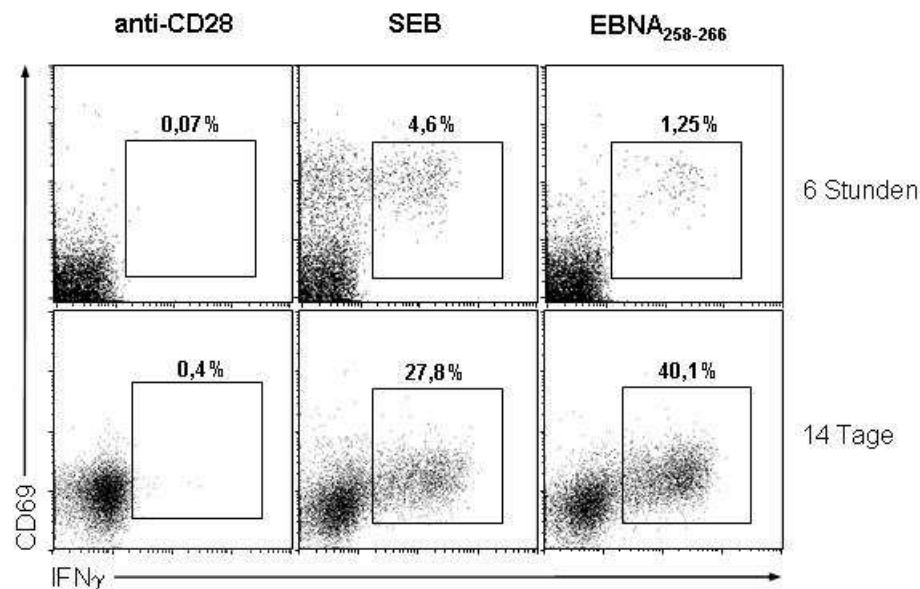
**Abb. 49: Expression von HLA-B27 durch humane Chondrozyten.** Humane artikuläre Chondrozyten, die aus dem Alginate ausgewandert waren (wie für Abb. 47 A beschrieben), wuchsen adhärent auf Glasplättchen. **(A)** Unbehandelte (obere Reihe) oder mit 0,5 ng/ml IFN $\gamma$  für 48 h stimulierte Kulturen (untere Reihe) wurden mit fluoreszenzmarkiertem anti-Kollagen Typ II (rot), anti-HLA-B27, Klon HLA-ABC-m3 (grün) und DAPI (blau) gefärbt und mittels LSM analysiert. Originalvergrößerung: x640. **(B)** Aus jeder Kultur wurden von jeweils 100 Kollagen Typ II<sup>+</sup> Chondrozyten die Expression von HLA-B27 bestimmt. Mittelwerte  $\pm$  SD aus vier vergleichbaren Experimenten.

Die LSM bestätigte die Morphologie von HLA-B27<sup>+</sup> Chondrozyten. Wie auch zuvor in der Fluoreszenzmikroskopie gezeigt, war der Anteil HLA-B27 exprimierender Chondrozyten aus den Kulturen mit 0,5 ng/ml IFN $\gamma$  für 48 h signifikant erhöht im Vergleich zu unstimulierten Chondrozyten ( $p = 0,029$ ).

Die Behandlung von CD80<sup>+</sup> Chondrozyten mit dem proinflammatorischen Zytokin IFN $\gamma$  bewirkte die Hochregulation von HLA-B27 und stellte damit die Voraussetzungen für die Untersuchungen zur Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Stimulation durch Chondrozyten her.

### 3.3.2 Herstellung einer Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Linie

Bei dem HLA-B27<sup>+</sup> AS-Patienten, von dem humane Chondrozyten in der Alginatmatrix kultiviert wurden, konnte in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes eine HLA-B27-restringierte Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort identifiziert werden. Bei dem Antigen handelte es sich um EBNA<sub>258-266</sub>, einem HLA-B27-restringierten immundominanten Peptid aus dem Epstein Barr Virus. Eine Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort auf Knorpelantigene konnte bei diesem Patienten nicht festgestellt werden. Um das Potential der Chondrozyten für eine HLA-I-restringierte Präsentation von Antigenen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen, bedienten wir uns eines Modellsystems mit einer EBNA<sub>258-266</sub>-spezifischen autologen HLA-B27-restringierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Linie (Abb. 50).



**Abb. 50: Induktion von EBNA<sub>258-266</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro*.** PBMC von HLA-B27<sup>+</sup> und EBV-seropositiven Spendern wurden in der Anwesenheit von 1 µg/ml anti-CD28, 10 µg/ml SEB bzw. 10 µg/ml EBNA<sub>258-266</sub>-Peptid für 6 h oder für 14 Tage mit einmaliger Restimulation durch das entsprechende Agens kultiviert. Die Zellen aus der Kultur wurden für CD69, IFN $\gamma$  und CD8 gefärbt. Die Anteile der durch Vielfarben-Durchflusszytometrie ermittelten CD69<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind gezeigt. Plots sind exemplarisch für jeweils mindestens drei Kulturansätze mit PBMC aus 3 Spendern.

Nach einer Kurzzeitstimulation über 6 h mit dem EBNA<sub>258-266</sub>-Peptid in Gegenwart professioneller APC aus PBMC produzierten bis zu 1,25 % aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen IFN $\gamma$ . Eine Fortsetzung der Antigen-spezifischen *in vitro*-Stimulation mit dem EBNA<sub>258-266</sub>-Peptid in Gegenwart autologer APC aus dem peripheren Blut über weitere 14 Tage

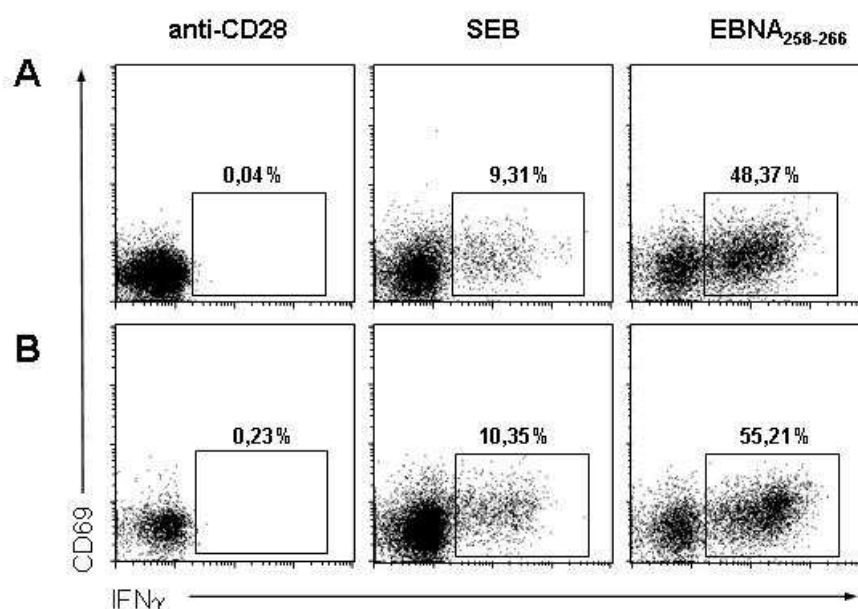
fürte zu einer signifikanten Steigerung ( $p = 0,029$ ) des Anteils IFN $\gamma$ -produzierender CD8 $^+$  T-Zellen (31,6 - 51,8 %). Der Effekt der Peptid-Stimulation war über den Kultivierungszeitraum von 14 Tagen stärker als die unspezifische Stimulation mit SEB (40 % vs. 28 %). Die Inkubation mit anti-CD28 zeigte weder nach 6 h, noch nach 14 Tagen eine intrazelluläre Ansammlung von IFN $\gamma$  in CD8 $^+$  T-Zellen.

Mit Hilfe dieser Antigen-spezifischen Kulturen standen also ausreichend prä-aktivierte CD8 $^+$  T-Zellen für funktionelle Untersuchungen zur HLA-B27-vermittelten Interaktion von Chondrozyten mit potentiell zytotoxischen CD8 $^+$  T-Zellen zur Verfügung.

### 3.3.3 Etablierung der Bedingungen für die Kokultur von Chondrozyten und T-Zellen

Ausgangspunkt für die Kostimulations-Experimente waren zwei verschiedene Zell-Typen mit unterschiedlichen Eigenschaften, für die geeignete Kulturbedingungen gefunden werden mussten.

Chondrozyten adhärten und wuchsen nur in ihrem spezifischen Chondrozyten-Medium (Daten nicht gezeigt). Daher wurde zunächst getestet, ob die CD8 $^+$  T-Zellen in diesen Medien ihre spezifische Funktion erhielten. Dazu wurden dendritische Zellen als professionelle APC gemeinsam mit Antigen-spezifischen T-Zellen in zwei verschiedenen Kulturmedien inkubiert und die IFN $\gamma$ -Produktion der CD8 $^+$  T-Zellen bestimmt (Abb. 51).



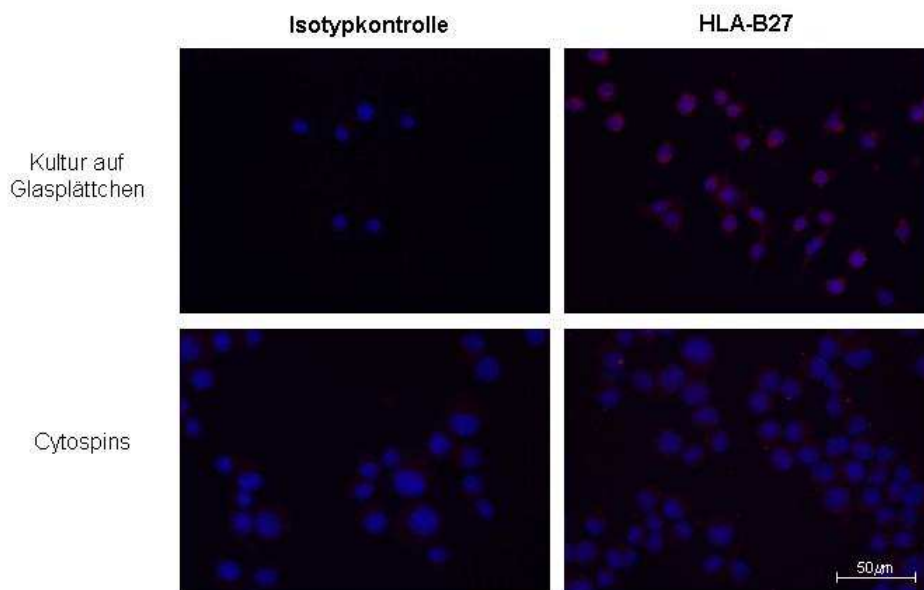
**Abb. 51: Etablierung des Kulturmediums für die Kokultur von T-Zellen mit APC.** Dendritische Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden mit  $10 \mu\text{g/ml}$  EBNA<sub>258-266</sub>-Peptid inkubiert und nicht-



gebundenes Peptid anschließend ausgewaschen, bevor die Zellen in Kokulturen mit  $5 \times 10^5$  Zellen einer autologen EBNA<sub>258-266</sub>-Peptid-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Linie vom Tag 14 zusammen in Kultur gebracht wurden. Als Kontrollen wurden die T-Zellen mit 1 µg/ml anti-CD28 oder 10 µg/ml SEB behandelt. Die Versuche wurden parallel in AB-Medium (**A**) und Chondrozyten-Medium (**B**) durchgeführt. Nach 6 h wurden die Zellen für CD69, IFN $\gamma$  und CD8 gefärbt. Die Anteile der durch Vielfarben-Durchflusszytometrie ermittelten CD69+/IFN $\gamma$ + /CD8+ T-Zellen sind gezeigt.

Unabhängig vom verwendeten Zellkulturmedium lag der Anteil IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den Suspensions-Kulturen, nach Stimulation mit EBNA<sub>258-266</sub>-Peptid-gepulsten dendritischen Zellen, bei  $50 \pm 5,6$  % aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Das Medium hatte somit keinen unspezifischen Einfluss auf die Peptid-spezifische Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen und konnte als für die Chondrozyten geeignetes Kulturmedium in den Kokulturrexperimenten verwendet werden.

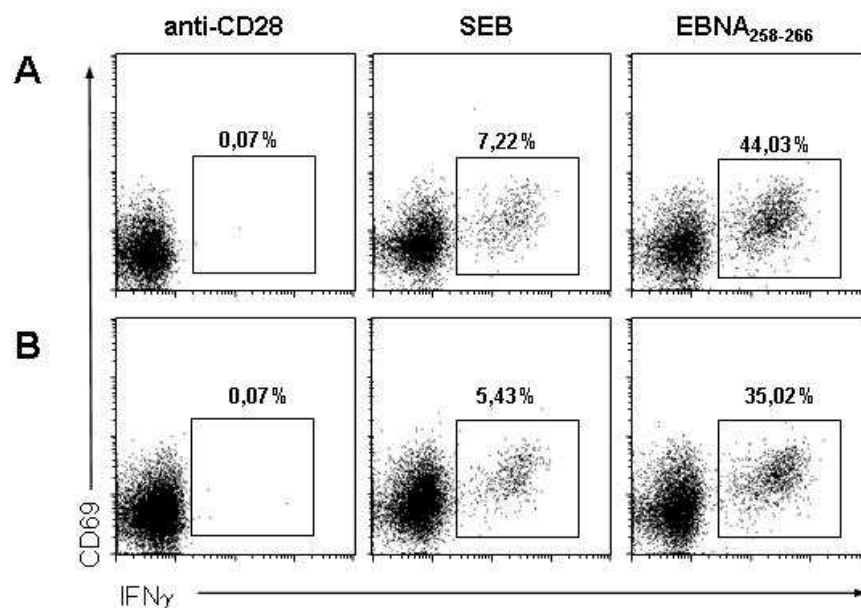
Auch in anderer Hinsicht waren die Chondrozyten der in der Kokultur experimentell schwerer darzustellende Zelltyp. So wurde zunächst die Stabilität der Immunfärbung für HLA-B27 nach Behandlung von Zellen mit Trypsin und chelierenden Agenzien untersucht (Abb. 52).



**Abb. 52: Effekt von Trypsin/EDTA auf HLA-B27 bei humanen Chondrozyten .** Humane artikuläre Chondrozyten nach Alginat-Kultur wurden *in vitro* 48 h mit 0,5 ng/ml IFN $\gamma$  behandelt. (**A**) Die Zellen wuchsen wie in Abb. 47 A beschrieben adhären auf Glasplättchen. (**B**) Chondrozyten wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und dann mittels Cytospin wieder auf Objektträger transferiert. Alle Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen HLA-B27, Klon HLA-ABC-m3 (rot: rechte Seite) bzw. der Isotypkontrolle IgG2a (rot: linke Seite) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt und die Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Originalvergrößerung: x400.

Auf den Chondrozyten, die direkt auf den Glasplättchen wuchsen, konnte die Expression von HLA-B27 unter Zugabe von 0,5 ng/ml IFN $\gamma$  nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu erschienen die Zellen, die zunächst abgelöst und wieder auf Objektträger mittels Zytocentrifugation aufgebracht wurden, trotz der Inkubation mit IFN $\gamma$  negativ für HLA-B27. Ob durch die enzymatische Wirkung des Trypsins HLA-B27-Moleküle komplett verloren gingen oder die Verfügbarkeit des Epitops des verwendeten monoklonalen Antikörpers verändert war, wurde hier nicht weiter untersucht.

Um die Adhärenz als optimale Bedingung für die Kostimulation beibehalten zu können, wurde ebenfalls mit dendritischen Zellen getestet, ob sich CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch in Gegenwart adhärenter APC stimulieren ließen (Abb. 53).



**Abb. 53: Etablierung Bedingungen für die Bereitstellung von APC in der Kokultur.** Dendritische Zellen wurden mit 10  $\mu$ g/ml EBNA<sub>258-266</sub>-Peptid inkubiert, und ungebundenes Peptid ausgewaschen, bevor diese Zellen in Kokulturen mit Zellen einer autologen EBNA<sub>258-266</sub>-Peptid-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Linie für 6 h in Kultur genommen wurden. Die dendritischen Zellen wurden entweder vor der Stimulation abgelöst (**A**) oder adhärerten am Boden einer 24-well-Platte (**B**). Als Kontrollen wurden die T-Zellen mit 1  $\mu$ g/ml anti-CD28 oder 10  $\mu$ g/ml SEB stimuliert. Die Zellen aus den Kulturen wurden für CD69, IFN $\gamma$  und CD8 gefärbt. Die Anteile der durch Vielfarben-Durchflusszytometrie ermittelten CD69+/IFN $\gamma$ + /CD8+ T-Zellen sind gezeigt.

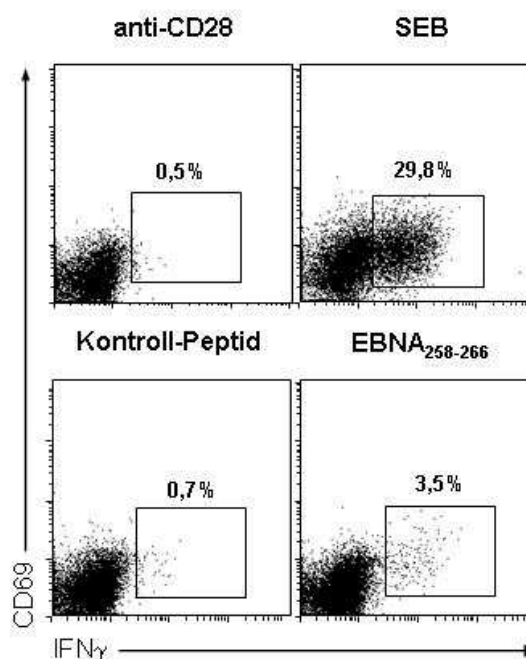
Auch in diesem Ansatz zeigten die CD8<sup>+</sup> T-Zellen unter den verschiedenen Bedingungen eine vergleichbare IFN $\gamma$ -Sekretion ( $44 \pm 4,6\%$  vs.  $35 \pm 5,7\%$ ) nach Peptid-spezifischer Stimulation.

Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass die Fähigkeit der Chondrozyten zur Aktivierung von Effektor-T-Zellen in Kokulturen adhärrierter, mit

0,5 ng/ml  $\text{IFN}\gamma$  vorbehandelter Chondrozyten mit Zellen aus autologen  $\text{EBNA}_{258-266}$ -Peptid-spezifischen  $\text{CD8}^+$  T-Zell-Linien untersucht werden konnte.

### 3.3.4 HLA-B27-abhängige Aktivierung von $\text{CD8}^+$ T-Zellen durch humane Chondrozyten

Durch die Verfügbarkeit von *in vitro* kultivierbaren Chondrozyten und einer Antigen-spezifischen  $\text{CD8}^+$  T-Zell-Linie vom gleichen Patienten, bestand die einmalige Möglichkeit zu studieren, ob Chondrozyten aus dem Femurkopf bei AS-Patienten autologe, Antigen-spezifische  $\text{CD8}^+$  T-Zellen HLA-B27-restringiert stimulieren (Abb. 54).



**Abb. 54: Aktivierung  $\text{EBNA}_{258-266}$ -spezifischer  $\text{CD8}^+$  T-Zellen in der Anwesenheit von autologen artikulären Chondrozyten *in vitro*.** Zellen der  $\text{EBNA}_{258-266}$ -spezifischen  $\text{CD8}^+$  T-Zell-Linie von Tag 14 (vgl. Abb. 50) wurden in MCTC mit  $\text{IFN}\gamma$ -behandelten humanen Chondrozyten inkubiert, die vorher mit  $10\ \mu\text{g}$  des  $\text{EBNA}_{258-266}$  Peptides oder mit einem irrelevanten Peptid beladen wurden. Als Kontrollen wurden die Zellen der Linie mit  $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$  anti-CD28 oder  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$  SEB in Anwesenheit von Chondrozyten stimuliert. Nach 6 h wurden die Frequenzen der  $\text{CD69}^+$   $\text{IFN}\gamma^+$   $\text{CD8}^+$  T-Zellen durch Vielfarben-Durchflusszytometrie ermittelt. Repräsentative Darstellung für vier unabhängige Experimente.

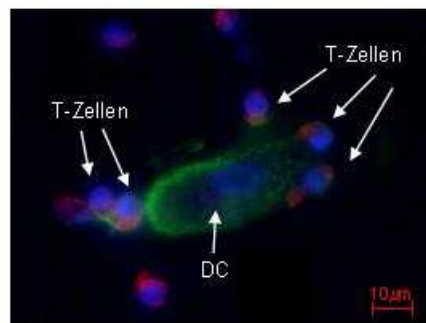
Wurde die  $\text{EBNA}_{258-266}$ -spezifische T-Zell-Linie in MCTC mit HLA-B27+ autologen  $\text{IFN}\gamma$ -behandelten und  $\text{EBNA}_{258-266}$ -Peptid beladenen Chondrozyten inkubiert, war der Anteil  $\text{IFN}\gamma^+$  $\text{CD8}^+$  T-Zellen signifikant erhöht (1,7 - 3,6 %) im Vergleich zu MCTC, die mit einem irrelevanten Kontrollpeptid (0,4 - 1,4 %) beladen waren ( $p = 0,034$ ). Der anti-CD28 Antikörper als Negativkontrolle induzierte keine  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion in den  $\text{CD8}^+$  T-Zellen

der EBNA<sub>258-266</sub>-spezifischen Linie (0,4 - 1,8 % aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen). Eine deutliche Erhöhung des Anteils IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Anwesenheit des Superantigens SEB auf 24,4 - 35,9 % aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigte, dass die T-Zellen grundsätzlich gut stimulierbar waren.

Wenn auch nicht so effizient wie professionelle APC aus dem peripheren Blut, induzierten humane Chondrozyten Antigen-spezifisch die Ausschüttung von proinflammatorischem IFN $\gamma$  in präaktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Dies zeigte, dass Chondrozyten in der Tat im Sinne von nicht-professionellen APC an einer T-Zell-Aktivierung beteiligt sein könnten.

### 3.3.5 Histologische Analyse spezifischer Zell/Zell-Interaktionen zwischen aktivierten Chondrozyten und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

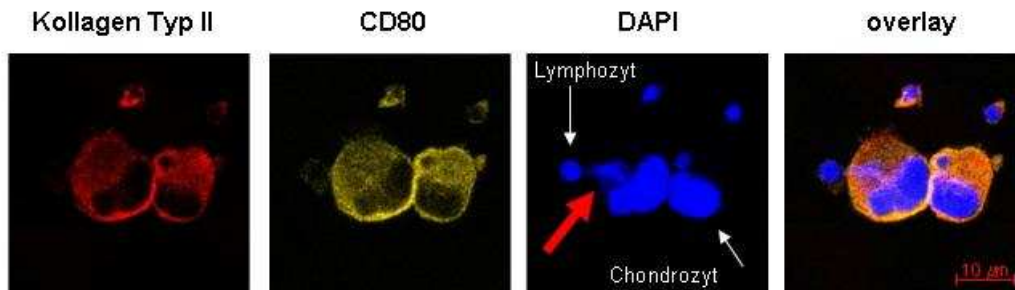
Ob der zelluläre Effekt der Peptid-abhängigen Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Chondrozyten direkt mittels Immunfluoreszenzmikroskopie detektierbar war, wurde anschließend untersucht. Dazu wurden die Bedingungen für fluoreszenzbasierte mikroskopische Untersuchungen von Kokulturen etabliert. Gemischte Kulturen von T-Zellen einer EBNA<sub>258-266</sub>-spezifischen Linie und autologen mit dem EBNA<sub>258-266</sub>-Peptid beladenen dendritischen Zellen wurden auf Glasplättchen für 6 h kokultiviert und bewertet (Abb. 55).



**Abb. 55: Etablierung der Bedingungen für die Kokultur peptidspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit APC für eine fluoreszenzbasierte zytologische Analyse.** Gemischte Kulturen von  $5 \times 10^5$  T-Zellen und  $1 \times 10^6$  dendritischen Zellen, die mit  $10 \mu\text{g}$  des EBNA<sub>258-266</sub>-Peptides beladen waren, wurden für 6 h auf Glasplättchen kokultiviert. Die Zellen wurden mit PFA fixiert und mit anti-CD3 (rot), anti-HLA-B27, Klon HLA-ABC-m3 (grün) und DAPI (blau) gefärbt. Anschließend wurden die Kulturen in der Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Die abgebildeten Bereiche sind exemplarisch für jeweils mindestens drei parallele Kulturansätze. Originalvergrößerung: x400.

Die Kokultivierung Peptid-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit APC in Objektträgerkulturen ermöglichte einen Einblick in die zellulären Wechselwirkungen der beiden eingesetzten

Zelltypen. Die T-Zellen traten mit den Antigen-gepulsten dendritischen Zellen in Kontakt und richteten ihre Oberflächenrezeptoren (CD3) zur Kontaktstelle hin aus. Unter den gleichen Bedingungen wurden die MCTC analysiert und nach Kontakten zwischen T-Zellen und Chondrozyten gesucht (Abb. 56).

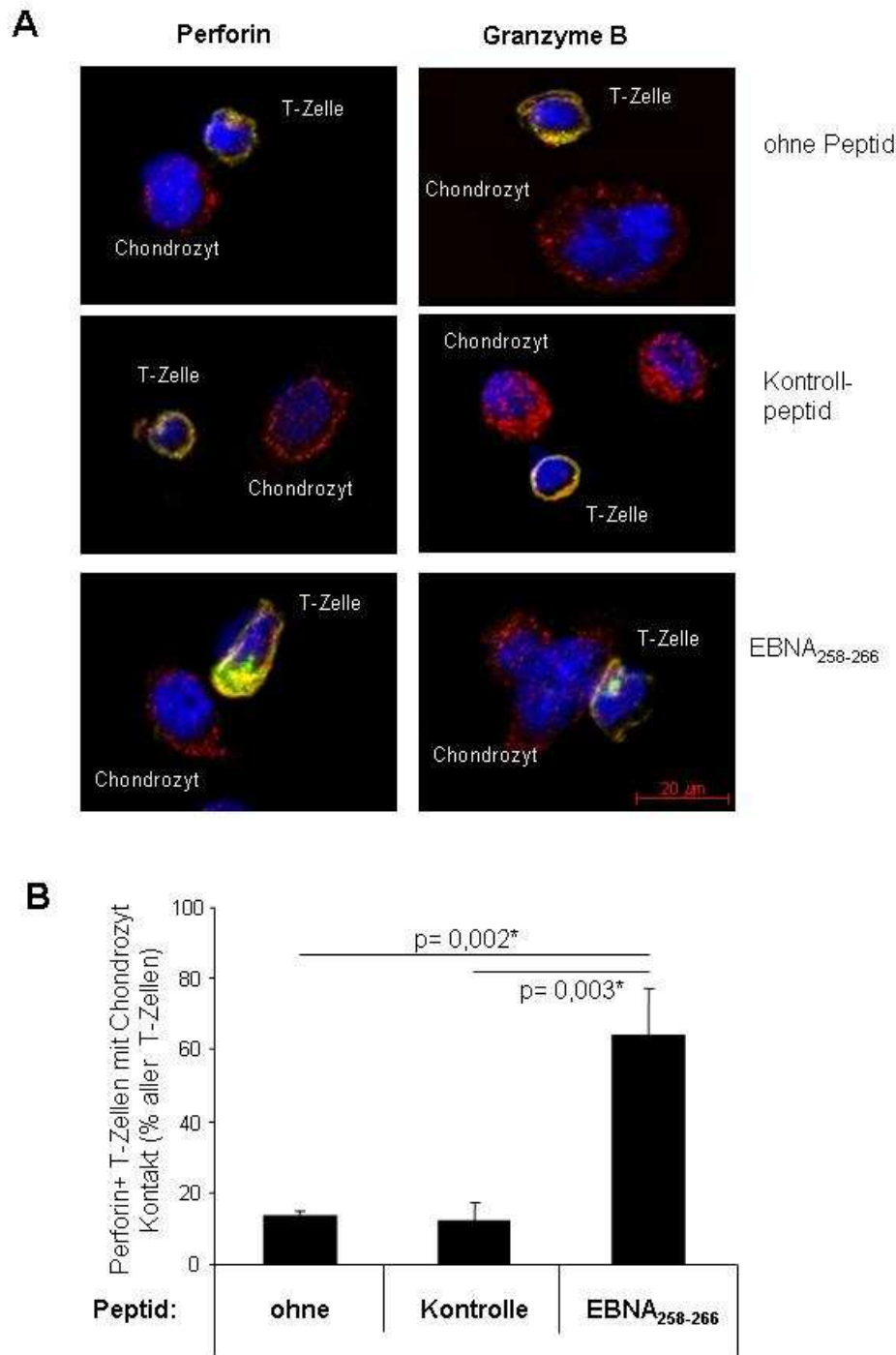


**Abb. 56: Zytologische Analyse der Stimulation EBNA<sub>258-266</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Peptid-beladene humane Chondrozyten.** Unter den für die Abb. 55 beschriebenen Bedingungen wurden gemischte Kulturen von  $5 \times 10^4$  T-Zellen und  $1 \times 10^5$  IFN $\gamma$ -behandelten, humanen Chondrozyten, die mit  $10 \mu\text{g}$  des EBNA<sub>258-266</sub>-Peptides beladen waren, für 6 h kokultiviert. Die Zellen wurden mit PFA fixiert und mit anti-Kollagen Typ II (rot), anti-CD80 (grün) und DAPI (blau) gefärbt. Anschließend wurden die Kulturen in der LSM beurteilt. Die abgebildeten Bereiche sind exemplarisch für jeweils mindestens drei parallele Kulturansätze. Originalvergrößerung: x640.

Wurden Peptid-beladene humane Chondrozyten und Zellen einer EBNA<sub>258-266</sub>-spezifischen T-Zell-Linie mikroskopisch unmittelbar aus dem zellulären Kontext einer Kokultur untersucht, konnte die räumliche Zuordnung als Bedingung CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelter zytotoxischer Wirkung studiert werden. Chondrozyten in unmittelbarer Nachbarschaft von T-Zellen wiesen Anzeichen morphologischer Veränderungen auf, die auf eine mögliche Lyse der Chondrozyten schließen ließen (Abb. 56 „DAPI“). Daraufhin wurde in solchen Kokulturen die Expression von zytolytischen Molekülen durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht.

### 3.3.6 Induktion zytotoxischer Moleküle in CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Hilfe von EBNA<sub>258-266</sub>-Peptid beladenen, autologen humanen Chondrozyten

Im nächsten Schritt wurde danach gefragt, ob Peptid-beladene, autologe artikuläre Chondrozyten eine zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort induzieren können. Die Expression der zytolytischen Proteine Perforin und Granzym B im Zell/Zell-Kontakt wurde fluoreszenzbasiert mittels LSM analysiert (Abb. 57).

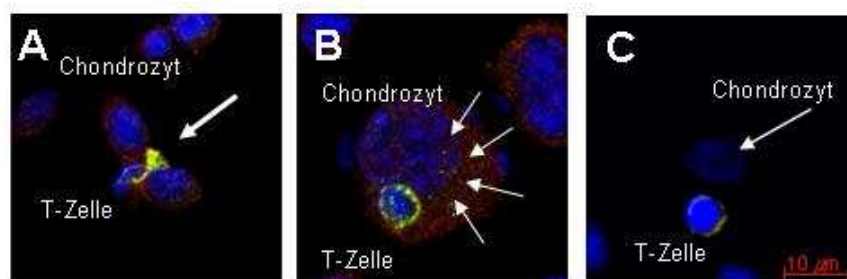


**Abb. 57: Expression von Granzym B und Perforin durch EBNA<sub>258-266</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Gegenwart autologer Chondrozyten.** In MCTC mit  $5 \times 10^4$  Zellen einer EBNA<sub>258-266</sub>-spezifischen T-Zell-Linie und  $1 \times 10^5$  IFN $\gamma$ -behandelten humanen Chondrozyten, die mit  $10 \mu\text{g}$  EBNA<sub>258-266</sub>-Peptid oder dem irrelevanten Peptid #Ch138 beladen waren, wurden die Zellen für 6 h auf Glasplättchen kokultiviert (wie für Abb. 47 A beschrieben). **(A)** Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen Perforin (grün; linke Seite) oder Granzym B (grün; rechte Seite), CD80 (rot), CD3 (gelb) und mit DAPI (blau) gefärbt. Anschließend wurden die Kulturen in der LSM beurteilt. Die abgebildeten Bereiche sind exemplarisch für jeweils mindestens drei parallele Kulturansätze. Originalvergrößerung: x640. **(B)** Der direkte Kontakt von Chondrozyten und CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurde aus der Mikroskopie quantifiziert. Mittelwerte  $\pm$  SD aus 100

CD3<sup>+</sup> T-Zellen in drei verschiedenen Regionen der Kokulturen. *p*-Werte ermittelt mittels T-Test.

Die Stimulation der Zellen einer EBNA<sub>258-266</sub>-spezifischen T-Zell-Linie mit aktivierten Chondrozyten, die mit dem entsprechenden Peptid beladen waren, zeigte in der mikroskopischen Darstellung der Kulturen enge Zell/Zell-Kontakte von CD80<sup>+</sup> Chondrozyten zu in ihrer Gestalt veränderten T-Zellen. Eine fokale Anreicherung des CD3<sup>+</sup> TCR und eine gestreckte Form der T-Zellen ließen sich beobachten. Die zytolytischen Moleküle Perforin und Granzyme B wurden ebenfalls dort lokal vermehrt gefunden, wo die CD3<sup>+</sup> T-Zellen direkt mit den Chondrozyten assoziiert waren (Abb. 57 A).

Die Analyse ergab, dass  $64 \pm 12,5\%$  der Perforin<sup>+</sup> T-Zellen unmittelbaren Kontakt zu den mit IFN $\gamma$ -behandelten humanen Chondrozyten hatten, wenn diese mit dem EBNA<sub>258-266</sub>-Peptid beladen wurden (Abb. 57 B). Im Gegensatz dazu waren es nur  $13 \pm 2\%$  der T-Zellen bei unbehandelten Chondrozyten.  $12 \pm 5\%$  der T-Zellen befanden sich in unmittelbarer Nähe zu Chondrozyten, die mit dem irrelevanten HLA-B27-spezifischen Peptid #Ch138 behandelt worden waren. Morphologisch sahen die T-Zellen aus den Kontrollansätzen nicht aktiviert aus. Sie hatten eine runde Gestalt und ein niedriges Zytoplasma/Zellkern-Verhältnis. CD3, Perforin und Granzym B wurden gleichmäßig verteilt in den T-Zellen gefunden. In Anwesenheit von EBNA<sub>258-266</sub>-beladenen Chondrozyten konnten signifikant mehr Perforin<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden, im Vergleich zu den Kontrollen, die aus unbehandelten ( $p = 0,002$ ) oder mit irrelevanten Peptid gepulsten ( $p = 0,003$ ) Chondrozyten bestanden. Der hohe Anteil aktivierter und Perforin-produzierender T-Zellen, die an Chondrozyten angrenzten, deutete auf das Potential der T-Zellen hin, Chondrozyten bei Antigen-spezifischen Interaktionen zu lysieren (Abb. 58).



**Abb. 58: Zytolyse humaner EBNA<sub>258-266</sub>-Peptid beladener autologer Chondrozyten durch EBNA<sub>258-266</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen.** Jeweils  $5 \times 10^4$  Zellen einer EBNA<sub>258-266</sub>-spezifischen T-Zell-Linie und  $1 \times 10^5$  IFN $\gamma$ -behandelten humanen Chondrozyten, die mit  $10 \mu\text{g}$  EBNA<sub>258-266</sub>-Peptid beladen waren, wurden wie für Abb. 47 A beschrieben, für 6 h auf Glasplättchen kokultiviert. Die MCTC wurden mit

Antikörpern gegen Perforin (grün), CD80 (rot), CD3 (gelb) sowie mit DAPI (blau) gefärbt und anschließend in der LSM beurteilt. Die abgebildeten Bereiche sind exemplarisch für mindestens drei parallele Kulturansätze. **(A)** Ausschüttung von Perforin durch eine CD3<sup>+</sup> T-Zelle (weißer Pfeil). **(B)** Punktförmige Akkumulation von Perforin im Inneren von CD80<sup>+</sup> Chondrozyten als Target-Zellen (weiße Pfeile). **(C)** Lysierte Targetzelle (weißer Pfeil). Originalvergrößerung: x640.

In der *in vitro*-Kultur von Zellen einer EBNA<sub>258-266</sub>-spezifischen T-Zell-Linie und von Chondrozyten, die mit dem entsprechenden im Kontext von HLA-B27 immunogenen Peptid beladen waren, ließ sich direkt mikroskopisch zeigen, dass die T-Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft der Chondrozyten tatsächlich Perforin freisetzen (Abb. 58 A). Dieses wurde punktförmig akkumuliert in den CD80<sup>+</sup> Chondrozyten nachgewiesen (Abb. 58 B). Bei einigen Zellen, die nach der Größe des Zellkerns als Chondrozyten identifiziert wurden, war kein Zytoplasma mehr darstellbar und die Kernfärbung deutete auf eine Lockerung des Chromatins hin. Dieses wurde als Zeichen einer Lyse der Chondrozyten durch die Wirkung unmittelbar benachbarter T-Zellen und der durch sie freigesetzten zytolytischen Proteine gewertet (Abb. 58 C).

Zusammengefasst konnte erstmals in einem humanen System nachgewiesen werden, dass Chondrozyten als nicht-professionelle APC fungieren können und somit an der Aufrechterhaltung einer lokalen Entzündung bei AS beteiligt sein könnten. Ein IFN $\gamma$ -getriggelter, autokriner Kreislauf von T-Zell-vermittelter Aktivierung der Chondrozyten in einem entzündlichen, gelenkspezifischen Milieu wäre eine interessante Hypothese für eine HLA-B27-restringierte zytotoxische Reaktion durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Diese Daten zur Interaktion von Chondrozyten und Peptid-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen führten zu einer Publikation (181).



#### 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde nach experimentellen Erklärungen zur Pathogenese der SpA gesucht. So ist bisher unverstanden, ob und wenn ja, wie eine HLA-B27-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort zum Krankheitsgeschehen in den Gelenken bei SpA-Patienten beitragen könnte. Welche Rolle spielt dabei die Assoziation eines definierten HLA-Peptid-Komplexes, wie das HLA-B27 Molekül, an der T-Zell-vermittelten Immunantwort im Gelenk? Um dies zu klären, wurden bakterielle Peptide und gelenkspezifische, autologe Peptide in den Fokus der Analyse mit einbezogen. Anhand von Patientengewebe wurde untersucht, inwieweit CD8<sup>+</sup> T-Zellen am primären Entzündungsort vorliegen und wie ihre Anwesenheit mit pathologischen Veränderungen korreliert. Diese Experimente führten schließlich zu der Frage, ob Chondrozyten als nicht-professionelle APC an der HLA-B27-restringierten Antigenpräsentation gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen beteiligt sind?

In der vorliegenden Arbeit wurde systematisch die Histopathologie von Oberschenkelköpfen von AS-Patienten mit Coxitis untersucht. Das Gewebe ist im Vergleich zu den bei dieser Erkrankung ebenso veränderten Wirbelgelenken, Sakroiliakgelenken oder Enthesien leichter zugänglich. Etwa 20 % der AS-Patienten erleiden eine schwere Coxitis (182), die bei 5 % der AS-Patienten eine Hüftgelenksersatzoperation erfordert (183). Zudem nimmt man an, dass in Hüftgelenken festgestellte Veränderungen die akute Entzündungspathologie an weniger gut zugänglichen Gelenken gut widerspiegeln. Bei der vorliegenden Untersuchung der Immunpathologie subchondraler Bereiche von Femurköpfen bei AS-Patienten wurde eine signifikant höhere Anzahl subchondraler T-Zellen in Bereichen mit Knorpel auf der Oberfläche, als in Bereichen ohne Knorpel festgestellt (Abb. 16). Die subchondrale T-Zell-Infiltration schien von der Anwesenheit von Knorpel auf der Gelenkoberfläche abhängig zu sein und war signifikant verringert, sobald der Knorpel im Krankheitsverlauf zerstört war. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass T-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AS spielen, und dass Knorpelantigene eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion stimulieren könnten.

Die erste histopathologische Beschreibung eines solchen Befundes stammt aus den 1960er Jahren. Ein AS-Patient zeigte im Femurkopf eine Coxitis mit einer Granulation, die von der subchondralen Seite in das Gelenk hineinragte (184). Histopathologische Untersuchungen der Sakroiliakgelenke bei AS-Patienten zeigen subchondrale Infiltrate von mononukleären Zellen als früheste Veränderungen (63). Magnetresonanztomographische Untersuchungen bestätigen akute Entzündungen in Sakroiliakgelenken von AS-Patienten (185). Andere Studien zeigen bei der immunhistologischen Untersuchung von Enthesien entzündeter Knie-

und Hüftgelenke vor allem Ödeme und entzündliche Infiltrate, die in erster Linie aus CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Bereich des subchondralen Knochenmarkes bei AS-Patienten bestehen (110).

Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit bei den AS-Patienten sowohl an der Knorpel/Knochen-Grenze als auch im subchondralen Knochenmark eine erhöhte Anzahl der CD34<sup>+</sup> Blutgefäße nachgewiesen werden, was eine Entzündungs-induzierte Gefäßneubildung anzeigte (Abb. 19). Der Knorpel ist unter normalen Gegebenheiten ein Gewebe ohne Blutgefäße, in dem die Chondrozyten, eingebettet in ihrer extrazellulären Matrix, keinen Zugang zu Zellen des Immunsystems haben. Neoangiogenese ist bei chronischen, inflammatorischen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis bekannt und ist dabei eines der frühesten histopathologischen Veränderungen in der Synovialmembran (186). Sie ruft zusammen mit der Infiltration autoreaktiver T-Zellen und Makrophagen eine Entzündung der Synovialmembran bei Patienten mit rheumatoider Arthritis hervor. Bei SpA-Patienten konnte eine erhöhte Gefäßdichte in der Synovialmembran peripherer Gelenke beobachtet werden (187, 188). Die Synovitis tritt bei AS-Patienten im Krankheitsverlauf erst sekundär auf (104).

Die Neoangiogenese ist ein komplexer Prozess, der unter der Kontrolle einer Vielzahl von Signalmolekülen steht, u. a. dem *Vascular endothelial growth factor* (VEGF). Ein auslösender Reiz für die Ausschüttung von VEGF ist Sauerstoffmangel in den Zellen (Hypoxie). Bei der rheumatoiden Arthritis kommt dies durch den erhöhten metabolischen Bedarf zustande, den die hyperplastische Synovialmembran hat. Dies führt zur verminderten Durchblutung, und man findet eine Überexpression VEGF-stimulierender Faktoren, den sogenannten Hypoxie induzierenden Faktoren (HIF). VEGF steuert die Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen und die Proliferation von Endothelzellen in Gefäßstrukturen. In Tiermodellen der Arthritis konnte gezeigt werden, dass die Applikation angiostatischer Faktoren (wie Angiostatin) die Neoangiogenese in der Synovialmembran unterdrücken und damit eine verminderte Knorpeldestruktion hervorrufen (189, 190). Andere Versuche zeigen, dass eine Blockierung von HIF (191) oder die Blockierung von VEGF über spezifische Antikörper (192) ebenfalls zur Hemmung der Neoangiogenese und damit zu einer geringer ausgeprägten Gelenkentzündung führen. Das belegt, dass die Neoangiogenese für die Aufrechterhaltung der Entzündung und die Progression entzündliche Gelenkerkrankungen von entscheidender Bedeutung ist.

Parallel zur Infiltration von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Knorpel ausgehend vom subchondralen Knochenmark, fand ein Abbau der Knochenendplatte durch Osteoklasten statt. Die Osteoklastendichte unterschied sich abhängig von der Schwere der Knorpelzerstörung. Die Anzahl der Osteoklasten war in Bereichen mit Knorpel auf der Gelenkoberfläche signifikant höher als in Bereichen ohne Gelenkknorpel (Abb. 21). Diese

Beobachtung deutete darauf hin, dass der Knochenabbau durch Osteoklasten bei SpA von einem proinflammatorischen Milieu, möglicherweise hervorgerufen durch eingewanderte T-Zellen, beeinflusst wird. Dies stimmt mit Tiermodellen für Arthritis überein. Mäuse, die das proinflammatorische Zytokin TNF $\alpha$  überexprimieren, entwickeln eine destruktive Arthritis (193). Werden diese TNF $\alpha$ -transgenen Mäuse mit *c-fos Knock-out* Mäusen gekreuzt, die keine funktionellen Osteoklasten besitzen, findet keine Knochenzerstörung statt. Eine Gelenkentzündung wird wegen der Überexpression von TNF $\alpha$  trotzdem entwickelt (194). Werden die Osteoklasten im experimentellen Arthritismodell in ihrer Funktion mittels Biphosphonaten blockiert, kann eine Hemmung der Knochenerosion belegt werden (195).

Osteoklasten sind für die Zerstörung des Knochens bei Patienten mit rheumatoider Arthritis verantwortlich und auch an den abbauenden Prozessen bei AS-Patienten beteiligt, wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen.

Die Regulierung der Osteoklastenaktivität geschieht über mehrere Mechanismen. Die Ausdifferenzierung von Osteoklasten aus Vorläuferzellen und deren Aktivierung wird vor allem von RANKL induziert (196-199), der an seinen spezifischen Rezeptor RANK auf den Osteoklasten bindet (200). RANKL wird von Osteoblasten, Stromazellen und T-Zellen exprimiert (196-199, 201). Neben RANK und RANKL ist OPG als dritte Komponente in der Knochenresorption involviert (202). OPG bindet an RANKL und antagonisiert somit alle stimulierenden Effekte der RANK/RANKL-Interaktion auf die Osteoklasten. Ein ausgewogenes RANKL/OPG-Verhältnis ist für das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau unabdingbar. Störungen dieses Gleichgewichtes wurden auch für rheumatische Erkrankungen beschrieben. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis ist die Expression von RANKL im Vergleich zu Kontrollen erhöht, wie Expressionsuntersuchungen der Synovialmembran auf transkriptionaler Ebene (203) und *in vitro* Experimente mit Synovialzellen (204) zeigen. AS-Patienten exprimieren RANKL in der Synovialmembran in Bereichen mit T-Zell-Infiltraten (205), und auch OPG ist dort histologisch nachzuweisen (206).

Die histologische Analyse von Hüftgelenken der AS-Patienten mit Antikörpern gegen RANK, RANKL und OPG erbrachten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Bereichen mit Knorpel auf der Gelenkoberfläche oder ohne Knorpel. Um eine klare Aussage treffen zu können, wären größere Fallzahlen notwendig.

An der Regulation der Differenzierung der Osteoklasten und dem Knochenabbau ist auch TNF $\alpha$  beteiligt (207, 208). Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass Osteoklasten ein relevantes Ziel der Beeinflussung durch TNF $\alpha$ -Blocker in AS-Patienten sein könnten. Bei der Behandlung der AS zeigen Biphosphonate, die die Aktivität der

Osteoklasten inhibieren, in jungen Patienten mit einer kurzen Krankheitsdauer eine bessere Antwort, als bei Langzeit-AS-Patienten (209). Das deutet darauf hin, dass Osteoklasten in späten Krankheitsphasen, in denen auch Knorpel und inflammatorische Zell-Infiltrate nicht mehr vorhanden sind, weniger bedeutsam sind, als in frühen reaktiven Entzündungen.

In späten Entzündungsphasen der AS, in denen es zum Verlust der hyalinen Knorpelschicht auf der Gelenkoberfläche und des subchondralen Knochenmarks kommt (Abb. 14 d, e), war die Anzahl von Osteoblasten im Vergleich zu Bereichen mit Knorpel signifikant erhöht (Abb. 24). Dies spricht für die Beteiligung von aktivierenden Osteoblasten an Reparaturmechanismen und Knochenneubildung. Gelenkankylose und die Ausbildung von Syndesmophyten in der Wirbelsäule könnten als Reaktion auf die Entzündung auftreten (210). Bei den Reparaturvorgängen wurde neuer Knochen und/oder knöcherner Ersatz von metaplastischem Knorpel gezeigt (Abb. 13 d, e). Auch in den Bereichen ohne Knorpel eine hohe Gefäßdichte nachzuweisen (Abb. 19). Eine erhöhte Dichte von Blutgefäßen ist nicht nur Entzündung assoziiert, sondern auch für die Neubildung von Knochen wichtig (211).

TNF $\alpha$  ist ein Botenstoff bei SpA und wird lokal an der Entzündungsstelle freigesetzt. Es regelt pleiotrop die Funktion vieler verschiedener Zellen: Proliferation, Differenzierung, Zytokinausschüttung und Apoptose. Eine Blockade von TNF $\alpha$  kann auf unterschiedlichen Ebenen eingreifen, jedoch sind die genauen molekularen Mechanismen noch unklar. Die Wirksamkeit einer Therapie mit TNF $\alpha$ -Blockern zeigt sich bei Patienten mit AS in einer signifikanten und anhaltenden Verbesserung und zur Regression der Krankheitsaktivität (212, 213). Eine Reduktion der Entzündung in den Sakroiliakgelenken und in der Wirbelsäule zeigen Magnetresonanztomographische Analysen (214). Die Entzündung bei AS ist auch durch TNF $\alpha$  reguliert. Dies zeigen *in situ* Hybridisierungen und histologischen Färbungen an Biopsien von Sakroiliakgelenken (215, 216).

TNF $\alpha$  ist auch in die Degradation von Knorpel involviert und hat eine proapoptotische Wirkung auf Chondrozyten (217-219). Es initiiert eine Kaskade von katabolischen Prozessen im Knorpel: Suppression der Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix, Aktivierung Matrix-degradierender Enzyme und Herabregulation der natürlichen Inhibitoren dieser Enzyme (220-223). In diesen Mechanismus können TNF $\alpha$ -Blocker nicht eingreifen. Die katabolen Effekte von TNF $\alpha$  in Chondrozyten können durch IL-10 herabreguliert werden (224) und ein gentherapeutischer Ansatz zur autologen Transplantation IL-10-überexprimierender Chondrozyten in Knorpeldefekte wäre denkbar.

Zusammenfassend deutet die Anwesenheit von T-Zellen, Hypervaskularisation und eine große Anzahl aktivierter Osteoklasten während akuter Entzündungsstadien bei AS-Patienten auf eine gelenkzerstörende Beteiligung multipler Mechanismen hin. In späteren

Krankheitsstadien mit Gelenkbeteiligung sind eine erhöhte Osteoblastenaktivität und eine vermehrte Gefäßdichte vorhanden. Die histopathologische Untersuchung zeigte einen klaren Zusammenhang zwischen dem Nachweis von akuten entzündlichen Veränderungen mit T-Zell-Infiltraten und der Anwesenheit von Gelenkknorpel auf der Oberfläche. Dies führte zu der Hypothese, dass CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten auf Knorpelantigene solche Entzündungsprozesse triggern.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde danach gefragt, welchen Ursprunges wohl ein mögliches, an der T-Zell-vermittelten Immunantwort beteiligtes Peptid, sein könnte? Das an der Präsentation spezifischer antigener Peptide involvierte Molekül HLA-B27 ist mit der Pathogenese von AS und ReA stark assoziiert. Das stimulatorische Potential von HLA-B27-restringierten Fremdanthigenen (wie Peptide aus *Chlamydia trachomatis*) wurde bei Patienten mit *Chlamydien*-induzierter ReA sowie bei mit AS-Patienten untersucht, da 20 - 40 % der HLA-B27<sup>+</sup> Patienten mit ReA in das Vollbild einer AS übergehen können (52). Zudem wurden gelenkspezifische Selbstantigene als potentielle Quelle arthritogener Peptide analysiert, die durch HLA-B27 präsentiert werden und schließlich zur Induktion Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei AS-Patienten führen können.

Ein häufiger Erreger einer ReA auslösenden Infektion ist *Chlamydia trachomatis*. Diese Bakterien leben obligat intrazellulär und können über den HLA-I und -II Weg präsentiert werden. *Chlamydia trachomatis* ist u. a. in der Lage, eine HLA-I-restringierte Immunantwort unter Beteiligung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu induzieren (61, 62, 225). Dieser Umstand ist im Hinblick auf die Krankheitsassoziation der SpA mit HLA-B27 wichtig, und ist daher auch Gegenstand intensiver experimenteller Forschung bei dieser Arbeit gewesen.

Zunächst wurden Proteine von *Chlamydia trachomatis* mit zwei mathematischen Algorithmen, einem sog. Epitop-Vorhersageprogramm (SYFPEITHI) (178) generiert und mit dem zweiten Algorithmus, einem Programm zur Proteasomenanalyse dahingehend überprüft, ob die durch den ersten Algorithmus vorhergesagten Peptide auch tatsächlich durch Proteasomen prozessiert werden können. Der Proteasomen-Algorithmus versucht die Funktion des enzymatischen Spaltungsprozesses im 20S Proteasom nachzuvollziehen (226, 227) und berechnet immunrelevante Aminosäure-Motive. Beide Programme haben eine Vorhersagekraft von ca. 90 % (178, 226). Zwölf Peptide, abgeleitet aus Proteinen von *Chlamydia trachomatis*, konnten so in früheren Experimenten als immunogen identifiziert werden (62). Um den Nachweis zu erbringen, dass diese Peptide aus *Chlamydia trachomatis* eine HLA-B27-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort bei ReA- und AS-Patienten induzieren können, wurden HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetramere hergestellt und erfolgreich eingesetzt.

T-Zellen erkennen Antigene nicht direkt, sondern über definierte Abbauprodukte im Zusammenhang mit einem HLA-I oder II-Molekül auf APC. Nachdem die Generierung von löslichen HLA-I und -II/Peptid-Monomeren (228) gelang, konnten Altman und Davis mithilfe der Tetramerisierung eines HLA-A2/Peptid-Monomers über Streptavidin erstmals Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen (135). Durch die Multimerisierung des HLA-I/Peptid-Monomers zum HLA-I/Peptid-Tetramer kann die niedrige Affinität eines TCR zu einem HLA-I/Peptid-Monomer (229-232) durch multiple (vier) Bindungsstellen so weit erhöht werden, dass sie experimentell eine Bindung an Zellen zulässt (135). Mit Hilfe solcher HLA-I/Peptid-Tetramere wurde inzwischen Physiologie, Funktion und Frequenz von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, vor allem bei viralen Entzündungen untersucht (147, 233-235). Die Arbeitsgruppe um Paul Bowness beschrieb erstmals die Herstellung von HLA-B27/Peptid-Tetrameren (136). Hierbei werden HLA-B27/Influenza-Peptid-Tetramere zur Analyse von HLA-B27-restringierten Influenza-spezifischen TCR-Klonen eingesetzt.

Während die Nutzung von HLA-I/Peptid-Tetrameren inzwischen weit verbreitet ist und HLA-A2/Peptid-Tetramere bereits ein wichtiges Werkzeug in der Tumorummunologie beim Menschen sind (236-239), ist der Einsatz von HLA-B27/Peptid-Tetrameren bei HLA-B27-assoziierten Erkrankungen bisher nicht beschrieben worden.

Erste Experimente mit HLA-B27/Peptid-Tetrameren an Patientenmaterial mit HLA-B27-assoziierten Erkrankungen wurden in einer Arbeit von Kuon et al. vorgestellt (62). In diesen Untersuchungen wurden in einem Patientenkollektiv von drei ReA-Patienten zwei HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetramere mit den Peptiden Chl#146 und Chl#195 getestet. Die vorliegende Arbeit schließt an diese Untersuchungen mit einem größeren Patientenkollektiv an, indem Funktionalität und Bindungseigenschaften von weiteren 12 HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetrameren analysiert wurden.

HLA-B27 ist ein außergewöhnliches Molekül, weil es im Gegensatz zu anderen HLA-B-Molekülen häufig fehlerhaft gefaltet wird. Eine Fehlfaltung kann unter anderem dazu führen, dass sich zwei schwere Ketten zu einem HLA-B27-Homodimer zusammenlagern, das nicht mehr mit der leichten Kette, dem  $\beta_2M$  assoziiert ist. Diese Art der Dimerisierung wird durch die Aminosäuresequenzen der beiden schweren Ketten ermöglicht, indem es infolge zweier freier Sulfhydrylgruppen an den Cystein-Resten in Position 67 (Cys 67) (240-242) zur Disulfidbrückenbildung und damit zur Bildung eines stabilen Homodimers und unspezifischer Proteinaggregationen kommen kann (82, 85, 86, 136, 243). Die Position 67 in der sog. B-Tasche des Peptidbindungsereichs (vgl. auch Abb. 2) wird auch in Zusammenhang mit einer möglichen Rolle bei der Peptidselektion gebracht (244, 245).

Um Homodimere und unspezifische Proteinaggregationen zu vermeiden, wurden für unsere Experimente schwere Ketten generiert, die statt des Cys67 einen Serinrest an dieser Position trugen (243). Solche Konstrukte sind möglich, da Cys67 für die Erhaltung der Molekülstruktur nicht essentiell notwendig ist. Allerdings würden große Aminosäuresubstitutionen an Position 67, wie z.B. durch Tryptophan, Tyrosin oder Alanin, eine begrenzte Konformationsänderung bewirken. Es wurde damals vermutet, dass der Aminosäureaustausch zu einem Serinrest keinen Einfluss auf die Bindung HLA-B27-spezifischer T-Zell-Epitope hat (246).

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten HLA-B27/*Chlamydia*-Tetramere, wurden zunächst mit der modifizierten schweren Kette (Ser67) von HLA-B27 hergestellt. Die Verwendung der HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetramere führte zur Identifizierung Antigen-spezifischer, CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten bei 5 von 8 HLA-B27<sup>+</sup> ReA-Patienten und bei einem von drei HLA-B27<sup>+</sup> AS-Patienten (Tab. 4). Die aus *Chlamydia trachomatis* abgeleiteten Peptide #ChI8, #ChI68, #ChI133 und #ChI195 erwiesen sich als eventuell immunologisch relevant. Die niedrige Frequenz Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen war mit Ergebnissen aus früheren Studien vergleichbar (62) und erschwerte teilweise eine Abgrenzung zu unspezifischer Hintergrundfärbung. Um die Ergebnisse spezifischer Färbungen mit den HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetrameren zu bestätigen, wurden parallel intrazelluläre Zytokinfärbungen durchgeführt. Die aus *Chlamydia trachomatis* abgeleiteten Peptide, die eine Bindung der jeweiligen HLA-B27/*Chlamydia*-Peptid-Tetramere an CD8<sup>+</sup> T-Zellen aufwiesen, induzierten auch IFN $\gamma$  in CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Tab. 5). Dies unterstützt die Hypothese (247-249), dass Peptide von Bakterien, die in den Gelenken persistieren, durch HLA-B27 den CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert werden, und so bei der Krankheitsentwicklung eine Rolle spielen könnten. Zu dem gleichen Ergebnis kamen vergleichbare Untersuchungen bei der *Yersinia*-getriggerten ReA (250).

Eine weitere Möglichkeit, Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die experimentelle Darstellung mit spezifischer Tetramerfärbung zugänglich zu machen, ist die *in vitro*-Vermehrung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. *Chlamydia trachomatis* ist ein Pathogen, das dendritische Zellen infizieren kann und zur Reifung aktiviert (251). Solche *Chlamydien*-infizierten, dendritischen Zellen, die als APC sowohl für CD4<sup>+</sup> als auch für CD8<sup>+</sup> T-Zellen fungieren (252), konnten nach zweiwöchiger *in vitro*-Inkubation mit autologen PBMNC eine Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Expansion gegen die Peptide #ChI8, #ChI68, #ChI133, #ChI138, #ChI195 und #ChI196 generieren, wie Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen (177).

Die von *Chlamydia trachomatis* abgeleiteten und untersuchten Peptide stammen aus Proteinen, die entweder mit der Pathogenese assoziiert (#ChI8, #ChI133), am aeroben Stoffwechsel beteiligt (#ChI144), Transportproteine (#ChI146), Proteasen (#ChI68, #ChI194)

oder bei der DNA-Replikation notwendig sind (#Chl145) (253). Einige der Peptide sind konserviert und kommen bei verschiedenen Bakterienspezies vor (#Chl194, #Chl145). Dies ist insofern von Bedeutung, da nicht nur *Chlamydia trachomatis* eine ReA induzieren kann, sondern auch *Enterobacteriaceae* wie *Yersinia*, *Salmonella*, oder *Shigella*. Konservierte bakterielle Antigene könnten somit auch eine Rolle bei der Kreuzreaktivität mit humanen Selbstantigenen spielen. Einige der identifizierten Peptide stammen von sogenannten hypothetischen Proteinen, deren Funktion unbekannt ist (#Chl80, Chl#131, #Chl138, #Chl195, #Chl196). Für *Borrelia burgdorferi* sind bei der chronischen Borreliose solche Proteine bekannt (254).

In unseren Untersuchungen zur AS wurden auch mögliche humane Knorpelantigen-Epitope für CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten mit einbezogen, da es Hinweise in der Literatur auf eine mögliche Assoziation mit autoimmunen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten bei der AS gibt (106, 109, 180, 255, 256). Zunächst wurde das humane Knorpelantigen Aggrecan als mögliche Quelle gelenkspezifischer Antigene bei der AS untersucht.

Humanes Aggrecan, eines aus einer ganzen Reihe möglicher extrazellulärer Knorpelbestandteile, scheint eine wichtige Rolle im inflammatorischen Prozess bei SpA zu spielen. Im Tiermodell induziert die Immunisierung mit Gesamtaggrecan (112, 257) oder nur mit der G1-Domäne (258-260) oder der G3-Domäne (206) eine Spondylitis und/oder Polyarthritis in Mäusen. Hierbei stehen CD4<sup>+</sup> T-Zell-Antworten auf Aggrecanpeptide im Vordergrund. Diese Befunde aus der Literatur, die starke Assoziation von AS mit HLA-B27 und die Gelenkbeteiligung waren ausschlaggebend dafür, dass wir uns ebenfalls intensiv mit diesem Molekül und seiner möglichen Bedeutung hinsichtlich einer HLA-B27-restringierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort beschäftigt haben.

Aus 22 humanen Aggrecanpeptiden mit einem Bindungsscore  $\geq 20$  (178) und einem positiven Ergebnis des Proteasom-Vorhersageprogrammes (226), wurden vier Peptide (#A47 aus der G3-Domäne, #A57 aus der G1-Domäne, #A59 aus der *Glycosaminoglycan-Attachment* Region und #A67 aus der G2-Domäne) als potentielle Autoantigene identifiziert (130). Diese wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet, um ihre Immunogenität mittels durchflusszytometrischer Messungen von IFN $\gamma$  in CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachzuweisen. Die T-Zellen stammten aus der Milz B27-transgener Mäuse nach Immunisierung und Priming mit den humanen Aggrecanpeptiden. Der intrazelluläre Nachweis von IFN $\gamma$  nach Behandlung mit Brefeldin A spiegelt die sekretorische Potenz der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wieder und dient der Bestimmung von Antigen-spezifischer T-Zell-Antworten (164, 165). Trotz der Bindungsscores von 20 - 31 zeigte das Peptid mit der geringsten Bindungskapazität #A67 die stärkste Antwort nach der *ex vivo* Kurzzeitstimulation (Abb. 35). In den Wildtyp-Mäusen konnte nach dem Priming der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz keine



IFN $\gamma$ -Sekretion nachgewiesen werden (Abb. 34). Das sprach für eine spezifische, HLA-B27 restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort auf die humanen Knorpelpeptide.

Wie zu Beginn diskutiert, stellt die molekulare Struktur des HLA-B27-Moleküls eine Besonderheit dar. In dem Zeitraum, in dem diese Arbeit entstand, gab es teilweise unterschiedliche Auffassungen bezüglich der Wirkung der Modifikation der schweren Kette von HLA-B27 in der B-Tasche an der Position 67 (Cys67  $\rightarrow$  Ser67) hinsichtlich der Bindungsspezifität. Während eine Studie keine Veränderung der Peptidbindungsspezifität bei der Substitution von Cystein zu Serin feststellte (261), besagte eine andere Untersuchung, dass die Mutation Cys67  $\rightarrow$  Ser67 die Bindung von HLA-B27-restringierten Peptiden an das HLA-B27 Molekül sehr wohl beeinflussen kann (262).

Auch unsere Arbeitsgruppe untersuchte die Fragestellung des Aminosäureaustausches und bediente sich dabei der HLA-B27-Tetramertechnologie. Versuche mit HLA-B27/Peptid-Tetrameren, die in ihrer schweren HLA-B27 Kette entweder den Cys67- oder den Ser67-Rest trugen, zeigten Veränderungen in der Peptidpräsentation, die folglich die T-Zell-Erkennung beeinflussten (179). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die weiteren Experimente, die nun dargestellt werden sollen, nur noch HLA-B27/Aggrecan-Peptid-Tetramere mit Cys67 verwendet.

Beim HLA-B27-Molekül spielt der Austausch eines einzelnen Aminosäurerestes eine große Rolle. Ebenso kann die Veränderung eines Aminosäurerestes auf Seite des immunogenen Peptides zu einer veränderten Immunogenität führen. Dieses liegt beispielsweise bei der Zöliakie vor. Dabei handelt es sich um eine Erkrankung der Dünndarmschleimhaut, hervorgerufen durch eine Überempfindlichkeit gegen Gluten. Bei 95 % der Patienten liegt eine Assoziation mit den HLA-II-Molekülen DQ2 und DQ8 vor (263). Die Peptidbindungsstelle von HLA-DQ2 und HLA-DQ8 zeigt eine Präferenz für negativ geladene Aminosäurereste der gebundenen Peptide an der Ankerposition 4. Bestimmte Glutaminreste, die aus dem Abbau von Gluten entstandenen immunogenen Peptides Gliadin, werden durch die endogene Gewebstransglutaminase in Glutaminsäure deaminiert. Damit passt das Gliadin besser in die Ankertasche P4 des HLA-DQ2-Moleküls und wird den CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert (264, 265). Dies löst eine Ausschüttung von IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-2 durch die CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus, was die Entzündungsreaktion fördert.

Neben den durchflusszytometrischen Messungen von IFN $\gamma$ , wurde in Rahmen dieser Arbeit die Anzahl Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Färbungen mit HLA-B27/Aggrecan-Peptid-Tetrameren bestimmt, um eine direkte HLA-B27-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort auf die humanen Knorpelpeptide zu zeigen. Mit den ausgewählten Peptiden aus dem humanen Aggrecan (#A47, #A57, #A59 und #A67) wurden HLA-B27/Aggrecan-Peptid-Tetramere mit

Cys 67 hergestellt. Alle vier Aggrecanpeptide waren in der Lage an HLA-B27 zu binden und das Molekül zu stabilisieren. Die Effizienz der Auffaltung korrelierte annähernd mit dem in mathematischen Modellen ermittelten Bindungsscore. Die Frequenz Aggrecan-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz immunisierter B27-transgener Mäuse ließ sich durch Inkubation mit den jeweiligen Aggrecanpeptiden *in vitro* für 7 Tage stark erhöhen (Abb. 37). Eine fast 50-fache Anreicherung in der Anzahl Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen war bei Peptid #A67 zu verzeichnen, während die anderen Aggrecanpeptide nur eine 1,5-fache Zunahme bewirkten.

Eine Anreicherung und Reinigung von Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist über MACS möglich. Dabei wurden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz immunisierter B27-transgener Mäuse mit dem HLA-B27/Aggrecan-Peptid-Tetrameren gefärbt und über den Fluoreszenzfarbstoff PE am komplexbildenden Streptavidin selektiert. Diese Methode ermöglichte die spezifische 6-fache Anreicherung Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb kurzer Zeit und war ohne die aufwändige und nicht immer verfügbare Technik des FACS-Sorters realisierbar.

Kuon et al (130) bestimmte in weiteren Experimenten die zellvermittelte Zytotoxizität durch Freisetzung von [51Cr] bei #A67-geprimten HLA-B27<sup>+</sup> Targetzellen und konnte eine Lyse dieser Targetzellen durch HLA-B27 restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen finden. Histologische Untersuchungen belegen die Entwicklung einer Tenosynovitis im Kniegelenk #A67-immunisierter B27-transgener Mäuse (130). Diese Ergebnisse zeigen, dass ein aus Aggrecan stammendes Peptid eine Entzündung im Gelenk auslösen kann.

Bisherige eigene Studien zeigten, dass die Frequenz Peptid-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Synovialflüssigkeit niedrig ist und im peripheren Blut meist sehr niedrig, um durch intrazelluläre Zytokinfärbung oder Tetramere reproduzierbar durchflusszytometrisch detektiert zu werden (62, 177, 180). Im peripheren Blut zirkulieren CD8<sup>+</sup> Effektor T-Zellen, um nach Antigenstimulation an den Ort der Entzündung zu gelangen oder liegen als Gedächtniszellen vor. Am lokalen Entzündungsort ist daher eher mit einer höheren Frequenz Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu rechnen.

Eine denkbare Technik, um Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gewebe zu identifizieren, ist der Einsatz von HLA-I/Peptid-Tetrameren bei Färbungen *in situ*. Sie ermöglichen die Lokalisierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit definierter Antigen-Spezifität in Geweben, Tumoren oder Entzündungsherden und spiegeln damit diese Zellen in ihrer pathologischen Umgebung wieder.

Es gibt zwei unterschiedliche methodische Ansätze für *in situ* Tetramer-Färbungen hinsichtlich der histologischen Aufarbeitung des Gewebes. Zum einen werden frische unfixierte, etwa 200 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt und diese mit direkt markierten

HLA-A2/Peptid-Tetrameren über Nacht bei 4°C inkubiert. Dies ermöglicht u. a. die Detektion des Effektes von murinen CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen „*minor histocompatibility antigens*“ in der Haut bei „*graft versus host*“ Reaktionen (266) und die *in situ* Darstellung von murinen CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen Tumorantigene und virale Antigene (267). Der Vorteil unfixierter Gewebe liegt in der Erhaltung der Mobilität des TCR, was eine entscheidende Bedingung für die Tetramerbindung darstellt. Ein Vorzug ist die Schnittdicke von 200 µm, da in diesen Schnitten, im Vergleich zu Dünnschnitten bis zu 10 µm, mehr Zellen pro Schnitt analysiert werden können. Nachteilig ist die verzerrte Gewebeanatomie, die beim Schneiden mit dem Vibratom entsteht. Die Spezifität dieser Färbungen ist aufgrund der zum Teil aufgelösten Anatomie eingeschränkt.

Der zweite Ansatz besteht darin, schockgefrorenes, unfixiertes Gewebe mit einer Schnittdicke von 6-10 µm für *in situ* Tetramer-Färbungen zu verwenden. Hier werden die Tetramer-Komplexe durch Sekundärfärbeschritte detektiert, was die Intensität der Färbung erhöht. Das Ergebnis der Färbungen mit HLA-I/Peptid-Tetrameren war der Nachweis Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz TCR-transgener Mäuse (268, 269). Eine weit umfangreichere Anwendung dieser Technik gibt es bereits für *in situ* Tetramer-Färbungen von murinen CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen Antigene des *Lymphocytic Choriomeningitis Virus* mit HLA-I/Peptid-Tetrameren an schockgefrorenem Gewebe aus der Milz und dem Gehirn von Mäusen (270). Der Nachteil dieser Methode ist die geringere sensitive Färbung, was sich durch TCR-Internalisation erklärt wird. Vergleichende durchflusszytometrische und histologische Tetramer-Untersuchungen unfixierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen ergaben nur unwesentliche Unterschiede und zeigen, dass sich auch kleine Populationen Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch *in situ* Tetramer-Färbungen detektieren lassen (268, 270). Das schockgefrorene Gewebe hat eine wesentlich bessere zelluläre Morphologie, wodurch in den Dünnschnitten auch qualitativ bessere Färbungen erreicht werden, die sich genauer analysieren lassen. Zudem ermöglicht es die Analyse archivierter Gewebeproben.

Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurde die *in situ* Tetramerfärbung an Dünnschnitten modifiziert (270) und an Cytospins antigenstimulierter muriner Milzzellen und an den Gefrierschnitten vom Milzgewebe etabliert. Im Gegensatz zu veröffentlichten Protokollen wurde ein Blockierungsschritt eingefügt, um unter anderem unspezifische Bindungen des im Tetramer enthaltenen Streptavidins mit endogenem Biotin, Biotin-bindenden Proteinen, Lectinen oder anderen unspezifischen Streptavidin-Bindungsstellen im Gewebe zu vermeiden. Während der Färbung wurde kein BSA oder Serum verwendet, da dies die Bindungen zwischen TCR und Tetramer blockiert. Ein weiterer methodischer Punkt, der abgeändert wurde, ist die kürzere Inkubation bei Raumtemperatur, die nach eigener experimenteller Erfahrung, Färbungen mit höherer Spezifität erbrachte.

Mittels Etablierung dieser Methode konnten erstmalig HLA-B27 restringierte, Knorpelantigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch *in situ* Färbungen mit HLA-B27/Aggrecan-Peptid-Tetrameren im Gewebe nachgewiesen werden. B27-transgene Mäuse wurden mit dem Peptid #A67 aus humanem Aggrecan immunisiert und anschließend die Milz *in situ* auf Peptid-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. Diese Färbungen waren spezifisch, da in Kontrollen mit HLA-B27/#Ch1138-Tetrameren und in Wildtyp-Mäusen, die ebenfalls mit HLA-B27/#A67-Peptid-Tetrameren inkubiert wurden, keine Zellen durch das Tetramer gefärbt waren (Abb. 42).

Im Knorpel- und Knochengewebe dieser immunisierten B27-transgene Mäuse ließen sich keine spezifischen Tetramerfärbungen etablieren, da es in diesem Gewebe zu starken unspezifischen Signalen kam. Ursache dafür könnte die unterschiedliche Zusammensetzung der Organe (Milz und Knochen) hinsichtlich Zellularität, Fettgehalt und Matrix (Stroma) sein. Durch die Molekülgröße der Tetramere kann es zu Protein/Protein-Interaktionen über nicht-kovalente Wechselwirkungen der Aminosäurereste zwischen den beteiligten Proteinen kommen. Als Verursacher unspezifischer Tetramerfärbungen sind in diesem Rahmen auch *Paired Ig-like* Rezeptoren zu nennen (88), die vor allem auf Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen, Megakaryozyten, aber auch auf B-Zellen und dendritischen Zellen (271) aber nicht auf T-Zellen exprimiert werden (272).

Um die Daten nicht nur auf das Modell B27-transgener Mäuse zu beschränken, wurde an Patientenmaterial untersucht, ob die knorpelspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen dazu beitragen, eine lokale zelluläre Immunantwort in den Gelenken zu entwickeln. Eine T-Zell-Antwort auf Aggrecan ist im peripheren Blut bei verschiedenen Erkrankungen nachgewiesen. Bei Patienten mit AS wurden Proteoglycan-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen (107), Aggrecan-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen (G1-Domäne) (273) und nicht-HLA-B27-restringierte Aggrecan-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen (G1-Domäne) (274) nachgewiesen. Auch bei der rheumatoiden Arthritis (275) und Osteoarthritis (108) können G1-spezifische T-Zellen detektiert werden. Eine HLA-B27-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort auf Aggrecanpeptide wurde dagegen bis dato nicht gezeigt.

Daher wurden im nächsten Schritt die vier Kandidatenpeptide #A47, #A57, #A59 und #A67 aus dem humanen Aggrecan auf ihre Fähigkeit geprüft, HLA-B27 restringierte, spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus humanen Zellen zu detektieren. Bei diesem Versuchsansatz bestand die Möglichkeit, neben dem peripheren Blut (31 AS-Patienten) auch die Synovialflüssigkeit von entzündeten Kniegelenken bei 3 AS-Patienten parallel durchflusszytometrisch mittels IFN $\gamma$ -Sekretion zu bestimmen. In dem kleinen untersuchten Patientenkollektiv wurden Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Synovialflüssigkeit relativ häufiger detektiert (2 von 3 AS-Patienten) als im peripheren Blut (3 von 31 AS-Patienten). Dieses Ergebnis korreliert mit

anderen Studien (62, 180, 276). Die Frequenz in der Synovialflüssigkeit war gering. Es könnte eine Rolle spielen, dass Patienten mit AS oder anderen SpA mit einer peripheren Arthritis nur sekundär eine vorübergehende Synovitis entwickeln (104) als Reaktion auf eine Osteitis oder Enthesitis im subchondralen Knochenmark. Vorrangig zeichnet sich die periphere Arthritis bei AS-Patienten durch eine Enthesitis im Gelenk aus, bei der eine T-Zell-Antwort auf Knorpelpeptide angenommen werden könnte (106).

Da die Analyse einer T-Zell-vermittelten Immunantwort auf HLA-B27-restringierte Peptide nicht nur auf die in der B27-transgenen Maus als immunogen identifizierten Aggecanpeptide beschränkt bleiben sollte, lag der Schwerpunkt in nächsten Teil der Arbeit auf der Identifikation weiterer CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitope aus anderen Bestandteilen der extrazellulären Knorpelmatrix bei AS-Patienten. So sind beim Menschen u.a. HLA-B27-vermittelte Antworten gegen Autoantigene aus dem Kollagen Typ II beschrieben worden (109, 180).

Die Peptid-bindende Vertiefung der HLA-I-Moleküle wird von den Domänen  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  ausgebildet. Sie dient der spezifischen Bindung von Peptiden definierter Länge, um sie dann den CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu präsentieren (244, 277). 68 % aller HLA-B27 bindenden Peptide sind Nonamere. Zudem werden Oktamere (12%) und Dekamere (13%) beschrieben (75). Die Strukturen einzelner Aminosäurereste des HLA-I-Moleküls, die an der Ausbildung der Peptidbindungsstelle beteiligt sind, bestimmen das Peptidbindungsmotiv des HLA-I-Moleküls (278). HLA-B27 enthält entlang der Peptidbindungsspalte insgesamt sechs Taschen (A-F), in denen einige Seitenketten des Peptides verankert werden. Festgelegte Ankerpositionen des HLA-B27-Moleküls sind die Taschen B und F mit den Seitenketten 2 und 9 (279, 280); weitere Ankerpositionen mit etwas größerer Flexibilität sind die Seitenketten P1, 3, 5 und 7. Peptide, die an HLA-B27 binden haben in der Regel einen Argininrest an Position 2 (244) und einen positiv geladenen Aminosäurerest an Position 9.

Beim Screening nach möglichen Kandidatenpeptiden aus der extrazellulären Knorpelmatrix wurden alle Nonamer-Peptide mit einem Argininrest an Position 2 des Nonamers selektioniert, dem typischen Anker-Aminosäurerest für HLA-B\*2705. Für die weitere Analyse wurden nur die Peptide ausgewählt, die eine relative Bindungsstärke von  $\geq 25$  hatten, die der Bindungsstärke der Mehrheit natürlich vorkommender Peptide entspricht (62). Auf Grundlage des HLA-B27 Bindungsmotives (178) wurden aus 18 verschiedenen Knorpelbestandteilen insgesamt 97 Kandidatenpeptide identifiziert. Darunter befand sich auch ein Decamer. Die Auswahl dieser Peptide unterschied sich von einer anderen Arbeit unserer Arbeitsgruppe (180) dadurch, dass ein höherer Bindungsscore und eine erweiterte Anzahl von Knorpelproteinen und Proteoglycanen angewendet wurden.

Die abgeleiteten Peptide wurden in Peptid-Pools von 3 - 10 Peptiden in Abhängigkeit von ihrem Bindungsscore zusammengefasst. Vollblut (32 AS-Patienten) oder Synovialflüssigkeit (3 AS-Patienten) wurden 6 h mit den jeweiligen Peptid-Pools in Anwesenheit von Brefeldin A inkubiert (164, 165) und eine durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären IFN $\gamma$ -Färbung durchgeführt. Bei einem positiven Resultat folgte eine anschließende Inkubation des Vollblutes bzw. der Synovialflüssigkeit mit den Einzelpeptiden und dabei wurden 8 Peptide aus den insgesamt 97 Peptiden als schwach stimulatorisch identifiziert. Damit können Bestandteile der extrazellulären Knorpelmatrix, inklusive des Aggrecans, als potentielle Autoantigene für HLA-B27-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestätigt werden.

Aufgrund der histopathologischen Untersuchungen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Knorpel bzw. den Chondrozyten und T-Zellen gibt. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Gelenkknorpel eines der primären Ziele bei der Gewebeerstörung in chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen sein könnte. Es wurde die Frage aufgeworfen, ob Chondrozyten selbst am Entzündungsprozess beteiligt sind und im Sinne nicht-professioneller APC T-Zellen direkt HLA-I-restringiert stimulieren können. Aufgrund der möglichen Relevanz einer CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort gegen Knorpelantigene bei AS-Patienten (Abb. 44, 45) (180) und der Identifikation von CD8<sup>+</sup> T-Zell-Infiltraten an der Knorpel/Knochengrenze bei Coxitis (Abb. 14), ergab sich die Frage, inwiefern Chondrozyten fähig sind, Selbstpeptide aus humanem Knorpel zu präsentieren, um bei HLA-B27-assoziierten Erkrankungen HLA-B27-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren.

Für die hier beschriebenen Untersuchungen ergab sich die einzigartige Möglichkeit, Chondrozyten eines entzündeten Gelenkes mit bekannter Histopathologie, T-Zell-Linien mit definierter HLA-I-restringierter Antigenpezifität und PBMNC des gleichen AS-Patienten parallel zu untersuchen. Dabei wurde ein Modell-System mit einem bekannten immundominanten HLA-B27-restringierten Peptid, EBNA<sub>258-266</sub> (131), zur Generierung der CD8<sup>+</sup> Antigen-spezifischen T-Zell-Linie genutzt, um in Kokultivierungsexperimenten mit autologen Chondrozyten die Funktionalität zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu analysieren. EBNA<sub>258-266</sub> stellt wie bei *Chlamydia* ein intrazellulär produziertes Fremdanigen dar. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde eine neue Methode etabliert (Abschnitt 3.4.6), um die Antigen-spezifische zytotoxische Interaktion zwischen T-Zellen und nicht-professionellen APC zu analysieren, die auch auf andere Zelltypen übertragen werden könnte.

Die immunhistologischen Analysen der Hüftgelenke von AS-Patienten mit einer Hüftarthrititis zeigten eine Hochregulation der HLA-B27-Expression in Bereichen mit Entzündungen im subchondralen Knochenmark und mit infiltrierenden mononukleären Zellen (Abb. 27). Dies

warf die Frage auf, ob ein inflammatorisches Milieu für den Anstieg der HLA-B27-Expression in diesen Chondrozyten verantwortlich ist. *In vitro* wurden verschiedene Zytokine getestet, und es zeigte sich, dass IFN $\gamma$  zu einer signifikanten Hochregulation von HLA-B27 in humanen Chondrozyten führt (Abb. 47). Ein ähnliches Ergebnis kann man bei Chondrozyten B27-transgener Mäuse beobachten (281).

Wir verwendeten den HLA-B27-spezifischen Antikörper des Klons HLA-B27-m<sup>3</sup>, für den eine Kreuzreaktion mit HLA-B7 bekannt ist (282). Da der HLA-B27<sup>+</sup> AS-Patient für HLA-B7 negativ war und auch die Isotyp-Kontrollen keine Färbung zeigten, konnte in diesem Fall eine Kreuzreaktion mit HLA-B7 ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurden auch weitere Antikörper gegen HLA-B27 eingesetzt. ME-1 (283), HC-10 (85) und EP-4 erkannten verschiedene Epitope auf dem HLA-B27-Molekül. Während der ME-1-Antikörper die Ergebnisse von HLA-B27-m<sup>3</sup> bestätigen konnte, zeigten die beiden anderen Antikörper unspezifische Färbungen.

Die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 aus der Immunglobulin-Supergen-Familie sind Liganden für CD28 auf T-Zellen und vor allem den Zellen des hämatopoetischen Ursprunges zugeordnet (20, 21). Man glaubte lange, dass sie nicht in anderen Gewebszellen vorkommen (22). Allerdings zeigen jüngere Studien eine Expression von CD80 und CD86 in nicht-professionellen APC wie Keratinozyten der Haut (19, 23, 24) und Mikroglia im Gehirn (18, 25, 26). In unseren Experimenten wurde CD80, aber nicht CD86 auf primären humanen Gelenkchondrozyten konstitutiv exprimiert (Abb. 29). Ausgehend von diesen experimentellen Beobachtungen, dass humane Gelenkchondrozyten unter entzündlichen Bedingungen die Voraussetzungen für eine Antigenpräsentation erfüllen, wurde analysiert, ob Chondrozyten als nicht-professionelle APC fungieren und aktiv die T-Zell-vermittelte Entzündung beeinflussen können.

MHC-II restringierte Antworten gegen Chondrozyten sind bereits beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass Chondrozyten aus dem Gelenkknorpel von Kaninchen MHC-II-Moleküle exprimieren, das Modellprotein OVA prozessieren und geprimte T-Zellen induzieren, was ihnen die Fähigkeit verleiht, die Proliferation von T-Zellen zu stimulieren (91, 284). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Chondrozyten von Ratten beobachtet (285, 286). Dagegen zeigen isolierte Chondrozyten des Menschen (153, 287), von Schweinen (288) oder der Maus (154) im Wesentlichen keine Expression von MHC-II-Molekülen und benötigen die Aktivierung durch IFN $\gamma$ , bevor sie Antigene den CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentieren können.

Im Unterschied zu Chondrozyten aus Kaninchen und Ratten scheinen menschliche Chondrozyten, mit oder ohne IFN $\gamma$ -Behandlung, sehr schwache Auslöser für allogene oder

autologe T-Zell-Antworten zu sein. Sie sind aber zur Antigen-Präsentation gegenüber einer Antigen-spezifischen T-Zell-Linie fähig (153, 287). Untersuchungen in Schweinen ergaben, dass durch inflammatorische Zytokine aktivierte Chondrozyten MHC-II-Moleküle und erhöhte Mengen von CD54 im Gelenkknorpel *in vivo* exprimieren (288). Ähnliche Beobachtungen konnten auch im Knorpel bei rheumatoider Arthritis gemacht werden (289).

In einem murinen Polyarthritis-Modell wurde bereits nachgewiesen, dass Chondrozyten aus einer mit Proteoglycan-immunisierten Wildtyp-Maus MHC-II-restringierte T-Zell-Antworten gegen Proteoglycan-spezifische Epitope vermitteln können (154, 290). Die Frage nach einer MHC-I-restringierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort ist bisher vor allem die Arbeitsgruppe von Helen Bodmer nachgegangen. Für diese Fragestellung nutzte sie B27-transgene Mäuse. Mit einem Peptid aus *Influenza A Virus* konnte nachgewiesen werden, dass zytotoxische T-Zellen Chondrozyten Antigen-spezifisch lysieren können (281, 291). Beim Menschen sind bislang nur vaskuläre Endothelzellen beschrieben, die im Sinne von nicht-professionellen APC eine HLA-I-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort induzieren (10).

In der vorliegenden Arbeit wurden Antigen-spezifische Effekte von humanen Chondrozyten auf die IFN $\gamma$ -Sekretion durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* beobachtet. Die Frequenz von IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen stimuliert mit Antigen-beladenen Chondrozyten war signifikant höher als nach Inkubation mit Kontrollpeptid-geprägten Chondrozyten (Abb. 54). Der zwei- bis fünffache Anstieg des Anteils IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu Kontrollen war mit den Daten für nicht-professionelle APC bei der Maus ähnlich. Eine definierte, aber niedrige IFN $\gamma$ -Produktion ist bei gemischten Kulturen mit T-Zellen und homologen Endothelzellen aus dem Pankreas zu beobachten (292). Im Vergleich mit professionellen APC hatten die Chondrozyten eine geringere Stimulationsfähigkeit. Ein ähnliches Bild zeigen humane vaskuläre Endothelzellen. Die Proliferation von T-Zellen nach Stimulation mit vaskulären Endothelzellen ist 5-20-fach geringer, verglichen mit Kokulturen professioneller APC (1). Die Stärke der zytotoxischen Reaktion ist abhängig von der Menge der HLA-I-gebundenen Peptide, die den CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert werden (293). Begrenzende Faktoren sind die Anzahl der HLA-I-Moleküle auf der Zelloberfläche und das Angebot von passenden Peptiden.

Poren-formendes Perforin und die Serin-Protease Granzym B sind zytotoxische Proteine, die sich in lysosomalen Granula unterhalb der Zytoplasmamembran zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen befinden. Nach Antigenerkennung durch die Interaktion vom HLA-Molekül der APC und dem TCR induzieren sie in der Zielzelle Apoptose durch lokale Exozytose (44, 45, 294). Die hier vorliegende *in vitro* Studie zeigt, dass durch autologe, Chondrozyten stimulierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht nur Zytokine produzieren, sondern auch zytolytische Eigenschaften haben. Analysen durch LSM offenbarten eine Akkumulation und eine zentrierte Aggregation



von Perforin und Granzym B genau an den Stellen, wo es zu einem direktem Zell/Zell-Kontakt zwischen T-Zellen und Peptid-beladenen Chondrozyten kam (Abb. 55). Es schien, als würden die Chondrozyten von den T-Zellen lysiert werden (Abb. 56 C). Um dies semiquantitativ nachzuweisen, müssten zusätzliche Analysen zur Apoptose oder Zytotoxizitätsassays gemacht werden. Granzym B kann Proteoglykane der extrazellulären Knorpelmatrix, z.B. Aggrecan, direkt abbauen, was die Zerstörung des Gelenkknorpels hervorrufen könnte (46-48). Das lokale Vorhandensein von Granzym B und Perforin in aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die ihrerseits an IFN $\gamma$ -behandelte Peptid-behandelte Gelenkchondrozyten angrenzen, lassen den starken Schluss zu, dass Antigenpräsentation durch Chondrozyten einen Anteil an der T-Zell-vermittelten Gewebedestruktion in AS-Patienten haben könnte.

Eine Hypothese für die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen ist die Organ-spezifische Antigenpräsentation durch nicht-professionelle APC. Die meisten derzeitigen Daten, die zu dieser Diskussion beitragen, stammen aus Maus-Modellen, z. B. für CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einem Modell für autoimmune Reaktionen im Darm, die durch das Hitzeschockprotein 60 induziert werden (295). Von HLA-I- und HLA-II-restringierter T-Zell-Aktivierung durch nicht-professionelle APC wird auch in anderen Studien berichtet. So sollen Mikroglia des zentralen Nervensystems von an Multipler Sklerose erkrankten Mäusen oder naive Mikroglia in einem inflammatorischen Milieu CD4<sup>+</sup> T-Zellen Myelin-Peptid-spezifisch zur Proliferation und IFN $\gamma$ -Produktion aktivieren (296). Auch bei Keratinozyten wird vermutet, dass sie unter inflammatorischen Bindungen als nicht-professionelle APC fungieren. Transgene Mäuse exprimieren Autoantigene unter der Kontrolle des Keratinozyten spezifischen Promotors K14. Die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch die Antigen-spezifischen Präsentation von Chondrozyten führt zur Autoimmunerkrankung in den Mäusen (297). Schließlich zeigt ein anderes Maus-Modell, dass Endothelzellen aus dem Pankreas eine HLA-I-restringierte Aktivierung Insulin-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen bewerkstelligen können, die zur Zerstörung der  $\beta$ -Zellen und letztendlich zur Diabetes führt (292).

Wie könnte ein mögliches Szenario aussehen, dass die Antigenpräsentation durch Chondrozyten zur Entstehung der Entzündung bei AS beschreibt? Knorpel wird als immunologisch begünstigtes Gewebe angesehen, in dem Chondrozyten in der extrazellulären Matrix ohne Blutgefäße eingebettet sind, die ihre Interaktion mit Immunglobulinen, Lymphozyten oder anderen Zellen verhindert. Mechanische Zerstörung des Knorpels oder biomechanischer stress-induzierter Knorpelumbau, der zu einem Microtrauma führen kann (298) und die Neoangiogenese, ebnet den Weg für die Beteiligung von T-Zellen an Gelenk-spezifischen Gewebeschäden. Sie könnte den ersten Zell/Zell-Kontakt zu Chondrozyten an der Knorpel/Knochen-Grenze der beschädigten

Gelenke ermöglichen. Werden Chondrozyten aus der zerstörten extrazellulären Matrix freigesetzt und regulieren ihre HLA-Moleküle wie HLA-B27 in der unmittelbaren Nähe zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen hoch, kann dies den Entzündungsprozess aufrecht erhalten, eingeschlossen dabei die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine *in situ*. Ein solches Szenario wäre entsprechend in intaktem Knorpelgewebe nicht möglich (281).

Zusammenfassend zeigt die hier vorgelegte Arbeit, dass humane Gelenkchondrozyten Antigen-spezifische, zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen HLA-B27-restringiert stimulieren können. Chondrozyten könnten so zur Entzündungspathologie bei AS beitragen. Es ist denkbar, dass eine autokrine IFN $\gamma$ -vermittelte Schleife die Antigen-spezifische zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort vorantreibt und eventuell nach dem kompletten Verlust des Knorpels endet. Die direkte Präsentation von Autoantigenen, z.B. Knorpelantigene, durch Chondrozyten in AS-Patienten sollte zukünftig weiter analysiert werden. Die Fähigkeit der humanen Gelenkchondrozyten zur Antigenpräsentation könnte die Infiltration Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in die Knochenendplatte und in den Knorpel erklären, die bei der Hüftgelenksarthritis von AS-Patienten beobachtet wurde.

## 5 Zusammenfassung

Die ankylosierende Spondylitis (AS) und reaktive Arthritis (ReA) sind eng mit dem humanen Leukozytenantigen (HLA)-B27 assoziiert. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte histologische Untersuchungen zeigten an Femurköpfen von AS-Patienten Ansammlungen von T-Zellen, auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die das Knorpelgewebe vom subchondralen Knochenmark aus infiltrierten. Das Ausmaß dieser T-Zell-Infiltrationen korrelierte mit dem Vorhandensein von Knorpel auf der Gelenkoberfläche. Eine erhöhte Dichte von Blutgefäßen in Bereichen mit akuter Entzündung am angrenzenden Knorpel deutete auf die Möglichkeit einer erleichterten Einwanderung von T-Zellen. Diese Beobachtungen warfen die Frage auf, auf welchen Ebenen der Beitrag von CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf lokale Entzündungen bei AS reguliert wird. Besonderes Augenmerk galt den über HLA-B27 vermittelten Antigen-spezifischen Mechanismen.

Zunächst wurden Peptide aus Proteinen von *Chlamydia trachomatis* in Patienten mit *Chlamydia*-getriggelter ReA und AS, sowie Peptide aus Proteinen der extrazellulären Knorpelmatrix bei AS-Patienten gesucht, die T-Zellen HLA-B27-restringiert stimulieren. Das wurde durchflusszytometrisch in CD8<sup>+</sup> T-Zellen über die Peptid-abhängige Induktion der Produktion von Interferon (IFN) $\gamma$  sowie über den Nachweis spezifischer T-Zellrezeptoren mittels selbst hergestellter HLA-B27/Peptid-Tetramere geprüft. *Chlamydia*-Peptid-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren nur in geringen Frequenzen in der Synovialflüssigkeit und nicht im peripheren Blut von ReA- und AS-Patienten nachweisbar. Vier im Modell mit HLA-B27-transgenen Mäusen identifizierte immundominante Aggrecanpeptide bestätigten Aggrecan als mögliches Autoantigen und aus dem *Screening* weiterer Knorpelproteine ergaben sich 8/97 Peptide, die HLA-B27-restringiert CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktivierten. Um diese systemischen Beobachtungen im zellulären Kontext des lokalen Entzündungsgeschehens weiter beurteilen zu können, wurden Methoden zum Nachweis Peptid-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in situ* etabliert.

Die Befunde, dass artikuläre Chondrozyten *in situ* konstitutiv kostimulatorisches CD80 exprimieren und dass proinflammatorisches IFN $\gamma$  die Expression von HLA-B27 induzierte, führte zu der Hypothese, dass Chondrozyten in einer Entzündung im Sinne nicht-professioneller Antigen-präsentierender Zellen lokale CD8<sup>+</sup> T-Zell-spezifische Immunantworten induzieren und/oder aufrechterhalten können. In einem Modellsystem mit EBNA<sub>258-266</sub>, einem HLA-B27-restringierten immundominanten Peptid aus dem Epstein Barr Virus, wurden Interaktionen von autologen artikulären Chondrozyten mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* untersucht. In Gegenwart HLA-B27<sup>+</sup> EBNA<sub>258-266</sub> beladener Chondrozyten produzierten HLA-B27/EBNA<sub>258-266</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen IFN $\gamma$ . Die konfokale Laserscanning-Mikroskopie zeigte bei direktem Chondrozyt/T-Zell-Kontakt eine Anreicherung von

zytolytischem Perforin und Granzym B in den CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie durch sie lysierte benachbarte Chondrozyten.

Die Aktivierung zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Gegenwart eines immunogenen HLA-B27-restringierten Peptids legt nahe, dass Chondrozyten im Gelenkknorpel über eine entzündungsabhängige Antigenpräsentation an der Aufrechterhaltung der Entzündung bei AS beteiligt sein könnten. Damit liefern die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Antigen-spezifischen Mechanismen Anhaltspunkte, wie die knorpelabhängige Sukzession der Infiltration von T-Zellen in Knochenendplatte und Knorpelgewebe zum Verlauf der Hüftgelenksarthritis von AS-Patienten beitragen könnte.

## Summary

Ankylosing spondylitis (AS) and reactive arthritis (ReA) are strongly associated with the class I human leukocyte antigen (HLA)-B27. Histopathology of hip joints from AS patients as done for this study revealed an accumulation of infiltrating mononuclear cells, including CD8<sup>+</sup> T cells, within the bone endplate and the hyaline articular cartilage. The extent of T cell aggregates was significantly reduced at bone sites devoid of cartilage. Enhanced microvessel densities in acute inflammation at the bone–cartilage interface pointed to a facilitated access of immunocompetent cells to the cartilage. These observations raised the question on the levels of involvement of CD8<sup>+</sup> T cells to local inflammations in AS. This work mainly focussed on antigen-specific mechanisms mediated by HLA-B27.

As for the role of exo- and endogeneous antigens, HLA–B27–restricted CD8<sup>+</sup> T cell responses were investigated using peptides derived from proteins of *Chlamydia trachomatis* and of the extracellular matrix from human cartilage and fibrocartilage. Phenotypic and functional analysis of CD8<sup>+</sup> T cells was performed by flow cytometry of suspended cells and *in situ* by immunohistochemistry and immunofluorescence. Asking for frequencies of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells, cytokine expression was studied and self manufactured HLA-B27 tetramers were used. *Chlamydia*-specific CD8<sup>+</sup> T cells were found at low frequencies in the synovial fluid and not in the peripheral blood of ReA and AS patients. Four HLA-B27-restricted immunodominant peptides derived from human aggrecan recently described in BALB/c-B27 transgenic mice confirmed aggrecan as an auto-antigen in AS. Screening of additional human cartilage proteins identified 8/97 peptides to stimulate HLA-B27-restricted CD8<sup>+</sup> T cells. To study the cellular context during hip joint inflammation, methods for the detection of peptide-specific CD8<sup>+</sup> T cells *in situ* were established.

Articular chondrocytes prepared from the femoral head joint cartilage constitutively expressed costimulatory CD80 and upregulated HLA-B27 expression after incubation with proinflammatory interferon (IFN)- $\gamma$ . This raised the question whether chondrocytes have the potential to directly trigger local CD8<sup>+</sup> T cell dependent inflammation as non-professional antigen-presenting cells. Human T cell lines from an HLA-B27<sup>+</sup> AS patient and autologous chondrocytes were available. These cells were used in a model system with an Epstein Barr Virus-derived peptide EBNA<sub>258-266</sub> to study peptide specificity and functionality of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells and to assess cellular interactions of T cells and chondrocytes by fluorescence confocal microscopy. Pulsed with the EBNA<sub>258-266</sub> peptide, autologous chondrocytes specifically induced IFN $\gamma$  production in CD8<sup>+</sup> T cells. In mixed chondrocyte-T cell cultures cell-cell contacts were strictly EBNA<sub>258-266</sub> peptide-dependent. T cells adjacent to chondrocytes produced perforin and granzyme B. Both molecules were found in focal aggregates, a prerequisite for an antigen-specific lysis of target cells.

In summary, the finding that human articular chondrocytes attract and stimulate antigen-specific cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells in an HLA-B27-restricted manner suggests that chondrocytes might contribute to maintenance of inflammation in AS. Antigenes might derive from exo- or endogenous sources. This antigen-presenting capacity of human articular chondrocytes might explain a facilitated invasion of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell into the bone end-plate and cartilage observed in hip arthritis of AS patients.

**6 Literaturverzeichnis**

1. Dengler TJ, Pober JS. Human vascular endothelial cells stimulate memory but not naive CD8+ T cells to differentiate into CTL retaining an early activation phenotype. *J Immunol* 2000;164(10):5146-55.
2. Epperson DE, Pober JS. Antigen-presenting function of human endothelial cells. Direct activation of resting CD8 T cells. *J Immunol* 1994;153(12):5402-12.
3. Ma W, Pober JS. Human endothelial cells effectively costimulate cytokine production by, but not differentiation of, naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1998;161(5):2158-67.
4. Laning JC, Deluca JE, Isaacs CM, Hardin-Young J. In vitro analysis of CD40-CD154 and CD28-CD80/86 interactions in the primary T-cell response to allogeneic "nonprofessional" antigen presenting cells. *Transplantation* 2001;71(10):1467-74.
5. de Bueger M, Bakker A, Goulmy E. Human keratinocytes activate primed major and minor histocompatibility antigen specific Th cells in vitro. *Transpl Immunol* 1993;1(1):52-9.
6. Lowe J, MacLennan KA, Powe DG, Pound JD, Palmer JB. Microglial cells in human brain have phenotypic characteristics related to possible function as dendritic antigen presenting cells. *J Pathol* 1989;159(2):143-9.
7. Haraldsen G, Sollid LM, Bakke O, Farstad IN, Kvale D, Molberg, et al. Major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by human intestinal endothelial cells. *Gastroenterology* 1998;114(4):649-56.
8. Geppert TD, Lipsky PE. Antigen presentation by interferon-gamma-treated endothelial cells and fibroblasts: differential ability to function as antigen-presenting cells despite comparable Ia expression. *J Immunol* 1985;135(6):3750-62.
9. Hughes CC, Pober JS. Costimulation of peripheral blood T cell activation by human endothelial cells. Enhanced IL-2 transcription correlates with increased c-fos synthesis and increased Fos content of AP-1. *J Immunol* 1993;150(8 Pt 1):3148-60.
10. Kummer M, Lev A, Reiter Y, Biedermann BC. Vascular endothelial cells have impaired capacity to present immunodominant, antigenic peptides: a mechanism of cell type-specific immune escape. *J Immunol* 2005;174(4):1947-53.
11. Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2002;20:29-53.
12. Schultze J, Nadler LM, Gribben JG. B7-mediated costimulation and the immune response. *Blood Rev* 1996;10(2):111-27.
13. Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol Res* 1999;19(1):1-24.
14. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science* 1995;270(5238):985-8.
15. Fuse S, Zhang W, Usherwood EJ. Control of memory CD8+ T cell differentiation by CD80/CD86-CD28 costimulation and restoration by IL-2 during the recall response. *J Immunol* 2008;180(2):1148-57.
16. Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med* 1994;180(2):631-40.
17. Lenschow DJ, Sperling AI, Cooke MP, Freeman G, Rhee L, Decker DC, et al. Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen. *J Immunol* 1994;153(5):1990-7.

18. Satoh J, Lee YB, Kim SU. T-cell costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) are expressed in human microglia but not in astrocytes in culture. *Brain Res* 1995;704(1):92-6.
19. Wakem P, Burns RP, Jr., Ramirez F, Zlotnick D, Ferbel B, Haidaris CG, et al. Allergens and irritants transcriptionally upregulate CD80 gene expression in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2000;114(6):1085-92.
20. Azuma M, Ito D, Yagita H, Okumura K, Phillips JH, Lanier LL, et al. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 1993;366(6450):76-9.
21. Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo VA, Jr., Lombard LA, et al. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 1993;262(5135):909-11.
22. Theobald VA, Lauer JD, Kaplan FA, Baker KB, Rosenberg M. "Neutral allografts"--lack of allogeneic stimulation by cultured human cells expressing MHC class I and class II antigens. *Transplantation* 1993;55(1):128-33.
23. Nickoloff BJ, Mitra RS, Lee K, Turka LA, Green J, Thompson C, et al. Discordant expression of CD28 ligands, BB-1, and B7 on keratinocytes in vitro and psoriatic cells in vivo. *Am J Pathol* 1993;142(4):1029-40.
24. Simon JC, Dietrich A, Mielke V, Wuttig C, Vanscheidt W, Linsley PS, et al. Expression of the B7/BB1 activation antigen and its ligand CD28 in T-cell-mediated skin diseases. *J Invest Dermatol* 1994;103(4):539-43.
25. De Simone R, Giampaolo A, Giometto B, Gallo P, Levi G, Peschle C, et al. The costimulatory molecule B7 is expressed on human microglia in culture and in multiple sclerosis acute lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995;54(2):175-87.
26. Williams K, Ulvestad E, Antel JP. B7/BB-1 antigen expression on adult human microglia studied in vitro and in situ. *Eur J Immunol* 1994;24(12):3031-7.
27. Townsend A, Bodmer H. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1989;7:601-24.
28. Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 1990;59:253-88.
29. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987;329(6139):506-12.
30. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987;329(6139):512-8.
31. Guo HC, Jardetzky TS, Garrett TP, Lane WS, Strominger JL, Wiley DC. Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature* 1992;360(6402):364-6.
32. Fremont DH, Matsumura M, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA. Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb. *Science* 1992;257(5072):919-27.
33. Scapozza L, Rognan D, Folkers G, Daser A. Molecular dynamics and structure-based drug design for predicting non-natural nonapeptide binding to a class I MHC protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1995;51(Pt 4):541-9.
34. Friedl P, Storim J. Diversity in immune-cell interactions: states and functions of the immunological synapse. *Trends Cell Biol* 2004;14(10):557-67.
35. Engelhard VH. Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 1994;6(1):13-23.
36. Bohley P. Surface hydrophobicity and intracellular degradation of proteins. *Biol Chem* 1996;377(7-8):425-35.
37. Niedermann G, Butz S, Ihlenfeldt HG, Grimm R, Lucchiari M, Hoschutzky H, et al. Contribution of proteasome-mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity* 1995;2(3):289-99.



38. Song R, Harding CV. Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J Immunol* 1996;156(11):4182-90.
39. Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 1989;7:445-80.
40. Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 1993;11:191-212.
41. Henkart PA. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 1985;3:31-58.
42. Verret CR, Firmenich AA, Kranz DM, Eisen HN. Resistance of cytotoxic T lymphocytes to the lytic effects of their toxic granules. *J Exp Med* 1987;166(5):1536-47.
43. Smyth MJ, Trapani JA. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today* 1995;16(4):202-6.
44. Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 1995;377(6548):446-8.
45. Pinkoski MJ, Hobman M, Heibin JA, Tomaselli K, Li F, Seth P, et al. Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. *Blood* 1998;92(3):1044-54.
46. Froelich CJ, Zhang X, Turbov J, Hudig D, Winkler U, Hanna WL. Human granzyme B degrades aggrecan proteoglycan in matrix synthesized by chondrocytes. *J Immunol* 1993;151(12):7161-71.
47. Buzza MS, Zamurs L, Sun J, Bird CH, Smith AI, Trapani JA, et al. Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. *J Biol Chem* 2005;280(25):23549-58.
48. Roday HK, van der Laan WH, Tak PP, de Roos JA, Bank RA, TeKoppele JM, et al. Human granzyme B mediates cartilage proteoglycan degradation and is expressed at the invasive front of the synovium in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40(1):55-61.
49. Braun J, Bollow M, Remlinger G, Eggens U, Rudwaleit M, Distler A, et al. Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis Rheum* 1998;41(1):58-67.
50. Brandt J, Bollow M, Haberle J, Rudwaleit M, Eggens U, Distler A, et al. Studying patients with inflammatory back pain and arthritis of the lower limbs clinically and by magnetic resonance imaging: many, but not all patients with sacroiliitis have spondyloarthropathy. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38(9):831-6.
51. Dougados M, van der Linden S, Juhlin R, Huitfeldt B, Amor B, Calin A, et al. The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 1991;34(10):1218-27.
52. Leirisalo-Repo M. Prognosis, course of disease, and treatment of the spondyloarthropathies. *Rheum Dis Clin North Am* 1998;24(4):737-51, viii.
53. Appel H, Sieper J., Rudwaleit M. Molekulare Pathomechanismen von HLA-B27 und anderen Genen bei Spondyloarthritis. *Aktuelle Rheumatologie* 2006;31:24-32.
54. Keat A. Reiter's syndrome and reactive arthritis in perspective. *N Engl J Med* 1983;309(26):1606-15.
55. Brewerton DA, Caffrey M, Nicholls A, Walters D, Oates JK, James DC. Reiter's disease and HL-A 27. *Lancet* 1973;2(7836):996-8.
56. Sieper J, Kingsley G. Recent advances in the pathogenesis of reactive arthritis. *Immunol Today* 1996;17(4):160-3.
57. Granfors K, Jalkanen S, von Essen R, Lahesmaa-Rantala R, Isomaki O, Pekkola-Heino K, et al. Yersinia antigens in synovial-fluid cells from patients with reactive arthritis. *N Engl J Med* 1989;320(4):216-21.

58. Granfors K, Jalkanen S, Lindberg AA, Maki-Ikola O, von Essen R, Laheesmaa-Rantala R, et al. Salmonella lipopolysaccharide in synovial cells from patients with reactive arthritis. *Lancet* 1990;335(8691):685-8.
59. Hammer M, Zeidler H, Klimsa S, Heesemann J. *Yersinia enterocolitica* in the synovial membrane of patients with *Yersinia*-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1990;33(12):1795-800.
60. Bas S, Griffais R, Kvien TK, Glennas A, Melby K, Vischer TL. Amplification of plasmid and chromosome *Chlamydia* DNA in synovial fluid of patients with reactive arthritis and undifferentiated seronegative oligoarthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38(7):1005-13.
61. Kuon W, Lauster R, Bottcher U, Koroknay A, Ulbrecht M, Hartmann M, et al. Recognition of chlamydial antigen by HLA-B27-restricted cytotoxic T cells in HLA-B\*2705 transgenic CBA (H-2k) mice. *Arthritis Rheum* 1997;40(5):945-54.
62. Kuon W, Holzhutter HG, Appel H, Grolms M, Kollnberger S, Traeder A, et al. Identification of HLA-B27-restricted peptides from the *Chlamydia trachomatis* proteome with possible relevance to HLA-B27-associated diseases. *J Immunol* 2001;167(8):4738-46.
63. Francois RJ, Gardner DL, Degraeve EJ, Bywaters EG. Histopathologic evidence that sacroiliitis in ankylosing spondylitis is not merely enthesitis. *Arthritis Rheum* 2000;43(9):2011-24.
64. Braun SA. Spondyloarthritides and related arthritides. New York: Oxford University Press; 2003.
65. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HLA-A 27. *Lancet* 1973;1(7809):904-7.
66. Khan MA. HLA-B27 polymorphism and association with disease. *J Rheumatol* 2000;27(5):1110-4.
67. Marker-Hermann E, Hohler T. Pathogenesis of human leukocyte antigen B27-positive arthritis. Information from clinical materials. *Rheum Dis Clin North Am* 1998;24(4):865-81, xi.
68. Duchmann R, Lambert C, May E, Hohler T, Marker-Hermann E. CD4+ and CD8+ clonal T cell expansions indicate a role of antigens in ankylosing spondylitis; a study in HLA-B27+ monozygotic twins. *Clin Exp Immunol* 2001;123(2):315-22.
69. Sieper J, Braun J. Pathogenesis of spondylarthropathies. Persistent bacterial antigen, autoimmunity, or both? *Arthritis Rheum* 1995;38(11):1547-54.
70. Marti M, Alvarez I, Lopez de Castro JA. A molecular insight on the association of HLA-B27 with spondyloarthropathies. *Curr Rheumatol Rep* 1999;1(1):78-85.
71. Khan MA. HLA-B27 and its subtypes in world populations. *Curr Opin Rheumatol* 1995;7(4):263-9.
72. Boyer GS, Templin DW, Cornoni-Huntley JC, Everett DF, Lawrence RC, Heyse SF, et al. Prevalence of spondyloarthropathies in Alaskan Eskimos. *J Rheumatol* 1994;21(12):2292-7.
73. Khan MA. Spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol* 1998;10(4):279-81.
74. Holdsworth R, Hurley CK, Marsh SG, Lau M, Noreen HJ, Kempenich JH, et al. The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Tissue Antigens* 2009;73(2):95-170.
75. Lopez de Castro JA, Alvarez I, Marcilla M, Paradela A, Ramos M, Sesma L, et al. HLA-B27: a registry of constitutive peptide ligands. *Tissue Antigens* 2004;63(5):424-45.
76. Khan MA. Update on spondyloarthropathies. *Ann Intern Med* 2002;136(12):896-907.
77. Khan MA, Ball EJ. Genetic aspects of ankylosing spondylitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2002;16(4):675-90.
78. Ramos M, Alvarez I, Sesma L, Logean A, Rognan D, Lopez de Castro JA. Molecular mimicry of an HLA-B27-derived ligand of arthritis-linked subtypes with chlamydial proteins. *J Biol Chem* 2002;277(40):37573-81.

79. Benjamin RJ, Madrigal JA, Parham P. Peptide binding to empty HLA-B27 molecules of viable human cells. *Nature* 1991;351(6321):74-7.
80. Oldstone MB. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 1987;50(6):819-20.
81. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;80(5):695-705.
82. Mear JP, Schreiber KL, Munz C, Zhu X, Stevanovic S, Rammensee HG, et al. Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies. *J Immunol* 1999;163(12):6665-70.
83. Dangoria NS, DeLay ML, Kingsbury DJ, Mear JP, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, et al. HLA-B27 misfolding is associated with aberrant intermolecular disulfide bond formation (dimerization) in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2002;277(26):23459-68.
84. Colbert RA. HLA-B27 misfolding: a solution to the spondyloarthropathy conundrum? *Mol Med Today* 2000;6(6):224-30.
85. Kollnberger S, Bird L, Sun MY, Retiere C, Braud VM, McMichael A, et al. Cell-surface expression and immune receptor recognition of HLA-B27 homodimers. *Arthritis Rheum* 2002;46(11):2972-82.
86. Bird LA, Peh CA, Kollnberger S, Elliott T, McMichael AJ, Bowness P. Lymphoblastoid cells express HLA-B27 homodimers both intracellularly and at the cell surface following endosomal recycling. *Eur J Immunol* 2003;33(3):748-59.
87. Bowness P. HLA B27 in health and disease: a double-edged sword? *Rheumatology (Oxford)* 2002;41(8):857-68.
88. Kollnberger S, Bird LA, Roddis M, Hacquard-Bouder C, Kubagawa H, Bodmer HC, et al. HLA-B27 heavy chain homodimers are expressed in HLA-B27 transgenic rodent models of spondyloarthritis and are ligands for paired Ig-like receptors. *J Immunol* 2004;173(3):1699-710.
89. Boyle LH, Hill Gaston JS. Breaking the rules: the unconventional recognition of HLA-B27 by CD4+ T lymphocytes as an insight into the pathogenesis of the spondyloarthropathies. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42(3):404-12.
90. Uchanska-Ziegler B, Ziegler A. Ankylosing spondylitis: a beta2m-deposition disease? *Trends Immunol* 2003;24(2):73-6.
91. Timms AE, Crane AM, Sims AM, Cordell HJ, Bradbury LA, Abbott A, et al. The interleukin 1 gene cluster contains a major susceptibility locus for ankylosing spondylitis. *Am J Hum Genet* 2004;75(4):587-95.
92. Jin L, Zhang G, Akey JM, Luo J, Lee J, Weisman MH, et al. Lack of linkage of IL1RN genotypes with ankylosing spondylitis susceptibility. *Arthritis Rheum* 2004;50(9):3047-8.
93. McGarry F, Neilly J, Anderson N, Sturrock R, Field M. A polymorphism within the interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene is associated with ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40(12):1359-64.
94. van der Paardt M, Crusius JB, Garcia-Gonzalez MA, Baudoin P, Kostense PJ, Alizadeh BZ, et al. Interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41(12):1419-23.
95. Marcilla M, Lopez de Castro JA. Peptides: the cornerstone of HLA-B27 biology and pathogenetic role in spondyloarthritis. *Tissue Antigens* 2008;71(6):495-506.
96. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005;201(2):233-40.
97. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 2008;8(5):337-48.
98. Nistala K, Moncrieffe H, Newton KR, Varsani H, Hunter P, Wedderburn LR. Interleukin-17-producing T cells are enriched in the joints of children with arthritis,

- but have a reciprocal relationship to regulatory T cell numbers. *Arthritis Rheum* 2008;58(3):875-87.
99. Lubberts E, Joosten LA, van de Loo FA, Schwarzenberger P, Kolls J, van den Berg WB. Overexpression of IL-17 in the knee joint of collagen type II immunized mice promotes collagen arthritis and aggravates joint destruction. *Inflamm Res* 2002;51(2):102-4.
  100. Poole AR. The histopathology of ankylosing spondylitis: are there unifying hypotheses? *Am J Med Sci* 1998;316(4):228-33.
  101. Claudepierre P, Gueguen A, Ladjouze A, Hajjaj-Hassouni N, Sellami S, Amor B, et al. Predictive factors of severity of spondyloarthropathy in North Africa. *Br J Rheumatol* 1995;34(12):1139-45.
  102. Lau CS, Burgos-Vargas R, Louthrenoo W, Mok MY, Wordsworth P, Zeng QY. Features of spondyloarthritis around the world. *Rheum Dis Clin North Am* 1998;24(4):753-70.
  103. Huang F, Zhang J, Zhu J, Guo J, Yang C. Juvenile spondyloarthropathies: the Chinese experience. *Rheum Dis Clin North Am* 2003;29(3):531-47.
  104. McGonagle D, Gibbon W, Emery P. Classification of inflammatory arthritis by enthesitis. *Lancet* 1998;352(9134):1137-40.
  105. Benjamin M, McGonagle D. The anatomical basis for disease localisation in seronegative spondyloarthropathy at entheses and related sites. *J Anat* 2001;199(Pt 5):503-26.
  106. Maksymowych WP. Ankylosing spondylitis--at the interface of bone and cartilage. *J Rheumatol* 2000;27(10):2295-301.
  107. Mikecz K, Glant TT, Baron M, Poole AR. Isolation of proteoglycan-specific T lymphocytes from patients with ankylosing spondylitis. *Cell Immunol* 1988;112(1):55-63.
  108. Guerassimov A, Zhang Y, Cartman A, Rosenberg LC, Esdaile J, Fitzcharles MA, et al. Immune responses to cartilage link protein and the G1 domain of proteoglycan aggrecan in patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42(3):527-33.
  109. Gao XM, Wordsworth P, McMichael A. Collagen-specific cytotoxic T lymphocyte responses in patients with ankylosing spondylitis and reactive arthritis. *Eur J Immunol* 1994;24(7):1665-70.
  110. Laloux L, Voisin MC, Allain J, Martin N, Kerboull L, Chevalier X, et al. Immunohistological study of entheses in spondyloarthropathies: comparison in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2001;60(4):316-21.
  111. McGonagle D, Stockwin L, Isaacs J, Emery P. An enthesitis based model for the pathogenesis of spondyloarthropathy. additive effects of microbial adjuvant and biomechanical factors at disease sites. *J Rheumatol* 2001;28(10):2155-9.
  112. Glant TT, Mikecz K, Arzoumanian A, Poole AR. Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology. *Arthritis Rheum* 1987;30(2):201-12.
  113. Benjamin M, Ralphs JR. Fibrocartilage in tendons and ligaments--an adaptation to compressive load. *J Anat* 1998;193 ( Pt 4):481-94.
  114. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 1998;47:477-86.
  115. Chen FH, Rousche KT, Tuan RS. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2(7):373-82.
  116. Eyre DR. Collagen structure and function in articular cartilage: Metabolic changes in the development of osteoarthritis. In: Kuettner KE, Goldberg VM, editors. *Osteoarthritic Disorders*. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1995. p. 219-29.
  117. Turnay J, Pfannmuller E, Lizarbe MA, Bertling WM, von der Mark K. Collagen binding activity of recombinant and N-terminally modified annexin V (anchorin CII). *J Cell Biochem* 1995;58(2):208-20.

118. Roughley PJ, Lee ER. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech* 1994;28(5):385-97.
119. Kuhne SA, Neidhart M, Everson MP, Hantzschel H, Fine PR, Gay S, et al. Persistent high serum levels of cartilage oligomeric matrix protein in a subgroup of patients with traumatic knee injury. *Rheumatol Int* 1998;18(1):21-5.
120. Di Cesare PE, Carlson CS, Stolerman ES, Hauser N, Tulli H, Paulsson M. Increased degradation and altered tissue distribution of cartilage oligomeric matrix protein in human rheumatoid and osteoarthritic cartilage. *J Orthop Res* 1996;14(6):946-55.
121. Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, Aeschlimann D, Paulsson M, Rosa-Pimentel E, et al. Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J Biol Chem* 1992;267(9):6132-6.
122. Mayne R. Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease? *Arthritis Rheum* 1989;32(3):241-6.
123. Kuettner KE. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* 1992;25(3):155-63.
124. Anderson HC, Chacko S, Abbott J, Holtzer H. The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro. VII. Effects of 5-bromodeoxyuridine and prolonged culturing on fine structure of chondrocytes. *Am J Pathol* 1970;60(2):289-312.
125. Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S. The Loss of Phenotypic Traits by Differentiated Cells in Vitro, I. Dedifferentiation of Cartilage Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1960;46(12):1533-42.
126. Zimmermann DR, Ruoslahti E. Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *Embo J* 1989;8(10):2975-81.
127. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982;30(1):215-24.
128. Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, et al. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res* 1994;212(1):97-104.
129. Guo JF, Jourdain GW, MacCallum DK. Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. *Connect Tissue Res* 1989;19(2-4):277-97.
130. Kuon W, Kuhne M, Busch DH, Atagunduz P, Seipel M, Wu P, et al. Identification of novel human aggrecan T cell epitopes in HLA-B27 transgenic mice associated with spondyloarthritis. *J Immunol* 2004;173(8):4859-66.
131. Brooks JM, Murray RJ, Thomas WA, Kurilla MG, Rickinson AB. Different HLA-B27 subtypes present the same immunodominant Epstein-Barr virus peptide. *J Exp Med* 1993;178(3):879-87.
132. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. A one-letter notation for amino acid sequences. Tentative rules. *Biochem J* 1969;113(1):1-4.
133. Weiss EH, Schliesser G, Botteron C, McMichael A, Riethmuller G, Kievits F, et al. HLA class-I-transgenic mice as model system to study MHC-restricted antigen recognition in man. *Scand J Rheumatol Suppl* 1990;87:91-6.
134. Weiss EH, Bevec D, Messer G, Schwemmle S, Grosshaus C, Steinmetz M, et al. Organization of the AKR Qa region: structure of a divergent class I sequence, Q5k. *J Immunogenet* 1989;16(4-5):283-90.
135. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996;274(5284):94-6.
136. Bowness P, Allen RL, Barclay DN, Jones EY, McMichael AJ. Importance of a conserved TCR J alpha-encoded tyrosine for T cell recognition of an HLA B27/peptide complex. *Eur J Immunol* 1998;28(9):2704-13.
137. Wunsch KH, Miethchen, R., Ehlers, D. Halogenkohlenwasserstoffe. Nucleophile Substitution und beta-Eliminierung. Berlin: Dt. Verlag der Wissenschaften; 1980.
138. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining

- centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968;97:77-89.
139. Timonen T, Saksela E. Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation. *J Immunol Methods* 1980;36(3-4):285-91.
  140. Pelloquin F, Lamelin JP, Lenoir GM. Human B lymphocytes immortalization by Epstein-Barr virus in the presence of cyclosporin A. *In Vitro Cell Dev Biol* 1986;22(12):689-94.
  141. Macey MG, McCarthy DA, Vordermeier S, Newland AC, Brown KA. Effects of cell purification methods on CD11b and L-selectin expression as well as the adherence and activation of leucocytes. *J Immunol Methods* 1995;181(2):211-9.
  142. Koller CA, King GW, Hurtubise PE, Sagone AL, LoBuglio AF. Characterization of glass adherent human mononuclear cells. *J Immunol* 1973;111(5):1610-2.
  143. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179(4):1109-18.
  144. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WC, Groeneveld K, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1997;130(3):388-93.
  145. Hannet I, Erkeller-Yuksel F, Lydyard P, Deneys V, DeBruyere M. Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunol Today* 1992;13(6):215, 218.
  146. Thiel A, Radbruch A. Antigen-specific cytometry. *Arthritis Res* 1999;1(1):25-9.
  147. Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 1998;8(2):177-87.
  148. Hauselmann HJ, Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE, Gitelis SH, Thonar EJ. Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Matrix* 1992;12(2):116-29.
  149. Shakibaei M, De Souza P. Differentiation of mesenchymal limb bud cells to chondrocytes in alginate beads. *Cell Biol Int* 1997;21(2):75-86.
  150. Schulze-Tanzil G, de Souza P, Villegas Castrejon H, John T, Merker HJ, Scheid A, et al. Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res* 2002;308(3):371-9.
  151. Lindl T. *Zell- und Gewebekultur*. Heidelberg, Berlin; 2000.
  152. Goldring MB. Control of collagen synthesis in human chondrocyte cultures by immune interferon and interleukin-1. *J Rheumatol* 1987;14:64-6.
  153. Alsalameh S, Jahn B, Krause A, Kalden JR, Burmester GR. Antigenicity and accessory cell function of human articular chondrocytes. *J Rheumatol* 1991;18(3):414-21.
  154. Brennan FR, Mikecz K, Buzas EI, Glant TT. Interferon-gamma but not granulocyte/macrophage colony-stimulating factor augments proteoglycan presentation by synovial cells and chondrocytes to an autopathogenic T cell hybridoma. *Immunol Lett* 1995;45(1-2):87-91.
  155. Ljunggren G, Anderson DJ. Cytokine induced modulation of MHC class I and class II molecules on human cervical epithelial cells. *J Reprod Immunol* 1998;38(2):123-38.
  156. Keir ME, Stoddart CA, Linqvist-Stepps V, Moreno ME, McCune JM. IFN-alpha secretion by type 2 predendritic cells up-regulates MHC class I in the HIV-1-infected thymus. *J Immunol* 2002;168(1):325-31.
  157. Nguyen VA, Furhapter C, Sepp N. Upregulation of MHC class I molecules on human dermal microvascular endothelial cells by interferon alpha. *Microvasc Res* 2001;62(2):204-7.
  158. Yang I, Kremen TJ, Giovannone AJ, Paik E, Odesa SK, Prins RM, et al. Modulation of major histocompatibility complex Class I molecules and major histocompatibility complex-bound immunogenic peptides induced by interferon-alpha and interferon-

- gamma treatment of human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 2004;100(2):310-9.
159. Cho S, Scharpf S, Franko M, Vermeulen CW. Effect of iso-propyl-thio-beta-D-galactoside concentration on the level of lac-operon induction in steady state *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;128(3):1268-73.
  160. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
  161. Sedmak JJ, Grossberg SE. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem* 1977;79(1-2):544-52.
  162. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
  163. Radbruch A. *Flow Cytometry and Cell Sorting*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag GmbH; 1992.
  164. Kern F, Surel IP, Brock C, Freistedt B, Radtke H, Scheffold A, et al. T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nat Med* 1998;4(8):975-8.
  165. Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM, Maino VC, Picker LJ. Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *J Clin Invest* 1997;99(7):1739-50.
  166. Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, Tamura G, Ikehara Y. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1986;261(24):11398-403.
  167. Pala P, Hussell T, Openshaw PJ. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods* 2000;243(1-2):107-24.
  168. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990;11(2):231-8.
  169. Göttinger CuR, A. *Methoden der Zelltrennung*; 1993.
  170. Goldberg AF, Barka T. Acid phosphatase activity in human blood cells. *Nature* 1962;195:297.
  171. Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 1982;34(3):285-90.
  172. Filgueira L. Fluorescence-based staining for tartrate-resistant acidic phosphatase (TRAP) in osteoclasts combined with other fluorescent dyes and protocols. *J Histochem Cytochem* 2004;52(3):411-4.
  173. Shin SS, Sheibani K, Kezirian J, Nademanee A, Forman SJ, Lee SK, et al. Immunoarchitecture of normal human bone marrow: a study of frozen and fixed tissue sections. *Hum Pathol* 1992;23(6):686-94.
  174. Brown DC, Gatter KC. The bone marrow trephine biopsy: a review of normal histology. *Histopathology* 1993;22(5):411-22.
  175. Appel H, Kuhne M, Spiekermann S, Kohler D, Zacher J, Stein H, et al. Immunohistochemical analysis of hip arthritis in ankylosing spondylitis: evaluation of the bone-cartilage interface and subchondral bone marrow. *Arthritis Rheum* 2006;54(6):1805-13.
  176. Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* 1992;70(6):1035-48.
  177. Appel H, Kuon W, Kuhne M, Wu P, Kuhlmann S, Kollnberger S, et al. Use of HLA-B27 tetramers to identify low-frequency antigen-specific T cells in Chlamydia-triggered reactive arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004;6(6):R521-34.
  178. Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 1999;50(3-4):213-9.
  179. Appel H, Kuon W, Kuhne M, Hulsmeyer M, Kollnberger S, Kuhlmann S, et al. The solvent-inaccessible Cys67 residue of HLA-B27 contributes to T cell recognition of HLA-B27/peptide complexes. *J Immunol* 2004;173(11):6564-73.

180. Atagunduz P, Appel H, Kuon W, Wu P, Thiel A, Kloetzel PM, et al. HLA-B27-restricted CD8+ T cell response to cartilage-derived self peptides in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2005;52(3):892-901.
181. Kuhne M, Erben U, Schulze-Tanzil G, Köhler D, Wu P, Richter J, et al. HLA-B27 restricted antigen presentation by human chondrocytes to CD8+ T cells: Potential contribution to local inflammation in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(6):1635-46.
182. Calin A, Elsworth J. The relationship between pelvic, spinal and hip involvement in ankylosing spondylitis--one disease process or several? *Br J Rheumatol* 1988;27(5):393-5.
183. Sweeney S, Gupta R, Taylor G, Calin A. Total hip arthroplasty in ankylosing spondylitis: outcome in 340 patients. *J Rheumatol* 2001;28(8):1862-6.
184. Bywaters EGL OE. A case of early ankylosing spondylitis with fatal secondary amyloidosis: demonstrated at the Royal Postgraduate Medical School. *Br Med J* 1968;2(5602):412-6.
185. Bollow M, Fischer T, Reisschauer H, Backhaus M, Sieper J, Hamm B, et al. Quantitative analyses of sacroiliac biopsies in spondyloarthropathies: T cells and macrophages predominate in early and active sacroiliitis- cellularity correlates with the degree of enhancement detected by magnetic resonance imaging. *Ann Rheum Dis* 2000;59(2):135-40.
186. Paleolog EM. Angiogenesis: a critical process in the pathogenesis of RA--a role for VEGF? *Br J Rheumatol* 1996;35(10):917-9.
187. Baeten D, Demetter P, Cuvelier C, Van Den Bosch F, Kruithof E, Van Damme N, et al. Comparative study of the synovial histology in rheumatoid arthritis, spondyloarthropathy, and osteoarthritis: influence of disease duration and activity. *Ann Rheum Dis* 2000;59(12):945-53.
188. Baeten D, De Keyser F. The histopathology of spondyloarthropathy. *Curr Mol Med* 2004;4(1):1-12.
189. Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 2003;47(3):149-61.
190. Kim JM, Ho SH, Park EJ, Hahn W, Cho H, Jeong JG, et al. Angiostatin gene transfer as an effective treatment strategy in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46(3):793-801.
191. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, Mackman N, et al. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003;112(5):645-57.
192. Sone H, Kawakami Y, Sakauchi M, Nakamura Y, Takahashi A, Shimano H, et al. Neutralization of vascular endothelial growth factor prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281(2):562-8.
193. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo J* 1991;10(13):4025-31.
194. Redlich K, Hayer S, Maier A, Dunstan CR, Tohidast-Akrad M, Lang S, et al. Tumor necrosis factor alpha-mediated joint destruction is inhibited by targeting osteoclasts with osteoprotegerin. *Arthritis Rheum* 2002;46(3):785-92.
195. Redlich K, Hayer S, Ricci R, David JP, Tohidast-Akrad M, Kollias G, et al. Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. *J Clin Invest* 2002;110(10):1419-27.
196. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93(2):165-76.
197. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-



- inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(7):3597-602.
198. Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, et al. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* 1997;272(40):25190-4.
199. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997;390(6656):175-9.
200. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(7):3540-5.
201. Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;402(6759):304-9.
202. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89(2):309-19.
203. Gravallese EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E, et al. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum* 2000;43(2):250-8.
204. Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T, et al. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43(2):259-69.
205. Crotti TN, Smith MD, Weedon H, Ahern MJ, Findlay DM, Kraan M, et al. Receptor activator NF-kappaB ligand (RANKL) expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathy, osteoarthritis, and from normal patients: semiquantitative and quantitative analysis. *Ann Rheum Dis* 2002;61(12):1047-54.
206. Hanyecz A, Bardos T, Berlo SE, Buzas E, Nesterovitch AB, Mikecz K, et al. Induction of arthritis in SCID mice by T cells specific for the "shared epitope" sequence in the G3 domain of human cartilage proteoglycan. *Arthritis Rheum* 2003;48(10):2959-73.
207. Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem* 2000;275(7):4858-64.
208. Abu-Amer Y, Erdmann J, Alexopoulou L, Kollias G, Ross FP, Teitelbaum SL. Tumor necrosis factor receptors types 1 and 2 differentially regulate osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2000;275(35):27307-10.
209. Maksymowych WP, Jhangri GS, Fitzgerald AA, LeClercq S, Chiu P, Yan A, et al. A six-month randomized, controlled, double-blind, dose-response comparison of intravenous pamidronate (60 mg versus 10 mg) in the treatment of nonsteroidal antiinflammatory drug-refractory ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2002;46(3):766-73.
210. Cruickshank B. Pathology of ankylosing spondylitis. *Bull Rheum Dis* 1960;10:211-4.
211. Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Lowik CW. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 2000;141(5):1667-74.
212. Braun J, Brandt J, Listing J, Zink A, Alten R, Golder W, et al. Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial. *Lancet* 2002;359(9313):1187-93.
213. Gorman JD, Sack KE, Davis JC, Jr. Treatment of ankylosing spondylitis by inhibition of tumor necrosis factor alpha. *N Engl J Med* 2002;346(18):1349-56.

214. Braun J, Landewe R, Hermann KG, Han J, Yan S, Williamson P, et al. Major reduction in spinal inflammation in patients with ankylosing spondylitis after treatment with infliximab: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled magnetic resonance imaging study. *Arthritis Rheum* 2006;54(5):1646-52.
215. Braun J, Bollow M, Neure L, Seipelt E, Seyrekbasan F, Herbst H, et al. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1995;38(4):499-505.
216. Francois RJ, Neure L, Sieper J, Braun J. Immunohistological examination of open sacroiliac biopsies of patients with ankylosing spondylitis: detection of tumour necrosis factor alpha in two patients with early disease and transforming growth factor beta in three more advanced cases. *Ann Rheum Dis* 2006;65(6):713-20.
217. Fischer BA, Mundle S, Cole AA. Tumor necrosis factor-alpha induced DNA cleavage in human articular chondrocytes may involve multiple endonucleolytic activities during apoptosis. *Microsc Res Tech* 2000;50(3):236-42.
218. Aizawa T, Kon T, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Induction of apoptosis in chondrocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Orthop Res* 2001;19(5):785-96.
219. Aigner T, Kim HA. Apoptosis and cellular vitality: issues in osteoarthritic cartilage degeneration. *Arthritis Rheum* 2002;46(8):1986-96.
220. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1996;14:397-440.
221. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 2002;39(1-2):237-46.
222. Malemud CJ, Islam N, Haqqi TM. Pathophysiological mechanisms in osteoarthritis lead to novel therapeutic strategies. *Cells Tissues Organs* 2003;174(1-2):34-48.
223. Blanco Garcia FJ. Catabolic events in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7(3):308-9.
224. Muller RD, John T, Kohl B, Feldner A, Zreiqat H, Ertel W, et al. Cartilage-Specific Matrix and Integrin Expression in Three-Dimensional Articular Chondrocyte Cultures Overexpressing Human Interleukin-10. *Clinical Medicine: Arthritis and Musculoskeletal Disorders* 2008;1:21-32.
225. Beatty PR, Stephens RS. CD8+ T lymphocyte-mediated lysis of Chlamydia-infected L cells using an endogenous antigen pathway. *J Immunol* 1994;153(10):4588-95.
226. Holzthutter HG, Frommel C, Kloetzel PM. A theoretical approach towards the identification of cleavage-determining amino acid motifs of the 20 S proteasome. *J Mol Biol* 1999;286(4):1251-65.
227. Holzthutter HG, Kloetzel PM. A kinetic model of vertebrate 20S proteasome accounting for the generation of major proteolytic fragments from oligomeric peptide substrates. *Biophys J* 2000;79(3):1196-205.
228. Garboczi DN, Hung DT, Wiley DC. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(8):3429-33.
229. Matsui K, Boniface JJ, Reay PA, Schild H, Fazekas de St Groth B, Davis MM. Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science* 1991;254(5039):1788-91.
230. Sykulev Y, Brunmark A, Jackson M, Cohen RJ, Peterson PA, Eisen HN. Kinetics and affinity of reactions between an antigen-specific T cell receptor and peptide-MHC complexes. *Immunity* 1994;1(1):15-22.
231. Corr M, Slanetz AE, Boyd LF, Jelonek MT, Khilko S, al-Ramadi BK, et al. T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity. *Science* 1994;265(5174):946-9.
232. Appel H, Gauthier L, Pyrdol J, Wucherpfennig KW. Kinetics of T-cell receptor binding by bivalent HLA-DR.Pepptide complexes that activate antigen-specific human T-cells. *J Biol Chem* 2000;275(1):312-21.

233. Sourdive DJ, Murali-Krishna K, Altman JD, Zajac AJ, Whitmire JK, Pannetier C, et al. Conserved T cell receptor repertoire in primary and memory CD8 T cell responses to an acute viral infection. *J Exp Med* 1998;188(1):71-82.
234. Bieganowska K, Hollsberg P, Buckle GJ, Lim DG, Greten TF, Schneck J, et al. Direct analysis of viral-specific CD8+ T cells with soluble HLA-A2/Tax11-19 tetramer complexes in patients with human T cell lymphotropic virus-associated myelopathy. *J Immunol* 1999;162(3):1765-71.
235. Gray CM, Lawrence J, Schapiro JM, Altman JD, Winters MA, Crompton M, et al. Frequency of class I HLA-restricted anti-HIV CD8+ T cells in individuals receiving highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Immunol* 1999;162(3):1780-8.
236. Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1999;10(6):673-9.
237. Hernandez J, Lee PP, Davis MM, Sherman LA. The use of HLA A2.1/p53 peptide tetramers to visualize the impact of self tolerance on the TCR repertoire. *J Immunol* 2000;164(2):596-602.
238. Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* 1999;5(6):677-85.
239. Savage P, Millrain M, Dimakou S, Stebbing J, Dyson J. Expansion of CD8+ cytotoxic T cells in vitro and in vivo using MHC class I tetramers. *Tumour Biol* 2007;28(2):70-6.
240. Whelan MA, Archer JR. Chemical reactivity of an HLA-B27 thiol group. *Eur J Immunol* 1993;23(12):3278-85.
241. Weiss GA, Valentekovich RJ, Collins EJ, Garboczi DN, Lane WS, Schreiber SL, et al. Covalent HLA-B27/peptide complex induced by specific recognition of an aziridine mimic of arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(20):10945-8.
242. Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* 1991;353(6342):321-5.
243. Allen RL, O'Callaghan CA, McMichael AJ, Bowness P. Cutting edge: HLA-B27 can form a novel beta 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure. *J Immunol* 1999;162(9):5045-8.
244. Jardetzky TS, Lane WS, Robinson RA, Madden DR, Wiley DC. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 1991;353(6342):326-9.
245. Colbert RA, Rowland-Jones SL, McMichael AJ, Frelinger JA. Allele-specific B pocket transplant in class I major histocompatibility complex protein changes requirement for anchor residue at P2 of peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(14):6879-83.
246. el-Zaatari FA, Sams KC, Taurog JD. In vitro mutagenesis of HLA-B27. Amino acid substitutions at position 67 disrupt anti-B27 monoclonal antibody binding in direct relation to the size of the substituted side chain. *J Immunol* 1990;144(4):1512-7.
247. Kingsley G, Sieper J. Third International Workshop on Reactive Arthritis. 23-26 September 1995, Berlin, Germany. Report and abstracts. *Ann Rheum Dis* 1996;55(8):564-84.
248. Hermann E, Yu DT, Meyer zum Buschenfelde KH, Fleischer B. HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet* 1993;342(8872):646-50.
249. Benjamin R, Parham P. Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol Today* 1990;11(4):137-42.
250. Ugrinovic S, Mertz A, Wu P, Braun J, Sieper J. A single nonamer from the Yersinia 60-kDa heat shock protein is the target of HLA-B27-restricted CTL response in Yersinia-induced reactive arthritis. *J Immunol* 1997;159(11):5715-23.

251. Ojcius DM, Bravo de Alba Y, Kanellopoulos JM, Hawkins RA, Kelly KA, Rank RG, et al. Internalization of Chlamydia by dendritic cells and stimulation of Chlamydia-specific T cells. *J Immunol* 1998;160(3):1297-303.
252. Moll H. Dendritic cells and host resistance to infection. *Cell Microbiol* 2003;5(8):493-500.
253. Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, et al. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: Chlamydia trachomatis. *Science* 1998;282(5389):754-9.
254. Hemmer B, Gran B, Zhao Y, Marques A, Pascal J, Tzou A, et al. Identification of candidate T-cell epitopes and molecular mimics in chronic Lyme disease. *Nat Med* 1999;5(12):1375-82.
255. Fiorillo MT, Maragno M, Butler R, Dupuis ML, Sorrentino R. CD8(+) T-cell autoreactivity to an HLA-B27-restricted self-epitope correlates with ankylosing spondylitis. *J Clin Invest* 2000;106(1):47-53.
256. Hulsmeier M, Fiorillo MT, Bettosini F, Sorrentino R, Saenger W, Ziegler A, et al. Dual, HLA-B27 Subtype-dependent Conformation of a Self-peptide. *J Exp Med* 2004;199(2):271-281.
257. Mikecz K, Glant TT, Poole AR. Immunity to cartilage proteoglycans in BALB/c mice with progressive polyarthritis and ankylosing spondylitis induced by injection of human cartilage proteoglycan. *Arthritis Rheum* 1987;30(3):306-18.
258. Leroux JY, Guerassimov A, Cartman A, Delaunay N, Webber C, Rosenberg LC, et al. Immunity to the G1 globular domain of the cartilage proteoglycan aggrecan can induce inflammatory erosive polyarthritis and spondylitis in BALB/c mice but immunity to G1 is inhibited by covalently bound keratan sulfate in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1996;97(3):621-32.
259. Shi S, Ciurli C, Cartman A, Pidoux I, Poole AR, Zhang Y. Experimental immunity to the G1 domain of the proteoglycan versican induces spondylitis and sacroiliitis, of a kind seen in human spondylarthropathies. *Arthritis Rheum* 2003;48(10):2903-15.
260. Zhang Y, Guerassimov A, Leroux JY, Cartman A, Webber C, Lalic R, et al. Arthritis induced by proteoglycan aggrecan G1 domain in BALB/c mice. Evidence for t cell involvement and the immunosuppressive influence of keratan sulfate on recognition of t and b cell epitopes. *J Clin Invest* 1998;101(8):1678-86.
261. Reinelt S, Dedier S, Asuni G, Folkers G, Rognan D. Mutation of Cys-67 alters the thermodynamic stability of the human leukocyte antigen HLA0-B\*2705. *J Biol Chem* 2001;276(21):18472-7.
262. Alvarez I, Marti M, Vazquez J, Camafeita E, Ogueta S, Lopez de Castro JA. The Cys-67 residue of HLA-B27 influences cell surface stability, peptide specificity, and T-cell antigen presentation. *J Biol Chem* 2001;276(52):48740-7.
263. Howell MD, Austin RK, Kelleher D, Nepom GT, Kagnoff MF. An HLA-D region restriction fragment length polymorphism associated with celiac disease. *J Exp Med* 1986;164(1):333-8.
264. Sollid LM. Celiac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* 2002;2(9):647-55.
265. Papadopoulos GK, Wijmenga C, Koning F. Interplay between genetics and the environment in the development of celiac disease: perspectives for a healthy life. *J Clin Invest* 2001;108(9):1261-6.
266. Dickinson AM, Wang XN, Sviland L, Vyth-Dreese FA, Jackson GH, Schumacher TN, et al. In situ dissection of the graft-versus-host activities of cytotoxic T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Nat Med* 2002;8(4):410-4.
267. Haanen JB, van Oijen MG, Tirion F, Oomen LC, Kruisbeek AM, Vyth-Dreese FA, et al. In situ detection of virus- and tumor-specific T-cell immunity. *Nat Med* 2000;6(9):1056-60.
268. Skinner PJ, Daniels MA, Schmidt CS, Jameson SC, Haase AT. Cutting edge: In situ tetramer staining of antigen-specific T cells in tissues. *J Immunol* 2000;165(2):613-7.

269. Skinner PJ, Haase AT. In situ tetramer staining. *J Immunol Methods* 2002;268(1):29-34.
270. McGavern DB, Christen U, Oldstone MB. Molecular anatomy of antigen-specific CD8(+) T cell engagement and synapse formation in vivo. *Nat Immunol* 2002;3(10):918-25.
271. Maeda A, Kurosaki M, Ono M, Takai T, Kurosaki T. Requirement of SH2-containing protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 for paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B)-mediated inhibitory signal. *J Exp Med* 1998;187(8):1355-60.
272. Kubagawa H, Chen CC, Ho LH, Shimada TS, Gartland L, Mashburn C, et al. Biochemical nature and cellular distribution of the paired immunoglobulin-like receptors, PIR-A and PIR-B. *J Exp Med* 1999;189(2):309-18.
273. Zou J, Zhang Y, Thiel A, Rudwaleit M, Shi SL, Radbruch A, et al. Predominant cellular immune response to the cartilage autoantigenic G1 aggrecan in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42(7):846-55.
274. Zou J, Appel H, Rudwaleit M, Thiel A, Sieper J. Analysis of the CD8+ T cell response to the G1 domain of aggrecan in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2005;64(5):722-9.
275. Guerassimov A, Zhang Y, Banerjee S, Cartman A, Webber C, Esdaile J, et al. Autoimmunity to cartilage link protein in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 1998;25(8):1480-4.
276. Thiel A, Wu P, Lauster R, Braun J, Radbruch A, Sieper J. Analysis of the antigen-specific T cell response in reactive arthritis by flow cytometry. *Arthritis Rheum* 2000;43(12):2834-42.
277. Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991;351(6324):290-6.
278. Madden DR. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 1995;13:587-622.
279. Reizis B, Schild H, Stefanovic S, Mor F, Rammensee H, Cohen IR. Peptide binding motifs of the MHC class I molecules (RT1.A1) of the Lewis rat. *Immunogenetics* 1997;45(4):278-9.
280. Thorpe CJ, Moss DS, Powis SJ, Howard JC, Butcher GW, Travers PJ. An analysis of the antigen binding site of RT1.Aa suggests an allele-specific motif. *Immunogenetics* 1995;41(5):329-31.
281. Cohen ES, Bodmer HC. Cytotoxic T lymphocytes recognize and lyse chondrocytes under inflammatory, but not non-inflammatory conditions. *Immunology* 2003;109(1):8-14.
282. Reynolds WM, Evans PR, Lane AC, Howell WM, Wilson PJ, Wong R, et al. Automated HLA-B27 testing using the FACSPrep/FACScan system. *Cytometry* 1994;18(2):109-15.
283. Little AM, Domena JD, Hildebrand WH, Shen SY, Barber LD, Marsh SG, et al. HLA-B67: a member of the HLA-B16 family that expresses the ME1 epitope. *Tissue Antigens* 1994;43(1):38-43.
284. Tiku ML, Liu S, Weaver CW, Teodorescu M, Skosey JL. Class II histocompatibility antigen-mediated immunologic function of normal articular chondrocytes. *J Immunol* 1985;135(5):2923-8.
285. Busche K, Schlesier M, Runge M, Binder A, Kirchhoff H. T cell lines responding to *Mycoplasma arthritidis* and chondrocytes in the *Mycoplasma arthritidis* infection of rats. *Immunobiology* 1990;181(4-5):398-405.
286. Gertzbein SD, Lance EM. The stimulation of lymphocytes by chondrocytes in mixed cultures. *Clin Exp Immunol* 1976;24(1):102-9.
287. Bujia J, Alsalameh S, Sittlinger M, Hammer C, Wilmes E, Burmester G. Antigen presenting cell function of class II positive human nasal chondrocytes. *Acta Otolaryngol* 1994;114(1):75-9.

288. Davies ME, Horner A, Franz B. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and MHC class II on chondrocytes in arthritic joints from pigs experimentally infected with *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994;9(4):265-72.
289. Summers KL, O'Donnell JL, Hoy MS, Peart M, Dekker J, Rothwell A, et al. Monocyte-macrophage antigen expression on chondrocytes. *J Rheumatol* 1995;22(7):1326-34.
290. Brennan FR, Mikecz K, Buzas EI, Ragasa D, Cs-Szabo G, Negroiu G, et al. Antigen-specific B cells present cartilage proteoglycan (aggrecan) to an autoreactive T cell hybridoma derived from a mouse with proteoglycan-induced arthritis. *Clin Exp Immunol* 1995;101(3):414-21.
291. Chan VS, Cohen ES, Weissensteiner T, Cheah KS, Bodmer HC. Chondrocyte antigen expression, immune response and susceptibility to arthritis. *Int Immunol* 2001;13(4):421-9.
292. Savinov AY, Wong FS, Stonebraker AC, Chervonsky AV. Presentation of antigen by endothelial cells and chemoattraction are required for homing of insulin-specific CD8+ T cells. *J Exp Med* 2003;197(5):643-56.
293. Valitutti S, Muller S, Dessing M, Lanzavecchia A. Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J Exp Med* 1996;183(4):1917-21.
294. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krahenbuhl O, Tschopp J, et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* 1991;173(5):1099-109.
295. Kuckelkorn U, Ruppert T, Strehl B, Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Lamer S, et al. Link between organ-specific antigen processing by 20S proteasomes and CD8(+) T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med* 2002;195(8):983-90.
296. Mack CL, Vanderlugt-Castaneda CL, Neville KL, Miller SD. Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003;144(1-2):68-79.
297. Fan L, Busser BW, Lifsted TQ, Oukka M, Lo D, Laufer TM. Antigen presentation by keratinocytes directs autoimmune skin disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(6):3386-91.
298. McGonagle D, Emery P. Enthesitis, osteitis, microbes, biomechanics, and immune reactivity in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 2000;27(10):2302-4.

## 7 Anhang

Peptide aus humanen Knorpelproteinen

<i>Herkunft</i>	<i>Name</i>	<i>Sequenz<sup>&amp;</sup></i>	<i>Bindungs- score</i>	<i>Pool</i>
<b>Aggrecan</b> P16112*	#K1	R R L Q K R S S R	31	2
	#K2	L R Y P I V T P R	27	3
	#K3	L R V L L G T S L	26	5
	#K4	V R Y P I H T P R	26	5
	#K5	V R Y P I V S P R	26	5
	#K6	R R C R E Q Q S H	26	5
	#K7	R R S R P S T A H	26	5
	#K8	V R Y P I S K A R	25	8
	#K9	K R S S R H P R R	25	8
<b>Anchorin</b> NP 001145 <sup>‡</sup>	#K10	G R D L L D D L K	26	5
	#K11	S R L Y D A Y E L	25	8
<b>Asporin</b> Q9BXN1*	#K12	L R I H E N K V K	25	8
<b>CMP</b> P21941*	#K13	M R V L S G T S L	26	5
	#K14	T R K L E A V S K	25	8
<b>COMP</b> P49747*	#K15	V R F Y E G P E L	26	5
	#K16	V R T G L P S V R	25	9
<b>Fibronectin</b> P02751*	#K17	Y R I G D Q W D K	27	3
	#K18	E R D A P I V N K	27	3
	#K19	Y R I G D T W S K	26	5
	#K20	G R G E W K C E R	26	5
	#K21	A R I T G Y I I K	26	6
	#K22	Y R V G D T Y E R	25	9
	#K23	G R K Y I V N V Y	25	9
	#K24	Y R L T V G L T R	25	9
	#K25	V R S Y T I T G L	25	9
<b>Link-Protein</b> P10915*	#K26	V R F V G F P D K	26	6
	#K27	V R Y P I S R P R	25	9
<b>Versican</b> P13611*	#K28	R R T W D A A E R	27	3
	#K29	S R E I V I S E R	26	6
	#K30	V R Y P I R A P R	25	9
	#K31	S R Q E V N P V R	25	9
<b>Kollagen Typ I A1</b> P02452*	#K32	I R A E G N S R F	28	11
	#K33	G R D G S P G A K	26	6
	#K34	I R S P E G S R K	26	6

<b>Kollagen Typ I A2</b> P08123*	#K35	G	R	D	G	Q	P	G	H	K	25	9
<b>Kollagen Typ II A1</b> P02458*	#K36	I	R	A	E	G	N	S	R	F	28	11
	#K37	G	R	D	G	A	A	G	V	K	27	3
	#K38	I	R	L	G	A	P	Q	S	L	26	6
	#K39	I	R	S	P	E	G	S	R	K	26	6
<b>Kollagen Typ III A1</b> P02461*	#K40	G	R	P	G	R	P	G	E	R	26	6
	#K41	G	R	D	G	S	P	G	G	K	26	6
	#K42	A	R	N	C	R	D	L	K	F	25	9
<b>Kollagen Typ V A1</b> P20908*	#K43	G	R	A	G	S	D	G	A	R	27	3
	#K44	G	R	Q	G	E	K	G	A	K	27	3
	#K45	R	R	N	I	D	A	S	Q	L	27	4
	#K46	G	R	S	G	P	P	G	P	K	26	6
	#K47	A	R	T	C	K	D	L	Q	L	25	10
<b>Kollagen Typ V A2</b> P05997*	#K48	G	R	D	G	A	V	G	E	R	27	4
	#K49	A	R	T	C	D	D	L	K	L	25	10
<b>Kollagen Typ V A3</b> P25940*	#K50	G	R	K	K	G	R	G	R	K	29	2
	#K51	R	R	P	P	G	T	A	E	R	29	3
	#K52	G	R	K	G	K	G	R	K	K	28	11
	#K53	R	R	K	G	K	G	K	G	R	27	4
	#K54	G	R	E	G	E	K	G	A	K	27	4
	#K55	G	R	V	G	P	E	G	L	R	27	4
	#K56	G	R	P	G	A	D	G	A	R	26	7
	#K57	G	R	P	G	H	P	G	Q	R	26	7
	#K58	G	R	R	G	P	P	G	L	F	26	7
	#K59	G	R	E	G	R	E	G	E	K	26	7
	#K60	G	R	T	G	P	M	G	A	R	26	7
<b>Kollagen Typ VI A1</b> P12109*	#K61	G	R	P	G	L	S	L	V	K	29	3
<b>Kollagen Typ VI A2</b> P12110*	#K62	R	R	F	V	E	Q	V	A	R	31	2
	#K63	A	R	E	E	G	I	R	L	F	27	4
	#K64	G	R	R	D	G	P	G	T	K	26	7
	#K65	D	R	L	I	K	E	S	R	R	26	7
	#K66	E	R	L	G	E	Q	N	F	H	26	7
	#K67	A	R	R	L	T	L	A	R	R	26	7
	#K68	D	R	S	K	G	T	V	H	F	25	10
	#K69	N	R	I	I	K	V	M	K	H	25	10
<b>Kollagen Typ VI A3</b> P12111*	#K70	G	R	T	G	P	L	G	R	K	29	3
	#K71	I	R	Y	G	V	V	A	L	K	28	11
	#K72	G	R	R	G	K	K	G	E	R	28	11
	#K73	R	R	D	S	F	Q	E	V	L	27	4



	#K74	I R F A D S K R K	27	4
	#K75	G R R G D K G P R	26	7
	#K76	G R R G P P G A K	26	8
	#K77	K R E V I T A V R	25	10
	#K78	S R F D E H Q S K	25	10
	#K79	V R N P S V V V K	25	10
	#K80	K R K S V L L D K	25	10
<b>Kollagen Typ IX A1</b>	#K81	Q R V V G S A T L	26	8
P20849*	#K82	N R I E S L P I K	26	8
	#K83	F R M T G S T L K	25	10
<b>Kollagen Typ IX A2</b>	#K84	G R P G T I Q S L	28	11
P12108*				
<b>Kollagen Typ IX A3</b>	#K85	G R A G S K G E K	28	11
P32017*	#K86	G R D G P P G P K	26	8
<b>Kollagen Typ XI A1</b>	#K87	G R Q G E K G A G	27	4
P12107*	#K88	K R G K L L S Y L	27	4
	#K89	G R P G A D G G R	26	8
	#K90	A R T C K D L Q L	25	10
<b>Biglycan</b>	#K91	L R Y S K L Y R L	10000	Einzel
P21810*	#K92	I R M I E N G S L	2000	1
	#K93	L R V V Q L S D L	2000	1
(10mer)	#K94	K R A Y Y N G I S L	6000	Einzel
<b>Fibromodulin</b>	#K95	L R H L E R L Y L	2000	1
Q06828*	#K96	M R G L R S L I L	2000	1
	#K97	L R S L I L L D L	2000	1

\*Sequenzangaben im Einbuchstaben-Code nach IUPAC-IUB-Vereinbarungen (1969)

\*Datenbankregistrierungsnummer aus *Swiss-Prot protein sequence database* (<http://uniprot.org>)

‡Datenbankregistrierungsnummer aus *NIH protein sequence database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)

## 8 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bezeichnung</b>
$\beta_2$ M	$\beta_2$ -Mikroglobulin
APC	Antigenpräsentierende Zelle
AS	Ankylosierende Spondylitis
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CMP	<i>Cartilage matrix protein</i>
COMP	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
Cys67	Cystein an Position 67 der schweren Kette von HLA-B27
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
EBNA <sub>258-266</sub>	Peptid mit den Aminosäureresten 258-266 (RRIYDLIEL) aus dem nukleären Antigen 3C
EBV	Epstein-Barr-Virus
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HE	Hämatoxilin-Eosin
HLA	humanes Leukozytenantigen
HLA-I	HLA-Klasse-I
HLA-II	HLA-Klasse-II
HPF	<i>High Power Field</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
K	Knorpel
KM	Knochenmark
LSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
MACS	Magnet-aktivierte Zellsortierung
MCTC	Gemischte Chondrozyten/T-Zell-Kulturen
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
n.s.	nicht signifikant
OA	Osteoarthritis
OD	Optische Dichte
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm und einem Messweg von 1 cm
OPG	Osteoprogenitorin

OVA	Ova-Albumin
PALS	periarteriolare lymphatische Scheide
PBMNC	Periphere mononukleäre Zellen
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridininchlorophyll-Proteinkomplex
PIR	<i>Paired like Ig</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
RANK	<i>Receptor Activator of NF-<math>\kappa</math>B</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-<math>\kappa</math>B Ligand</i>
ReA	Reaktive Arthritis
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
Ser67	Serin an Position 67 der schweren Kette von HLA-B27
SF	Synovialflüssigkeit
SFMNC	mononukleäre Zellen aus der Synovialflüssigkeit
SpA	Spondyloarthritis
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAP	Tartrat-resistente Saure Phosphatase
ün	über Nacht
UOA	Undifferenzierte Oligoarthritis
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

---