

Kapitel 2

Immunologische Grundlagen

2.1 Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine entzündliche Erkrankung der Gelenkinnenhaut (Synovia), die zur Erosion, Fehlstellung und Destruktion führt. Sie betrifft besonders Frauen (Verhältnis von Frauen zu Männern = 3:1) und beginnt überwiegend im jungen oder mittleren Erwachsenenalter. Die Prävalenz wird auf 1-3% der Bevölkerung geschätzt. Die Erkrankung beginnt oft in den kleinen Gelenken von Händen und Füßen, bevorzugt in den Metakarpophalangealgelenken. Zu Beginn der Erkrankung stehen Schmerz, Schwellung und Bewegungseinschränkung der betroffenen Gelenke, die besonders nach Ruhephasen ausgeprägt sind (Morgensteifigkeit), im Vordergrund. Später sind auch proximale Gelenke betroffen, oft mit symmetrischem Befall. Extraartikuläre Manifestationen dieser Erkrankung, die sich in Form einer fibrosierenden Alveolitis, einer Vaskulitis der Haut, Nerven und Augen äußern, sind bei aggressiveren Verlaufsformen zu finden (Klinische Immunologie J. Borstoff et al., 1991). Da im Falle einer Lungenfibrose mit einer Fünfjahresüberlebensrate von nur 50% gerechnet werden kann, wird deutlich, welche immense Bedeutung effektive Therapieansätze haben. Aufgrund der systemischen Manifestation der Erkrankung, ist eine Untersuchung der lymphoiden Zellen des peripheren Blutes an Stelle der Synovialzellen gerechtfertigt und zudem weniger belastend für den Patienten. Um die immunologischen Vorgänge, die für die Pathogenese der RA wichtig sein könnten, zu verstehen, wird im folgenden kurz auf die Grundlagen eingegangen.

2. 2 Funktion des Immunsystems

Auf den Körper wirken aus der Umwelt eine große Anzahl von infektiösen und schädigenden Einflüssen (Viren, Bakterien, Parasiten und deren Toxine) ein, deren ungebremste Vermehrung pathologische Folgen für das Individuum haben kann. Deshalb hat sich im Laufe der Evolution ein effektives Abwehrsystem entwickelt, das den eigenen Organismus vor oben genannten Einflüssen schützt, indem es in der Lage ist, zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden und letztere zu bekämpfen.

Die beiden funktionellen Untereinheiten des Immunsystems, das angeborene und das erworbene System, arbeiten synergistisch zusammen. Zu den angeborenen Abwehrmechanismen werden zelluläre Abwehrmechanismen wie u.a. Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen, Antikörper und Komplementfaktoren gezählt. Das spezifische Immunsystem hat die Aufgabe, sowohl die extrazellulären als auch körperfremde intrazelluläre Strukturen zu bekämpfen. Aus dieser Tatsache heraus haben sich zwei Mechanismen der Antigenerkennung entwickelt:

Antikörper, die von B-Lymphozyten gebildet werden, erkennen extrazelluläre vollständige Antigene. T-Lymphozyten können dagegen Peptidfragmente erkennen, die phagozytiert und anschließend auf den Oberflächen von Körperzellen präsentiert werden. Dies entspricht der früher gebräuchlichen Einteilung in humorale und zellvermittelte Immunantwort.

Während die Antikörper grundsätzlich nur vollständige Antigene erkennen, sind für den T-Zellrezeptor Peptidfragmente der intrazellulären Pathogene ausreichend. Diese müssen allerdings mit Hilfe der Haupthistokompatibilitäts (MHC)-Moleküle auf der Oberfläche der infizierten Zelle präsentiert werden. An den meisten Immunantworten sind sowohl T- als auch B-Zellen beteiligt.

Sehr viele Informationen im Immunsystem werden wahrscheinlich nicht über direkten Zellkontakt, sondern über Botenstoffe, die sogenannten Zytokine, vermittelt. Diese bilden eine heterogene Gruppe, die von vielen unterschiedlichen Zellen gebildet wird. Eine wichtige Position nehmen die Interferone und Interleukine ein.

Die Interleukine dienen dem Signalaustausch der Leukozyten untereinander. Sie vermitteln Aktivierungs-, Proliferations- und Differenzierungsinformationen.

2.3 T-Helfer Zellen

Man unterscheidet zwei Hauptgruppen von T-Zellen: Die CD8⁺ T-Zellen erkennen Antigenpeptide in Assoziation mit MHC-Klasse-I-Molekülen. Ihre hauptsächliche Funktion beruht auf der Erkennung und Vernichtung virusinfizierter Zellen und Tumorzellen. Die CD4⁺ T-Zellen besitzen eine Vielzahl von Funktionen bei der Kontrolle der Immunantwort. Sie sind bei der Initiation der humoralen Immunantwort durch Zytokinproduktion direkt beteiligt und erkennen Antigenfragmente, die mit MHC-Klasse-II-Molekülen assoziiert sind. Die Antigene werden von antigenpräsentierenden Zellen (APC) phagozytiert, anschließend prozessiert und als Peptidfragment zusammen mit MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Oberfläche präsentiert.

Für den Informationsfluß von der Zelloberfläche zum Zellkern spielen der CD4-Rezeptor und der CD3-Rezeptor, den alle T-Zellen exprimieren, eine entscheidende Rolle. Der CD3-Rezeptor und der CD4-Rezeptor haben beide die Aufgabe, die Bindung zwischen T-Zell-Rezeptor (TCR) und MHC-Komplex zu stabilisieren. Ihre intrazellulären Domänen sind assoziiert mit spezifischen Enzymen, die die Signaltransduktion erst ermöglichen und schließlich zur Steigerung der DNA-Transkriptionsrate im Nukleus führen (Basic Immunology: J. Sharon 1998).

Allerdings sind zur Aktivierung der T-Zelle neben der Bindung des TCR noch weitere costimulatorische Signale nötig. Die Bindung zwischen TCR und MHC-Komplex führt zur verstärkten Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle auf den Oberflächen der T-Zelle und der APC. Das CD28-Molekül auf der Zelloberfläche der T-Zellen tritt mit dem membranständigen Rezeptor B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) der APC in Interaktion. Zur vollständigen Aktivierung der CD4⁺ Th-Zelle ist B7 als wichtigstes Costimulationssignal essentiell. Nach der Aktivierung wechselt die naive, antigenunerfahrene Th-Zelle aus der G₀-Phase des Zellzyklus in die G₁-Phase mit folgender DNA-Synthese, Mitose und Proliferation. Im Zuge der

Proliferation differenzieren sich die Zellen zu den morphologisch deutlich größeren Blasten aus, die nun die Funktionen von Effektorzellen einnehmen.

Die Aktivierung der CD4⁺ Th-Zelle bewirkt, daß die Zelle sowohl das Zytokin Interleukin 2 (IL-2) sezerniert, als auch den IL-2-Rezeptor verstärkt auf der Oberfläche exprimiert. IL-2 wirkt als autokriner Wachstumsfaktor auf die Zelle selbst, beeinflusst aber u. a. auch B-Zellen und NK-Zellen. In vielen *in vitro*-Systemen wird die *in vivo* Stimulationssituation der Th-Zellen durch die Anwesenheit spezifischer Antikörper, die eine Vernetzung des CD3-Rezeptors mit dem CD28- Molekül induzieren, nachgeahmt. Die Proliferation der so aktivierten T-Zellen wird durch die Anwesenheit von exogenem IL-2 verstärkt.

Die Th-Zellen wurden anhand der Zytokine, die sie sezernieren, in zwei Untergruppen eingeteilt, die bereits 1986 von T. Mosman und R. Coffman auf Grund von Beobachtungen am Mausmodell beschrieben wurden (Mosman et al., 1986). Diese beiden Untergruppen wurden auch für humane T-Helferzellen gefunden (Romagnani, 1991). Die sogenannten Th1-Zellen zeichnen sich dadurch aus, daß die Zellen nach der Aktivierung vor allem proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ sezernieren, wohingegen die Th2-Zellen durch die antiinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 charakterisiert sind. Bevor sich die aktivierte Zelle in die eine oder andere Richtung entwickelt, sezerniert sie, wie bereits beschrieben, als erstes Zytokin IL-2.

Die proinflammatorischen Zytokine bewirken eine verstärkte Expression der MHC- und B7-1 Moleküle auf Makrophagen. Man kann davon ausgehen, daß die Aktivierung von Th1-Zellen zu einer zellvermittelten Immunantwort führt, die mit inflammatorischen Prozessen verbunden ist. Das Th2-Zytokinmuster bewirkt dagegen eine humorale Immunantwort. Die Th1- und Th2-Zytokine verstärken jeweils ihre eigene Expression, bewirken damit eine Polarisierung und inhibieren zum Teil die Effekte der jeweils anderen Gruppe (Mosemann et al., 1991).

Damit sich *in vitro* Kulturen eine naive Th-Zelle zu einer Th1- oder Th2-Zelle differenziert, sind Signale zusätzlich zu den Wachstumssignalen CD3/CD28 unerlässlich. IL-12 wurde als wichtigster Induktor für eine Th1-Differenzierung

beschrieben (Gajewski et al., 1988). IL-12 wird von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen produziert. IFN- γ unterstützt ebenfalls die Th1-Polarisierung durch Verstärkung der IL-12 Sekretion der Makrophagen (Trinchieri et al., 1993). IL-4 als Th2-Zytokin wirkt selbst als potentester Polarisator für die Differenzierung zu antiinflammatorischen Effektorzellen (Demeure et al., 1994; Swain et al., 1990). Welche zusätzlichen Signale bei der Th1/Th2-Differenzierung noch entscheidend sein könnten, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Erwähnung finden u.a. die Intensität der TCR-Ligation (Carballido et al., 1997), der APC-Typ (Croft et al., 1992) und costimulatorische Signale (Rulifson et al., 1997; Kim et al., 1998).

Die Polarisierung von naiven Th-Zellen in Th1-Richtung ist bereits nach drei bis vier Tagen in Kultur nachweisbar, während die Th2-Polarisierung mindestens sechs Tage benötigt (Sornasse et al., 1996). Die Th1- und Th2-Zytokinmuster wurden auch für andere Zellen beschrieben, wie u.a. für CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen, so daß in der Literatur auch die Bezeichnung Typ I- (Th1-like) und Typ II- (Th2-like) Zytokine zu finden ist.

Ein Ungleichgewicht zwischen den antiinflammatorischen und proinflammatorischen Zytokinen wird für die Entstehung und Persistenz von einigen Autoimmunerkrankungen, chronischen Entzündungen und Allergien mit verantwortlich gemacht (Lucey et al., 1996). Eine erhöhte Th2-Aktivität fand man in Kombination mit kutanen Hypersensitivitätsreaktionen (Kay et al., 1991) oder bei Atopikern assoziiert mit erhöhten IgE-Spiegeln und einer Eosinophilie (Parronchi et al., 1992). Eine Dominanz der Th1-Zytokine wurde für verschiedene Arthritiden beschrieben, z. B. bei der Lyme Arthritis (Yssel et al., 1991; Yin et al., 1997) oder der rheumatoiden Arthritis (Yin et al., 1999).

2.4 Naive und antigenerfahrene Th-Zellen:

Der erste Kontakt mit dem fremden Antigen während der primären Immunantwort erzeugt ein antigenspezifisches „Gedächtnis“. Eine Reexposition des Antigens führt zur schnelleren, stärkeren und länger andauernden, sekundären Immunantwort.

Dieses T-Zellgedächtnis entsteht während der Phase der antigenspezifischen Aktivierung von naiven T-Zellen. Zur Unterscheidung der beiden Subpopulationen wird klassischer Weise der von humanen CD4⁺ Th-Zellen oberflächlich exprimierte CD45-Rezeptor herangezogen. Das CD45-Molekül wird aber auf allen Lymphozyten exprimiert, ist also kein Unterscheidungskriterium per se. Naive Th-Zellen sind durch die Isoform CD45RA⁺ gekennzeichnet, während die antigenerfahrene aktivierte Zelle die Isoform CD45RO⁺ auf ihrer Oberfläche trägt. Allerdings unterscheiden sich naive und erfahrene Th-Zellen nicht nur hinsichtlich ihres CD45-Moleküls. Die antigenerfahrenen Th-Zellen exprimieren zusätzlich verstärkt die Oberflächenmarker CD2 (LFA-2) und CD11a/CD18 (LFA-1) (Sanders et al., 1988). Daraus resultiert eine verstärkte Interaktion mit der APC und eine deutlich niedrigere Aktivierungsschwelle.

Während der Konversion beginnt die stimulierte CD45RA⁺ Th-Zelle den CD45RA⁺ Rezeptor allmählich zu verlieren und den CD45RO⁺ Rezeptor zu exprimieren. Eine Übergangsfraction exprimiert beide Isoformen (Akbar et al., 1988). Die Anwesenheit von IL-2 scheint dabei die Konversion von CD45RA⁺ CD45RO⁻ in CD45RO⁺ CD45RA⁻ Th-Zellen zu unterstützen (Roth et al., 1994).

Unterschiede zwischen naiven und antigenerfahrenen Th-Zellen lassen sich auch auf der Zytokinebene feststellen. Nach antigener *in vitro* Stimulation produzieren naive Th-Zellen ausschließlich IL-2, wohingegen die antigenerfahrenen Zellen zusätzlich Effektorzytokine wie IL-4, IL-5 und IFN- γ produzieren können (Weinberg et al., 1990).

Sehr lange war man der Ansicht, daß es sich bei der Konversion der CD45RA⁺ Th-Zellen in CD45RO⁺ Zellen um einen unidirektionalen Prozeß handelt. Dies wird seit einiger Zeit stark in Frage gestellt. Die *in vivo* Analysen von Bell und Sparshot präferieren eine bidirektionale Konversion der beiden Isoformen (Bell and Sparshot 1990, Lightstone et al., 1992). Eine Reexpression des CD45RA-Moleküls wurde bei mit PMA/Ionomycin restimulierten CD4⁺ Th-Zellen beobachtet (Brod et al., 1989). Ergebnisse von Hamann deuten darauf hin, daß es zu einer phänotypischen Konversion von ehemaligen CD45RO-Zellen zur CD45RA-Isoform kommen kann (Hamann et al., 1996). Auch eine zyklische Regulation der beiden Isoformen wurde beschrieben (Rothstein et al., 1989). Zusätzlich eignet sich zur Unterscheidung von

naiven und antigenerfahrenen Th-Zellen auch das Oberflächenmolekül CD31 (PECAM-1, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1), das auf Endothelialzellen, verschiedenen Leukozyten und Thrombozyten exprimiert wird (Torimoto et al., 1992). Vorzugsweise, aber nicht ausschließlich, prägt die CD4⁺ CD45RA⁺ Th-Zellsubpopulation dieses Merkmal aus (De Lisser et al., 1994; Tanaka et al., 1992). Mit Hilfe eines anti-CD31-mAK konnte A. Thiel zeigen, daß sich die CD4⁺ CD45RA⁺ Subpopulation ihrerseits in eine CD31⁺ und eine CD31⁻ Population aufteilen läßt. Innerhalb der CD31⁻ Fraktion gelang es nach polyklonaler Stimulation einen signifikanten Anteil von IFN- γ positiven Zellen nachzuweisen, während die CD31⁺ Th-Zellen nach der Stimulation, wie für naive Zellen auch angenommen, keinen nennenswerten Anteil an IFN- γ Produzenten aufwiesen. (Thiel et al., 1997). Es scheint sich bei der CD4⁺ CD45RA⁺ Fraktion also nicht um eine homogene Zellpopulation zu handeln.

2.5 Die Rolle der CD4⁺ Th-Zellen in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis

Erstmals wurde 1975 von van Boxel und seiner Arbeitsgruppe eine Infiltration der Synovia mit T-Zellen beschrieben (Boxel et al., 1975). Diese Beobachtung wurde von vielen anderen Arbeitsgruppen in der folgenden Zeit bestätigt, denen zusätzlich der Nachweis gelang, daß es sich bei den T-Zellaggregaten vorwiegend um aktivierte CD4⁺ Th-Zellen handelt (Janossy et al., 1981; Cush et Lipsky.,1988). Es wurde diskutiert, ob die Autoimmunprozesse bei der RA durch eine Immunreaktion, die sich initial gegen einen mikrobiellen Erreger richtet, in einer genetisch prädisponierten Person ausgelöst wird (Paliard et al., 1991; Alm et al., 1996). Dies konnte jedoch bis heute nicht eindeutig belegt werden, wie die zu dieser Fragestellung veröffentlichten sehr widersprüchlichen Ergebnisse zeigen.

2.5.1 Erworben oder angeboren?

Unklar ist bis zum heutigen Tag, inwieweit eine genetische Disposition für die Pathogenese der RA eine Rolle spielt. Schon sehr früh wurde eine Assoziation der RA mit bestimmten Allelen des MHC II-Komplexes nachgewiesen (Stastny et al., 1978). In der letzten Zeit konnte eine Assoziation der RA mit den HLA-Molekülen HLA-DR4, HLA-DR1 (Gregerson et al., 1987) gezeigt werden, deren Aufgabe die Fremdartigenerkennung ist. Sie könnten bei der Antigenerkennung Einfluß auf die Peptidbindung haben (Stern et al., 1994). Spätere Untersuchungen haben allerdings neue Ergebnisse geliefert. In einigen ethnischen Gruppen konnte keine Assoziation mit dem HLA-Rezeptor nachgewiesen werden, bzw. es war kein klarer Zusammenhang zwischen der Genexpression und dem RA-Risiko erkennbar (McDaniel et al., 1995; Yelamos et al., 1993).

Zusätzlich wurde die Möglichkeit diskutiert, daß die HLA-Moleküle selbst die „Quelle des Übels“ sein könnten, die von anderen T-Zellen erkannt werden (Thomas and Lipsky.,1996).

Diese Beobachtungen machen deutlich, daß sich die Forschung auch auf die naiven Th-Zellen konzentrieren sollte, so wie es in der vorliegenden Arbeit geschehen ist.

2.5.2 Die "Th-1 Shift These"

Zytokine spielen eine entscheidende Rolle in der Initiierung und Unterhaltung des Entzündungsprozesses und somit bei der Zerstörung von Knorpel und Knochen. Im Gegensatz zur früheren Meinung zeigen neue sensitivere Nachweismethoden eine eindeutige Präsenz der Th-Zellzytokine, wobei dem Th1-Zytokin IFN- γ besonderes Gewicht zukommt (Dolhain et al., 1997).

Jedoch ist die Analyse der Zytokinproduzenten sehr kontrovers beschrieben worden. Während der größere Teil der Publikationen ein Übergewicht der proinflammatorischen Zytokine und eine verminderte Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen beschreibt (Dolhain et al., 1997; Yin et al.,1997),

gibt es auch Veröffentlichungen, die die "Theorie vom Th1-Shift" ablehnen (Schulze-Koops et al., 1995). Für einen Th1-Shift sprechen dagegen die therapeutischen Erfolge, die durch Hemmung der proinflammatorischen Zytokine erzielt wurden (Feldmann et al., 1996). Diese Annahme bildet auch die Grundlage der vorliegenden Arbeit.

Bisher wurde in allen Untersuchungen nur das Zytokinmuster von Gedächtnis T-Zellen nach polyklonaler Stimulation betrachtet, wobei bis jetzt unklar ist, wie es zu dem Übergewicht der proinflammatorischen Zytokine kommt. Zu klären wäre, ob bereits auf der Ebene der naiven, antigenunerfahrenen Zellen ein gestörtes Zytokinegleichgewicht zu Gunsten der Th1-Zytokine, wie sie bei den antigenerfahrenen Zellen beschrieben wurde, zu finden ist. Dies würde für einen genetischen Hintergrund der RA gegen eine erworbene Ätiologie sprechen.

