

I. Einleitung

I.1. Klinische Aspekte der Ankylosierende Spondylitis

Spondyloarthritiden (SpAs) sind zusammen mit der Rheumatoiden Arthritis die **häufigsten chronisch-entzündlichen Erkrankungen** (1). Sie sind durch akute und chronische **Entzündungszustände** an **Sehnenansätzen** und **Gelenken** von Wirbelsäule und Extremitäten gekennzeichnet. Unter den SpAs weisen die auch Morbus Bechterew genannte Ankylosierende Spondylitis (AS) und sogenannte undifferenzierte Spondyloarthritiden die höchste Prävalenz auf (1, 2).

Die AS befällt vor allem das **Achsenskelett**, wobei in der frühen Krankheitsphase vor allem die Sakroiliakgelenke betroffen sind, und die Entzündung und Knochenneubildung später auf die Wirbelsäule übergreift. Auch periphere Gelenke, Band- und Sehnenansatzstrukturen, vordere Uvea und die Aorta können betroffen sein.

Typischerweise beruht die Diagnosestellung auf **radiologischen Veränderungen** der Sakroiliakgelenke, der typischen **Anamnese** von entzündlichem Rückenschmerz sowie dem Befund einer **limitierten spinalen Beweglichkeit** und einer verminderten Thoraxexkursion bei der körperlichen Untersuchung. Krankheitsbeginn ist durchschnittlich im Alter von 26 Jahren, die AS kann sich aber auch bei Kindern und Erwachsenen über 50 erstmanifestieren. Männer sind dabei zwei- bis dreimal häufiger betroffen als Frauen, wobei die Ursache unbekannt ist. Hervorzuheben ist die eindeutige genetische Prädisposition, **ungefähr 90% aller kaukasischen AS Patienten sind HLA B27 positiv**. Reaktive Arthritis, Psoriasis und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen sind weitere Risikofaktoren.

In 30-50% der Fälle tritt im Krankheitsverlauf eine oft oligoartikuläre, meist asymmetrische Beteiligung der grossen peripheren Gelenke auf, bei etwa 20% der Patienten ist dies das initial führende Symptom. Seltener sind auch die kleinen Gelenke betroffen. Auch Enthesitiden im Bereich von Achillessehne, Calcaneus, Beckenkamm, Tuberositates von Scham- und Darmbein und anderen Sehnenansatzpunkten treten auf.

I.2. Äthiologie und Pathogenese der Ankylosierenden Spondylitis

Zu Äthiologie und Pathogenese der Ankylosierenden Spondylitis gibt es viele Hypothesen, jedoch ist es bisher noch nicht gelungen eine Erklärung für die Ergebnisse der verschiedenen, sich teilweise widersprechenden experimentellen und epidemiologischen Untersuchungen zu finden (3).

I.2.1. Die Assoziation mit HLA B27

Seit vor über 25 Jahren die hohe Assoziation von **HLA B27** mit AS bekannt wurde, haben viele Gruppen versucht deren Ursache zu ergründen. In einer Geschwisterstudie bei AS Patienten wurde festgestellt, dass HLA B27 fast essentiell für die Vererbung der AS ist, obwohl auch nicht mit HLA B27 assoziierte Fälle vorkommen können (4). Trotzdem entwickeln nur circa 2% der HLA B27 positiven Personen eine AS (5). Insgesamt werden etwa **20-50% des genetischen Erkrankungsrisikos** HLA B27 zugeschrieben und mittlerweile sind **20 HLA B27 Subtypen** bekannt, von denen interessanterweise HLA B2706 und HLA B2709 nicht mit AS assoziiert sind (6-8). Der Grund dafür ist jedoch nicht klar. Zwar weisen diese beiden Subtypen besondere Peptidbindungsstellen auf, es konnte aber bisher noch keine Teilsequenz ausgemacht werden, die positiv und negativ mit AS assoziierte Subtypen eindeutig voneinander unterscheidet.

I.2.2. Untersuchungen im Tiermodell

Mit der Entwicklung mehrerer der AS ähnelnden Tiermodelle in den letzten Jahren wurden neue interessante Entdeckungen gemacht. **HLA B27** und human β_2 -Mikroglobulin **transgene Ratten** entwickeln ein der AS sehr ähnelndes Krankheitsbild mit spontaner multisystemischer Erkrankung, dieses tritt jedoch **nicht** auf, wenn sie in **keimfreier** Umgebung gehalten werden. Dies deutet stark darauf hin, dass auch Mikroorganismen eine bedeutende Rolle spielen (9-11). Eine zusätzliche Transfektion dieser Ratten mit einem gut HLA B27 bindenden Influenza Peptid, welches die Peptidbindungsstelle von HLA B27 dadurch für

andere Peptide blockiert, vermindert dann signifikant die Krankheitshäufigkeit. Während dadurch einerseits die Relevanz eines auf HLA B27 präsentierten Peptides unterstrichen wird, konnte in Ergänzung dazu gezeigt werden, dass die Erkrankung auch in Mäusen auftritt, die keinen MHC-Klasse II exprimieren (12).

I.2.3. Infektionen und AS

Die oben beschriebene Abhängigkeit einer Entstehung der AS-ähnlichen Erkrankung von bakterieller Umgebung im Falle von HLA B27 transgenen Ratten und Mäusen weist auf eine mögliche wichtige Rolle von Infektionserregern auch beim Mensch hin. Eine mögliche Ursache könnte ein so genanntes „**molekulares Mimikry**“ sein: im Rahmen einer Immunabwehrreaktion gegen Bakterien werden auf HLA B27 bakterielle Peptide präsentiert, die körpereigenen Peptiden ähneln. Deshalb bleibt auch nach der Bekämpfung des Erregers die Aktivierung des Immunsystems bestehen und richtet sich nun gegen diejenigen Körperstrukturen, die bakteriellen Peptiden-ähnliche Strukturen exprimieren. Somit könnte aus einer ursprünglich gegen „fremd“ gerichteten Abwehrreaktion eine chronische Entzündungsreaktion gegen körpereigene Strukturen resultieren. Andererseits gibt es aber auch Hinweise darauf, dass eine bakterielle Infektion die Art der von HLA B27 präsentierten Peptide beeinflussen kann: Tapasin ist ein Chaperone im endoplasmatischen Retikulum, das in die Peptidbeladung von Klasse I Molekülen involviert ist. An Tapasin-defizienten, HLA B27 positiven Zellen konnte gezeigt werden, dass diese ein geändertes Peptid-Repertoire präsentieren, welches möglicherweise auch niedrig affine Peptide beinhaltet. Dies kann dazu führen, dass auf der Zelloberfläche mehr freie, d.h. nicht mit Peptid beladene MHC Klasse I Moleküle sind. Diese könnten dann entweder internalisiert und HLA B27 Fragmente auf MHC Klasse II präsentiert werden, oder im Falle einer Infektion exogen mit bakteriellen Fragmenten beladen werden (13). Bisher konnte jedoch noch keine Beeinflussung der Tapasin Funktion durch bakterielle Erreger, oder eine wie auch immer geartete Tapasin-Defizienz in an AS erkrankten Personen nachgewiesen werden.

I.2.4. Spezielle Eigenschaften von HLA B27

Aber auch einige einzigartige Eigenschaften des HLA B27 Moleküls selbst könnten in die Pathogenese der AS verwickelt sein: HLA B27 kann so genannte **HCB 27 Homodimere** bilden, die durch ihre strukturelle Ähnlichkeit mit MHC Klasse II Molekülen vielleicht auch in der Lage sein könnten, CD4⁺ T-Zellen neue Antigene zu präsentieren, gegen die keine Toleranz besteht und dadurch eine Immunreaktion hervorrufen (14). Ebenso wird diskutiert, ob HCB 27 Homodimere eine veränderte intrazelluläre Signalkaskade und damit eine exzessive Zytokinfreisetzung bewirken.

I.2.5. weitere Genassoziationen

Abgesehen von der einzigartigen Rolle, die HLA B27 selbst wohl bei der Entstehung einer AS spielt, führte die Erkenntnis, dass AS eine polygene Erkrankung ist, dazu, dass auch andere Genassoziationen intensiver untersucht wurden. Dabei interessieren v.a. benachbarte Gene, die mit HLA B27 in einem sogenannten **linkage disequilibrium** stehen und aufgrund ihrer Nähe zum HLA B Locus oft zusammen vererbt werden.

Von besonderem Interesse ist dabei die etwa 250kb zentromerwärts vom HLA B Locus entfernt liegende **TNF α Promotorregion** (15). In dieser Promotorregion sind mehrere Polymorphismen bekannt, die u.a. in Multipler Sklerose und Rheumatoider Arthritis (16, 17) unabhängig von MHC Klasse I oder II unterschiedlich zu Krankheitsentstehung, bzw. –ausprägung beizutragen scheinen. Bezogen auf die Transkriptionsinitiationsstelle sind an den Stellen –238 und -308 Allelvarianten bekannt, die mit einer höheren TNF α Produktion in Verbindung gebracht werden (18, 19) und deren Häufigkeit in HLA B27 positiven AS Patienten untersucht wurde: Diese Allelvariante an der Stelle –238 wurde seltener bei AS Patienten und HLA B27 positiven gesunden im Vergleich zu HLA B27 negativen gesunden Personen (20) gefunden. Aber in einer anderen Untersuchung wurde sowohl an der Stelle –238 als auch –308 bei AS Patienten seltener als bei HLA B27 positiven Kontrollen die Allelvariante mit höherer TNF α Produktion gefunden (21, 22). Im Widerspruch dazu steht eine weitere Studie, die

im Vergleich zwischen HLA B27 positiven AS Patienten und HLA B27 positiven gesunden Kontrollpersonen keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Polymorphismen an der Stelle -238 und -308 gefunden hatte (23). Zusammengefasst hat die Untersuchung dieser Polymorphismen **keine eindeutigen Ergebnisse** erbracht. Der Grund dafür könnte sein, dass immer ein gewisser Unsicherheitsfaktor in der Auswahl der positiven gesunden Kontrollpersonen besteht, da einige von ihnen an AS erkrankt sein könnten, ohne zum Zeitpunkt der Untersuchung davon zu wissen, oder erst noch daran erkranken werden. Dies könnte vielleicht die doch sehr unterschiedlichen Ergebnisse erklären.

I.2.6. Zytokinexpression und HLA B27

Ein weiterer Nachteil der Untersuchung von Promotorpolymorphismen ist, dass Zytokinexpression ein multifaktorieller und noch nicht vollständig aufgeklärter Vorgang ist, und die Analyse von einem oder auch mehreren Polymorphismen nur unzureichend vorhersehen kann, ob und wie stark die Expression dann auch wirklich verändert ist. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeitsgruppe ein System etabliert, um auf **Einzelzellebene** die **Zytokin-Expression** von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu analysieren. In einer ersten Studie an HLA B27-positiven Patienten mit **reaktiver Arthritis** konnte eine Korrelation von **niedriger TNF α** Produktion mit chronischem Krankheitsverlauf festgestellt werden (24). Die anschließende Untersuchung von **HLA B27-positiven** gesunden und an AS erkrankten Personen zeigte, dass sie sowohl bei CD4⁺ als auch bei CD8⁺ T-Zellen einer **geringere Expression** der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IFN γ aufweisen als HLA B27-negative Blutspender (25).

I.3. Immunologische Grundlagen

aus (26)

Im Laufe der Evolution hat sich in höheren Wirbeltieren ein komplexes, wirkungsvolles Immunsystem zum Schutz vor Infektionen durch krankheitserregende Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Pilze) und Parasiten entwickelt. Grundlegende Charakteristika des Immunsystems sind seine hochgradige Spezifität und die Fähigkeit, „fremde“ von „eigenen“ Molekülen zu unterscheiden.

Die „**angeborene**“ Immunität dient der ersten Abwehr, die in den Körper eingedrungene Fremdsubstanzen erkennt und eliminiert. An diesen Abwehrreaktionen sind u.a. Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Faktoren des Komplementsystems beteiligt. Kann eine Infektion durch diese frühen Abwehrmaßnahmen nicht beseitigt werden, kommt es zu einer „**adaptiven**“ Immunantwort. Diese beruht auf der klonalen Selektion von B- und T-Lymphozyten, die eine Vielfalt hochspezifischer Antigen-Rezeptoren besitzen und durch diese die unterschiedlichsten Pathogene und ihre Toxine erkennen. Aus einem breiten Spektrum von Effektormechanismen werden dann dem Antigen angemessene Reaktionen induziert. Diese lassen sich grob vereinfacht in zwei große Klassen von Immunreaktionen untergliedern:

Die **humorale**, Antikörper-vermittelte Antwort, für die B-Lymphozyten (oder B-Zellen) verantwortlich sind und die **zellvermittelte** Immunantwort, die hauptsächlich mittels T-Lymphozyten (T-Zellen) erfolgt. Diese Einteilung basiert auf zwei unterschiedlichen Effektormechanismen der Lymphozyten, die auf die Erfassung von extra- und intrazellulären Krankheitserregern und ihrer Toxine spezialisiert sind.

Bei der **humoralen** Antwort werden die verschiedenen Abwehrreaktionen, z.B. Komplementaktivierung, Phagozytose und Neutralisierung größtenteils durch spezifische Immunglobuline (Antikörper) vermittelt, die von aktivierten B-Zellen sezerniert werden. Die Aktivierung der B-Zellen und deren nachfolgende Differenzierung zu verschiedenen Effektorzellen erfolgt durch die Bindung des Antigens an den passenden membrangebundenen B-Zellrezeptor und erfordert in vielen Fällen die Hilfe von spezifischen aktivierten T-Helferzellen.

Die **zellvermittelte** Immunantwort bekämpft intrazelluläre Erreger, z.B. Viren, einige Parasiten und Bakterien, die vor dem Angriff durch Antikörper geschützt

sind, und beruht auf direkten Wechselwirkungen zwischen zytotoxischen T-Lymphozyten und infizierten Körperzellen. Die Antigen-Rezeptoren der zytotoxischen T-Zellen erkennen Peptidfragmente intrazellulärer Pathogene, die mit Hilfe der spezialisierten Haupthistokompatibilitäts (MHC) Moleküle-Klasse I an der Oberfläche der infizierten Zellen präsentiert werden. Unter anderem sind bei der zellvermittelten Antwort auch Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und T-Helfer-Zellen direkt beteiligt.

Die komplexen und immer noch unvollständig geklärten Interaktionen zwischen den Zellen des Immunsystems werden nicht nur durch membranständige Oberflächenmoleküle sondern u.a. auch durch lösliche Proteine, so genannte Zytokine vermittelt. Diese heterogene Gruppe von Mediatoren wird von einer Vielzahl verschiedener Zellen gebildet und freigesetzt, u.a. von B- und T-Zellen, Makrophagen oder Mastzellen. Die meisten besitzen viele verschiedene biologische Effekte und beeinflussen Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der Zielzellen, die jeweils die spezifischen Oberflächenrezeptoren tragen. Sie wirken meist lokal und die Wirkung ist u.a. abhängig von der Konzentration, dem Zielzell-Typ und dessen Differenzierungsgrad.

I.3.1. Major Histokompatibilitäts Komplex (MHC)

Beim Mensch ist die MHC Genregion auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert und folgendermassen organisiert: Gene für MHC Klasse II (HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ) , Komplementfaktoren, Hitze Schock Proteine, Zytokine (TNF, Lymphotoxin, Lymphotoxin- β) und MHC Klasse I (HLA-A, HLA-B, HLA-C).

MHC Moleküle sind extrem polymorph und sowohl Klasse I als auch Klasse II binden Peptide und bilden damit Komplexe die durch antigen-spezifische T Zellen erkannt werden, wobei sich die derzeit bekannten Polymorphismen vor allem auf die Peptidbindungsstellen der MHCs auswirken. Während **MHC Klasse I** Peptide mit einer Länge von 9-11 Aminosäuren bindet und CD8 T-Zellen stimuliert, werden am **MHC Klasse II** v.a. Peptide mit einer Länge von bis zu 30 Aminosäuren gebunden, die dann von CD4⁺ T-Zellen erkannt werden.

I.3.2. Zytotoxische T Zellen

Die Hauptaufgaben **zytotoxischer T-Zellen** sind vor allem die Zerstörung infizierter Körperzellen, von MHC Klasse I inkompatiblen Fremdgeweben, wie z. B. bei Transplantation und auch Tumorgeweben. Sie werden vor allem durch die Expression des Oberflächenmoleküls **CD8** charakterisiert, dessen Ligand **MHC Klasse I** von fast allen Körperzellen exprimiert wird. Die an MHC Klasse I gebundenen Peptide werden hauptsächlich von der präsentierenden Zelle selbst produziert. Im Rahmen einer Virusinfektion stammen sie dann vom Virus und werden somit als fremd erkannt. Bei der Aktivierung einer $CD8^+$ Zelle ist dann die Erkennung des zum jeweiligen T Zell Rezeptor (TCR) korrespondierenden Peptides gebunden an MHC Klasse I und ein weiteres Signal wie z.B. von Th-Zellen produzierte Zytokine oder Kostimulation durch eine APC nötig. Die Effektormechanismen, derer sich die CD8 Zellen bedienen, sind vor allem Zytokinproduktion, Exozytose von Granula mit zelllysierendem Perforin oder apoptoseinduzierendem Granzym B sowie die Oberflächenexpression des Moleküls CD95 (FasL).

I.3.3. T-Helfer-Zellen

T-Helfer-Zellen (Th-Zellen), aufgrund der Expression des Oberflächenmoleküls CD4 auch **$CD4^+$** T-Zellen genannt, sind sowohl an der humoralen als auch an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt. Im Gegensatz zu den zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$ T-Zellen) erkennen Th-Zellen über ihren TCR zwischen 10 und 30 Aminosäuren lange Peptide, die auf **MHC-Molekülen der Klasse II** von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) an der Oberfläche präsentiert werden. Hierfür werden die extrazellulären Pathogene zuerst von den APCs aufgenommen, in den lysosomalen Kompartimenten prozessiert und danach werden Peptidfragmente der Antigene gebunden an MHC-II Moleküle an die Oberfläche befördert. Als APC können v.a. dendritische Zellen, aktivierte B-Zellen, Monozyten und Makrophagen fungieren. Dadurch stimulierte $CD4^+$ Th Zellen können dann sowohl durch Expression von Oberflächenmolekülen wie z.B. CD40L zur B Zell Aktivierung oder Sekretion von Zytokinen die Immunreaktion entscheidend beeinflussen und

steuern. Aufgrund ihrer zentralen Rolle möchte ich im Folgenden näher auf die verschiedenen Stadien der Th Zelldifferenzierung eingehen.

I.4. Aktivierung und Differenzierung naiver Th-Zellen

Für eine Aktivierung und Expansion von naiven Th-Zellen sind mindestens zwei Signale notwendig. Neben der Antigenerkennung durch den **T Zell Rezeptor (TCR)** ist die Bindung der von der APC exprimierten membrangebundenen Proteine CD80 (B7/1) oder CD86 (B7/2) an das auf der Oberfläche der Th-Zellen exprimierte, kostimulatorisch wirkende Molekül **CD28** erforderlich (Abb.1). Anschliessend exprimieren **naive** Th-Zellen zunächst fast ausschliesslich das Zytokin **Interleukin 2 (IL-2)**, das u.a. als autokriner Wachstumsfaktor wirkt (27-29). Gleichzeitig wird die Synthese des hochaffinen IL-2 Rezeptors auf der aktivierten T-Zelle induziert. Erst bei einer weiteren Stimulation produziert die dann **antigen-erfahrene Th Zelle** zusätzlich weitere **Effektorzytokine** wie z.B. $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-4, IL-5, IL-10 (30, 31). Findet die primäre Antigenerkennung durch den TCR ohne gleichzeitige kostimulierende Signale statt, kann dies eine antigen-unerfahrene T-Zelle funktionell inaktivieren (keine IL-2 Produktion) und den Zustand der Anergie bewirken (modifiziert aus (26)).

Abb. 1

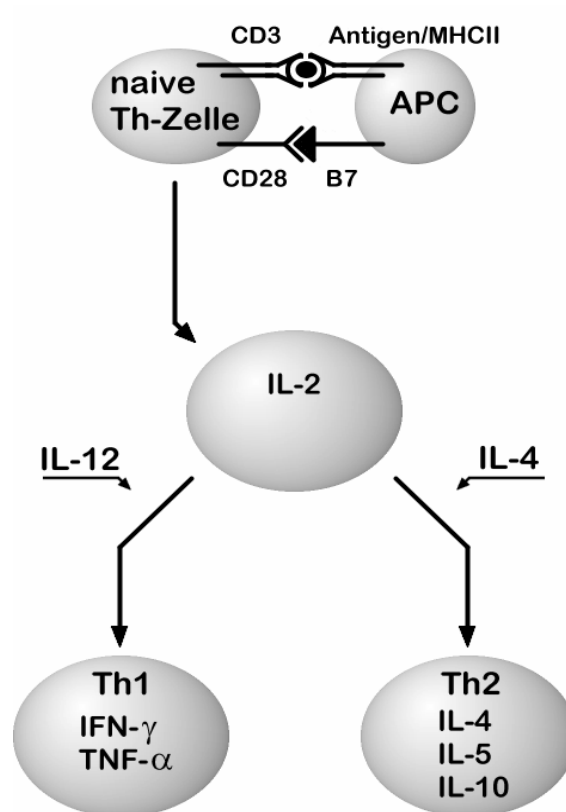


Abb. 1: Aktivierung und Differenzierung einer naiven $CD4^+$ T-Zelle

I.4.1. TH1/TH2 Differenzierung

Aufgrund der Art der von ihnen sezernierten Zytokine lassen sich Th-Zellen vereinfacht in Zellen mit **TH1**- oder **TH2**- Zytokinsekretionsmuster einteilen (siehe Abb.1). Diese Gliederung wurde erstmalig von T. Mosmann und R. Coffman (32, 33) anhand der Analyse von Th-Zellklonen der Maus beschrieben. Während so genannte TH1-Zelllinien nach Aktivierung IL-2, $TNF\alpha$ und $IFN\gamma$ sezernieren, sind TH2-Zelllinien hingegen durch Expression von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 charakterisiert. Einige Zytokine, u.a. IL-3, werden von TH1- und TH2-Zellen sezerniert (34). Später wurde dieses Konzept auch noch durch zusätzliche Definition von TH0, TH3 und Tr1 Th-Zellen erweitert.

Viele Faktoren entscheiden darüber, in welche Richtung sich naive T-Zellen differenzieren. Das von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen produzierte Zytokin **IL-12** induziert in naiven Th-Zellen die Sekretion von **TH1**-Zytokinen z.B. $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ (35, 36). Im Gegensatz dazu ist der wichtigste Differenzierungsfaktor zur Induktion der **TH2**-Zytokine (IL-4, IL-5, IL-10) **IL-4** selbst (37, 38). Doch neben Zytokinen, deren zentrale Rolle in der Th-Zellpolarisierung eindeutig belegt ist, werden weitere Faktoren, die einen regulatorischen Einfluss auf die TH1/TH2-Entwicklung ausüben könnten, z.B. die Intensität der TCR-Ligation (39), der APC-Typ (40) und kostimulatorische Signale (41), kontrovers diskutiert.

I.4.2. Eigenschaften von TH1, bzw. TH2 Zellen

Diese Unterteilung in TH1, bzw. TH2 Zellen beruht hauptsächlich auf der unterschiedlichen, teils gegensätzlichen Wirkung der von Ihnen produzierten Zytokine: Die von **INF γ** vermittelten Wirkungen, z. B. Aktivierung von Makrophagen, MHC Klasse I und II Hochregulation, Aktivierung von neutrophilen Granulozyten betreffen eher die Bekämpfung von intrazellulären Erregern und stärken die zelluläre Immunantwort. Im Gegensatz dazu aktiviert **IL-4** ruhende B-Zellen zur Proliferation, Differenzierung und Antikörperbildung, induziert den Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgE und ist dadurch mit der humoralen Immunantwort assoziiert (26).

Das klassische TH1/TH2-Konzept ging von einer strikten Einteilung in $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ produzierende TH1 und IL-4/IL-5 und IL-10 produzierende TH2-Zellen aus. Analysen auf Einzelzellebene zeigten jedoch, dass die Zytokinexpression in individuellen Th-Zellen variabler ist, als angenommen. Dazu gibt es derzeit zwei konkurrierende Hypothesen: die erste besagt, dass die Koexpression von Typ 1 oder Typ 2 Zytokinen durch einzelne Zellen die zelluläre Basis für die auf Populationsebene beobachtete TH1/TH2 Dichotomie ist. Die andere besagt, dass Koexpression von Zytokinen ein zufälliges Ereignis ist und polarisierte TH1 oder TH2 Populationen aus selektionierten T-Zellen bestehen.

Ihre zentrale Rolle, wie Th Zellen entscheidend über das Resultat von Immunantworten entscheiden. So wirkt bei einer Infektion mit Mykobakterium

leprae eine vorherrschende TH1-Antwort protektiv, da eine dadurch stark aktivierte zelluläre Antwort die intrazellulär persistierenden Erreger wirkungsvoll bekämpft, während eine durch TH2 Zellen angeregte humorale Immunantwort mittels Antikörper v.a extrazellulär und damit unzureichend wirkt. Eine **Dysregulation des TH1/TH2 Gleichgewichts** wird jedoch auch für andere pathologische Situationen verantwortlich gemacht: **TH2-Zytokine** spielen, vor allem durch die Induktion von IgE, eine massgebliche Rolle bei der Entstehung von **Allergien**, wohingegen bei **chronischen Entzündungen** und vielen **Autoimmunerkrankungen**, **TH1-Zytokine** für die Initiierung und Fortdauer der Krankheit als verantwortlich betrachtet werden (42, 43).

I.5. Subpopulationen von CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen

Zur Isolierung und Analyse humaner CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell Subpopulationen werden verschiedene Oberflächenmarker verwendet, die auf naiven und antigen-erfahrenen T-Lymphozyten unterschiedlich exprimiert werden, u.a. CD2, LFA-1(CD11a/CD18), VLA, L-Selektin (CD62L), CCR7, CD31, CD27 und verschiedene CD45-Isoformen (44).

Die verschiedene Expression dieser Moleküle erklärt Unterschiede zwischen naiven und antigen-erfahrenen Th-Zellen hinsichtlich Zell-Zell-Interaktion (LFA-1, VLA), *in vivo*-Lokalisierung (CD31, CD62L) oder Aktivierungsbedingungen (CD27).

I.5.1. Unterteilung von CD4⁺ T-Zellen

Ein klassisches Konzept für Oberflächenmarker, die naive und antigen-erfahrene Th-Zellen in adultem peripherem Blut unterscheiden, ist die unterschiedliche Expression von Isoformen der Tyrosinphosphatase CD45. **Naive** Th-Zellsubpopulationen exprimieren die **CD45RA**-Isoform, während **Antigen-erfahrene** Th-Zellen durch die **CD45RO**-Isoform charakterisiert sind (45). Nach antigener oder mitogener Stimulation der CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ Zellen findet eine Konversion vom naiven zum antigen-erfahrenen Th-Zellstadium statt.

CD4⁺CD45RA⁺ Zellen "verlieren" die Expression der CD45RA-Isoform und beginnen gleichzeitig die CD45RO-Isoform auszuprägen (46-48). Diese relativ einfache Unterteilung ist oft ausreichend. Zur möglichst genauen Unterscheidung zwischen naiven und antigen-erfahrenen Th Zellen können jedoch weitere Marker wie CD62L, CD27 zusätzlich analysiert werden (44).

I.5.2. Unterteilung von CD8⁺ T-Zellen

Ein funktioneller Unterschied zwischen CD45RA⁺ und CD45RO⁺ Th-Zellen wurde auch für CD8⁺ T-Zellen beschrieben (49), jedoch gibt es dort eine bedeutende Population von nicht naiven CD8⁺ CD45RA⁺ T Zellen (50). Sowohl in CD4⁺ als auch in CD8⁺ T-Zellpopulationen steigt mit zunehmendem Alter der Anteil der CD45RO⁺ Zellen und gleichzeitig nimmt der Anteil der CD45RA⁺ Zellen ab (51).

Zur genaueren Unterscheidung von naiven, antigen-unerfahrenen und antigen-erfahrenen T-Zellen wurde in dieser Arbeit CD27 benutzt. Dieser Oberflächenmarker ermöglicht es sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T Zellen in funktionell unterschiedliche Subpopulationen einzuteilen und diese somit selektiv zu analysieren.

I.6. Das Oberflächenmolekül CD27 auf T-Zellen

CD27 ist ein transmembranes Glykoprotein, das von der Mehrzahl peripherer T-Zellen, medullärer Thymozyten, B und NK Zellen exprimiert wird (52-56). Es ist ein Mitglied der TNF-R/NGF-R Superfamilie (57) dessen Ligand CD70 u.a. auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen v. a. im RO⁺ Kompartiment exprimiert wird (58).

CD27 wird nach TCR Stimulation hoch-, nach andauernder Stimulation jedoch wieder herunterreguliert und es konnte gezeigt werden, dass die CD27-CD70 Interaktion ein wichtiges **Zweit-Signal** zur Zytokinproduktion und Induktion von aktivierenden Antigenen ist (59). Die Proliferation von CD45RA⁺ ist mehr als die von CD45RO⁺CD4⁺ T-Zellen davon abhängig (60). Andererseits konnte für CD8⁺

T-Zellen gezeigt werden, dass über CD27 vermittelte Signale sowohl deren Aktivierung (61), als auch Persistenz (62) entscheidend beeinflussen können. Jedoch unterscheidet sich bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen die Expression von CD27 auf RA⁺ und RO⁺ Zellen und dessen Korrelation mit anderen phänotypischen und funktionellen Merkmalen wie z.B. Homing-Rezeptoren und Zytokinproduktion.

I.6.1 CD27 auf CD4⁺T-Zellen

Bei der Unterteilung von CD4⁺ T-Zellen in eine CD27⁺ und CD27⁻ Fraktion ohne Unterscheidung zwischen RA und RO konnte in CD27⁻ T-Zellen eine ausschließliche IL-5 und eine verstärkte Expression von IL-4 Gen-Transkripten festgestellt werden (63). Auf Einzelzellebene waren mehr IL5⁺IFN γ ⁻, IFN γ ⁺ IL4⁻ und IL4⁺IFN γ ⁻ Zellen in der CD27⁻ als in der CD27⁺ Fraktion nachweisbar (64).

Bei zusätzlicher Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen anhand der Expression der Isoform von CD45 fällt als Unterschied zwischen **CD4⁺CD45RA⁻CD27⁺** und **CD27⁻** T-Zellen eine geringere Produktion von IL-4, geringere Expression von den β 1-Integrinen VLA4, VLA 5 und des β 2 Integrins CD11b in der CD27⁺ Zellfraktion auf, wobei auch deren Expression des Rezeptors für organspezifisches Einwandern von T-Zellen, α E β 7, erniedrigt ist (65). Ausserdem ist die Proliferation nach Stimulation mit Tetanustoxoid nach Booster-Impfung v.a. auf die CD27⁻ Fraktion beschränkt, ebenso wie die von Atopikern auf das jeweilige Allergen (66). Ein erhöhter prozentualer Anteil an CD27⁻CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut konnte bisher für virale und parasitäre Erkrankungen, Sarkoidose und höheres Lebensalter nachgewiesen werden. Bei Multipler Sklerose, Typ1- Diabetes und Rheumatoider Arthritis waren signifikante Unterschiede jedoch nicht zu finden (63, 67, 68).

Zusammengefasst kann man CD4⁺ T-Zellen vereinfacht in **naive CD45RA⁺CD27⁺**, **Gedächtnis CD45RA⁻CD27⁺** und **mehrfach antigen-stimulierte, hier als differenzierte Gedächtnis CD4⁺ T-Zellen bezeichnete, CD45RA⁻CD27⁻ Zellen einteilen.**

I.6.2. CD27 auf CD8⁺ T-Zellen

CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺ T-Zellen ähneln naiven CD4⁺ T-Zellen nicht nur hinsichtlich ihrer Zytokin-Produktion, hauptsächlich IL-2 und wenig IFN γ und TNF α , sondern auch die Expression von Oberflächenmarkern wie CD62L, CD49d und e, CD29, CD11a/CD18, CD58 und CD95 ist vergleichbar. Im Gegensatz zu CD4⁺ Zellen sind **CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻** jedoch relativ häufig, und man könnte sie aufgrund ihrer Oberflächenmarker, Zytokinproduktion (kaum IL-2 und IL-4, viel IFN γ und TNF α), und zytolytischer Funktion ohne vorherige Stimulation wohl am besten als klassisch zytotoxische T-Zellen bezeichnen. Sie induzieren Apoptose von Zielzellen sowohl durch Exozytose von Granula, als auch durch Fas/ FasL Interaktion. Ihr gefährliches Zerstörungspotential wird durch NK-Zell Inhibitor Rezeptoren kontrolliert (69). Im Gegensatz dazu sind **CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺** erst nach vorheriger *in vitro* Restimulation zytolytisch, produzieren deutlich mehr IL-2, mehr IL-4 und sind weniger positiv für Granzym B und Perforin. Man könnte sie somit als Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen und als Vorläufer für zytotoxische T-Zellen bezeichnen (50). Ein Vergleich der Telomere Restriktions Fragmente (TRF) von CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺, CD45RA⁻CD27⁺ und CD45RA⁺CD27⁻ konnte zeigen, dass CD45RA⁺CD27⁺ längere TRFs als CD45RA⁻CD27⁺ und CD45RA⁺CD27⁻ haben, wobei letztere sich nicht unterscheiden (70). Bei den CD8⁺ T-Zellen sind CD45RA⁻CD27⁻ T-Zellen zwar auch vorhanden, aber eher als Übergangspopulation anzusehen.

Somit differenzieren bei CD8⁺ T-Zellen die Oberflächenmarker CD27 und CD45RA zwischen **naiven CD45RA⁺CD27⁺**, **CD45RA⁻CD27⁺ Gedächtnis** und **CD45RA⁺CD27⁻ Effektor CD8⁺ T-Zellen**.

Abb. 2

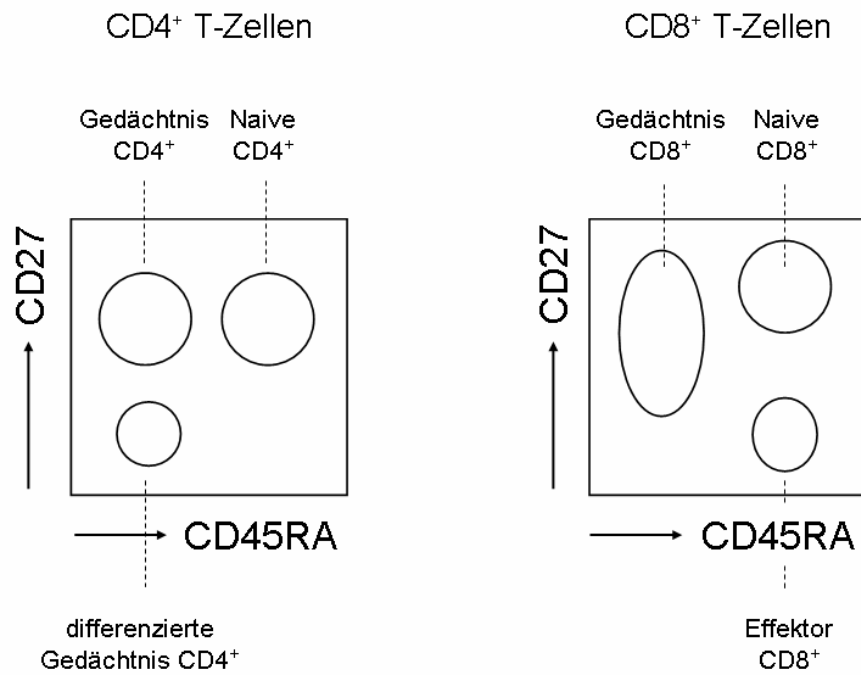


Abb. 2: Schema der durchflusszytometrischen Einteilung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell Subpopulationen.

Dargestellt ist die Expression von CD27 und CD45RA auf verschiedenen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell Subpopulationen.