# IV. Diskussion

Obwohl die hohe Assoziation von HLA B27 und Ankylosierender Spondylitis schon seit über 25 Jahren bekannt ist, ist der Grund dafür trotz intensiver Forschung noch nicht eindeutig geklärt. Hauptansatzpunkte der verschiedenen Untersuchungen zur Pathogenese der AS und ihrer Verbindung mit HLA B27 sind besondere Eigenschaften von HLA B27 selbst, die Präsentation von möglicherweise pathogenen, HLA B27-restringierten Peptiden und Analysen zur gekoppelten Vererbung von chromosomal dem HLA Lokus benachbarten Genen, wie vor allem dem TNF$\alpha$ und IL-10 Promotor. Eine mit HLA B27 gekoppelte Fehlregulation der Zytokine TNF$\alpha$ und IL-10 könnte durch deren herausragende Rolle in der Bekämpfung von Pathogenen und ihre entzündungsfördernde bzw. –unterdrückende Wirkung von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung einer Ankylosierenden Spondylitis sein (75). Aus diesem Grund haben bereits mehrere Arbeitsgruppen die Verteilung einiger bekannter TNF$\alpha$ und IL-10 Promoter Polymorphismen unter HLA B27-negativen, HLA B27-positiven gesunden und an AS-erkrankten Personen untersucht. Jedoch sind die Ergebnisse dieser Studien widersprüchlich (20-23). Da Analysen dieser Polymorphismen jedoch den Nachteil haben, dass deren tatsächliche Auswirkungen auf die Expressionsstärke oft unzureichend geklärt sind, sind funktionelle Analysen, welche die Produktion der Zytokine unter definierten Bedingungen messen, meist vorzuziehen.

Eine vorher in dieser Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchung der tatsächlichen Expression von Zytokinen hatte gezeigt, dass HLA B27-positive Personen durch eine im Vergleich mit HLA B27-negativen Personen geringere Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF$\alpha$ und IFN$\gamma$ in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten gekennzeichnet sind (25). Auf diese Studie aufbauend wurde in dieser Dissertationsarbeit eine verbesserte Methodik etabliert, die eine getrennte Analyse der Zytokinproduktion in verschiedenen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zell Subpopulationen und deren genauere Charakterisierung ermöglichte. Dabei konnte gezeigt werden, dass antigen-erfahrene Gedächtnis und Effektor $CD8^+$ T-Zellen von HLA B27-positiven im Vergleich mit HLA B27-negativen Personen durch eine signifikant geringere Zytokinproduktion gekennzeichnet sind. Dies trifft jedoch nicht auf naive $CD8^+$ T-Zellen und keine der $CD4^+$ T-Zell Subpopulationen zu. Auch die TH1 bzw. TH2 Differenzierung in Gedächtnis $CD4^+$ T Zell Subpopulationen in HLA B27-

positiven Personen ist nicht signifikant unterschiedlich. Zusammengenommen könnte dies auf eine gestörte Differenzierung von naiven $CD8^+$ zu Gedächtnis bzw. Effektor $CD8^+$ T Zellen in HLA B27-positiven Personen hinweisen.

Durch die effektive, hochgenaue magnetische Aufreinigung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen und die Anfärbung der beiden Oberflächenantigene CD45RA und CD27 wurde hier eine Methode zur selektiven Stimulation und Analyse der Zytokinproduktion spezieller Subpopulationen von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen etabliert. Dies ermöglicht einen detaillierten Vergleich der Zytokinproduktion in verschiedenen Kontrollgruppen und die Identifikation der Untergruppe/-n von T-Zellen, die für die geringere Zytokinproduktion in HLA B27-positiven Individuen verantwortlich ist/sind. Dabei ist anzumerken, dass keine genaue Typisierung der HLA B27-positiven Spender durchgeführt wurde, obwohl von HLA B27 mehrere Subtypen mit unterschiedlicher Krankheitsassoziation bekannt sind (6-8). Alle untersuchten Personen waren jedoch Kaukasier, von denen eine Subtypverteilung von etwa 95% HLA B2705 und etwa 5% HLA B2702 bekannt ist (76, 77). Sowohl HLA B2705, als auch HLA B2702 sind positiv mit AS assoziiert.

In Übereinstimmung mit der von Rudwaleit et al berichteten Untersuchung (25), unterschieden sich HLA B27-positive gesunde und an AS erkrankte Personen nicht hinsichtlich der Produktion der von uns untersuchten Zytokine TNF$\alpha$, IFN$\gamma$, IL-4 und IL-10 in den jeweiligen Subpopulationen der $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen. Im Unterschied zu jener Studie war die Frequenz zytokinproduzierender Zellen im Vergleich zu HLA B27-negativen Kontrollpersonen jedoch nur bei $CD8^+$ T Zellen vermindert. Nur antigen-erfahrene Gedächtnis und Effektor $CD8^+$ T-Zellen HLA B27-positiver Personen zeigten nach polyklonaler PMA/Ionomycin Stimulation eine signifikant geringere TNF$\alpha$ und IFN$\gamma$ Expression als HLA B27-negative Individuen. Ein weiterer Unterschied zu der Studie von Rudwaleit et al liegt in einer generell weitaus höheren Zytokinproduktion in dieser Untersuchung. Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich möglicherweise durch methodisch verschiedene Ansätze erklären: In zitierter Studie wurden, im Gegensatz zu dieser Arbeit, vorher eingefrorene Zellen untersucht, was für die insgesamt geringere Zytokinproduktion verantwortlich sein könnte. Eine weitere wichtige methodische Verbesserung war die jetzt durchgeführte Stimulation hochaufgereinigter $CD4^+$

bzw. $CD8^+$ T-Zellen, welche deren nachträgliche Identifizierung durch Oberflächenfärbung ersetzte. Dadurch konnten einerseits Fehler bei der indirekten Identifizierung von $CD4^+$ T-Zellen, die aufgrund des Verlusts des CD4 Antigens nach PMA/Ionomycin Stimulation nötig wird, vermieden werden. Ausserdem wurde es infolgedessen möglich, $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen getrennt zu stimulieren. Damit wurden sowohl eine gegenseitige Beeinflussung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, als auch durch andere in der Gesamtheit der PBMCs enthaltene Zellarten hervorgerufene Effekte ausgeschlossen.

Im Gegensatz zu oben erwähnten Unterschieden bei antigen-erfahrenen $CD8^+$ Zellen waren bei naiven, antigen-unerfahrenen $CD8^+$ T-Zellen trotz erheblicher TNF$\alpha$ und IFN$\gamma$ Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen HLA B27-positiven und -negativen Personen nachweisbar. Dies deutet auf einen Defekt hin, der selektiv nur antigen-erfahrene $CD8^+$ T-Zellen betrifft. Zusammen mit dem Ergebnis, dass bei allen $CD4^+$ T Zell Subpopulationen keine Unterschiede zwischen HLA B27-positiven und -negativen Spendern festgestellt wurden, macht das die in der Einleitung erwähnte Hypothese der unterschiedlichen Verteilung von TNF$\alpha$ Promotor-Polymorphismen recht unwahrscheinlich. Unter der Voraussetzung, dass bei $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen prinzipiell die gleichen Promotoren in die TNF$\alpha$ Produktion involviert sind, sollten die erwähnten Polymorphismen auch in $CD4^+$ T-Zellen die Zytokinexpression beeinflussen. Dies war jedoch in unserer Untersuchung nicht der Fall. Auch die gleichermassen nur in Gedächtnis und Effektor $CD8^+$ T-Zellen verminderte IFN$\gamma$ Sekretion ist damit schwierig in Einklang zu bringen. Die geringere Expression von IFN$\gamma$ könnte zwar durch einen indirekten Einfluss der verminderten TNF$\alpha$ Expression auf die IFN$\gamma$ Sekretion zustande kommen. Aber auch bei diesem Mechanismus würde man erwarten, dass $CD4^+$ T-Zellen und naive $CD8^+$ T-Zellen ebenfalls betroffen sind.
Allerdings bleibt als mögliche Hypothese eine Beeinflussung der Differenzierung von naiven $CD8^+$ T-Zellen zu Gedächtnis bzw. Effektor $CD8^+$ T-Zellen durch HLA B27. Diese könnte sowohl TNF$\alpha$, als auch IFN$\gamma$ Sekretion vermindern, wäre erst bei antigen-erfahrenen, also Gedächtnis und Effektor $CD8^+$ T-Zellen sichtbar, und die MHC Klasse I-CD8 Interaktion bei der Stimulation von $CD8^+$ T-Zellen wäre eine gute Begründung, wieso $CD4^+$ T-Zellen nicht betroffen sind. Ausserdem macht es die Interaktion von CD8 und MHC Klasse I beim $CD8^+$ T-Zell Priming

durchaus denkbar, dass, unabhängig vom präsentierten Peptid, über HLA B27 eine im Vergleich mit anderen MHC Klasse I Molekülen andere Signalkaskade in Gang gesetzt wird. Dies könnte dann zu einem quantitativ und/oder qualitativ verschiedenen $CD8^+$ T-Zell Priming führen, und die hier beobachtete verminderte Expression von proinflammatorischen Zytokinen erklären. Zum Beweis dieser Theorie fehlt jedoch noch der direkte Nachweis einer unterschiedlichen Differenzierung von naiven $CD8^+$ Zellen in HLA B27-positiven und -negativen Spendern.

Wie bereits erwähnt, wurde die geringere Expression proinflammatorischer Zytokine gleichermassen in HLA B27-positiven AS-Patienten und HLA B27-positiven gesunden Spendern beobachtet. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass, obwohl etwa 90-95% aller AS Patienten HLA B27 positiv sind und HLA B27 deshalb für den Ausbruch der Erkrankung nahezu unerlässlich sein dürfte, diese Tatsache nicht allein durch eine verringerte Zytokinproduktion erklärt werden kann. Es scheint also einen oder mehrere Kofaktoren zu geben, die bei HLA B27-positiven Personen dazu führen, dass die Krankheit entsteht. In diesem Kontext können die in der Einleitung angeführten Untersuchungen an HLA B27 transgenen Ratten, die den Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer der AS-ähnelnden Erkrankung und dem Kontakt mit Pathogenen unterstreichen (9-11), wichtige Hinweise liefern.
Zusammengenommen mit der geringeren Expression proinflammatorischer Zytokine in $CD8^+$ T-Zellen könnte sich dann folgendes Szenario ergeben: In einer Auseinandersetzung mit intrazellulären Erregern, bei deren Bekämpfung $CD8^+$ T-Zellen und deren TNF$\alpha$ und IFN$\gamma$ Sekretion eine wichtige Rolle spielen, führt die verringerte Zytokinproduktion in HLA B27-positiven Personen zu einer schwächeren und möglicherweise dadurch auch qualitativ unterschiedlichen Immunantwort. Dies könnte einerseits zu einer längeren Verweildauer von Infektionserregern im Organismus führen. Ebenso ist es denkbar, dass durch diese längere Verweildauer und eine qualitativ andere Immunantwort Mechanismen in Gang gesetzt werden, die bei HLA B27-negativen Personen nicht auftreten. Dadurch könnten dann die in der Einleitung erwähnten möglichen Pathomechanismen, wie z.B. molekulares Mimikri, Homodimerbildung oder auch eine Präsentation spezieller Peptide auf HLA B27 erst ermöglicht werden.

Interessanterweise wird ein Zusammenhang zwischen Infektionen, Ankylosierender Spondylitis und HLA B27 zusätzlich durch die 60-80% Assoziation von HLA B27 mit Reaktiver Arthritis und den häufigen Übergang von Reaktiver Arthritis in eine AS nach einer Infektion mit Pathogenen wie Chlamydien, Yersinien und Salmonellen unterstützt. Gleichwohl macht der unterschiedliche Beginn und Verlauf dieser Erkrankungen und die ebenso unzureichend geklärte Pathogenese der Reaktiven Arthritis eine klare Interpretation schwierig (78).

Dieser soeben dargestellten Theorie der Entwicklung einer AS widersprechen auf den ersten Blick Berichte über einen sehr erfolgreichen Einsatz von TNFα blockierenden Antikörpern und löslicher TNFα Rezeptoren in der Therapie der Ankylosierenden Spondylitis (79, 80). Ausgehend von einer verringerten Expression von TNFα als einer der Ursachen der Erkrankung, könnte eine Blockade dieses Zytokins die Erkrankung theoretisch eher verstärken. Um dies richtig einschätzen zu können, ist es allerdings wichtig zu bedenken, zu welchem Zeitpunkt diese Medikamente eingesetzt werden. Mit dem Einsatz der die TNFα Wirkung blockierenden Medikamente zur Therapie der Ankylosierenden Spondylitis wird erst begonnen, wenn die Krankheit sich schon massiv manifestiert, und eine grosse Menge an TNFα im Gelenk gefunden werden kann (81). Dabei beruht die positive Wirkung der Antikörper und der löslichen TNFα-Rezeptoren unter anderem darauf, dass TNFα gebunden und dessen Wirkung im Organismus dadurch abgeschwächt oder blockiert wird. Dadurch wird die gegen körpereigene Strukturen gerichtete, fehlgeleitete Entzündungsreaktion, in der TNFα eine zentrale Rolle spielt, herunterreguliert und dies wirkt sich positiv auf den Krankheitsverlauf aus. Die dabei ablaufenden Mechanismen stehen jedoch im Gegensatz zum Beginn der Erkrankung, wie er hier dargestellt wurde. Zu diesem Zeitpunkt ist die TNFα Expression gegen körperfremde Pathogene gerichtet, und eine verringerte Sekretion dieses Entzündungsmediators in HLA B27-positiven Personen erschwert die Bekämpfung der Erreger. Aus diesem Grund schliesst der erfolgreiche Einsatz von anti-TNFα Antikörpern zur Therapie der manifesten Ankylosierenden Spondylitis nicht aus, dass zum Beginn der Erkrankung eine verringerte Produktion proinflammatorischer Zytokine in $CD8^+$ T-Zellen ein entscheidender Faktor zur Krankheitsentstehung sein könnte. Zudem ist der Effekt

der TNFα Neutralisation mit anti-TNFα Antikörpern oder löslichem TNFα-Rezeptor nicht nur auf in $CD8^+$ T-Zellen gebildetes TNFα beschränkt und es ist unklar, in welchem Ausmass die Stärke der $CD8^+$ T-Zell Zytokinproduktion die lokale Entzündung in einer bereits bestehenden Erkrankung beeinflusst.

Da eine chronisch entzündliche Erkrankung wie die Ankylosierende Spondylitis durch eine Expansion krankheitsunterhaltender T Zell Subpopulationen charakterisiert sein könnte, untersuchten wir auch das periphere Blut daraufhin, ob eine Akkumulation spezifischer durch CD27 und CD45RA definierter Untergruppen nachweisbar ist. Die mögliche Anhäufung bestimmter $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zell Subpopulationen könnte auch Hinweise darauf gegeben, welche Immunmechanismen in diesen chronischen Krankheitsprozess involviert sind.
Als Resultat zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der durch CD45RA und CD27 definierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zell Subpopulationen zwischen HLA B27-negativen gesunden, HLA B27-positiven gesunden und an AS erkrankten Personen. Trotz mehrjähriger Krankheitsdauer kam es bei den Patienten nicht zu einer im peripheren Blut erkennbaren Expansion einer oder mehrerer $CD4^+$ und $CD8^+$T-Zell Populationen. In diesem Aspekt gleicht die Ankylosierende Spondylitis also Erkrankungen wie der Rheumatoide Arthritis, der Multiplen Sklerose und dem Typ I- Diabetes (63, 67, 68). Dies könnte bedeuten, dass es nicht zu einer signifikanten Anhäufung krankheitsassoziierter T-Zell Subpopulationen kommt. Andererseits führt die an vielen Stellen im Körper bestehende chronische Entzündung in AS Patienten zu einer, unter anderem über Chemokine und Zytokine vermittelten, Rekrutierung von Lymphozyten. Deshalb ist es nicht auszuschliessen, dass gerade diejenigen T-Zellen, die den Krankheitsprozess unterhalten, im entzündeten Gewebe gefangen sind und nicht in ausreichendem Masse rezirkulieren, um im peripheren Blut eine nachweisbare Änderung der prozentualen Verteilung zu bewirken.

In der Studie von Rudwaleit et al (25) hatten sich zwischen HLA B27-positiven und HLA B27-negativen Personen signifikante Unterscheide in der Zytokinproduktion von $CD4^+$ T-Zellen gefunden. Deshalb war es ein Ziel dieser Studie zu untersuchen, ob damit auch eine geringere *in vivo* TH1/TH2 Differenzierung in HLA B27-positiven Personen einhergeht. Auch wenn die Ergebnisse für $CD4^+$ T-

Zellen in dieser Arbeit nicht bestätigt wurden, ist dies trotzdem interessant. Möglicherweise könnte nämlich eine geringere TH1 Differenzierung in $CD4^+$ T-Zellen, die sich nicht auf die absolute Frequenz an IFNγ-produzierenden $CD4^+$ T-Zellen auswirken muss, das Antigenpriming von $CD8^+$ Zellen so beeinflussen, dass diese infolgedessen weniger proinflammatorische Zytokine produzieren. Ebenso ist eine umgekehrte Wechselwirkung von $CD8^+$ T Zellen auf die *in vivo* TH1/TH2 Differenzierung von $CD4^+$ T- Zellen denkbar.

Um einen potentiellen Einfluss auf die *in vivo* TH1/TH2 Differenzierung zu analysieren, wählten wir als deren Mass die Korrelation von IFNγ und IL-4 Produktion in Gedächtnis $CD4^+$ T-Zellen. Dabei zeigt die Stärke der negativen Korrelation von IFNγ und IL-4 Produktion das Ausmass der Differenzierung in TH1, bzw. TH2 Richtung an. Um die Genauigkeit und Sensitivität der Untersuchungen zu erhöhen, wurde diese Korrelation in verschiedenen Gedächtnis $CD4^+$ T-Zell Populationen ermittelt. Dazu wurde unter anderem der Oberflächenmarker CD27 benutzt, der erst nach mehrfacher Stimulation auf Gedächtnis $CD4^+$ T-Zellen herunterreguliert wird, und dadurch dazu dienen kann, Gedächtnis $CD4^+$ T-Zellen in ein oder mehrfach stimulierte Zellen zu unterscheiden (66).

Als Bestätigung für unseren methodischen Ansatz konnten wir nur in $CD27^-$, also mehrfach stimulierten, differenzierten Gedächtnis $CD4^+$ T-Zellen, eine negative Korrelation von IFNγ und IL-4 Expression feststellen. Dies lässt sich sehr gut mit der Theorie in Einklang bringen, dass vor allem nach mehrfacher Stimulation eine Th-Zelle in Richtung TH1 oder TH2 getrieben wird. Zwar war diese negative Korrelation nicht sonderlich stark verglichen mit *in vitro* TH1 oder TH2 Kulturen, und etwas geringer als in aus Schistosoma-Granulomen isolierten $CD4^+$ T-Zellen (82). Bei diesem Vergleich muss man aber in Betracht ziehen, dass die von uns untersuchten Zellen eine sehr heterogene Population darstellen und deren Differenzierung in der Mehrzahl sicher nicht unter ebenso stark TH1/TH2-Differenzierung favorisierenden Bedingungen stattgefunden hat.

Im Vergleich zwischen HLA B27-negativen und HLA B27-positiven gesunden Personen und an AS erkrankten Patienten konnten wir jedoch keinerlei Unterschiede in der Korrelation von IFNγ und IL-4 Produktion in den verschiedenen $CD4^+$ Gedächtnis T-Zell Subpopulationen feststellen. Somit lässt sich eine veränderte TH1/TH2 Differenzierung in $CD4^+$ T-Zellen wohl als Ursache

einer geringeren Zytokinproduktion in $CD8^+$ T-Zellen von HLA B27-positiven Personen ausschliessen. Auch scheint die verminderte Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF$\alpha$ und IFN$\gamma$ in HLA B27-positiven Personen die *in vivo* TH1/TH2 Differenzierung der $CD4^+$ T-Zellen nicht signifikant zu beeinflussen.

Auch wenn bei HLA B27-positiven und -negativen Personen keine Unterschiede feststellbar waren, konnte bei humanen peripheren T-Zellen auf Einzellebene gezeigt werden, dass das TH1/TH2 Paradigma in einer schwachen, aber doch signifikanten Form, bei differenzierten Gedächtnis $CD4^+$ T-Zellen nachweisbar ist. Ebenso zeigt diese Arbeit, dass der Verlust der Oberflächenexpression von CD27 *in vivo* ein gutes Merkmal zur Unterscheidung zwischen noch nicht und schon in TH1/TH2 Richtung getriebenen $CD4^+$ T-Zellen zu sein scheint. In diesem Zusammenhang ist auch bedeutsam, dass diese mehrfache Stimulation nicht nur zu einer TH1 oder TH2 gerichteten, sondern auch signifikant gesteigerten IFN$\gamma$-, IL-4 und TNF$\alpha$ Sekretion führt. Ebenso war die Expression von IL-10 zwar erhöht, aber nicht signifikant unterschiedlich. Somit waren alle untersuchten Zytokine, wenn auch im Falle des IL-10 nicht signifikant, stärker in $CD27^-$ differenzierten Gedächtnis Th Zellen exprimiert.

Interessanterweise konnte eine Studie von De Jong et al (66) zeigen, dass als Reaktion auf eine Stimulation mit sogenannten Recall-Antigenen, z.B. mit Tetanus Toxoid bei Tetanus Geimpften, oder mit dem jeweiligen Allergen bei Atopikern, vor allem $CD27^-$ Gedächtnis $CD4^+$ T-Zellen proliferieren. Zusammen mit den Ergebnissen unserer Studie führt uns dies zu der Schlussfolgerung, dass diejenigen $CD4^+$ T-Zellen, die für die schnelle und effiziente Auseinandersetzung mit einem Antigen, mit dem sich der Körper schon mehrmals auseinandergesetzt hatte, verantwortlich sind, vor allem unter jenen differenzierten $CD27^-$ Gedächtnis $CD4^+$ T-Zellen zu finden sind. Im Gegensatz zu $CD27^+$ Gedächtnis $CD4^+$ T-Zellen besitzen sie schon ein an das Antigen adaptiertes Zytokinprofil und zusammen mit einer gleichzeitig höheren Frequenz an Zytokinproduzenten, ermöglicht dies eine passgenauere, stärkere und deshalb schnellere und effizientere Art das Antigen anzugehen.