

CHARITÉ-UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
CAMPUS BENJAMIN FRANKLIN
AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK I
GASTROENTEROLOGIE / INFEKTILOGIE / RHEUMATOLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. M. ZEITZ

**IDENTIFIZIERUNG IMMUNDOMINANTER T-ZELL-EPITOPE BEI
PATIENTEN MIT VERSCHIEDENEN FORMEN VON ARTHRITIDEN
UNTER VERWENDUNG DER ANTIGENSPEZIFISCHEN
DURCHFLUßZYTOMETRIE**

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE
DER CHARITÉ-UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
CAMPUS BENJAMIN FRANKLIN

VORGELEGT VON
MALGORZATA LANOWSKA AUS BRESLAU

REFERENT: PROF. DR. MED. J. SIEPER

KOREFERENT: PROF. DR. MED. C. SCHEIBENBOGEN

GEDRUCKT MIT GENEHMIGUNG DER CHARITÉ-UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN

CAMPUS BENJAMIN FRANKLIN

PROMOVIERT AM: 25.02.2005

Für meine Eltern

1.	EINLEITUNG	8
1.1.	DAS IMMUNSYSTEM	8
1.1.1.	Spezifische und unspezifische Immunabwehr	8
1.1.2.	Der Haupthistokompatibilitätskomplex	10
1.1.3.	T-Helfer-Lymphozyten: Subpopulationen der Th1- und Th2-Zellen	11
1.2.	SPONDYLARTHROPATHIEN	13
1.2.1.	Reaktive Arthritis	14
1.2.2.	Ankylosierende Spondylitis	14
1.2.3.	Immunpathogenetische Vorstellungen bei Spondylarthropathien	15
1.3.	RHEUMATOIDE ARTHRITIS	22
1.3.1.	Krankheitsbild und Therapiemöglichkeiten der rheumatoiden Arthritis	22
1.3.2.	Immunpathogenetische Hypothesen bei der rheumatoiden Arthritis	23
1.4.	ZIEL DER ARBEIT	26
2.	PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	29
2.1.	PATIENTEN	29
2.1.1.	Charakterisierung der Patienten mit reaktiver Arthritis	29
2.1.2.	Charakterisierung der Patienten mit ankylosierender Spondylitis	30
2.1.3.	Charakterisierung der Patienten mit rheumatoider Arthritis	31
2.1.4.	HLA-Typisierung	33
2.2.	MATERIAL	34
2.2.1.	Chemikalien, Lösungen und Medien	34
2.2.2.	Antigene und monoklonale Antikörper	35
2.2.3.	MACS (Magnetic Cell Separation) Cytokine Secretion Assay	37
2.2.4.	Zellkultur	38
2.2.5.	Selektion der HLA-B27 bindenden Peptide	38
2.3.	METHODEN	41
2.3.1.	Isolierung von humanen mononukleären Zellen	41
2.3.1.1.	Isolierung der mononukleären Zellen aus peripherem Blut bzw. Synovialflüssigkeit	41
2.3.1.2.	Bestimmung der Zellzahl	41
2.3.1.3.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	42
2.3.2.	Stimulation von mononukleären Zellen in vitro	42
2.3.2.1.	Stimulation der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) und der Synovialflüssigkeit (SFMCS)	43
2.3.2.2.	Vollblutstimulation	43
2.3.3.	Oberflächenfärbung und intrazelluläre Zytokinfärbung	44
2.3.4.	Technologie der zellulären Affinitätsmatrix	45
2.3.4.1.	Detektion IFN γ -sezernierender Zellen	45
2.3.4.2.	Zellseparation	48
2.3.5.	Kultivierung IFN γ -sezernierender Zellen	50
2.3.6.	Restimulation expandierter IFN γ -sezernierender Zellen	51
2.3.7.	Durchflußzytometrie	52
2.3.7.1.	Prinzipien der Durchflußzytometrie	52
2.3.7.2.	Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären Zytokinfärbung	54
2.3.7.3.	Durchflußzytometrische Analyse bei Technologie der zellulären Affinitätsmatrix	56
2.3.7.4.	Durchflußzytometrische Analyse nach Expansion IFN γ -sezernierender Zellen	56
2.3.8.	Statistik	56
3.	ERGEBNISSE	58
3.1.	IDENTIFIZIERUNG IMMUNDOMINANTER T-ZELL-EPITOPE BEI PATIENTEN MIT REAKTIVER ARTHRITIS	58
3.1.1.	Bestimmung der Feinspezifität von antigenspezifischen CD4 ⁺ -T-Zellen bei Chlamydia-trachomatis-induzierter reaktiver Arthritis	58
3.1.1.1.	Antigenstimulation des peripheren Blutes und der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Chlamydien-induzierter reaktiver Arthritis	59
3.1.1.2.	Isolierung antigenspezifischer CD4 ⁺ -T-Zellen	61

Abkürzungen

19kD	19 kiloDalton-Protein
AG	Antigen
AK	Antikörper
APC	antigen presenting cell, Antigen präsentierende Zellen
AS	ankylosierende Spondylitis
BSA	Bovines Serum Albumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CD	Cluster of differentiation
CFDA-SE	Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester
Ch.	Chlamydia
Ch.t.	Chlamydia trachomatis
CRP	C-reaktives Protein
CT579	Chlamydia trachomatis protein 579
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxynucleid acid
EDTA	Ethylendiamin-Tetracetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immunospot
F	Fragment
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
FL	Flouerszenzkanal
FSC	forward scatter, Streulichtdetektor für Vorwärtslicht
g	Umdrehungen pro minute
h Hsp	human heat shock protein
HBSS	Hanks´ Balanced Salt Solution
HC gp-39	human cartilage glycoprotein 39
HLA	human leukocyte antigen
Hsp	heat shock protein
HSP-Medium	human serum protein-Medium

IFN γ	Interferon- γ
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IQR	Interquartilsbereich
mAb	monoclonal antibody
MACS	magnetic cell separation
MHC	major histocompatibility complex
min.	Minuten
Momp	major outer membrane protein
mRNA	messenger ribonuclein acid
MW	Mittelwert
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
OMP2	outer membrane protein 2
PB	peripheres Blut
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll protein
PHA	Phytohämagglutinin
pmpD	putativ outer membrane protein D
p	Signifikanzniveau
RA	Rheumatoide Arthritis
ReA	Reaktive Arthritis
RPMI-Medium	Rosewell Park Memorial Institut- Medium
R	Region
SD	Standardabweichung
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
SF	Synovialflüssigkeit
SFMC	synovial fluid mononuclear cells
SpA	Spondylarthropathien
SSC	side scatter, Streulichtdetektor für Seitwärtslicht

SSP	sequenzspezifische Primer
TCR	T-cell-receptor
TGF β	tumor growth factor- β
Th	T-Helfer-Zellen
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
uSpA	unspezifische Spondylarthropathien
Y.e.	<i>Yersinia enterocolitica</i>

1. Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse von immundominanten T-Zell-Epitopen, die bei der Pathogenese von rheumatischen Erkrankungen ursächlich beteiligt sein könnten.

Die Arbeit gliedert sich in zwei Teile, von denen sich der erste mit den Spondylarthropathien (SpA), hier insbesondere mit der reaktiven Arthritis (ReA) und der ankylosierenden Spondylitis (AS), und der zweite mit der rheumatoiden Arthritis (RA) beschäftigt.

1.1. Das Immunsystem

1.1.1. Spezifische und unspezifische Immunabwehr

Das Immunsystem verteidigt den Organismus gegen Infektionen. Seine beiden Grundpfeiler bilden die angeborene und die erworbene (adaptive) Immunität.

Die angeborene Immunität besteht in einer unspezifischen Abwehr des Organismus gegen die Krankheitserreger, die dabei nicht spezifisch erkannt werden, so daß keine Verbesserung der Wirkung durch mehrfache Exposition möglich ist. Die angeborene Immunität wird im Wesentlichen durch die Phagozyten (v.a. die Neutrophilen Granulozyten und die Makrophagen), die Natürlichen Killerzellen, das Komplementsystem und die Akute-Phase-Proteine getragen (Ezekowitz and Hoffmann 1996).

Die erworbene Immunität ist spezifisch. Ihre Grundlage bilden die B- und T-Lymphozyten, die neben der Spezifität für eine bestimmte antigene Struktur, die Fähigkeit zur klonalen Expansion sowie ein immunologisches Gedächtnis besitzen. Lymphozyten haben auf ihrer Oberfläche Antigenrezeptoren, deren variable Regionen die Antigenpezifität (Monospezifität) der Zellen bestimmen. Die Antigen-Erkennung während der adaptiven Immunantwort wird durch zwei unterschiedliche Gruppen von hochvariablen Rezeptormolekülen vermittelt, nämlich durch die Immunglobuline (Antikörper, AK), die den B-Zellen als Rezeptoren dienen, und durch

die antigenspezifischen Rezeptoren auf T-Zellen. Die Vielfalt der Antigenrezeptoren basiert darauf, daß für jede der variablen Regionen zahlreiche Gensegmente vorhanden sind, die zufällig kombiniert werden können (somatische Rekombination) (Fugmann, Lee et al. 2000).

Es können grundsätzlich humorale und zelluläre Abwehrmechanismen der adaptiven Immunantwort unterschieden werden. Die humorale Immunität, die für die Eliminierung von extrazellulären Erregern und für die Neutralisierung von Toxinen entscheidend ist, wird durch die Immunglobuline vermittelt. Die Immunglobuline werden einerseits als Rezeptoren auf der Oberfläche von B-Zellen exprimiert und andererseits durch von Antigenen spezifisch aktivierte, klonal proliferierte B-Effektorzellen (Plasmazellen) sezerniert. Sezernierte Antikörper binden Pathogene oder ihre toxischen Produkte in extrazellulären Räumen des Körpers. Die Antikörper-Bindung neutralisiert Viren und markiert Krankheitserreger für die Zerstörung durch Phagozyten und das Komplementsystem (Davies and Cohen 1996). Langlebige Plasmazellen, die einen erhöhten Antikörper-Titer für eine bestimmte Zeit nach der Infektion aufrechterhalten, und Gedächtnis-B-Zellen, die im Falle einer Reinfektion für die Produktion von hochaffinen Antikörpern sorgen, bilden die Basis der langfristigen humoralen Immunität (McHeyzer-Williams and Ahmed 1999).

Zelluläre Abwehrmechanismen sind für die Bekämpfung von intrazellulären Erregern entscheidend und T-Zell-abhängig. T-Zellen können die Anwesenheit intrazellulärer Krankheitserreger erkennen, da infizierte Zellen auf ihrer Oberfläche Peptidfragmente präsentieren, die aus den Proteinen der Pathogene stammen. Diese antigen wirkenden Peptide werden von spezialisierten Glykoproteinen der Wirtszellen (den Haupthistokompatibilitätsmolekülen, MHC-Molekülen) an die Zelloberfläche gebracht und über den T-Zell-Rezeptor (TCR) durch T-Zellen erkannt (Germain 1994). Nach Antigenkontakt proliferieren die T-Zellen klonal und differenzieren zu Effektor- und Gedächtniszellen. Letztere sind wiederum für eine effiziente Erregerbekämpfung im Falle einer Reinfektion entscheidend (Rogers, Dubey et al. 2000).

1.1.2. Der Haupthistokompatibilitätskomplex

Die Haupthistokompatibilitätsmoleküle entdeckte man im Rahmen der Transplantationsforschung, indem ihr starker Einfluß auf die Immunantwort gegen transplantierte Gewebe beobachtet wurde. Aus diesem Grunde nannte man die Gene dieser Proteine, die in einem großen Cluster liegen, den Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) und die peptidbindenden Glykoproteine MHC-Moleküle.

Der Haupthistokompatibilitätskomplex besteht aus einer Gruppe gekoppelter genetischer Loci, die viele der Proteine kodieren, die an der Präsentation von Antigenen für T-Zellen beteiligt sind. Das herausragendste Merkmal der MHC-Gene ist ihr ausgeprägter Polymorphismus, der für die Antigenerkennung durch T-Zellen von wesentlicher Bedeutung ist.

Die Reaktion der T-Zellen auf Antigene ist durch eine MHC-Abhängigkeit geprägt, d.h. eine T-Zelle nimmt ein Antigen als solches wahr, wenn es an eine bestimmte allele Variante des MHC-Moleküls gebunden ist (Germain 1994).

Es werden drei Klassen von Genen im MHC unterschieden: Die Klasse I kodiert die schwere transmembranöse α -Kette des MHC-I-Moleküls, die in drei Formen als HLA-A, -B und -C vorkommt, und die nicht kovalent gebundene β -Kette (β 2-Mikroglobulin) (Maenaka and Jones 1999). Die Klasse II enthält die Gene für die MHC-II-Moleküle, bei denen es sich um transmembranöse Heterodimeren jeweils aus α - und β -Kette bestehend, handelt. Es gibt drei Paare von α - und β -Ketten-Genen für die Klasse II, genannt HLA-DR, -DP und -DQ (Fremont, Hendrickson et al. 1996). Klasse-III-Gene haben Produkte wie die Komplementkomponenten C2, Faktor B und C4 oder die Tumornekrosefaktoren α und β , die wichtige Immunfunktionen besitzen. In der MHC-Region befinden sich außerdem weitere Gene, deren Produkte für die Antigenprozessierung und -präsentation von Bedeutung sind (Peptidtransporter TAP, die Proteasomenuntereinheiten LMP2 und LMP7 und die Chaperone) (Maenaka and Jones 1999).

Die Proteinprodukte von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Genen sind hochpolymorph – für manche Genloci existieren über 100 verschiedene Allele. Die

beiden Allele für einen Genlocus werden kodominant exprimiert. MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen des menschlichen Organismus mit Ausnahme der Chorionzotten exprimiert. Sie dienen der Präsentation von endogenen Antigenen (intrazelluläre Bakterien, Viren), die im Zytosol prozessiert und im endoplasmatischen Reticulum an MHC-I-Moleküle gebunden werden (Germain 1994; Song and Harding 1996), an die CD8⁺-Zellen. MHC-Klasse-II-Moleküle befinden sich auf antigenpräsentierenden Zellen (Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen). Antigene, die an MHC-Klasse-II-Moleküle binden, werden in angesäuerten Endosomen abgebaut (Harding and Geuze 1993) und den CD4⁺-Zellen präsentiert. Durch den oben beschriebenen Polymorphismus werden drei wichtige Eigenschaften der MHC-Moleküle beeinflusst: das Spektrum der Peptide, die gebunden werden, die Konformation des gebundenen Peptids und die direkte Wechselwirkung des MHC-Moleküls mit den T-Zell-Rezeptor. Folglich hat die polymorphe Natur des MHC Auswirkungen auf seine Funktionsweise, und die evolutionäre Selektion dieses Polymorphismus weist darauf hin, daß er für die Aufgaben der MHC-Moleküle bei der Immunantwort von entscheidender Bedeutung ist.

1.1.3. T-Helfer-Lymphozyten: Subpopulationen der Th1- und Th2-Zellen

Naive T-Zellen können sich nach einer Aktivierung entweder zu einer Th1- oder zu einer Th2-Zelle entwickeln, die unterschiedliche Zytokine synthetisieren und sich daher in ihrer Funktion unterscheiden (Abbas, Murphy et al. 1996; Mosmann and Sad 1996). Von dieser Differenzierung der T-Helfer-Zellen, die unterschiedliche Zytokine ausschütten, ist eine adäquate und effektive Immunantwort abhängig.

Die Th1-Zellen sezernieren die Zytokine Interleukin-2 (IL2) und Interferon- γ (IFN γ) und sind für die effektive zelluläre Immunantwort entscheidend, die Th2-Zellen produzieren IL4, IL5 und IL10, die für die humorale Immunantwort von Bedeutung sind. Entsprechende Muster wurden sowohl im Maussystem (Mosmann, Schumacher et al. 1991) als auch für humane Zellen nachgewiesen (Romagnani 1991).

Die verschiedenen Zytokinmuster haben nicht nur unterschiedliche Funktionen, sondern sie können auch inhibitorisch auf die Expression des jeweils anderen

Zytokinmusters wirken: IL10 hemmt die Th1-Antwort durch Inhibierung der Produktion von Th1-Zytokinen (Fiorentino, Bond et al. 1989), IFN γ hemmt die Th2-Antwort, indem es die Proliferation von Th2-Zellen verhindert (Fitch, McKisic et al. 1993).

Als erstes Zytokin, welches die Induktion der Differenzierung in Richtung Th1-Zellen fördert, entsteht das von Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten, B-Zellen und dendritischen Zellen gebildete IL12 (Heufler, Koch et al. 1996). Als Induktor der Th2-Antwort fungiert das hauptsächlich von T-Zellen gebildete IL4 (Seder and Paul 1994). Außer diesen beiden Subpopulationen existieren auch sogenannte Th0- und Th3-Zellen. Th0-Zellen sind in der Lage, sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine zu sezernieren (Firestein, Roeder et al. 1989), Th3-Zellen sezernieren große Mengen an dem Transforming Growth Factor β (TGF β) (Chen, Kuchroo et al. 1994).

Die Entscheidung, in welcher Richtung sich eine naive CD4⁺-Zelle entwickelt, fällt bei ihrem ersten Kontakt mit einem Antigen, durch welches die naiven CD4⁺-Zellen zu Effektor-Zellen aktiviert werden (Mosmann and Sad 1996). Sie wird durch zahlreiche Faktoren (Art und Konzentration des Antigens, Art der antigenpräsentierenden Zelle, Zytokinmilieu am Ort der Immunantwort) beeinflusst (Abbas, Murphy et al. 1996).

Eine reine Th1- oder Th2-Antwort stellt allerdings eine extreme Polarisierung der Zellen *in vitro* dar, *in vivo* werden T-Zell-Antworten in dieser Form bei normaler Immunität nur selten beobachtet (Sher and Coffman 1992; Romagnani 1994). Bei chronischen Erkrankungen jedoch nimmt die Polarisierung mit der Chronifizierung der Erkrankung zu, besonders bei persistierenden Antigenen, die nicht eliminiert werden können (Romagnani 1994; Abbas, Murphy et al. 1996).

Die Balance zwischen der Th1- und Th2-Antwort ist für eine effektive, den Organismus schützende Immunität entscheidend, ein gestörtes Th1/Th2-Zytokingleichgewicht kann die Grundlage von Autoimmunerkrankungen sein (Paul and Seder 1994; Abbas, Murphy et al. 1996).

Einer Überexpression der Th1-Zytokine wurde eine Bedeutung für die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (Mauri, Williams et al. 1996) und Diabetes mellitus (Rapoport, Jaramillo et al. 1993) zugeschrieben.

Eine pathologische Th2-Antwort spielt bei der Entstehung von allergischen

Reaktionen (Typ I) eine Rolle (Robinson, Hamid et al. 1992; Romagnani 1994).

Auch unter CD8⁺-Zellen lassen sich nach Antigenstimulation Subpopulationen mit einem Th1-ähnlichen Zytokinmuster und mit einem Th2-ähnlichen Zytokinmuster beobachten (Sad, Marcotte et al. 1995).

1.2. Spondylarthropathien

Zu den Spondylarthropathien (SpA) zählen die ankylosierende Spondylitis (AS), die reaktive Arthritis (ReA), die Arthritis-Spondylitis bei entzündlichen Darmerkrankungen (M. Crohn, Colitis ulcerosa), die Arthritis-Spondylitis bei Psoriasis und die undifferenzierte Spondylarthropathie (uSpA) (Sieper and Braun 1995). Gemeinsam ist diesen Erkrankungen die Assoziation mit dem HLA-B27, das gleiche Muster der peripheren Gelenkbeiteiligung (asymmetrischer Befall der Gelenke, betroffen ist v.a. die untere Extremität) und das mögliche Auftreten von Sakroiliitis, Spondylitis, Enthesitis (Entzündung der Sehnenansatzpunkte) und Uveitis (Dougados, van der Linden et al. 1991). Die Assoziation mit HLA-B27 wird v.a. bei Patienten mit Wirbelsäulenmanifestation, Enthesitis und Uveitis, weniger dagegen bei peripherer Arthritis beobachtet.

Die Pathogenese der Spondylarthropathien ist nicht vollständig geklärt.

Bei allen Formen der SpA spielen wahrscheinlich Autoimmunmechanismen eine ursächliche Rolle in der Pathogenese. Es werden allerdings auch bakterielle Antigene (als initialer Trigger und im Falle einer Chronifizierung als persistierendes Agens) für die Entstehung der Erkrankungen – v.a. der reaktiven Arthritis– gefordert. Die bei allen Formen der SpA vorhandene Assoziation mit HLA-B27 spricht für die Bedeutung einer genetischen Komponente.

Das immunpathogenetische Konzept zur Entstehung von Spondylarthropathien basiert also auf einer Interaktion zwischen dem bakteriellen Antigen, den MHC-Molekülen und den T-Zellen (Sieper and Braun 1995).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei Formen der SpA, nämlich der reaktiven Arthritis und der ankylosierenden Spondylitis, deshalb werden im Folgenden diese beiden Krankheitsbilder unter immunpathogenetischen Gesichtspunkten kurz vorgestellt.

1.2.1. Reaktive Arthritis

Zu einer reaktiven Arthritis kommt es nach vorausgegangener Infektion des Urogenitaltraktes mit *Chlamydia trachomatis* (Ch.t.) oder des Darmes mit verschiedenen Enterobakterien (Yersinien, Salmonellen, *Campylobacter*, Shigellen).

Klinisch kommt es wenige Tage bis zu 6 Wochen nach dem primären Infekt zu einer Arthritis, die in der Regel ein typisches Muster zeigt (Mono- oder Oligoarthritis mit Bevorzugung der unteren Extremität, wobei am häufigsten das Kniegelenk betroffen ist). Eine Sonderform der ReA ist das Reiter-Syndrom, welches durch das Auftreten der Trias: Arthritis, Urethritis und Konjunktivitis gekennzeichnet ist.

Die ReA ist eine weltweit verbreitete Krankheit. 1-5% der vorher an einem gastrointestinalen oder urogenitalen Infekt Erkrankten entwickeln eine Arthritis. Das typische Manifestationsalter liegt bei 20-40 Jahren, die Geschlechtsverteilung ist nach enteralen Infektionen ausgeglichen, nach urogenitalen Infekten erkranken Männer häufiger. 70-80% dieser Patienten sind positiv für HLA-B27 (Sieper and Braun 1999).

Die Grundlage der medikamentösen Therapie der ReA bilden die nichtsteroidalen Antirheumatika. Glukokortikoide werden überwiegend intraartikulär bei persistierender Entzündungsaktivität einzelner Gelenke sowie lokal bei Enthesiopathien eingesetzt. Eine erregerspezifische antibiotische Therapie ist nur bei Erregernachweis indiziert. Begleitend zur medikamentösen Therapie können physikalische Maßnahmen insbesondere krankengymnastische Übungen die Symptomatik und Funktionsfähigkeit der befallenen Gelenke positiv beeinflussen.

1.2.2. Ankylosierende Spondylitis

Die ankylosierende Spondylitis (AS) ist die häufigste Form der Spondylarthropathien und ihr typischer Repräsentant. Sie ist eine chronisch entzündliche Erkrankung von Bändern und Synovialis der Wirbelbogengelenke, der Rippenwirbelgelenke, der Iliosakralfugen sowie der Symphyse, die zur Verknöcherung und Versteifung der betroffenen Gelenke führt. Die Erkrankung tritt familiär gehäuft auf, beginnt in der Regel zwischen dem 20. und dem 40. Lebensjahr und verläuft schubweise. Männer erkranken 2-4mal häufiger als Frauen. Die Assoziation mit HLA-B27 liegt bei 90%

(Brewerton, Hart et al. 1973) (die Häufigkeit der HLA-B27-Positivität in der Allgemeinbevölkerung beträgt 8%). Die Prävalenz der AS liegt zwischen 0,2-1,2% (Gran and Husby 1993).

Leitsymptom der AS ist der über längere Zeit bestehende entzündliche Rückenschmerz, der besonders in den frühen Morgenstunden auftritt und sich durch Bewegung bessert. Es besteht sehr häufig eine Sakroiliitis. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur Ankylosierung der Sakroiliakalgelenke und zur immer weiter fortschreitenden Bewegungseinschränkung der Wirbelsäule, die bis zur völligen Einsteifung führen kann („Bambusstabwirbelsäule“).

Die ankylosierende Spondylitis kann auch mit einer Arthritis der Extremitätengelenke einhergehen. Häufig sind auch begleitend auftretende rezidivierende Uveitiden.

Radiologisch wegweisend sind eine doppelseitige Sakroiliitis, Syndesmophyten, die vor allem am thorakolumbalen Übergang auftreten, eine Spondylitis anterior sowie im Spätstadium die Bambusstabform der Wirbelsäule.

Therapeutisch versucht man die Entzündung zu hemmen und den Ossifikations- und Deformationsprozeß aufzuhalten. Neben der symptomatischen Behandlung mit nichtsteroidalen Antirheumatika ist die frühe Physiotherapie von entscheidender Bedeutung. Glukokorticoide werden intraartikulär bei peripheren therapieresistenten Arthritiden sowie Enthesiopathien eingesetzt. Sogenannte Basistherapeutika haben zur Zeit keinen großen Stellenwert in der Behandlung der AS, allenfalls gibt es positive Berichte über Sulfasalazin (Clegg, Reda et al. 1999).

Eine neue Perspektive in der Behandlung der AS bietet die Anti-Tumornekrosefaktor- α (Anti-TNF α)-Therapie (Brandt, Haibel et al. 2000; Braun, Xiang et al. 2000).

Die Ätiologie der AS ist weitgehend ungeklärt. Die enge Assoziation mit HLA-B27 spricht für eine genetische Disposition. Da aber nicht alle Patienten HLA-B27-positiv sind und von eineiigen Zwillingen ungefähr die Hälfte erkranken, werden weitere Faktoren in der Krankheitsentstehung diskutiert.

1.2.3. Immunpathogenetische Vorstellungen bei Spondylarthropathien

Die enge Assoziation der Spondylarthropathien mit HLA-B27 läßt dessen Rolle bei der Pathogenese der Erkrankungen vermuten. Das Vorhandensein von HLA-B27 ist

allerdings nur als eine genetische Disposition zu betrachten, da über 90% der HLA-B27-positiven Menschen nicht erkranken. Auf der anderen Seite hat ein HLA-B27-positiver Mensch im Vergleich zu einem HLA-B27-negativen ein etwa 40mal höheres Risiko an einer AS zu erkranken; sein Risiko nach einer Urethritis eine ReA zu entwickeln, ist entsprechend zwölfmal erhöht (Keat, Maini et al. 1978).

Die Hypothesen zur Erklärung der HLA-B27-Assoziation mit den Spondylarthropathien basieren auf der Interaktion zwischen dem HLA-B27-Molekül und Bakterien.

Die Beteiligung von Bakterien ist bei der ReA offensichtlich, eine bakterielle Genese wird aber auch für die anderen Formen der Spondylarthropathien diskutiert .

Über die Persistenz von Bakterien bei Patienten mit einer reaktiven Arthritis ist schon mehrfach berichtet worden. Durch verschiedene Techniken konnte gezeigt werden, daß lebendige Bakterien (hier v.a. *Chlamydia trachomatis* (Ch.t.)) oder bakterielle Antigene (hier v.a. die Enterobakterien) im Gelenk persistieren und daher wahrscheinlich für die Unterhaltung der lokalen Immunantwort verantwortlich sind (Sieper and Braun 1995; Sieper and Kingsley 1996).

Bisher ist es vor allem für die Chlamydien gelungen, den Erreger in lebender Form im Gelenk nachzuweisen (Gerard, Branigan et al. 1998; Wilkinson, Kingsley et al. 1998), wobei nicht nur chlamydiale DNA sondern auch mRNA mit molekularen Methoden in Biopsien der synovialen Membran von ReA-Patienten nachgewiesen werden konnte (Gerard, Branigan et al. 1998).

Der Nachweis von Enterobakterien gestaltete sich hingegen schwieriger. Es gibt einzelne Berichte über den PCR-Nachweis von *Campylobacter jejuni* (Braun, Tuszewski et al. 1997) und *Yersinia enterocolitica* (Wilkinson, Kingsley et al. 1999), sowie den Salmonellennachweis mittels anderer Techniken (Nikkari, Rantakokko et al. 1999). Aber auch hier gibt es Hinweise auf die in vivo-Persistenz, da bakterienspezifische IgA-Antikörper bis zu 2 Jahren nach der Infektion persistieren können (Toivanen, Lahesmaa-Rantala et al. 1987) und der Nachweis von *Yersinia*-Hitzeschockprotein (Hsp) in peripheren Blutmonozyten bis zu 4 Jahren nach der Infektion gelungen ist (Granfors, Merilahti-Palo et al. 1998). Ein möglicher Ort für das Persistieren von Enterobakterien wäre die Darmmukosa sowie die darmnahen Lymphknoten (Sieper and Kingsley 1996), wie auch in einem Rattenmodell für

Yersinienarthritis gezeigt werden konnte (Zhang, Gripenberg-Lerche et al. 1996). Von dort ausgehend könnten v.a. bei chronischen Formen der ReA bakterielle Bestandteile in die Gelenke abgesiedelt werden. So lassen sich bakterielle Oberflächenstrukturen (wie z.B. Lipopolysaccharide) tatsächlich im Gelenk nachweisen (Granfors, Jalkanen et al. 1989).

Überraschenderweise wurde in letzter Zeit mit Hilfe der PCR erregerspezifische DNA im Gelenk nachgewiesen, die von Erregern stammt, die klassischerweise nicht pathogen im Sinne der ReA sind (Kempesell, Cox et al. 2000; Cox, Kempesell et al. 2003). Dies zeigt, daß die Interpretation positiver Befunde umso schwieriger wird, je sensitiver die Nachweismethoden werden.

Es stellt sich die Frage, warum es bei den ReA-Patienten zur Persistenz der Bakterien kommt. Eine mögliche Erklärung ist das Vorhandensein einer insuffizienten Immunantwort. Es ist bekannt, daß für die rasche und effektive Eliminierung von ReA-assoziierten Bakterien wie Yersinien und Chlamydien die T-Zellantwort und hier insbesondere die Th1-Antwort eine entscheidende Rolle spielt. Die Untersuchungen von Wilkinson et al. (Wilkinson, Kingsley et al. 1998) bestätigen, daß eine verminderte T-Zellantwort im Zusammenhang mit der Persistenz der Bakterien steht. Die im Gelenk von ReA-Patienten nachgewiesene Menge chlamydialer DNA war nämlich umso höher, je weniger die spezifischen Lymphozyten dieser Patienten auf in vitro Stimulation mit abgetöteten Chlamydien proliferierten.

Andere Untersuchungen liefern Hinweise auf das Vorliegen einer gestörten Th1-Antwort bei ReA-Patienten, die sich in der verminderten Sekretion von Th1-Zytokinen wie $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ äußert (Yin, Braun et al. 1997). Für die ReA-assoziierten Bakterien wie Chlamydien und Yersinien konnte in Tierversuchen gezeigt werden, daß die Th1-Zytokine wie $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ für die schnelle und effektive Beseitigung dieser Erreger essentiell sind, während die sogenannten Th2/Th3-Zytokine wie IL4 und IL10 die Th1-Antwort hemmen und somit die Persistenz der Erreger unterstützen (Bohn and Autenrieth 1996; Yang, Gartner et al. 1999). $\text{TNF}\alpha$ scheint dabei eine besondere Bedeutung zu besitzen: die Lymphozyten von Patienten mit einer frühen ReA sezernieren weniger $\text{TNF}\alpha$ als Patienten mit einer unbehandelten rheumatoiden

Arthritis, und die Krankheitsdauer ist bei Patienten mit einer niedrigen $\text{TNF}\alpha$ -Produktionsrate länger als bei solchen mit einem hohen $\text{TNF}\alpha$ -Level (Braun, Yin et al. 1999). Auch andere Autoren berichteten über einen relativen Mangel an Th1-Zytokinen (Smeets, Dolhain et al. 1998) und einen relativen Überschuß an Zytokinen wie IL10 (Kotake, Schumacher et al. 1999) bei Patienten mit ReA.

Es konnte auch gezeigt werden, daß die inhibierte $\text{TNF}\alpha$ - bzw. $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion durch die in vitro Gabe von Anti-IL10 reversibel ist, was für den relativen Überschuß an IL10 als verantwortlichen Faktor für die Suppression der Th1-Zytokine spricht (Yin, Braun et al. 1997). In vitro Zugabe von IL12 bewirkte ebenfalls einen Anstieg der Sekretion der Th1-Zytokine durch die T-Zellen von Patienten mit ReA, was gegen einen inhärenten Th1-Block spricht.

Die ankylosierende Spondylitis ist mit der reaktiven Arthritis eng assoziiert. Nach Untersuchungen von Leirisalo-Repo (Leirisalo-Repo 1998) entwickeln 20-40% der HLA-B27-positiven ReA-Patienten eine ankylosierende Spondylitis. Dabei stellt sich natürlich die Frage, ob die ReA-assoziierten Erreger bei der Pathogenese der ankylosierenden Spondylitis ebenfalls eine Rolle spielen. Einen Hinweis darauf liefern die Untersuchungen von Braun et al., die solche Erreger in den peripheren Gelenken nachweisen konnten. Die Ileosakralbiopsien ergaben dagegen einen negativen Befund (Braun, Tuszewski et al. 1997).

Ähnlich wie bei der ReA wurde auch bei der AS die Th1/Th2-Dichotomie untersucht. Rudwaleit et al. (Rudwaleit, Siegert et al. 2001) fanden eine signifikant geringere Produktion von den Th1-Zytokinen $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ sowohl bei HLA-B27-positiven AS-Patienten als auch bei HLA-B27-positiven gesunden Kontrollen im Vergleich zu gesunden HLA-B27-negativen Personen. Inwieweit dies zur Pathogenese der AS beiträgt, bleibt noch unklar. Erste Genotyp/Phänotyp-Korrelationen gaben einen Hinweis darauf, daß der $\text{TNF}\alpha$ -2-Polymorphismus an Position 308 bei HLA-B27-Positiven mit einer höheren $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion verbunden war und daher als ein protektives Allel zu betrachten ist (Rudwaleit, Siegert et al. 2001).

Es existieren verschiedene Hypothesen über die Interaktion zwischen HLA-B27 und

den Bakterien bei der Pathogenese von Spondylarthropathien.

Nach der arthritogenen Peptidhypothese werden zytotoxische T-Zellen primär durch eine bakterielle Infektion mit intrazellulären Bakterien induziert. Ein oder wenige bakterielle Peptide (bei Persistenz der Bakterien) oder kreuzreagierende Selbstpeptide können über das HLA-B27-Molekül an diese CD8⁺-Zellen präsentiert werden und damit zu einer zytotoxischen Immunantwort führen (Burmester, Daser et al. 1995; Sieper and Braun 1995). Hermann et al. (Hermann, Yu et al. 1993) konnten bakterienspezifische und auch autoreaktive HLA-B27-restringierte CD8⁺-Zellklone aus der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit reaktiver Arthritis und ankylosierender Spondylitis isolieren. Weiterhin konnten synoviale T-Zellen bei Patienten mit einer Yersinien-induzierten ReA nachgewiesen werden, die ein aus dem Yersinien-Hitzeschockprotein sich ableitendes Peptid HLA-B27-restringiert erkannten (Ugrinovic, Mertz et al. 1997). Frauendorf et al. (Frauendorf, von Goessel et al. 2003) fanden kürzlich ein über HLA-B27 präsentiertes, sich von HLA-B2705 selbst ableitendes Nonamer-Peptid, welches von CD8⁺-Zellen von AS-Patienten, nicht jedoch von Gesunden spezifisch erkannt wird und Homologien mit bakteriellen Proteinen aufweist.

Andererseits gibt es aber auch Berichte über die eher CD4-dominierte T-Zell-Antworten (Gaston, Life et al. 1989; Sieper, Braun et al. 1992; Hassell, Reynolds et al. 1993; Sieper, Braun et al. 1993).

Beide Vorstellungen lassen sich miteinander verbinden, wenn man annimmt, daß die CD4-positive T-Zell-Antwort darüber entscheidet, ob die ReA-assoziierten Erreger schnell und effektiv eliminiert werden oder persistieren, während die HLA-B27-assoziierte CD8-positive T-Zell-Antwort für das Auftreten bestimmter chronischer Manifestationen verantwortlich ist. Bei der peripheren Arthritis scheint die CD4-positive T-Zell-Antwort für die Immunpathologie verantwortlich zu sein, passend dazu induzieren ReA-assoziierte Bakterien sowohl bei HLA-B27-positiven als auch HLA-B27-negativen Patienten eine (periphere) Arthritis. Enthesitis, Sakroiliitis und das Vollbild der ankylosierenden Spondylitis entwickeln sich jedoch fast ausschließlich bei HLA-B27-positiven Patienten mit einer ReA, hier scheinen CD8-positive T-Zellen die entscheidende Rolle zu spielen, eventuell auch über die Induktion einer Autoimmunantwort. Hierzu paßen auch die oben bereits erwähnten Untersuchungen

von Braun et al., die bakterielle Erreger in den peripheren Gelenken von Patienten mit ankylosierender Spondylitis, nicht jedoch in den Iliosakralgelenken dieser Patienten nachweisen konnten (Braun, Tuszewski et al. 1997).

Es gibt aber auch Hinweise darauf, daß die CD8-Antwort für die Eliminierung von Bakterien (und damit auch von ReA-assoziierten Erregern) eine bedeutende Rolle spielt (Kaufmann 1993; Pamer 1993; Burmester, Daser et al. 1995). Eine partielle Defizienz dieser Immunantwort könnte zur Persistenz der Erreger führen. Verschiedene Mechanismen sind denkbar: fehlende Antigenpräsentation des entscheidenden Peptids durch HLA-B27 (Pazmany, Rowland-Jones et al. 1992; Rowland-Jones, Powis et al. 1993), Störungen der Prozessierung des bakteriellen Antigens auf der Ebene der Transporterproteine (TAP) oder ähnlicher Strukturen (Pazmany, Rowland-Jones et al. 1992; Townsend and Trowsdale 1993) oder aber eine Induktion eines ungünstigen Zytokinmusters im Sinne der Th1/Th2-Dichotomie (Simon, Seipelt et al. 1994; Liblau, Singer et al. 1995).

In der Literatur wird außerdem die mögliche Modulation der zellulären Aufnahme von Bakterien und das intrazelluläre Überleben von Bakterien beschrieben.

Eine Theorie besagt, daß HLA-B27-Expression auf den Zellen das Eindringen von gramnegativen Bakterien in diese beeinflusst (Kapasi and Inman 1992).

Andere Untersuchungen ergaben, daß Bakterien in HLA-B27-positiven Zellen länger überleben als in HLA-B27-negativen Zellen, unabhängig von der antigenpräsentierenden Funktion der HLA-B27-Moleküle (Laitio, Virtala et al. 1997).

Weitere Erklärungsmodelle gehen von einer HLA-B27-assoziierten Autoimmunität als pathogenetischen Mechanismus der Entstehung von Spondylarthropathien aus.

Die ältere Hypothese des molekularen Mimikry fordert das Vorhandensein von bakteriellen Antigenen, die in ihrer Aminosäuresequenz mit dem HLA-B27-Molekül übereinstimmen und damit eine autoimmune Antikörperreaktion hervorrufen (van Bohemen, Grumet et al. 1984; Schwimmbeck, Yu et al. 1987). Generell haben Proteine von Enterobakterien überdurchschnittlich häufig eine Sequenzhomologie mit HLA-B27 und ein Bindungsmotiv für das HLA-B27-Molekül (Scofield, Warren et al. 1993). Laheesmaa et al. (Laheesmaa, Skurnik et al. 1991) zeigten jedoch, daß

Antikörper gegen die kreuzreagierenden Peptide bei HLA-B27-positiven Personen zwar vorkommen, daß diese aber nicht mit den kreuzreagierenden Sequenzen selbst, sondern mit flankierenden Peptidsequenzen reagieren.

Eine andere These geht von einer Autoimmunreaktion auf T-Zell-Ebene aus. Danach würde die immunologische Toleranz bzw. Ignoranz durch die Freisetzung von Autoepitopen bei einem Trauma oder einer Entzündungsreaktion mit Zellzerstörung durchbrochen. Als solche Autoepitope würden sogenannte „kryptische“ Epitope in Frage kommen, die im Thymus nicht als Selbstpeptide präsentiert wurden und normalerweise vom Immunsystem nicht gesehen werden (Sercarz, Lehmann et al. 1993). ReA-assoziierte Erreger besitzen ribosomale Proteine und Hitzeschockproteine, die sowohl untereinander als auch mit den entsprechenden humanen Proteinen Homologien aufweisen (Scofield, Warren et al. 1993). Von ihnen stammende Selbstpeptide werden über die MHC-Klasse-I-Moleküle den CD8⁺-Zellen präsentiert und führen zur Induktion von Gedächtniszellen, die nach Freisetzung von Autoepitopen mit diesen kreuzreagieren können.

Eine weitere Hypothese zur autoimmunen Pathologie ergibt sich aus der Tatsache, daß MHC-Klasse-I-Moleküle als Selbstpeptide durch MHC-Klasse-II-Moleküle den CD4⁺-Zellen präsentiert werden können (Chicz, Urban et al. 1993). Im Falle der Spondylarthropathien wäre dann die fehlerhafte und/oder vermehrte Präsentation von HLA-B27-Selbstpeptiden denkbar. Da zwischen HLA-B27-Peptiden und bakteriellen Peptiden, wie oben bereits erwähnt, Homologien bestehen, wäre auch in diesem Falle eine Kreuzreaktivität möglich. Für diese Hypothese sprechen die Untersuchungen von Wildner et al. (Wildner and Thureau 1994), die in einer Studie mit wenigen HLA-B27-positiven Uveitispatienten eine erhöhte Reaktivität mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut gegenüber HLA-B27-Selbstpeptiden fanden.

Hinweise zur Bedeutung des HLA-B27-Moleküls in der Pathogenese der Spondylarthropathien liefert auch das Tiermodell der HLA-B27-transgenen Ratte. Die Transfektion des HLA-B27-Gens führte bei einem bestimmten Rattenstamm zu spondylarthropathieähnlichen Haut-, Darm- und Gelenkveränderungen, deren

Schweregrad von der HLA-B27-Expression abhängig war (Hammer, Maika et al. 1990; Taurog, Maika et al. 1993). Bei Transfektion von anderen MHC-Klasse-I-Genen konnten solche Veränderungen nicht beobachtet werden. Interessanterweise traten aber die Krankheitsveränderungen kaum auf, wenn die HLA-B27-transfizierten Tiere unter keimfreien Bedingungen aufgezogen wurden (Taurog, Richardson et al. 1994). Die Erkrankung ließ sich durch Knochenmarkszellen übertragen.

1.3. Rheumatoide Arthritis

1.3.1. Krankheitsbild und Therapiemöglichkeiten der rheumatoiden Arthritis

Bei der rheumatoiden Arthritis (RA) handelt es sich um eine chronisch entzündliche systemische Bindegewebserkrankung unklarer Genese, die mit einer chronisch verlaufenden Entzündung der Synovialis verbunden ist und in Abhängigkeit von der Aggressivität ihres Verlaufs kurz- oder längerfristig zur Zerstörung des Knorpels und des angrenzenden Knochens mit radiologisch nachweisbaren Destruktionen der betroffenen Gelenke sowie zu extraartikulären Manifestationen an Sehnenscheiden, Gefäßen und inneren Organen führen kann.

Die Erkrankung tritt am häufigsten zwischen dem 5. und 7. Lebensjahrzehnt auf, Frauen sind 2- bis 3-mal häufiger betroffen als Männer. Mit einer Prävalenz von etwa 1% ist die RA die häufigste der entzündlich-rheumatischen Erkrankungen.

Die Entzündung führt zu schmerzhaften Schwellungen der Gelenke, die am häufigsten symmetrisch auftreten und vor allem die Gelenke an Händen, Füßen und der oberen Halswirbelsäule betreffen. Durch die Destruktion der befallenen Strukturen kommt es oft zu Deformitäten und fortschreitendem Funktionsverlust.

Die Diagnose der RA wird aufgrund der Kombination von klinischen, labormedizinischen und radiologischen Kriterien gestellt, wobei Kriterien wie Dauer der Morgensteifigkeit, befallene Gelenkregionen, Rheumaknoten, Rheumafaktor und Röntgenbefund verwendet werden (Arnett, Edworthy et al. 1988).

Auch bei der RA besteht eine HLA-Assoziation und zwar mit drei Markern HLA-DR4 (wichtigster), -DR1 und DRw6, bei denen es sich genetisch um Allele des DRB₁-Gens des HLA-Komplexes handelt (Lang, Rothenfusser et al. 1993).

Die Therapie der RA hat zum Ziel, die Entzündung zu unterdrücken und die Gelenkfunktionen zu erhalten oder wiederherzustellen.

Medikamentös wird mit nichtsteroidalen Antirheumatika, Kortikosteroiden und Basistherapeutika behandelt. Ein neues therapeutisches Prinzip steht mit der TNF α -Blockade zur Verfügung, wobei zwei Möglichkeiten in Frage kommen (der chimäre TNF α -neutralisierende monoklonale Antikörper CA-2 und das lösliche TNF α -Rezeptor p75 IgG₁ Fusionskonstrukt). Für beide konnte eine signifikante Besserung der klinischen Symptomatik in placebokontrollierten Therapiestudien gezeigt werden (Elliott, Maini et al. 1994; Moreland, Schiff et al. 1999). Wie bei den Spondylarthropathien spielt auch bei der RA die Krankengymnastik eine wichtige Rolle.

1.3.2. Immunpathogenetische Hypothesen bei der rheumatoiden Arthritis

Die Ätiologie der rheumatoiden Arthritis ist trotz intensiver Forschungsbemühungen immer noch unklar. Wie bei den Spondylarthropathien gibt es auch bei der RA verschiedene mehr oder minder gut miteinander zu vereinbarende Hypothesen zur Pathogenese der multifaktoriell bedingten Erkrankung, die im folgenden kurz dargestellt werden sollen.

Die wichtigsten Hypothesen gehen davon aus, daß es sich bei der RA um eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung handelt, bei der endogene Antigene eine wichtige Rolle spielen. In diesem Zusammenhang ist das Konzept des „epitope spreading“ zu nennen, welches davon ausgeht, daß es nach der Induktion der Erkrankung durch ein oder wenige Antigene zur Rekrutierung weiterer autoreaktiver Lymphozyten mit neuen Spezifitäten kommt. Diese sind gegen Epitope gerichtet, die im Rahmen der Entzündung aus sonst kryptisch gelegenen Strukturen freigesetzt werden. Der Verlauf des angestoßenen Autoimmunprozesses wird vermutlich durch die individuelle Immunogenetik des Patienten beeinflusst.

In der Pathogenese der RA wurden in der Vergangenheit bereits sehr viele potentielle Antigene diskutiert, von denen hier zwei kurz vorgestellt werden sollen. Als ein endogenes Antigen wurde bisher unter anderem das Kollagen Typ II, eine wesentliche Komponente des Gelenkknorpels, identifiziert (Londei, Savill et al. 1989; Sekine, Kato et al. 1999). Untersuchungen von Autoantikörperantworten bei RA-Patienten und auch Experimente an HLA-DR-transgenen Mauslinien (Fugger, Rothbard et al. 1996) deuten auf eine Assoziation zwischen dieser Autoimmunreaktion und den mit dem schweren Krankheitsverlauf assoziierten HLA-DRB₁-Allelen (HLA-DRB₁*0401, HLA-DRB₁*0404, HLA-DRB₁*0101), deren Endprodukte zu den MHC-Klasse-II-Molekülen gehören. Wichtig zu erwähnen ist hierbei, daß die oben erwähnten HLA-DR-transgenen Mauslinien und auch kollagen-II-spezifische T-Zell-Antworten bei Maus-Wildtypstämmen (Malmstrom, Michaelsson et al. 1996) den gleichen Kollagenabschnitt erkannt haben wie humane T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß evolutionär konservierte Strukturen für die Initiierung bzw. Unterhaltung des Autoimmunprozesses entscheidend sind.

Ein weiteres im Gelenk exprimiertes Protein, welches als Autoantigen bei RA in Frage kommt, ist das Human Cartilage Glycoprotein HC gp-39. Es wird von artikulären Chondrozyten, Synovialzellen, Makrophagen später Differenzierungsstadien und Neutrophilen produziert. HC gp-39 ist von Bedeutung beim Umbau von Gewebe und der Degradation der extrazellulären Matrix. Es sind erhöhte HC gp-39-Spiegel bei RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden gefunden worden (Hakala, White et al. 1993; Johansen, Jensen et al. 1993). Außerdem wurden Peptide aus der HC gp-39-Sequenz identifiziert, die an HLA-DR4 binden und von T-Zellen erkannt werden (Verheijden, Rijnders et al. 1997).

Die Bedeutung der zellulären Immunantwort bei der Pathogenese der RA wird einerseits dadurch unterstrichen, daß T-Zellen die dominierende Zellpopulation innerhalb der Synovialis entzündeter Gelenke darstellen (Harris 1990). Ein weiteres Argument ergibt sich aus der oben bereits erwähnten Assoziation der RA mit bestimmten Allelen des HLA-DRB₁-Gens, dessen Produkte der Präsentation von Peptiden an CD4⁺-Zellen dienen. Diese Allele (HLA-DRB₁*0401, DRB₁*0404, HLA-DRB₁*0101) besitzen das Sequenzmotiv QKRAA oder QRRAA, welches als „shared

epitope“ bezeichnet wird (Gregersen, Silver et al. 1987). Die Rolle dieses Sequenzmotivs bei der Pathogenese der RA bleibt bis jetzt unklar, möglich wäre eine Bedeutung bei der Selektion bestimmter T-Lymphozyten im Thymus oder bei der Präsentation exogener oder endogener Strukturen.

Für die T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen nimmt man eine wichtige Rolle einer relativ ungehemmten Th1-Antwort bei der Pathogenese an. Yin et al. (Yin, Siegert et al. 1999) fanden, daß das Verhältnis $IFN\gamma^+/IL4^+$ -Zellen bei der RA zwischen 4 und 5 beträgt, im Vergleich dazu bei der reaktiven Arthritis nur ca. 1,5. Eine pathogenetisch wichtige Rolle für die Entzündung und die damit einhergehenden Destruktionen bei der RA haben auch das Interleukin 1 und das $TNF\alpha$ (Brandt, Haibel et al. 2000).

Das Auftreten von Rheumafaktoren bei einem hohen Prozentsatz von RA-Patienten könnte auf eine Beteiligung von B-Lymphozyten hinweisend sein. Es wäre denkbar, daß die Rheumafaktoren produzierenden B-Lymphozyten zirkulierende Antigen-Antikörper-Komplexe an ihrer Oberflächen binden, internalisieren, prozessieren und den T-Zellen präsentieren.

Schröder et al. (Schroder, Greiner et al. 1996) konnten B-Lymphozyten und Plasmazellen in lymphofollikelartigen Strukturen in der RA-Synovialmembran nachweisen, was ein Hinweis auf eine lokale, antigenabhängige, humorale Immunantwort und damit eine Beteiligung der B-Lymphozyten bei der Pathogenese der RA sein kann.

Ein bei den RA-Patienten häufiger Befund sind die Kollagen-II-spezifischen Antikörper (Schulte, Unger et al. 1998), die bei 70% der Patienten im entzündeten Gelenkkompartiment nachweisbar sind. In Tierexperimenten ließ sich eine frühe Bildung dieser Antikörper bei der kollagen-induzierten Arthritis vor dem Auftreten erosiver Knorpelveränderungen nachweisen und diese Arthritis war auf naive syngene Tiere mit Hilfe diese Antikörper übertragbar.

In der Pathogenese der RA wird auch die Mitwirkung lymphozytenunabhängiger Prozesse diskutiert. So ist bei der RA die aus Fibroblasten bestehende synoviale Deckzellschicht verdickt, was entweder Ausdruck synovialer Hyperplasie im Rahmen des Entzündungsgeschehens (also sekundär) möglich ist oder aber Folge primärer

Fibroblastenproliferation darstellt, die sekundär zur Entzündung führt (Muller-Ladner, Gay et al. 2000; Pap, Muller-Ladner et al. 2000). Das destruktive Potential von fibroblastenähnlichen Zellen ist in Tierexperimenten belegt worden (Pap, Franz et al. 2000). Man nimmt an, dass die zu den Destruktionen führende Aktivierung der Fibroblasten unter den Bedingungen einer Entzündung stattfindet, da Kontrollfibroblasten aus gesunden Körperstrukturen keine Destruktionen induzieren. Eine viel diskutierte Hypothese geht – ähnlich wie bei der reaktiven Arthritis – von einer Infektionsätiologie der RA aus. Jedoch ist es trotz des Einsatzes sensitiver Methoden wie die PCR bis heute nicht gelungen, ein mögliches infektiöses Agens zu identifizieren. Gegen diese Hypothese spricht auch die Tatsache, daß Endemien oder horizontale Transmissionen nie nachgewiesen werden konnten.

Beim Versuch, die möglichen pathogenetischen Aspekte miteinander zu verbinden, geht man von einem exogenem Faktor aus, der den Autoimmunprozeß induziert. Dieser Autoimmunprozeß ist durch eine pathologische Th1-Antwort charakterisiert, die sich auch gegen gelenkspezifische Autoantigene richtet. Später kommt es im Rahmen der Entzündung zur Transformation der Synovialfibroblasten, die zu Destruktionen der Gelenkstrukturen führen.

1.4. Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die für die Pathogenese von rheumatischen Erkrankungen in Frage kommenden bakteriellen bzw. Autoantigene mit Hilfe von hochsensitiven durchflußzytometrischen Methoden zu bestimmen.

Die durchflußzytometrische Analyse stellt einen neuen Zugang zur Epitopbestimmung bei rheumatischen Erkrankungen dar, die es möglich macht, Zellen, die mit einer sehr niedrigen Frequenz im peripheren Blut und in der Synovialflüssigkeit vorkommen, zu detektieren. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode der Technologie der zellulären Affinitätsmatrix stellt eine weitere Sensitivitätserhöhung gegenüber der üblichen durchflußzytometrischen Analyse der Zellen nach Oberflächenfärbung bzw. intrazellulärer Zytokinfärbung.

Da es bei der reaktiven Arthritis einen klaren Zusammenhang zwischen den bakteriellen Erregern und der Erkrankung gibt, ist die Identifizierung spezifischer bakterieller Epitope bei dieser Form der Spondylarthropathien von besonderem Interesse. Es wurde bereits in Studien gezeigt, daß sowohl auf der CD4- (Kingsley and Sieper 1993; Burmester, Daser et al. 1995) als auch auf der CD8-Ebene (Pamer 1993; Kuon, Lauster et al. 1997) von mehreren Antigenen auszugehen ist. Bei der ReA wirft die Suche nach immundominanten Antigenen grundsätzlich die Frage nach gemeinsamen Strukturen der verschiedenen ReA-assoziierten Erreger auf, da diese trotz ihrer Heterogenität zu ähnlichen klinischen Symptomen führen. Ein solches gemeinsames Antigen ist bisher noch nicht gefunden worden, insbesondere auch nicht für die häufigsten Erreger wie Chlamydien und Yersinien. Eine wichtige Rolle scheinen aber die hoch konservierten ribosomalen und histonähnlichen Proteine zu spielen (Kingsley and Sieper 1993; Burmester, Daser et al. 1995). In dem der reaktiven Arthritis gewidmeten Teil der Arbeit wurde versucht, immundominante T-Zell-Epitope aus den hochkonservierten bakteriellen Proteinen mit Hilfe von durchflußzytometrischen Methoden zu identifizieren.

Bei der ankylosierenden Spondylitis ist die Assoziation mit bakteriellen Erregern weniger deutlich. Da es aber auch bei dieser Erkrankung Hinweise auf bakterielle Trigger gibt und eine Assoziation mit der reaktiven Arthritis bekannt ist, wurde in dieser Arbeit die CD8-Antwort auf mögliche, aus bakteriellen Proteinen stammende Antigene, durchflußzytometrisch untersucht. Auch hierbei handelte es sich um Proteine aus Chlamydien und Yersinien. Es wurden dabei zum Teil auch solche Peptide verwendet, die bei der reaktiven Arthritis bereits als mögliche T-Zell-Epitope identifiziert wurden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die gleichen Methoden für die Untersuchung der antigenen Wirkung eines in der Literatur bereits als mögliches Autoantigen bei der rheumatoiden Arthritis beschriebenen Moleküls, nämlich des HC gp-39, verwendet.

Die Epitopenanalyse hat einerseits die Aufgabe, zur Aufklärung der pathogenetischen Mechanismen der einzelnen rheumatischen Erkrankungen beizutragen. Auf der

anderen Seite läßt die Kenntnis der antigenen Sequenzen auch auf therapeutische Konsequenzen hoffen. Die hinter der Epitopenanalyse der bakteriellen und der Autoantigene bei rheumatischen Erkrankungen stehende therapeutische Idee ist die Möglichkeit der Erzeugung einer Immuntoleranz gegen bekannte krankheitsauslösende Strukturen.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1. Patienten

2.1.1. Charakterisierung der Patienten mit reaktiver Arthritis

Im Rahmen der Epitopanalyse bei der reaktiven Arthritis wurden das periphere Blut und / oder die Synovialflüssigkeit von 5 Patienten mit yersinien-induzierter und weiteren 6 Patienten mit chlamydien-induzierter reaktiver Arthritis untersucht.

Alle 5 Patienten mit yersinien-induzierter reaktiver Arthritis und 5 Patienten mit der chlamydien-induzierten reaktiven Arthritis wurden im Rahmen der rheumatologischen Sprechstunde der medizinischen Poliklinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin betreut. Einer der Patienten mit der chlamydien-assoziierten reaktiven Arthritis wurde in der Rheumatologischen Klinik in Berlin-Buch behandelt. Synovialflüssigkeit wurde für die Experimente verwendet, wenn bei den Patienten aufgrund eines hochgradigen Ergusses eine Gelenkpunktion notwendig geworden war. Synovialflüssigkeit wurde jeweils bei den Patienten 1 bis 3 aus beiden Patientengruppen gewonnen. Anderenfalls bzw. zusätzlich zu der Synovialflüssigkeit wurde bei den Patienten nach deren Zustimmung anlässlich der routinemäßigen Blutabnahmen das für die Experimente notwendige periphere Blut entnommen.

Bei insgesamt 8 von 11 Patienten galt die Diagnose der reaktiven Arthritis als gesichert, bei den 3 übrigen Patienten bestand Verdacht auf diese Erkrankung.

Die Diagnose der reaktiven Arthritis wurde nach den Kriterien des „International workshop on reactive arthritis“ (Kingsley and Sieper 1996; Sieper, Braun et al. 2000) gestellt.

Die Diagnose der reaktiven Arthritis basierte auf der typischen Symptomatik, der Anamnese einer vorausgegangenen urogenitalen (bei den chlamydien-induzierten Arthritiden) oder enteralen (im Falle der yersinien-induzierten Arthritiden) Infektion, dem Nachweis der entsprechenden Antikörper im Blut der Patienten oder einem positiven Urogenitalabstrich (Chlamydien).

In den folgenden Tabellen werden die wichtigsten Merkmale der Patienten vorgestellt. Die Tabelle 1 dient der Charakterisierung der Patienten mit der

chlamydien-induzierten reaktiven Arthritis, in der Tabelle 2 wurden die Merkmale der Patienten mit der yersinien-induzierten reaktiven Arthritis zusammengestellt.

Patient	Alter	Geschlecht	Diagnose	Erkrankungsdauer	HLA-B27	Diagnostik Chlamydien
1	26	männlich	ReA	1 Jahr	negativ	IgG+Abstrich positiv
2	34	männlich	ReA	3 Monate	positiv	IgG+IgA positiv
3	34	männlich	ReA	1 Monat	positiv	Abstrich positiv
4	30	männlich	ReA	3 Monate	positiv	IgA,IgG positiv
5	35	weiblich	V.a. ReA	2 Monate	negativ	IgA positiv
6	34	männlich	V.a. ReA	2 Monate	positiv	IgG positiv

Tabelle 1: Charakteristika der Patienten mit chlamydien-assoziiertes reaktiver Arthritis

Patient	Alter	Geschlecht	Diagnose	Erkrankungsdauer	HLA-B27	Serologie Yersinien
1	44	weiblich	ReA	1 Monat	positiv	positiv
2	22	weiblich	ReA	1 Jahr	positiv	positiv
3	43	männlich	ReA	1 Monat	positiv	positiv
4	28	weiblich	ReA	4 Monate	positiv	positiv
5	34	männlich	V.a. ReA	2 Monate	positiv	positiv

Tabelle 2: Charakteristika der Patienten mit yersinien-assoziiertes reaktiver Arthritis

2.1.2. Charakterisierung der Patienten mit ankylosierender Spondylitis

Die Patienten mit ankylosierender Spondylitis wurden alle in der rheumatologischen Sprechstunde der medizinischen Poliklinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin betreut. Das für die Experimente notwendige Blut wurde ihnen im Rahmen der routinemäßigen Blutentnahmen nach Zustimmung entnommen. Die Diagnose wurde nach den 1984 modifizierten New York Kriterien gestellt (van der Linden,

Valkenburg et al. 1984). Sämtliche Patienten waren HLA-B27 positiv. Die Beurteilung der Krankheitsaktivität erfolgte anhand des klinischen Bildes (entzündlicher Rückenschmerz, periphere Gelenkbeteiligung, Uveitis) und der Entzündungsparameter (Erhöhung des C-reaktiven Proteins (CRP) und der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG)). Alle Patienten wurden mit nichtsteroidalen Analgetika (NSAR) medikamentös behandelt.

Es lassen sich drei Gruppen unterscheiden. In die erste Gruppe wurden 10 Patienten eingeschlossen und die Reaktion ihrer T-Lymphozyten auf Peptide, die von zwei Proteinen von *Yersinia enterocolitica* (Y.e.) stammen, untersucht. Ein Patient aus dieser Gruppe mußte aufgrund einer nicht gelungenen Negativkontrolle aus der Wertung genommen werden. In der zweiten Gruppe wurden 5 Patienten auf die Reaktion ihrer T-Zellen auf Peptide chlamydialer Herkunft getestet.

Die wichtigsten Merkmale der Patienten aus den Gruppen 1 und 2 werden in der Tabelle 3 zusammengestellt.

Patienten-Gruppe	Anzahl der Patienten	Geschlecht: m/w	mittleres Alter in Jahren \pm Standardabweichung (SD)	mittlere Erkrankungsdauer in Jahren \pm SD	CRP > 6 mg/dl	entzündlicher Rückenschmerz	periphere Gelenkbeteiligung	Uveitis
1	9	5/4	36,44 \pm 8,0	8,0 \pm 7,7	7	9	4	2
2	5	3/2	38,0 \pm 8,0	5,4 \pm 3,7	4	5	3	0

Tabelle 3: Epidemiologische Charakteristika der Patienten mit ankylosierender Spondylitis, bei denen Kurzzeitstimulationen durchgeführt wurden. In der Gruppe 1 wurde das periphere Blut der Patienten mit Yersinien-Peptiden, in der Gruppe 2 mit Chlamydien-Peptiden stimuliert

2.1.3. Charakterisierung der Patienten mit rheumatoider Arthritis

Die Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden in der rheumatologischen Sprechstunde der medizinischen Poliklinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin und in der rheumatologischen Sprechstunde des Immanuel-Krankenhauses in Berlin betreut. Das für die Experimente notwendige Blut wurde ihnen im Rahmen der routinemäßigen Blutentnahmen nach Zustimmung entnommen. Die für die

Experimente verwendete Synovialflüssigkeit wurde durch Punktion von hochgradigen Ergüssen in Kniegelenken der Patienten gewonnen.

Die Diagnose wurde nach den 1987 modifizierten Kriterien des American Rheumatism Association gestellt (Arnett, Edworthy et al. 1988).

Die Einschätzung der Krankheitsaktivität wurde anhand des klinischen Bildes (Anzahl der geschwollenen und der schmerzhaften Gelenke) und der Entzündungsparameter (Erhöhung der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und des C-reaktiven-Proteins (CRP)) vorgenommen.

Es lassen sich zwei Gruppen von Patienten unterscheiden. Die erste Gruppe bilden 10 Patienten, deren peripheres Blut für die Untersuchungen verwendet wurde. Bei allen Patienten sind Kurzzeit-Stimulationen durchgeführt worden (Gruppe 1a) und bei den Patienten 1 bis 9 wurde zusätzlich eine Anreicherung der Zellen mit Hilfe der Technologie der zellulären Affinitätmatrix nach 10-stündiger Stimulation vorgenommen (Gruppe 1b). Bei Patient 10 war diese aufgrund der geringen Menge des abgenommenen peripheren Blutes nicht möglich. In der zweiten Gruppe wurden 10 Patienten zusammengefaßt, deren Synovialflüssigkeit als Material für die Kurzzeit-Stimulationen verwendet wurde.

In der Gruppe 1 wurde die rheumatoide Arthritis bei den Patienten 1 bis 4 intensiv medikamentös behandelt. Die Patienten erhielten Methotrexat, NSAR, Glukortikoide und die Patienten 1, 3 und 4 zusätzlich Anti-TNF α -Therapie (Infliximab[®]), Patient 2 Cyclosporin A.

Bei den Patienten 5 bis 10 wurde die Erkrankung höchstens mit Prednisolon \leq 7,5 mg/Tag und NSAR behandelt.

In der zweiten Gruppe erhielten die Patienten Prednisolon und NSAR, zwei von ihnen auch zusätzlich Methotrexat.

Die wichtigsten Merkmale der Patienten werden in der Tabelle 4 zusammengefaßt.

Patienten-Gruppe	verwendetes Material	Anzahl der Patienten	Geschlecht: m/w	mittleres Alter in Jahren \pm SD	mittlere Erkrankungsdauer in Jahren \pm SD	CRP > 6 mg/dl und/oder BSG-Erhöhung	Patienten mit seropositiver RA	Anzahl der geschwollenen Gelenke	Anzahl der schmerzhaften Gelenke
1a	PB	10	2/8	50,2 \pm 10,1	11,9 \pm 9,1	6	7	10,0 \pm 6,2	12,9 \pm 7,1
1b	PB	9	2/7	49,9 \pm 10,7	10,5 \pm 8,3	5	8	9,7 \pm 6,5	12,7 \pm 7,5
2	SF	10	5/5	58,2 \pm 16,5	7,6 \pm 7,2	7	6	5,6 \pm 4,3	6,6 \pm 6,5

Tabelle 4: Epidemiologische Charakteristika der Patienten mit rheumatoider Arthritis. Bei Patienten der Gruppe 1 wurde peripheres Blut als Material verwendet, wobei in der Gruppe 1a Kurzzeit-Stimulationen und in der Gruppe 1b eine Anreicherung der Zellen mit Hilfe der Technologie der zellulären Affinitätsmatrix durchgeführt wurden. Bei Patienten der Gruppe 2 wurde Synovialflüssigkeit als Material für Kurzzeit-Stimulationen verwendet.

2.1.4. HLA-Typisierung

Die HLA-Typisierungen der Patienten wurden im hämatologischen Labor des Universitätsklinikums Benjamin Franklin vorgenommen.

Bei Patienten mit reaktiver Arthritis wurde der gesamte HLA-Phänotyp mit der Methode der sequenzspezifischen Primer (SSP) bestimmt. Bei Patienten mit ankylosierender Spondylitis erfolgte die HLA-B-Typisierung mit Hilfe eines Komplement-abhängigen Lymphozyten-Toxizität-Tests.

2.2. Material

2.2.1. Chemikalien, Lösungen und Medien

In diesem Abschnitt werden die häufig verwendeten Chemikalien, Lösungen und Medien aufgeführt.

Chemikalien:

DMSO (zum Lösen von Peptiden)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMSO (zum Einfrieren von Zellen)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ficoll-Paque TM PLUS	Amersham Pharmacia Biotech AB Uppsala, Schweden
Trypanblau	0,3%, Sigma, USA

Lösungen:

Brefeldin A	Endkonzentration: 10 µg/ml; Sigma, USA
EDTA	20 mM, in Aqua dest. gelöst
FACS TM Lysing Solution	BD, San Jose, CA, USA
FACS TM Permeabilizing Solution	BD, San Jose, CA, USA
FCS (fetal calf serum)	GIBCO BRL, Paisley, Schottland
Fixierpuffer	2% Formaldehyd (Sigma, St.Louis, MO) gelöst in PBS (phosphate buffered saline)
HBSS	Gibco, Berlin, Deutschland
Lysepuffer	8,29 g/l NH ₄ Cl 1,00 g/l KHCO ₃ 0,272 g/l EDTA
NaNH ₃ /PBS/BSA (FACS-Puffer)	0,5% BSA in PBS mit 0,1% Natriumazid (NaNH ₃)
PBS (10x)	GIBCO BRL, Paisley, Schottland
PBS/BSA	5 g/l BSA in PBS
PBS-Dulbecco	Biochrom KG, Berlin, Deutschland

Medien:

Auftaumedium	20% FCS, 80% RPMI1640 Medium
Einfriermedium	20% DMSO, 80% FCS
Kulturmedium	RPMI 1640 Medium 100 U/ml Penicillin (Gibco, BRL) 100 U/ml Streptomycin (Gibco, BRL) 2 mM L-Glutamin (Gibco, BRL) 10% FCS bzw. humanes Mischserum
RPMI 1640 Medium (Rosewell Park Memorial Institut Medium 1640)	GIBCO BRL, Paisley, Schottland

2.2.2. Antigene und monoklonale Antikörper

Im nachfolgenden werden die für die verschiedenen Stimulationen verwendeten Antigene aufgeführt.

Für die Experimente bei reaktiver Arthritis verwendete rekombinante Antigene:

<i>Antigen</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Ch.t. Momp, Fragment 1 (F1)	Genexpress, Deutschland
Ch.t. Momp, Fragment 2 (F2)	Genexpress, Deutschland
Ch.t. Momp, Fragment 3 (F3)	Genexpress, Deutschland
Peptide (18mere) von Ch.t. Momp	Genexpress, Deutschland
Ch.t. Hsp 60kD	Genexpress, Deutschland
SEB	Sigma, USA
Y.e. Hsp 60kD	Genexpress, Deutschland
Y.e. Hsp 60kD, Fragment 1 (F1)	Genexpress, Deutschland
Y.e. Hsp 60kD, Fragment 2 (F2)	Genexpress, Deutschland
Y.e. Hsp 60kD, Fragment 3 (F3)	Genexpress, Deutschland

Peptide (18mere) von Y.e. Hsp 60kD	Genexpress, Deutschland
Y.e. 19kD	Genexpress, Deutschland

Für die Experimente bei rheumatoider Arthritis verwendete rekombinante Antigene:

Antigen	Bezugsquelle
Human Cartilage Glycoprotein (HC gp-39)	Organon, Niederlande

Für die Experimente bei ankylosierender Spondylitis verwendete rekombinante Antigene (die Peptidsequenzen werden im Abschnitt 2.2.5. tabellarisch dargestellt):

Antigen	Bezugsquelle
Nonamer-Peptide von Ch.t. Hsp 60kD	Dr. Stoll, NMI, Reutlingen, Deutschland
Nonamer-Peptide von Ch.t. Momp	Dr. Stoll, NMI, Reutlingen, Deutschland
Nonamer-Peptide von Y.e. Hsp 60kD	Genexpress, Deutschland
Nonamer-Peptide von Y.e 19kD	Genexpress, Deutschland

Es werden hier die für die intrazelluläre Zytokinfärbung verwendeten Antikörper aufgeführt.

Antikörper	Verdünnung	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
CD4 PerCP	1:100	SK3	Maus IgG _{1,k}	Becton Dickinson
CD8 PerCP	1:10	SK1	Maus IgG _{1,k}	Becton Dickinson
CD69 PE	1:10	L78	Maus IgG _{1,k}	Becton Dickinson
IFN γ Cy5	1:400	4SB3	Maus IgG _{1,k}	gekoppelt an Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers
TNF α FITC	1:250	MAB11	Maus IgG ₁	PharMingen

sonstige Immunglobuline:

Antikörper	Verdünnung bzw. Endkonzentration	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
Beriglobin (humanes Immunglobulin)	1:50	-	-	Centeon
Anti-CD28	1 µg/ml	CD28.2	Maus IgG ₁	Immunotech

2.2.3. MACS (Magnetic Cell Separation) Cytokine Secretion Assay

Chemikalien, Puffer und Antikörper, die für den MACS Cytokine Secretion Assay benötigt werden:

IFN γ Catch Reagent [®]	Miltenyi Biotec, Deutschland
IFN γ Detection Antibody [®]	Miltenyi Biotec, Deutschland
Beriglobin (humanes Immunglobulin)	Centon, Deutschland
Anti-PE-Microbeads [®]	Miltenyi Biotec, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma

Antikörper	Verdünnung	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
CD4 Cy5	1:800	TT1	Maus IgG _{1,k}	gekoppelt an Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers
CD8 Cy5	1:400	GN11-134D7	Maus IgG _{1,k}	gekoppelt an Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers

Sonstige Materialien:

MiniMACS-Zellseparationsgerät	Miltenyi Biotec, Deutschland
VS ⁺ -Säulen (Kapazität 1 x 10 ⁸ Zellen)	Miltenyi Biotec, Deutschland

2.2.4. Zellkultur

Es werden hier die speziell für Zellkultur verwendeten Materialien aufgeführt.

Zellkulturplatten (96- und 24-Loch-Platten)	Costar, USA
---	-------------

<i>rekombinante Zytokine</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Bezugsquelle</i>
IL-2	20 U/ml	Boehringer Mannheim, Deutschland

2.2.5. Selektion der HLA-B27 bindenden Peptide

In dieser Arbeit wurden insgesamt 34 HLA-B27-bindende aus bakteriellen Proteinen stammende Peptide auf ihre antigene Wirkung bei HLA-B27-positiven Patienten mit ankylosierender Spondylitis untersucht.

Es wurden insgesamt vier bakterielle Proteine ausgewählt, die anhand ihrer Aminosäuresequenz auf das Vorhandensein von möglichen HLA-B27-bindenden Peptiden untersucht wurden. Zwei von diesen Proteinen stammten von *Yersinia enterocolitica* (Y.e. Hsp 60kD und Y.e. 19kD), zwei weitere waren chlamydialer Herkunft (Ch.t. Momp und Ch.t. Hsp). Alle vier Peptide sind wichtige CD4- und Antikörperpitope.

Entscheidend für die Bindung an das HLA-B27-Molekül ist das Vorhandensein von Arginin an Position 2 eines in Frage kommenden Peptides.

Die hier verwendeten von *Yersinia enterocolitica* stammenden Peptide wurden bereits in früheren Studien als HLA-B27-bindend identifiziert. Die von Y.e. Hsp 60kD abgeleiteten Peptide wurden von Ugrinovic et. al. für Untersuchungen an ReA-Patienten verwendet. Es handelt sich um 7 Nonamer-Peptide, die folgende Kriterien erfüllen: sie enthalten Arginin an Position 2, haben eine basische aromatische

Gruppe oder aber einen hydrophoben Rest an Position 9 und einen basischen Rest oder eine kurze Seitenkette an Position 1 (Ugrinovic, Mertz et al. 1997).

Die für diese Arbeit benutzten, von dem Y.e. 19kD-Protein stammenden Peptide wurden in früheren Untersuchungen durch einen HLA-Bindungsassay als HLA-B27-bindend identifiziert (Mertz, Daser et al. 1994). Es handelt sich um vier Nonamer-Peptide, die Arginin an Position 2 enthalten.

Die aus dem *Chlamydia trachomatis* Hsp 60kD und dem *Chlamydia trachomatis* Momp serovar D und E stammenden Nonamer-Peptide, die Arginin an Position 2 besitzen, wurden mit Hilfe eines Computerprogrammes (HG Rammensee, <http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi>) auf ihre Bindungsfähigkeit an das HLA-B27-Molekül überprüft. Jedem Peptid wird dort ein bestimmter Score-Wert zugeordnet, der die relative Affinität des Peptides zum HLA-B27-Molekül ausdrückt. Bei *Chlamydia trachomatis* Hsp 60kD wurden von dem Programm insgesamt 536 HLA-B27-bindende Nonamer-Peptide mit Score-Werten zwischen 25 und 1 gefunden. Bei *Chlamydia trachomatis* Momp Serovar D waren es 382, bei Serovar E 383 Nonamer-Peptide. Für die Untersuchungen wurden Peptide ausgewählt, die einen Score-Wert von 14 oder höher erreicht haben und die Aminosäure Arginin an Position 2 enthalten. Diesen Kriterien entsprachen 16 Nonamer-Peptide aus *Chlamydia trachomatis* Hsp 60kD, 6 Peptide aus *Chlamydia trachomatis* Momp Serovar D und 6 Peptide aus *Chlamydia trachomatis* Momp Serovar E, wobei aufgrund der sehr ähnlichen Sequenz der Momp-Proteine vier von den jeweiligen sechs Peptiden bei Serovar D und E idnetisch waren.

Nr.	Protein	Position der Peptidsequenz innerhalb der Proteins	Peptidsequenz	Score-Wert
1	Y. e. Hsp 60kD	12-20	ARIKM LRGV	nicht bestimmt
2	Y. e. Hsp 60kD	57-65	AREIE LEDK	nicht bestimmt
3	Y. e. Hsp 60kD	117-125	KRGID KAVI	nicht bestimmt
4	Y. e. Hsp 60kD	284-292	RRKAM LQDI	nicht bestimmt
5	Y. e. Hsp 60kD	321-329	KRVVI NKDT	nicht bestimmt
6	Y. e. Hsp 60kD	349-352	IRQQI EEAT	nicht bestimmt
7	Y. e. Hsp 60kD	446-452	LRAME SPLR	nicht bestimmt
1	Y. e. 19kD	60-68	VRNTG DRPI	nicht bestimmt
2	Y. e. 19kD	93-101	KRLNI SSTT	nicht bestimmt
3	Y. e. 19kD	103-111	IRFEP GDRT	nicht bestimmt
4	Y. e. 19kD	153-161	RRAAE RGFK	nicht bestimmt
1	Ch. t. Hsp 60kD	117-125	KRGID KAVK	25
2	Ch. t. Hsp 60kD	379-387	IRVGA ATEI	24
3	Ch. t. Hsp 60kD	196-204	NRGYL SSYF	23
4	Ch. t. Hsp 60kD	284-292	RRKAM LEDI	21
5	Ch. t. Hsp 60kD	483-491	LRDAY TDML	20
6	Ch. t. Hsp 60kD	244-252	GRPLL IIAE	19
7	Ch. t. Hsp 60kD	35-43	GRHVV IDKS	19
8	Ch. t. Hsp 60kD	344-352	ARCES IKKQ	18
9	Ch. t. Hsp 60kD	442-450	ARIVL KALS	16
10	Ch. t. Hsp 60kD	265-273	NRIRG GFRV	16
11	Ch. t. Hsp 60kD	12-20	ARKKI QKGV	16
12	Ch. t. Hsp 60kD	367-375	ERLAK LSGG	15
13	Ch. t. Hsp 60kD	131-139	IRKIS KPVQ	15
14	Ch. t. Hsp 60kD	420-428	IRCIP TLEA	14
15	Ch. t. Hsp 60kD	283-291	DRRKA MLED	14
16	Ch. t. Hsp 60kD	267-275	IRGGF RVCA	14
1	Ch. t. Momp Serovar D+E	131-139	DRFDV FCTL	25
2	Ch. t. Momp Serovar D+E	110-118	GRHMQ DAEM	24
3	Ch. t. Momp Serovar D+E	103-111	ARENP AYGR	24
4	Ch. t. Momp Serovar D+E	279-287	YRLNM FTPY	22
5	Ch. t. Momp Serovar E	60-68	MRMGY YGDF	22
6	Ch. t. Momp Serovar D+E	302-310	IRIAQPKSA	14
7	Ch. t. Momp Serovar D	71-79	DRVLK TDVN	14

Tabelle 5: Charakterisierung der bei Patienten mit ankylosierender Spondylitis getesteten Peptide.

2.3. Methoden

2.3.1. Isolierung von humanen mononukleären Zellen

Mononukleäre Zellen lassen sich mittels eines Ficoll-Gradienten durch Zentrifugation von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen trennen. Bei Ficoll handelt es sich um ein ungeladenes Sucrose-Polymer. Seine Dichte ist so gewählt, daß sich Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten in der Interphase zwischen der Ficoll- und der darüberliegenden Plasmaschicht ansammeln, während andere Zellen entweder die Ficollschicht passieren (Erythrozyten, tote Zellen) oder in der Ficollphase bleiben (Granulozyten).

2.3.1.1. Isolierung der mononukleären Zellen aus peripherem Blut bzw. Synovialflüssigkeit

Das vorliegende Material wird im Verhältnis 1:1 mit HBSS verdünnt. Je 20-25 ml des verdünnten Blutes bzw. Synovialflüssigkeit werden vorsichtig über 15 ml Ficoll-Paque geschichtet. Es wird bei 600 x g, 20 °C für 20 min. ohne Bremse zentrifugiert. Danach wird die Interphase mit den dort angereicherten mononukleären Zellen vorsichtig mit der Pipette abgenommen. Die isolierten Zellen werden dreimal in HBSS gewaschen (300 x g, 4 °C, mit Bremse). Die Waschschritte dienen der Entfernung des Ficolls und der Thrombozyten, die bei der gewählten Zentrifugationsgeschwindigkeit nicht pelletiert werden.

2.3.1.2. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl werden die isolierten Zellen zunächst mit der Trypanblaulösung gemischt, wobei der Farbstoff durch die defekte Zellmembran der toten Zellen eindringt und diese blau färbt. Die nicht gefärbten lebenden Zellen werden in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

2.3.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Der Einfriervorgang erfolgt auf Eis und mit kaltem Einfriermedium. Die isolierten Zellen werden in einer Konzentration von 5 bis 10×10^6 / ml zunächst in reinem FCS resuspendiert. Diese Zellsuspension wird auf die Einfrierröhrchen verteilt (jeweils 0,5 ml pro Röhrchen). Je 0,5 ml von FCS mit 20%-igem Zusatz von DMSO werden langsam dazugegeben. Die Einfrierröhrchen werden für 20 min. auf Eis gelagert, dann bei -70°C eingefroren. Nach einigen Tagen können sie für längerfristige Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Zum Auftauen werden die Zellen im 37°C warmen Wasserbad für einige Minuten erwärmt, die nicht vollständig aufgetaute Zellsuspension wird dann in 15 ml Auftaumedium überführt und zentrifugiert ($300 \times g$, 4°C , 10 min., mit Bremse). Die Zellen werden noch zweimal mit PBS-Dubecco gewaschen. Sie können dann in Kulturmedium aufgenommen, gezählt und auf die gewünschte Zellkonzentration zum Kultivieren eingestellt werden.

2.3.2. Stimulation von mononukleären Zellen in vitro

Die mononukleären Zellen können spezifisch durch Antigene stimuliert werden. Dazu werden die Antigene von APCs aufgenommen und über die MHC-Moleküle den T-Zellen präsentiert, die dann aktiviert werden können und mit einem bestimmten Zytokinexpressionsmuster reagieren. Die Zytokinexpressionsmuster werden durchflußzytometrisch analysiert (2.3.7). Für die Aktivierung der T-Zellen ist eine Kostimulation über CD28 entscheidend. In vivo fungiert das CD80/86 als Ligand von CD28, in vitro kann diese Kostimulation durch die Zugabe von anti-CD28-AK verstärkt werden.

Als Negativkontrolle dient ein Ansatz, zu dem nur der anti-CD28-AK hinzugegeben wurde. Die Positivkontrolle erfolgt mit dem Staphylococcus Enterotoxin B (SEB), welches zu den Superantigenen zählt. Letztere binden ohne intrazelluläre Prozessierung an die seitliche Oberfläche des MHC-II-Moleküls und an die $V\beta$ -Region des T-Zell-Rezeptors.

Die mononukleären Zellen können entweder nach Separation und Aufnahme in Nährmedium oder direkt im peripheren Blut (Vollblutstimulation) mit Antigenen

stimuliert werden.

2.3.2.1. Stimulation der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) und der Synovialflüssigkeit (SFMCs)

Die Antigenstimulation von separierten mononukleären Zellen erfolgt nach dem Protokoll von Waldrop (Waldrop, Pitcher et al. 1997) mit geringfügigen Modifikationen.

$2-3 \times 10^6$ mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMCs) bzw. 5×10^6 mononukleäre Zellen aus der Synovialflüssigkeit (SFMCs) werden in 1 ml Kulturmedium in Kulturröhrchen kultiviert. Zu jedem Röhrchen wird anti-CD28-AK in einer Endkonzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ hinzugegeben. Die Endkonzentration von SEB für die Positivkontrolle beträgt 1 $\mu\text{g/ml}$, die der Antigene, wenn nicht anders angegeben, 5 $\mu\text{g/ml}$ (Peptide) oder 10 $\mu\text{g/ml}$ (Proteine).

Die Zellen werden für 6 Stunden bei 37°C und 5,0% CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Nach zweistündiger Stimulation wird der Sekretionsinhibitor Brefeldin A in einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ hinzugegeben. Brefeldin A ist ein für die Zellen relativ wenig toxischer, potenter Inhibitor, der die Sekretion der produzierten Zytokine verhindern soll (Picker, Singh et al. 1995). Nach der Stimulation wird jeder Ansatz mit 100 μl 20mM EDTA für 15 min. inkubiert, welches die Lösung der Zellaggregate bewirken soll. Die Zellen werden dann mit PBS/BSA gewaschen und mit 1 ml 2%-tiger Formaldehyd/PBS-Lösung für 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diesen als Fixierung bezeichneten Schritt soll der Proteinstatus der Zellen erhalten bleiben, so daß die akkumulierten Zytokine intrazellulär gefärbt werden können. Die Fixierung erfolgt v.a. durch die Quervernetzung von Proteinen unter Beteiligung der Aldehydgruppen des Formaldehyds. Nach der Fixierung werden die Zellen noch einmal gewaschen und in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen. Anschließend werden die Zellen gegen Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Zytokine gefärbt.

2.3.2.2. Vollblutstimulation

Bei der Vollblutstimulation wird peripheres Blut direkt und ohne vorherige Separation

von mononukleären Zellen über 6 Stunden mit Antigenen stimuliert und anschließend durchflußzytometrisch analysiert (Suni, Picker et al. 1998).

Für die Vollblutstimulation wird je 1 ml Heparinblut mit anti-CD28-AK und den Antigenen wie in 2.3.2.1. beschrieben inkubiert. Nach der Stimulation erfolgt, wie oben geschildert, die Behandlung der Zellen mit EDTA.

Die Erythrozyten werden dann mit Hilfe der FACS™ Lysing Solution (formaldehydhaltiges Erythrozytenlyse-Reagenz) lysiert, welches gleichzeitig die Zellen leicht fixiert. Dazu werden je 9 ml 1 x FACS™ Lysing Solution in jedes Kulturröhrchen gegeben, mit dem Vortexmischer gut gemischt und für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze werden dann zentrifugiert (300 x g, 10 min., 4°C, mit Bremse), und die Zellen noch einmal gewaschen. Es folgen die Oberflächen- und die intrazelluläre Zytokinfärbung.

2.3.3. Oberflächenfärbung und intrazelluläre Zytokinfärbung

Zur Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen und zur Beurteilung ihrer Zytokinmuster können antigenstimulierte Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmoleküle und gegen Zytokine markiert und anschließend durchflußzytometrisch analysiert und quantifiziert werden (Waldrop, Pitcher et al. 1997; Kern, Surel et al. 1998; Thiel and Radbruch 1999).

Sowohl die PBMCs und die SFMCs als auch die Zellen aus der Vollblutstimulation werden in FACS-Röhrchen überführt, abzentrifugiert (300 x g, 10 min., 4°C, mit Bremse), und das Zellpellet wird in je 0,5 ml 1x FACS™ Permeabilizing Solution resuspendiert. Es wird für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend werden die Zellen gewaschen. Durch die Einwirkung der Permeabilisierungslösung entstehen in der Zellmembran reversible Öffnungen, die für größere Proteine (und somit für die Antikörper) durchgängig sind.

Die für die jeweilige Färbung gewünschten Antikörper werden zu der Färbelösung in der entsprechenden Menge hinzugefügt, so daß die angegebene Endkonzentration erreicht wird. Das Färbevolumen für die intrazelluläre Zytokinfärbung beträgt pro Ansatz 50 µl. Außer den Antikörpern enthält die Färbelösung noch Beriglobin, durch welches unspezifische Bindungen mit dem farbstoffkonjugierten Antikörper

vermieden werden sollten. Auf das Färbevolumen von 50 µl pro Ansatz wird jeweils mit FACS-Puffer aufgefüllt. Es wird für 30 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, die Zellen werden anschließend gewaschen und in einem für die danach erfolgende FACS-Analyse geeigneten Volumen FACS-Puffer (je nach Zellzahl 200-500 µl) resuspendiert.

2.3.4. Technologie der zellulären Affinitätsmatrix

2.3.4.1. Detektion IFN γ -sezernierender Zellen

Die Technologie der zellulären Affinitätsmatrix (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) erlaubt die Detektion und Separation von IFN γ -sezernierenden antigenspezifischen Zellen anhand des von ihnen sezernierten IFN γ (Brosterhus, Brings et al. 1999).

Die Grundlage der Methode bilden zwei Antikörper. Das IFN γ Catch Reagent[®] ist ein bipolarer Antikörper, der einerseits an das IFN γ , andererseits an das CD45 auf der Oberfläche der das Zytokin produzierenden Zelle bindet und somit in der Sekretionsphase die IFN γ -Moleküle an seine Produzenten fixiert (Abbildung 1).

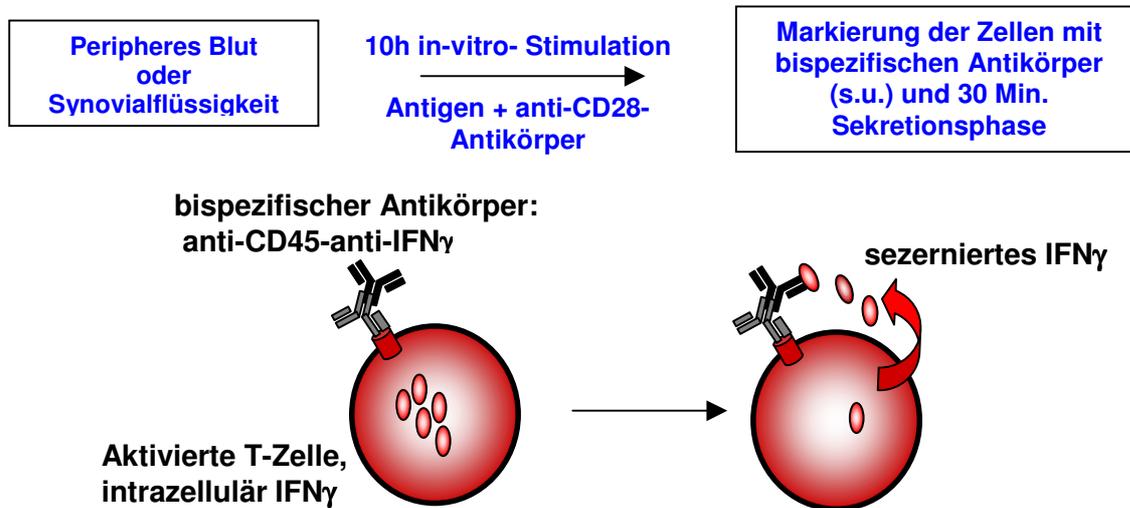


Abbildung 1: Prinzip der Affinitätsmatrix-Technologie (1): T-Zellen aus Vollblut oder Synovialflüssigkeit werden mit spezifischem Antigen zunächst über 10 Stunden in vitro stimuliert. Dann werden die Zellen mit einem bispezifischen Antikörper (Anti-CD45-anti-IFN γ) markiert. Das nach Stimulation von spezifisch aktivierten T-Zellen sezernierte IFN γ wird durch diesen an der Zelloberfläche verankerten Doppelantikörper auf der Zelloberfläche gebunden.

Der zweite Antikörper ist ein IFN γ -Detektionsantikörper (IFN γ Detection Antibody[®]), der fluoreszenzmarkiert ist (PE-gekoppelt) und damit einerseits die durchflußzytometrische Analyse der Zellen ermöglicht, andererseits für die Bindung der Anti-PE-Microbeads[®] entscheidend ist (Abbildung 2). (Die detaillierte Beschreibung der Prinzipien der FACS-Analyse erfolgt weiter unten).

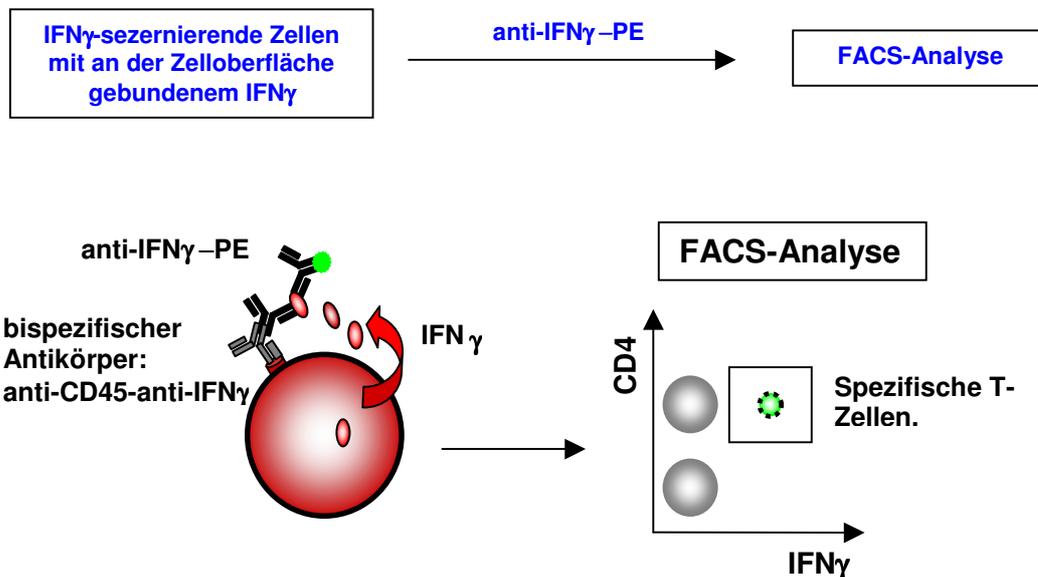


Abbildung 2: Prinzip der Affinitätsmatrix-Technologie (2): Das an der Oberfläche durch den bispezifischen Antikörper verankerte IFN γ wird durch einen zweiten PE-gekoppelten Anti-IFN γ -Antikörper markiert und kann somit durchflußzytometrisch analysiert werden.

Die unbehandelte Synovialflüssigkeit (VollSF) bzw. das Heparinblut wird mit anti-CD28-AK und Antigenen stimuliert. Da hierbei selten vorkommende Zellen detektiert und angereichert werden sollen (der Sekretionsassay ist für antigenspezifische Zellen mit einer Frequenz von weniger als 5% an der Gesamtzellzahl konzipiert), werden je 20-25 ml Heparinblut bzw. SF für die Stimulation mit anti-CD28-AK (dient als Negativkontrolle) bzw. mit anti-CD28-AK und dem zu untersuchenden Antigen angesetzt. Die Stimulationszeit beträgt 10 Stunden, die in 2.3.2. beschriebene Brefeldin A-Gabe fällt weg. Es werden je 2 ml Material pro Kulturröhrchen angesetzt. Sonst gelten die Bedingungen von 2.3.2. Nach 10-stündiger Stimulation werden die Zellen wie in 2.3.2. beschrieben mit EDTA behandelt. Anschließend erfolgt bei Heparinblut die Erythrozytenlyse, bei VollSF fällt dieser Schritt weg. Für die Erythrozytenlyse werden je 5 ml des stimulierten Heparinblutes im Verhältnis 1:1 mit RPMI 1640 Medium verdünnt und mit 40 ml Lysepuffer versetzt. Es wird 15 min. auf Eis inkubiert, wobei die Röhrchen alle 5 min. geschwenkt werden. Das Verfahren nutzt die osmotischen Eigenschaften des Ammoniumchlorids und führt durch das

Einströmen von Wasser zum Platzen der Erythrozyten. Die Erythrozytenreste werden durch Zentrifugation (300 x g, 4°C, 10 min.) von übrigen Zellen getrennt. Das Pellet wird noch zweimal mit PBS/BSA gewaschen.

Je 1×10^7 Zellen werden in 160 µl PBS/BSA resuspendiert und mit 40 µl IFN γ Catch Reagent[®] versetzt. Dies wird für 7 min. auf Eis inkubiert und anschließend mit 37°C warmem Kulturmedium auf 50 ml aufgefüllt. Es folgt die Sekretionsphase im Brutschrank bei 37°C, 5,0% CO₂ und gesättigten Wasserdampf, die 45 min. dauert und bei der die Röhrchen alle 5 min. geschwenkt werden sollen. Durch die niedrige Zellkonzentration und ständige Bewegung des Mediums soll die Bindung des IFN γ an andere als die sezernierende Zelle verhindert werden. Nach 45 min. werden die Zellen abzentrifugiert und noch einmal mit PBS/BSA gewaschen. Es werden wiederum je 1×10^7 Zellen in 160 µl PBS/BSA resuspendiert und mit 40 µl IFN γ Detection Antibody[®] versetzt. Gleichzeitig wird die Oberfläche mit einem anti-CD8- bzw. anti-CD8-Antikörper (CD4-Cy5 bzw. CD8-Cy5) gefärbt. Beriglobinzugabe erfolgt wie bei der intrazellulären Zytokinfärbung. Es wird für 15 min. im Dunkeln auf Eis inkubiert, anschließend mit PBS/BSA gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgt die magnetische Zellseparation.

2.3.4.2. Zellseparation

Die magnetische Zellseparation (MACS, Magnetic Cell Separation) ist eine zur Isolierung von definierten Zellen aus einer uneinheitlichen Zellpopulation entwickelte Methode. Ihr Prinzip beruht darauf, daß Zellen über monoklonale Antikörper direkt oder indirekt mit supermagnetischen Partikeln (Durchmesser kleiner als 100 nm) markiert werden, und die Zellsuspension dann auf eine sich im Magnetfeld (starkes Permanentmagnet-System) befindende Trennsäule gebracht wird. Die von uns verwendeten Trennsäulen besitzen eine Matrix aus eisenmagnetischen Kugeln. Markierte Zellen werden durch magnetische Kräfte in der Säule zurückgehalten und nach Entnahme der Säule aus dem Magnetfeld eluiert. Zur magnetischen Markierung werden je 1×10^7 Zellen in 160 µl PBS/BSA resuspendiert und mit 40 µl anti-PE-Microbeads[®] versetzt. Es wird für 15 min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert, wobei die Röhrchen alle 5 min. leicht geschwenkt werden. Die Zellen werden anschließend

zweimal mit PBS/BSA gewaschen und in 1 ml PBS/BSA aufgenommen. Sowohl von der nur mit anti-CD28-AK stimulierten Zellfraktion als auch von den mit anti-CD28-AK und dem jeweiligen Antigen stimulierten Zellen wird ein geringes Volumen (ca. 30 μ l) für die durchflußzytometrische Analyse entnommen. Zwei VS⁺-Säulen werden mit je 2 ml PBS/BSA gewaschen. Anschließend läßt man die Zellsuspensionen über die Säulen laufen, wobei die negativen Fraktionen jeweils in einem 15 ml Schraubendeckelröhrchen gesammelt werden. Hat die ganze Zellsuspension die Säule durchlaufen, wird jeweils mit 2 ml nachgespült. Danach werden die Säulen aus dem Magnetfeld entfernt und jeweils auf ein weiteres 15 ml Schraubendeckelröhrchen aufgesetzt. 3 ml PBS/BSA werden mit Hilfe des Säulenstempels durch die Säule gedrückt und so die magnetisch markierten Zellen in das Röhrchen eluiert. Sowohl von der positiven als auch von der negativen Fraktion wird ein kleines Volumen für die durchflußzytometrische Untersuchung entnommen. Die positiven Fraktionen durchlaufen jeweils noch eine zweite Säule, um die Reinheit der angereicherten Zellen zu erhöhen. Auch hierbei entnimmt man Zellen für die durchflußzytometrische Analyse (Abbildung 3).

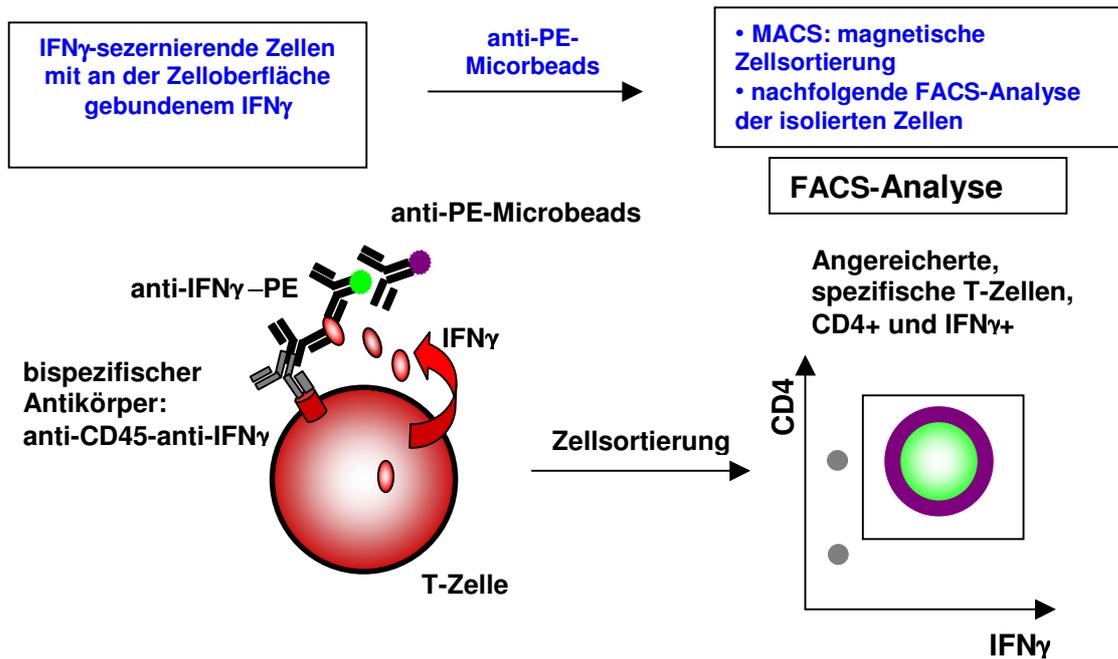


Abbildung 3: Prinzip der Affinitätsmatrix-Technologie (3): Durch die Hinzugabe eines Anti-PE-Antikörpers, an den magnetische „Microbeads“ gekoppelt sind, können die IFN γ -positiven CD4-positiven T-Zellen mit der magnetischen Zellsortierung (MACS) isoliert und später durchflußzytometrisch analysiert werden.

2.3.5. Kultivierung IFN γ -sezernierender Zellen

Die durch die MACS-Technologie angereicherten antigenspezifischen IFN γ -produzierenden Zellen werden bei 300 x g und 4°C für 10 min. zentrifugiert und dann in 200 μ l humanserumhatigen Kulturmedium (HSP-Medium) resuspendiert. Die Zellen werden in einem Loch der 96-Loch-Zellkulturplatte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO $_2$ in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre kultiviert. 4 Unit von rekombinatem IL-2 werden einen Tag nach Anlegen der Zellkultur dazugegeben, danach erfolgen die Gaben alle drei Tage (Endkonzentration von IL-2: 20 U/ml). Proliferieren die Zellen, so werden die Zellen eines Loches auf mehrere Löcher (je nach Proloferationsstärke) verteilt, und es wird mit HSP-Medium jeweils auf 200 μ l/Loch aufgefüllt. Gelingt es, die Zellkultur stärker zu expandieren, so können mehrere (3-4) Löcher aus einer 96-Loch-Platte in ein Loch einer 24-Loch-Platte überführt werden. Bei letzterer beträgt das Zellsuspensionsvolumen pro Loch 1 ml, die IL-2-Menge pro

Loch 20 U.

Sollen die antigenspezifischen Zellen länger als 4 Wochen kultiviert werden, so müssen sie mit dem Antigen restimuliert werden. Zusätzlich werden für die Restimulation noch $0,5 \times 10^6$ autologe antigenpräsentierende Zellen (APCs) pro Loch der 24-Loch-Platte und die entsprechende Menge an IL-2 benötigt. Als APCs fungieren durch das Ficollieren gewonnene frische PBMCs des Patienten. Zum Vergleich können antigenspezifische Zellen auch unspezifisch mit PHA und allogenen APCs (PBMCs eines Fremdspenders) restimuliert werden. Auch hier erfolgt die IL-2-Gabe am Tag der Restimulation.

2.3.6. Restimulation expandierter IFN γ -sezernierender Zellen

Werden antigenspezifische IFN γ -sezernierende Zellen expandiert, so kann ihre Spezifität gegen das entsprechende Antigen bestätigt und eventuelle Kreuzreaktivität überprüft werden. Weiterhin ist es möglich, die antigene Sequenz genauer zu bestimmen. Wird das ursprüngliche Antigen in Fragmente zerlegt, so können Zellen separat mit jedem Fragment stimuliert und die Zellantwort anhand des Zytokinmusters beurteilt werden. Wurde ein Fragment identifiziert, auf das die Zelllinie spezifisch reagiert, so kann dieses in viele Peptide weiter zerlegt werden. Aufgrund der großen Anzahl der Peptide werden sie zu Peptidpools so zusammengefaßt, daß sich ein Kreuzschema ergibt, anhand dessen im Falle der Reaktivität der Pools das für die Reaktion verantwortliche Peptid identifiziert werden kann (s. Ergebnisse). Das so identifizierte Peptid kann wiederum nach Stimulation der Zelllinie anhand des Zytokinmusters als Antigen bestätigt werden.

Die nachfolgend beschriebenen Stimulationsversuche werden prinzipiell wie unter 2.3.2.1. beschrieben durchgeführt. Auf die vorhandenen Unterschiede in der Versuchsdurchführung wird im Folgenden eingegangen. Zusätzlich zu den Antigenen und dem anti-CD28-AK werden APCs für die Stimulationen der Zelllinie benötigt. Als solche fungieren frische autologe PBMCs des Patienten. Es ist notwendig, diese zu markieren, damit sie bei der Versuchsauswertung von den T-Zellen der antigenspezifischen Zelllinie unterschieden werden können. Dies erfolgt durch Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE), einen

membranständigen Farbstoff, der an die freien Amine zytoplasmatischer Proteine bindet und die Zellfunktion nicht beeinträchtigt. PBMCs werden auf 1×10^7 Zellen/ml PBS/BSA eingestellt, und die Zellsuspension wird mit $1 \mu\text{l}$ CFDA-SE-Lösung (Konzentration 5 mM/ml) versetzt. Es wird 4 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, anschließend wird mit RPMI 1640 Medium aufgefüllt und gewaschen. Dieser Waschschritt wird noch einmal wiederholt, um das freie CFDA-SE durch die Bindung an die Proteine des Mediums zu entfernen. Die markierten Zellen werden in HSP-Medium aufgenommen und zwar so, daß die Zellkonzentration 2×10^6 Zellen/ml beträgt. Die zu testenden T-Zellen werden aus der 24-Loch-Platte entnommen, gewaschen und in HSP-Medium resuspendiert. Pro Ansatz sollen 2×10^5 T-Zellen und 1×10^6 APCs (Verhältnis 1:5) in 1 ml HSP-Medium stimuliert werden. Anti-CD28-AK und die Antigene werden in der entsprechenden Konzentration (s. 2.3.2. und 2.2.2.) hinzugegeben. Zusätzlich werden in einem Röhrchen nur die T-Zellen und in einem weiteren nur die APCs zur Kontrolle angesetzt. Die Stimulation und die Fixierung der Zellen erfolgt wie unter 2.3.2. beschrieben.

2.3.7. Durchflußzytometrie

2.3.7.1. Prinzipien der Durchflußzytometrie

Die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern markierten Zellen können durchflußzytometrisch analysiert werden. Alle hier beschriebenen durchflußzytometrischen Untersuchungen wurden am FACS-Calibur™ (Becton Dickinson) durchgeführt. Die Zellen passieren in einem Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert einen Laserstrahl. Durch diesen werden einerseits geeignete Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt, andererseits streuen die Zellen das auftreffende Licht. Unterschiedliche Detektoren ermöglichen die gleichzeitige Analyse mehrerer Parameter.

Streulichtdetektor für Vorwärtslicht (FSC): Das in einem zum Anregungsstrahl geringem Winkel ($3\text{-}10^\circ$) reflektierte Licht wird von diesem Detektor gemessen. Es besteht eine Korrelation v.a. zur Zellgröße der gemessenen Zellen.

Streulichtdetektor für Seitwärtsstreuung (SSC): Hierbei wird von dem Detektor das um

ca. 90° zum Anregungsstrahl reflektierte Licht gemessen. Die Seitwärtsstreuung korreliert v.a. mit der Oberflächenbeschaffenheit (Membranfaltung) und der Granularität der Zellen.

Fluoreszenzdetektoren: Fluoreszenzfarbstoffe emittieren bei Anregung mit dem Laser Licht charakteristischer Wellenlänge, die für jeden Farbstoff spezifisch ist. Die Emissionsmaxima können von unterschiedlichen Detektoren simultan registriert werden. Über den ersten Laser stehen Sensoren für die Wellenlänge von 530 nm (Fluoreszenzkanal FL 1), 585 nm (FL 2) und >650 nm (FL 3) zur Verfügung. Über einen zweiten Dioden-Laser kann ein weiterer Fluoreszenzparameter mit einer anderen Anregungswellenlänge zur Verfügung gestellt werden (FL 4, 670 nm). Bei der Analyse der Fluoreszenzen muß die teilweise Überschneidung der Emissionsspektren berücksichtigt werden. Folglich muß die von jedem Detektor registrierte Fluoreszenz um den von anderen Farbstoffen stammenden Anteil korrigiert werden, was man als Kompensation bezeichnet. Alle Parameter werden im FACS-Gerät für jede analysierte Zelle registriert und gespeichert. Zunächst wird die Zusammensetzung der Populationen analysiert. Jede Zellpopulation (z. B. die Lymphozyten) hat im Vorwärts-Seitwärtsstreulichtdiagramm eine definierte Lage, die von der Größe und Granularität der Zellen bestimmt wird. Möchte man nur eine Zellpopulation analysieren, so kann über diese ein Fenster gesetzt werden (die Population wird dabei als „Region (R)“ definiert), und sie kann dann separat betrachtet werden. FSC- und SSC-Signale werden in linearer Skalierung dargestellt. Als zweites wird die Fluoreszenzmarkierung untersucht, wobei im FACS-Calibur bis zu vier Parameter gleichzeitig betrachtet werden können. Die Aufnahme der Fluoreszenzsignale erfolgt hier in logarithmischer Skalierung. Die Analyse erfolgt mit der Cellquest Research Software® (Becton Dickinson), wobei in der vorliegenden Arbeit die Daten als zweidimensionale „Punkt-Diagramme“ (Dot-plots) dargestellt werden. Es werden Trennlinien („Quadrantenmarker“) in die Punktdiagramme gelegt. Durch die Trennlinien entstehen im Dot-plot vier Quadranten. Der sich jeweils im Quadranten befindende Prozentsatz der Zellen läßt sich in der Quadrantenstatistik ablesen. Mehr als 99% der Zellen der Negativkontrolle sollen sich im linken unteren Quadranten befinden.

2.3.7.2. Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären Zytokinfärbung

Zur Analyse der verschiedenen Zellpopulationen wurden die kurzzeitstimulierten Zellen oberflächen- sowie intrazellulär gefärbt. An der Oberfläche konnten die CD4- oder CD8-Marker sowie der CD69-Marker (als Parameter für die Aktivierung der T-Zellen) durch die nach dem unter 2.3.3. beschriebenen Prinzip erfolgte Färbung dargestellt werden. Durch die ebenfalls unter 2.3.3. beschriebene intrazelluläre Zytokinfärbung konnte das nach Kurzzeitstimulation von den T-Zellen produzierte IFN γ oder TNF α intrazellulär dargestellt werden (Abbildung 4A).

Durch die oben beschriebene Färbung konnten die Zellen aus den kurzzeitstimulierten Ansätzen durchflußzytometrisch analysiert werden.

Im Vorwärts- (FSC) / Seitwärts- (SSC) Streulichtdiagramm (Punktdiagramm) wurde bei der durchflußzytometrischen Analyse zunächst um die mononukleären Zellen ein Fenster (Region 1 = R1) gesetzt (Abbildung 4B). In einem weiteren Punktdiagramm wurden die Zellen, die in der Region 1 liegen, im CD4- oder CD8-SSC-Punktdiagramm dargestellt. Aus dieser Population konnten dann die CD4- bzw. CD8-positiven Zellen in der Region 2 (R2) eingegrenzt werden (Abbildung 4C).

Im folgenden CD69-IFN γ (bzw. TNF α)-Punktdiagrammen gelangen nur solche Zellen zur Darstellung, die sowohl in der Region 1 als auch in der Region 2 liegen (Abbildung 4D).

Die Quadranten-Marker wurden so gewählt, daß >99% der Zellen der Negativkontrolle im linken unteren Quadranten lagen.

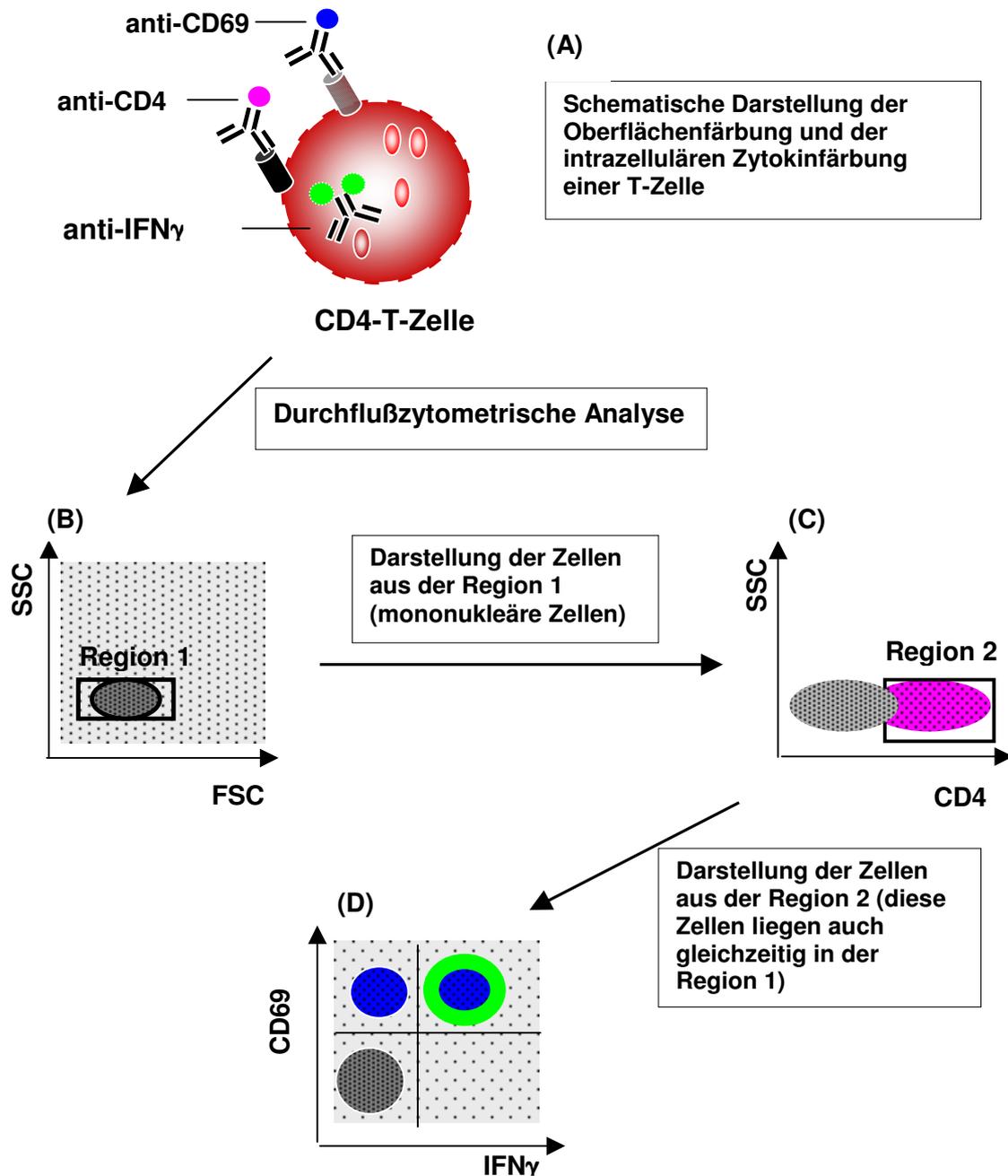


Abbildung 4: Prinzip der Oberflächen- und der intrazellulären Zytokinfärbung sowie der durchflußzytometrischen (FACS-) Analyse der gefärbten Zellen. (A): Schematische Darstellung der Oberflächen- und der intrazellulären Zytokinfärbung am Beispiel einer CD69⁺/IFN γ ⁺-CD4-T-Zelle. (B): In der FACS-Analyse wird im Vorwärts-(FSC-)/Seitwärts-(SSC-) Streulichtdiagramm die Population der mononukleären Zellen im untersuchten Zellansatz als Region 1 eingegrenzt. (C): In der Region 2 werden die CD4⁺-Zellen, die gleichzeitig in der Region 1 liegen, eingegrenzt. (D): Die interessierenden Zellen (sowohl in der Region 1 als auch in der Region 2 liegend) werden auf ihre CD69-Positivität (Marker der Aktivierung der Zellen) und auf ihre IFN γ -Positivität hin untersucht. Die doppelpositiven Zellen sind die durch das für die Stimulation verwendete Antigen spezifisch aktivierten T-Zellen.

2.3.7.3. Durchflußzytometrische Analyse bei Technologie der zellulären Affinitätsmatrix

Wie unter 2.3.7.2 wurde auch hierbei um die mononukleären Zellen im Vorwärts- (FSC) / Seitwärts- (SSC) Streulichtdiagramm ein Fenster (R1) gesetzt. Aus dieser Population konnten wiederum die CD4- bzw. CD8-positiven Zellen im Fenster R2 eingegrenzt werden. Aus den CD4- bzw. CD8-positiven mononukleären Zellen wurden im nächsten Schritt die nicht mit Propidiumjodid anfärbbaren (und damit lebenden) Zellen im Fenster R3 eingegrenzt. Für diese Zellpopulationen wurde dann die INF γ -Produktion im dot-plot-Diagramm dargestellt.

2.3.7.4. Durchflußzytometrische Analyse nach Expansion INF γ -sezernierender Zellen

Wie oben beschrieben, erfolgte zunächst auch hier die Eingrenzung der mononukleären Zellen im Fenster R1. Aus den in diesem Fenster liegenden Zellen wurden nur die mit CFDA-PE nicht markierten Zellen (CFDA-PE-positive Zellen sind die APCs, die für die Restimulation der expandierten Zellen verwendet wurden, s. 2.3.6) im Fenster R2 eingegrenzt und von diesen wiederum die CD4-positiven Zellen im Fenster R3. Für diese Zellpopulationen wurde dann die INF γ -Produktion im dot-plot-Diagramm dargestellt.

2.3.8. Statistik

Für statistische Berechnungen wurde das Programm SPSS 10.0 für Microsoft Windows verwendet.

Signifikanzprüfungen für den Vergleich von gepaarten Werten (antigenstimulierte Zellen und die dazugehörigen Kontrollen) wurden mit dem Wilcoxon-Test für nicht normalverteilte Stichproben vorgenommen.

Für den Vergleich von verschiedenen Gruppen (Vergleich von Patienten, die unterschiedlich behandelt wurden) wurde der Mann-Whitney-U-Test für nicht normalverteilte Stichproben verwendet.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als signifikant angesehen.

Für die Beurteilung der Ergebnisse der Kurzzeit-Stimulationen wurden Mittelwerte

der am Durchflußzytometer gemessenen prozentualen Anteile von positiven Zellen errechnet und die 95%-Konfidenzintervalle um die Mittelwerte bestimmt. Die 95%-Konfidenzintervalle um die Mittelwerte der antigenstimulierten Ansätze wurden anschließend mit den 95%-Konfidenzintervallen der Negativkontrollen verglichen.

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung immundominanter T-Zell-Epitope bei Patienten mit reaktiver Arthritis

Für die Bestimmung der Feinspezifität der antigenspezifischen IFN γ -sezernierenden Zellen war es zunächst nötig, diese Zellen zu isolieren. Wie im Kapitel 2 beschrieben, wurde das zur Verfügung stehende Material zunächst mit dem in Frage kommenden Antigen stimuliert und die antigenspezifischen Zellen dann anhand des von ihnen produzierten IFN γ isoliert. Gelang die Expansion dieser Zellen, so konnte anschließend die Analyse immundominanter Epitope aus dem jeweiligen Antigen erfolgen.

Da die Technologie der zellulären Affinitätmatrix eine aufwendige Methode ist, wurde die Isolierung und Expansion der Zellen nur bei solchen Patienten versucht, die vorher in einem Kurzzeit-Stimulationstest auf das in Frage kommende Antigen mit IFN γ -Produktion reagiert haben. Diese konnte dann durch die intrazelluläre Zytokinfärbung nachgewiesen werden.

3.1.1. Bestimmung der Feinspezifität von antigenspezifischen CD4⁺-T-Zellen bei Chlamydia-trachomatis-induzierter reaktiver Arthritis

Es wurden insgesamt sechs Patienten mit Verdacht auf bzw. mit klinischer Diagnose der chlamydien-induzierten reaktiven Arthritis untersucht. Zur Charakterisierung siehe 2.1.1. Die Expansion der IFN γ ⁺-CD4⁺-Lymphozyten und die nachfolgende Epitopanalyse gelang bei drei von diesen Patienten (Patienten 1-3).

3.1.1.1. Antigenstimulation des peripheren Blutes und der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Chlamydien-induzierter reaktiver Arthritis

Nach der Kurzzeit-Stimulation des vorliegenden Materials (Vollblut oder VollSF) wurde eine Oberflächenfärbung gegen CD4 und CD69 (CD69 dient als Aktivitätsmarker) sowie eine intrazelluläre Zytokinfärbung gegen IFN γ und zusätzlich gegen TNF α durchgeführt.

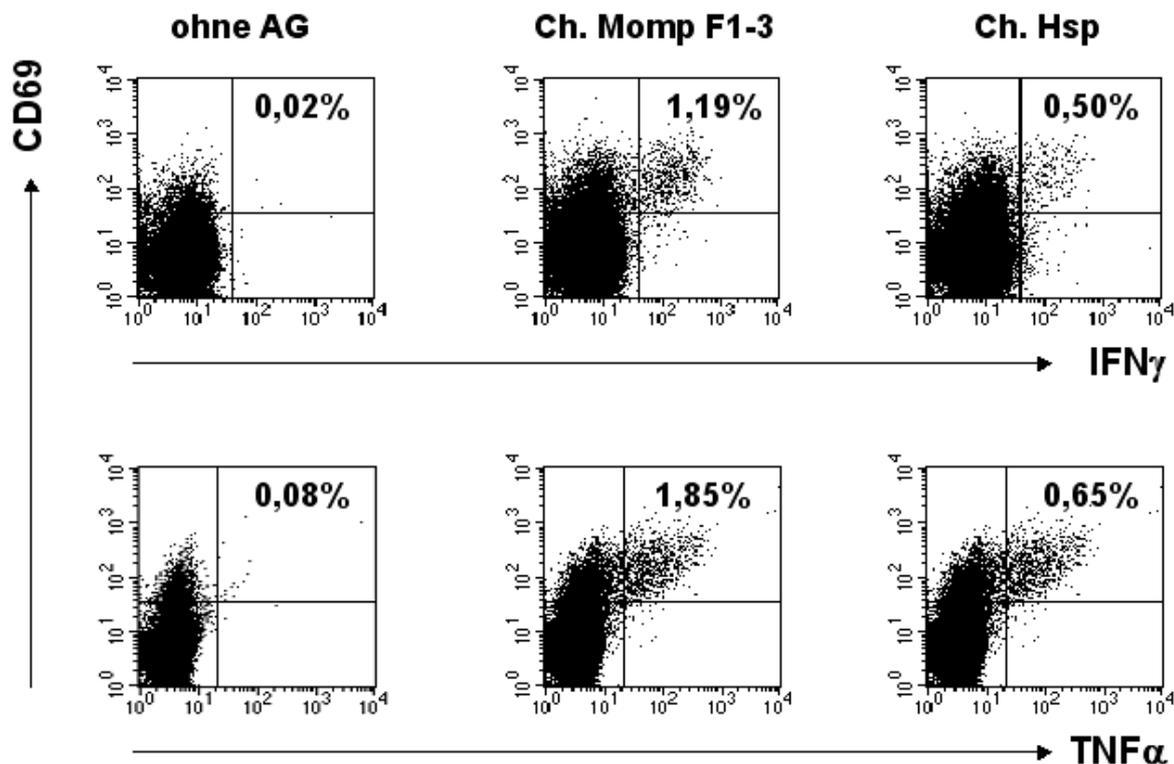


Abbildung 5: Frequenzen der IFN γ ⁺-CD69⁺-CD4⁺- und der TNF α ⁺-CD69⁺-CD4⁺-T-Zellen nach der Stimulation der Synovialflüssigkeit (Patient 2) mit chlamydialen Antigenen

In der Abbildung 5 wird die durchflußzytometrische Analyse verschiedener Stimulationsansätze der Synovialflüssigkeit bei Patient 2 gezeigt. Dargestellt sind nur die CD4⁺-Lymphozyten. Um zu dieser Eingrenzung zu gelangen, wird zunächst die Lymphozytenpopulation im FSC-SSC-Punktdiagramm als Region 1 definiert. In

einem weiteren Punktdiagramm werden die Zellen, die in der Region 1 liegen, im CD4-SSC-Punktdiagramm dargestellt. Die CD4⁺-Lymphozyten werden als Region 2 definiert. In den in der Abbildung 5 gezeigten Diagrammen gelangen nur solche Zellen zur Darstellung, die sich sowohl in der Region 1 als auch in der Region 2 befinden.

Bei der Kurzzeit-Stimulation der Synovialflüssigkeit von Patient 2 zeigte sich eine starke Reaktivität der Zellen auf das Hsp von Chlamydia trachomatis (Ch. Hsp) und auf die drei zu einem Pool zusammengefaßten Fragmente des chlamydialen Momp (Ch. Momp F1-3). Der Anteil der IFN γ ⁺-CD69⁺-CD4⁺-Lymphozyten an der Gesamtpopulation der CD4⁺-Lymphozyten betrug 1,19% für Ch.t. Momp F1-3 und 0,5% für Ch.t. Hsp. Die Negativkontrolle, die nur mit anti-CD28-AK stimuliert wurde, zeigte einen Anteil von 0,02% an IFN γ ⁺-CD69⁺-CD4⁺-Zellen. Bei der mit SEB stimulierten Positivkontrolle betrug der Anteil der doppeltpositiven CD4⁺-Zellen 12,81%. Bei den Patienten 1 bis 3 konnten für die Kurzzeit-Stimulationen sowohl Synovialflüssigkeit als auch peripheres Blut gewonnen werden, bei den übrigen Patienten wurde nur Blut als Material verwendet.

Die Ergebnisse der Stimulationen werden in den Abbildung 6 dargestellt.

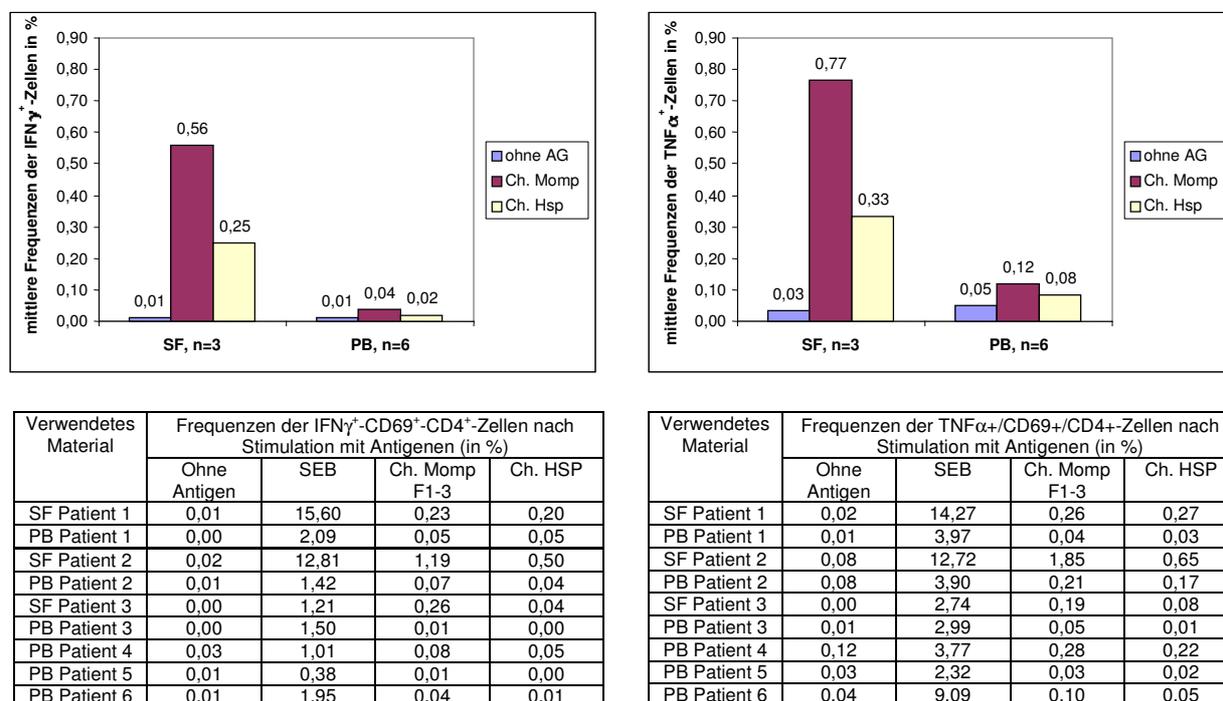


Abbildung 6: Frequenzen der IFN γ^+ /CD69 $^+$ /CD4 $^+$ - und der TNF α^+ /CD69 $^+$ /CD4 $^+$ -Zellen in der Synovialflüssigkeit bzw. im peripheren Blut von Patienten mit Chlamydien-induzierter ReA nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen. In den Balkendiagrammen werden die mittleren Zellfrequenzen in der Synovialflüssigkeit und im peripheren Blut dargestellt. Die Tabellen zeigen die bei den einzelnen Patienten nach der Antigenstimulation gemessenen Frequenzen.

Es fällt auf, daß die Frequenzen der antigenspezifischen Zellen im peripheren Blut immer geringer waren als in der Synovialflüssigkeit. Während Negativkontrollen sowohl in SF als auch im PB ähnlich niedrig lagen, waren Werte für IFN γ^+ - bzw. TNF α^+ -Zellen für die Antigenstimulation bei Patienten 1 bis 3, bei denen beide Materialien verwendet wurden, im SF immer um ein Vielfaches höher als im PB. Die Frequenzen der TNF α^+ -produzierenden CD69 $^+$ -CD4 $^+$ -Lymphozyten an den Gesamt-CD4 $^+$ -Zellen sind fast in allen Fällen höher als die der IFN γ^+ -Produzenten. Allerdings liegen die Werte der Negativkontrollen für TNF α fast immer höher.

3.1.1.2. Isolierung antigenspezifischer CD4 $^+$ -T-Zellen

Die Isolierung der antigenspezifischen Zellen wurde bei den Patienten 1, 2, 3 und 5 durchgeführt. Sie erfolgte wie im Methodenteil beschrieben nach 10-stündiger

Stimulation des vorliegenden Materials mit Ch.t. Momp F1-3 und dem anti-CD28-AK. Im Rahmen der Arbeit konzentrierten wir uns auf die Epitopanalyse des chlamydialen Momp-Proteins, da sich dieses Protein im Rahmen von früheren Untersuchungen bereits als ein wichtiges potentiell Antigen erwiesen hat. Bei Patienten 1, 2 und 5 konnte auch zusätzlich ein Kontrollansatz - nur mit anti-CD28-AK stimuliert - mitgeführt werden, bei Patient 3 reichte die Menge an Synovialflüssigkeit für diese Kontrolle nicht mehr aus. Synovialflüssigkeit wurde als Material bei Patienten 1 und 3 verwendet, bei Patienten 2 und 5 wurde mit peripherem Blut gearbeitet.

In Abbildung 7 werden die durch die Affinitätsmatrix detektierten Frequenzen der antigenspezifischen IFN γ -sezernierenden Zellen dargestellt.

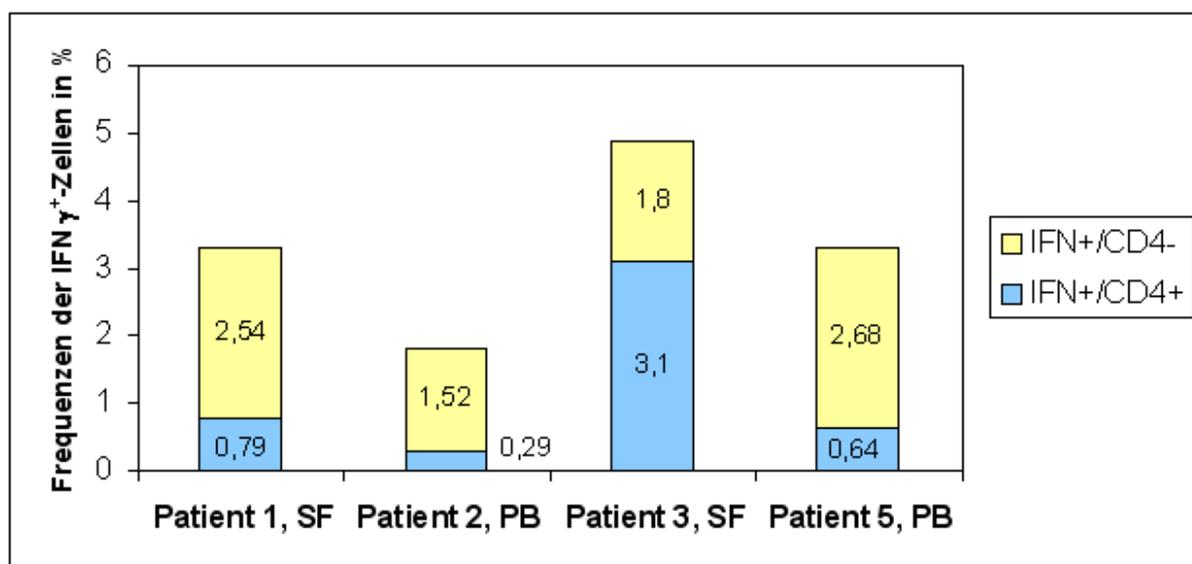


Abbildung 7: Frequenzen der durch die Affinitätsmatrix detektierten Ch.t. Momp-spezifischen IFN γ -sezernierenden CD4⁺- und CD4⁻-Zellen (vor der Anreicherung (vor MACS))

Wie bei der Kurzzeit-Stimulation wurden bei Patienten, bei denen SF als Material verwendet wurde, insgesamt höhere Frequenzen an IFN γ -Produzenten beobachtet.

Die Technologie der zellulären Affinitätsmatrix wurde im Methodenteil detailliert beschrieben. Zur Wiederholung soll hier nur kurz gesagt werden, daß das von den spezifischen T-Zellen nach Antigenstimulation produzierte IFN γ mit Hilfe dieser Methode an der Oberfläche der produzierenden Zellen gebunden wird und durchflußzytometrisch quantifiziert werden kann. Außerdem können diese Zellen im

weiteren Schritten angereichert werden.

Die höchste Frequenz an IFN γ ⁺-Zellen vor der Anreicherung zeigte sich bei Patient 3, sie betrug fast 5%, wobei 3,1% auf die IFN γ ⁺-CD4⁺- und 1,8% auf die IFN γ ⁺-CD4⁻-Zellen entfielen. Bei den übrigen Patienten betrug die Frequenz der IFN γ -sezernierenden Zellen zwischen 1,8% bei Patient 2 und 3,3% bei Patient 1, wobei der Prozentsatz der IFN γ ⁺-CD4⁻-Zellen stets viel höher lag als der der IFN γ ⁺-CD4⁺-Lymphozyten.

Die Frequenzen der IFN γ ⁺-Zellen nach Stimulation nur mit anti-CD28-AK lagen stets weit unter denen nach Antigenstimulation. Sie betrug zwischen 0,29% bei Patient 2 und 1,43% bei Patient 5. Bei Patient 3 konnte keine Kontrollstimulation mit anti-CD28-AK durchgeführt werden, bei anderen Patienten waren – analog zur Antigenstimulation – die Frequenzen der IFN γ ⁺-Zellen im VollSF stets höher als im Vollblut und der Anteil der IFN γ ⁺-CD4⁻-Zellen immer höher als der Anteil der IFN γ ⁺-CD4⁺-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 8 zeigt die Frequenzen der Zellen nach der anschließenden magnetischen Anreicherung.

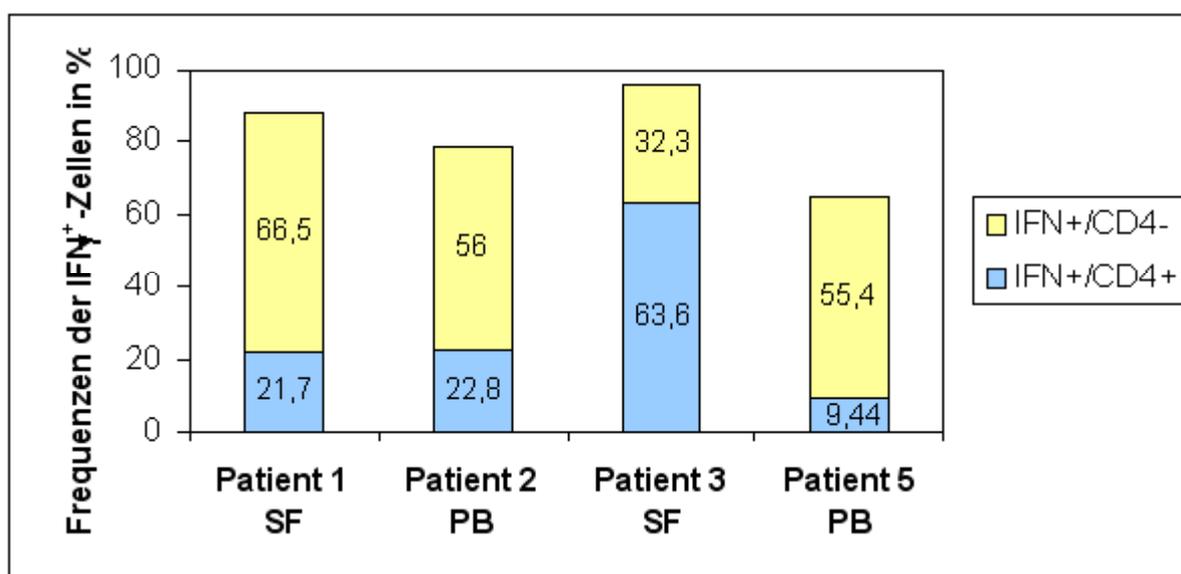


Abbildung 8: Frequenzen der Ch.t. Momp-spezifischen IFN γ -sezernierenden CD4⁺- und CD4⁻-Zellen nach Anreicherung (nach Anreicherung (nach 2.MACS))

IFN γ ⁺-Zellen konnten durch die MACS-Technologie hoch angereichert werden. Bei

SF-Stimulationen war eine Anreicherung auf über 90% möglich, in Experimenten, bei denen PB als Material verwendet wurde, auf über 60% (Patient 5) und knapp 80% (Patient 2). Nach erfolgter Anreicherung wurde die höchste Frequenz an $\text{IFN}\gamma^+$ -Zellen (95,9%) ebenfalls bei Patient 3 beobachtet.

Die Frequenzen der $\text{IFN}\gamma$ -sezernierenden Zellen bei den Kontrollansätzen nur mit anti-CD28-AK lagen zwischen 96,9% bei Patient 1 und 13,5% bei Patient 5. Die $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten konnten also auch bei Kontrollansätzen zum Teil hoch angereichert werden, doch war ihre absolute Zellzahl hierbei stets gering. Der Anteil der $\text{IFN}\gamma^+$ - CD4^+ -Zellen war bei den Kontrollansätzen stets geringer als der Anteil der $\text{IFN}\gamma^+$ - CD4^- -Zellen (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 9 zeigt am Beispiel von Patient 3 die durchflußzytometrische Analyse der Isolierungsschritte bei der MACS-Technologie.

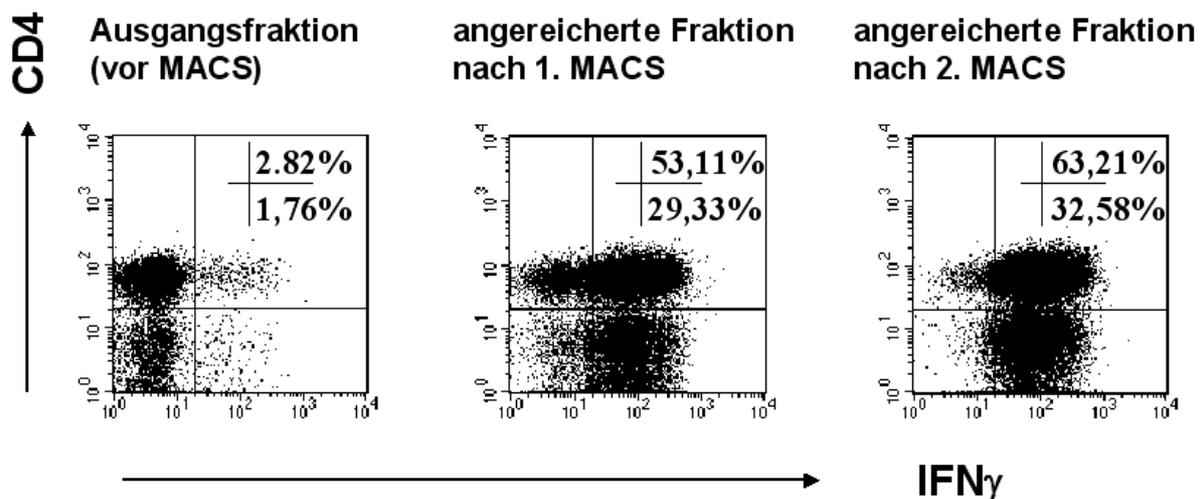


Abbildung 9: Frequenzen der IFN -sezernierenden CD4^+ - und CD4^- -Zellen vor und nach c Anreicherung (vor und nach MACS) bei Patient 3

3.1.1.3. Expansion der isolierten $\text{IFN}\gamma^+$ -T-Zellen und Bestimmung der antigenen Sequenz

Für die Überprüfung der Spezifität der angereicherten Zellen und für eine genauere Bestimmung des Antigens wurden die Zellen, wie im Methodenteil beschrieben, in vitro expandiert. Die Expansion der angereicherten Zellen gelang bei Patienten 1-3.

Es folgten dann erneute Stimulationsversuche mit Antigenen. Im ersten Versuch wurden die Zellen mit den chlamydialen Momp-Fragmenten 1, 2 und 3 separat

stimuliert. Zusätzlich erfolgte eine Stimulation mit Y.e. 19kD als Negativkontrolle. Die Ergebnisse dieser Versuche werden in der Abbildung 10 dargestellt.

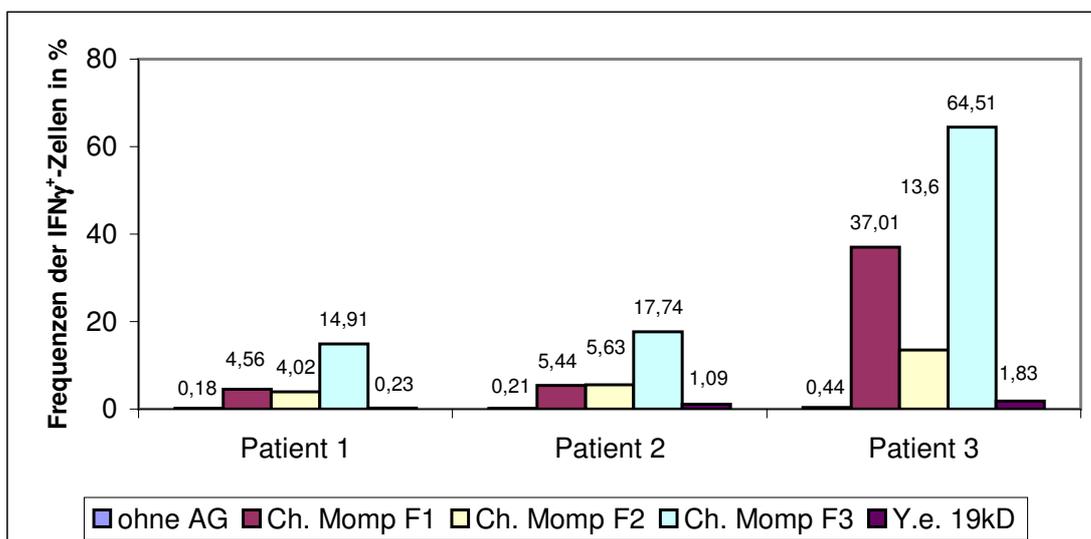


Abbildung 10: Frequenzen der $\text{IFN}\gamma^+/\text{CD69}^+/\text{CD4}^+$ -T-Zellen an den expandierten antigenspezifischen T-Zellen nach Restimulation mit Fragment 1-3 von Ch.t. Momp sowie mit Y.e. 19kD

Bei allen drei Patienten zeigte sich die stärkste Reaktion auf das Ch.t. Momp F3. Die Frequenzen der $\text{IFN}\gamma^+$ - Zellen betragen 14,9% bei Patient 1, 17,74% bei Patient 2 und 64,51% bei Patient 3. Die Reaktionen auf die Fragmente 1 und 2 von Ch.t. Momp waren deutlich schwächer, die Frequenzen lagen in den meisten Fällen bei ca. einem Drittel der Frequenzen für F3. Patient 3 zeigte zusätzlich eine stärkere Reaktion auf F1 (37,01%).

Bei allen Negativkontrollen (Stimulation nur mit anti-CD28-AK) lagen die Frequenzen der $\text{IFN}\gamma^+$ - Zellen stets unter 1%.

Auch die Reaktionen auf das von Yersinien stammende Protein, Y.e. 19kD, welches als Kontrollantigen fungierte, waren gering (zwischen 0,23% bei Patient 1 und 1,83% bei Patient 3).

Abbildung 11 zeigt exemplarisch die durchflußzytometrische Analyse der oben beschriebenen Stimulationsversuche. Im oberen Bereich der Abbildung wird die für die durchflußzytometrische Analyse wichtige Trennung von CFDA-SE-markierten APCs von den expandierten Zellen gezeigt.

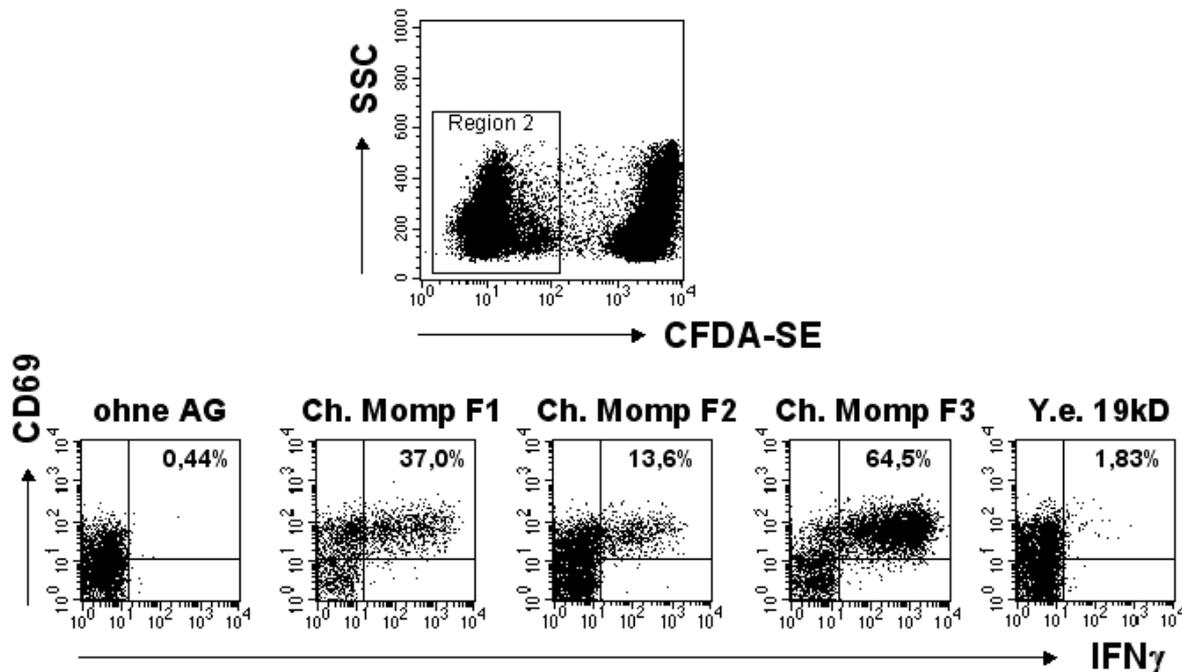


Abbildung 11: Frequenzen der IFN γ ⁺/CD69⁺/CD4⁺-Zellen an den expandierten Zellen nach Restimulation mit den Fragmenten 1, 2 und 3 von Ch. Momp und mit Y.e. 19kD (Negativkontrolle) bei Patient 3. Die für die Restimulation eingesetzten APCs wurden mit CFDA-SE markiert und liegen jenseits des Analysefensters (Region 2, obere Abbildung). Es werden nur die in der Region 2 liegenden unmarkierten Zellen auf die Zytokinproduktion nach Antigenstimulation untersucht.

Um das antigene Epitop noch genauer zu bestimmen, wurden die Fragmente in 43 Peptide (20-mer) mit überlappenden Sequenzen zerlegt. Jedes Peptid hatte seine 11 ersten Aminosäuren mit seinem Vorgänger, seine letzten 11 mit dem darauf folgenden Peptid gemeinsam (eine Ausnahme waren die letzten beiden Peptide 42 und 43, sie hatten 16 Aminosäuren gemeinsam). Die Peptide wurden zu insgesamt 14 Pools nach dem in der Tabelle 6 vorgegebenen Schema zusammengefaßt. In den Pools 1 bis 5 wurden also jeweils 7, in den Pools 6 und 7 jeweils 4 aufeinanderfolgende Peptide zusammengefaßt. Die Pools 8 bis 14 wurden dann nach dem unten angegebenen Schema so zusammengestellt, daß jedes Peptid in nur genau 2 Pools vertreten war und somit bei eventueller Reaktion der Zellen auf die Stimulation mit den entsprechenden Pools eindeutig identifiziert werden konnte.

Pools/ Peptide	8	9	10	11	12	13	14
1	1	2	3	4	5	6	7
2	8	9	10	11	12	13	14
3	15	16	17	18	19	20	21
4	22	23	24	25	26	27	28
5	29	30	31	32	33	34	35
6	36	37	38	39			
7	40	41	42	43			

Tabelle 6: Die 43 Peptide aus Fragment 3 von Ch.t. Momp wurden zu 14 Pools so zusammengefaßt, daß anhand der Reaktivität der Pools die als Antigen wirkenden Peptide identifiziert werden konnten.

Nach weiterer Expansion über 4 Wochen unter Stimulation mit IL-2, wie im Methodenteil beschrieben, konnten die Zellen mit den Pools restimuliert werden. Bei den Patienten 1 und 2 zeigten sich hohe Frequenzen von IFN γ ⁺- Zellen nach Stimulation mit den Pools 7, 10 und 11. Sie lagen bei Patient 1 zwischen 10% und 20,39% und bei Patient 2 zwischen 25,58% und 31,46%. Diese Frequenzen sind um ein Vielfaches höher als diejenigen, die nach der Stimulation mit anderen Pools beobachtet wurden. Bei Patient 3 wurde nur eine schwach positive Reaktion auf die Stimulation mit Pool 7 (2,11%) und Pool 11 (4,3%) und eine mit den anderen Patienten vergleichbar starke Reaktion auf Pool 10 (19,24%) beobachtet. Bei Negativkontrollen, die nur mit anti-CD28-AK stimuliert wurden, lagen die Frequenzen immer unter 1%. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 12 dargestellt, die exemplarische durchflußzytometrische Analyse in der Abbildung 13.

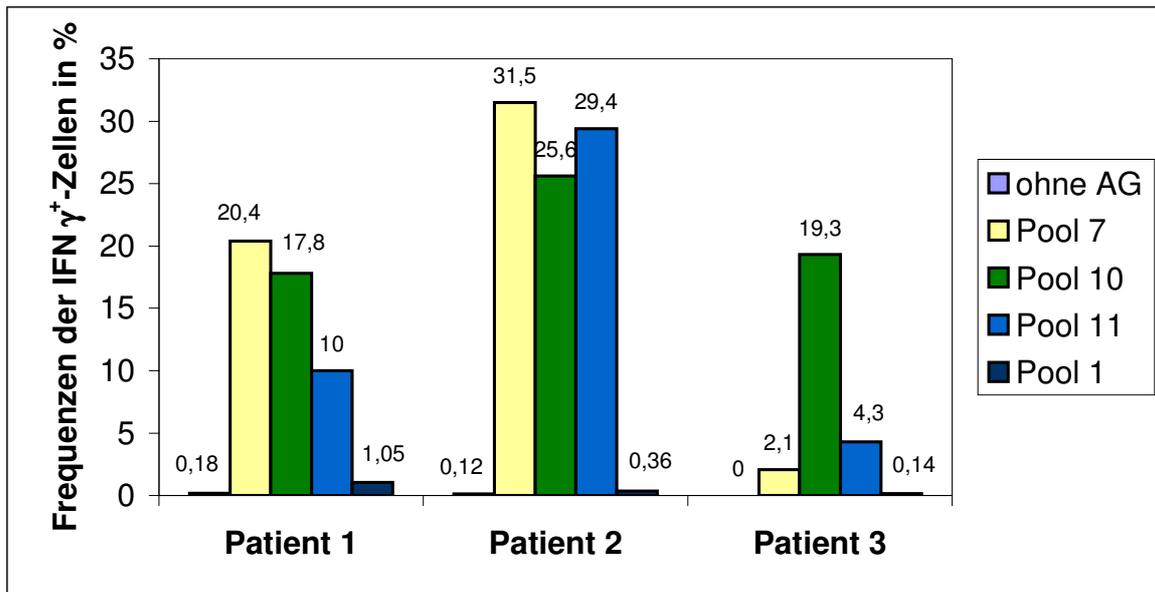


Abbildung 12: Frequenzen der $\text{IFN}\gamma^+/\text{CD69}^+/\text{CD4}^+$ -Zellen an den expandierten Zellen nach Restimulation mit den aus dem Ch.t. Momp F3 stammenden Peptidpools bei Patient 2. Dargestellt werden die Pools 7, 10 und 11, bei denen sich eine positive Reaktion zeigte, sowie Pool 1, der die Negativkontrolle darstellt.

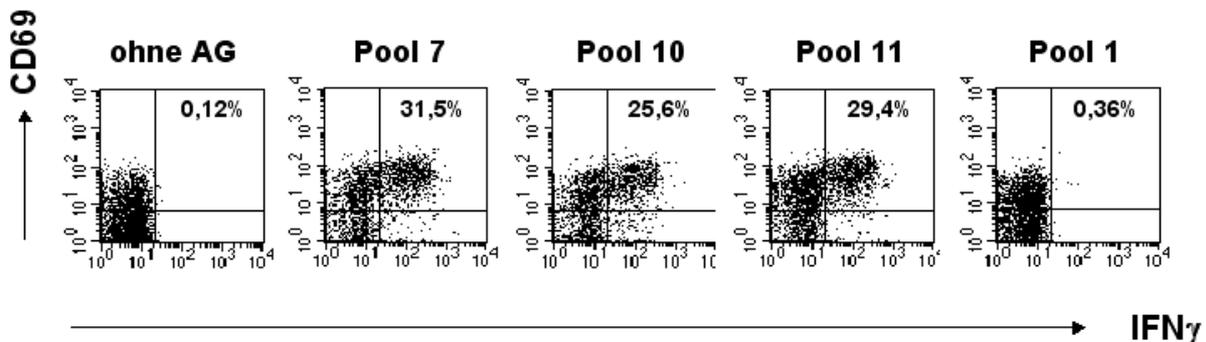


Abbildung 13: Frequenzen der $\text{IFN}\gamma^+/\text{CD69}^+/\text{CD4}^+$ -Zellen an den expandierten antigenspezifischen T-Zellen nach Restimulation mit den zu Pools zusammengefaßten Peptiden aus dem Fragment 3 von Ch.t. Momp. Dargestellt sind die reaktiven Pools 7, 10 und 11 sowie der als Negativkontrolle dienender Pool 1.

Da wie oben erläutert, jedes Peptid nur in genau zwei Pools vertreten ist, kann bei der Reaktion von zwei Pools das entsprechende reaktive Peptid bestimmt werden.

Aus dem obigen Schema ist ersichtlich, daß den Pools 7 und 10 das Peptid 42, den Pools 7 und 11 das Peptid 43 gemeinsam ist. In einem weiteren Versuch wurde die Restimulation der expandierten T-Zellen mit diesen beiden Peptiden sowie mit Kontrollpeptiden vorgenommen. Dieser Versuch sollte dann der Bestätigung der

durch die Pool-Reaktion vermuteten Antigenität der entsprechenden Peptide dienen. Alle drei Patienten zeigten eine starke Reaktion auf das Peptid 42, die Frequenzen lagen zwischen 17,2% und 30%. Die Patienten 1 und 2 reagierten auch auf das Peptid 43 (bei Patient 1 betrug die Frequenz 12,3%, bei Patient 2 30,32%). Die Negativkontrollen lagen immer unter 1%, ähnlich niedrige Frequenzen wurden nach der Stimulation mit dem als Kontrollpeptid verwendeten Peptid 6 beobachtet. Die durchflußzytometrische Analyse wird in der Abbildung 14 gezeigt.

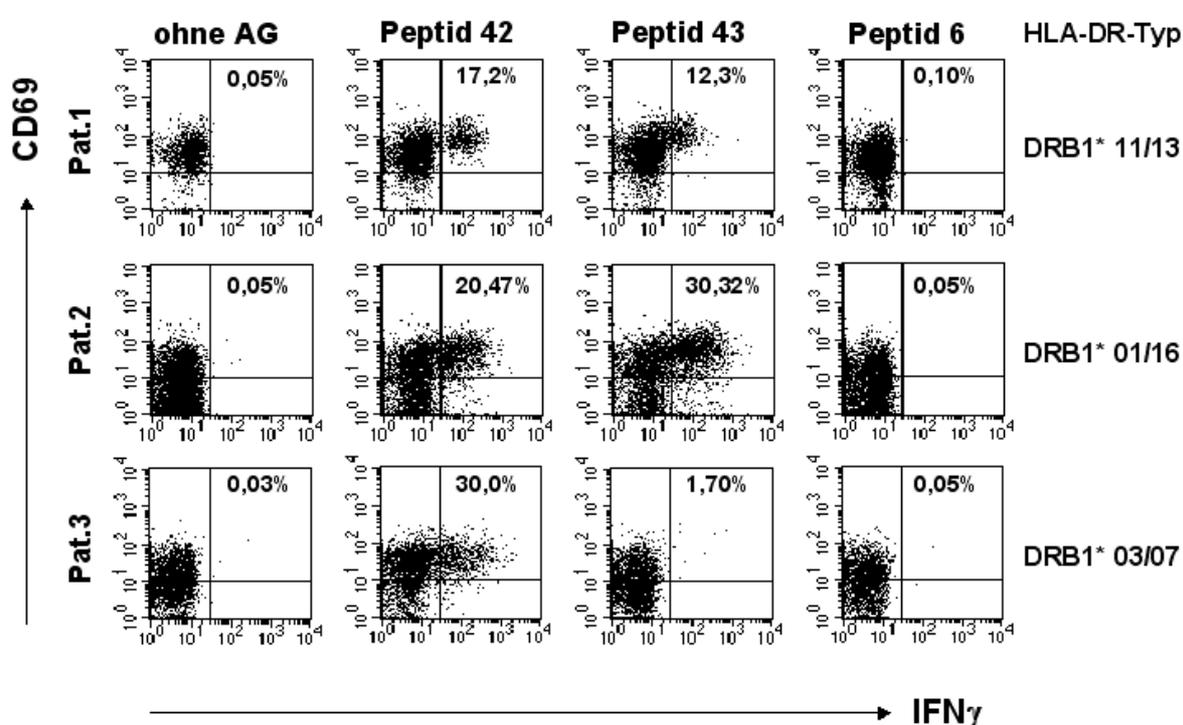


Abbildung 14: Frequenzen der $\text{IFN}\gamma^+/\text{CD69}^+/\text{CD4}^+$ -Zellen an den expandierten Zellen nach Stimulation mit den antigen wirkenden Peptiden sowie mit einem Kontrollpeptid bei den Patienten 1 bis 3. Die Patienten gehören zu verschiedenen HLA-DRB-Typen.

In der folgenden Tabelle 7 werden die Sequenzen der bei den Patienten als antigen wirkend identifizierten Peptide wiedergegeben. Die bei den beiden Peptiden überlappende Aminosäuresequenz ist fett markiert.

Nr.	Protein	Position der Peptides	Peptidsequenz
		innerhalb des Proteins	
42	Ch. Momp Serovar D(F3)	369-388	KYAVT VETRL IDERA AHVNA
43	Ch. Momp Serovar D(F3)	374-393	TVETR LIDER AAHVN AQFRF

Tabelle 7: Charakterisierung der antigenen Peptide, die aus dem Ch.t. Momp F3-Protein identifiziert wurden. Die überlappende Aminosäuresequenz der beiden Peptide ist fett markiert.

3.1.1.4. Verlust der Antigenpezifität einer Zellkultur durch unspezifische Expansion

Da es gelungen ist, die isolierten IFN γ ⁺-T-Zellen von Patient 2 über einen langen (über 6 Wochen) Zeitraum zu kultivieren, wurde anhand dieser Zelllinie überprüft, ob die Spezifität der IFN γ -produzierenden Zellen in einer Zellkultur mit der Zeit verloren geht und wie dieser Prozeß verhindert werden kann.

Zu diesem Zweck wurde ein Teil der Zellen vier Wochen nach Separation mit ihrem spezifischen Antigen (Ch.t. Momp F3) unter Zugabe von bestrahlten – also proliferationsunfähigen - autologen APCs restimuliert. Der andere Teil der Zellkultur wurde mit dem unspezifischen Stimulans PHA unter Zugabe von bestrahlten allogenen APCs stimuliert. In beiden Versuchsansätzen wurden Zellen unter Zugabe von IL-2 über einige Tage kultiviert und anschließend in einer Kurzzeit-Stimulation getestet. Die Antigenpezifität der mit F3 von Ch.t. Momp restimulierten Zellen (Ansatz 1) ist im Gegensatz zu den mit PHA restimulierten Zellen (Ansatz 2) erhalten geblieben. Die Frequenz der IFN γ ⁺-CD69⁺-CD4⁺-Zellen nach der Kurzzeit-Stimulation mit F3 betrug 14,23% im Ansatz 1, hingegen nur 0,04% im Ansatz 2. Auch die Reaktionen auf die in vorausgegangenen Experimenten als Antigen identifizierten Peptide 42 und 43 waren im Ansatz 1 deutlich (31,35% und 32,0%), im Ansatz 2 dagegen nicht vorhanden (0,06% und 0,07%). Es fällt außerdem auf, daß die Reaktionen auf die Fragmente 1 und 2 von Ch.t. Momp bei beiden Ansätzen im Vergleich zu Vorexperimenten schwach waren (im Ansatz 1 unter 1%, im Ansatz 2 unter 0,5%, in vorausgegangenen Experimenten dagegen über 5%). Die Werte für die nur mit anti-CD28-AK stimulierter Negativkontrolle sowie für die Kontrollpeptide 6 und 13 lagen in allen Fällen unter 1%. Diese Daten werden in der Abbildung 15 und

Abbildung 16 dargestellt.

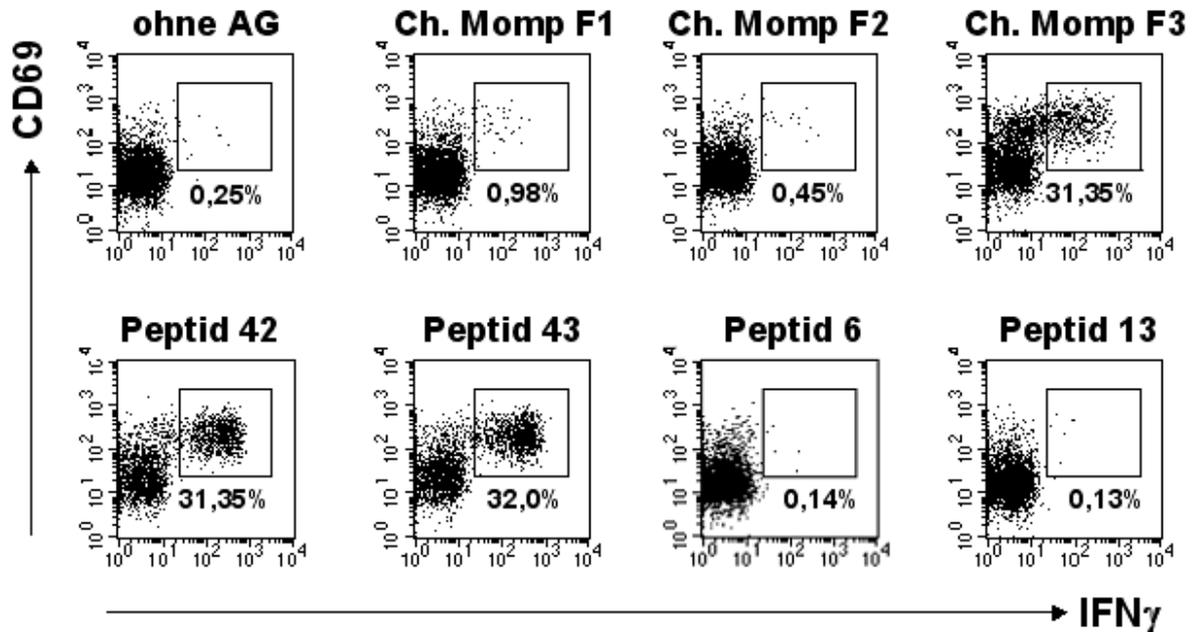


Abbildung 15: Die Zellen der IFN γ ⁺-Zelllinie von Patient 2 wurden nach 4 Wochen mit Ch.t. Momp F3 unter Zugabe von bestrahlten autologen APCs restimuliert (Ansatz 1 im Text). Nach einer Kurzzeit-Stimulation zeigte sich eine erhaltene hohe Spezifität der Zellen für Ch.t. Momp F3 sowie für die als Antigene identifizierte Peptide.

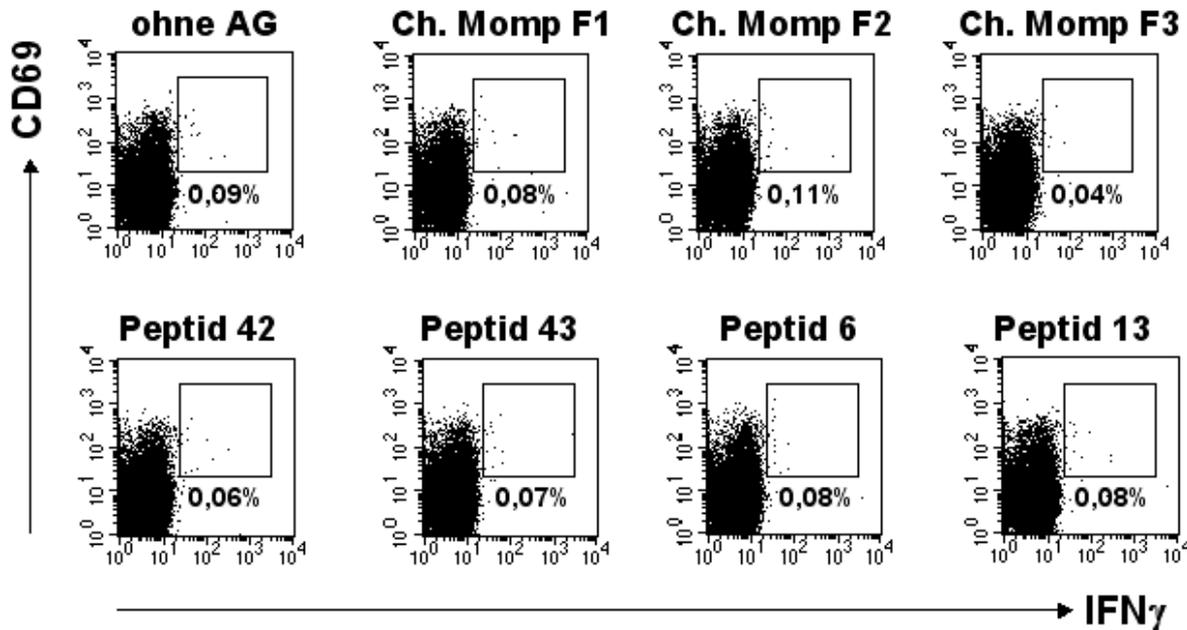


Abbildung 16: Die Zellen der $\text{IFN}\gamma^+$ -Zelllinie von Patient 2 wurden nach 4 Wochen mit dem unspezifischen Mitogen PHA unter Zugabe von bestrahlten allogenen APCs restimuliert (Ansatz 2 im Text). Die Spezifität der Zelllinie konnte hierbei im Gegensatz zu Ansatz 1 nicht erhalten werden. Nach einer Kurzzeit-Stimulation mit Ch.t. Momp F3 und mit den als Antigene identifizierten Peptiden zeigte sich keine Erhöhung der $\text{IFN}\gamma$ -Produktion im Vergleich zu der Negativkontrolle.

3.1.2. Bestimmung der Feinspezifität von antigenspezifischen CD4^+ -T-Zellen bei *Yersinia-enterocolitica*-induzierter reaktiver Arthritis

Analog zu den in 3.1.1 beschriebenen Experimenten wurden auch 5 Patienten mit Verdacht bzw. mit der klinischen Diagnose von Yersinien-induzierter reaktiver Arthritis untersucht (Charakterisierung der Patienten in 2.1.1.).

Die Expansion von antigenspezifischen $\text{IFN}\gamma^+$ -T-Zellen gelang bei zwei Patienten (Patient 1 und 2).

3.1.2.1. Antigenstimulation des peripheren Blutes und der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Yersinien-induzierter reaktiver Arthritis

Das vorliegende Material wurde zunächst in einer Kurzzeit-Stimulation auf das Vorhandensein von antigenspezifischen Zellen untersucht. Es wurde mit Y.e. Hsp, Y.e. 19kD, sowie zusätzlich mit drei Proteinfragmenten, in die das Y.e. Hsp-Protein

zerlegt wurde, stimuliert. Nach der Fixierung erfolgte eine Oberflächenfärbung gegen CD4 und CD69, sowie eine intrazelluläre Zytokinfärbung gegen IFN γ und TNF α . Eine Negativkontrolle nur mit anti-CD28-AK und eine Positivkontrolle mit SEB stimuliert wurden jeweils mitgeführt. Bei Patienten 1, 2 und 4 wurde Synovialflüssigkeit und peripheres Blut für die Stimulationen verwendet, bei Patienten 3 und 5 nur peripheres Blut.

Die bei den jeweiligen Patienten in der Synovialflüssigkeit gemessenen Frequenzen von antigenspezifischen Zellen waren immer höher als im peripheren Blut. Die Negativkontrollen lagen in allen Fällen deutlich unter 1%, und ihre Werte waren in der Synovialflüssigkeit genauso niedrig wie im peripheren Blut.

Die höchsten Frequenzen von IFN γ -produzierenden Zellen wurden in der Synovialflüssigkeit von Patient 2 beobachtet. Es zeigte sich eine starke Reaktion sowohl auf das Y.e. 19kD (1,6% an IFN γ^+ -CD69 $^+$ -CD4 $^+$ -T-Zellen) als auch auf das Y.e. Hsp (entsprechend 1,43%). Die höchste Frequenz an IFN γ -produzierenden Zellen fand sich bei diesem Patienten nach der Stimulation des Materials mit dem Fragment 1 von Y.e. Hsp (2,82%), gefolgt von Fragment 3 (2,12%). Im peripheren Blut wurden ähnliche Verhältnisse vorgefunden, nur waren die Frequenzen viel niedriger (0,42% bei dem am stärksten reagierenden Antigen - Y.e. Hsp F1).

In der Synovialflüssigkeit von Patient 1 wurden nach der Antigenstimulation ebenfalls deutlich erhöhte Frequenzen von IFN γ^+ -CD69 $^+$ -CD4 $^+$ -T-Zellen gefunden (0,18% für Y.e. Hsp und 0,14% für Y.e. 19kD). Der Patient reagierte ebenfalls am stärksten auf die Stimulation mit einzelnen Fragmenten des Y.e. Hsp (F 1: 0,47% und F 3: 0,55%). Im peripheren Blut dagegen waren die Frequenzen jeweils sehr niedrig.

Bei den anderen Patienten waren die detektierten Frequenzen an IFN γ^+ -CD69 $^+$ -CD4 $^+$ -T-Zellen nach Antigenstimulation nur geringgradig erhöht. Bei Patient 3 wurde mit Synovialflüssigkeit und mit peripherem Blut gearbeitet, die Unterschiede in den detektierten Frequenzen zwischen den beiden Materialien waren aber viel geringer als bei den ersten beiden Patienten.

Die beobachteten Frequenzen der TNF α^+ -CD69 $^+$ -CD4 $^+$ -T-Zellen verhielten sich insgesamt gesehen ähnlich wie die der IFN γ^+ -CD69 $^+$ -CD4 $^+$ -T-Zellen. Die Werte für die Negativkontrollen lagen für die TNF α -Produzenten etwas höher als für die IFN γ -

Produzenten.

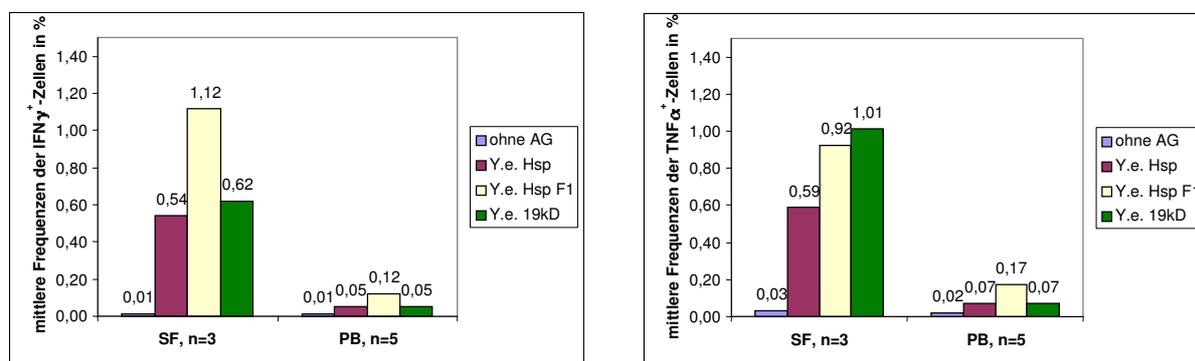
Der höchste Anteil von TNF α -sezernierenden Zellen nach Antigenstimulation wurde ebenfalls in der Synovialflüssigkeit von Patient 2 beobachtet. Dabei war die Frequenz der TNF α -Produzenten nach Stimulation mit Y.e. 19kD am höchsten (2,41%), es folgten Y.e. Hsp Fragment 3 mit 2,06% und Fragment 1 mit 1,77%.

Auch in der Synovialflüssigkeit von Patient 1 zeigten sich nach der Stimulation mit allen verwendeten Antigenen deutlich erhöhte Frequenzen an TNF α^+ -CD69 $^+$ -CD4 $^+$ -T-Zellen. Die Frequenzenerhöhung der für TNF α positiven Zellen nach Antigenstimulation im peripheren Blut von Patient 1 war deutlicher als die der IFN γ -Produzenten.

Bei Patient 3 waren in der Synovialflüssigkeit nach Antigenstimulation deutlich mehr Zellen positiv für TNF α als für IFN γ .

Bei den übrigen Ansätzen waren die beobachteten Frequenzen niedrig.

Die Ergebnisse der Antigenstimulationen werden in der Abbildung 17 dargestellt.



Material	Frequenzen der IFN γ^+ -CD69 $^+$ -CD4 $^+$ -Zellen nach Stimulation mit Antigenen (in %)						
	Ohne AG	SEB	Y.e. HSP	Y.e. HSP F1	Y.e. HSP F2	Y.e. HSP F3	Y.e. 19kD
SF Pat. 1	0,01	13,77	0,18	0,47	0,4	0,55	0,14
PB Pat. 1	0,01	1,75	0,01	0,03	0,03	0,01	0,03
SF Pat. 2	0,01	11,22	1,43	2,62	0,13	2,12	1,6
PB Pat. 2	0,00	3,6	0,18	0,42	0,02	0,17	0,1
SF Pat. 3	0,02	1,11	0,02	0,06	0,05	0,06	0,12
PB Pat. 3	0,00	0,46	0,04	0,01	0,01	0,04	0,07
PB Pat. 4	0,01	1,32	0,02	0,04	0,02	0,07	0,03
PB Pat. 5	0,01	1,95	0,02	0,08	0,00	0,02	0,02

Material	Frequenzen der TNF α^+ /CD69 $^+$ /CD4 $^+$ -Zellen nach Stimulation mit Antigenen (in %)						
	Ohne AG	SEB	Y.e. HSP	Y.e. HSP F1	Y.e. HSP F2	Y.e. HSP F3	Y.e. 19kD
SF Pat. 1	0,04	24,21	0,35	0,71	1,15	0,52	0,25
PB Pat. 1	0,02	8,34	0,05	0,22	0,42	0,26	0,07
SF Pat. 2	0,02	5,55	1,1	1,77	0,36	2,06	2,41
PB Pat. 2	0,02	4,16	0,11	0,14	0,04	0,11	0,14
SF Pat. 3	0,04	1,92	0,33	0,28	0,16	0,37	0,38
PB Pat. 3	0,01	0,55	0,05	0,04	0,02	0,07	0,05
PB Pat. 4	0,01	4,16	0,05	0,05	0,03	0,07	0,05
PB Pat. 5	0,04	9,09	0,07	0,41	0,02	0,05	0,04

Abbildung 17: Frequenzen der IFN γ^+ /CD69 $^+$ /CD4 $^+$ - und der TNF α^+ /CD69 $^+$ /CD4 $^+$ -Zellen in der Synovialflüssigkeit bzw. im peripheren Blut von Patienten mit Yersinien-induzierter ReA nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen. In den Balkendiagrammen werden die mittleren Zellfrequenzen in der Synovialflüssigkeit und im peripheren Blut dargestellt. Die Tabellen zeigen die bei den einzelnen Patienten nach der Antigenstimulation gemessenen Frequenzen.

3.1.2.2. Isolierung antigenspezifischer CD4 $^+$ -T-Zellen

Die Isolierung von spezifisch auf das Y.e. Hsp reagierenden Zellen konnte bei den Patienten 1, 2, 3 und 4 vorgenommen werden. Wie bei den Patienten mit chlamydien-induzierter reaktiver Arthritis erfolgte sie nach 10-stündiger Antigenstimulation des vorliegenden Materials.

Aufgrund der geringen Materialmengen konnten keine Kontrollen, nur mit anti-CD28-AK stimuliert, mitgeführt werden.

Bei Patienten 1 und 2 wurde Synovialflüssigkeit als Material verwendet. Die vor der Anreicherung detektierten Frequenzen der IFN γ -sezernierenden Zellen lagen bei Patient 2 mit 17,26% außerordentlich hoch, bei Patient 1 betrug der Anteil 2,13%. In beiden Fällen überwogen die CD4 $^+$ -T-Zellen (14,9% bei Patient 2, 1,69% bei Patient 1).

Bei den Patienten 3 und 4, bei denen peripheres Blut untersucht wurde, lagen die Frequenzen vor der Anreicherung niedriger (1,14% bei Patient 3 und 0,48% bei Patient 4), wobei hier der Anteil der $\text{IFN}\gamma^+$ - CD4^- -T-Zellen viel höher war als der der CD4^+ - $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten. Die Ergebnisse werden in der Abbildung 18 dargestellt.

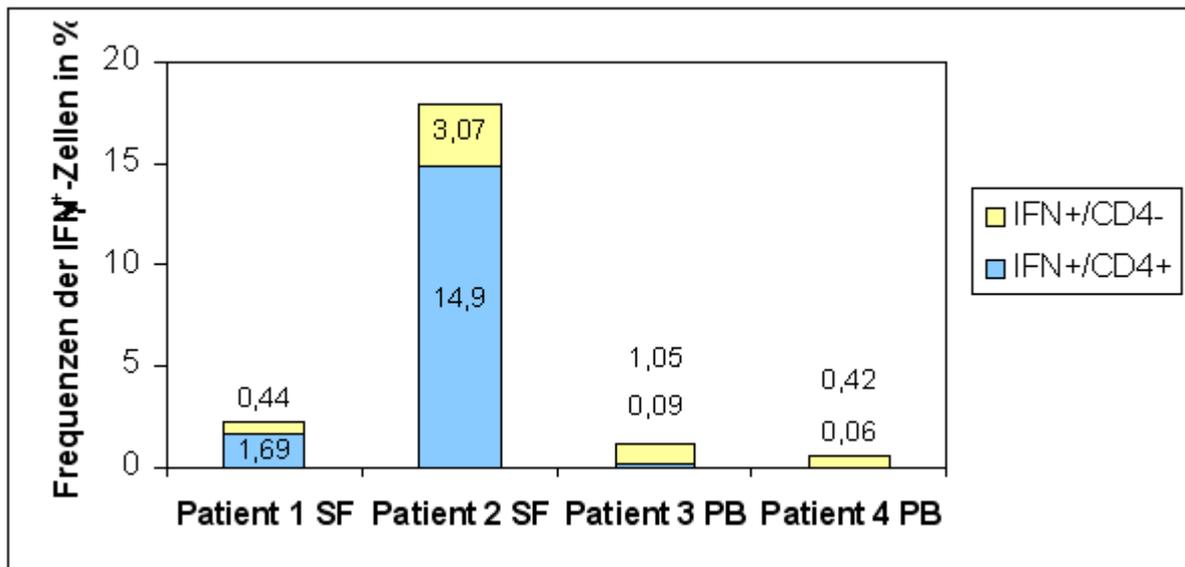


Abbildung 18: Frequenzen der durch die Affinitätsmatrix detektierten Y.e. Hsp-spezifischen $\text{IFN}\gamma$ -sezernierenden CD4^+ - und CD4^- -Zellen (vor MACS).

Die $\text{IFN}\gamma$ -sezernierenden Zellen konnten durch die MACS-Technologie hoch angereichert werden. Bei Patient 1 konnte eine Reinheit von 95,77% erreicht werden, bei den Patienten 2 und 4 wurden Werte über 80% erreicht, bei Patient 3 gelang nur eine Anreicherung auf knapp 56%.

Wie vor MACS waren die CD4^+ -Lymphozyten bei den ersten beiden Patienten sehr viel höher vertreten als die CD4^- . Bei Patient 3 war der Anteil CD4^- - $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten höher, bei Patient 4 waren die Werte ungefähr gleich.

Die Ergebnisse werden in der Abbildung 19 dargestellt.

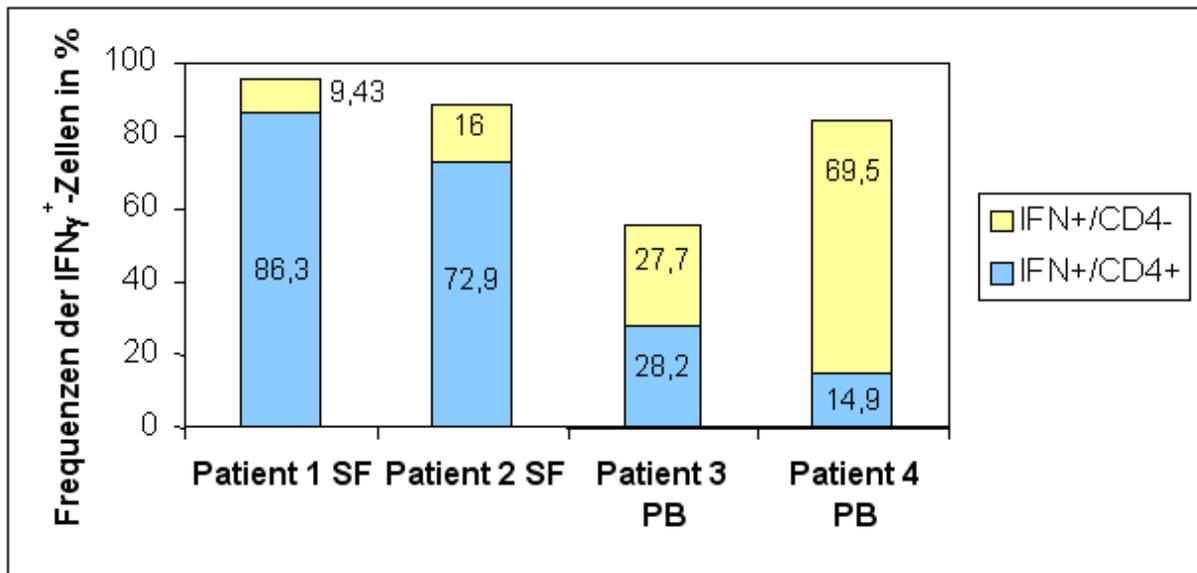


Abbildung 19: Frequenzen der Y.e. Hsp-spezifischen IFN γ -sezernierenden CD4⁺- und CD4⁻-Zellen nach Anreicherung (nach 2. MACS).

3.1.2.3. Expansion der isolierten IFN γ ⁺-T-Zellen und Bestimmung der antigenen Sequenz

Die durch die MACS-Technologie angereicherten Zellen wurden in vitro expandiert, um Versuche zu ermöglichen, die zur genaueren Bestimmung der Antigen-spezifität der isolierten Zellen beitragen würden. Die Expansion der Zellen gelang nur bei den Patienten 1 und 2 und daher wurden nur diese Patienten weiter untersucht.

Die Restimulationsversuche unter Verwendung von autologen APCs wurden analog zu denen mit chlamydien-spezifischen Zelllinien durchgeführt.

Bei allen Restimulationsversuchen lagen die Frequenzen der IFN γ ⁺-CD69⁺-CD4⁺-Lymphozyten bei den Negativkontrollen unter 1%.

Im ersten Versuch wurde die Spezifität der expandierten Zellen auf die drei Fragmente des Y.e. Hsp untersucht.

Bei beiden Patienten fand sich die stärkste Reaktion auf die Stimulation der Zellen mit dem Fragment 1 (Patient 1: 80,81%, Patient 2: 63,56%). Auf die anderen Fragmente reagierte die Zelllinie ebenfalls mit erhöhter IFN γ -Produktion, allerdings waren die Werte deutlich niedriger.

Es wurde gleichzeitig die Kreuzreaktivität der Zellen untersucht. Beide Patienten reagierten schwach positiv auf die Stimulation mit Ch.t. Hsp (Patient 1: 12,89%,

Patient 2: 4,72%), noch schwächer waren die Reaktionen auf das humane Hsp (Patient 1: 3,32%, Patient 2: 6,24%). Die Ergebnisse dieser Experimente werden in der und Abbildung 21 vorgestellt.

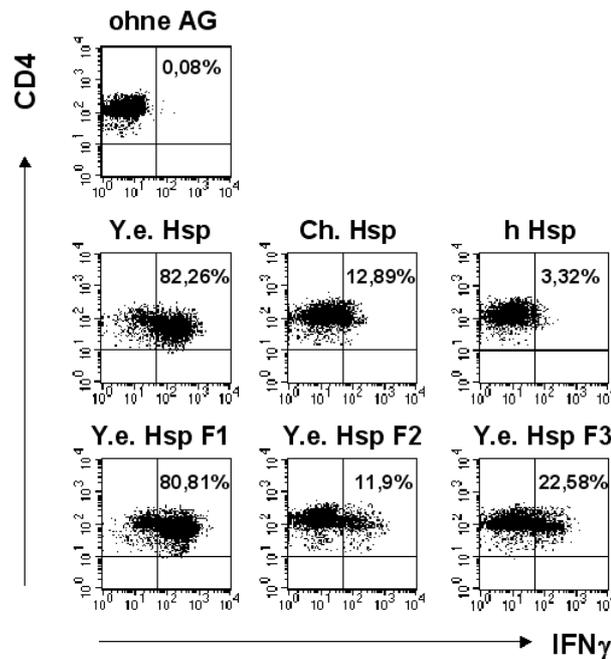


Abbildung 20: Frequenzen von IFN γ ⁺/CD4⁺-Zellen an den expandierten antigenspezifischen Zellen von Patient 1 nach Restimulation mit Hsp von Yersinien (Y.e. Hsp), chlamydialen Hsp (Ch. Hsp), humanem Hsp (h Hsp), sowie mit den drei Fragmenten von Y.e. Hsp (F1-3).

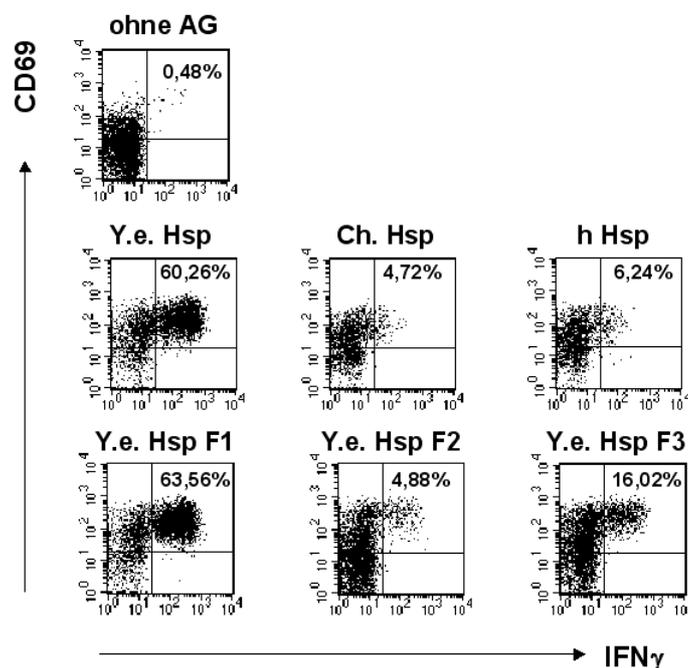


Abbildung 21: Frequenzen von $\text{IFN}\gamma^+/\text{CD4}^+$ -Zellen an den expandierten antigenspezifischen Zellen von Patient 1 nach Restimulation mit Hsp von Yersinien (Y.e. Hsp), chlamydialen Hsp (Ch. Hsp), humanem Hsp (h Hsp), sowie mit den drei Fragmenten von Y.e. Hsp (F1-3).

Analog zu den Versuchen bei Patienten mit chlamydien-induzierter reaktiver Arthritis wurden die Zellen im nächsten Schritt mit den zu Pools zusammengefaßten, aus dem Fragment 1 stammenden Peptiden stimuliert. Bei den Peptiden handelte es sich um 18-mere. Die Peptide waren überlappend, jedes Peptid hatte seine ersten 12 Aminosäuren mit seinem Vorgänger, die letzten 12 mit dem darauf folgenden Peptid gemeinsam. Die Pools wurden nach folgendem Schema zusammengestellt:

Pools/ Peptide	7	8	9	10	11	12
1	1	2	3	4	5	6
2	7	8	9	10	11	12
3	13	14	15	16	17	18
4	19	20	21	22	23	24
5	25	26	27	28	29	30
6	31	32	33	34	35	36

Tabelle 8: Die 36 Peptide aus Fragment 1 von Y.e. Hsp wurden zu 12 Pools so zusammengefaßt, daß anhand der Reaktivität der Pools die als Antigen wirkenden Peptide identifiziert werden konnten.

Bei Patient 1 fand sich ein hoher Prozentsatz von IFN γ -Produzenten nach der Stimulation mit Pool 4 (40,99%) und Pool 12 (37,46%).

Die expandierten Zellen von Patient 2 reagierten auf die Stimulation mit Pool 1, 8 und 9 mit hoher IFN γ -Produktion (entsprechend: 58,97%, 59,37%, 54,57%). Bei Stimulationsansätzen mit Kontrollpools lagen die Werte immer unter 2% bei Patient 1 und 5% bei Patient 2.

Aus dem Poolschema ergibt sich, daß bei Patient 1 das Peptid 24, bei Patient 2 die Peptide 2 und 3 antigen wirken. Diese Annahme wurde im letzten Restimulationsversuch bestätigt. Patient 1 reagierte auf die Stimulation mit Peptid 24 mit einer Frequenz der IFN γ^+ -CD69 $^+$ - Lymphozyten von 38,62%. Die Frequenzen für die Peptide 2 und 3 bei Patient 2 lagen bei 57,05% und 54,76%. Die Frequenzen für die verwendeten Kontrollpeptide verhielten sich ähnlich wie der Kontrollpools.

Die Darstellung dieser Ergebnisse der letzten beiden Restimulationsversuche erfolgt in der Abbildung 22 und Abbildung 23.

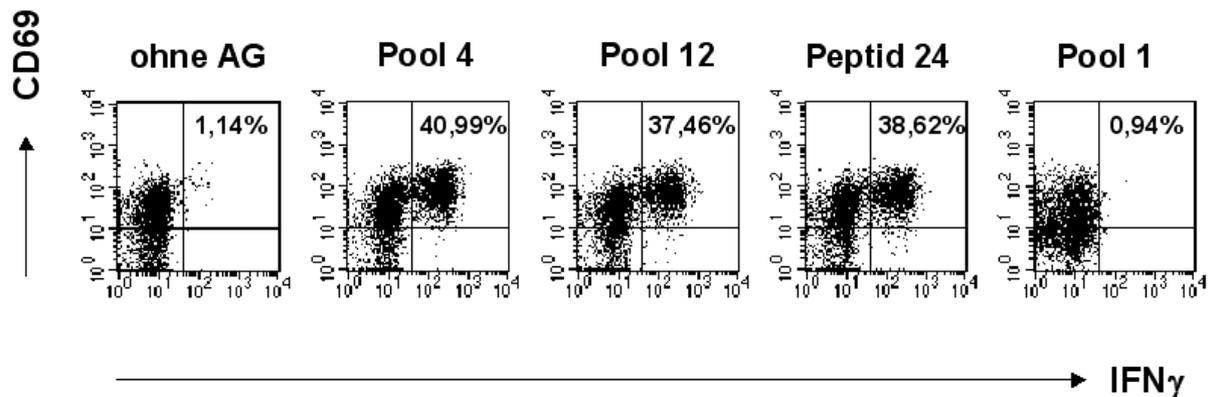


Abbildung 22: Frequenzen der IFN γ ⁺/CD69⁺/CD4⁺-Zellen an den expandierten antigenspezifischen Zellen von Patient 1 nach Restimulation mit den zu Peptidpools zusammengefaßten Peptiden aus dem Fragment 1 von Y.e. Hsp. Dargestellt sind die reaktiven Pools 4 und 12, sowie das in beiden Pools enthaltene Peptid 24. Pool 1 dient als Negativkontrolle.

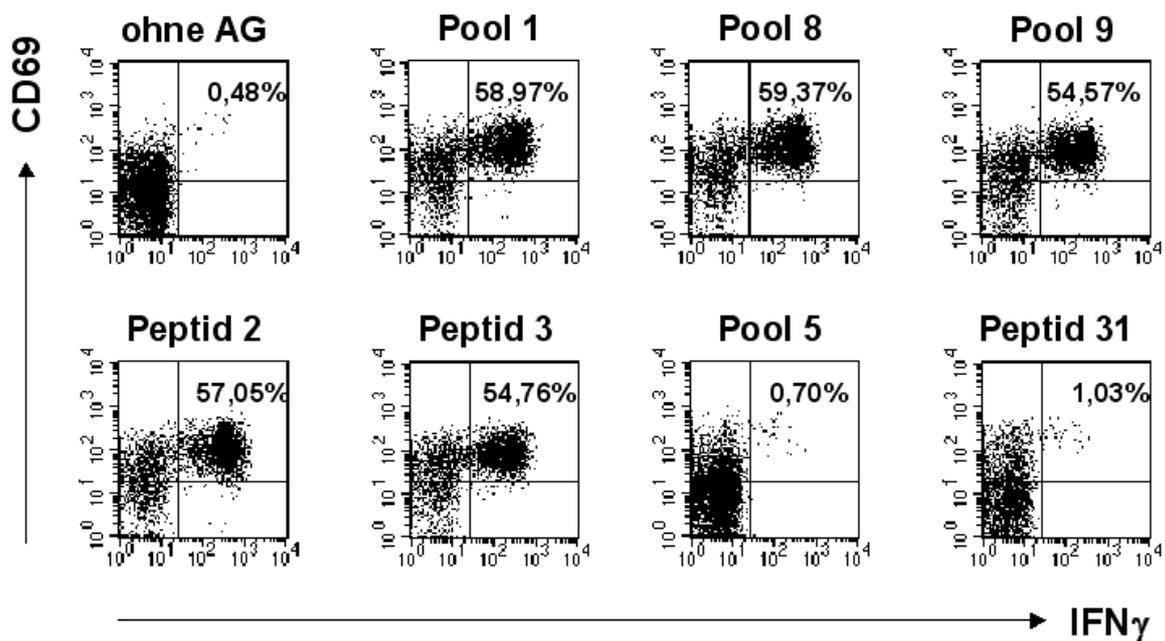


Abbildung 23: Frequenzen der IFN γ ⁺/CD69⁺/CD4⁺-Zellen an den expandierten antigenspezifischen Zellen von Patient 2 nach Restimulation mit den zu Peptidpools zusammengefaßten Peptiden aus dem Fragment 1 von Y.e. Hsp. Dargestellt sind die reaktiven Pools 1, 8 und 9. In Pool 1 und 8 ist das Peptid 2 enthalten, Pool 1 und 9 haben das Peptid 3 gemeinsam; diese beiden Peptide waren ebenfalls stark reaktiv. Pool 1 und das Peptid 31 dienen als Negativkontrolle.

In der folgenden Tabelle 9 werden die Sequenzen der bei den beiden Patienten als antigen wirkend identifizierten Peptide wiedergegeben. Die Peptide 2 und 3 besitzen eine überlappende Aminosäuresequenz, die fett markiert ist.

Nr.	Protein	Position der Peptides		Peptidsequenz
		innerhalb der Proteins		
2	Y. e. Hsp 60kD (F1)	7-24		KFGNDARIKMLRGVNILA
3	Y. e. Hsp 60kD (F1)	13-30		RIKMLRGVNILADAVKVT
24	Y. e. Hsp 60kD (F1)	139-156		SDSKAIAQVGTISANS

Tabelle 9: Charakterisierung der antigenen Peptide, die aus dem Y.e. Hsp F1-Protein identifiziert wurden. Die überlappende Aminosäuresequenz der Peptide 2 und 3, die bei Patient 2 als Antigene identifiziert wurden, ist fett markiert.

3.2. Untersuchung möglicher T-Zell-Epitope bei ankylosierender Spondylitis

3.2.1. Stimulation der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) mit bakteriellen Antigenen

Die aus dem peripheren Blut von HLA-B27-positiven Patienten mit ankylosierender Spondylitis durch den Ficoll-Gradienten isolierten PBMCs wurden mit den bakteriellen Peptiden über 6 Stunden stimuliert. Nach der Fixierung erfolgte eine intrazelluläre Zytokinfärbung gegen IFN γ sowie eine Oberflächenfärbung gegen CD8 und CD69. Eine Negativkontrolle nur mit anti-CD28-AK sowie eine Positivkontrolle mit SEB wurden immer mitgeführt.

Die PBMCs von insgesamt 10 Patienten wurden mit Nonamer-Peptiden stimuliert, die aus dem Y.e. Hsp 60kD-Protein (Peptid 1-7) und aus dem Y.e. 19kD-Protein (Peptid 1-4) stammten. Ein Patient mußte aufgrund nicht gelungener Negativkontrolle aus der Wertung herausgenommen werden.

Die PBMCs von weiteren 5 Patienten wurden mit Nonamer-Peptiden stimuliert, die aus Proteinen chlamydialer Herkunft stammten (Peptid 1-16 aus Ch.t. Hsp 60kD,

Peptid 1-7 aus Ch.t. Momp Serovar D und E).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß keines der Nonamer-Peptide zu einer Erhöhung der IFN γ -Produktion der CD8⁺-Zellen im Vergleich zu der Negativkontrolle geführt hat.

Die Mittelwerte der Frequenzen der IFN γ ⁺-CD69⁺-CD8⁺-Zellen nach einer Stimulation mit von *Yersinia enterocolitica* stammenden Nonamer-Peptiden betrug zwischen $0,003 \pm 0,005$ und $0,007 \pm 0,01$ (MW) \pm (SD). Der Anteil der CD69⁺-CD8⁺-IFN γ -Produzenten bei der Negativkontrolle lag bei $0,017 \pm 0,015$ (MW \pm SD), bei der Positivkontrolle entsprechend bei $7,887 \pm 6,436$.

Bei Ansätzen, die mit den chlamydialen Nonamer-Peptiden stimuliert wurden, wurden Mittelwertfrequenzen von IFN γ ⁺-CD69⁺-CD8⁺-Zellen zwischen $0,004 \pm 0,009$ (MW \pm SD) und $0,000 \pm 0,000$ (MW \pm SD) beobachtet. Der Wert für die Negativkontrolle lag bei $0,006 \pm 0,009$ (MW \pm SD), der für die Positivkontrolle entsprechend bei $3,480 \pm 2,115$ (MW \pm SD).

In der Abbildung 24 werden die Mittelwerte der prozentualen Anteile der IFN γ ⁺-CD69⁺-CD8⁺-Zellen sowie ihre 95%-Konfidenzintervalle gezeigt. Die oberen Begrenzungen der 95%-Konfidenzintervalle um die Mittelwerte der Frequenzen von IFN γ -sezernierenden Zellen nach Antigenstimulation liegen immer unterhalb der oberen Begrenzung des 95%-Konfidenzintervalls um den Mittelwert der Negativkontrollen. Die untersuchten Peptide führen folglich nicht zu einer Erhöhung der IFN γ -Produktion der PBMCs im Vergleich zu Negativkontrollen.

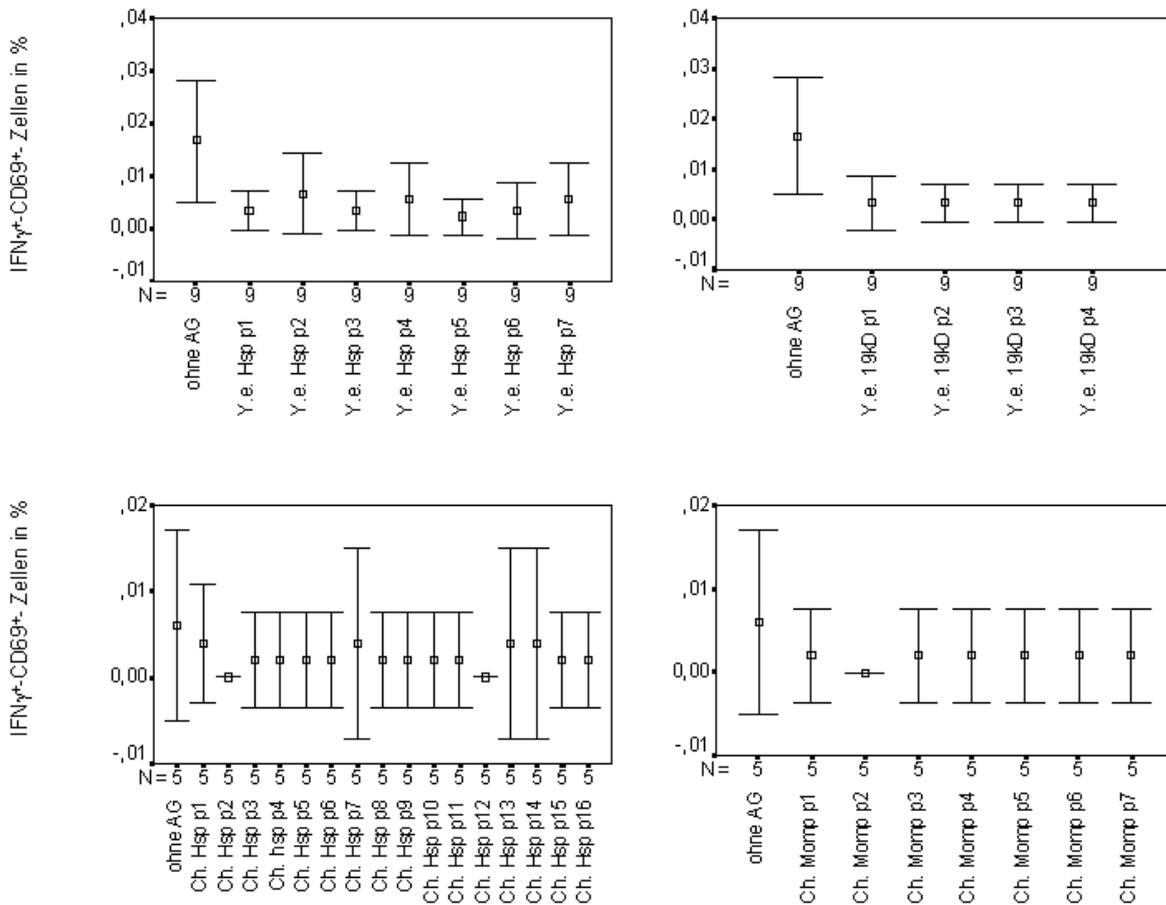


Abbildung 24: Darstellung des Anteils von $CD69^+/CD8^+/IFN\gamma$ -produzierenden Zellen nach der Stimulation der PBMCs von Patienten mit ankylosierender Spondylitis mit bakteriellen Peptiden sowie bei der Negativkontrolle (ohne Antigen (AG)). In den oberen Diagrammen werden die Frequenzen von $CD69^+/CD8^+/IFN\gamma^+$ -Zellen nach der Stimulation mit rekombinanten Yersinien-Peptiden bei insgesamt 9 Patienten dargestellt (Y.e. Hsp p1 bis p7 sind die von Y.e. Hsp 60kD-Protein stammenden Nonamer-Peptide mit HLA-B27-Bindungsmotiven; Y.e. 19kD p1 bis p4 sind Nonamere mit HLA-B27-Bindungsmotiven aus dem Y.e. 19kD-Protein). Die unteren Diagramme zeigen die Frequenzen von $CD69^+/CD8^+/IFN\gamma^+$ -Zellen nach Stimulation mit rekombinanten Chlamydien-Nonamer-Peptiden mit HLA-B27-Bindungsmotiven (Ch.t. Hsp p1 bis p16 sind Nonamer-Peptide aus dem Ch.t. Hsp 60kD-Protein, Ch.t. Momp p1 bis p7 aus dem Ch.t. Momp-Protein). Dargestellt sind die 95%-Konfidenzintervalle um den Mittelwert der Frequenzen der $CD69^+/CD8^+/IFN\gamma^+$ -Zellen. Die untersuchten Peptide haben nicht zu einer Erhöhung der $IFN\gamma$ -Sekretion geführt.

3.3. Zelluläre Immunantwort auf das Autoantigen HC gp-39 bei rheumatoider Arthritis

3.3.1. Intrazelluläre Zytokinfärbung

Die mononukleären Zellen aus der Synovialflüssigkeit und aus dem peripheren Blut von je 10 Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden mit HC gp-39 stimuliert. Eine Negativkontrolle (nur mit anti-CD28-AK) und eine Positivkontrolle (mit SEB) wurden bei jedem Versuch mitgeführt. Für die durchflußzytometrische Analyse wurden die Zellen gegen CD4, CD69 und IFN γ gefärbt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Stimulation mit HC gp-39 weder bei Verwendung der Synovialflüssigkeit noch des peripheren Blutes zu einer Erhöhung der IFN γ -Sekretion im Vergleich zu den Negativkontrollen geführt hat.

Nach der Stimulation der Lymphozyten des peripheren Blutes mit HC gp-39 betrug der mittlere prozentuale Anteil der IFN γ^+ -CD69 $^+$ -CD4 $^+$ -Zellen $0,005\% \pm 0,007$ (Mittelwert (MD) \pm Standardabweichung (SD)), bei der Negativkontrolle lag der Wert bei $0,007\% \pm 0,009\%$ (MW \pm SD), bei der Positivkontrolle bei $0,786\% \pm 0,919\%$ (MW \pm SD). Bei Verwendung von Synovialflüssigkeit als Material wurde ein ähnlicher Wert für die HC gp-39-Stimulation ($0,006\% \pm 0,005\%$ (MW \pm SD)) und höhere Werte für die Negativ- und Positivkontrolle ($0,018\% \pm 0,010\%$ und $5,19\% \pm 3,99\%$ (MW \pm SD)) beobachtet. In der Abbildung 25 werden die Mittelwerte der prozentualen Anteile der IFN γ^+ -CD69 $^+$ -CD4 $^+$ -Zellen sowie ihre 95%-Konfidenzintervalle dargestellt. Die Begrenzungen der 95%-Konfidenzintervalle für den Mittelwert der Negativkontrollen liegen immer höher als die für den Mittelwert der HC gp-39-Stimulationen. Es konnte daher keine Erhöhung der IFN γ -Sekretion nach der Stimulation mit HC gp-39 im Vergleich zur Negativkontrolle beobachtet werden.

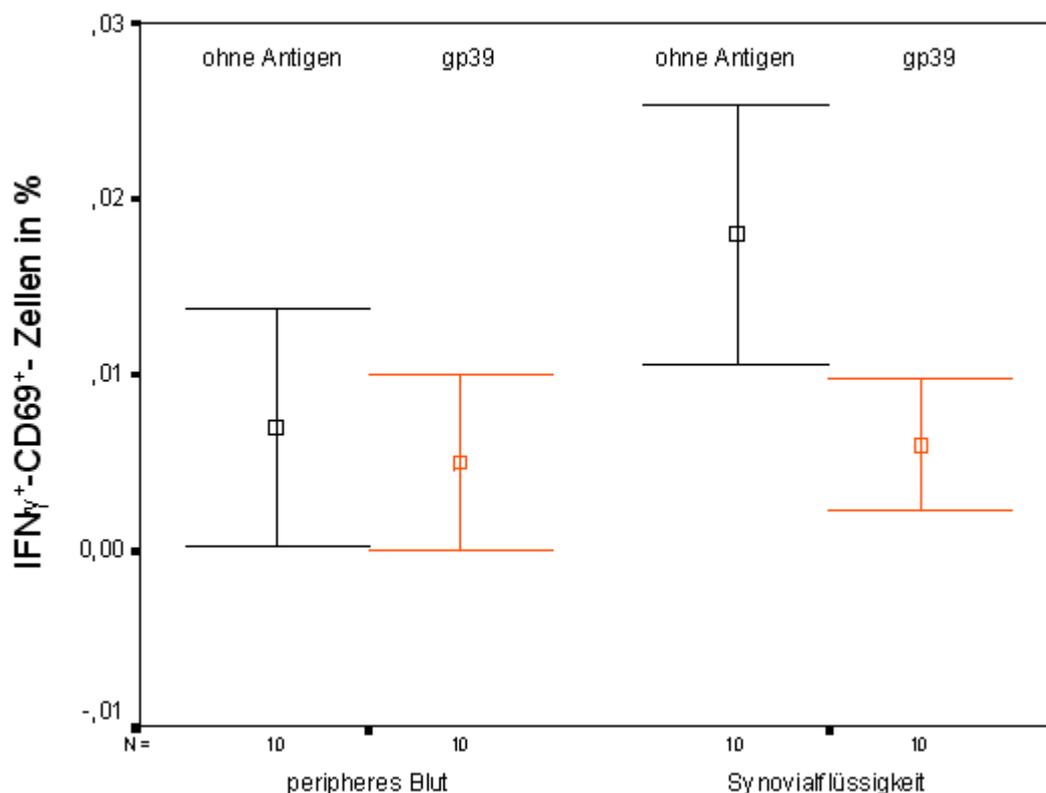


Abbildung 25: Darstellung des Anteils von $CD69^+/CD8^+/IFN\gamma$ -produzierenden Zellen nach der Stimulation des peripheren Blutes und der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis mit HC gp-39 sowie bei der Negativkontrolle (ohne Antigen). Dargestellt sind die 95%-Konfidenzintervalle um den Mittelwert der Frequenzen der $CD69^+/CD8^+/IFN\gamma^+$ -Zellen. Die Stimulation mit HC gp-39 hat weder beim peripheren Blut noch bei der Synovialflüssigkeit zu einer Erhöhung der $IFN\gamma$ -Sekretion im Vergleich zur Negativkontrolle geführt.

3.3.2. Anreicherung HC gp-39-spezifischer $IFN\gamma^+$ - $CD4^+$ -T-Zellen

Bei insgesamt 9 an der rheumatoiden Arthritis erkrankten Patienten wurde eine Isolierung der $IFN\gamma$ -sezernierenden Zellen mittels der Technologie der zellulären Affinitätsmatrix vorgenommen. Ziel war es, eventuelle antigenspezifische T-Zellen aufgrund der höheren Sensitivität dieser Methode gegenüber der Methode der intrazellulären Zytokinfärbung zu erkennen. Die Isolierung erfolgte aus dem peripheren Blut, welches zunächst über 10 Stunden mit HC gp-39 stimuliert wurde. Für jeden Patienten erfolgte eine Negativkontrolle, die nur mit dem anti-CD28-AK stimuliert wurde. Anschließend wurde jeweils versucht, die $IFN\gamma$ -produzierenden Zellen zu kultivieren. Im Falle einer gelungenen Kultivierung der isolierten T-Zellen

würde ein Restimulationstest mit HC gp-39 folgen. Die aus dem mit HC gp-39 stimulierten Ansatz angereicherten antigenspezifischen Zellen, müßten im Restimulationstest mit einer höheren Zytokinproduktion reagieren als Zellen, die aus dem Kontrollansatz (nur mit anti-CD28-AK stimuliert) isoliert und angereichert wurden. Jedoch konnte in keinem der Fälle eine derartige Expansion der Zelllinie erreicht werden, daß ein Restimulationstest möglich gewesen wäre.

Vor der Anreicherung waren die Frequenzen der IFN γ -Produzenten sowohl bei den mit HC gp-39 stimulierten Zellen als auch bei den Negativkontrollen sehr niedrig. Sie lagen bei den antigenstimulierten Zellen zwischen 0,01% und 0,73%, bei der Negativkontrolle zwischen 0,05% und 0,67%. Der Median war bei beiden Ansatzreihen annähernd gleich, die Streuung der Werte war bei den antigenstimulierten Ansätzen höher. Es bestand kein Unterschied in der IFN γ -Produktion zwischen den mit HC gp-39 stimulierten Zellen und den Negativkontrollen ($p = 0,4$). Diese Daten werden im linken Diagramm der Abbildung 26 dargestellt.

Die IFN γ^+ -Zellen konnten mittels der Technologie der zellulären Affinitätsmatrix unterschiedlich hoch angereichert werden, was in der hohen Streuung der Werte zum Ausdruck kommt. Die mit HC gp-39 stimulierten IFN γ^+ -Zellen wurden auf 1,54% bis 62,3% angereichert, die Negativkontrollen auf 4,79% bis 67,0%. Die Frequenzen der IFN γ -Produzenten bei einem mit Antigen stimulierten Ansatz und der dazugehörigen Negativkontrolle lagen fast immer bei ähnlichen Werten. Auch nach der Anreicherung war der Median der antigenstimulierten Ansätze und der Negativkontrollen annähernd gleich. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen dem prozentualen Anteil IFN γ^+ -Zellen unter an mit HC gp-39 stimulierten Zellen im Vergleich zu den Zellen der Negativkontrollen ($p = 0,3$). Die Darstellung der Daten erfolgt im rechten Diagramm der Abbildung 26.

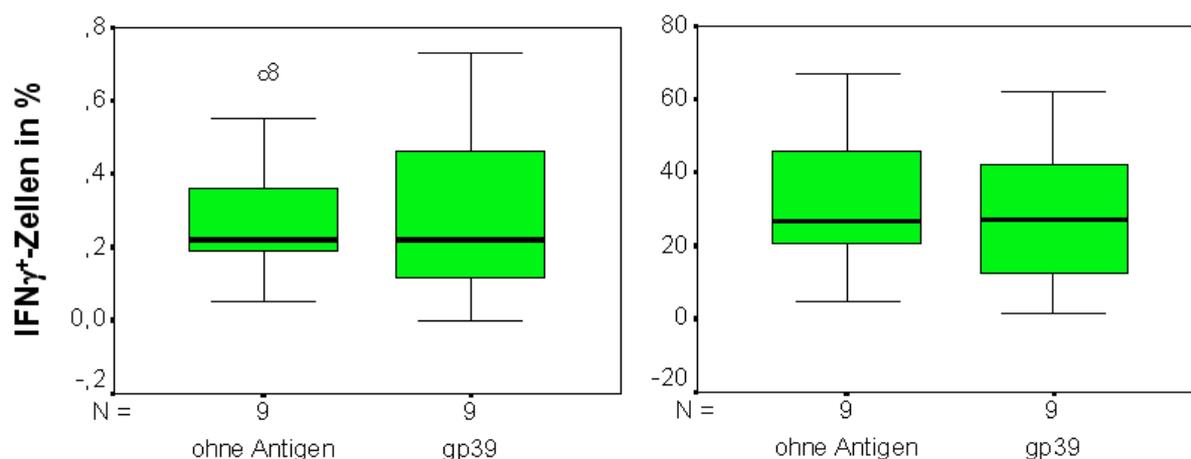


Abbildung 26: Darstellung der prozentualen Anteile der IFN γ -sezernierenden Zellen nach der Stimulation mit HC gp-39 im Vergleich zu der Negativkontrolle vor der Anreicherung (vor MACS, linkes Diagramm) und nach der Anreicherung durch die Technologie der zellulären Affinitätsmatrix (nach MACS, rechtes Diagramm). Es zeigt sich keine Erhöhung der IFN γ -Produktion nach der Stimulation mit HC gp-39 im Vergleich zu der Negativkontrolle.

Die Darstellung erfolgt mittels der Box-Whiskers-Plots. Der Kasten (Box) stellt den Interquartilsbereich (IQR) dar, der dicke Strich darin den Median. Die Werte, die maximal $1,5 \times$ IQR über oder unter der Box liegen, bilden die Linien (Whiskers), der Querstrich steht für den größten bzw. kleinsten tatsächlich vorhandenen Wert innerhalb dieses Bereiches. Werte außerhalb von $1,5 \times$ IQR aber innerhalb von $3 \times$ IQR gelten als Ausreißer und werden einzeln mit einem Kreis dargestellt. Extremwerte liegen mehr als $3 \times$ IQR von der Box entfernt und werden durch Sterne markiert (in dieser Abbildung nicht vorhanden).

In fast allen Fällen war sowohl vor der Anreicherung als auch danach der prozentuale Anteil der CD4⁺-Zellen an den IFN γ -Produzenten niedriger als der Anteil der CD4⁻-Zellen. Bei den beobachteten Frequenzen der CD4⁻-Zellen ließ sich immer eine viel höhere Streuung beobachten. Im Vergleich zu den Werten der Negativkontrollen bestand weder vor noch nach der Anreicherung ein Unterschied im prozentualen Anteil von CD4⁺-IFN γ -Produzenten nach der Stimulation mit HC gp-39 ($p > 0,1$). Das gleiche gilt auch für die CD4⁻-IFN γ -Zellen ($p > 0,05$). Die Daten werden in der Abbildung 27 gezeigt.

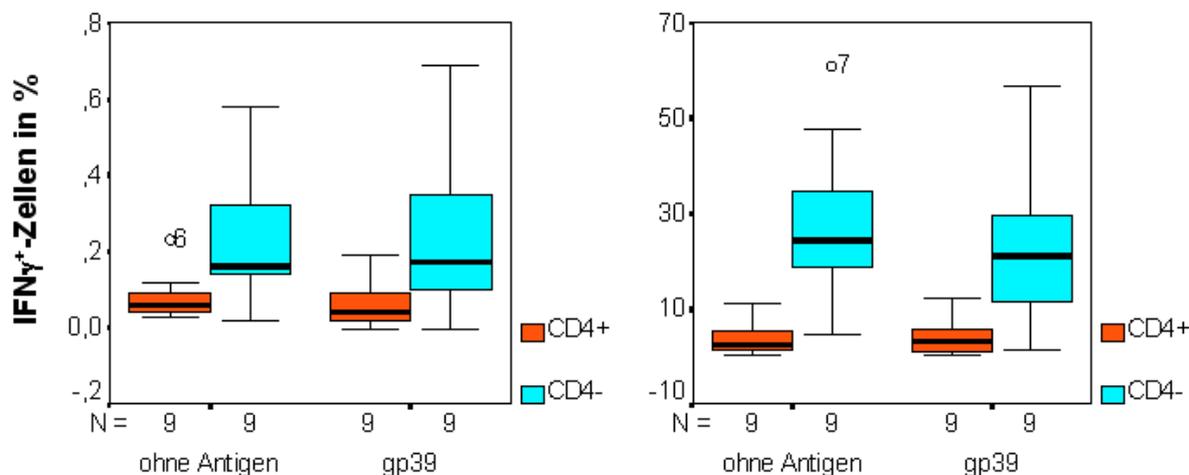


Abbildung 27: Darstellung der prozentualen Anteile der IFN γ -sezernierenden Zellen nach der Stimulation mit HC gp-39 im Vergleich zu der Negativkontrolle vor der Anreicherung (vor MACS, linkes Diagramm) und nach der Anreicherung durch die Technologie der zellulären Affinitätsmatrix (nach MACS, rechtes Diagramm). Es werden die CD4 $^{+}$ - und die CD4 $^{-}$ -IFN γ -Produzenten separat dargestellt. Die Anteile der CD4 $^{+}$ - bzw. der CD4 $^{-}$ -Zellen an den IFN γ -sezernierenden Zellen nach Antigenstimulation mit HC gp-39 unterscheiden sich weder vor noch nach der Anreicherung von den entsprechenden Werten der Negativkontrolle ($p > 0,05$).

Wie im Kapitel 2.1. beschrieben, wurden Patienten 1 bis 4 recht intensiv medikamentös behandelt (im Folgenden als behandelt bezeichnet), Patienten 5 bis 9 hingegen nur geringgradig oder überhaupt nicht (im Folgenden als unbehandelt bezeichnet).

In der Gruppe der unbehandelten Patienten sind die beobachteten Frequenzen der IFN γ^{+} -Lymphozyten sowohl vor der Anreicherung als auch danach für die Negativkontrolle höher ($p = 0,01$), für die antigenstimulierten Zellen grenzwertig höher ($p = 0,05$) als bei den intensiv behandelten Patienten. Diese Ergebnisse kommen in der Abbildung 28 zur Darstellung.

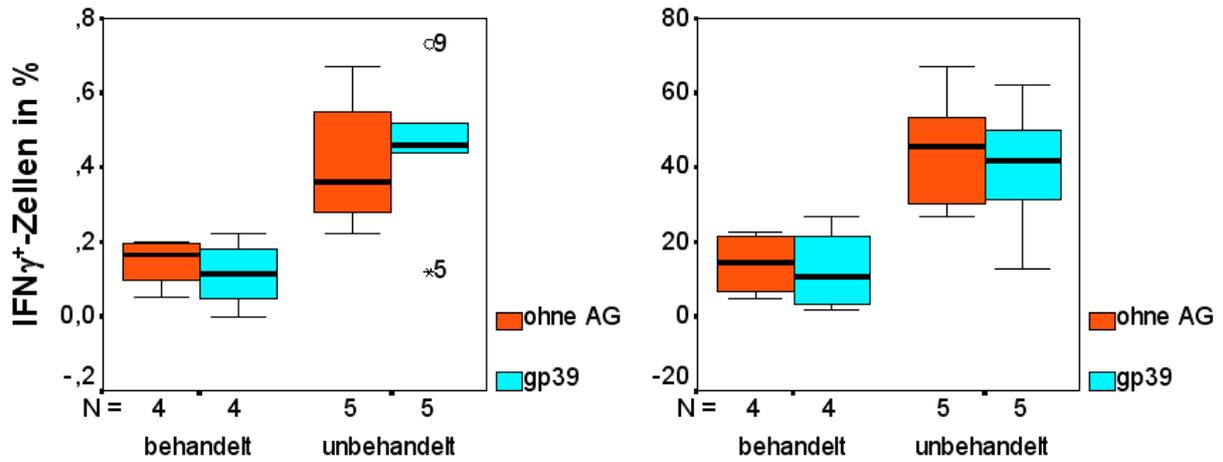


Abbildung 28: Darstellung der prozentualen Anteile der IFN γ -sezernierenden Zellen bei Patienten mit intensiv behandelter rheumatoider Arthritis sowie mit unbehandelter rheumatoider Arthritis. Dargestellt sind die Frequenzen der IFN γ -produzierenden Zellen vor der Anreicherung (vor MACS, linkes Diagramm) und nach der Anreicherung (nach MACS, rechtes Diagramm). Sowohl vor der Anreicherung als auch nach der Anreicherung ist der Anteil der IFN γ ⁺- Zellen bei Patienten mit unbehandelter rheumatoider Arthritis höher als bei Patienten mit behandelter rheumatoider Arthritis ($p=0,05$).

4. Diskussion

4.1. Diskussion der durchflußzytometrischen Methode

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Technologie der durchflußzytometrischen Analyse ist ein neuer Zugang zur Epitopanalyse bei rheumatischen Erkrankungen.

Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, antigenspezifische Zellen, die mit einer niedrigen Frequenz im peripheren Blut und in der Synovialflüssigkeit vorkommen, zu detektieren (Gross, Verwer et al. 1993; Radbruch and Recktenwald 1995).

Die Durchflußzytometrie erlaubt es weiterhin, die Zellpopulationen derart zu analysieren, daß die Oberflächenmarker und die Zytokinproduktion auf Einzelzellebene bestimmt werden können (Jung, Schauer et al. 1993; Assenmacher, Schmitz et al. 1994).

Sie stellt daher einen großen Fortschritt gegenüber den konventionellen Methoden in der rheumatischen Antigenforschung wie dem Proliferationstest (Ugrinovic, Mertz et al. 1997; Mertz, Ugrinovic et al. 1998) oder der Isolierung antigenspezifischer T-Zell-Klone (Mertz, Wu et al. 2000) dar, bei denen detaillierte Aussagen über Zytokinmuster oder Frequenzen antigenspezifischer Zellen nicht möglich sind.

Aufgrund der kurzen Stimulationszeit, die für die FACS-Analyse notwendig ist (6 Stunden), werden hierbei nur die spezifischen T-Gedächtnis-Zellen aktiviert, so daß die unspezifische Reaktion im Vergleich zum Lymphozytenproliferationstest, bei dem die Stimulationszeit normalerweise 6 Tage beträgt, als gering einzuschätzen ist (Thiel, Wu et al. 2000).

Der Vergleich mit anderen Methoden weist auf eine hohe Sensitivität der FACS-Analyse hin. Für die CD8-Antwort auf virale Antigene in Virusinfektionen liefert die Durchflußzytometrie im Vergleich zu der Tetramer-Technologie ähnliche Ergebnisse (Murali-Krishna, Altman et al. 1998; Thiel and Radbruch 1999). Beide Methoden ergeben höhere Werte für die Frequenzen der antigenspezifischen Zellen während einer Virusinfektion als mit Hilfe der T-Zell-Klone geschätzt wurde (Murali-Krishna, Altman et al. 1998).

Die Untersuchungen von Kern et al. (Kern, Surel et al. 1998) zeigen, daß die Durchflußzytometrie auch zur Epitopkartierung nach Stimulation der Zellen mit

überlappenden Peptiden geeignet ist und daß sie eine effiziente und sensitive Methode zur Epitopanalyse darstellt, bei der eine hohe Anzahl von Peptiden mit verhältnismäßig geringem Aufwand getestet werden kann. Dieser Zugang ist im Rahmen dieser Arbeit zur Epitopanalyse der für die Pathogenese der reaktiven Arthritis bekannten Antigene eingesetzt worden.

Ein großer Vorteil der Durchflußzytometrie ist die Tatsache, daß die Zytokinexpressionmuster, die bekanntlich bei der Pathogenese der rheumatischen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen, analysiert werden können. Ein Nachteil der durchflußzytometrischen Analyse war jedoch, daß die Zytokine zum größten Teil sezerniert werden und nur nach Fixierung der Zellen vor der Zytokinsekretion intrazellulär gefärbt werden können (Thiel and Radbruch 1999). Die Untersuchung von lebenden Zellen ist also mit dieser Methode nicht möglich. Ebensowenig können diese Zellen dann weiter kultiviert werden.

Eine Weiterentwicklung der klassischen durchflußzytometrischen Analyse ist ihre Kombination mit der Methode der magnetischen Anreicherung, die eine Detektion von antigenspezifischen Zellen erlaubt, die mit einer Frequenz unter 10^{-5} im peripheren Blut vorkommen (Brosterhus, Brings et al. 1999), während die durchflußzytometrische Analyse nach intrazellulärer Zytokin- und/oder Oberflächenfärbung für die Identifizierung von Zellen, deren Frequenz nicht unter $1:10^3$ bis 10^4 liegt, gut geeignet ist (Thiel and Radbruch 1999). Da aber spezifische T-Zellen für zahlreiche Antigene mit einer sehr geringen Zellfrequenz im peripheren Blut vorkommen (unter $1:10^5$) (Thiel and Radbruch 1999), stellt die magnetische Anreicherung einen großen Fortschritt in der Epitopsuche dar.

Die von Manz et al. (Manz, Assenmacher et al. 1995) zuerst für das Maussystem entwickelte Technologie der zellulären Affinitätsmatrix machte es möglich, die nach einer Kurzzeit-Stimulation durch die antigenspezifischen Lymphozyten sezernierten Moleküle an der Oberfläche der produzierenden Zelle zu binden und diese Zellen magnetisch zu separieren.

Brosterhus et al. (Brosterhus, Brings et al. 1999) verwendeten die Methode erfolgreich für die ex vivo Analyse von humanen zytotoxischen und T-Helfer-Lymphozyten. Die Zellen können nach der Anreicherung sowohl

durchflußzytometrisch analysiert als auch für weitere Untersuchungen kultiviert werden. Beide Vorgehensweisen wurden im Rahmen dieser Arbeit genutzt. Die Möglichkeit der weiteren Zellanreicherung stellt einen großen Vorteil dar, vor allem unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die spezifischen T-Zellen in einer geringen Konzentration im peripheren Blut vorkommen und die zur Verfügung stehende Menge an diesem Material immer sehr begrenzt ist und man aber auf der anderen Seite sehr viele in Frage kommende Peptide zu untersuchen hat, um aus einem fraglichen Protein die entsprechende antigen wirkende Peptidsequenz zu bestimmen.

Dies ist ein großer Vorteil gegenüber anderen Methoden, die antigengetriggert induzierte Zytokinmuster analysieren, wie die oben beschriebene klassische Durchflußzytometrie oder aber auch die ELISPOT-Methode (Schmittel, Keilholz et al. 1997). Letztere stellt eine Variante des Sandwich-ELISA-Tests dar. Ihr Prinzip beruht auf der Bindung von zytokinspezifischen Antikörpern an einer Kunststoffoberfläche, auf die mit einem bestimmten Antigen stimulierte, aktivierte T-Zellen gebracht werden. Das von einigen aktivierten T-Zellen freigesetzte zu untersuchende Zytokin wird von den gebundenen Antikörpern festgehalten und kann nach Entfernung der T-Zellen durch einen zweiten zytokinspezifischen Antikörper sichtbar gemacht werden.

Eine andere Methode für die direkte Analyse und Isolierung von antigenspezifischen T-Zellen stellt der Einsatz von löslichen MHC-Peptid-restringierten Tetrameren dar (Altman, Moss et al. 1996; Bowness, Allen et al. 1998). MHC-Peptid-Tetramere stellt man aus rekombinanten zurückgefalteten MHC-Peptid-Komplexen her, die ein einziges definiertes Peptidepitop enthalten. Durch die Tatsache, daß es sich hierbei um Multimere handelt, kann die normalerweise geringe Wechselwirkung zwischen den MHC-Peptid-Komplexen und den T-Zellen verstärkt werden. Diese Tetramere werden durch T-Zellen gebunden, die Rezeptoren der passenden Spezifität exprimieren. Der limitierende Faktor dieser Methode ist jedoch die aufwendige Herstellung solcher Tetramere, sowie die Tatsache, daß sowohl das entsprechende Peptid sowie das MHC-Molekül, über welches dieses Peptid präsentiert wird, vorher bekannt sein müssen. Aus diesen Gründen ist die Methode als eine Screening-Methode für viele Antigene problematisch (Brosterhus, Brings et al. 1999).

4.2. Diskussion der Ergebnisse der Untersuchungen zur reaktiver Arthritis

4.2.1. Identifizierung immundominanter T-Zell-Epitope bei reaktiver Arthritis

Das Vorhandensein einer T-Zellantwort auf die bei Patienten mit reaktiver Arthritis persistierenden Bakterien oder bakteriellen Bestandteile ist seit langer Zeit bekannt und mehrfach bestätigt worden (Gaston, Life et al. 1989; Sieper, Kingsley et al. 1991; Ugrinovic, Mertz et al. 1997; Mertz, Wu et al. 2000; Thiel, Wu et al. 2000).

Potentiell ist jedes der vielen tausend bakteriellen Proteine ein Stimulans für humane T-Zellen. Burmester et al. (Burmester, Daser et al. 1995) geben vier Kriterien an, die bedacht werden sollten, wenn es um die Suche nach immundominanten Proteinen geht. Das Protein sollte im entzündeten Gelenk unter den dort vorherrschenden Bedingungen exprimiert werden; es mag ein Vorteil für das Immunsystem sein, Proteine zu erkennen, die bei den Bakterien hochkonserviert sind; Proteine, für die eine Kreuzreaktivität zwischen dem bakteriellen und dem humanen System besteht, könnten eine besondere Rolle bei der Pathogenese der ReA spielen und schließlich erscheint es logisch, daß das humane Immunsystem v.a. auch solche Proteine erkennen sollte, die es den Bakterien ermöglichen, die humane Immunantwort zu umgehen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bestätigen die antigene Wirkung der in bisherigen Studien gefundenen immundominanten Moleküle wie das Y.e. Hsp 60- und Y.e. 19kD-Protein bei der Yersinien-induzierten und das Ch.t. Hsp 60- und Ch.t. Momp-Protein bei der Chlamydien-induzierten reaktiven Arthritis. Die antigene Wirkung der beiden Yersinienproteine ist in früheren Untersuchungen sowohl mit durchflußzytometrischen Methoden (Thiel, Wu et al. 2000) als auch mit Hilfe des Lymphozytenproliferationstests (Fendler, Braun et al. 1998; Mertz, Ugrinovic et al. 1998) und durch Isolierung spezifischer T-Zell-Klone

(Mertz, Wu et al. 2000) gefunden worden. Für das chlamydiale Hsp 60-Protein sind ebenfalls T-Zell-Klone von verschiedenen Gruppen isoliert worden (Deane, Jecock et al. 1997), und die antigene Wirkung des Proteins ist ebenfalls durchflußzytometrisch nachgewiesen worden (Thiel, Wu et al. 2000). Thiel et al. (Thiel, Wu et al. 2000) konnten erstmalig das chlamydiale Momp als Zielprotein der T-Zell-vermittelten Antwort durchflußzytometrisch identifizieren, was durch die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse aus früheren Studien, in denen das Momp-Protein nur als ein Zielprotein für die humorale Antwort, nicht jedoch für die T-Zellantwort identifiziert werden konnte. Als mögliche Erklärung dafür wurde die Tatsache herangezogen, daß bei chronischer Arthritis im Gelenk ein saures, hypoxisches Milieu vorherrscht, welches zur Hochregulation bestimmter Gene (z.B. der Gene für die Hitzeschockproteine) und zur Runterregulation anderer Gene verantwortlich sein könnte (Burmester, Daser et al. 1995). Übereinstimmend damit fand eine Gruppe, daß bei chronischen Chlamydieninfektionen die Expression des chlamydialen Hsp 60-Proteins in der Synovialmembran hochreguliert, während die des Momp-Proteins herunterreguliert wird (Gerard, Branigan et al. 1998).

Es ist wichtig zu erwähnen, daß neben den hier bereits erwähnten seit längerer Zeit diskutierten Antigenen weitere Antigenkandidaten bekannt sind. Besonders bei der chlamydieninduzierten ReA sind in neuerer Zeit weitere potentielle Antigene identifiziert worden. So fanden Goodall et al. (Goodall, Beacock-Sharp et al. 2001) ein 60 kDa schweres cysteinreiches chlamydiales Protein, das Outer Membrane Protein 2 (OMP2), aus welchem durch weitere Untersuchungen ein Peptidepitop identifiziert werden konnte, das über HLA-DRB*0401 präsentiert und von T-Zellen von Patienten mit chlamydieninduzierter ReA erkannt wird. Die identifizierte Epitopsequenz konnte bei allen Stämmen von *Chlamydia trachomatis*, nicht jedoch bei *Chlamydia pneumoniae*, gefunden werden. Derselben Arbeitsgruppe ist es außerdem gelungen mit Hilfe von T-Zell-Klonen drei andere chlamydialen Proteine als mögliche Antigene zu identifizieren, nämlich das pmpD (putativ outer membrane protein D), das CT579 (*Chlamydia trachomatis* Protein 579) und die chlamydiale Enolase (Goodall, Yeo et al. 2001). Außer dem bereits erwähnten chlamydialen Hsp60, fanden Gaston et al. (Gaston, Deane et al. 1996) bereits vor längerer Zeit mit

Hilfe von T-Zell-Klonen noch ein anderes potentiell antigen wirkendes chlamydiales Protein, nämlich das 18 kDa schwere, histonähnliche Protein Hc1.

Bei einer solchen Vielzahl von potentiellen pathogenetisch wirkenden Molekülen erscheint die Wahrscheinlichkeit der Existenz von einem universellem und damit für eine eventuelle Induktion der Immuntoleranz geeignetem Antigen nicht sehr hoch und entsprechend schwierig gestaltet sich dann natürlich die Suche. Außerdem muß die Eventualität bedacht werden, daß die identifizierten Antigene auch als Antigene der protektiven Immunantwort fungieren können und nicht unbedingt alle mit der Immunpathologie assoziiert sein müssen (Goodall, Beacock-Sharp et al. 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit konzentrierten wir uns auf die Epitopanalyse aus dem Momp-Protein. Dabei ist es uns gelungen, das Momp-Protein nicht nur als T-Zell-Target zu identifizieren, sondern auch eine weitere Epitopanalyse dieses Antigens vorzunehmen und bei drei Patienten dasselbe immundominante Epitop zu identifizieren, was einen starken Hinweis auf die Bedeutung des Momp in der Pathogenese der ReA darstellt.

Unser Ziel war es, die Feinspezifität der reaktiven T-Zellen zu bestimmen. Nach Kern et al. (Kern, Surel et al. 1998) kann bei hohen Frequenzen eine solche Bestimmung durchflußzytometrisch direkt aus dem Blut erfolgen. Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit stand jedoch eine begrenzte Materialmenge zur Verfügung, und die Anzahl der überlappenden Kandidatenpeptide war aufgrund der Molekülgröße der in Frage kommenden Antigene sehr hoch, weshalb die anfangs mit dem Gesamtprotein stimulierten reaktiven Zellen zunächst expandiert wurden.

Es ist damit erstmals gelungen, sowohl bei Patienten mit Yersinien-induzierter als auch bei denen mit Chlamydien-induzierter ReA immundominante T-Zell-Epitope zu identifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus dem Blut bzw. der Synovialflüssigkeit von drei Patienten mit Chlamydien-assoziiierter ReA dasselbe immundominante T-Zell-Epitop mit der Aminosäuresequenz 369-388 aus dem Momp-Protein identifiziert. Dieses, im Rahmen der Arbeit mit der Nummer 42 bezeichnete Peptid besitzt eine überlappende Aminosäuresequenz von 16 Aminosäuren mit dem nachfolgenden Peptid 43,

welches durch die Aminosäuresequenz 374-393 charakterisiert wird. Letzteres konnte ebenfalls als ein immundominantes Epitop bei zwei der drei Patienten charakterisiert werden, nicht jedoch bei Patient 3, was auf eine in der Aminosäuresequenz etwas andere (weiter vorne in der Sequenz zu findende) Lokalisation hinweisend sein könnte. Interessanterweise stimmen die drei Patienten in ihrem HLA-DR-Typ nicht überein (Abbildung 14), was einen Hinweis darauf gibt, daß es sich um ein gemeinsames, sogenanntes promiskuides, HLA-Typ-unabhängig von den T-Zellen erkanntes Antigen handeln könnte .

Bisher ist die Existenz eines solchen gemeinsamen Antigens für die CD4-Antwort bezweifelt worden, als nämlich die CD4-Antwort auf der klonalen Ebene in früheren Untersuchungen recht weitgehend untersucht wurde und sowohl für die Yersinien-induzierte ReA als auch für die Chlamydien-induzierte ReA T-Zell-Klone beschrieben worden sind, die verschiedene bakterielle Antigene erkannten (Hermann, Lohse et al. 1991; Viner, Bailey et al. 1991; Hassell, Reynolds et al. 1993). Diese partiell erfolgreiche Suche nach immundominanten Antigenen hat gezeigt, daß auf der CD4-Ebene eher von mehreren Antigenen auszugehen ist (Burmester, Daser et al. 1995). Auf der CD8-Ebene ist die Immunantwort, wie im Listerienmodell (Pamer 1993) gezeigt, auf weniger Epitope ausgerichtet, so daß hier ein gemeinsames Epitop für wahrscheinlicher gehalten wurde, obwohl es bisher nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Ugrinovic et al. (Ugrinovic, Mertz et al. 1997) konnten ein HLA-B27-restringiertes Epitop (Nonamer) von dem Y.e. Hsp 60-Protein identifizieren, welches von drei Patienten mit Yersinien-assoziiierter ReA erkannt wurde. Überraschend war hierbei, daß das Nonamer fast vollständig (mit Ausnahme einer Aminosäure) in Bereich eines in einer anderen Studie als immundominant auf CD4-Ebene gefundenen Epitops lag (Mertz, Wu et al. 2000).

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten legen nahe, daß es solche konservierten Epitope auch auf der CD4-Ebene gibt. Welches Zytokinmuster ein solches konserviertes Antigen bei Stimulation von T-Zellen induziert, und ob ein solches Zytokinmuster hilft, bakterielle Antigene zu eliminieren (Th1-Muster) oder deren Persistenz bedingt, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. In zukünftigen Untersuchungen sollten daher nach antigenspezifischer T-Zell-Stimulation neben IFN γ noch TNF α , IL-4 und IL-10 bestimmt werden.

Bei Yersinien-induzierter ReA ist die Identifizierung immundominanter T-Zell-Epitope aus dem Hsp 60-Protein von *Yersinia enterocolitica* bei zwei Patienten gelungen, wobei es sich im Gegensatz zur Chlamydien-assoziierten ReA um verschiedene Epitope handelt. Bei einem der beiden Patienten sind es wiederum zwei Peptide mit einer überlappenden Aminosäuresequenz (7-24 und 13-30) von 12 Aminosäuren, die eine antigene Wirkung gezeigt haben. Der zweite Patient reagierte auf ein einziges Peptid mit der Aminosäuresequenz 139-156. All diese immundominanten Epitope liegen im ersten Fragment des Hsp 60-Proteins. Die Identifizierung eines Epitops, von dem man annehmen könnte, daß es sich um ein gemeinsames immundominantes Epitop handelt, ist hierbei im Gegensatz zur Chlamydien-assoziierten ReA nicht gelungen; die Tatsache, daß nur zwei Patienten untersucht werden konnten, mag ein Grund dafür sein.

Wie in anderen Studien wurden auch im Rahmen dieser Arbeit in der Synovialflüssigkeit im Vergleich zum peripheren Blut höhere Frequenzen von antigenspezifischen Zellen bei ReA detektiert. Thiel et al. (Thiel, Wu et al. 2000) zeigten erstmalig, daß diese Frequenzen höher liegen als früher angenommen wurde. Sie konnten mit Hilfe durchflußzytometrischer Methoden ~1:50 bis 1:200 antigenspezifischen Zellen in der Synovialflüssigkeit detektieren, während aus früheren Studien Werte zwischen 1:600 bis 1:5000 bekannt waren (Burmester, Daser et al. 1995). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden in einzelnen Fällen die mit den Ergebnissen von Thiel vergleichbare Frequenzen gefunden.

Für die höheren Frequenzen antigenspezifischer Zellen in der Synovialflüssigkeit wird die lokale T-Zell-Expansion verantwortlich gemacht. Zunächst glaubte man, daß die erhöhte synoviale T-Zellantwort aufgrund der effektiveren Präsentation von bakteriellen Antigenen durch antigenpräsentierende Zellen im Synovium zu erklären ist (Life, Viner et al. 1990), jedoch konnten andere Untersuchungen keinen Unterschied zwischen antigenpräsentierenden Zellen aus peripheren Blut und Synovialflüssigkeit feststellen (Sieper, Braun et al. 1993). Als weitere Erklärung wurde dann die höhere Anzahl der aktivierten Zellen (CD45RO+) im Synovium herangezogen, jedoch führte eine Anreicherung solcher Zellen weder in der

Synovialflüssigkeit noch im peripheren Blut zu einer Erhöhung der proliferativen Antwort (Braun, Grolms et al. 1994).

4.2.2. Diskussion der für die Identifizierung der Epitope verwendeten Methodensequenz

Die Technologie der zellulären Affinitätsmatrix zur Isolierung von antigenspezifischen Zellen gegen ein bakterielles Protein, die weitere Expansion der Zellen *in vitro* und die durchflußzytometrische Testung der aus dem Protein stammenden überlappenden Peptide scheint eine geeignete Methode zur Identifizierung immundominanter Epitope zu sein. Durch die Verwendung einer Matrix von Peptidpools läßt sich die Anzahl der Versuchsansätze und damit auch der Bedarf an expandierten Zellen stark reduzieren.

Die Problematik der Methode liegt in der Tatsache, daß die Frequenzen der antigenspezifischen Zellen in der Synovialflüssigkeit und noch viel mehr im peripheren Blut niedrig sind und die Zellzahl der isolierten Zellen selbst bei hoher Anreicherung gering bleibt. Bei geringen Zellzahlen der Lymphozyten gestaltet sich die Expansion der Zellen schwierig, so daß weitere Testungen nicht immer möglich sind. Bekanntlich ist die Zahl der antigenspezifischen Zellen in der Synovialflüssigkeit 5-10fach höher als im peripheren Blut (Thiel, Wu et al. 2000). So erfolgten fast alle Epitopidentifizierungen aus der Synovialflüssigkeit. Bei Patienten, die sich klinisch im akuten und damit sehr aktiven Stadium der Krankheit befanden, konnte Material gewonnen werden, welches aufgrund der hohen Frequenzen der antigenspezifischen Zellen in diesem Stadium, die besten Ergebnisse bei den Untersuchungen in dieser Arbeit lieferte. So gelang bei einem solchen Patienten sogar die Expansion antigenspezifischer Zellen aus dem peripheren Blut, die dann erfolgreich weitergetestet werden konnten (Patient 2 mit Chlamydien-assoziiertes ReA). Eine weitere Schwierigkeit liegt in der Tatsache, daß die Zellen *in vitro* nach einiger Zeit ihre Spezifität verlieren und deshalb spezifisch restimuliert werden müssen, was ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde. Die Expansion der Zellen und die anschließende Testung sollte deshalb möglichst schnell erfolgen.

Insgesamt läßt sich sagen, daß die hier verwendete Methodensequenz zur Identifizierung von Peptidepitopen aus hochmolekularen Proteinen als geeignet erscheint.

4.3. Bakterielle Antigene als potentielle Antigene bei der ankylosierenden Spondylitis

Die genaue Pathogenese der ankylosierenden Spondylitis ist bisher unbekannt, verschiedene Theorien sind – wie in der Einleitung ausführlich beschrieben – bisher postuliert worden. Einige dieser Theorien gehen von einer bakteriellen Infektion aus und postulieren das Vorhandensein von (persistierenden) bakteriellen Antigenen, die HLA-B27-abhängig eine Immunantwort induzieren (Sieper and Braun 1995).

Bei der ebenfalls zu den Spondylarthropathien zählenden reaktiven Arthritis gelten die Yersinienproteine Hsp-60 und 19kD sowie die chlamydialen Proteine Momp und Hsp als die in die Pathogenese dieser Erkrankung involvierten Antigene (Sieper 2004).

Aufgrund der vorhandenen Parallelen zwischen beiden Erkrankungen und aufgrund der Tatsache, daß ca. 20-30% der an der yersinien-induzierten reaktiven Arthritis Erkrankten im Laufe der nächsten 10-20 Jahre eine ankylosierende Spondylitis entwickeln (Leirisalo-Repo 1998), wurden im Rahmen unserer Untersuchungen diese bakteriellen Epitope auf ihre pathogenetische Bedeutung bei der AS untersucht.

Einen weiteren Anhalt für die Bedeutung der T-Zellen in der Pathogenese der AS lieferte die Analyse der T-Zell-Rezeptoren bei monozygoten Zwillingen, die ergeben hat, daß AS mit einer Oligoklonalität sowohl der CD8⁺- als auch der CD4⁺-Zellen im Vergleich zu Nichterkrankten einhergeht, was als ein Hinweis für die Mitbeteiligung von T-Zell-Antigenen bei der Entstehung von AS gedeutet wurde (Duchmann, Lambert et al. 2001).

Bei der für die Untersuchungen verwendeten durchflußzytometrischen Methode handelt es sich um ein sehr sensitives, aber auch aufwendiges Verfahren. Auf der anderen Seite war die Anzahl der für unsere Arbeit selektierten Peptide hoch. Unsere Experimente wurden daher so angelegt, daß zunächst die Untersuchung von kleinen Patientenzahlen geplant war. Würde sich bei einem oder bei mehreren Peptiden ein

kleiner Unterschied in den T-Zell-Frequenzen im Vergleich zu der Negativkontrolle ergeben, war die Untersuchung von größeren Patientenzahlen und die eventuelle Verwendung der Methode der Affinitätmatrix für die genauere Bestimmung der Frequenzunterschiede geplant.

Verwendet wurden – wie im Methodenteil beschrieben – Nonamere, die mit Hilfe eines Computerprogramms auf ihre Bindungsfähigkeit an das HLA-B27-Molekül positiv geprüft wurden (HG Rammensee, <http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi>) oder bereits in der Vergangenheit durch unsere Arbeitsgruppe identifizierte HLA-B27-bindende Yersiniennonamere (Ugrinovic, Mertz et al. 1997; Mertz, Ugrinovic et al. 1998).

Unsere Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf das Vorhandensein erhöhter Frequenzen von für die untersuchten Peptide spezifischen T-Zellen und damit keinen Anhalt für die pathogenetische Bedeutung der untersuchten Peptide bei der AS.

Auf CD4-Ebene konnte die Bedeutung von bakteriellen Antigenen ebenfalls weder für die RA noch für die AS nachgewiesen werden (Zou, Rudwaleit et al. 2002).

Frauendorf et al. (Frauendorf, von Goessel et al. 2003) fanden vor kurzem ein über das HLA-B27-Molekül präsentiertes von HLA-B2705 stammendes Nonamer-Peptid, welches von CD8⁺-Zellen von AS-Patienten, nicht jedoch von Kontrollpersonen spezifisch erkannt wird und Homologien mit bakteriellen Peptiden aufweist. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um Peptide, die sich von den am häufigsten postulierten Chlamydien und Yersinien ableiten, sondern von *P. aeruginosa*, *E.coli* und *Bacillus megaterium*. Bei den in den früheren Untersuchungen isolierten T-Zell-Klonen handelte es sich dagegen um autoreaktive HLA-restringierte CD8⁺-Zellklone, die aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit AS gewonnen werden konnten, wohingegen bei ReA-Patienten die Gewinnung von bakterienspezifischen Zellklonen gelang (Hermann, Yu et al. 1993).

Insgesamt sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit gegen die pathogenetische Bedeutung von bakteriellen Antigenen bei der AS.

4.4. HC gp-39 als mögliches Autoantigen bei rheumatoider Arthritis

Das humane Cartilage Glycoprotein HC gp-39, ein aus 383 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein, ist einerseits ein Sekretionsprodukt der Chondrozyten, der Synovialzellen sowie der in die Gelenke eingewanderten und in Makrophagen umgewandelten Monozyten und wird andererseits auch von der Leber produziert (Hakala, White et al. 1993; Kirkpatrick, Emery et al. 1997). Das Protein weist eine strukturelle Homologie mit bakteriellen Chitinaseproteinen auf (Hakala, White et al. 1993). Obwohl seine physiologische Funktion bisher unbekannt ist, scheint es eine wichtige Rolle bei der Umgestaltung von Geweben zu spielen (Hakala, White et al. 1993; Johansen, Cinton et al. 1995; Johansen, Moller et al. 1997). Interessanterweise kommt das HC gp-39 sowie die mRNA, die für dieses Protein kodiert, vor allem in den Gelenken von Patienten mit RA vor, während sich in den Gelenken gesunder Probanden kaum nennenswerte Mengen von HC gp-39 nachweisen lassen (Hakala, White et al. 1993). In Übereinstimmung damit, konnten Baeten et al. (Baeten, Boots et al. 2000) nachweisen, daß CD16-positive Monozyten, die eine Quelle für die HC gp-39-Produktion in vivo darstellen, bei RA-Patienten sowohl im peripheren Blut als auch im Synovium überexprimiert sind.

Aufgrund dieser Daten wurde angenommen, daß dieses verstärkt im entzündlichen Milieu gebildete Protein in die Pathogenese der RA involviert sein kann und mit einer Erhöhung der T-Zellen, die dieses Protein oder auch aus diesem Protein stammende Peptide erkennen, verbunden ist (Verheijden, Rijnders et al. 1997). Dazu passend wurde auch eine Erhöhung von HC gp-39-Leveln im Serum von Patienten mit RA in der Vergangenheit beschrieben (Johansen, Jensen et al. 1993; Vos, Steenbakkers et al. 2000).

Aufgrund dieser Annahmen versuchte man in der Vergangenheit einerseits die das HC gp-39 spezifisch erkennenden T-Zellen zu identifizieren und zu quantifizieren und andererseits wurden Versuche unternommen, mit Hilfe dieses Proteins im Tierexperiment ein Arthritis-Modell zu entwickeln.

Bisher durchgeführte Untersuchungen konnten zeigen, daß aus dem HC gp-39-Protein stammende über HLA-DR4 (HLA-DRB1*0401) präsentierte 13- oder 14-mere

von den T-Zellen aus dem peripheren Blut von RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen häufiger erkannt wurden (Verheijden, Rijnders et al. 1997), (Cope, Patel et al. 1999). Vos et al. (Vos, Miltenburg et al. 2000) testeten dieselben Peptide bei einer größeren Gruppe von RA-Patienten und gesunden Kontrollen und konnten eine hochsignifikante Erhöhung der Proliferation der mononukleären Zellen bei RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden für eines der Peptide (HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵) zeigen, wobei hier auch die Krankheitsintensität mit der Reaktion auf das Peptid positiv korrelierte.

Steenbakkers et al. (Steenbakkers, Baeten et al. 2003) generierten einen Antikörper (mAb 12A), welcher einen Komplex bestehend aus HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ und dem HLA-DR1*0401-Molekül spezifisch bindet. Die Komplexe wurden nur dann erkannt, wenn mindestens die Sequenz HC gp-39²⁶³⁻²⁷³ vorhanden war. Mit Hilfe von diesem Antikörper war es möglich, dendritische Zellen im Gelenk von HLA-DR1*0401-positiven RA-Patienten zu identifizieren, die HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ spezifisch präsentierten. Baeten et al. (Baeten, Steenbakkers et al. 2004) konnten mit Hilfe von dem mAb 12A-Antikörper zeigen, daß 61,5% der untersuchten RA-Patienten in ihrem Synovium dendritische Zellen aufweisen, die HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ spezifisch präsentieren, während nur bei 3% der untersuchten gesunden Kontrollen solche Zellen nachgewiesen werden konnten. Die Aktivierung von spezifischen T-Zellen konnte mit Hilfe von dem mAb 12 A-Antikörper in vitro verhindert werden (Steenbakkers, Baeten et al. 2003).

Diese Ergebnisse unterstützen einerseits die Rolle von HC gp-39 als potentielles Antigen bei der RA und lassen andererseits an den möglichen therapeutischen Einsatz solcher Antikörper zur Verhinderung der Aktivierung von spezifischen T-Zellen und damit zur Unterdrückung des Autoimmunprozesses denken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, mit Hilfe der hochsensitiven Methoden der Durchflußzytometrie HC gp-39 spezifisch erkennende T-Zellen zu identifizieren und ihren Anteil zu quantifizieren. Als Antigen verwendeten wir das gesamte Protein HC gp-39, während in den bisherigen Versuchen nur eine Proliferation von mononukleären Zellen nach Stimulation mit aus HC gp-39 stammenden Peptiden beschrieben wurde. In unseren Versuchen konnte bei allen 10 Patienten keine

Erhöhung der Produktion von IFN γ nach Kurzzeitstimulation mit HC gp-39 im Vergleich zu Kontrollen (ohne Antigen) nachgewiesen werden.

Um die Sensitivität noch weiter zu erhöhen, haben wir in einem zweiten Schritt versucht, die IFN γ -produzierenden T-Zellen mit Hilfe der zellulären Affinitätsmatrix zu isolieren. Wie in der Literatur beschrieben, können durch die Technologie der zellulären Affinitätsmatrix Zellen, deren Frequenz unter 1: 10⁵ liegt, nachgewiesen werden (Brosterhus, Brings et al. 1999, Thiel and Radbruch 1999), während die durchflußzytometrische Analyse nach intrazellulärer Zytokin- und/oder Oberflächenfärbung für die Identifizierung von Zellen, deren Frequenz nicht unter 1: 10³ bis 10⁴ liegt, gut geeignet ist (Thiel and Radbruch 1999).

Der Vergleich der Frequenzen der isolierten Zellen nach Antigenstimulation und bei der Negativkontrolle ergab auch bei dieser hochsensitiven Methode keine Erhöhung der IFN γ -Produktion nach Stimulation mit HC gp-39.

Deshalb muß die Relevanz dieses Antigens sowohl für die Pathogenese als auch für die Therapie angezweifelt werden.

Es stellt sich die Frage nach dem Grund für die fehlende Reaktivität der T-Zellen in unseren Experimenten.

In unseren Untersuchungen konnten weder bei der antigenspezifischen Durchflußzytometrie noch bei der noch sensitiveren Affinitätsmatrixtechnologie antigenspezifische Zellen nachgewiesen werden. Unsere Daten legen daher nahe, daß die bisher diskutierte Rolle bei der RA eher überschätzt wurde und daß dieses Molekül keine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der Erkrankung spielt. Dafür spricht auch, daß bisherige Therapieversuche, die mit diesem Antigen eine mucosale (nasale) Toleranz induzieren sollten, fehlgeschlagen sind (J. Sieper, persönliche Mitteilung).

Es müssen allerdings auch die Unterschiede zu den bisherigen Arbeiten, die einerseits in der Methodik und andererseits beim Antigen selbst bestehen, als Ursache für die Diskordanz zwischen unseren und den aus der Literatur bekannten Ergebnissen bezüglich der Antigenität von HC gp-39 in Betracht gezogen werden.

In den bisherigen Arbeiten wurde der Lymphozytenproliferationstest für die Antigenuntersuchung verwendet, bei dem eine im Vergleich zu der durchflußzytometrischen Methode relativ hohe unspezifische Reaktion wegen der relativ langen (normalerweise 6 Tage betragenden) Stimulationszeit bekannt ist (Thiel, Wu et al. 2000). Bei der Durchflußzytometrie ist die unspezifische Reaktion dagegen (wie im Teil zur Diskussion der Methoden bereits beschrieben) als gering einzuschätzen.

Eine Reaktion von T-Zellen auf die Stimulation mit HC gp-39 als Gesamtprotein ist bisher nie beschrieben worden. Auch wenn eine ausschließliche Reaktivität der T-Zellen von RA-Patienten auf bestimmte aus HC gp-39 stammenden Peptide unwahrscheinlich erscheint, könnte es der Grund für die Diskrepanz zwischen den in der Vergangenheit beschriebenen und unseren Ergebnissen sein.

Es muß außerdem bedacht werden, daß die bisher bei RA-Patienten positiv getesteten Peptide, ein DRB1*0401-bindendes Motiv besitzen und vor allem bei den DRB1*0401-positiven Patienten zu einer Reaktion führten (Vos, Miltenburg et al. 2000). Dies schränkt natürlich die Bedeutung von HC gp-39 als generell für die RA geltendes Antigen ein.

In unseren Experimenten wurde eine HLA-Typisierung und vorherige Patientenauswahl nach HLA-Typ nicht durchgeführt.

Als andere in Frage kommenden Ursachen für die Diskrepanzen müssen auch zu geringe Patientenanzahl und unterschiedliche Vorbehandlung der Patienten oder ungeeignete Peptidkonzentrationen genannt werden. Die von uns verwendeten Proteinkonzentrationen entsprachen aber den aus der Literatur bekannten für die Kurzzeitstimulation von mononukleären Zellen üblicherweise verwendeten Proteinkonzentrationen.

Wie oben bereits erwähnt, ist das HC gp-39 kein gelenkspezifisches Protein. Auch bei anderen Krankheitsbildern konnten erhöhte Serumlevel von HC gp-39 nachgewiesen werden, so z.B. bei fortgeschrittenem Mammakarzinom (Johansen, Cintin et al. 1995) und alkoholtoxischer Leberzirrhose (Johansen, Moller et al. 1997). Da aber bei RA-Patienten in der Synovialflüssigkeit im Vergleich zum Serum etwa 10-15fach erhöhte HC gp-39-Spiegel gefunden werden, wobei diese Spiegel jeweils

miteinander korrelieren, besteht Grund zu der Annahme, daß das HC gp-39 bei RA-Patienten tatsächlich spezifisch aus dem Synovium stammt und mit der entzündlichen Aktivität im Gelenk korreliert (Vos, Steenbakkers et al. 2000) .

Bekanntlich steht hinter der Suche nach den möglichen bei der Auslösung der RA mitwirkenden Antigenen nicht nur das Bestreben nach der Klärung der Pathogenese der Erkrankung, sondern auch ein eventueller therapeutischer Ansatz durch Induktion der Immuntoleranz.

In Tierexperimenten sind solche Versuche mit HC gp-39 in der Vergangenheit bereits erfolgreich verlaufen.

Wie bei anderen für die RA als potentielle Antigene in Frage kommenden Molekülen, wurde ebenfalls das HC gp-39 in der Vergangenheit auf seine mögliche Arthritisinduktion im Tiermodell untersucht. So konnte gezeigt werden, daß die Injektion von HC gp-39 bei einer BALB/c Maus zur Ausbildung einer Arthritis führt, wobei der Schweregrad der Gelenkveränderungen von der injizierten Menge an HC gp-39 abhängig war (Verheijden, Rijnders et al. 1997). Insgesamt war das Krankheitsbild weniger schwer als die proteoglycan-induzierte Arthritis bei der BALB/c Maus oder die Kollagen-II-induzierte Arthritis bei der DBA/1 Maus (Courtenay, Dallman et al. 1980; Glant, Mikecz et al. 1987). Durch die vorherige intranasale Applikation von HC gp-39 konnte die Entwicklung der Arthritis verzögert und bei 50% der Tiere sogar verhindert werden.

HC gp-39 wurde außerdem auf seine Fähigkeit hin untersucht, im Tiermodell Kreuztoleranzen für durch andere Antigene hervorgerufene Arthritiden zu induzieren. Joosten et al. (Joosten, Coenen-de Roo et al. 2000) haben die mögliche Induktion der Immuntoleranz durch die intranasale Applikation von HC gp-39 bei Mäusen mit Kollagen-II-induzierter Arthritis untersucht. Sie konnten zeigen, daß sowohl eine Reduzierung der Inzidenz als auch des Schweregrades der Kollagen-II-induzierten Arthritis durch die intranasale Applikation von HC gp-39 erreicht werden konnten und erklärten diesen Effekt der Kreuztoleranz mit einer T-zell-vermittelten Suppression deren Mechanismus allerdings noch einer genaueren Klärung bedarf.

Diese tierexperimentellen Ergebnisse deuten einerseits stark auf die arthritogene Potenz von HC gp-39 hin. Andererseits muß aber gesagt werden, daß trotz der

Ähnlichkeiten, die antigeninduzierte Arthritiden mit der menschlichen RA aufweisen, Tiermodelle, die diese Erkrankung in toto widerspiegeln, nicht bekannt sind.

So brachten die Versuche zur Erzeugung einer Immuntoleranz mit HC gp-39 und damit einer Reduzierung der Krankheitsaktivität beim Menschen bisher keinen eindeutigen Erfolg.

Kavanaugh et al. (Kavanaugh, Genovese et al. 2003) untersuchten die Wirksamkeit, Toleranz und Pharmakokinetik eines löslichen Proteinkomplexes bestehend aus dem HLA-DR1*0401-Molekül und dem daran gebundenen HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ (AG4263). Hinter dieser Untersuchung stand die Idee, eine therapeutische Strategie in der Behandlung der RA zu entwickeln, bei der die Verabreichung von mit möglichen Antigenen beladenen MHC-II-Molekülen zur Induktion einer Immuntoleranz führen könnte, was in der Literatur bereits für andere Erkrankungen beschrieben wurde (Spack, McCutcheon et al. 1995).

Diese Arbeit zeigte, daß das AG4263 insgesamt gut toleriert wurde und eine Therapieantwort auf AG4263 bei HLA-DRB1*0401-positiven Patienten im Vergleich zu Placebo häufiger beobachtet werden konnte (ein Signifikanzniveau ist allerdings nicht erreicht worden). Allerdings waren nur 29% der von dieser Arbeitsgruppe untersuchten RA-Patienten HLA-DRB1*0401-positiv (in der Literatur findet man Angaben um ca. 40%, (Kavanaugh, Genovese et al. 2003)), was die generelle Bedeutung von diesem Therapieansatz für RA-Patienten einschränkt.

Auch die in den Tierexperimenten zunächst erfolgreich erprobte intranasale Applikation von HC gp-39 beim Menschen zur Induktion einer Immuntoleranz zeigte bisher keine Wirkung (J. Sieper, persönliche Mitteilung).

Insgesamt ist die Rolle von HC gp-39 als mögliches Autoantigen bei der RA kontrovers zu sehen.

Insgesamt läßt sich sagen, daß hinter der Epitopsuche bei rheumatischen Erkrankungen, mit der sich diese Arbeit beschäftigte, zwei Ideen stehen. Einerseits liefert die Identifizierung und Spezifizierung der bakteriellen Epitope wichtige Einblicke in die molekularbiologischen Grundlagen für die Entstehung der rheumatischen Erkrankungen. Andererseits bietet die Kenntnis der Epitope die

Möglichkeit der Entwicklung spezifischer, kausaler Therapien. Eine kausale Therapie bedeutet die Eliminierung bzw. Unschädlichmachung der persistierenden Erreger oder anderer schädigender Substanzen oder aber auch die Induktion einer Immuntoleranz. Besonders letzteres erscheint durchaus als eine Möglichkeit bei den rheumatischen Erkrankungen. Denn einerseits ist im Falle der reaktiven Arthritis unklar, ob persistierende Erreger dem Organismus schaden und sie sind auch nicht einfach zu beseitigen, falls sie sich für längere Zeit im latenten Stadium befinden. Auf der anderen Seite erscheint für die anderen eher autoimmun ausgelösten bzw. unterhaltenden Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis die Eliminierung der antigenen Substanzen schwierig oder unmöglich.

Die Bedeutung der Notwendigkeit der Entwicklung einer effektiven kausalen Therapie sei durch die Tatsache unterstrichen, daß die rheumatischen Erkrankungen zu einem sehr großen Teil junge Menschen betreffen, chronisch verlaufen und nicht selten zur Invalidität führen können, so daß rein symptomatische Therapien, die den Progreß nicht aufhalten können, sehr unbefriedigend erscheinen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Epitopenalyse bei rheumatischen Erkrankungen unter Einsatz der hochsensitiven Methoden der Durchflußzytometrie und der Affinitätsmatrix-Technologie.

Mit Hilfe dieser Methoden ist im Rahmen der Arbeit in dem der reaktiven Arthritis (ReA) gewidmeten Teil die Identifizierung von aus Yersinien- und Chlamydienproteinen stammenden Antigenen (Y.e. Hsp60 und Ch. tr. Momp) auf Peptidebene gelungen. Es wurden mehrere CD4-Epitope gefunden. Wir konnten zeigen, daß bei der chlamydien-induzierten ReA dieselben Peptidsequenzen zum Teil von mehreren Patienten spezifisch erkannt werden.

Die hier gelungene Identifizierung der immundominanten CD4-T-Zell-Epitope, die sich von den ReA-assoziierten Bakterien ableiten, und zwar zunächst auf Proteinebene, aber letztendlich auch auf der Ebene der den T-Zellen präsentierten Peptide, stellt einen wichtigen molekularbiologischen Schritt zur Erforschung der Immunpathologie der ReA dar.

Die Bedeutung der bei der ReA aus der Literatur bekannten, potentiell antigen wirkenden bakteriellen CD8-Peptide konnte für die Pathogenese der ankylosierenden Spondylitis nicht bestätigt werden.

Das seit längerer Zeit für die Entstehung der rheumatoiden Arthritis (RA) als bedeutsam diskutierte Glycoprotein HC gp-39 wurde als Target-Antigen für die autoreaktiven CD4-T-Zellen der RA-Patienten durch unsere Untersuchungen nicht bestätigt.

Die Identifizierung und Spezifizierung der bakteriellen Epitope liefert wichtige Einblicke in die molekularbiologischen Grundlagen für die Entstehung der rheumatischen Erkrankungen. Die Kenntnis der Epitope könnte die Möglichkeit der Entwicklung spezifischer, kausaler Therapien bieten. Eine kausale Therapie bedeutet die Eliminierung bzw. Unschädlichmachung der persistierenden Erreger oder anderer schädigender Substanzen oder aber auch die Induktion einer Immuntoleranz. Besonders letzteres erscheint durchaus als eine therapeutische Option bei den rheumatischen Erkrankungen.

6. Referenzen

- Abbas, A. K., K. M. Murphy, et al. (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." Nature **383**(6603): 787-93.
- Altman, J. D., P. A. Moss, et al. (1996). "Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes." Science **274**(5284): 94-6.
- Arnett, F. C., S. M. Edworthy, et al. (1988). "The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **31**(3): 315-24.
- Assenmacher, M., J. Schmitz, et al. (1994). "Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells." Eur J Immunol **24**(5): 1097-101.
- Baeten, D., A. M. Boots, et al. (2000). "Human cartilage gp-39+,CD16+ monocytes in peripheral blood and synovium: correlation with joint destruction in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **43**(6): 1233-43.
- Baeten, D., P. G. Steenbakkers, et al. (2004). "Detection of major histocompatibility complex/human cartilage gp-39 complexes in rheumatoid arthritis synovitis as a specific and independent histologic marker." Arthritis Rheum **50**(2): 444-51.
- Bohn, E. and I. B. Autenrieth (1996). "IL-12 is essential for resistance against *Yersinia enterocolitica* by triggering IFN-gamma production in NK cells and CD4+ T cells." J Immunol **156**(4): 1458-68.
- Bowness, P., R. L. Allen, et al. (1998). "Importance of a conserved TCR J alpha-encoded tyrosine for T cell recognition of an HLA B27/peptide complex." Eur J Immunol **28**(9): 2704-13.
- Brandt, J., H. Haibel, et al. (2000). "Successful treatment of active ankylosing spondylitis with the anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody infliximab." Arthritis Rheum **43**(6): 1346-52.

- Braun, J., M. Grolms, et al. (1994). "The specific antibacterial proliferation of reactive arthritis synovial T cells is not due to their higher proportion of CD45RO+ cells compared to peripheral blood." J Rheumatol **21**(9): 1702-7.
- Braun, J., M. Tuszewski, et al. (1997). "Nested polymerase chain reaction strategy simultaneously targeting DNA sequences of multiple bacterial species in inflammatory joint diseases. I. Screening of synovial fluid samples of patients with spondyloarthropathies and other arthritides." J Rheumatol **24**(6): 1092-100.
- Braun, J., M. Tuszewski, et al. (1997). "Nested polymerase chain reaction strategy simultaneously targeting DNA sequences of multiple bacterial species in inflammatory joint diseases. II. Examination of sacroiliac and knee joint biopsies of patients with spondyloarthropathies and other arthritides." J Rheumatol **24**(6): 1101-5.
- Braun, J., J. Xiang, et al. (2000). "Treatment of spondyloarthropathies with antibodies against tumour necrosis factor alpha: first clinical and laboratory experiences." Ann Rheum Dis **59 Suppl 1**: i85-9.
- Braun, J., Z. Yin, et al. (1999). "Low secretion of tumor necrosis factor alpha, but no other Th1 or Th2 cytokines, by peripheral blood mononuclear cells correlates with chronicity in reactive arthritis." Arthritis Rheum **42**(10): 2039-44.
- Brewerton, D. A., F. D. Hart, et al. (1973). "Ankylosing spondylitis and HL-A 27." Lancet **1**(7809): 904-7.
- Brosterhus, H., S. Brings, et al. (1999). "Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion." Eur J Immunol **29**(12): 4053-9.
- Burmester, G. R., A. Daser, et al. (1995). "Immunology of reactive arthritides." Annu Rev Immunol **13**: 229-50.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, et al. (1994). "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." Science **265**(5176): 1237-40.
- Chicz, R. M., R. G. Urban, et al. (1993). "Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles." J Exp Med **178**(1): 27-47.

- Clegg, D. O., D. J. Reda, et al. (1999). "Comparison of sulfasalazine and placebo for the treatment of axial and peripheral articular manifestations of the seronegative spondylarthropathies: a Department of Veterans Affairs cooperative study." Arthritis Rheum **42**(11): 2325-9.
- Cope, A. P., S. D. Patel, et al. (1999). "T cell responses to a human cartilage autoantigen in the context of rheumatoid arthritis-associated and nonassociated HLA-DR4 alleles." Arthritis Rheum **42**(7): 1497-507.
- Courtenay, J. S., M. J. Dallman, et al. (1980). "Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice." Nature **283**(5748): 666-8.
- Cox, C. J., K. E. Kempell, et al. (2003). "Investigation of infectious agents associated with arthritis by reverse transcription PCR of bacterial rRNA." Arthritis Res Ther **5**(1): R1-8. Epub 2002 Oct 11.
- Davies, D. R. and G. H. Cohen (1996). "Interactions of protein antigens with antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 7-12.
- Deane, K. H., R. M. Jecock, et al. (1997). "Identification and characterization of a DR4-restricted T cell epitope within chlamydia heat shock protein 60." Clin Exp Immunol **109**(3): 439-45.
- Dougados, M., S. van der Linden, et al. (1991). "The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy." Arthritis Rheum **34**(10): 1218-27.
- Duchmann, R., C. Lambert, et al. (2001). "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 **123**(2): 315-22.
- Elliott, M. J., R. N. Maini, et al. (1994). "Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis." Lancet **344**(8930): 1105-10.
- Ezekowitz, R. A. B. and J. A. Hoffmann (1996). "Innate immunity." Curr Opin Immunol **8**(1): 1-2.
- Fendler, C., J. Braun, et al. (1998). "Bacteria-specific lymphocyte proliferation in peripheral blood in reactive arthritis and related diseases." Br J Rheumatol **37**(5): 520-4.

- Fiorentino, D. F., M. W. Bond, et al. (1989). "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones." J Exp Med **170**(6): 2081-95.
- Firestein, G. S., W. D. Roeder, et al. (1989). "A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile." J Immunol **143**(2): 518-25.
- Fitch, F. W., M. D. McKisic, et al. (1993). "Differential regulation of murine T lymphocyte subsets." Annu Rev Immunol **11**: 29-48.
- Frauendorf, E., H. von Goessel, et al. (2003). "HLA-B27-restricted T cells from patients with ankylosing spondylitis recognize peptides from B*2705 that are similar to bacteria-derived peptides." Clin Exp Immunol **134**(2): 351-9.
- Fremont, D. H., W. A. Hendrickson, et al. (1996). "Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides." Science **272**(5264): 1001-4.
- Fugger, L., J. B. Rothbard, et al. (1996). "Specificity of an HLA-DRB1*0401-restricted T cell response to type II collagen." Eur J Immunol **26**(4): 928-33.
- Fugmann, S. D., A. I. Lee, et al. (2000). "The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition." Annu Rev Immunol **18**: 495-527.
- Gaston, J. S., K. H. Deane, et al. (1996). "Identification of 2 Chlamydia trachomatis antigens recognized by synovial fluid T cells from patients with Chlamydia induced reactive arthritis." J Rheumatol **23**(1): 130-6.
- Gaston, J. S., P. F. Life, et al. (1989). "Synovial T lymphocyte recognition of organisms that trigger reactive arthritis." Clin Exp Immunol **76**(3): 348-53.
- Gerard, H. C., P. J. Branigan, et al. (1998). "Synovial Chlamydia trachomatis in patients with reactive arthritis/Reiter's syndrome are viable but show aberrant gene expression." J Rheumatol **25**(4): 734-42.
- Germain, R. N. (1994). "MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation." Cell **76**(2): 287-99.
- Glant, T. T., K. Mikecz, et al. (1987). "Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology." Arthritis Rheum **30**(2): 201-12.
- Goodall, J. C., H. Beacock-Sharp, et al. (2001). "Recognition of the 60 kilodalton cysteine-rich outer membrane protein OMP2 by CD4(+) T cells from humans infected with Chlamydia trachomatis." Clin Exp Immunol **126**(3): 488-93.

- Goodall, J. C., G. Yeo, et al. (2001). "Identification of Chlamydia trachomatis antigens recognized by human CD4+ T lymphocytes by screening an expression library." Eur J Immunol **31**(5): 1513-22.
- Gran, J. T. and G. Husby (1993). "The epidemiology of ankylosing spondylitis." Semin Arthritis Rheum **22**(5): 319-34.
- Granfors, K., S. Jalkanen, et al. (1989). "Yersinia antigens in synovial-fluid cells from patients with reactive arthritis." N Engl J Med **320**(4): 216-21.
- Granfors, K., R. Merilahti-Palo, et al. (1998). "Persistence of Yersinia antigens in peripheral blood cells from patients with Yersinia enterocolitica O:3 infection with or without reactive arthritis." Arthritis Rheum **41**(5): 855-62.
- Gregersen, P. K., J. Silver, et al. (1987). "The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **30**(11): 1205-13.
- Gross, H. J., B. Verwer, et al. (1993). "Detection of rare cells at a frequency of one per million by flow cytometry." Cytometry **14**(5): 519-26.
- Hakala, B. E., C. White, et al. (1993). "Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family." J Biol Chem **268**(34): 25803-10.
- Hammer, R. E., S. D. Maika, et al. (1990). "Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders." Cell **63**(5): 1099-112.
- Harding, C. V. and H. J. Geuze (1993). "Immunogenic peptides bind to class II MHC molecules in an early lysosomal compartment." J Immunol **151**(8): 3988-98.
- Harris, E. D., Jr. (1990). "Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy." N Engl J Med **322**(18): 1277-89.
- Hassell, A. B., D. J. Reynolds, et al. (1993). "Identification of T-cell stimulatory antigens of Chlamydia trachomatis using synovial fluid-derived T-cell clones." Immunology **79**(4): 513-9.
- Hermann, E., A. W. Lohse, et al. (1991). "Synovial fluid-derived Yersinia-reactive T cells responding to human 65- kDa heat-shock protein and heat-stressed antigen-presenting cells." Eur J Immunol **21**(9): 2139-43.

- Hermann, E., D. T. Yu, et al. (1993). "HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis." Lancet **342**(8872): 646-50.
- Heufler, C., F. Koch, et al. (1996). "Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells." Eur J Immunol **26**(3): 659-68.
- Johansen, J. S., C. Cintoni, et al. (1995). "Serum YKL-40: a new potential marker of prognosis and location of metastases of patients with recurrent breast cancer." Eur J Cancer **31A**(9): 1437-42.
- Johansen, J. S., H. S. Jensen, et al. (1993). "A new biochemical marker for joint injury. Analysis of YKL-40 in serum and synovial fluid." Br J Rheumatol **32**(11): 949-55.
- Johansen, J. S., S. Moller, et al. (1997). "Plasma YKL-40: a new potential marker of fibrosis in patients with alcoholic cirrhosis?" Scand J Gastroenterol **32**(6): 582-90.
- Joosten, L. A., C. J. Coenen-de Roo, et al. (2000). "Induction of tolerance with intranasal administration of human cartilage gp-39 in DBA/1 mice: amelioration of clinical, histologic, and radiologic signs of type II collagen-induced arthritis." Arthritis Rheum **43**(3): 645-55.
- Jung, T., U. Schauer, et al. (1993). "Detection of intracellular cytokines by flow cytometry." J Immunol Methods **159**(1-2): 197-207.
- Kapasi, K. and R. D. Inman (1992). "HLA-B27 expression modulates gram-negative bacterial invasion into transfected L cells." J Immunol **148**(11): 3554-9.
- Kaufmann, S. H. (1993). "Immunity to intracellular bacteria." Annu Rev Immunol **11**: 129-63.
- Kavanaugh, A., M. Genovese, et al. (2003). "Allele and antigen-specific treatment of rheumatoid arthritis: a double blind, placebo controlled phase 1 trial." J Rheumatol **30**(3): 449-54.
- Keat, A. C., R. N. Maini, et al. (1978). "Role of Chlamydia trachomatis and HLA-B27 in sexually acquired reactive arthritis." Br Med J **1**(6113): 605-7.

- Kempesell, K. E., C. J. Cox, et al. (2000). "Reverse transcriptase-PCR analysis of bacterial rRNA for detection and characterization of bacterial species in arthritis synovial tissue." Infect Immun **68**(10): 6012-26.
- Kern, F., I. P. Sural, et al. (1998). "T-cell epitope mapping by flow cytometry." Nat Med **4**(8): 975-8.
- Kingsley, G. and J. Sieper (1993). "Current perspectives in reactive arthritis." Immunol Today **14**(8): 387-91.
- Kingsley, G. and J. Sieper (1996). "Third International Workshop on Reactive Arthritis. 23-26 September 1995, Berlin, Germany. Report and abstracts." Ann Rheum Dis **55**(8): 564-84.
- Kirkpatrick, R. B., J. G. Emery, et al. (1997). "Induction and expression of human cartilage glycoprotein 39 in rheumatoid inflammatory and peripheral blood monocyte-derived macrophages." Exp Cell Res **237**(1): 46-54.
- Kotake, S., H. R. Schumacher, Jr., et al. (1999). "Gamma interferon and interleukin-10 gene expression in synovial tissues from patients with early stages of Chlamydia-associated arthritis and undifferentiated oligoarthritis and from healthy volunteers." Infect Immun **67**(5): 2682-6.
- Kuon, W., R. Lauster, et al. (1997). "Recognition of chlamydial antigen by HLA-B27-restricted cytotoxic T cells in HLA-B*2705 transgenic CBA (H-2k) mice." Arthritis Rheum **40**(5): 945-54.
- Lahesmaa, R., M. Skurnik, et al. (1991). "Molecular mimicry between HLA B27 and Yersinia, Salmonella, Shigella and Klebsiella within the same region of HLA alpha 1-helix." Clin Exp Immunol **86**(3): 399-404.
- Laitio, P., M. Virtala, et al. (1997). "HLA-B27 modulates intracellular survival of Salmonella enteritidis in human monocytic cells." Eur J Immunol **27**(6): 1331-8.
- Lang, B., A. Rothenfusser, et al. (1993). "Susceptibility to relapsing polychondritis is associated with HLA-DR4." Arthritis Rheum **36**(5): 660-4.
- Leirisalo-Repo, M. (1998). "Prognosis, course of disease, and treatment of the spondyloarthropathies." Rheum Dis Clin North Am **24**(4): 737-51, viii.

- Liblau, R. S., S. M. Singer, et al. (1995). "Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases." Immunol Today **16**(1): 34-8.
- Life, P. F., N. J. Viner, et al. (1990). "Synovial fluid antigen-presenting cells unmask peripheral blood T cell responses to bacterial antigens in inflammatory arthritis." Clin Exp Immunol **79**(2): 189-94.
- Londei, M., C. M. Savill, et al. (1989). "Persistence of collagen type II-specific T-cell clones in the synovial membrane of a patient with rheumatoid arthritis." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(2): 636-40.
- Maenaka, K. and E. Y. Jones (1999). "MHC superfamily structure and the immune system." Curr Opin Struct Biol **9**(6): 745-53.
- Malmstrom, V., E. Michaelsson, et al. (1996). "Systemic versus cartilage-specific expression of a type II collagen- specific T-cell epitope determines the level of tolerance and susceptibility to arthritis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 4480-5.
- Manz, R., M. Assenmacher, et al. (1995). "Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(6): 1921-5.
- Mauri, C., R. O. Williams, et al. (1996). "Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and the arthritogenic response in collagen-induced arthritis." Eur J Immunol **26**(7): 1511-8.
- McHeyzer-Williams, M. G. and R. Ahmed (1999). "B cell memory and the long-lived plasma cell." Curr Opin Immunol **11**(2): 172-9.
- Mertz, A. K., A. Daser, et al. (1994). "The evolutionarily conserved ribosomal protein L23 and the cationic urease beta-subunit of *Yersinia enterocolitica* O:3 belong to the immunodominant antigens in *Yersinia*-triggered reactive arthritis: implications for autoimmunity." Mol Med **1**(1): 44-55.
- Mertz, A. K., S. Ugrinovic, et al. (1998). "Characterization of the synovial T cell response to various recombinant *Yersinia* antigens in *Yersinia enterocolitica*-triggered reactive arthritis. Heat-shock protein 60 drives a major immune response." Arthritis Rheum **41**(2): 315-26.

- Mertz, A. K., P. Wu, et al. (2000). "Multispecific CD4+ T cell response to a single 12-mer epitope of the immunodominant heat-shock protein 60 of *Yersinia enterocolitica* in *Yersinia*-triggered reactive arthritis: overlap with the B27-restricted CD8 epitope, functional properties, and epitope presentation by multiple DR alleles." J Immunol **164**(3): 1529-37.
- Moreland, L. W., M. H. Schiff, et al. (1999). "Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial." Ann Intern Med **130**(6): 478-86.
- Mosmann, T. R. and S. Sad (1996). "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more." Immunol Today **17**(3): 138-46.
- Mosmann, T. R., J. H. Schumacher, et al. (1991). "Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4+ T cells." Immunol Rev **123**: 209-29.
- Muller-Ladner, U., R. E. Gay, et al. (2000). "Activation of synoviocytes." Curr Opin Rheumatol **12**(3): 186-94.
- Murali-Krishna, K., J. D. Altman, et al. (1998). "Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection." Immunity **8**(2): 177-87.
- Nikkari, S., K. Rantakokko, et al. (1999). "Salmonella-triggered reactive arthritis: use of polymerase chain reaction, immunocytochemical staining, and gas chromatography-mass spectrometry in the detection of bacterial components from synovial fluid." Arthritis Rheum **42**(1): 84-9.
- Pamer, E. G. (1993). "Cellular immunity to intracellular bacteria." Curr Opin Immunol **5**(4): 492-6.
- Pap, T., J. K. Franz, et al. (2000). "Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of Expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction." Arthritis Res **2**(1): 59-64.
- Pap, T., U. Muller-Ladner, et al. (2000). "Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." Arthritis Res **2**(5): 361-7.
- Paul, W. E. and R. A. Seder (1994). "Lymphocyte responses and cytokines." Cell **76**(2): 241-51.
- Pazmany, L., S. Rowland-Jones, et al. (1992). "Genetic modulation of antigen presentation by HLA-B27 molecules." J Exp Med **175**(2): 361-9.

- Picker, L. J., M. K. Singh, et al. (1995). "Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry." Blood **86**(4): 1408-19.
- Radbruch, A. and D. Recktenwald (1995). "Detection and isolation of rare cells." Curr Opin Immunol **7**(2): 270-3.
- Rapoport, M. J., A. Jaramillo, et al. (1993). "Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice." J Exp Med **178**(1): 87-99.
- Robinson, D. S., Q. Hamid, et al. (1992). "Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma." N Engl J Med **326**(5): 298-304.
- Rogers, P. R., C. Dubey, et al. (2000). "Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen." J Immunol **164**(5): 2338-46.
- Romagnani, S. (1991). "Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more." Immunol Today **12**(8): 256-7.
- Romagnani, S. (1994). "Lymphokine production by human T cells in disease states." Annu Rev Immunol **12**: 227-57.
- Rowland-Jones, S. L., S. H. Powis, et al. (1993). "An antigen processing polymorphism revealed by HLA-B8-restricted cytotoxic T lymphocytes which does not correlate with TAP gene polymorphism." Eur J Immunol **23**(8): 1999-2004.
- Rudwaleit, M., S. Siebert, et al. (2001). "Low T cell production of TNFalpha and IFNgamma in ankylosing spondylitis: its relation to HLA-B27 and influence of the TNF-308 gene polymorphism." Ann Rheum Dis **60**(1): 36-42.
- Sad, S., R. Marcotte, et al. (1995). "Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines." Immunity **2**(3): 271-9.
- Schmittel, A., U. Keilholz, et al. (1997). "Evaluation of the interferon-gamma ELISPOT-assay for quantification of peptide specific T lymphocytes from peripheral blood." J Immunol Methods **210**(2): 167-74.

-
- Schroder, A. E., A. Greiner, et al. (1996). "Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 221-5.
- Schulte, S., C. Unger, et al. (1998). "Arthritis-related B cell epitopes in collagen II are conformation- dependent and sterically privileged in accessible sites of cartilage collagen fibrils." J Biol Chem **273**(3): 1551-61.
- Schwimmbeck, P. L., D. T. Yu, et al. (1987). "Autoantibodies to HLA B27 in the sera of HLA B27 patients with ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome. Molecular mimicry with *Klebsiella pneumoniae* as potential mechanism of autoimmune disease." J Exp Med **166**(1): 173-81.
- Scofield, R. H., W. L. Warren, et al. (1993). "A hypothesis for the HLA-B27 immune dysregulation in spondyloarthropathy: contributions from enteric organisms, B27 structure, peptides bound by B27, and convergent evolution." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(20): 9330-4.
- Seder, R. A. and W. E. Paul (1994). "Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells." Annu Rev Immunol **12**: 635-73.
- Sekine, T., T. Kato, et al. (1999). "Type II collagen is a target antigen of clonally expanded T cells in the synovium of patients with rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **58**(7): 446-50.
- Sercarz, E. E., P. V. Lehmann, et al. (1993). "Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants." Annu Rev Immunol **11**: 729-66.
- Sher, A. and R. L. Coffman (1992). "Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines." Annu Rev Immunol **10**: 385-409.
- Sieper, J. (2004). "Disease mechanisms in reactive arthritis." Curr Rheumatol Rep **6**(2): 110-6.
- Sieper, J. and J. Braun (1995). "Pathogenesis of spondylarthropathies. Persistent bacterial antigen, autoimmunity, or both?" Arthritis Rheum **38**(11): 1547-54.
- Sieper, J. and J. Braun (1999). "Reactive arthritis." Curr Opin Rheumatol **11**(4): 238-43.
- Sieper, J., J. Braun, et al. (1992). "Pathogenetic role of *Chlamydia*, *Yersinia* and *Borrelia* in undifferentiated oligoarthritis." J Rheumatol **19**(8): 1236-42.

- Sieper, J., J. Braun, et al. (2000). "Report on the Fourth International Workshop on Reactive Arthritis." Arthritis Rheum **43**(4): 720-34.
- Sieper, J., J. Braun, et al. (1993). "T cells are responsible for the enhanced synovial cellular immune response to triggering antigen in reactive arthritis." Clin Exp Immunol **91**(1): 96-102.
- Sieper, J. and G. Kingsley (1996). "Recent advances in the pathogenesis of reactive arthritis." Immunol Today **17**(4): 160-3.
- Sieper, J., G. Kingsley, et al. (1991). "Synovial T lymphocyte-specific immune response to Chlamydia trachomatis in Reiter's disease." Arthritis Rheum **34**(5): 588-98.
- Simon, A. K., E. Seipelt, et al. (1994). "Divergent T-cell cytokine patterns in inflammatory arthritis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(18): 8562-6.
- Smeets, T. J., R. J. Dolhain, et al. (1998). "Analysis of the cellular infiltrates and expression of cytokines in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and reactive arthritis." J Pathol **186**(1): 75-81.
- Song, R. and C. V. Harding (1996). "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 **156**(11): 4182-90.
- Spack, E. G., M. McCutcheon, et al. (1995). "Induction of tolerance in experimental autoimmune myasthenia gravis with solubilized MHC class II:acetylcholine receptor peptide complexes." J Autoimmun **8**(6): 787-807.
- Steenbakkers, P. G., D. Baeten, et al. (2003). "Localization of MHC class II/human cartilage glycoprotein-39 complexes in synovia of rheumatoid arthritis patients using complex-specific monoclonal antibodies." J Immunol **170**(11): 5719-27.
- Suni, M. A., L. J. Picker, et al. (1998). "Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry." J Immunol Methods **212**(1): 89-98.
- Taurog, J. D., S. D. Maika, et al. (1993). "Susceptibility to inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rat lines correlates with the level of B27 expression." J Immunol **150**(9): 4168-78.

- Taurog, J. D., J. A. Richardson, et al. (1994). "The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats." J Exp Med **180**(6): 2359-64.
- Thiel, A. and A. Radbruch (1999). "Antigen-specific cytometry." Arthritis Res **1**(1): 25-9.
- Thiel, A., P. Wu, et al. (2000). "Analysis of the antigen-specific T cell response in reactive arthritis by flow cytometry." Arthritis Rheum **43**(12): 2834-42.
- Toivanen, A., R. Lahesmaa-Rantala, et al. (1987). "Association of persisting IgA response with yersinia triggered reactive arthritis: a study on 104 patients." Ann Rheum Dis **46**(12): 898-901.
- Townsend, A. and J. Trowsdale (1993). "The transporters associated with antigen presentation." Semin Cell Biol **4**(1): 53-61.
- Ugrinovic, S., A. Mertz, et al. (1997). "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 **159**(11): 5715-23.
- van Bohemen, C. G., F. C. Grumet, et al. (1984). "Identification of HLA-B27M1 and -M2 cross-reactive antigens in Klebsiella, Shigella and Yersinia." Immunology **52**(4): 607-10.
- van der Linden, S., H. A. Valkenburg, et al. (1984). "Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria." Arthritis Rheum **27**(4): 361-8.
- Verheijden, G. F., A. W. Rijnders, et al. (1997). "Human cartilage glycoprotein-39 as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **40**(6): 1115-25.
- Viner, N. J., L. C. Bailey, et al. (1991). "Isolation of Yersinia-specific T cell clones from the synovial membrane and synovial fluid of a patient with reactive arthritis." Arthritis Rheum **34**(9): 1151-7.
- Vos, K., A. M. Miltenburg, et al. (2000). "Cellular immune response to human cartilage glycoprotein-39 (HC gp-39)-derived peptides in rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions." Rheumatology (Oxford) **39**(12): 1326-31.

- Vos, K., P. Steenbakkers, et al. (2000). "Raised human cartilage glycoprotein-39 plasma levels in patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions." Ann Rheum Dis **59**(7): 544-8.
- Waldrop, S. L., C. J. Pitcher, et al. (1997). "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 **99**(7): 1739-50.
- Wildner, G. and S. R. Thuruau (1994). "Cross-reactivity between an HLA-B27-derived peptide and a retinal autoantigen peptide: a clue to major histocompatibility complex association with autoimmune disease." Eur J Immunol **24**(11): 2579-85.
- Wilkinson, N. Z., G. H. Kingsley, et al. (1999). "The detection of DNA from a range of bacterial species in the joints of patients with a variety of arthritides using a nested, broad-range polymerase chain reaction." Rheumatology (Oxford) **38**(3): 260-6.
- Wilkinson, N. Z., G. H. Kingsley, et al. (1998). "Lack of correlation between the detection of Chlamydia trachomatis DNA in synovial fluid from patients with a range of rheumatic diseases and the presence of an antichlamydial immune response." Arthritis Rheum **41**(5): 845-54.
- Yang, X., J. Gartner, et al. (1999). "IL-10 gene knockout mice show enhanced Th1-like protective immunity and absent granuloma formation following Chlamydia trachomatis lung infection." J Immunol **162**(2): 1010-7.
- Yin, Z., J. Braun, et al. (1997). "Crucial role of interleukin-10/interleukin-12 balance in the regulation of the type 2 T helper cytokine response in reactive arthritis." Arthritis Rheum **40**(10): 1788-97.
- Yin, Z., S. Siegert, et al. (1999). "The elevated ratio of interferon gamma-/interleukin-4-positive T cells found in synovial fluid and synovial membrane of rheumatoid arthritis patients can be changed by interleukin-4 but not by interleukin-10 or transforming growth factor beta." Rheumatology (Oxford) **38**(11): 1058-67.
- Zhang, Y., C. Gripenberg-Lerche, et al. (1996). "Antibiotic prophylaxis and treatment of reactive arthritis. Lessons from an animal model." Arthritis Rheum **39**(7): 1238-43.

Zou, J., M. Rudwaleit, et al. (2002). "T cell response to human HSP60 and yersinia 19 kDa in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis: no evidence for a causal role of these antigens in the pathogenesis." Ann Rheum Dis **61**(5): 473-4.

Eigene Publikationen

1. Lanowska, M., P. Wu, M. Grolms, A. Thiel, M. Rudwaleit, A. Radbruch, J. Sieper (2001): „Identification of chlamydial immunodominant T-cell epitope in patients with the chlamydia-induced reactive arthritis.“ Arthritis Rheum **44** (9, Suppl.): S264 (Abstract)
2. Thiel, A., P. Wu, M. Lanowska, M. Rudwaleit, A. Radbruch, J. Sieper (2001): „Characterization of a yersinia (yers)-Hsp60 derived peptide-specific CD4+ T-cell line from a patient with yersinia-induced reactive arthritis.“ Arthritis Rheum **44** (9, Suppl.): S150 (Abstract)

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der Affinitätsmatrix-Technologie (1): T-Zellen aus Vollblut oder Synovialflüssigkeit werden mit spezifischem Antigen zunächst über 10 Stunden in vitro stimuliert. Dann werden die Zellen mit einem bispezifischen Antikörper (Anti-CD45-anti-IFN γ) markiert. Das nach Stimulation von spezifisch aktivierten T-Zellen sezernierte IFN γ wird durch diesen an der Zelloberfläche verankerten Doppelantikörper auf der Zelloberfläche gebunden.	46
Abbildung 2: Prinzip der Affinitätsmatrix-Technologie (2): Das an der Oberfläche durch den bispezifischen Antikörper verankerte IFN γ wird durch einen zweiten PE-gekoppelten Anti-IFN γ -Antikörper markiert und kann somit durchflußzytometrisch analysiert werden.	47
Abbildung 3: Prinzip der Affinitätsmatrix-Technologie (3): Durch die Hinzugabe eines Anti-PE-Antikörpers, an den magnetische „Microbeads“ gekoppelt sind, können die IFN γ -positiven CD4-positiven T-Zellen mit der magnetischen Zellsortierung (MACS) isoliert und später durchflußzytometrisch analysiert werden.	50
Abbildung 4: Prinzip der Oberflächenfärbung und der intrazellulären Zytokinfärbung sowie der durchflußzytometrischen (FACS-) Analyse der gefärbten Zellen. (A): Schematische Darstellung der Oberflächen- und der intrazellulären Zytokinfärbung am Beispiel einer CD69+/IFN γ +CD4-T-Zelle. (B): In der FACS-Analyse wird im Vorwärts-(FVS-)/Seitwärts-(SSC-)-Streulichtdiagramm die Population der mononukleären Zellen im untersuchten Zellansatz als Region 1 eingegrenzt. (C): In der Region 2 werden die CD4+Zellen, die gleichzeitig in der Region 1 liegen, eingegrenzt. (D): Die interessierenden Zellen (sowohl in der Region 1 als auch in der Region 2 liegend) werden auf ihre CD69-Positivität (Marker der Aktivierung der Zellen) und auf ihre IFN γ -Positivität hin untersucht. Die doppeltpositiven Zellen sind die durch das für die Stimulation verwendete Antigen spezifisch aktivierten T-Zellen.	55
Abbildung 5: Frequenzen der IFN γ +CD69+CD4- und der TNF α +CD69+CD4-T-Zellen nach der Stimulation der Synovialflüssigkeit (Patient 2) mit chlamydialen Antigenen	59
Abbildung 6: Frequenzen der IFN γ +CD69+/CD4- und der TNF α +CD69+/CD4-Zellen in der Synovialflüssigkeit bzw. im peripheren Blut von Patienten mit Chlamydien-induzierter ReA nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen. In den Balkendiagrammen werden die mittleren Zellfrequenzen in der Synovialflüssigkeit und im peripheren Blut dargestellt. Die Tabellen zeigen die bei den einzelnen Patienten nach der Antigenstimulation gemessenen Frequenzen.....	61
Abbildung 7: Frequenzen der durch die Affinitätsmatrix detektierten Ch.t. Momp-spezifischen IFN γ -sezernierenden CD4+ und CD4-Zellen (vor der Anreicherung (vor MACS)).....	62
Abbildung 8: Frequenzen der Ch.t. Momp-spezifischen IFN γ -sezernierenden CD4+ und CD4-Zellen nach Anreicherung (nach Anreicherung (nach 2.MACS))	63
Abbildung 9: Frequenzen der IFN-sezernierenden CD4+ und CD4-Zellen vor und nach der Anreicherung (vor und nach MACS) bei Patient 3	64
Abbildung 10: Frequenzen der IFN γ +CD69+/CD4-T-Zellen an den expandierten antigenspezifischen T-Zellen nach Restimulation mit Fragment 1-3 von Ch.t. Momp sowie mit Y.e. 19kD.....	65
Abbildung 11: Frequenzen der IFN γ +CD69+/CD4-Zellen an den expandierten Zellen nach Restimulation mit den Fragmenten 1, 2 und 3 von Ch. Momp und mit Y.e. 19kD (Negativkontrolle) bei Patient 3. Die für die Restimulation eingesetzten APCs wurden mit CFDA-SE markiert und liegen jenseits des Analysefensters (Region 2, obere Abbildung). Es werden nur die in der Region 2 liegenden unmarkierten Zellen auf die Zytokinproduktion nach Antigenstimulation untersucht. 66	66
Abbildung 12: Frequenzen der IFN γ +CD69+/CD4-Zellen an den expandierten Zellen nach Restimulation mit den aus dem Ch.t. Momp F3 stammenden Peptidpools bei Patient 2. Dargestellt werden die Pools 7, 10 und 11, bei denen sich eine positive Reaktion zeigte, sowie Pool 1, der die Negativkontrolle darstellt.	68
Abbildung 13: Frequenzen der IFN γ +CD69+/CD4-Zellen an den expandierten antigenspezifischen T-Zellen nach Restimulation mit den zu Pools zusammengefaßten Peptiden aus dem Fragment 3 von Ch.t. Momp. Dargestellt sind die reaktiven Pools 7, 10 und 11 sowie der als Negativkontrolle dienender Pool 1.....	68

- Abbildung 14:** Frequenzen der $\text{IFN}\gamma^+/\text{CD69}^+/\text{CD4}^+$ -Zellen an den expandierten Zellen nach Stimulation mit den antigen wirkenden Peptiden sowie mit einem Kontrollpeptid bei den Patienten 1 bis 3. Die Patienten gehören zu verschiedenen HLA-DRB-Typen..... 69
- Abbildung 15:** Die Zellen der $\text{IFN}\gamma^+$ -Zelllinie von Patient 2 wurden nach 4 Wochen mit Ch.t. Momp F3 unter Zugabe von bestrahlten autologen APCs restimuliert (Ansatz 1 im Text). Nach einer Kurzzeit-Stimulation zeigte sich eine erhaltene hohe Spezifität der Zellen für Ch.t. Momp F3 sowie für die als Antigene identifizierten Peptide. 71
- Abbildung 16:** Die Zellen der $\text{IFN}\gamma^+$ -Zelllinie von Patient 2 wurden nach 4 Wochen mit dem unspezifischen Mitogen PHA unter Zugabe von bestrahlten allogenen APCs restimuliert (Ansatz 2 im Text). Die Spezifität der Zelllinie konnte hierbei im Gegensatz zu Ansatz 1 nicht erhalten werden. Nach einer Kurzzeit-Stimulation mit Ch.t. Momp F3 und mit den als Antigene identifizierten Peptiden zeigte sich keine Erhöhung der $\text{IFN}\gamma$ -Produktion im Vergleich zu der Negativkontrolle. 72
- Abbildung 17:** Frequenzen der $\text{IFN}\gamma^+/\text{CD69}^+/\text{CD4}^+$ - und der $\text{TNF}\alpha^+/\text{CD69}^+/\text{CD4}^+$ -Zellen in der Synovialflüssigkeit bzw. im peripheren Blut von Patienten mit Yersinien-induzierter ReA nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen. In den Balkendiagrammen werden die mittleren Zellfrequenzen in der Synovialflüssigkeit und im peripheren Blut dargestellt. Die Tabellen zeigen die bei den einzelnen Patienten nach der Antigenstimulation gemessenen Frequenzen..... 75
- Abbildung 18:** Frequenzen der durch die Affinitätsmatrix detektierten Y.e. Hsp-spezifischen $\text{IFN}\gamma$ -sezernierenden CD4^+ - und CD4^- -Zellen (vor MACS). 76
- Abbildung 19:** Frequenzen der Y.e. Hsp-spezifischen $\text{IFN}\gamma$ -sezernierenden CD4^+ - und CD4^- -Zellen nach Anreicherung (nach 2. MACS)..... 77
- Abbildung 20:** Frequenzen von $\text{IFN}\gamma^+/\text{CD4}^+$ -Zellen an den expandierten antigenspezifischen Zellen von Patient 1 nach Restimulation mit Hsp von Yersinien (Y.e. Hsp), chlamydialen Hsp (Ch. Hsp), humanem Hsp (h Hsp), sowie mit den drei Fragmenten von Y.e. Hsp (F1-3). 78
- Abbildung 21:** Frequenzen von $\text{IFN}\gamma^+/\text{CD4}^+$ -Zellen an den expandierten antigenspezifischen Zellen von Patient 1 nach Restimulation mit Hsp von Yersinien (Y.e. Hsp), chlamydialen Hsp (Ch. Hsp), humanem Hsp (h Hsp), sowie mit den drei Fragmenten von Y.e. Hsp (F1-3). 79
- Abbildung 22:** Frequenzen der $\text{IFN}\gamma^+/\text{CD69}^+/\text{CD4}^+$ -Zellen an den expandierten antigenspezifischen Zellen von Patient 1 nach Restimulation mit den zu Peptidpools zusammengefaßten Peptiden aus dem Fragment 1 von Y.e. Hsp. Dargestellt sind die reaktiven Pools 4 und 12, sowie das in beiden Pools enthaltene Peptid 24. Pool 1 dient als Negativkontrolle. 81
- Abbildung 23:** Frequenzen der $\text{IFN}\gamma^+/\text{CD69}^+/\text{CD4}^+$ -Zellen an den expandierten antigenspezifischen Zellen von Patient 2 nach Restimulation mit den zu Peptidpools zusammengefaßten Peptiden aus dem Fragment 1 von Y.e. Hsp. Dargestellt sind die reaktiven Pools 1, 8 und 9. In Pool 1 und 8 ist das Peptid 2 enthalten, Pool 1 und 9 haben das Peptid 3 gemeinsam; diese beiden Peptide waren ebenfalls stark reaktiv. Pool 1 und das Peptid 31 dienen als Negativkontrolle. 81
- Abbildung 24:** Darstellung des Anteils von $\text{CD69}^+/\text{CD8}^+/\text{IFN}\gamma$ -produzierenden Zellen nach der Stimulation der PBMCs von Patienten mit ankylosierender Spondylitis mit bakteriellen Peptiden sowie bei der Negativkontrolle (ohne Antigen (AG)). In den oberen Diagrammen werden die Frequenzen von $\text{CD69}^+/\text{CD8}^+/\text{IFN}\gamma^+$ -Zellen nach der Stimulation mit rekombinanten Yersinien-Peptiden bei insgesamt 9 Patienten dargestellt (Y.e. Hsp p1 bis p7 sind die von Y.e. Hsp 60kD-Protein stammenden Nonamer-Peptide mit HLA-B27-Bindungsmotiven; Y.e. 19kD p1 bis p4 sind Nonamere mit HLA-B27-Bindungsmotiven aus dem Y.e. 19kD-Protein). Die unteren Diagramme zeigen die Frequenzen von $\text{CD69}^+/\text{CD8}^+/\text{IFN}\gamma^+$ -Zellen nach Stimulation mit rekombinanten Chlamydien-Nonamer-Peptiden mit HLA-B27-Bindungsmotiven (Ch.t. Hsp p1 bis p16 sind Nonamer-Peptide aus dem Ch.t. Hsp 60kD-Protein, Ch.t. Momp p1 bis p7 aus dem Ch.t. Momp-Protein). Dargestellt sind die 95%-Konfidenzintervalle um den Mittelwert der Frequenzen der $\text{CD69}^+/\text{CD8}^+/\text{IFN}\gamma^+$ -Zellen. Die untersuchten Peptide haben nicht zu einer Erhöhung der $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion geführt. 84
- Abbildung 25:** Darstellung des Anteils von $\text{CD69}^+/\text{CD8}^+/\text{IFN}\gamma$ -produzierenden Zellen nach der Stimulation des peripheren Blutes und der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis mit HC gp-39 sowie bei der Negativkontrolle (ohne Antigen). Dargestellt sind die 95%-Konfidenzintervalle um den Mittelwert der Frequenzen der $\text{CD69}^+/\text{CD8}^+/\text{IFN}\gamma^+$ -Zellen. Die Stimulation mit HC gp-39 hat weder beim peripheren Blut noch bei der Synovialflüssigkeit zu einer Erhöhung der $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion im Vergleich zur Negativkontrolle geführt. 86

- Abbildung 26:** Darstellung der prozentualen Anteile der IFN γ -sezernierenden Zellen nach der Stimulation mit HC gp-39 im Vergleich zu der Negativkontrolle vor der Anreicherung (vor MACS, linkes Diagramm) und nach der Anreicherung durch die Technologie der zellulären Affinitätsmatrix (nach MACS, rechtes Diagramm). Es zeigt sich keine Erhöhung der IFN γ -Produktion nach der Stimulation mit HC gp-39 im Vergleich zu der Negativkontrolle. 88
- Abbildung 27:** Darstellung der prozentualen Anteile der IFN γ -sezernierenden Zellen nach der Stimulation mit HC gp-39 im Vergleich zu der Negativkontrolle vor der Anreicherung (vor MACS, linkes Diagramm) und nach der Anreicherung durch die Technologie der zellulären Affinitätsmatrix (nach MACS, rechtes Diagramm). Es werden die CD4 $^{+}$ - und die CD4 $^{-}$ -IFN γ -Produzenten separat dargestellt. Die Anteile der CD4 $^{+}$ - bzw. der CD4 $^{-}$ -Zellen an den IFN γ -sezernierenden Zellen nach Antigenstimulation mit HC gp-39 unterscheiden sich weder vor noch nach der Anreicherung von den entsprechenden Werten der Negativkontrolle ($p > 0,05$). 89
- Abbildung 28:** Darstellung der prozentualen Anteile der IFN γ -sezernierenden Zellen bei Patienten mit intensiv behandelter rheumatoider Arthritis sowie mit unbehandelter rheumatoider Arthritis. Dargestellt sind die Frequenzen der IFN γ -produzierenden Zellen vor der Anreicherung (vor MACS, linkes Diagramm) und nach der Anreicherung (nach MACS, rechtes Diagramm). Sowohl vor der Anreicherung als auch nach der Anreicherung ist der Anteil der IFN γ^{+} - Zellen bei Patienten mit unbehandelter rheumatoider Arthritis höher als bei Patienten mit behandelter rheumatoider Arthritis ($p = 0,05$). 90

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika der Patienten mit chlamydien-assoziiertes reaktiver Arthritis.....	30
Tabelle 2: Charakteristika der Patienten mit yersinien-assoziiertes reaktiver Arthritis.....	30
Tabelle 3: Epidemiologische Charakteristika der Patienten mit ankylosierender Spondylitis, bei denen Kurzzeitstimulationen durchgeführt wurden. In der Gruppe 1 wurde das periphere Blut der Patienten mit Yersinien-Peptiden, in der Gruppe 2 mit Chlamydien-Peptiden stimuliert.	31
Tabelle 4: Epidemiologische Charakteristika der Patienten mit rheumatoider Arthritis. Bei Patienten der Gruppe 1 wurde peripheres Blut als Material verwendet, wobei in der Gruppe 1a Kurzzeit-Stimulationen und in der Gruppe 1b eine Anreicherung der Zellen mit Hilfe der Technologie der zellulären Affinitätsmatrix durchgeführt wurden. Bei Patienten der Gruppe 2 wurde Synovialflüssigkeit als Material für Kurzzeit-Stimulationen verwendet.....	33
Tabelle 5: Charakterisierung der bei Patienten mit ankylosierender Spondylitis getesteten Peptide. .	40
Tabelle 6: Die 43 Peptide aus Fragment 3 von Ch.t. Momp wurden zu 14 Pools so zusammengefaßt, daß anhand der Reaktivität der Pools die als Antigen wirkenden Peptide identifiziert werden konnten.	67
Tabelle 7: Charakterisierung der antigenen Peptide, die aus dem Ch.t. Momp F3-Protein identifiziert wurden. Die überlappende Aminosäuresequenz der beiden Peptide ist fett markiert.	70
Tabelle 8: Die 36 Peptide aus Fragment 1 von Y.e. Hsp wurden zu 12 Pools so zusammengefaßt, daß anhand der Reaktivität der Pools die als Antigen wirkenden Peptide identifiziert werden konnten.	79
Tabelle 9: Charakterisierung der antigenen Peptide, die aus dem Y.e. Hsp F1-Protein identifiziert wurden. Die überlappende Aminosäuresequenz der Peptide 2 und 3, die bei Patient 2 als Antigene identifiziert wurden, ist fett markiert.	82

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Campus Benjamin Franklin der Charité Berlin in der Medizinischen Klinik I, Gastroenterologie, Infektiologie, Rheumatologie (Direktor: Prof. Dr. med. M. Zeitz) unter Anleitung von Prof. Dr. med. J. Sieper, Abteilung für Rheumatologie, durchgeführt.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. M. Zeitz, dem Leiter der Medizinischen Klinik I und meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. J. Sieper für die Überlassung des Themas dieser Promotionsarbeit und die Möglichkeit der Durchführung meiner Experimente in der Medizinischen Klinik I des Klinikums Benjamin Franklin. Für die Betreuung der Arbeit, die uneingeschränkte Unterstützung während der Erstellung und bei auftretenden Problemen, sowie für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe mitarbeiten zu können, zahlreiche Methoden zu erlernen und anzuwenden, sowie Einblicke in wissenschaftliches Arbeiten zu erlangen, gebührt Herrn Professor Dr. Sieper mein Dank. Seine freundliche und geduldige Unterstützung in allen Fragen hat ein angenehmes Arbeitsklima geschaffen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Peihua Wu und Frau Martina Grolms sowie Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang Kuon für die freundschaftliche Aufnahme im Labor und die Einarbeitung in das Gebiet der experimentellen Rheumatologie sowie für ihre ausgezeichnete und intensive Betreuung sowohl während der experimentellen Phase als auch während der schriftlichen Verfassung der Arbeit. Sie standen mir zu jeder Zeit unermüdlich mit Rat und Tat zur Seite.

Meinen Eltern und meiner Schwester Katharina gilt mein allergrößter Dank für die kontinuierliche Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung. Sie gaben mir in allen Situationen Rückhalt und ich konnte mich immer auf sie verlassen.

Meinem Freund, Dr. Andreas Jansen danke ich für seine Unterstützung in der Phase der schriftlichen Zusammenfassung der Ergebnisse sowie für seine Ratschläge zur Vorbereitung meiner Disputation.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.