

## 2. Ergebnisse und Diskussion

### 2.1. Immunologische Untersuchungen zur Pathogenese der Ankylosierenden Spondylitis und anderer HLA-B27 assoziierter Erkrankungen

#### 2.1.1. T-Zell Antigene bei der Reaktiven Arthritis

Da 20-40% der HLA-B27-positiven Patienten mit einer ReA in das Vollbild einer ankylosierenden Spondylitis übergehen (Leirisalo-Repo 1998), könnte ein Bakterien-abgeleitetes HLA-B27-restringiertes Peptid über Kreuzreaktivität eine Autoimmunantwort gegen eine HLA-B27-restringiertes Selbstpeptid induzieren und so entscheidend zur Immunpathologie bei einem Teil der oder bei allen Patienten mit Ankylosierender Spondylitis beitragen (Sieper et al. 1995, Sieper et al. 1996, Sieper et al. 2000).

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde von uns eine biochemische Charakterisierung von Zielantigenen aus *Yersinia enterocolitica* mittels biochemischer Präparation von löslichen Antigenen, die in Stimulationsassays getestet wurden (Mertz et al. 1991, Mertz et al. 1994, Mertz 1998, Appel et al. 1999, siehe Seite 22; Appel et al. 2002, siehe Seite 20) vorgenommen. Hierbei habe ich in Zusammenarbeit mit A.Mertz mehrere immundominante Proteine aus *Yersinia enterocolitica* charakterisiert und bezüglich ihrer Immunogenität untersucht. Die  $\beta$ -Untereinheit des Urease-Komplexes mit einer Größe von 19kD erwies sich als bedeutsam für eine humorale Immunantwort aber auch für eine zelluläre Immunantwort durch CD4-positive T-Zellen (Mertz et al. 1994, Appel et al. 1999, siehe Seite 22). Weitere immundominante Proteine wurden durch biochemische Separationsschritte gewonnen (Appel 1997 (Promotion)), sequenziert, charakterisiert und als rekombinante Proteine hergestellt. Neben dem 19kD Protein war es das Heat-Shock Protein 60 (hsp60), das bei Patienten eine starke Proliferation von CD4-positiven Zellen auslöste. Ein ribosomales 32kDa Protein und ein basisches Membranprotein mit DNA-bindenden Eigenschaften (OMP H-18kDa) lösten eine schwächere zelluläre Immunantwort aus (Mertz et al. 1998). Auf der Peptidebene wurde ein einzelnes promiskuides Peptid (bezüglich HLA-Klasse-II-Präsentation)

innerhalb des Yersinien-Hsp60 identifiziert (AS-Sequenz 322-333), welches eine starke zelluläre Immunantwort auslöste (Mertz et al. 2000).

Unter Verwendung von T-Zellklonen konnte gezeigt werden, dass zytotoxische CD8-positive T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit *Yersinien*-induzierter ReA in der Lage waren, Yersinienproteine in HLA-B27-restringierter Form zu erkennen (Hermann et al. 1993). Gleiches gelang unserer Arbeitsgruppe in einem HLA-B27 transgenen Mausmodell, in dem CD8+ zytotoxische T-Zellen *Chlamydia trachomatis* Antigene in HLA-B27-restringierter Form erkannten (Kuon et al. 1997). Yersinien-spezifische HLA-B27-restringierte CD8-positive T-Zelllinien aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit *Yersinien*-induzierter ReA erkannten ein Nonapeptid aus dem Yersinien-spezifischen hsp60 (AS-Sequenz 321-329) als immundominant (Ugrinovic et al. 1997), das fast identisch war mit einem von uns bestimmten CD4-Epitop (Mertz et al. 2000).

Auf Peptidebene haben wir zunächst im Mausmodell mit HLA-B27-transgenen Tieren bestimmte HLA-B27 restringierte immunogene Chlamydien-spezifische Peptide aus dem Gesamtproteom von *Chlamydia trachomatis* identifizieren können (Kuon et al. 2001, siehe Seite 30). Hierbei kam erstmals die von mir etablierte HLA-B27 Tetramertechnologie zum Einsatz. In dieser Studie wurde auch eine sehr interessante Methode vorgestellt, um arthritogene Peptide zu identifizieren, die HLA-B27 restringiert sind und CD8+ T-Zellen stimulieren können. Dafür wurden zwei Computer-Algorithmen eingesetzt: einer zur Vorhersage von Peptiden, die ausreichend gut an HLA-B27 binden und ein zweiter zur Vorhersage der Spaltung und Verdauung von Proteinen bzw. Peptiden in Proteosomen des Zytosols zu Nonamerpeptiden, die dann an HLA-B27 binden können. Bei Patienten mit Chlamydien-getriggelter Reaktiver Arthritis konnte ich in Zusammenarbeit mit W.Kuon in der Tat auch Chlamydien-Peptid-spezifische CD8+ T-Zellen in der Synovialflüssigkeit entzündeter Gelenke nachweisen (Kuon et al. 2001, siehe Seite 30; Appel et al. 2004b, siehe Seite 74).

Ogleich es uns mit diesen verschiedenen Arbeiten methodisch gelungen ist, HLA-B27 restringierte Bakterien-spezifische T-Zellen bei Patienten mit Reaktiver Arthritis zu identifizieren, hat dies keinen Durchbruch in der Identifizierung möglicher pathogener Autoantigene erbracht. Möglicherweise spielen hier bisher nicht definierte Mechanismen der Kreuz-Antigenität eine Rolle.

Bakterielle Antigene von Reaktive Arthritis triggernden Erregern konnten in der Synovialmembran von solchen Patienten nachgewiesen werden (Granfors et al. 1989). Dies hat auf der Grundlage der Analyse von synovialen T-Zellen zu der Hypothese geführt, dass persistierende Bakterien die lokale Immunantwort in der Synovialmembran triggern und Zytokine wie IL-10 oder TGF- $\beta$  die Persistenz dieser Erreger fördern (Yin et al. 1997, Braun et al. 1999). Ich habe bei Patienten mit Reaktiver Arthritis und Rheumatoider Arthritis vergleichende Untersuchungen bezüglich des Zytokinsekretionsprofils von T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen in der Synovialmembran mithilfe Immunfluoreszenz-mikroskopischer Untersuchungen durchgeführt. Bei Patienten mit Reaktiver Arthritis konnten wir eine signifikant höhere Sekretion von IL-10 in CD3+ T-Zellen nachweisen, ebenso eine erhöhte Sekretion von TGF- $\beta$  in CD3+ T-Zellen und Makrophagen. Die Frequenz von TNF-alpha produzierenden CD3+-T-Zellen und Makrophagen war bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis höher. Diese Befund deutet auf ein Zytokinmilieu in der Synovialmembran von Reaktive Arthritis Patienten hin, die eine Persistenz solcher triggernder Erreger erlaubt (Appel et al. 2004a).

#### **Eigene Referenzen:**

**Appel H** Untersuchungen zur zellulären und humoralen Immunantwort auf das 19kD Protein von *Yersinia enterocolitica* O:3 bei Patienten mit Yersinien-getriggerte Reaktiver Arthritis. Dissertation, Freie Universität Berlin 1997.

**Appel H**, Mertz A, Distler A, Sieper J, Braun J: The 19kDa protein of *Yersinia enterocolitica* O3 is recognized on the cellular and humoral level by patients with *Yersinia*-induced arthritis. *J Rheumatol* 1999, 26: 1964-1969.

**Appel H**, Rudwaleit M, Wu P, Grolms M, Sieper J, Mertz A: Synovial T cell proliferation to the *Yersinia enterocolitica* 19 kDa antigen differentiates yersinia triggered reactive arthritis (ReA) from ReA triggered by other enterobacteria. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 566-7.

**Appel H**, Neure L, Kuhne M, Braun J, Rudwaleit M, Sieper J: An elevated level of IL-10- and TGF $\beta$ - secreting T cells, B cells and macrophages in the synovial membrane of patients with reactive arthritis compared to rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2004, 23: 435-440. (a)

**Appel H**, Kuon W, Kuhne M, Wu P, Kuhlmann S, Thiel A, Kollnberger S, Bowness P, Sieper J: HLA-B27 restricted, peptide specific CD8+ T cell response and the use of HLA-B27 tetramers in Chlamydia triggered reactive arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: R521-34. (b)

Kuon W, Holzhutter HG, **Appel H**, Grolms M, Kollnberger S, Traeder A, Henklein P, Weiss E, Thiel A, Lauster R, Bowness P, Radbruch A, Kloetzel PM, Sieper J. Identification of HLA-B27-restricted peptides from the *Chlamydia trachomatis* proteome with possible relevance to HLA-B27-associated diseases. *J Immunol* 2001; 167: 4738-46.

Mertz AKH, Daser A, Skurnik M, Wiesmüller KH, Braun J, **Appel H**, Batsford S, Wu P, Distler A, Sieper J: The evolutionarily conserved ribosomal protein L23 and the cationic urease  $\beta$ -

subunit of *Yersinia enterocolitica* O:3 belong to the immunodominant antigens in *Yersinia*-induced reactive arthritis: implications for autoimmunity. *Mol Med* 1994, 1:44-55.

Mertz AKH, Ugrinovic S, Lauster R, Wu P, Böttcher U, **Appel H**, Yin Z, Schiltz E, Batsford S, Schauer-Petrowski C, Braun J, Distler A, Sieper J: *Arthritis Rheum* 1998, 41: 315-326.

### **2.1.2. T-Zell Antigene bei der Ankylosierender Spondylitis**

Aufgrund der zunehmenden Evidenz, dass Knorpelantigene ein mögliches Zielantigen der zellulären Immunantwort bei der AS darstellen (Poole et al. 1998, Bardos et al. 2005, Adarichev et al. 2006), haben wir uns auf die Untersuchung der Antigen-spezifischen T-Zellantwort gegen Knorpelantigene konzentriert. Zunächst konnten wir bei einem grossen Patientenkollektiv von 45 AS Patienten das gesamte Proteom der G1-Domäne des Aggrecans auf T-Zell Antworten screenen und dabei sowohl eine CD4+ als auch eine CD8+ T-Zell Antwort gegen überlappende 18mer Peptide nachweisen (Zou et al. 2003; Zou et al. 2005, siehe Seite 51). Diese Befunde belegen eindrücklich, dass T-Zellen von AS Patienten in der Tat Knorpelantigene erkennen können. Die CD8-Antwort war jedoch nicht HLA-B27 restringiert, weshalb sich die Frage stellt, ob solch eine T-Zell Antwort eine pathogenetische Relevanz hat oder ob sie nur die Exposition von Knorpelantigenen als Folge einer lokalen Entzündungsreaktion gegenüber dem Immunsystem anzeigt. Wir haben im folgenden dann die Untersuchungen auf die T-Zell Antwort gegen die Gesamtheit der extrazellulären Matrixproteine des Knorpels ausgedehnt, um die Experimente nicht wie in früheren Untersuchungen auf ein einzelnes Protein zu begrenzen. Es ist mir in Zusammenarbeit mit P. Atagunduz hier gelungen, nach einem Screening des Proteoms aller bekannten extrazellulären Matrixproteine des humanen Knorpels auf HLA-B27 bindende Nonamerpeptide, zwei immundominante CD8+ T-Zell Epitope aus dem humanen Kollagen II und VI zu identifizieren. Bei vier von sieben Patienten konnten wir synoviale, HLA-B27 restringierte CD8+ T-Zellen gegen das Peptid C34 aus Kollagen VI nachweisen. Eine Patientin mit besonders schwerem Krankheitsverlauf hatte im peripheren Blut CD8+ T-Zellen, die gegen das Peptid C34 und gegen ein Peptid (A41) aus Kollagen II gerichtet waren (Atagunduz et al. 2005, siehe Seite 41; Appel et al. 2005). Hierbei konnte ich durch biochemische Methoden in vitro anhand der gelungenen Auffaltung von rekombinantem HLA-B27

im Beisein von C34 darlegen, dass dieses Peptid in der Tat von HLA-B27 gebunden wird.

In HLA-B27 transgenen BALB/c Mäusen konnten wir darüber hinaus ein Selbstpeptid aus dem Aggrekan als immunogen identifizieren, welches eine Tendovaginitis in diesen Tieren verursachte (Kuon et al. 2004, siehe Seite 60). Hierbei habe ich Untersuchungen mit HLA-B27 Tetrameren durchgeführt (siehe unten), die die mögliche pathogenetische Relevanz dieses Peptides unterstreichen konnte.

Diese erste systematische Untersuchung nach T-Zell Antworten gegen Strukturen aus extrazellulären Matrixproteinen bei AS Patienten konnte sowohl HLA-B27 restringierte als auch HLA-B27 unabhängige Epitope identifizieren. Insbesondere die HLA-B27 restringierten Peptide C34 und A41 sind hier von besonderem Interesse. Inwieweit diese eine pathogenetische Relevanz haben, muss durch zukünftige Untersuchungen wie zum Beispiel die in situ Detektion von Antigen-spezifischen T-Zellen durch HLA-B27 Tetramere oder die Präparation und Kultivierung solcher Zellen aus dem subchondralen Knochenmark entzündeter Gelenke gezeigt werden.

#### **Eigene Referenzen:**

**Appel H**, Atagunduz P, Sieper J: Reply to: A cartilage-derived self peptide presented by HLA-B27 molecules? Comment on the article by Atagunduz et al. by - Ziegler A, Loll B, Biesiadka J, Saenger W, Kellermann T, Misselwitz R, Uchanska-Ziegler B. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 2581-2; author reply 2582-3.

Atagunduz P, **Appel H**, Kuon W, Wu P, Thiel A, Sieper J: CD8+ T cell response to self-peptides in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 892-901.

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

Zou J, **Appel H**, Rudwaleit M, Thiel A, Sieper J: Analysis of the CD8+ T cell response to the G1 domain of aggrecan in spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 722-9. Epub 2004 Nov 11

## **2.2. Methoden zur Detektion von Antigen-spezifischen CD4+- und CD8+ T-Zell-Antworten unter besonderer Berücksichtigung von MHC Klasse I und II Tetrameren**

Entscheidende Fortschritte in immunologischen Untersuchungstechniken der letzten 5-10 Jahre erlauben es uns heute, die Frage nach HLA-B27-restringierten CD8-T-Zell Epitopen aber auch nach anderen MHC Klasse I oder II restringierten T-Zellen erfolversprechend anzugehen. Mithilfe der durchflusszytometrischen Quantifizierung intrazellulärer Zytokine, wie dem IFN $\gamma$  nach Antigen-spezifischer in vitro Stimulation von T-Zellen, ist es möglich, (i) eine größere Menge von potentiellen T-Zellantigenen zu screenen und (ii) eine Abschätzung der Antigen-spezifischen T-Zellfrequenz ex vivo zu erreichen (Kern et al. 1998). Diese Analyse ist sowohl für CD4-positive als auch CD8-positive T-Zellen möglich. Dafür ist eine Dreifachfärbung mit anti-CD69 (CD69 = früher T-Zellaktivierungsmarker), anti-IFN $\gamma$ -Antikörpern und anti-CD4- oder anti-CD8-Antikörpern notwendig. Es folgt dann ein sogenanntes "Gating" auf CD4-positive (Waldrop et al. 1997) oder CD8-positive T-Zellen (Kern et al. 1998) und die Anzahl der CD69/IFN $\gamma$  doppelt-positiven Zellen wird als Parameter für die Anzahl der Antigen-spezifischen T-Zellen gewertet.

Der Nachteil dieser Untersuchung liegt aber darin, dass die analysierten T-Zellen danach zu weiteren Analysen und Langzeitkulturen nicht mehr eingesetzt werden können, da es sich um fixierte Zellen handelt. Die hier beschriebene Methode konnte durch die sogenannte Zelloberflächen-Affinitätsmatrix-Technologie verfeinert werden, mit der T-Zellen entsprechend ihres Zytokinsekretionsmusters separiert und weiter kultiviert werden können (Brosterhus et al. 1999). Der entscheidende Nachteil der letzteren Methode liegt jedoch darin, dass T-Zellen nur nach vorausgegangener Stimulation aufgetrennt werden können, und dass über die Auswahl des sezernierten Zytokins (IFN $\gamma$ ) bereits eine Vorauswahl getroffen wird.

Um diese Nachteile zu umgehen, habe ich in unserer Arbeitsgruppe die HLA-B27 Tetramertechnologie zur Identifizierung und Untersuchung von Antigen-spezifischen T-Zellen etabliert. Hierbei werden Antigen-spezifische HLA-B27 restringierte T-Zellen durch rekombinante multimerisierte HLA-B27/Peptid Komplexe detektiert. Nachdem einige Jahre zuvor die ersten Arbeiten zur Generierung von löslichen MHC Klasse I-Molekülen (Garboczi et al. 1992) und MHC Klasse II-Molekülen (Stern et al. 1994) vorgestellt worden waren, gelang es Altman und Davis 1996 mithilfe der

Tetramerisierung eines HLA-A2/Peptid-Komplexes erste Antigen-spezifische T-Zell Färbungen vorzunehmen (Altman et al. 1996). Hierbei gelang es, durch die Multimerisierung dieses MHC/Peptid-Komplexes die physiologisch niedrige Affinität zwischen T-Zell-Rezeptor und einem einzelnen MHC/Peptid-Komplex (Matsui et al. 1991, Corr et al. 1994; Appel et al. 2000, siehe Seite 123) durch multiple (vier) Bindungsstellen zu überwinden. Mithilfe von MHC Klasse I-Tetrameren konnten inzwischen zahlreiche Arbeiten zur Physiologie, Funktion und Frequenz von CD8-positiven T-Zellen vor allem bei viralen Entzündungen vorgestellt werden (u.a. Murali-Krishna et al. 1998, Sourdive et al. 1998, Bieganoska et al. 1999, Gray et al. 1999; Day et al. 2003, siehe Seite 98). Die Herstellung von HLA-B27-Tetrameren wurde erstmals von der Arbeitsgruppe um McMichael publiziert (Bowness et al. 1998). Hierbei wurden diese Multimere allerdings nur zur funktionellen Analyse von T-Zell-Rezeptoren eingesetzt.

Für die Etablierung der HLA-B27 Tetramer Technologie bei Patienten mit HLA-B27 assoziierten Erkrankungen habe ich zunächst immundominante virale Peptide für die Auffaltung der in Inklusionskörpern vorliegenden schweren Kette von HLA-B27 und  $\beta$ 2-Mikroglobulin benutzt. Die Technik konnte so gut ausgearbeitet werden, dass die Rate der Proteinauffaltung und die Menge an aufgereinigtem Molekül vergleichbar mit den gut etablierten HLA-A2 Tetrameren war, die ebenfalls mit einem viralen Peptid beladen waren (Appel et al. 2004b, siehe Seite 79). HLA-A2 und HLA-B27 Monomere und Tetramere wurden mittels Gelfiltration und SDS-PAGE biochemisch charakterisiert. Die biologische Funktion beider Moleküle konnte in FACS Analysen von Blutspendern mit vorausgegangener EBV Infektion dokumentiert werden. (Appel et al. 2004b, siehe Seite 79).

Unsere ersten Arbeiten mit HLA-B27 Tetrameren wurden mit einer schweren Kette von HLA-B27 durchgeführt, die in der B-Tasche an der Position 67 eine Mutation des Cysteins zu Serin trägt, da das einzelne Cystein mit einer freien SH-Gruppe zu starker Aggregation von rekombinantem HLA-B27 führt (Madden et al. 1992, Bowness et al. 1998). Wir konnten in unseren Versuchen nachweisen, dass in Abhängigkeit von der Bindungsaffinität des Peptides an HLA-B27 die Peptidpräsentation durch die Mutation verändert und somit die T-Zell Erkennung durch diese rekombinanten Moleküle beeinflusst wird. Dies konnte anhand von Versuchen mit HLA-B27 Tetrameren mit beiden schweren Ketten (Serin an Position 67 oder Cystein an Position 67) von HLA-B27 und Peptiden unterschiedlicher

Affinität in Tetramerfärbungen im FACS dargestellt werden (siehe Abbildung 3) (Appel et al. 2004c, siehe Seite 88). Zudem wurden Dissoziationsversuche mit ILT-2 transfizierten Zellen durchgeführt, die unspezifisch an MHC Klasse I Moleküle binden. Hier konnte bei 37°C nachgewiesen werden, dass die HLA-B27/Peptid-Komplexe mit Serin an Position 67 der schweren Kette wesentlich früher dissoziierten als diejenigen Moleküle mit Cystein an Position 67. Dies zeigt an, dass die durch die Bindung des Peptids in die HLA-B27-Bindungsgrube definierte Stabilität im mutierten Molekül deutlich niedriger ist. In Zusammenarbeit mit Martin Hülsmeier (damals Institut für Kristallographie, FU Berlin) habe ich Homologie-Modellierungen durchgeführt, um diese Beobachtung durch Konformationsmodelle strukturell zu analysieren. Es ist bekannt, dass die Seitenkette der Aminosäure an Position 2 in der Bindungsgrube durch zahlreiche polare Interaktionen gehalten wird. Hierbei zeigte sich, dass das Cystein an Position 67 eine seltene SH- $\pi$  Wasserstoffbindung zulässt, die durch die Mutation zu Serin 67 aufgehoben wird. Dies könnte zur Destabilisierung des HLA-B27/Peptid Komplexes beitragen.

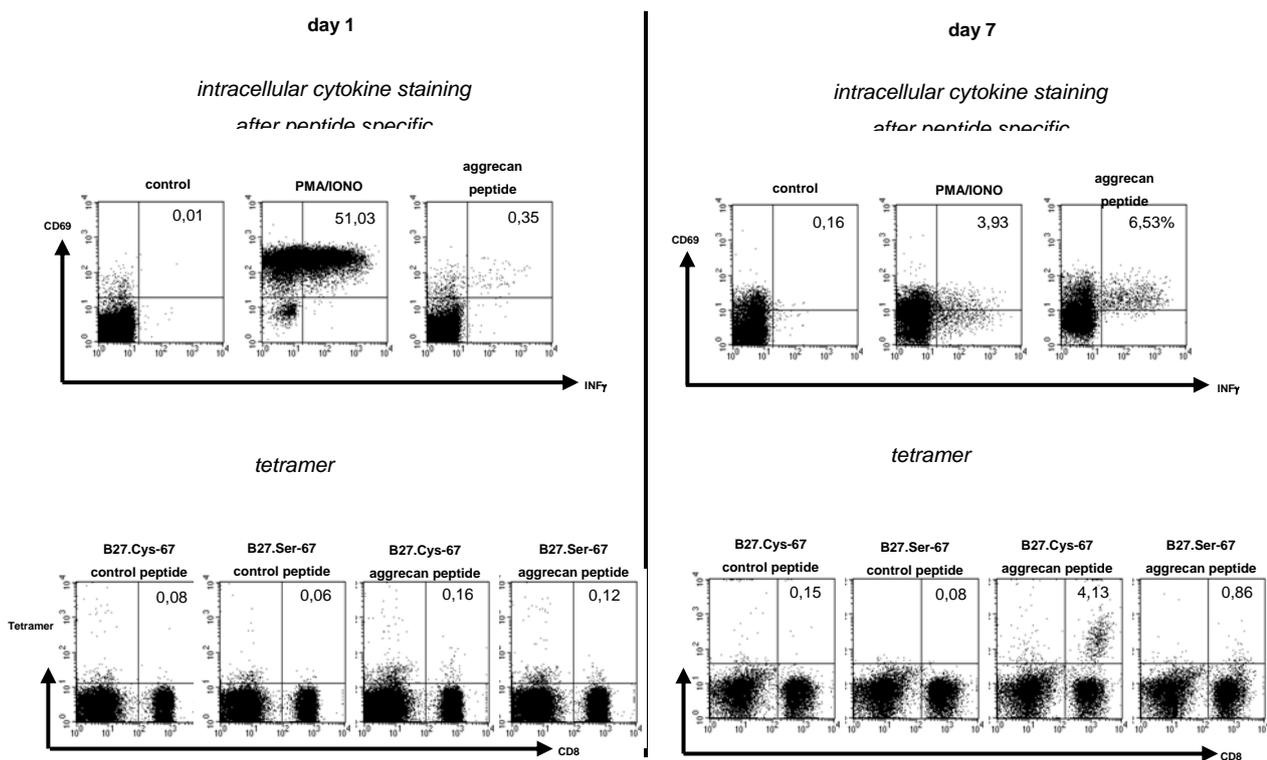


Abbildung 3: HLA-B27/Aggrecanpeptid Tetramer mit Cystein oder Serin an Position 67: das rekombinante Molekül mit Cys-67 verursacht eine Tetramerfärbung, die mit dem Ser-67 kaum detektierbar ist (day 7: rechts unten 4.13% oder 0.86%). (aus Appel et al. J Immunol 2004)

Die erste Arbeit, in der HLA-B27 Tetramere bei Patienten mit HLA-B27 assoziierten Erkrankungen zur Anwendung kam, wurde aus unserer Arbeitsgruppe vorgestellt (Appel et al. 2004b, siehe Seite 74). Hierbei konnten bei Patienten mit Chlamydien-getriggelter Reaktiver Arthritis HLA-B27 restringierte synoviale CD8+ T-Zellen mithilfe dieser Tetramere identifiziert werden. Ich habe dabei insgesamt 9 HLA-B27/Chlamydiapeptid Tetramere mit immundominanten Peptiden (Kuon et al. 2001, siehe Seite 30) herstellen können (Appel et al. 2004b, siehe Seite 74). Diese wurden bei insgesamt 9 Patienten mit Chlamydien-getriggelter Reaktiver Arthritis in der Synovialflüssigkeit und im peripheren Blut zur Identifizierung von HLA-B27-restringierten und Chlamydienpeptid-spezifischen CD8+ T-Zellen eingesetzt. Hierbei konnten bei 4 von 6 HLA-B27+ Patienten die Bindung von synovialen CD8+ T-Zellen an HLA-B27 Tetramere nachgewiesen werden, wobei die Frequenz dieser Tetramer-positiven T-Zellen niedrig (0.02-0.09%) war. Im peripheren Blut lag die Frequenz von Tetramer-positiven CD8+ T-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze. Dies konnten wir dadurch nachweisen, dass wir im Anschluss an eine Stimulation von peripheren CD8+ T-Zellen mit Chlamydia trachomatis infizierten Dendritischen Zellen (DC) bei diesen Patienten Chlamydiapeptid-spezifische CD8+ T-Zellen expandieren und mittels HLA-B27 Tetrameren nachweisen konnten (Appel et al. 2004b, siehe Seite 85).

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Wucherpfennig in Boston habe ich mich mit der Herstellung von rekombinanten MHC Klasse II Molekülen beschäftigt. Die Detektion von MHC Klasse II restringierten, Antigen-spezifischen CD4+ T-Zellen mittels rekombinanter, multimerisierter MHC Klasse II/Peptid Komplexe war dabei wesentlich aufwendiger (Waldrup et al. 1997), da offensichtlich die Bindungsavidität zwischen MHC Klasse II Molekül und T-Zell Rezeptor eine andere ist als bei MHC Klasse I und T-Zell Rezeptor. Ich konnte aber mithilfe dieser rekombinanten MHC Klasse II Moleküle dazu beitragen, Antigen-spezifische CD4+ T-Zellen gegen Selbstantigene zu detektieren, wie z.B. das Myelin-basische Protein, Peptid 85-99 (Appel et al. 2000, siehe Seite 129), I-A(g7)-restringierte Selbstpeptide im Diabetes-Mausmodell (Ferlin et al. 2004, Kooperation mit dem Labor N. Glaichenhaus) aber auch gegen virale Peptide (Hepatitis C) (Day et al. 2003, siehe Seite 98) und Leishmania-Antigene (Malherbe et al. 2000, Kooperation mit dem Labor N. Glaichenhaus).

Vor allem der kombinierte Einsatz von Antigen-spezifischer Zytokinfärbung und Tetramertechnologie bietet völlig neue Perspektiven zur Identifizierung von Antigen-spezifischen T-Zellen:

Der wichtige Vorteil der intrazellulären Zytokinfärbung ist die Möglichkeit, das Screening einer grösseren Anzahl von Kandidatenpeptiden durchzuführen, welche zum Beispiel dem Bindungsmotiv von HLA-B27 entsprechen. Dies wäre mit der Tetramertechnologie aufgrund des erheblichen Aufwandes, die Tetramere herzustellen, nicht möglich.

Folgende Vorteile bietet die Tetramertechnologie im Vergleich zur alleinigen Anwendung der intrazellulären IFN $\gamma$ -Färbung als Parameter für Antigen-spezifische CD4- oder CD8-positive T-Zellen:

(i) Mit den Tetrameren können Antigen-spezifische T-Zellen unabhängig von ihrer Funktion, d.h. auch unabhängig von ihrem Zytokinexpressionsmuster identifiziert werden. Durch Verwendung der intrazellulären Zytokinfärbung könnten wichtige Antigen-spezifische T-Zellen verfehlt bzw. nicht identifiziert werden. Da naive, nicht durch artifizielle Stimulation in ihrer Funktionslage veränderte T-Zellen per Zell-Sorter isoliert werden können, kann die biologische Funktion dieser Zellen bezüglich ihrer Zytokinsekretion untersucht werden.

(ii) Ein weiterer Vorteil der Tetramertechnologie gegenüber der Zytokinfärbung ist, dass die Färbung nach einer 30- bis 60-minütigen Inkubationszeit sofort durchgeführt werden kann. Dahingegen beanspruchen die Zytokinfärbungen eine Versuchsdauer von etwa 6-8 Stunden bevor eine FACS-Analyse durchgeführt werden kann. Falls Peptide von Interesse bereits identifiziert worden sind, ist die Tetramertechnologie besser geeignet für Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Patienten und für Längsschnittuntersuchungen bei den gleichen Patienten. Außerdem kann sich aufgrund des Zeitfaktors unmittelbar nach der Färbung eine Zellsortierung und die Klonierung der separierten T-Zellen anschliessen, falls dies gewünscht wird. Eine Untersuchung eingefrorener mononukleärer Zellen auf ihre Antigen-Spezifität hin ist ebenfalls nur mit der Tetramertechnologie möglich und nicht mit der intrazellulären Zytokinfärbung.

### **Eigene Referenzen:**

**Appel H**, Gauthier L, Pyrdol J, Wucherpfennig KW: Kinetics of T-cell receptor binding by bivalent HLA-DR.Peptid complexes that activate antigen-specific human T-cells. *J Biol Chem* 2000; 275:312-21.

**Appel H**, Kuon W, Kuhne M, Wu P, Kuhlmann S, Thiel A, Kollnberger S, Bowness P, Sieper J: HLA-B27 restricted, peptide specific CD8+ T cell response and the use of HLA-B27 tetramers in Chlamydia triggered reactive arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: R521-34. (b)

**Appel H**, Kuon W, Kuhne M, Köhler D, Kuhlmann S, Kollnberger S, Bowness P, Sieper J: The solvent-inaccessible Cys-67 residue of HLA-B27 contributes to T cell recognition of HLA-B27/peptide complexes. *J Immunol.* 2004; 173: 6564-73. (c)

Day CL, Seth NP, Lucas M, **Appel H**, Gauthier L, Lauer GM, Robbins GK, Szczepiorkowski ZM, Casson DR, Chung RT, Bell S, Harcourt G, Walker BD, Klenerman P, Wucherpfennig KW: Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers. *J Clin Invest.* 2003; 112: 831-42.

Ferlin WG, Mougneau E, Hugues S, **Appel H**, Jang MH, Cazareth J, Beaudoin L, Schricke C, Lehuen A, Wucherpfennig KW, Glaichenhaus N. Self-peptides that bind with low affinity to the diabetes-associated I-A(g7) molecule readily induce T cell tolerance in non-obese diabetic mice. *Eur J Immunol.* 2004; 34: 2656-63.

Kuon W, Holzhutter HG, **Appel H**, Grolms M, Kollnberger S, Traeder A, Henklein P, Weiss E, Thiel A, Lauster R, Bowness P, Radbruch A, Kloetzel PM, Sieper J. Identification of HLA-B27-restricted peptides from the Chlamydia trachomatis proteome with possible relevance to HLA-B27-associated diseases. *J Immunol.* 2001; 167: 4738-46.

Malherbe L, Filippi C, Julia V, Foucras G, Moro M, **Appel H**, Wucherpfennig K, Guery J, Glaichenhaus N: Selective Activation and Expansion of High-Affinity CD4(+) T Cells in Resistant Mice upon Infection with Leishmania major. *Immunity* 2000; 13: 771-782.

## **2.3. Spektrum der Einsatzmöglichkeiten von löslichen rekombinanten MHC Klasse I und II Molekülen**

### **2.3.1. Induktion von Anergie in Antigen-spezifischen T-Zellen mittels MHC Multimeren**

T-Zellen spielen bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle. Transfer-Experimente mit CD4+ T-Zell Klonen oder die Expression von autoreaktiven T-Zell Rezeptoren zeigen, dass diese Zellen eine wichtige Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen (Zamvil S et al. 1990, Goverman et al. 1993, Steinman L 1996). Daher erscheinen Antigen-spezifische T-Zellen eine interessante Zielstruktur für die Entwicklung von Therapiestrategien bei Autoimmunerkrankungen zu sein. Grundsätzlich gibt es zwei denkbare Möglichkeiten, eine Antigen-spezifische T-Zell Toleranz zu induzieren. Zum einen könnte durch eine Überstimulation mit grossen Konzentrationen von löslichem Antigen ein Aktivitäts-induzierter Zelltod („activation-induced cell death“) ausgelöst werden. Hierbei besteht aber das Risiko, dass die Erkrankung sich auch unkontrollierbar verschlechtern kann (Mitchison NA 1968, Critchfield JM et al. 1994). Im Gegensatz dazu führt die partielle Stimulation von T-Zellen ohne Ko-Stimulation zur Anergie-Induktion in T-Zellen (Gimmi et al. 1993). Der Einsatz von MHC-Multimeren erlaubt ebenfalls, eine Antigen-spezifische in vitro-Manipulation von separierten T-Zellen und die Induktion von Anergie, die therapeutisch eingesetzt werden könnte. Aus in vitro Studien mit humanen alloreaktiven T Zell-Klonen ist bekannt, dass T-Zellen anerg werden, wenn sie mit transfizierten Fibroblasten stimuliert werden, die zwar ein MHC Klasse II-Molekül exprimieren, aber keine der kostimulatorischen Faktoren B7-1 oder B7-2 (Gimmi et al. 1993). Diesen Gedanken habe ich bei der Stimulierung von T-Zell-Klonen mit den löslichen DR2/MBP-Molekülen aufgegriffen (2 rekombinante HLA-DR2 Moleküle mit einem immundominantem Peptid aus dem Myelin basischen Protein gekoppelt an ein Fc-Fragment eines IgG Antikörpers, siehe Seite 126) und konnte nachweisen, dass die initiale Aktivierung von T-Zellen mit den löslichen DR2/MBP-IgG-Komplexen ohne Kostimulation mit anti-CD28 in den DR2-restringierten, MBP (85-99)-spezifischen T-Zell-Klonen einen Zustand der Anergie auslöst. Diese anergen Zellen, welche zum einen durch Proliferationsassays mit Thymidinaufnahme und durch eine CFSE

Färbung im FACS nachgewiesen wurden, gingen in Apoptose über, was durch eine CFSE/Annexin V Doppelfärbung nachgewiesen werden konnte (Appel et al. 2001, siehe Seite 112). Ich habe mit diesen Versuchen eine Methode zur Toleranzinduktion bei T-Zellen, die Selbstantigene erkennen, etablieren können.

Dieses Modell der Toleranzinduktion ist prinzipiell auf alle autoreaktiven Erkrankungen, in denen ein immundominantes Antigen und eine MHC Restriktion bekannt ist, übertragbar.

#### **Eigene Referenzen:**

**Appel H**, Shroff N, Gauthier L, Wucherpfennig KW: Anergy induction by dimeric T cell receptor ligands. *J Immunol* 2001; 166: 5279-85.

### **2.3.2. In situ Detektion von Antigen-spezifischen T-Zellen mittels MHC Multimeren**

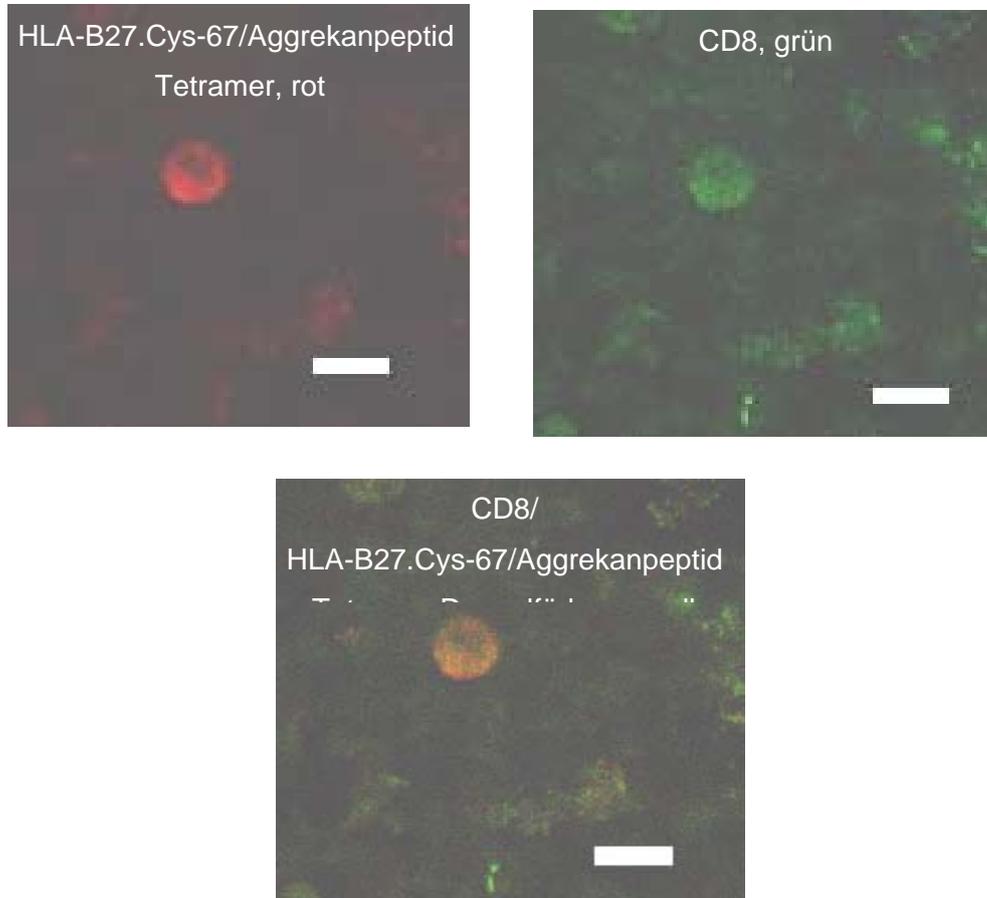
MHC Multimere können auch in histologischen Untersuchungen zur Identifikation von Antigen-spezifischen T-Zellen in situ eingesetzt werden. Es gibt nach wie vor erhebliche Probleme mit dieser Methode, die bisher nur in Ansätzen überwunden werden konnten.

Bisherige Untersuchungen zu Antigen-spezifischen T-Zellen bei HLA-B27 assoziierten Erkrankungen wurden bisher ausschliesslich im peripheren Blut oder in der Synovialflüssigkeit durchgeführt. Nach Identifizierung von potentiellen arthritogenen Antigenen wäre der Nachweis solcher Antigen-spezifischer T-Zellen in situ am Ort der Entzündung von grossem Interesse. Die einzig denkbare Technik, um Antigen-spezifische CD8+ T-Zellen im Knorpel- bzw. Knochengewebe direkt zu identifizieren, ist der Einsatz von MHC Klasse I Tetrameren in einer in situ Färbung. Die Methode ist für uns auch von wesentlicher Bedeutung, da wir aus unseren bisherigen Untersuchungsergebnissen wissen, dass die Frequenz von Peptid-spezifischen CD8+ T-Zellen in der Synovialflüssigkeit zwar höher ist als im peripheren Blut (Kuon et al. 2001, siehe Seite 60); Atagunduz et al. 2005, siehe Seite 41; Appel et al. 2004, siehe Seite 74) wir aber eine wesentlich höhere Frequenz dieser T-Zellen direkt am Ort der Entzündung erwarten (Kuckelhorn et al. 2002). Bisher sind für in situ Färbungen mit MHC Klasse I Molekülen zwei unterschiedliche methodische Ansätze der histologischen Aufarbeitung des Gewebes durchgeführt

worden. Zum einen wurden vitale etwa 200µm dicke Gewebeschnitte benutzt, in denen der Effekt von murinen CD8+ T-Zellen gegen „minor histocompatibility antigens“ in der Haut bei „graft versus host“ Reaktionen aufgezeigt wurde (Dickinson et al. 2002) und murine CD8+ T-Zellen in situ gegen Tumorantigene und virale Antigene dargestellt werden konnten (Haanen et al. 2000, Skinner et al. 2002). Ein Durchbruch in der Anwendung dieser Technik war eine Arbeit, die erfolgreich umfangreiche in situ Färbungen von murinen CD8+ T-Zellen zeigen konnte, die spezifisch gegen Antigene des Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) gerichtet waren, mit Tetrameren an schockgefrorenem Gewebe aus der murinen Milz und dem murinen Gehirn (McGavern et al. 2002). Diese Arbeitsgruppe untersuchte auch die Durchführbarkeit von in situ Färbungen in vitalem Gewebe und musste feststellen, dass die Spezifität dieser Färbungen aufgrund der schlechten Qualität der Schnitte mit zum Teil aufgelöster Anatomie eingeschränkt ist. Von daher stellt die Technik mit schockgefrorenem Gewebe wahrscheinlich die bessere Option dar.

Daher habe ich die Methode aus der Arbeitsgruppe von M. Oldstone (McGavern et al. 2002) an den Gefrierschnitten modifiziert und erstmalig HLA-B27 restringierte, Knorpelantigen-spezifische CD8+ T-Zellen im Gewebe nachweisen können (Kuon et al. 2004; Appel et al. 2004, siehe Seite 88). HLA-B27 transgene BALB/c Mäuse wurden mit einem Peptid (Peptid #67) von humanem Aggrekan immunisiert und anschliessend eine in situ Untersuchung der Milz auf Peptid-spezifische CD8+ T-Zellen durchgeführt (Abbildung 4). Diese Färbungen waren spezifisch, da in Kontrolltieren, die nicht HLA-B27-transgen waren oder mit Kontrollpeptiden immunisiert worden waren, solche Färbungen nicht nachgewiesen werden konnten. Ebenfalls negativ waren auch Färbungen mit HLA-B27 Tetrameren, die mit einem Kontrollpeptid beladen waren.

**Abbildung 4:** In situ Tetramer Färbung mit HLA-B27.Cys67/Aggrekanpeptid-Tetrameren. Milzgewebe einer HLA-B27 transgenen BALB/c Maus nach Immunisierung mit dem Aggrekanpeptid; Frequenz 1,2:1000 Tetramer bindende CD8+ T-Zellen. Der weisse Balken zeigt 10µm an (aus Appel et al. J Immunol 2004)



**Eigene Referenzen:**

**Appel H**, Kuon W, Kuhne M, Köhler D, Kuhlmann S, Kollnberger S, Bowness P, Sieper J: The solvent-inaccessible Cys-67 residue of HLA-B27 contributes to T cell recognition of HLA-B27/peptide complexes. *J Immunol.* 2004; 173: 6564-73 (c).

Atagunduz P, **Appel H**, Kuon W, Wu P, Thiel A, Sieper J: CD8+ T cell response to self-peptides in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 892-901.

Kuon W, Holzhutter HG, **Appel H**, Grolms M, Kollnberger S, Traeder A, Henklein P, Weiss E, Thiel A, Lauster R, Bowness P, Radbruch A, Kloetzel PM, Sieper J. Identification of HLA-B27-restricted peptides from the *Chlamydia trachomatis* proteome with possible relevance to HLA-B27-associated diseases. *J Immunol* 2001; 167: 4738-46.

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

### **2.3.3. Untersuchungen zur Interaktion zwischen MHC Molekülen und T-Zell Rezeptoren durch den Einsatz von MHC Multimeren**

Die T-Zell Rezeptor Erkennung von MHC-gebundenen Peptiden ist für die Antigen-spezifische Immunantwort von grosser Bedeutung. Monovalente MHC/Peptid Komplexe lösen sich innerhalb von wenigen Sekunden von ihren entsprechenden T-Zell Rezeptoren (Matsui et al. 1994). Dies deutet darauf hin, dass bei der T-Zell Stimulation erst die Multimerisierung von MHC-Molekülen eine ausreichend lange Bindung an den T-Zell Rezeptor erlaubt, welcher dann die T-Zell Aktivierung vermittelt. Mithilfe von HLA-DR2/MBP-IgG-Fusionsproteinen (2 rekombinante HLA-DR2 Moleküle mit einem immundominantem Peptid aus dem Myelin basischen Protein gekoppelt an ein Fc-Fragment eines IgG Antikörpers, siehe Seite 126) konnten wir umfangreiche Studien zur Kinetik der Bindung zwischen MHC-Molekülen und T-Zell-Rezeptor durchführen. Dafür habe ich zunächst die rekombinanten löslichen MHC Moleküle als Monomer (HLA-DR2 ohne den IgG-Anteil), als Dimer und als Tetramer (Zwei Dimere an Protein A gekoppelt) inkubiert und nachweisen können, dass nicht das Monomer aber bereits das Dimer eine suffiziente Stimulation eines entsprechenden T-Zell Klons induzierte. Bindungsstudien zwischen MHC Molekül und T-Zell Rezeptor in vitro erfolgten mithilfe der BIACORE Technologie. Dazu wurde neben dem löslichen, rekombinanten MHC-Molekül ein entsprechender rekombinanter löslicher T-Zell Rezeptor hergestellt und eingesetzt. Die Dissoziationszeit war hier mit dem Tetramer signifikant länger als mit dem Dimer. Insgesamt zeigte sich bei diesen Versuchen, dass die schwache Bindungsaffinität zwischen einem einzelnen MHC/Peptid-Molekül und seinem T-Zell-Rezeptor schon durch eine Dimerisierung von MHC/Peptid-Molekülen verstärkt werden kann. Ausserdem konnten wir nachweisen, dass bereits eine Dimerisierung des T-Zell-Rezeptors der initiale Schritt zur T-Zell-Aktivierung ist (Appel et al. 2000, siehe Seite 123), was in einer etwa zur gleichen Zeit erschienenen Arbeit ähnlich beschrieben wurde (Cochran et al. 2000).

#### **Eigene Referenzen**

**Appel H**, Gauthier L, Pyrdol J, Wucherpfennig KW: Kinetics of T-cell receptor binding by bivalent HLA-DR.Pepptide complexes that activate antigen-specific human T-cells. J Biol Chem 2000; 275:312-21.

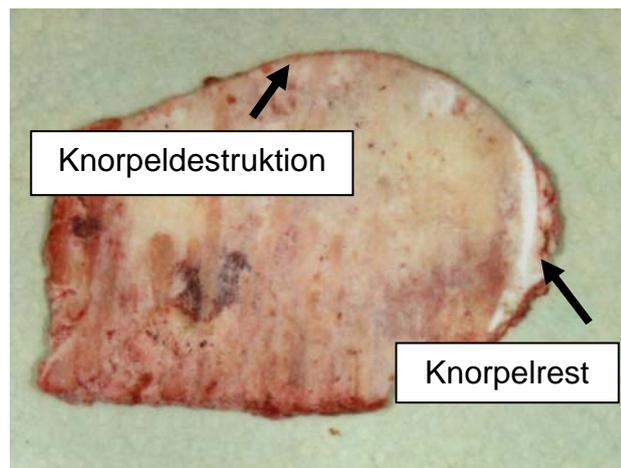
## 2.4. Histopathologische Untersuchungen bei der Ankylosierenden Spondylitis

### 2.4.1. Histopathologie bei der Arthritis peripherer Gelenke von AS Patienten am Beispiel der Coxitis

Um die Bedeutung des subchondralen Knochenmarks und der Knorpel/Knochengrenze bei der Pathogenese der AS zu untersuchen, habe ich bei AS Patienten mit Coxitis, die sich einer Hüftgelenksersatzoperation unterziehen mussten, histopathologische Untersuchungen durchgeführt und die Ergebnisse mit Patienten mit Rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis verglichen.

Bei diesen AS Patienten, die eine Beschwerdesymptomatik von 0.5 bis 10 Jahren hatten, konnten auch hochakute entzündliche Veränderungen analysiert werden. Die immunhistologischen Untersuchungen wurden zur Darstellung von CD3+, CD4+ und CD8+ T Lymphozyten, CD20+ B Lymphozyten, CD34+ Gefäßen, CD68+ und TRAP+ Osteoklasten, CD68+ Makrophagen und CD56+ Osteoblasten in Kooperation mit Christoph Loddenkemper aus dem pathologischen Institut, Campus Benjamin Franklin (Leiter: Prof. Dr. H. Stein) durchgeführt.

Abbildung 5: Femurkopf von einem AS Patienten mit Arealen kompletter Knorpeldestruktion und Resten von Knorpel auf der Gelenkoberfläche. (aus : Appel H et al. Arthritis Rheum 2006; 54:1805-13)



Bei der histopathologischen Aufarbeitung von Hüftgelenksköpfen von AS Patienten war das Ausmaß der entzündlichen Prozesse im subchondralen Knochenmark in Hüftgelenken von AS Patienten abhängig von dem Vorhandensein von Knorpel auf

der Gelenkoberfläche (Abbildung 5). In solchen Bereichen konnten wir eine hohe Dichte von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten nachweisen, während in Arealen ohne Knorpel an der Oberfläche die Dichte von CD4+ und CD8+ T Lymphozyten deutlich abnahm (Abbildung 6). Im Gegensatz dazu nahm bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, die Dichte von T Lymphozyten im subchondralen Knochenmark bei voranschreitender Zerstörung des Gelenkknorpels zu.

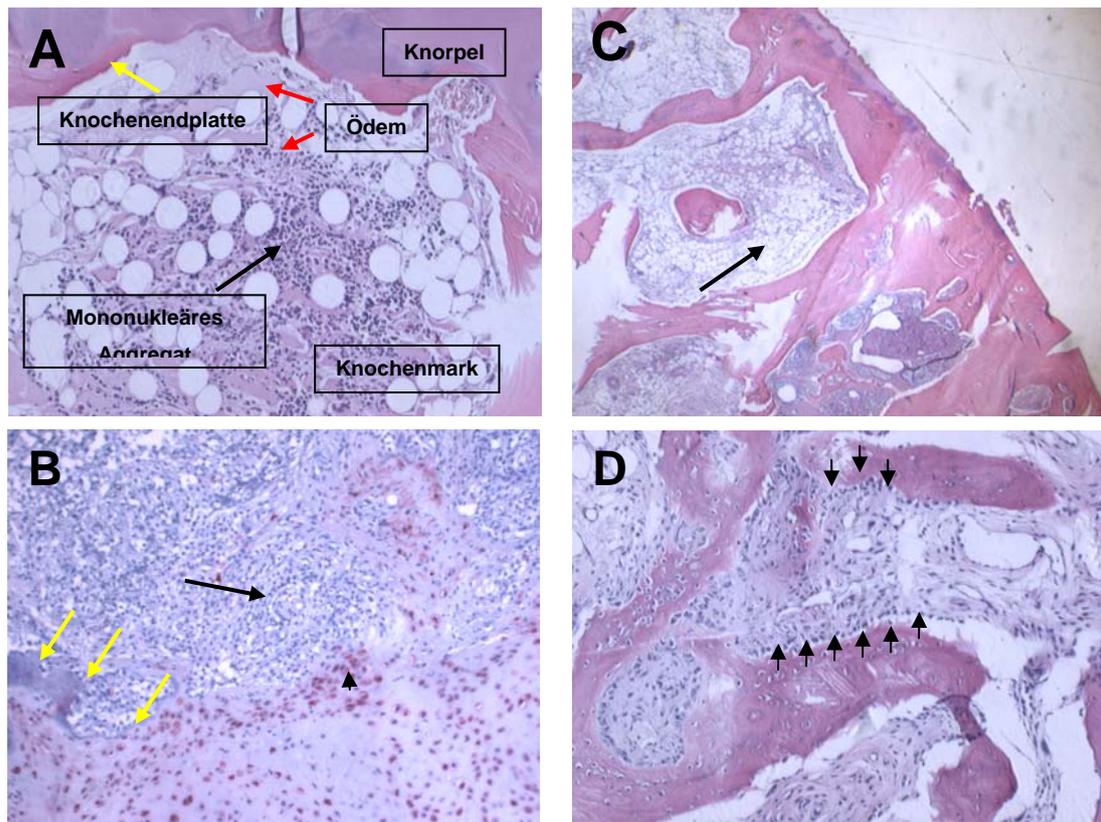


Abbildung 6: A und B: Subchondrales Knochenmark in Arealen mit Knorpel auf der Gelenkoberfläche: Mononukleäre Zellinfiltrate (schwarze Pfeile) infiltrieren das subchondrale Knochenmark, die knöcherne Endplatte (gelbe Pfeile) und Knorpelgewebe an der Knorpel/Knochengrenze (B: Chondrozyten mit Expression des S100-Proteins, APAAP-Methode). C und D: Subchondrales Knochenmark in Arealen ohne Knorpel an der Oberfläche: das Knochenmark enthält kaum mononukleäre Zellen. Reparationsmechanismen wie die Formation dichter Osteblastensäume stehen hier im Vordergrund. (aus: Appel H et al. Arthritis Rheum 2006; 54:1805-13)

Wir denken, dass bei RA Patienten die subchondrale Anreicherung von mononukleären Zellen sekundär zur Synovitis in den betroffenen Gelenken auftritt. Bei AS Patienten waren entzündliche Prozesse an der Knorpel/Knochengrenze vergesellschaftet mit einer gesteigerten Gefäßdichte und einer erhöhten Frequenz von Osteoklasten, die in die knöcherne Endplatte invadierten.

Unsere Ergebnisse an den Hüftgelenken von AS Patienten deuten darauf hin, dass (neben den Enthesien) die Knorpel/Knochengrenze und das subchondrale Knochenmark in peripheren Gelenken von AS Patienten möglicherweise der primäre Ort der Entzündung sind. Das Vorhandensein von akuten Entzündungszeichen vor allem in Arealen, in denen noch Knorpel an der Knorpel/Knochengrenze anzutreffen ist, deutet darauf hin, dass die entzündliche Reaktion bei der AS möglicherweise durch T-Zellen, die gegen Knorpelantigene gerichtet sind, unterhalten werden könnte. Dass neben T-Zellen eine hohe Gefässdichte und eine hohe Frequenz von Osteoklasten in dem subchondralen Knochenmark und an der Knorpel/Knochengrenze von AS-Patienten mit Koxitis nachgewiesen werden konnten, spricht zusätzlich dafür, dass bei der AS zahlreiche Faktoren an der Zerstörung von Gelenken beteiligt sind (Appel et al. 2006, siehe Seite 136).

#### **Eigene Referenzen:**

**Appel H**, Kuhne M, Spiekermann S, Köhler D, Zacher J, Stein H, Sieper J, Loddenkemper C. Immunohistochemical analysis of hip arthritis in ankylosing spondylitis – an analysis of the bone/cartilage interface and subchondral bone marrow. *Arthritis Rheum* 2006; 54:1805-13 (a).

#### **2.4.2. Histopathologie in den Facetten-Gelenken von AS Patienten**

Um der Frage nach der Rolle von entzündlichen Veränderungen in den Facettengelenken weiter nachzugehen, habe ich bei Patienten mit fortgeschrittener Krankheitsdauer (Mittlere Krankheitsdauer 7-33 Jahre), bei denen aufgrund einer erheblichen Kyphosierung eine Lordosierungsosteotomie (Metz-Stavenhagen et al. 2001) im Bereich der Lendenwirbelsäule durchgeführt wurde, die hierbei zu entfernenden Facettengelenke histopathologisch aufgearbeitet.

Im Bereich der Facettengelenke konnten wir bei 6 von 16 AS Patienten trotz der langen Krankheitsdauer und einer partiellen Ankylose in zahlreichen untersuchten Gelenken eine persistierende Entzündung mit dem Nachweis von T- und B-lymphozytären Infiltraten beobachten (Appel et al. 2006b, siehe Seite 147). Diese lag wie bei den von uns untersuchten Femurköpfen (Appel et al. 2006a, siehe Seite 136) sowohl im subchondralen Knochenmark unterhalb der mit hyalinem Knorpel bedeckten Facettengelenke (Abbildung 7) als auch an den Enthesien vor.

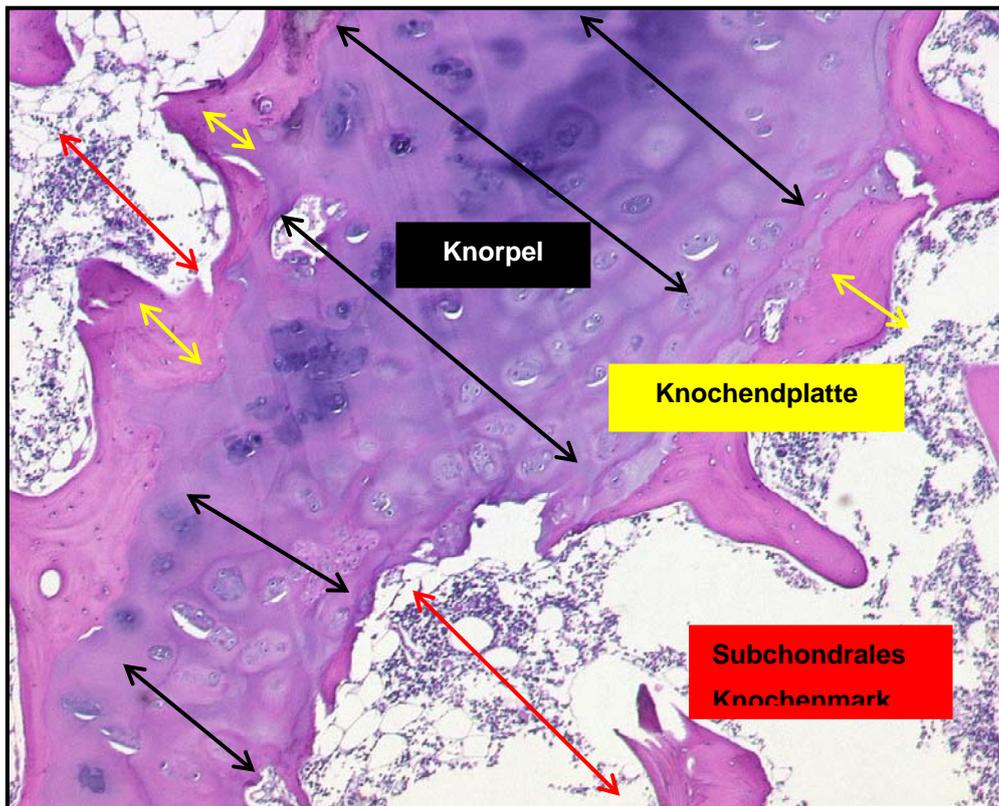


Abbildung 7: Ausbildung von Knorpelinseln in einem ankyloisierten Facettengelenk eines AS Patienten. Die knöcherne Endplatte ist unregelmässig, mononukleäre Zellinfiltrate befinden sich im subchondralen Knochenmark. Die Immunhistologie konnte hier CD3+ T-Zellen sowie CD20+ B Zell Aggregate nachweisen (siehe Appel et al. 2006b, Seite 147).

Innerhalb dieser Aggregate konnte ich eine enge Assoziation zwischen T- und B-Zellen beobachten. Dies lässt vermuten, dass B-Zellen hier möglicherweise als Antigen-präsentierende Zellen fungieren. Die Charakterisierung dieser B-Zellen ist Gegenstand der derzeitigen Untersuchungen.

Auch in diesen Gelenken waren, wenn verbliebene Knorpelreste nachgewiesen werden konnten, entzündliche Infiltrate nachweisbar. Von besonderem Interesse ist hier die charakteristische Formation von Knorpelinseln (siehe Abbildung 7) im Bereich des ehemaligen Gelenkspaltes wie sie bereits 1956 durch Cruickshank (siehe Abbildung 2B und C) beschrieben worden waren (Cruickshank 1956).

Der Nachweis einer persistierenden Entzündung in diesen Facettengelenken war angesichts der langen Krankheitsdauer der Patienten überraschend. Diese Beobachtung hat aber für die Betreuung von AS Patienten mit fortgeschrittener Ankylose eine wichtige Bedeutung, da sie das Vorhandensein von entzündlichen

Rückenschmerzen trotz Ankylose gut erklären und daher auch eine intensive anti-inflammatorische Therapie z.B. mit einem anti-TNFalpha Blocker rechtfertigen.

In Übereinstimmung mit den Befunden in den Femurköpfen von AS Patienten waren auch in den Facettengelenken eine hohe Gefässdichte in Bereichen mit und ohne entzündliche Veränderungen nachweisbar. Die verbleibende hohe Gefässdichte ohne Zeichen einer persistierenden Entzündung war vor allem im Bereich von dichten Säumen aktivierter Osteoblasten entlang der Knochentrabekel nachweisbar, so dass die Funktion dieser Gefäße möglicherweise die Versorgung dieser Osteoblasten bzw. des neugebildeten Knochengewebes ist. Die Dichte der Osteoklasten und Makrophagen in den zygapophysealen Gelenken dieser Patienten mit langer Krankheitsdauer unterschied nicht von denen der Kontrollen (Appel et al. 2006b, siehe Seite 147). Insgesamt konnten in diesen histopathologischen Untersuchungen weitere Mechanismen, die zur Gelenkdestruktion in Facettengelenken bei der AS beitragen, festgestellt werden, die zukünftig bei der Entwicklung neuerer Therapiestrategien von Bedeutung sein könnten.

**Eigene Referenzen:**

**Appel H**, Kuhne M, Spiekermann S, Ebhardt H, Groszdanovic Z, Köhler D, Dreimann M, Hempfing A, Rudwaleit M, Stein H, Metz-Stavenhagen P, Sieper J, Loddenkemper C. Immunohistological analysis of zygapophyseal joints in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2845-2851 (b).

### **2.4.3. Korrelation von histopathologischen Befunden in der Wirbelsäule von AS Patienten mit der Magnetresonanztomographie (MRT)**

Spinale MRT Untersuchungen werden bei AS Patienten mit dem Ziel durchgeführt, entzündliche Veränderungen als Ausdruck von erhöhter Krankheitsaktivität zu erkennen. Solche akuten entzündlichen Veränderungen in MRT-Untersuchungen der Wirbelsäule von AS Patienten sind im Bereich der Bandscheiben, der Wirbelkörper, der interspinalen Bänder, der Costovertebralgelenke und der Facettengelenke nachweisbar (Hermann et al. 2005). Eine systematische Untersuchung von entzündlichen Veränderungen in den Facettengelenken von AS Patienten ist allerdings bisher nicht durchgeführt worden. Dementsprechend liegen auch keine Daten dazu vor, inwieweit entzündliche Veränderungen in diesen Gelenken aber auch in allen anderen Abschnitten der Wirbelsäule mit histomorphologischen

Untersuchungen korrelieren. Bei Sakroiliakalgelenken von AS Patienten liegen solche vergleichenden Untersuchungen vor, wobei hier weder immunhistochemische Untersuchungen erfolgten noch wurde das Knochenmarksödem histomorphologisch quantifiziert (Bollow et al. 2000).

Areale entzündlicher Läsionen im MRT werden in T2-gewichteten Aufnahmen mit Fettsättigung dargestellt und repräsentieren ein Knochenmarksödem (Jevtic et al. 2000). Der Terminus „Knochenmarksödem“ bei MRT Untersuchungen wurde erstmals 1988 benutzt. Regional begrenzte abgeschwächte Signale in T1-gewichteten Aufnahmen bei starken Signalen in den T2-gewichteten Aufnahmen repräsentierten histomorphologisch die Akkumulation von Flüssigkeit im Knochenmark, was daher als „Knochenmarksödem“ definiert wurde (Wilson et al. 1988).

Ich habe bei 8 AS Patienten die histomorphologisch nachweisbaren Knochenmarksödeme mit MRT-Befunden der Wirbelsäule verglichen (Appel et al. 2006c, siehe Seite 156). Die Korrelation zwischen histopathologischen Befunden und Knochenmarksödemen im MRT war gut, jedoch zeigte sich, dass die Sensitivität des MRTs im Vergleich zu histopathologischen Untersuchungen geringer ist. Unsere Untersuchungen deuten darauf hin, dass eine entzündliche Reaktion nicht immer das entsprechende Ausmass an Ödem verursacht und dies eine Erklärung dafür sein mag, dass trotz hoher Krankheitsaktivität ein negatives MRT auftreten kann (Rudwaleit et al. 2005).

Eine weitere Analyse von Knochenmarksödemen in MRTs mit entsprechender Korrelation zu histopathologischen Untersuchungen wurde bei Patienten mit Osteoarthritis in peripheren Gelenken durchgeführt. Hier war in 50-68% der Patienten ein solches Ödem nachweisbar. Die Korrelation zu histomorphologischen Befunden von korrespondierenden Arealen ergab jedoch in mehr als der Hälfte der Fälle ein normales Gewebe. Nur in 4% der Fälle war tatsächlich eine erhöhte Flüssigkeitsansammlung im Knochenmark feststellbar (Zanetti et al. 2000). Von besonderer Bedeutung ist aber hier, dass keine erhöhte Dichte von mononukleären Zellinfiltraten in entsprechenden Arealen nachweisbar war. In unserer Studie war das interstitielle Knochenmarksödem immer mit einer erhöhten Dichte von mononukleären Zellen vergesellschaftet. Dies untermauert die Hypothese, dass bei AS Patienten das Knochenmarksödem, wie es durch das MRT detektiert wird,

tatsächlich auf entzündliche Veränderungen zurückgeführt werden kann (Appel et al. 2006c, siehe Seite 156).

Eigene Referenzen:

Appel H, Loddenkemper C, Kuhne M, Spiekermann S, Ebhardt H, Grozdanovic Z, Köhler D, Dreimann M, Hempfing A, Metz-Stavenhagen P, Rudwaleit M, Sieper J. Inflammation in the Spine of Patients with Ankylosing Spondylitis. Correlation of Histopathology with Findings in Magnetic Resonance Imaging (MRI). *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R143 [Epub ahead of print] (c).