

### 3. Zusammenfassung

Ausgehend von der Beobachtung, dass bei HLA-B27+ Patienten mit einer gastrointestinalen Infektion mit *Yersinia enterocolitica* oder einer urogenitalen Infektion mit *Chlamydia trachomatis* häufiger eine reaktive Arthritis (ReA) und bei chronischem Verlauf eine Ankylosierende Spondylitis auftritt, habe ich bei der Yersinien-getriggerten reaktiven Arthritis konservierte Antigene und beispielhaft an der Chlamydia trachomatis induzierten ReA das gesamte Proteom von Chlamydia trachomatis auf HLA-B27 restringierte immundominante Antigene, zunächst auf Protein- später dann auf Peptidebene untersucht. Hierfür habe ich in Zusammenarbeit mit A.Mertz und W.Kuon nicht nur Methoden zur Aufreinigung von bakteriellen Proteinen entwickelt, sondern auch solche, die die Identifikation von Antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen mithilfe von Tetrameren und FACS Analyse erlaubt. Hierbei konnten mittels HLA-B27 Tetrameren erstmals humane HLA-B27 restringierte CD8+ T-Zellen charakterisiert werden.

Mithilfe der HLA-B27 Tetramere konnte ich auch die Rolle der Position 67 der schweren Kette von HLA-B27 für die Bindung von Peptiden in der Bindungsgrube von HLA-B27 untersuchen. Durch eine Mutation von Cystein zu Serin an dieser Position wurde die Stabilität des HLA-B27/Peptid Komplexes durch den Verlust einer SH- $\pi$  Bindung derartig reduziert, dass die Detektion von Antigen-spezifischen T-Zellen sowohl in FACS Analysen als auch in situ durch die veränderte Peptidpräsentation deutlich reduziert war. Dies hatte für uns die Konsequenz, dass trotz der erleichterten Auffaltung und Herstellung von löslichem rekombinantem HLA-B27 mit einer schweren Kette mit Serin an Position 67 diese mutierte schwere Kette nicht mehr verwendet wird.

In Immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen konnte ich in der Synovialmembran von Patienten mit Reaktiver Arthritis ein Zytokinmilieu mit IL-10 und TGF- $\beta$  produzierenden CD3+ T-Zellen und TGF- $\beta$  produzierenden Makrophagen und eine Erniedrigung der TNF-alpha Sekretion nachweisen, was möglicherweise eine Persistenz der die Reaktive Arthritis triggernden Erreger zulassen könnte und so eine Erreger-spezifische Induktion von T-Zellantworten ermöglichen könnte.

Ausgehend von der Hypothese, dass Knorpelstrukturen die primäre Zielstruktur von T-Zell Antworten ist, haben ich zusammen mit P.Atagunduz und J.Zou bei AS

Patienten mittels synovialer mononukleärer Zellen nach immundominanten Antigenen von extrazellulären Matrixproteinen des Knorpels gesucht und identifizieren können. Hierbei konnten HLA-B27 restringierte Nonamerpeptide aus Kollagen II und Kollagen VI identifiziert werden. Aus der G1 Domäne von Aggrekan wurden außerdem 18mer Peptide identifiziert, die HLA-B27 unabhängig bei AS Patienten immunogen sind. Im Tiermodell bei der HLA-B27-transgenen Maus konnte schliesslich in Zusammenarbeit mit W. Kuon ein Nonamer-Peptid aus dem Aggrekan identifiziert werden, das eine Tenovaginitis in diesen Tieren auslöste.

Ziel der Suche nach Antigen-spezifischen T-Zellantworten gegen definierte körpereigene Strukturen als Auslöser der Immunpathologie bei AS ist die Entwicklung einer hochspezifischen Ausschaltung von T-Zellen, die diese Erkrankung unterhalten. Hier habe ich modellhaft in Zusammenarbeit mit K.Wucherpfennig mittels rekombinanter MHC Klasse II Moleküle ausführliche Untersuchungen zur Interaktion zwischen T-Zell Rezeptoren und MHC Molekülen durchgeführt. Hierbei konnte ich zeigen, dass bereits ein löslicher MHC/Peptid-Dimer Komplex im Gegensatz zum MHC/Peptid-Monomer in der Lage ist, T-Zellen suffizient Antigen-spezifisch zu stimulieren. In BIACORE Experimenten konnte ich ausserdem zeigen, dass ein MHC Tetramer eine längere Dissoziationszeit vom entsprechenden T-Zell Rezeptor hat als ein Dimer oder Monomer. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse habe ich eine neue Methode entwickelt, wie mithilfe rekombinanter löslicher MHC Moleküle T-Zellen in einen Zustand der Anergie versetzt und damit Antigen-spezifisch ausgeschaltet werden können.

Die Suche nach Belegen für die Bedeutung von Knorpel und Knorpelstrukturen bei der AS hat im Weiteren zur Durchführung von systematischen histopathologischen Untersuchungen geführt: Magnet Resonanz Tomographische (MRT) Untersuchungen zeigen neben den Enthesitiden häufig auch entzündliche Veränderungen im subchondralen Knochenmark an der Knorpel/Knochengrenze. Ich habe diese Frage in einer systematischen histopathologischen Untersuchung von Femurköpfen von AS Patienten aufgegriffen und eine detaillierte vergleichende Untersuchung zur Rheumatoiden Arthritis und Osteoarthritis durchgeführt. Diese Untersuchungen konnten ausgeprägte entzündliche Veränderungen an der Knorpel/Knochengrenze vor allem in Arealen mit verbliebenem Knorpel aufzeigen,

welche nach der Destruktion des Knorpels deutlich schwächer sind. Diese Untersuchungen unterstreichen zum einen, dass neben den Enthesien auch die Knorpel/Knochengrenze ein weiterer wichtiger Ort der primären Immunpathologie ist und dass Knorpelstrukturen eine triggernde Funktion für die lokale Immunpathologie haben. Die entzündlichen Aggregate, die aus CD4- und CD8+ T-Zellen bestanden, waren häufig mit einem Knochenmarksödem, einer hohen Gefässdichte und einer Ausdünnung der knöchernen Endplatte aufgrund hoher Osteoklastenaktivität assoziiert. Dies beweist eindrücklich, dass neben der rein T-Zell vermittelten Immunpathologie auch andere Mechanismen bei der Gelenkzerstörung im Rahmen der Ankylosierenden Spondylitis von Bedeutung sind.

In Facettengelenken von AS Patienten habe ich trotz lange Krankheitsdauer eine anhaltende entzündliche Aktivität im Knochenmark nachweisen können, obwohl die physiologischen Gelenkstrukturen zum Teil komplett zerstört waren und eine Ankylose dieser Gelenke bestand. Hierbei waren wie auch in den Femurköpfen von AS Patienten CD3+ T-Zell Aggregate nachweisbar. Wir konnten auch eine erhöhte Frequenz von CD20+ B-Zellen nachweisen. Im Bereich der lymphozytären Infiltrate fand ich ausserdem eine hohe Gefässdichte, häufig ein Knochenmarksödem und eher weniger Osteoklastenaktivität. Die Anzahl der Makrophagen unterschied sich nicht signifikant zu Kontrollen.

Diese Beobachtung von entzündlichen Infiltraten in Facettengelenken mit fortgeschrittener Gelenkdestruktion widerlegt keineswegs die Hypothese der Knorpel-getriggerten Immunpathologie, da in Facettengelenken zahlreiche Bandansätze mit Faserknorpel nachweisbar sind. Sie hat für die Beurteilung von AS Patienten mit fortgeschrittener Ankylose erhebliche Bedeutung, da wir durch diese Untersuchungen nachweisen konnten, dass auch bei fortgeschrittener Ankylose therapiebedürftige Rückenschmerzen, die auf entzündliche Veränderungen zurückzuführen sind, vorliegen können. In der Korrelation von histopathologisch nachgewiesenen entzündlichen Veränderungen mit CD3+ und CD20+ lymphozytären Infiltraten und Knochenmarksödem im Vergleich zu kernspintomographischen Untersuchungen konnte ich auch zeigen, dass erst ausgeprägtere entzündliche Veränderungen durch das MRT der Lendelwirbelsäule detektiert werden.