

Aus dem Deutschen RheumaForschungs Zentrum Berlin

HABILITATIONSSCHRIFT

Die differentielle Expression von MHC II-Genen als Mechanismus bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen

Zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Immunologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke
aus Bonn

Präsident: Prof. Dr. Dr. h. c. H. Meyer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: Prof. Dr. med. Elisabeth Märker-Herrmann (Mainz)

PD Dr. med. Ralf Waßmuth (Erlangen)

eingereicht: 17.12.2000

Datum der Habilitation: 12.12.2000

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	FAZIT, KONTEXT UND VISIONEN.....	6
2	EINLEITUNG.....	8
2.1	AUTOIMMUNERKRANKUNGEN	8
2.2	TOLERANZ UND AUTOIMMUNITÄT	8
2.3	DIE ROLLE VON B- UND T-LYMPHOZYTEN BEI DER ENTSTEHUNG VON AUTOIMMUNERKRANKUNGEN 9	
2.4	BEDEUTUNG DER REGULATORISCHEN T-ZELLEN BEI DER ENTSTEHUNG VON AUTOIMMUNERKRANKUNGEN.....	10
2.5	GENETIK VON AUTOIMMUNERKRANKUNGEN	14
3	ERGEBNISSE.....	20
3.1	DIFFERENTIELLE EXPRESSION DER MHC II GENE IN DER MAUS	20
3.1.1	<i>in vivo Analyse der differentiellen MHC II Expression</i>	<i>20</i>
3.1.1.1	B-Zellen stellen den größten Anteil an APZ im Lymphknoten	20
3.1.1.2	Differentielle Expression der MHC II Gene auf Lymphknoten-Makrophagen.....	20
3.1.2	<i>in vitro Analyse der MHC II Expression auf den Antigen-präsentierenden Zellen</i>	<i>21</i>
3.1.2.1.	Verlängerte Expression zweier protektiver Allele auf Knochenmark-Makrophagen	21
3.1.2.2.	Die differentielle MHC II Expression ist auf die Makrophagen beschränkt.....	23
3.1.3	<i>Immun-Deviation durch differentielle MHC II Expression auf den Makrophagen</i>	<i>23</i>
3.1.3.1.	Eine hohe MHC II Expression auf Makrophagen begünstigt eine Typ1 Antwort	25
3.1.3.2.	Eine niedrige MHC II Expression auf Makrophagen begünstigt eine Typ 2 Antwort.....	27
3.2	DIFFERENTIELLE EXPRESSION DER MHC II GENE IM MENSCHEN.....	28
3.2.1	<i>Assoziation von DR4 und DR10 mit der RA bei einer Kohorte früher Patienten</i>	<i>29</i>
3.2.2	<i>Assoziation von DR1 und DR4 mit einem schweren Krankheitsverlauf</i>	<i>30</i>
3.2.3	<i>Erhöhte DR4 Expression auf den B-Zellen von RA-Patienten.....</i>	<i>30</i>
3.2.4	<i>Differentielle Regulation der Expression von DR4 und DRB4 auf Monozyten.....</i>	<i>33</i>
3.2.5	<i>Differentielle gesamt-DR Expression DR4 und DR7 homozygoter B-Zellen.....</i>	<i>34</i>
3.2.6	<i>Unterschiedliche Kopplung verschiedener DRB4-Promotoren mit DR4 und DR7</i>	<i>36</i>
3.3	IMMUN-DEVIATION IM DREI-ZELLTYP-CLUSTER.....	37
3.3.1	<i>Das experimentelle System des drei-Zelltyp-Clusters.....</i>	<i>38</i>
3.3.2	<i>Für eine effektive Polarisierung der naiven Th-Zellen wird die gekoppelte Antigen- Präsentation benötigt</i>	<i>41</i>
3.3.3	<i>Polarisierte Typ 1 Th-Zellen induzieren die IL-12 Produktion der DZ am effektivsten.....</i>	<i>42</i>
3.3.4	<i>Bei der Polarisierung von naiven Th zu Typ 1 Effektor Th-Zellen werden IFNγund IL-12 nacheinander benötigt.....</i>	<i>44</i>
3.3.5	<i>Übertragung der Arthritis durch adoptiven Transfer von Milz-Zellen aus CIA Tieren in SCID Mäuse.....</i>	<i>45</i>
3.3.6	<i>Verhinderung der CIA durch regulatorische Typ 2 Effektor Th-Zellen im drei-Zelltyp- Cluster</i>	<i>46</i>

4	DISKUSSION	48
4.1	DIFFERENTIELLE EXPRESSION ALS MECHANISMUS, MIT DEM MHC II GENE FÜR DIE ENTSTEHUNG VON AUTOIMMUNERKRANKUNGEN PRÄDISPONIEREN	48
4.1.1	<i>Die Differentielle Expression der MHC II Gene auf murinen Makrophagen ist mit dem T- Zell-Zytokinprofil und protektiven/immunsuppressiven Effekten assoziiert</i>	49
4.1.2	<i>Differentielle Expression der MHC II Gene beim Menschen</i>	50
4.1.3	<i>Parallelen zwischen der differentiellen Expression in der Maus und beim Menschen</i>	53
4.2	IMMUN-DEVIATION IM DREI-ZELLTYP-CLUSTER.....	54
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	58
6	ANTIKÖRPER, VERWENDETE MAUSSTÄMME, PATIENTEN-DATEN	65

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Abkürzungsverzeichnis

APZ	Antigen-präsentierende Zelle
bKII	bovines Kollagen Typ II
CD	Cluster of Differentiation, Kürzel für Oberflächenmoleküle
CIA	Collagen-Induced Arthritis
CytC	Cytochrom C
DZ	Dendritische Zelle
HLA	Human Leukocyte Antigen
Ig	Immunglobulin
LPS	LipoPolySaccharid
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Major Histokompatibility Complex
MΦ	Makrophagen
MS	Multiple Sklerose
OVA	Ovalbumin
PMA	Phorbol Myristat Acetat
RA	Rheumatoide Arthritis
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
TZR	T-Zellrezeptor

Zytokine

GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
IFNγ	Interferon gamma
IL	Interleukin
TNFα	Tumor Nekrose Faktor alpha

1 Fazit, Kontext und Visionen

Autoimmunerkrankungen sind durch eine fehlgesteuerte Immunantwort gegen Selbst charakterisiert und entstehen durch das Zusammenspiel multipler Umwelt- und genetischer Faktoren. Zu den genetischen Faktoren, die bei allen Autoimmun-erkrankungen eine Rolle zu spielen scheinen, gehört eine Assoziation mit Haupt-Histokompatibilitätsantigenen der Klasse I oder II (MHC I oder II). Interessanterweise gibt es aber nicht nur krankheitsassoziierte sondern auch protektive MHC Gene, deren Anwesenheit die Entstehung einer Erkrankung verhindert (Veröffentlichungen M1, M2). Ich möchte verstehen, mit welchen Mechanismen die MHC II Gene die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigen und/oder verhindern und bewege mich mit meiner Forschung im Grenzgebiet zwischen Immunologie und Genetik. Mein Ziel ist es, ein Verständnis der natürlichen Mechanismen der Protektion in der Zukunft gegen die Erkrankung einzusetzen.

Die MHC Gene besetzen eine zentrale Schaltstelle im Immunsystem, indem sie den Kontakt zwischen Antigen-präsentierenden Zellen und den regulatorischen Effektorzellen, den T-Helferzellen, vermitteln. Gleichzeitig sind sie die Gene mit dem höchsten bisher beschriebenen Polymorphismus. Man nimmt an, daß sich der hohe Polymorphismus bei den MHC Genen parallel zu der Vielfalt der Krankheitserreger entwickelt hat, um das Überleben der Art zu gewährleisten. Diese Betrachtungsweise wurde bisher auf den Polymorphismus der Proteinstruktur beschränkt. Ich trage diese Idee nun einen Schritt weiter, indem ich für Mensch und Maus zeige, dass der Polymorphismus in den Promotor-Regionen ebenfalls von entscheidender funktioneller Bedeutung ist und in einer unterschiedlichen Expression von protektiven und krankheitsassoziierten MHC II Genen in bestimmten Antigen-präsentierenden Zellen mündet (M3, M7). Über diese differentielle Expression können die krankheitsassoziierten Gene die T-Helferzellen funktionell in eine andere Richtung polarisieren als die protektiven und wir nehmen an, dass diese unterschiedlichen Polarisierungen wesentlich am Aufrechterhalten bzw. Aufheben der Toleranz beteiligt sind (M4, M5, M7).

Ich möchte die MHC II Allele, die im Menschen mit der Entstehung von Rheumatoider Arthritis (RA) assoziiert sind, auf der Transkriptions- und der Oberflächenexpressionsebene genau untersuchen und ihre jeweiligen Expressionsmuster mit denen von protektiven Allelen vergleichen (M6, M8). Mit einem detaillierten Verständnis darüber, wie die protektiven MHC II Gene in welchem Zelltyp exprimiert werden, könnte eine Therapie entwickelt werden, bei der die Expression der RA-assoziierten Gene gezielt verändert wird.

Auf der immunologischen Ebene habe ich den Einfluß der differentiellen Expression auf die Polarisierung der T-Helferzellen untersucht und für die Maus zeigen können, dass Antigen-präsentierende Zellen mit protektiven oder Arthritis-assoziierten MHC II Allelen in T-Zellen die Expression von funktionell antagonistischen Zytokinen induzieren (M4). Zytokine des Typs 1 (IL-2, IFN γ) sind sowohl mit der Kollagen-induzierten Arthritis in der Maus als auch der Rheumatoiden Arthritis (RA) im Menschen assoziiert. Man nimmt an, dass sie zum Verlauf der Erkrankung maßgeblich beitragen. Eine mögliche Form der Therapie könnte die Immun-Deviation sein, bei der versucht wird, Polarisierungen der Zytokinexpression umzukehren. In Vorarbeiten haben wir ein *in*

vitro System entwickelt, an dem wir die Interaktionen zwischen zwei T-Helferzellen untereinander und mit dendritischen Zellen als wichtigste Antigen-präsentierende Zelle analysiert haben. Wir konnten so eine detaillierte Abfolge und Kinetik der Zytokinexpression im Verlauf der Interaktion zwischen T-Helferzellen und dendritischen Zellen beschreiben (M10).

In der Zukunft möchte ich untersuchen, über welche Oberflächenmoleküle und/oder Zytokine dendritische Zellen polarisiert werden können, um ihrerseits Typ 1 oder Typ 2 Antworten der T-Helferzellen zu induzieren. Im Zentrum unseres Interesses stehen dabei die Signalketten, über die die für dendritische Zellen charakteristische IL-12 Produktion gesteuert wird. Mein therapeutisches Ziel ist eine Vakzinierung von RA-Patienten mit autologen dendritischen Zellen, die *ex vivo* darauf vorbereitet wurden, das entzündungsfördernde Typ 1 Zytokinmilieu im betroffenen Gelenk umzukehren und damit den Krankheitsprozess aufzuhalten.

Die folgenden Publikationen sind im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit entstanden:

M1 Daser, A., Mitchison, H., Mitchison, N.A. and Müller, B. 1996. Non-classical-MHC genetics of immunological disease in man and mouse. The key role of pro-inflammatory cytokine genes. *Cytokine* **8**:593-597

M2 Mitchison, N.A., Müller, B., Mitchison, H., Clarke, J. and Daser, A. 1997. Two sources of programmed flexibility in the immune system: variation in structural and regulatory gene segments. In *Immunoregulation in Health and Disease*, Academic Press.

M3 Müller, B. and Mitchison, N.A.. 1997. The importance of the back-signal from T cells into antigen-presenting cells in determining susceptibility to parasites. *Phil. Trans. Roy. Soc. B.* **352**:1327-1330

M4 Baumgart M., Moos V., Schuhbauer D. and Müller, B. 1998. Differential expression of major histocompatibility complex class II genes on murine macrophages associated with T cell cytokine profile and protective/suppressive effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 6936-6940.

M5 Müller, B., Gimsa, U., Mitchison, N.A., Radbruch, A., Sieper, J. and Yin, Z. 1998. Modulating the Th1/Th2 balance in inflammatory arthritis. *Springer Sem. Immunopath.* **20**:181-196.

M6 Czerwony, G., Alten, R., Gromnica-Ihle, E., Hagemann, D., Reuter, U., Sörensen, H. and Müller, B. 1999. Differential surface expression of HLA-DRB1 and HLA-DRB4 among peripheral blood cells of DR4 positive individuals. *Hum. Immunol.* **60**: 1-9

M7 Mitchison, N.A., Müller, B. and Segal, R.M. 2000. Natural variation in immune responsiveness, with special reference to immunodeficiency and promoter polymorphism in class II MHC genes. *Hum. Immunol.* **61**:177-181

M8 Listing, J., Rau, R., Müller, B., Alten, R., Czerwony, G., Gromnica-Ihle, E., Hagemann, D. and Zink, A. 2000. HLA-DRB1 genes, rheumatoid factor and elevated CRP: nearly independent risk factors of radiographic progression in early RA. *J. Rheumatol.* **27**:2100-2109

M9 Mitchison, N.A., Schuhbauer, D. and Müller, B. 2000. Natural and induced manipulation of the Th1/Th2 balance. *Springer Sem. Immunopath.* **21**:199-210

M10 Schuhbauer, D.M.S., Mitchison, N.A. and Müller, B. 2000. Interaction within clusters of dendritic cells and helper T cells during initial Th1/Th2 commitment. *Eur. J. Immunol.* **30**:1255-1262

2 Einleitung

2.1 Autoimmunerkrankungen

Vor etwa 100 Jahren hat Paul Ehrlich die Vorstellung, daß es für den Organismus verheerende Folgen haben muß, wenn sich die in der Fremdadwehr so wirkungsvollen Antikörper gegen Selbst richten, *horror autotoxicus* genannt (Ehrlich und Morgenroth, 1901).

Seitdem sind eine Reihe von verschiedenen Erkrankungen beschrieben und als Autoimmunerkrankungen definiert worden, die durch eine fehlgesteuerte Immunantwort gegen Selbst charakterisiert sind. Dabei kann sich das Immunsystem - wie beim Diabetes mellitus - ausschließlich gegen ein einzelnes Organ richten oder es kann – wie beim systemischen Lupus erythematoses (SLE) – das gesamte System angreifen. Zwischen den organspezifischen und den systemischen Autoimmunerkrankungen liegt ein breites Spektrum an Mischformen, bei denen einzelne Organe in Verbindung mit dem System betroffen sind. Die zweithäufigste Autoimmunerkrankung ist die Rheumatoide Arthritis (RA), bei der sich die Immunantwort bevorzugt gegen bestimmte Hand- und Finger- sowie Fuß- und Zehengelenke richtet und auf das Bindegewebe des gesamten Systems übergreifen kann. Einer von 100 Erwachsenen ist von dieser Erkrankung betroffen.

Die Ätiologie und Pathogenese der meisten Autoimmunerkrankungen sind noch weitgehend ungeklärt. Aufgrund von Ergebnissen aus Zwillingsstudien weiß man jedoch, daß sowohl genetische als auch Umwelt-Faktoren eine Rolle spielen.

Autoimmunerkrankungen verlaufen fast immer chronisch progressiv, münden in der Zerstörung der betroffenen Organe und können bei einem schweren Verlauf mit Systembeteiligung zum Tod führen. Für die Betroffenen bedeutet diese Erkrankung ein lebenslanges Leiden, für das es bisher keine Heilung gibt und das eine fortlaufende medizinische Betreuung erfordert. Volkswirtschaftlich betrachtet kommt den Autoimmunerkrankungen sowohl durch die ununterbrochene medizinische Versorgung der Patienten als auch durch eine mit dem Krankheitsverlauf zunehmende Arbeitsunfähigkeit der Betroffenen eine große Bedeutung zu.

Eine Erforschung von Autoimmunerkrankungen muß folglich zum Ziel haben, die Ursachen der Entstehung sowie mögliche Pathomechanismen zu untersuchen, um eine Grundlage für neue Therapiekonzepte entwickeln zu können.

2.2 Toleranz und Autoimmunität

Das Immunsystem der Vertebraten dient dazu, den Organismus gegen Fremderreger zu schützen und somit das Überleben der Art zu gewährleisten. Die Mammalia verfügen über das am höchsten entwickelte Immunsystem, das sich in einen angeborenen, unspezifischen und einen erworbenen, spezifischen Zweig gliedert. Die Hauptprinzipien der erworbenen Immunabwehr bestehen darin, i) eine nahezu unendliche Vielzahl von Erregern spezifisch abzuwehren, ii) ein Gedächtnis auszubilden, um bei wiederholtem Kontakt den Erreger noch schneller eliminieren zu können und iii) Toleranz zu entwickeln, damit sich die Immunantwort nicht gegen Selbst richtet. Man geht heute davon aus, daß eine der Ursachen für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen in einer

fehlerhaften Toleranzentwicklung liegt.

Die spezifische Immunabwehr wird durch B- und T-Lymphozyten vermittelt, die membranständig klonotypische Antigenrezeptoren exprimieren. Diese Rezeptoren sind der Antikörper (Ak) auf den B-Zellen und der T-Zellrezeptor (TZR) auf den T-Zellen. Durch den Antikörper ist die B-Zelle in der Lage, spezifisches Antigen sowohl in gebundener als auch in löslicher Form zu erkennen. Die T-Zelle erkennt ihr Antigen grundsätzlich unterschiedlich von der B-Zelle und benötigt für die Erkennung des Antigens dessen Präsentation über Haupt-Histokompatibilitäts-Antigene (MHC) oder CD1-Moleküle. Die CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen (Tc) erkennen ein 8-11 Aminosäuren langes Peptid wenn es im Zusammenhang mit MHC I Molekülen präsentiert wird, die CD4-positiven Helfer T-Zellen (Th) benötigen für die Erkennung eines etwa 12-25 Aminosäuren langes Peptids die Präsentation über MHC II-Moleküle.

Beide, die B- und die T-Zelle durchlaufen eine Toleranzentwicklung, die jeweils in eine zentrale und eine periphere Toleranz mündet. Die zentrale Toleranzentwicklung findet für T-Zellen im Thymus statt, wo durch negative Selektion verhindert wird, daß T-Zellen mit einer hohen Affinität für Eigenantigene aus dem Thymus in die Peripherie entlassen werden. Für B-Zellen findet die zentrale Toleranzentwicklung wahrscheinlich noch im Knochenmark statt, wo durch den Prozeß des „receptor-editing“ dafür gesorgt werden könnte, daß Rezeptoren mit hoher Affinität für Eigenantigene ausgetauscht werden, bevor die B-Zelle in die Peripherie auswandert. In der Peripherie gesunder Menschen finden sich sowohl niedrig-affine autoreaktive T-Zellen als auch Autoantikörper und damit autoreaktive B-Zellen, ohne jemals pathologisch auffällig zu werden. Mit Hilfe der klonalen Deletion und der Anergie werden diese autoreaktiven B- und T-Zellen entweder entsorgt oder ruhig gestellt und so die periphere Toleranz aufrecht erhalten.

Mechanismen der zentralen Toleranz finden bereits während der Embryonalentwicklung statt, wohingegen die periphere Toleranz erst postnatal an Bedeutung gewinnt, wenn der Organismus mit Fremderregern konfrontiert wird und lernen muß, Fremd von Selbst zu unterscheiden. Die Tatsache, daß die meisten Autoimmunerkrankungen erst im Erwachsenenalter auftreten – Ausnahmen bilden hier die juvenile Arthritis, die Zöliakie und der Diabetes mellitus, die durchschnittlich im Alter von 2.5-9.8, 0.5-2, bzw. 12-20 Jahren auftreten – wird dahingehend gedeutet, daß bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen die periphere Toleranz durchbrochen wird weil die Mechanismen, die die periphere Toleranz im gesunden Zustand aufrecht erhalten, mit zunehmendem Alter nur noch fehlerhaft funktionieren.

2.3 Die Rolle von B- und T-Lymphozyten bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen

Ein großer Teil unseres heutigen Verständnisses über die Rolle von B- und T-Zellen bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wurde aus der Untersuchung von Tiermodellen, insbesondere von Mausmodellen, gewonnen. So wissen wir, daß für die Ausprägung von systemischen Autoimmunerkrankungen ein enges Zusammenspiel von T- und B-Zellen nötig ist. Systemische Autoimmunerkrankungen sind primär durch die Überproduktion von hoch-affinen Autoantikörpern des IgG-Isotyps charakterisiert, für deren Produktion T-Zell-Hilfe benötigt wird. Diese Autoantikörper richten sich beim SLE gegen Zellkern-Bestandteile und werden entweder

direkt oder als Immunkomplexe in den Glomeruli der Niere, der Haut, den Speicheldrüsen oder Gefäßen deponiert und führen dort zur Komplement-Aktivierung und Ligandierung von Fc-Rezeptoren. Es wurde lange Zeit angenommen, daß diese Immunkomplexe für die Entstehung der Erkrankung verantwortlich sind, indem sie mononukleäre Zellen anlocken und damit die Entzündungen einleiten. An einem Mausmodell für den SLE, den MRL/lpr-Mäusen, konnte allerdings kürzlich gezeigt werden, daß B-Zellen zwar für die Ausprägung der Erkrankung benötigt werden (Chan et al. 1998), es aber auch ohne Autoantikörper zu Nephritiden mit mononukleären Infiltraten kommen kann. Diese Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, daß die B-Zellen wahrscheinlich als Antigen-präsentierende Zellen für autoreaktive T-Zellen dienen und diese aktivieren (Chan et al. 1999). Für die Organ-spezifische Autoimmunerkrankungen nimmt man schon seit längerem an, daß die T-Zellen die größere Rolle spielen. Die Kollagen-induzierte Arthritis in der Maus (CIA), die als ein Modell für die Rheumatoide Arthritis gilt und in der Maus ausschließlich die Gelenke betrifft, kann durch den adoptiven Transfer von CD4⁺ Th-Zellen aus einem erkrankten auf ein gesundes Tier übertragen werden (Kadowaki et al. 1994). Auf der anderen Seite wurde für den „T-Zell vermittelten“ autoimmunen Diabetes erst kürzlich in NOD Mäusen gezeigt, daß auch hier B-Zellen für die Auslösung der Erkrankung benötigt werden (Serreze et al. 1998).

2.4 Bedeutung der regulatorischen T-Zellen bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen

Durch ihre Kontrollfunktion bei der Produktion von Autoantikörpern und bei chronischen Entzündungsprozessen kommt den regulatorischen oder Effektor Th-Zellen bei der Entstehung und dem Verlauf von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle zu.

Man geht davon aus, daß sich in einem gesunden Organismus die Typ 1- und die Typ 2 Effektor Th-Zellen im Gleichgewicht befinden. Am Beispiel der Leishmanien-Infektion in der Maus wird jedoch deutlich, daß es für den Ausgang einer erfolgreichen Immunabwehr von entscheidender Bedeutung ist, ob mit einer Typ 1- oder einer Typ 2 Antwort reagiert wird. C57/BL6 Mäuse, die mit einer starken Typ 1 Antwort auf die Infektion reagieren, eliminieren den Erreger und überleben. BALB/c Mäuse hingegen, die aufgrund eines Defekts in der IL-12R-Expression überwiegend mit einer Typ 2 Antwort reagieren können, sterben (Reiner and Locksley, 1995). Am Ende einer erfolgreichen Immunantwort soll das Typ 1/Typ 2-Gleichgewicht wiederhergestellt werden.

Das grundlegende Typ 1/Typ 2 Paradigma sieht vor, daß naive CD4⁺ Th-Zellen durch den spezifischen Kontakt mit professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) aktiviert und zur Produktion und Sekretion von sowohl pro-inflammatorischen Typ 1- als auch anti-inflammatorischen Typ 2 Zytokinen angeregt werden (s. Abb.1). Der primäre Kontakt zwischen Th- und Antigen-präsentierender Zelle – professionelle APZ sind die dendritischen Zellen (DZ), die B-Zellen und die Makrophagen (MΦ) – wird über den TCR und das mit Antigen beladene MHC II-Molekül auf der APZ hergestellt. Paare von Adhäsionsmolekülen sorgen dann für eine Stabilisierung der Interaktion und eine Aktivierung der Zellen sorgt für die erhöhte oder *de novo* Synthese von weiteren Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen. Wichtige kostimulatorische Moleküle auf der APZ sind das CD40, welches mit dem CD40-Liganden (CD40L) auf den Th-Zellen interagiert (Grewal and Flavell 1996), das B7, welches mit dem CD28 interagiert (Linsley and

Ledbetter, 1993), das LFA-3, welches mit dem CD2 interagiert (van Kooyk et al., 1989) und LFA-1, das mit dem ICAM-1 interagiert (Dustin et al., 1989), wobei sowohl LFA-1 und -2 als auch ICAM-1 auf Th-Zellen und auf APZ exprimiert werden. Die Stimulation von DZ über das CD40-Molekül sorgt auf den DZ für eine erhöhte Expression von B7 und ICAM, so daß die DZ in ihrer Funktion als APZ noch wirkungsvoller wird.

Auf den primären Kontakt zwischen Th- und APZ erfolgt eine Aktivierung der Th-Zelle, die zur Ausschüttung des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 führt (s.Abb.1). Zusätzliche Signale steuern dann die Differenzierung in Richtung einer Typ 1 oder Typ 2 Effektor Th-Zelle. Diese zusätzlichen Signale werden sowohl durch Zytokine als lösliche Faktoren als auch durch direkten zellulären Kontakt vermittelt und räumen somit der jeweiligen APZ eine wichtige Rolle am Ausgang einer Immunantwort ein. Während es noch weitestgehend unbekannt ist, welche Adhäsions- oder kostimulatorischen Moleküle an der Polarisierung in Richtung Typ 1 oder Typ 2 beteiligt sind, konnte bereits mehrfach gezeigt werden, daß DZ und MΦ mit einer IL-12-Ausschüttung auf die Stimulation über CD40 reagieren (Koch et al., 1996; Kato et al., 1996). Dieses IL-12 bedingt dann die Differenzierung der beteiligten Th-Zelle in Richtung einer Typ1 Effektor Th-Zelle (Germann et al., 1993; Seder et al., 1993). B-Zellen hingegen sekretieren kein IL-12 und spielen wahrscheinlich bei der Induktion von Typ 2 Effektor Th-Zellen die größere Rolle (s.Abb.2) (Stockinger et al., 1996).

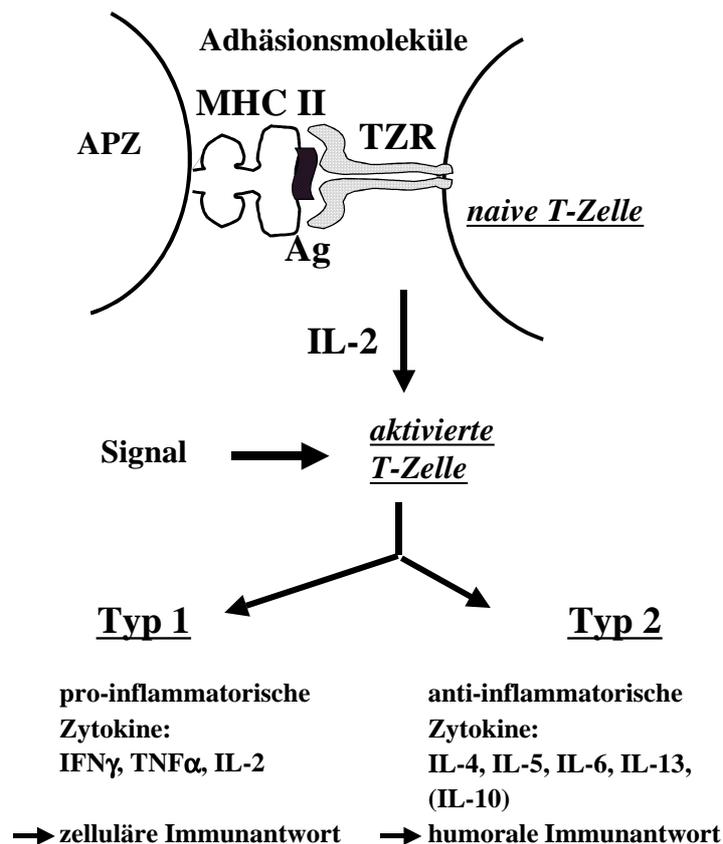


Abb.1 Schematische Darstellung der Interaktion zwischen naiver Th-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle (APZ). Der primäre Kontakt führt zur IL-2 Produktion der Th-Zelle. Die aktivierte Th-Zelle kann dann durch zusätzliche Signale zu einer Typ 1 oder Typ 2 Effektor Th-Zelle differenzieren, die durch ihre jeweilige Zytokinproduktion die zelluläre bzw. die humorale Immunantwort kontrolliert.

Im Gegensatz zu aktivierten humanen T-Zellen, die eine schwache MHC II-Expression zeigen, findet man auf murinen T-Zellen überhaupt kein MHC II-Moleküle exprimiert. Für die Maus schließt man deswegen eine Antigen-spezifische Interaktion zwischen Th-Zellen aus. Dennoch kommunizieren Th-Zellen über die sogen. „bystander“-Effekte miteinander. Bereits polarisierte Effektor Th-Zellen sind somit in der Lage, auf naive oder auch auf weniger differenzierte Th-Zellen einen Einfluß auszuüben.

Nach mehrmaligem Antigenkontakt verfestigt sich entweder das Typ 1- oder das Typ 2 Zytokin-Expressionsmuster, es entstehen die Typ 1 oder Typ 2 Effektor Th-Zellen und diese sind in ihrer Zytokinproduktion nur noch bedingt reversibel: Man geht davon aus, daß Typ1 Effektor Th-Zellen nicht mehr zur Typ 2-Zytokinproduktion gebracht werden können, da das STAT-6, welches das über den IL-4 Rezeptor (IL-4R) vermittelte und zur Typ 2- Differenzierung benötigte Signal weiterleitet, in terminal differenzierten Typ1 Effektor Th-Zellen schwächer exprimiert und unvollständig phosphoryliert wird (Huang and Paul, 1998). Typ 2 Effektor Th-Zellen hingegen können zu Typ 1 Effektor Th-Zellen revertieren, da der für die Typ 1 Differenzierung benötigte IFN γ Rezeptor (IFN γ R) auf Typ 2 Zellen durch entsprechend hohe Konzentrationen an IL-12 reinduziert werden kann (Guler et al., 1997).

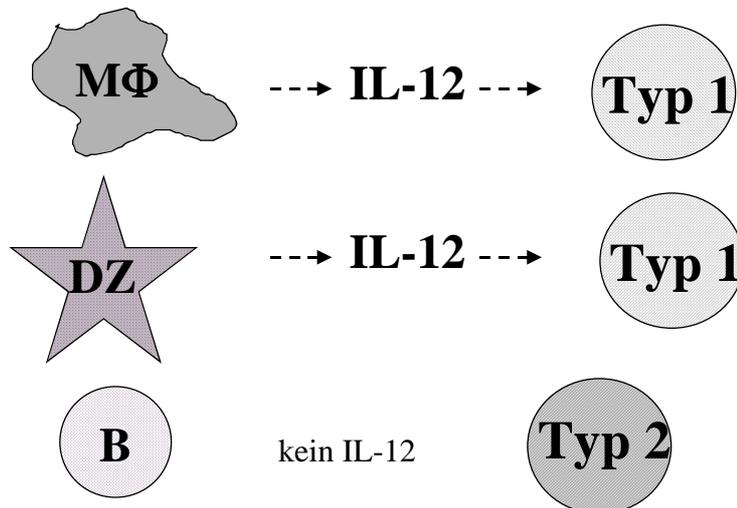


Abb.2 Die drei Typen der professionellen Antigen-präsentierenden Zellen und die von ihnen induzierten Effektor Th-Zellen. Durch die Sekretion von IL-12 begünstigen die Makrophagen (MΦ) und die dendritischen Zellen (DZ) eine Differenzierung zu Typ 1 Effektor Th-Zellen. Die B-Zellen (B) sekretieren kein IL-12 und fördern die Entwicklung von Typ 2 Effektor Th-Zellen, die dann T-Zellhilfe bieten.

Die Rheumatoide Arthritis ist eine chronisch entzündliche Erkrankung, bei der die Typ 1 Effektor Th-Zellen überwiegen (Müller et al., 1998). Dabei glaubt man, daß das für das chronische Stadium charakteristische Ungleichgewicht zugunsten der Typ 1 Zytokine durch einen Krankheits-auslösenden Prozeß, z.B. eine Infektion, eingeleitet wird. Aufgrund der Häufigkeit von RA und der – wenn auch ungleichen – Verteilung über die gesamte Erde können die auslösenden Erreger keine seltenen Keime sein. Warum also reagieren manche Individuen mit einer Immunantwort, die in einer chronisch entzündlichen Erkrankung mündet? Und würde eine stärkere Typ 2 Antwort zum richtigen Zeitpunkt die Typ1 Effektor Th-Zellen wieder in ein Gleichgewicht zurüchdrängen? Um diese Frage zu beantworten, muß man verstehen, wie die Zytokinexpression von Th-Zellen am besten manipuliert werden kann und wie Th-Zellen miteinander kommunizieren. Mit dieser

Problematik beschäftige ich mich in dem Kapitel „T-Zellkommunikation im 3-Zelltyp-Cluster“.

An dieser Stelle möchte ich auf den angeborenen Zweig des Immunsystems eingehen, der bei der Differenzierung zu Typ 1 oder Typ 2 Effektor Th-Zellen sicherlich eine größere Rolle spielt, als bisher angenommen wurde. Dabei ist sowohl die Effizienz, mit der Antigen präsentiert wird, von entscheidender Bedeutung als auch die Zytokinproduktion der APZ, die das jeweilige Antigen präsentiert, (s.Abb.2). Über die Zytokinproduktion kontrolliert die APZ die Antwort der mit ihr interagierenden Th-Zelle: Bei der Differenzierung zu Typ 1 Effektor Th-Zellen spielt IL-12 eine große Rolle, wobei IL-10 der Typ 1-Differenzierung entgegenwirkt (s.Abb. 3) (Mitchison et al., im Druck). Woher das initiale IL-4 kommt, von dem man annimmt, daß es für die Typ 2-Entwicklung benötigt wird, ist noch weitgehend unklar aber es werden sowohl die CD4⁺ Th-Zellen selbst als auch NK1.1⁺ Zellen diskutiert (Yoshimoto et al., 1994). Die Effizienz der Antigen-Präsentation hängt dann von der Antigen-Konzentration (Constant et al., 1995; Hosken et al., 1995) der Qualität und Quantität der kostimulatorischen Molekülen (Croft et al., 1992) und der MHC II-Dichte auf der jeweiligen Antigen-präsentierenden Zelle ab (Baumgart et al., 1998; Stockinger et al., 1996)

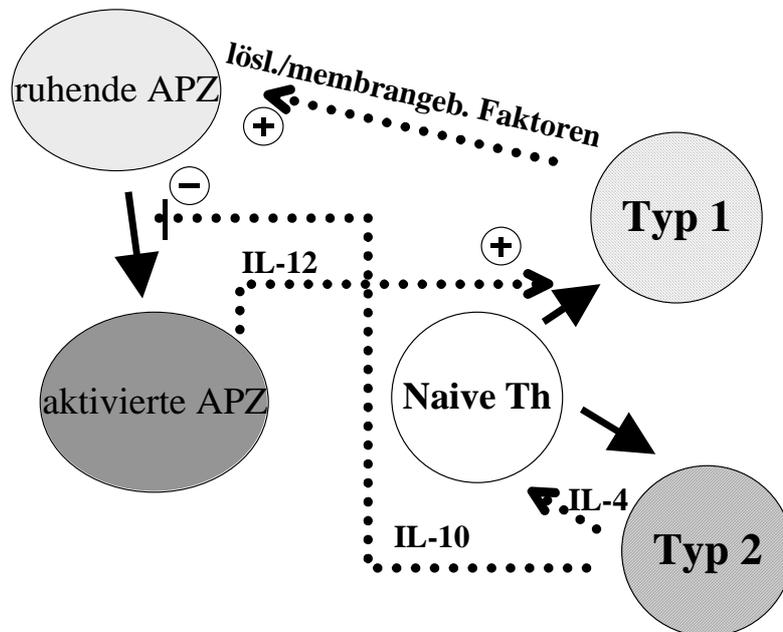


Abb. 3: Zusammenspiel verschiedener Zytokine bei der Typ 1-/Typ 2-Differenzierung. Typ 1 Effektor Th-Zellen aktivieren ruhende Antigen-präsentierende Zellen (APZ) und stimulieren sie zur IL-12 Produktion, die wiederum eine Typ 1-Differenzierung unterstützt. Von Typ 2 Effektor Th-Zellen sekretiertes IL-10 inhibiert die Aktivierung der APZ, verhindert dadurch die IL-12 Sekretion und begünstigt Typ 2-Differenzierungen. Durchgezogene Pfeile symbolisieren Differenzierungen, gestrichelte Pfeile und Linien symbolisieren die Richtung, in der Zytokine aktivierend (+) oder inhibierend (-) wirken.

Beide, die Rheumatoide Arthritis und ihr Mausmodell, die Kollagen-induzierte Arthritis, zeigen neben der Typ 1- auch eine Typ 2 Komponente. Rheumafaktor⁺ (RF⁺) Patienten, das sind Patienten mit erhöhtem Titer an Autoantikörpern gegen Immunglobuline, zeichnen sich z.B. durch einen schwereren Verlauf aus als RF- Patienten (Paimela et al., 1995). Und bei einigen Patienten findet man in den Synovialmembranen Infiltrate mit Keimzentrum-ähnlichen Strukturen, die auf Th-Zellhilfe und damit auf Typ 2-Zytokine hindeuten (Berek and Kim, 1997). Bei der Kollagen-

induzierten Arthritis in der Maus konnte zusätzlich gezeigt werden, daß für die Ausprägung der Erkrankung eine frühe Ausschüttung von Typ 2-Zytokinen nötig ist. Die Arthritis wurde verhindert, wenn die Mäuse zum Zeitpunkt der Immunisierung mit Kollagen zusätzlich mit einem IL-4-neutralisierenden Antikörper behandelt wurden (Hesse et al.1996).

2.5 Genetik von Autoimmunerkrankungen

Bei der Aufklärung genetischer Einflüsse auf die Entstehung von Autoimmunerkrankungen spielen Zwillingsstudien und die Analyse großer Familien mit mehreren betroffenen Individuen eine große Rolle. Tabelle 1 beschreibt die Häufigkeit verschiedener Autoimmunerkrankungen in der Gesamtbevölkerung, bei Geschwistern und bei monozygoten Zwillingen (Vyse and Todd, 1996 und Ollier and Symmons, 1992).

Die λ_s -Werte geben das Risiko für Geschwisterkinder von Patienten, an der gleichen Autoimmunerkrankung zu erkranken, an. Geschwisterkinder von RA-Patienten haben demnach im Vergleich zur Gesamtbevölkerung ein 8-fach höheres Risiko, ebenfalls an RA zu erkranken. Dass die Gene aber nicht die einzige Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen spielen, geht aus dem Erkrankungsrisiko monozygoter Zwillingspartnern hervor, wenn der erste Zwilling bereits unter einer Autoimmunerkrankung leidet. Bei dem SLE stellen die Gene fast 60% des Risikos zu erkranken dar, wohingegen bei der RA die Gene nur zu 32% beitragen und die Umweltfaktoren die weitaus größere Rolle zu spielen scheinen. Welche Umweltfaktoren für die Entstehung welcher Autoimmunerkrankung verantwortlich sind, ist noch völlig unklar. Bei den Genen beginnen wir langsam zu verstehen, welche eine Rolle spielen könnten und wir wissen mittlerweile, daß Autoimmunerkrankungen nicht durch einzelne sondern durch das Zusammenspiel mehrerer Gene ausgelöst werden. Aus dem Vergleich der λ_s - mit den MHC λ_s -Werten in Tabelle 1 geht hervor, daß die MHC-Gene in unterschiedlichem Ausmaß zu dem Risiko zu erkranken beitragen. Bei der Colitis ulcerosa stellen sie fast 70% und bei der RA 20% des genetischen Risikos (Tab. 1).

Tabelle 1: Häufigkeiten von Autoimmunerkrankungen in der Gesamtbevölkerung und in Familien

	Gesamt- bevölkerung	Geschwister	λ_s	monozygote Zwillinge	MHC λ_s
Psoriasis	2.8 %	17.0 %	6	n.b.	n.b.
Rheumatoide Arthritis	1.0 %	8.0 %	8	32 %	1.6
Diabetes mellitus	0.4 %	6.0 %	15	50 %	2.4
Colitis ulcerosa	0.1 %	1.2 %	12	n.b.	8.3
SLE	0.1 %	2.0 %	20	57 %	n.b.
Multiple Sklerose	0.1 %	2.0 %	20	25 %	2.4

n.b.: nicht bestimmt; λ_s = Risiko der Geschwister/Risiko in der Gesamt-Bevölkerung, zu erkranken

Welche Gene – zusätzlich zu den MHC-Genen – eine Rolle spielen könnten, wird hauptsächlich an Mausmodellen und mit Hilfe der Mikrosatelliten-Technik in Kombination mit Genom-Scans untersucht. In NOD- und in NZBxNZW Mäusen, Modelle für den Diabetes mellitus und den SLE, wurden insgesamt 26 bzw. 14 an der Entstehung der Erkrankung beteiligten Genloci beschrieben, wobei die einzelnen Gene noch nicht identifiziert sind (Vyse and Todd 1996; Vyse and Kotzin, 1998). Im Menschen konnte für den SLE bereits gezeigt werden, daß fehlerhafte Komplement-Komponenten, verringerte Komplement-Rezeptor Expression, Polymorphismen in Fc γ -Rezeptoren sowie durch einen Genpolymorphismus hervorgerufene reduzierte TNF α -Spiegel mit der Auslösung der Erkrankung assoziiert sind (Vyse and Kotzin, 1998).

Insgesamt haben die Zytokingene und dazugehörige Polymorphismen, die sich auf die Expression auswirken, im Zusammenhang mit der Genetik von Autoimmunerkrankungen eine hohe Aufmerksamkeit erlangt. Aber nur an wenigen Beispielen konnte tatsächlich eine Assoziation zwischen genetisch bedingter Über- oder Unterproduktion pro-inflammatorischer Zytokine und dem Auftreten einer Autoimmunerkrankungen gezeigt werden. Eines dieser Beispiele ist die ankylosierende Spondylitis, bei der der –308.1 Polymorphismus im TNF α -Gen mit dem Auftreten der Erkrankung assoziiert wurde (McGarry et al, 1999). Weitere Beispiele sind die frühkindliche Oligoarthritis Typ I und die RA, bei denen das Vorhandensein des IL-1A2-Allels mit dem Auftreten der Erkrankung (McDowell et al., 1995) bzw. mit erhöhten Krankheitsparametern korreliert wurde (Jouvenne et al., 1999).

Gemeinsam ist allen Autoimmunerkrankungen eine Assoziation mit bestimmten HLA-Haplotypen der Klasse I oder II (s. Tab. 2). Dabei gibt es sowohl positive als auch negative Assoziationen, die für die jeweilige Erkrankung krankheitsassoziierte, neutrale und protektive Haplotypen und Allele definieren. DRB1*03 und DRB1*04 sind z.B. positiv mit dem Diabetes mellitus assoziiert, wohingegen DRB1*02 negativ assoziiert ist und als protektiv gilt.

Bei der RA spielen ebenfalls die HLA-DRB1-Gene eine wichtige Rolle. Allerdings kann es in Abhängigkeit vom jeweiligen Patientengut erhebliche Unterschiede für die Häufigkeiten assoziierter HLA-Haplotypen geben. Da die RA von Patient zu Patient einen sehr unterschiedlichen Verlauf nehmen und von leichten Entzündungen in wenigen Gelenken bis zu vollständigen Erosionen mit Systembeteiligung das gesamte Spektrum abdecken kann, ergibt die Analyse einer gemischten frühen Kohorte andere Daten als die Analyse ausschließlich schwerer Fälle, die im späteren Verlauf der Erkrankung gezielt ausgesucht werden können (Listing et al., 2000; Weyand et al., 1995; Valenzuela et al., 1999).

Bei RA-Patienten kaukasischen Ursprungs, die die am besten untersuchte Patientengruppe darstellen, sind deutliche Unterschiede zwischen Rheumafaktor (RF)+ und RF- Patienten beschrieben worden. So haben Weyand et al. eine Kohorte beschrieben, bei der 91 % der RF+ Patienten – im Vergleich zu nur 22% der Kontrollen – Gene der Gruppe HLA-DRB1*04 tragen (Weyand et al., 1995). Bei RF- Patienten waren nur etwa 35 % positiv für Gene der Gruppe HLA-DRB1*04, dafür exprimierten 50 % der HLA-DRB1*04- RA-Patienten Gene der Gruppe HLA-DRB1*01. Bei den Kontrollen exprimierten nur 27 % Gene der Gruppe HLA-DRB1*01. Ferner konnten Weyand et al. bei kaukasischen RA-Patienten den Krankheitsverlauf mit dem

Tabelle 2: Assoziationen zwischen Autoimmunerkrankungen und HLA- Haplotypen

Erkrankung	HLA-Haplotyp	Häufigkeit in %	
		Patienten	Kontrollen
Ankylosierende Spondylitis	HLA-B27	90	9
Reaktive Arthritis	HLA-B27	79	9
Rheumatoide Arthritis	DRB1*04	69	34
Frühkindl. Polyarthritis	DRB1*11	55	25
	DRB1*08	38	7
	DPB1*0201	61	21
SLE	DRB1*03	66	25
Diabetes mellitus	DRB1*03	52	25
	DQB1*0201	66	45
	DRB1*04	77	34
	DQB1*0302	60	14
	DRB1*02	7	28
	DQB1*0602	3	17
	Zöliakie	DRB1*03	78
Myasthenia gravis	DRB1*03	45	25
Multiple Sklerose	DRB1*02	61	28

Aus Ollier and Symmons, 1992

Vorhandensein bestimmter HLA-DRB1-Gene korrelieren (Weyand et al., 1995): Das Gen DRB1*0401 wurde mit den schwersten Krankheitsverläufen in Verbindung gebracht, gefolgt von DRB1*0404 und DRB1*0101.

Als protektiv im Zusammenhang mit der RA und dem Diabetes mellitus sind Gene der Gruppen HLA-DRB1*05, *07 und am deutlichsten der Gruppe *02 beschrieben worden (Lang et al., 1990; Stastny et al., 1988; Todd et al., 1987). Innerhalb eines Kontroll-Kollektivs exprimieren etwa 28 % HLA-DRB1*02, bei RA-Patienten sind es nur 16 % und bei Diabetes mellitus Patienten findet man – je nach Studie – 7% und weniger HLA-DRB1*02 positive Patienten (Stastny et al., 1988).

Die Mechanismen, mit denen die HLA-Gene Empfänglichkeit gegenüber Autoimmunerkrankungen bzw. Schutz davor vermitteln, sind weitgehend unbekannt und ihnen gilt mein besonderes Interesse. Für die mit der RA assoziierten HLA-Gene DRB1*0101, *0404 und *0408 wurde eine strukturelle Gemeinsamkeit gefunden, die auf der Aminosäuresequenz QRRAA in der dritten hypervariablen Region des MHC-Moleküls, welche die Peptid-bindende Grube bildet, beruht. Geringfügige Variationen davon findet man bei DRB1*0401 (QKRAA) und DRB1*10 (RRRAA) (Hall et al., 1996). Diese Homologien haben zu der „shared epitope“ Hypothese geführt. Die „shared epitope“ Hypothese beinhaltet, daß MHC-Moleküle mit den o.a. Homologien in der Peptid-bindenden Grube die krankheits-induzierenden Peptide binden und den T-Zellen präsentieren können und damit die Autoimmunreaktion ermöglichen (Gregersen et al., 1987). Alternativ könnten

die MHC-Moleküle selbst die krankheitsinduzierenden Peptide liefern (Zanelli et al., 1996; Paul et al., 1993) und an der Formung des T-Zellrezeptor-Repertoires mitwirken.

Obwohl die „shared-epitope-Hypothese“ zunächst viele Anhänger gefunden hat, birgt sie doch mehrere Unstimmigkeiten. Abb. 4 listet alle bisher in der Genbank deponierten HLA-DRB1-Allele auf, die durch ein „shared epitope“ charakterisiert sind. Da wesentlich mehr Gene ein „shared epitope“ tragen, als mit der RA assoziiert sind, muß man zusätzliche Faktoren annehmen, die die Entstehung der RA beeinflussen. Des weiteren geht aus Tabelle 2 hervor, daß sowohl die RA als auch der Diabetes mellitus mit DRB1*04-Genen assoziiert sind. Es ist schwer vorzustellen, daß beide Erkrankungen durch das gleiche oder ein ähnliches krankheitsinduzierendes Peptid hervorgerufen werden bzw. daß beide Erkrankungen dasselbe T-Zellrezeptor-Repertoire benötigen. Noch unverständlicher ist die Situation für DRB1*03-Gene, die sowohl mit dem Diabetes mellitus, dem SLE, der Zöliakie u.a. assoziiert sind.

	10	30	50	70	90		
Kons.	RFLLELLKSECHF	FNGTERVRF	LFLERHFHFNQEEYARF	DSVGEYRAVRELGR	PDAEYWNSQKDLLE	QKR QVDNYCRHNYGVVESP	TVQRRVHPQVTVYPA
*0101	---WQ--F-----	-----L--CIY---SV-----	-----T-----	-----	-----	R-AA --T-----G-----E-K-----S	
*0104	---WQ--F-----	-----L--CIY---SV-----	-----T-----	-----	-----	R-AA --T-----E-K-----S	
*0401	---QV-H-----	-----D-Y-YH---V-----	-----T-----	-----	-----	K-AA --T-----G-----Y-E-----	
*0404	---QV-H-----	-----D-Y-YH---V-----	-----T-----	-----	-----	R-AA --T-----Y-E-----	
*0405	---QV-H-----	-----D-Y-YH---V-----	-----T-----S-----	-----	-----	R-AA --T-----G-----GER-----	
*0408	---QV-H-----	-----D-Y-YH---V-----	-----T-----	-----	-----	R-AA --T-----G-----	
*0409	---QV-H-----	-----D-Y-YH---V-----	-----T-----S-----	-----	-----	K-AA --T-----G-----	
*0410	---QV-H-----	-----D-Y-YH---V-----	-----T-----S-----	-----	-----	R-AA --T-----	
*0413	---QV-H-----	-----D-Y-YH---V-----	-----T-----	-----	-----	K-AA --T-----	
*0416	---QV-H-----	-----D-Y-YH---V-----	-----T-----Q-----	-----	-----	K-AA --T-----G-----	
*1113	YST-----	-----D-Y-----FV-----F-----T-----E-----	-----	-----	-----	R R-AA --T-----	
*1406	---YST-----	-----D-Y-----NV-----T-----	-----	-----	-----	R-AA --T-----	
*1409	---YST-----	-----D-Y-----NV-----T-----	-----	-----	-----	R-AA --T-----G-----	
*1412	---YST-----	-----D-Y-----NV-----F-----T-----	-----	-----	-----	R-AA --T-----	
*1413	---YST-----	-----D-Y-----NV-----T-----S-----	-----	-----	-----	R-AA --T-----G-----	
*1418	---YST-----	-----D-Y-----FV-----F-----T-----E-----	-----	-----	-----	R R-AA --T-----	
*0811	YSTG-----	-----D-Y-----FV-----F-----T-----E-----	-----	-----	-----	R R-AA --T-----	
*1001	---EV--F-----	-----L-RV-----Y-----T-----	-----	-----	-----	R R-AA --T-----G-----Q-K-----S	

Abb.4 Aminosäuresequenz aller DRB1-Allele mit einem "shared epitope". Die Abbildung zeigt den jeweiligen Vergleich mit der Konsensus-Sequenz, die in der obersten Zeile steht. Übereinstimmungen sind durch einen Strich, Unterschiede durch die entsprechende Aminosäure gekennzeichnet. Die dem "shared epitope" entsprechende Sequenz ist fett gedruckt, die Namen der Allele stehen links.

Wie also könnte man die Assoziation von ganzen Gruppen von Autoimmunerkrankungen mit bestimmten HLA-Haplotypen erklären? Bevor ich mein Modell, mit dem ich diese Frage zu beantworten suche und um das sich die vorliegende Arbeit dreht, vorstelle, möchte ich noch einmal auf die Maus zurückkommen. In der Maus gibt es eine Reihe von Beobachtungen, die andeuten, daß den protektiven MHC-Allelen eine weitaus größere Bedeutung zukommt als bisher angenommen. Das Mausmodell für die RA, die Kollagen-induzierten Arthritis (CIA), zeigt – ebenfalls wie die RA – eine deutliche Assoziation mit MHC II-Genen und kann nur in Mausstämmen des H-2q oder H-2r Haplotyps ausgelöst werden (Holmdahl et al., 1992; Gonzalez-Gay et al., 1994). Als protektiv im Zusammenhang mit der CIA gelten das I-Ab sowie das I-E Molekül. Beide sind zusätzlich bei der Ausbildung von Antikörpern (Brunner et al., 1995) oder bei der Entstehung des Diabetes in NOD-Mäusen (Hanson et al., 1996) als immunsuppressiv bzw.

protektiv definiert worden. Das Vorhandensein von nur einem protektiven Allel hat in F1-Mäusen, die einen protektiven und einen krankheitsassoziierten I-Aq Haplotypen exprimieren, ausgereicht, die Entstehung der CIA zu verhindern bzw. den Verlauf stark abzuschwächen (Lund et al., 1990; Merino et al., 1993; Mitchison and Brunner, 1995; Nishimoto et al., 1987; Oliveira et al., 1985; Uehira et al., 1989).

Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß die protektiven Allele einem aktiven Wirkungsmechanismus unterliegen. Sie könnte ferner bedeuten, daß das Vorhandensein zweier krankheits-assoziiertes HLA-Allele deswegen zu einem schwereren Krankheitsverlauf führt, weil kein protektives Allel entgegenwirkt.

Ich möchte nun mein Modell der differentiellen MHC II-Expression, mit dem sich ein aktiver Wirkungsmechanismus der protektiven Allele erklären läßt, einführen. Dieses Modell sieht vor, daß die verschiedenen MHC II-Moleküle auf den unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) unterschiedlich stark exprimiert werden. Aus einer quantitativ differentiellen Expression der verschiedenen Haplotypen folgen Unterschiede in den jeweiligen Interaktionen zwischen Th- und Antigen-präsentierenden Zellen, daraus folgen unterschiedliche Polarisierungen der Th-Zell-Antworten und schließlich eine Prädisposition für oder Schutz vor Autoimmunerkrankungen (s. Abb. 5).

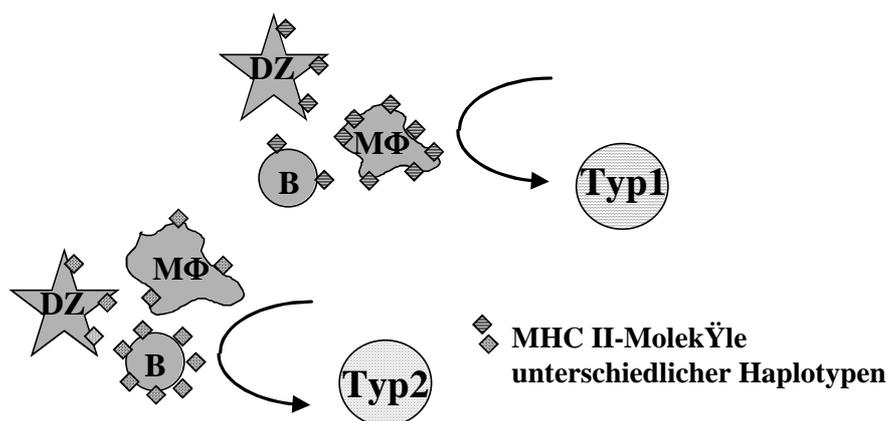


Abb.5 Modell der differentiellen Expression von MHC II-Genen. Quantitative Unterschiede in der Dichte von MHC II-Molekülen auf der Oberfläche der jeweiligen APZ bedingen quantitative Unterschiede in der Interaktion mit Th-Zellen und resultieren somit in unterschiedlichen Polarisierungen.

Durch eine stete Polarisierung des Immunsystems in Richtung von Typ 1 Effektor Th-Zellen würden solche Autoimmunerkrankungen, die durch ein Überwiegen der Typ 1 Zytokine charakterisiert sind, in ihrer Entstehung und/oder ihrem Fortlauf begünstigt. Alternativ wäre denkbar, daß die Typ 2 Zytokin-Ausschüttung, die z.B. für die Induktion der CIA benötigt wird, durch die Polarisierung in Richtung Typ 1 Effektor Th-Zellen unterbunden wird und es dadurch zum Schutz vor der Erkrankung kommt. Umgekehrt würde eine Polarisierung des Immunsystems in Richtung von Typ 2 Effektor Th-Zellen diejenigen Autoimmunerkrankungen begünstigen, die durch ein Überwiegen der Typ 2 Zytokine gekennzeichnet sind.

Gibt es bereits Hinweise auf eine differentielle Expression der MHC II Gene? Eine Korrelation von unterschiedlichen H-2 Haplotypen und unterschiedlicher Zytokinproduktion wurde zum ersten Mal im 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD)-System beschrieben, wo kongene Mäuse, die entweder den H-2k oder den H-2b Haplotypen tragen, mit allo-HPPD immunisiert wurden. Innerhalb von 24 Stunden nach der Immunisierung reagierten die H-2k Mäuse mit einer IL-4 Ausschüttung und später mit einer Antikörperproduktion. In Mäusen mit dem immunsuppressiven H-2b Haplotyp und auch in H-2k x H-2b F1-Mäusen hingegen konnte weder eine IL-4 Ausschüttung noch eine Antikörperantwort beobachtet werden (Brunner et al. 1995).

Die bereits erwähnte frühe IL-4 Ausschüttung, die mit der Auslösung der CIA in empfänglichen Mäusen korreliert ist, konnten Hesse et al. zeigen, indem sie die Entstehung der Erkrankung durch die Gabe von neutralisierenden anti-IL-4 Antikörpern zum Zeitpunkt der Immunisierung mit Kollagen verhindern konnten (Hesse et al., 1996). Ferner wurde für den I-A β^b -Promotor ein einzelner Basenpaar-Austausch gefunden, der diesen Promotor von allen anderen I-A β -Promotoren unterscheidet und in einer Makrophagen-Zelllinie zu einer erhöhten Transkription des Reportergens führt (Janitz et al., 1997). Unter der Voraussetzung, daß sich eine erhöhte Transkription auch in der Proteinexpression niederschlägt und die I-A α -Kette nicht limitierend ist, würde man auf Makrophagen eine erhöhte Dichte an I-A b Molekülen und damit eine erleichterte Interaktion mit I-A b restringierten T-Zellen erwarten.

Mein Ziel bei der vorliegenden Arbeit war es, die differentielle MHC II Expression im Menschen und in der Maus nachzuweisen und eine funktionelle Bedeutung mit dieser Expression verbinden zu können. Ferner möchte ich einen Weg aufzeigen, in bestehende Typ 1/Typ 2 Ungleichgewichte, wie sie für Autoimmunerkrankungen charakteristisch sind, einzugreifen, um eine Abschwächung der Autoimmunreaktion zu bewirken.

3 Ergebnisse

3.1 Differentielle Expression der MHC II Gene in der Maus

3.1.1 in vivo Analyse der differentiellen MHC II Expression

3.1.1.1 B-Zellen stellen den größten Anteil an APZ im Lymphknoten

In der Maus gibt es zwei verschiedene MHC II Moleküle, das I-A und das I-E, die zusammen den H-2 Haplotypen bestimmen. Um die MHC II-Expression auf den verschiedenen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) im Verlauf einer Immunantwort zu untersuchen, wurden B10. Mäuse mit jeweils 200 µg KLH in Adjuvans nahe der Schwanzwurzel immunisiert, die ableitenden Lymphknoten nach 12, 36, 50 bzw. 98 Stunden isoliert, zu Einzelzell-Suspensionen verarbeitet und die B-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen wurden mit Zelltyp- sowie MHC II-spezifischen Fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern (mAk) angefärbt und im Durchflußzytometer analysiert. So konnten die Anteile der B220⁺ B-Lymphozyten an den mononukleären Zellen der Lymphknoten mit im Mittel 25% zu Beginn der Immunantwort und 35% nach 41/2 Tagen als zahlenmäßig stärkste APZ-Population ermittelt werden (Abb. 6A). Die Anteile der CD11b⁺ Makrophagen schwankten zwischen 2.5% am Tag 0.5 und 3.2 am Tag 4.5 und erreichten den maximalen Anteil von 4% am Tag 1.5. Die CD11c⁺ dendritischen Zellen stellten die kleinste Population und erreichten ihren maximalen Anteil von 0.5% am Tag 2.5 (Abb. 6A). Diese Analysen wurden mit 5 verschiedenen kongenen B10. Mausstämmen durchgeführt, deren I-A und I-E Moleküle in Tabelle 3 aufgelistet sind. Die jeweiligen Anteile der APZ-Populationen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung waren für alle 5 getesteten Stämme identisch.

3.1.1.2 Differentielle Expression der MHC II Gene auf Lymphknoten-Makrophagen

Parallel zu der Bestimmung der Anteile der APZ im Lymphknoten wurde die Expression der MHC II Moleküle auf den verschiedenen APZ im Verlauf einer Immunantwort untersucht. Die Expression der MHC II Moleküle wurde als mittlere Fluoreszenzintensität (mFi) und Veränderungen in der Expression im Verlauf der Immunantwort als Anstieg der mFi gemessen. Die für die einzelnen Haplotypen ermittelten mFi können nicht direkt miteinander verglichen werden, da sie durch unterschiedliche mAk hervorgerufen werden. Wir haben deshalb für jeden Haplotypen die mFi auf B-Zellen zu Beginn der Immunantwort als Bezugspunkt gewählt und als 1 festgelegt, um dann eine Veränderung in der MHC II Expression und die Expression auf dendritischen Zellen und Makrophagen mit der frühen Expression auf B-Zellen vergleichen zu können. Anschließend konnte die Verteilung der MHC II Expression bei den verschiedenen Haplotypen miteinander verglichen werden (Abb. 6B). Wir konnten so für beide, die I-A^q und die I-E^k Expression auf B-Lymphozyten einen langsamen Anstieg zeigen, der sich nach 4.5 Tagen mit einer 3-4fach höheren mFi beschreiben läßt. Dendritische Zellen exprimieren die meisten MHC II Moleküle und sind durch eine 20-30fach höhere mFi als B-Lymphozyten charakterisiert, die sich im Verlauf der Immunantwort kaum verändert. In bezug auf die MHC II Expression auf B-Zellen und dendritischen Zellen ähneln sich die verschiedenen Haplotypen sehr (nicht alle Daten sind

gezeigt). Allerdings gibt es in bezug auf die MHC II Expression auf Makrophagen Unterschiede und Abbildung 6B zeigt mit dem Verlauf der Expression vom I-A^q im

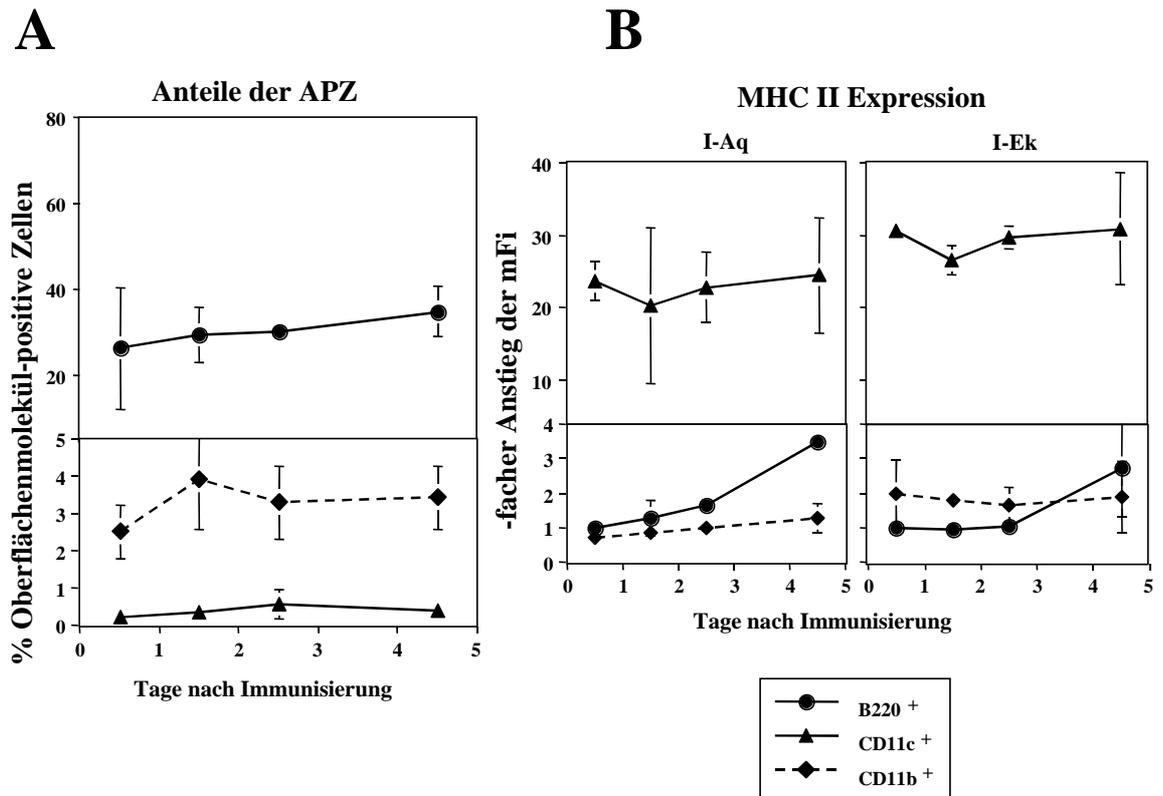


Abb.6 APZ-Populationen und MHC II Expression im Verlauf einer Immunantwort. In A sind die Anteile der B220⁺ B-Zellen, CD11c⁺ dendritischen Zellen und der CD11b⁺ Monozyten in % der mononukleären Lymphknoten-Zellen im Verlauf einer Immunantwort dargestellt. B zeigt die I-A^q und die I-E^k Expression auf B220⁺, CD11c⁺ und CD11b⁺ Zellen. Um einen Vergleich der mFi zu ermöglichen, ist die MHC II Expression auf den B220⁺ B-Zellen jeweils zu Beginn der Immunantwort als 1 festgelegt und alle weiteren Messungen beziehen sich auf diesen Wert.

Vergleich zum I-E^k Molekül die beiden beobachteten Extreme: Obwohl sich die Expression beider Moleküle auf Makrophagen im Verlauf der Immunantwort kaum ändert, ist die mFi für das I-E^k Molekül am Tag 0.5 etwa doppelt so hoch wie auf B-Zellen und es dauert bis nach Tag 3, bis B-Zellen und Makrophagen die gleiche mFi zeigen. Erst am Tag 4 ist die mFi auf B-Zellen höher als auf den Makrophagen. Anders für das I-A^q Molekül: Hier ist die mFi auf B-Zellen von Anfang an höher als auf den Makrophagen (Abb. 6B) und deutet bereits auf eine differentielle Expression der MHC II Moleküle auf den Makrophagen hin.

3.1.2 *in vitro* Analyse der MHC II Expression auf den Antigen-präsentierenden Zellen

3.1.2.1. Verlängerte Expression zweier protektiver Allele auf Knochenmark-Makrophagen

Um die Kinetik der MHC II Expression auf Makrophagen untersuchen zu können, wurde das

Knochenmark verschiedener Mausstämme isoliert und in konditioniertem Medium – bestehend aus 30% L929 Überstand (Stanley et al., 1978) – für 25 Tage kultiviert und so die Entwicklung von Knochenmark-Makrophagen ermöglicht. Über diesen Zeitraum wurden die CD11b Expression als Maß für die Entwicklung von adherent wachsenden Makrophagen sowie die MHC II Expression als Differenz zwischen der mFi ungefärbter und gefärbter Makrophagen gemessen. Nach etwa 7 Tagen enthielten alle Kulturen zwischen 95 und 99% CD11b⁺ Zellen, wobei die CD11b Expression über den Zeitraum von 25 Tagen – ebenfalls in allen Kulturen – langsam abnahm (s. Abb. 7). Bei der Messung der MHC II Expression haben wir uns auf die als protektiv/immunsuppressiv beschriebenen I-A^b und I-E^k, auf die als neutral geltenden I-A^d und I-A^k sowie auf das mit der CIA assoziierte I-A^q Molekül konzentriert.

Für die I-A^b und I-E^k Expression auf Knochenmark-Makrophagen konnte gezeigt werden, dass die Kinetiken der MHC II Expression etwa parallel zur CD11b Expression verlaufen, d.h. langsam über die 25 Tage *in vitro* Kultur abfallen (Abb. 7). Die Kinetiken der der I-A^d, I-A^k und I-A^q Expression hingegen fallen sehr schnell ab und nach 20 Tagen läßt sich eine spezifische Anfärbung mit mAk nur noch schwach beobachten. Durch die Analyse von BALB/c Mäusen, der F1 aus B10.A(5R) und BALB/c, sowie CBA/J Mäusen, DBA/1 Mäusen und der F1 aus DBA/1 und B10.Q konnten wir ausschließen, dass die differentielle Expression auf den B10.-Hintergrund beschränkt ist (Abb. 7).

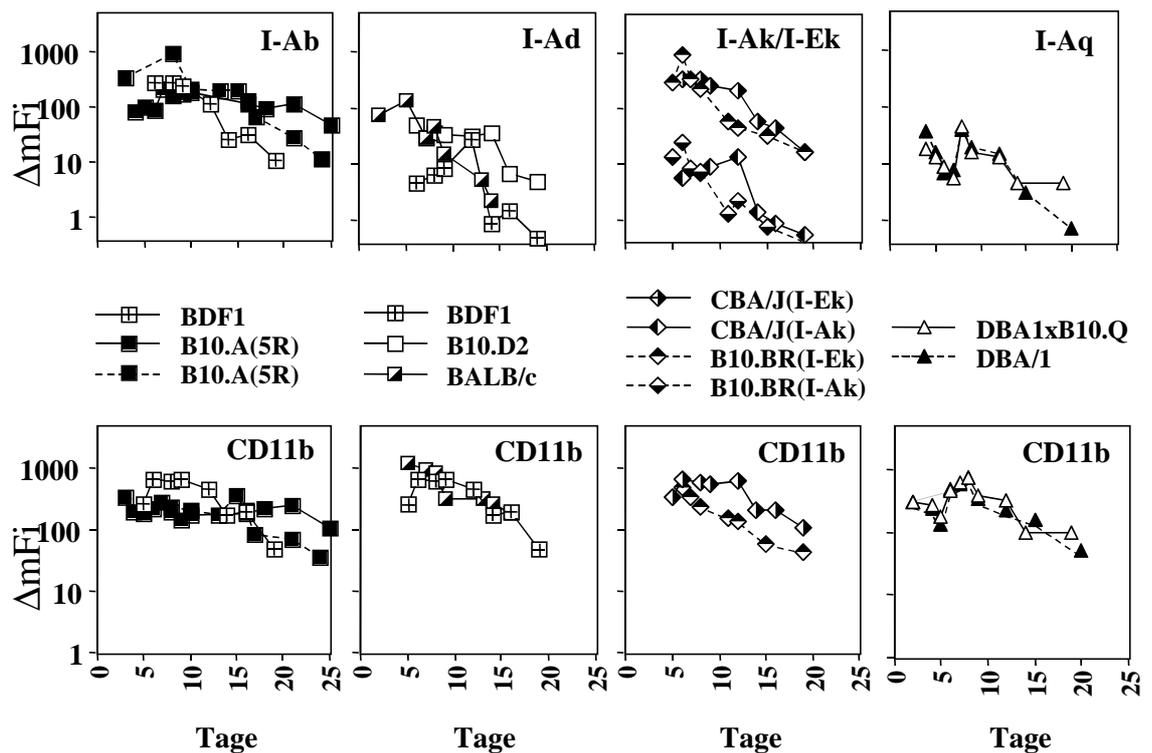


Abb.7 Kinetiken der CD11b und MHC II Expression auf Knochenmark-Makrophagen. Die Expression ist als ΔmFi , als Differenz zwischen der mFi gefärbter und ungefärbter Zellen, angegeben. Die Angabe der Mausstämme ermöglicht die Zuordnung der Symbole zu den jeweiligen MHC II Molekülen. Um individuelle Unterschiede auszugleichen, wurde für jede Kurve das Knochenmark von 6-10 Mäusen vereinigt.

3.1.2.2. Die differentielle MHC II Expression ist auf die Makrophagen beschränkt

Die Quantifizierung der verschiedenen MHC II Moleküle auf den Antigen-präsentierenden Zellen wurden sowohl an frisch aus der Maus isolierten als auch an *in vitro* aktivierten B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen unterschiedlicher Haplotypen durchgeführt. Frische Zellen wurden aus den Milzen nicht-immunisierter Mäuse isoliert und durch die Anfärbung mit mAk gegen B220, CD11b oder CD11c identifiziert. Aktivierte Zellen waren frische B220⁺ Milzzellen, die für 24 Stunden mit 5µg/ml LPS stimuliert worden waren, Knochenmark-dendritische Zellen, die mit 100U/ml TNF α zur terminalen Differenzierung angeregt waren (Inaba et al. 1992) und adherent gewachsene Knochenmark-Makrophagen. Für die Quantifizierung wurden "Quantum Simply Cellular Microbeads" verwendet, die aus 5 verschiedenen Populationen von Partikeln bestehen, die jeweils eine definierte Menge von Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche tragen und damit eine definierte Bindungskapazität für Maus IgG Antikörper besitzen. Mit diesen Microbeads wurde für jeden anti-MHC II mAk eine Kalibrierungs-Kurve erstellt, um die durch den jeweiligen mAk hervorgerufene Fluoreszenz-Intensität mit einer Bindungskapazität korrelieren zu können, die man dann als Maß für die Expression des entsprechenden MHC II Moleküls verwendet.

Insgesamt wurde die Oberflächenexpression 5 verschiedener MHC II Moleküle, des I-E^k, I-A^b, I-A^d, I-A^k und I-A^q, quantifiziert (Abb. 8). Auf frischen B-Zellen schwankt die MHC II Expression je nach Haplotyp zwischen 28.000 und 61.000 und auf LPS-aktivierten B-Zellen zwischen 230.000 und 480.000 Molekülen/Zelle, ohne signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Haplotypen. Frische dendritische Zellen exprimieren zwischen 35.000 und 205.000 und terminal differenzierte dendritische Zellen aus dem Knochenmark exprimieren die meisten MHC II Moleküle/Zelle, nämlich zwischen 2×10^6 und 7.5×10^6 . Auch bei den dendritischen Zellen gab es keine signifikanten Unterschiede in der Expression der verschiedenen Haplotypen, der größte Unterschied war 6-fach und wurde zwischen I-E^k und I-A^q gemessen (Abb. 8). Auf frische Makrophagen war die MHC II Expression am niedrigsten, betrug zwischen 3.400 und 7.200 Molekülen/Zelle und war für alle Haplotypen ähnlich. Deutlich wurde die differentielle Expression auf aktivierten Knochenmark-Makrophagen, wo etwa 680.000 I-E^k und 607.000 I-A^b Moleküle aber nur 7.000 I-A^q Moleküle/Zelle gemessen wurden. Hier ist die Expression der als protektiv/immunsuppressiv beschriebenen MHC II Moleküle 100-fach stärker als die des mit der CIA assoziierten I-A^q.

3.1.3 Immun-Deviation durch differentielle MHC II Expression auf den Makrophagen

Um eine physiologische Bedeutung der differentiellen MHC II Expression bei der Immunantwort zu untersuchen, wurden die Zytokinantworten von *in vitro* restimulierten T-Zellen, die durch differentiell exprimierte MHC II Moleküle restringiert waren, untersucht und miteinander verglichen. Dazu wurden F1-Mäuse, die jeweils einen auf Makrophagen hoch exprimierten und einen auf Makrophagen niedrig exprimierten parentalen Haplotyp tragen, mit cI_g oder KLH als Antigen in Adjuvans immunisiert. Am Tag 7 nach der Immunisierung wurden die ableitenden Lymphknoten entnommen, die T-Zellen in Gegenwart von Antigen und Knochenmark-Makrophagen, die entweder den väterlichen oder mütterlichen MHC II Haplotypen exprimieren, restimuliert und die resultierende Zytokinantwort gemessen. Das experimentelle Schema ist in Abbildung 9 dargestellt.

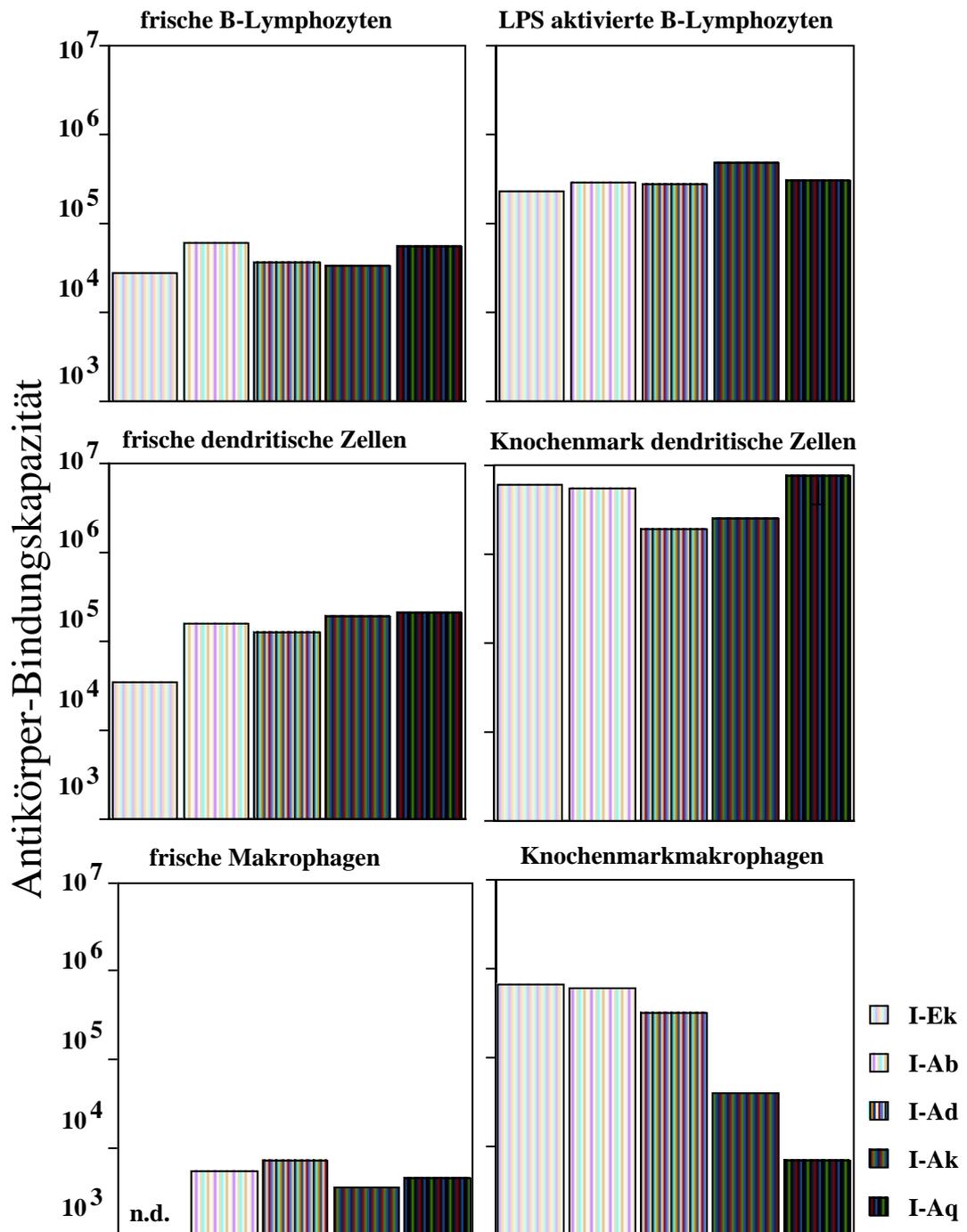


Abb.8 Differentielle MHC II Expression auf APZ. Für die Analyse frischer und für 24 Stunden LPS-aktivierter B-Zellen wurden je 3-5 Milzen gepoolt und in Doppelfärbungen mit mAk gegen B220 und das entsprechende MHC II Molekül untersucht. Für die Analyse frischer Makrophagen und dendritischer Zellen wurden ebenfalls 3-5 Milzen vereinigt und über Tripelfärbungen mit mAk gegen CD11b, CD11c und das entsprechende MHC II Molekül untersucht. Für die Analyse der Knochenmark-Makrophagen wurde das Knochenmark aus Tibia und Femur von je 10 Mäusen vereinigt, in konditioniertem Medium mit 30% L929 Überstand kultiviert und am Tag 7 der Kultur (vgl. mit Abb. 7) in Doppelfärbungen mit mAk gegen CD11b und das entsprechende MHC II Molekül untersucht. Für die Analyse der dendritischen Zellen aus dem Knochenmark wurde wieder das Mark aus Tibia und Femur von je 5 Mäusen vereinigt, in Gegenwart von rGM-CSF kultiviert, am Tag 6 der Kultur mit rTNF α stimuliert und am Tag 7 in Doppelfärbungen mit mAk gegen CD11c und das entsprechende MHC II Molekül untersucht.

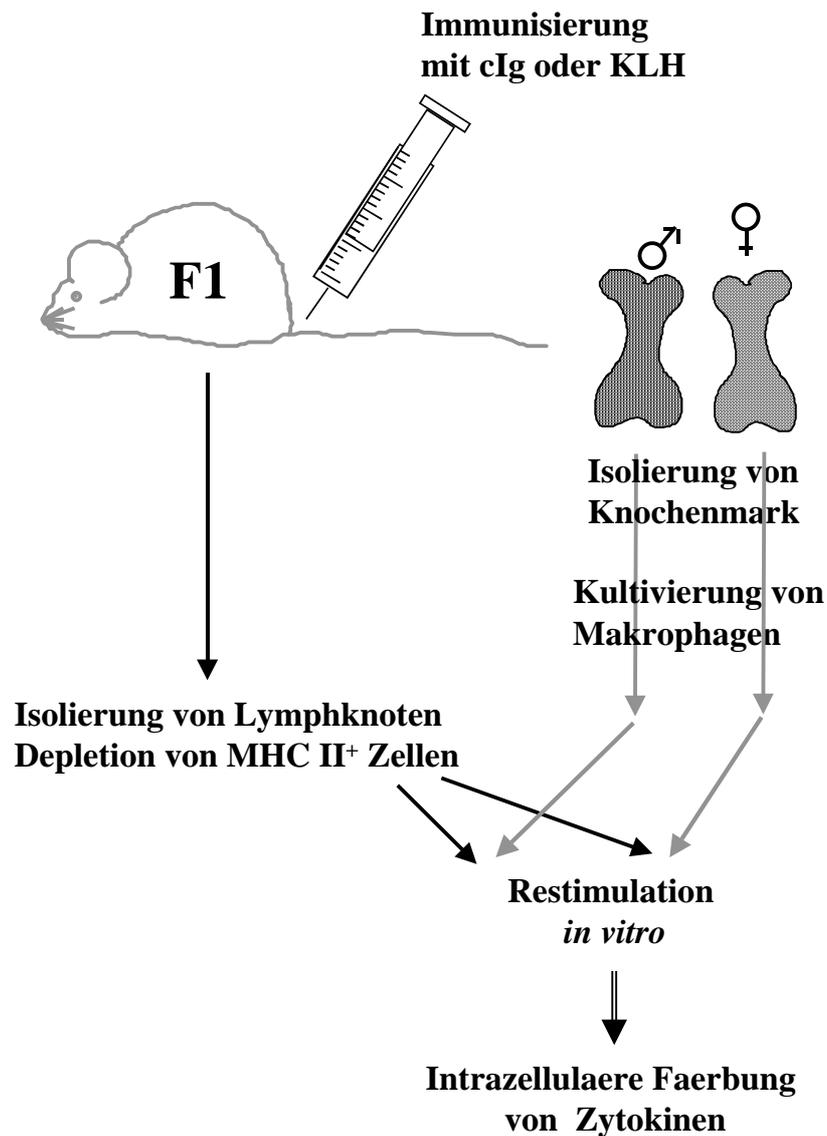


Abb.9 Experimentelles Schema bei der Messung von T-Zellantworten in Abhängigkeit vom restringierenden MHC II Haplotyp. Kongene F1 Mäuse wurden mit 250µg cIg (Hühner-Immunglobulin) oder KLH (Keyhole Limpet Hämocyanin) in Adjuvans immunisiert. Die ableitenden Lymphknoten wurden isoliert, APZ (MHC II⁺ Zellen) aus den Lymphknoten wurden depletiert und die T-Zellen *in vitro* in Gegenwart von Antigen und Knochenmark-Makrophagen restimuliert. Die Zytokinexpression wurde als intrazelluläres IL-4 oder IFN γ im Durchflußzytometer gemessen.

3.1.3.1. Eine hohe MHC II Expression auf Makrophagen begünstigt eine Typ1 Antwort

Die Zytokinantwort der *in vitro* restimulierten F1 T-Zellen wurde im Durchflußzytometer nach intrazellulärer Anfärbung von IL-4 bzw. IFN γ gemessen. Abbildung 10 zeigt exemplarisch eine FACS-Analyse von T-Zellen aus B10.A(5R) x B10.D2 Mäusen, die mit KLH immunisiert worden waren. Wie zu erwarten, werden T-Zellen in Abwesenheit von APZ nicht stimuliert und produzieren keine Zytokine. Eine Restimulation durch Makrophagen mit hoher Dichte des I-A^b Moleküls induziert eine höhere IFN γ -Produktion in I-A^b restringierten T-Zellen (4.7%), als die Restimulation durch Makrophagen mit niedriger I-A^d Expression in I-A^d restringierten T-Zellen (2.4%), (Abb. 10).

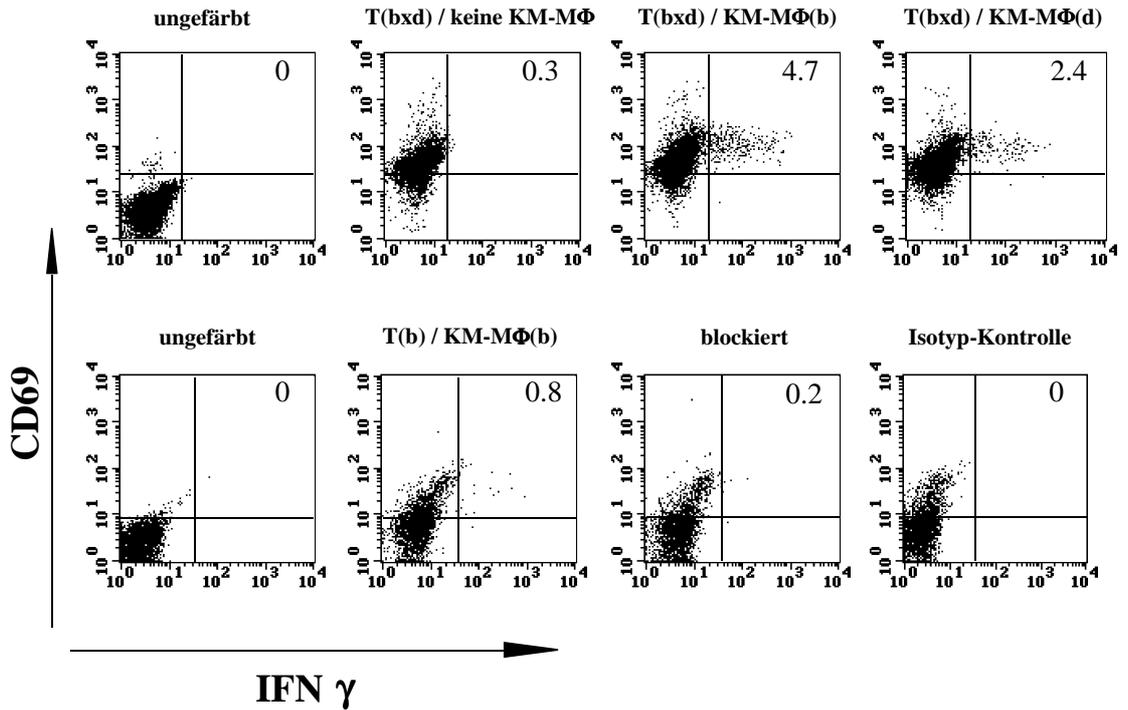


Abb.10 FACS-Analyse intrazellulärer IFN γ Produktion. H-2b und H-2d restringierte T-Zellen aus F1 Mäusen wurden in Abwesenheit von oder in Abwesenheit von H-2b und H-2d exprimierenden Knochenmark-Makrophagen (KM-M Φ) restimuliert, um intrazelluläres IFN γ zu bestimmen (obere Reihe). Die Spezifität der Färbungen wurde in der unteren Reihe gezeigt, wo die IFN γ -Färbung mit einem unmarkierten Antikörper gegen IFN γ blockiert, bzw. die Zellen mit einer Fluoreszenz-markierten Isotyp-Kontrolle inkubiert wurden. Die Ordinate zeigt die Anfärbung mit einem mAk gegen CD69, einem sehr frühen Aktivierungsmarker auf T-Zellen.

Abbildung 11 faßt die Ergebnisse der IFN γ Produktion von je drei Restimulationsexperimenten zusammen, in denen F1 Mäuse mit dem B10. Hintergrund immunisiert wurden. Dabei wurden zwei Kreuzungen so gewählt, dass jeweils ein hoch und ein niedrig exprimierter H-2 Haplotyp ausgeprägt werden (bxd und bxq). Die dritte Kreuzung trägt zwei niedrig exprimierte Haplotypen (dxq). Bei den durch das auf Makrophagen hoch exprimierte I-A^b Molekül restringierten T-Zellen produzierten im Mittel zwischen 4 und 4.5% der T-Zellen IFN γ , wohingegen es bei den durch die auf Makrophagen niedrig exprimierten I-A^d und I-A^q restringierten T-Zellen im Mittel nur 1.8 – 3% waren. Die IFN γ Antworten der I-A^d und I-A^q restringierten T-Zellen aus den F1 Mäusen mit zwei auf Makrophagen nur niedrig exprimierten H-2 Haplotypen brachten im Mittel nur 2.2 bzw. 2% IFN γ ⁺ Zellen hervor (Abb. 11).

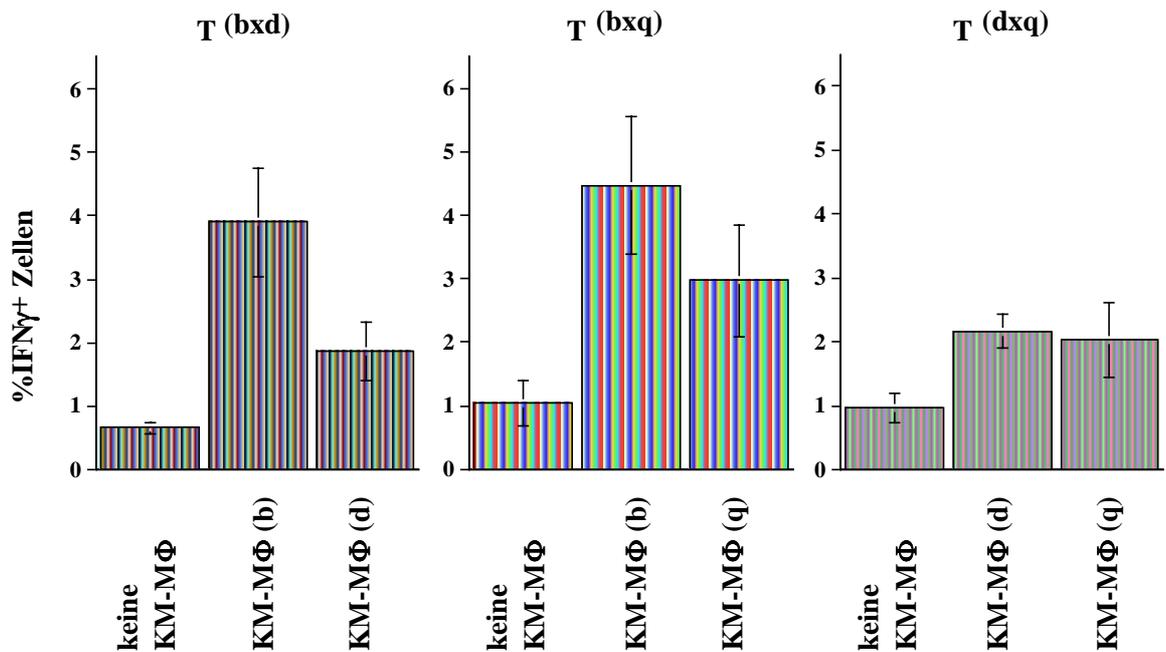


Abb.11 IFN γ Produktion von *in vitro* restimulierten B10. T-Zellen. Die jeweilige Restriktion der T-Zellen sowie das von den interagierenden Knochenmark-Makrophagen (KM-M Φ) exprimierte MHC II Molekül sind angegeben. Jedes Balkendiagramm faßt die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten zusammen, in denen jeweils 3-5 Mäuse mit KLH in Adjuvans immunisiert worden sind. Die Balken repräsentieren die jeweiligen Mittelwerte mit Standardabweichungen. Der experimentelle Ansatz erfolgte wie in Abb. 9 beschrieben.

3.1.3.2. Eine niedrige MHC II Expression auf Makrophagen begünstigt eine Typ 2 Antwort

Die IL-4 Produktion von *in vitro* restimulierten T-Zellen wurde an Mäusen mit dem BALB Hintergrund ebenfalls intrazellulär im Durchflußzytometer bestimmt. Dazu wurden Mäuse der Kreuzung BALB/b x BALB/c immunisiert und am Tag 7 wurden – wie in Abbildung 9 gezeigt – die Lymphknoten isoliert, die T-Zellen daraus isoliert und *in vitro* restimuliert. Abbildung 12 zeigt

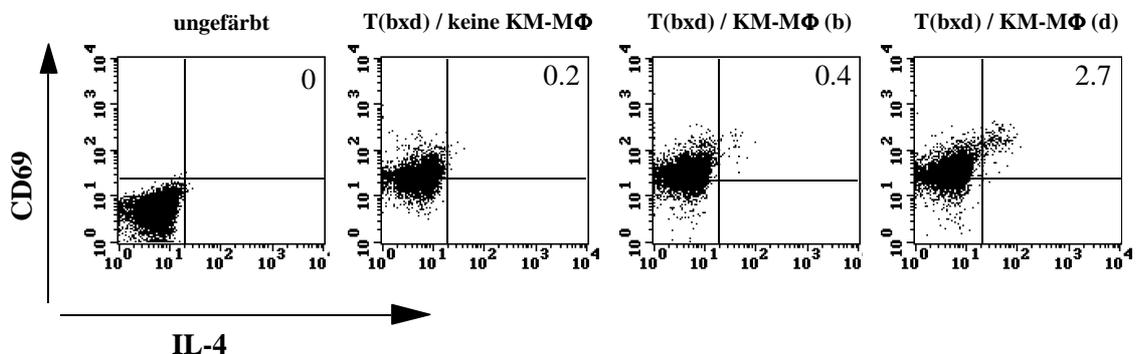


Abb.12 FACS Analyse einer intrazellulären IL-4 Färbung. Die IL-4 Färbung der Lymphozyten ist auf der Abszisse, die Anfärbung mit dem mAk gegen den sehr frühen Aktivierungsmarker CD69 auf der Ordinate gezeigt.

exemplarisch eine FACS-Analyse, bei der 2.7% der T-Zellen, die durch das niedrig exprimierte I-A^d Molekül restringiert sind, IL-4 produzieren. Im Gegensatz dazu sind es bei den durch das hoch exprimierte I-A^b restringierten T-Zellen nur 0.4%.

In Abbildung 13 sind wieder die Ergebnisse aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, bei denen jeweils 3-5 Mäuse immunisiert wurden, zusammengefasst. Die IFN γ Produktion der *in vitro* restimulierten T-Zellen aus BALB Mäusen werden durch die Interaktion mit Makrophagen mit hoher MHC II Dichte begünstigt und bestätigten somit die Ergebnisse der Experimente an B10. Mäusen. Bei der IL-4 Produktion, die wir in den B10. Mäusen kaum messen konnten, wurde genau das Gegenteil beobachtet, nämlich dass eine niedrige MHC II Dichte auf den Makrophagen die IL-4 Produktion fördert. Eine gemeinsame statistische Auswertung der Daten aus Abbildungen 11 und 13 ergibt einen signifikanten Unterschied (P Wert = 0.0417) zwischen der Zytokinantwort in Abhängigkeit von der MHC II Dichte auf den Makrophagen.

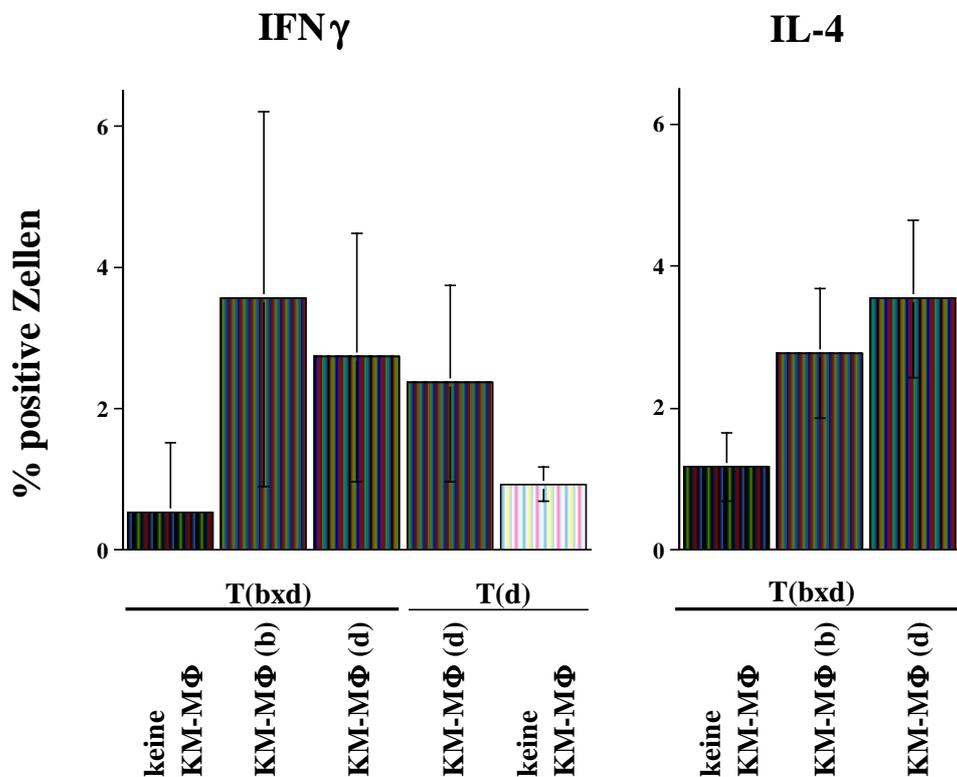


Abb.13 IFN γ und IL-4 Produktion von *in vitro* restimulierten BALB T-Zellen. Die jeweilige Restriktion der T-Zellen sowie das von den interagierenden Knochenmark-Makrophagen (KM-M Φ) exprimierte MHC II Molekül sind angegeben. Jedes Balkendiagramm faßt die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten zusammen, in denen jeweils 3-5 Mäuse mit KLH in Adjuvans immunisiert worden sind. Die Balken repräsentieren die jeweiligen Mittelwerte mit Standardabweichungen. Der experimentelle Ansatz erfolgte wie in Abb. 9 beschrieben.

3.2 Differentielle Expression der MHC II Gene im Menschen

Nachdem wir in der Maus die differentielle Expression von MHC II Molekülen und deren Bedeutung bei der Polarisierung von Th-Zell Zytokin-Antworten zeigen konnten, wurden unsere Analysen auf

den Menschen ausgedehnt. Beim Menschen wollten wir zunächst an einer Berliner Kohorte den Einfluß der HLA II Gene auf die Entstehung und den Verlauf der Rheumatoiden Arthritis als Beispiel einer Autoimmunerkrankung aufzeigen.

3.2.1 Assoziation von DR4 und DR10 mit der RA bei einer Kohorte früher Patienten

Zunächst wurde bei den uns zur Verfügung stehenden RA-Patienten eine Assoziation zwischen dem HLA-DR Haplotyp und der Entstehung der Erkrankung untersucht. Die RA-Patienten gehörten zu einer Inzeptionskohorte, die die ACR (American College for Rheumatology)-Kriterien von 1988 für RA (Arnett et al., 1988) erfüllen und zu Beginn der Studie eine Krankheitsdauer von weniger als 2 Jahren hatten (Listing et al., 1997). Diese Kohorte umfaßte ursprünglich 302 Patienten und von 173 dieser Patienten konnte der HLA-DR Haplotyp bestimmt werden. Die Typisierung wurde mittels der SSO-Methode durchgeführt (Scharf et al., 1991) und alle DR4 Gene wurden zusätzlich sequenziert, um eine genaue Zuordnung zu einem Allel zu ermöglichen.

Abbildung 14 vergleicht die HLA-DRB1 Haplotypen der Patienten mit denen von 139 gesunden Kontrollen (Listing et al., im Druck). Bei dieser frühen Kohorte gab es – wie zu erwarten – eine deutliche Assoziation zwischen der RA und Genen der Subgruppe HLA-DRB1*04 und *10 (Lang et al., 1990, Weyand et al., 1995). Eine Assoziation mit der Subgruppe *01 konnte bei diesen frühen Berliner Patienten nicht beobachtet werden.

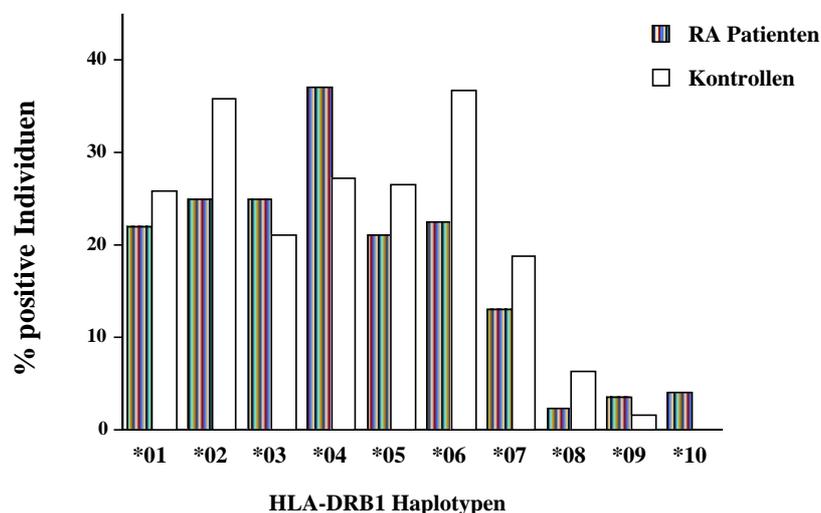


Abb.14 Assoziation von DR4 und RA bei einer Kohorte früher Patienten. Die gestreiften Balken zeigen anteilig, wieviele Patienten welche Allele der 10 verschiedenen HLA-DRB1 Subgruppen (DRB1*01-*10) tragen. Die weißen Balken repräsentieren die Kontrollen.

3.2.2 Assoziation von DR1 und DR4 mit einem schweren Krankheitsverlauf

Um den Einfluß der HLA-DRB Gene auf den Verlauf der Erkrankung zu ermitteln, wurden bei 139 Patienten in regelmäßigen Intervallen die Erosionen an den Händen, den Handgelenken und den Vorderfüßen als Ratingen Score bestimmt (Rau and Herborn, 1995) und anschließend mit den jeweiligen HLA-DR Haplotypen korreliert. Da der Ratingen Score für alle Patienten zu einem vergleichbaren Zeitpunkt im Verlauf der Erkrankung bestimmt wurde, kann er als Maß für die Schwere des jeweiligen Verlaufs herangezogen werden. Abbildung 15 vergleicht die Ratingen Scores mit dem jeweiligen HLA-DRB1 Haplotyp und stellt jeden Patienten gemäß der beiden vorhandenen HLA-DRB1 Allele zweimal dar. Da das Vorhandensein eines DR1-Allele – ebenso wie die DR4 Allele – für einen schwereren Verlauf zu sorgen schien, wird in Abb. 15 differenziert, ob ein bestimmtes DR Allele in Kombination mit einem DR1 oder DR4 zu dem entsprechenden Ratingen Score geführt hat. Tatsächlich hatten 63% aller DR1- (17/27) und 67% aller DR4- (41/61) positiven Patienten einen Ratingen Score von > 0. Bei allen anderen Haplotypen waren es nur 20 – 50%. Die höchsten Ratingen Scores von über 30 wurden bei zwei DR4-homozygoten Patienten und einem Patienten mit der Kombination DR4/DR5 gefunden (Abb. 15).

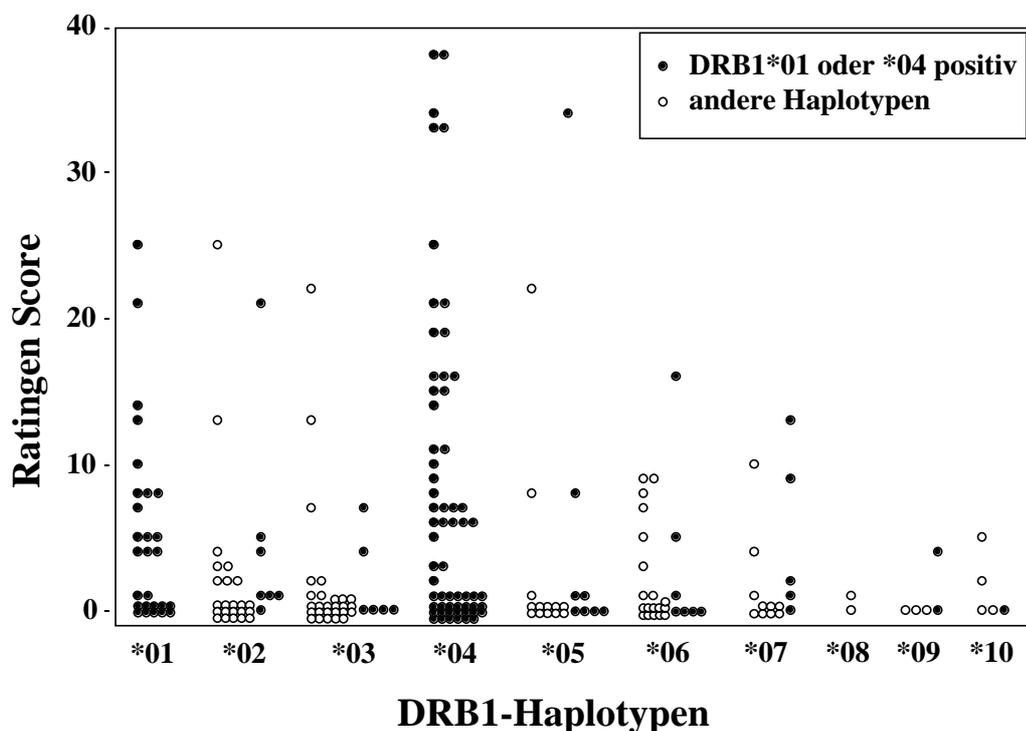


Abb.15 Einfluß des HLA-DRB1 Haplotyps auf den Ratingen Score. Jeder Patient ist gemäß der beiden vorhandenen HLA-DRB1 Allele zweimal dargestellt. Alle DR1 oder DR4 Allele sowie alle anderen Allele, die mit einem DR1 oder DR4 kombiniert vorliegen, sind als schwarze Kreise gezeichnet. Alle weiteren Haplotypen sind durch leere Kreise repräsentiert.

3.2.3 Erhöhte DR4 Expression auf den B-Zellen von RA-Patienten

Der menschliche MHC II Haplotyp besteht aus drei verschiedenen Molekülen, dem HLA-DP, -DQ und dem -DR. Während auf jedem menschlichen Chromosom 6 jeweils nur ein funktionelles -DP

und -DQ Molekül kodiert ist, gibt es für das -DR Molekül 5 verschiedene allelische Linien. Diese verschiedenen allelischen Linien tragen alle das gleiche-DRA aber ein oder zwei verschiedene funktionelle DRB Gene und führen deswegen zur Ausprägung von ein oder zwei unterschiedlichen -DR Molekülen. Im Menschen gibt es 4 verschiedene Gruppen von DRB Genen, DRB1, DRB3, DRB4 und DRB5, die auf die 5 allelischen Linien verteilt sind. Die DRB1 Gene werden in die 10 Untergruppen DR1-DR10 unterteilt und jedes Chromosom 6 trägt ein DRB1 Allel und – je nach allelische Linie – ein DRB3, DRB4, DRB5 oder kein weiteres funktionelle DRB Gen. Ein DR2 Allel wird gekoppelt mit einem DRB5 vererbt, ein DR3, DR5 oder DR6 jeweils mit einem DRB3 und ein DR4, DR7 oder DR9 jeweils mit einem DRB4. Für die DR1-, DR10- und DR8-positiven Individuen ist das DRB1 das einzige funktionelle Gen. Je nach Haplotyp exprimieren wir also zwischen ein und vier unterschiedlichen HLA-DR, ein bis zwei unterschiedlichen –DP und ein bis zwei unterschiedlichen -DQ Molekülen. Allen diesen Molekülen ist gemeinsam, dass sie die für MHC II Moleküle charakteristische Sekundärstruktur beibehalten, aber in der Peptid-bindenden Grube einen extrem hohen Polymorphismus entwickelt haben. Die letzte Veröffentlichung der Nomenklatur für HLA Moleküle listet 184 DRB1, 11 DRB3, 5 DRB4 und 12 DRB5 Allele (Bodmer et al., 1996). Aus dieser Vielfalt ist unmittelbar ableitbar, dass die Verfügbarkeit spezifischer mAk gegen einzelne Vertreter der HLA-DR Moleküle sehr begrenzt sein muß und eine Untersuchung der Expression von HLA-DRB Molekülen auf menschlichen APZ deswegen nur bedingt möglich ist.

Wir haben uns aufgrund der Verfügbarkeit von spezifischen mAk auf die Expression der mit der RA assoziierten HLA-DRB1*04 Allele und des – je nach Studie – neutralen bis protektiven HLA-DRB1*07 Allels konzentriert. Abbildung 16 zeigt schematisch die auf dem DR4 und DR7 Haplotyp

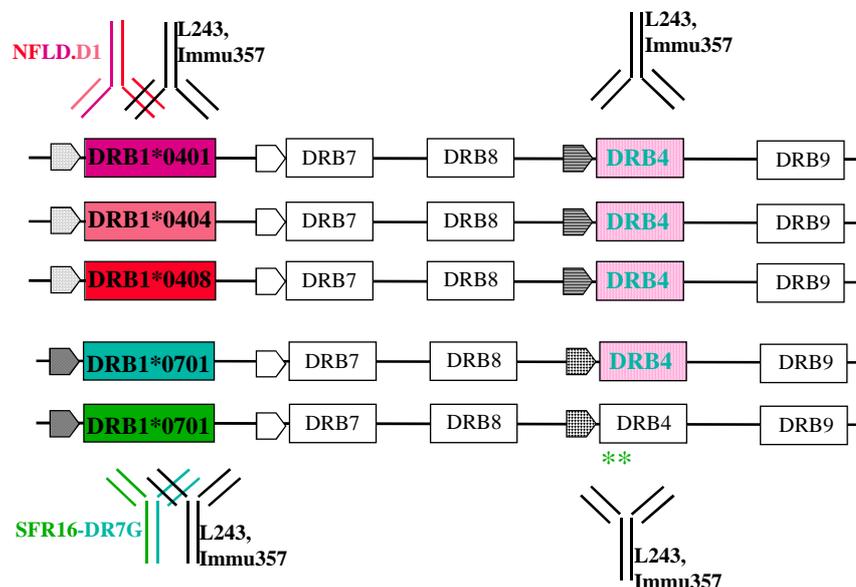


Abb.16 Schematische Darstellung der DR4 und DR7 Genloci. Funktionelle Gene sind als grau unterlegte, Pseudogene als weiße Rechtecke und die dazugehörigen Promotoren als Pentagone gezeichnet. DRB8 besteht aus den Exonen 3-6, DRB9 besteht nur aus Exon 2 und beide Pseudogene sind ohne Promotoren. DRB7 besteht aus einem Promotor und Exon 1. Das mit dem DR7 gekoppelte DRB4 kann am 3'Ende des 1. Introns eine defekte Splice-Schnittstelle tragen (durch ** gekennzeichnet) und wird dann nicht exprimiert. Die verwendeten mAk und die Gene, deren Genprodukte sie erkennen, sind eingezeichnet.

enthaltenen HLA-DR Gene und die mAk, die in den nachfolgend beschriebenen Experimenten benutzt wurden. L243 (Shackelford et al., 1983) und Immu357 erkennen spezifisch alle DR Moleküle, NFLD.D1 (Drover et al., 1994) erkennt alle DR4 Allele und SFR16-DR7G (Radka et al., 1984) ist spezifisch für DR7.

In Abbildung 17 ist die FACS Analyse einer Färbung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut eines DR4 homozygoten gesunden Spenders mit mAk gegen T-Zell-, B-Zell- und Monozyten-spezifische Oberflächenmoleküle sowie gegen gesamt-DR und DR4 gezeigt. Während nur wenige T-Zellen DR Moleküle exprimieren, zeigen alle B-Zellen und alle Monozyten eine positive Färbung mit dem anti DR4 und dem anti Gesamt-DR mAk.

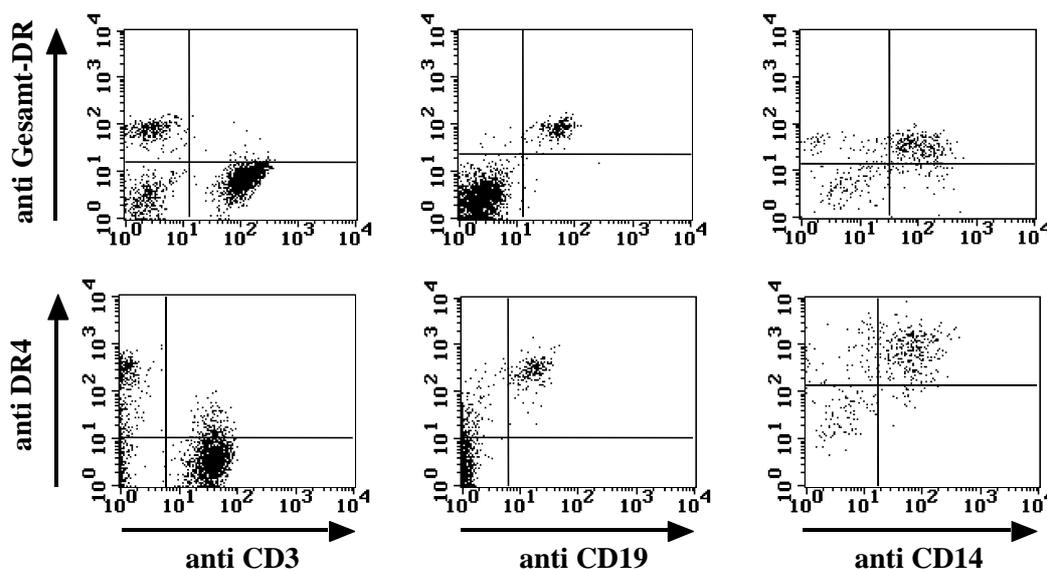


Abb.17 HLA-DR Expression auf T-Zellen, B-Zellen und Monozyten aus dem peripheren Blut eines DR4 homozygoten gesunden Spenders. Die oberen drei Bilder zeigen jeweils eine Doppelfärbung mit dem mAk gegen Gesamt-DR sowie CD3, CD19 und CD14. Die unteren drei Bilder zeigen ebenfalls Doppelfärbungen, aber mit dem DR4 spezifischen mAk.

Zunächst wurde die DR4 Expression auf frischen B-Zellen, Monozyten und T-Zellen aus dem peripheren Blut von DR4 homozygoten gesunden Kontrollen und RA-Patienten analysiert. Die Patienten wurden nochmals unterteilt, je nachdem ob sie Corticosteroide einnahmen oder nicht. Die tägliche Dosis vom Prednisolon lag zwischen 2.5 und 20 mg/Tag.

Menschliche B-Zellen zeigen eine höhere DR4 Expression als die Monozyten und die T-Zellen zeigen deutlich die geringste DR4 Expression. Aufgrund der unterschiedlichen Eigenfluoreszenz von Lymphozyten und Monozyten wurde die jeweilige Expression als Differenz der Kanalwerte zwischen gefärbten und ungefärbten Zellen angegeben. Im Vergleich mit den B-Zellen von RA-Patienten unter Prednisolon-Einfluß zeigten die B-Zellen von Patienten, die keine Corticosteroide einnahmen, eine signifikant höhere DR4 Expression (Abb. 18). Für Monozyten und T-Zellen waren diese Unterschiede vernachlässigbar.

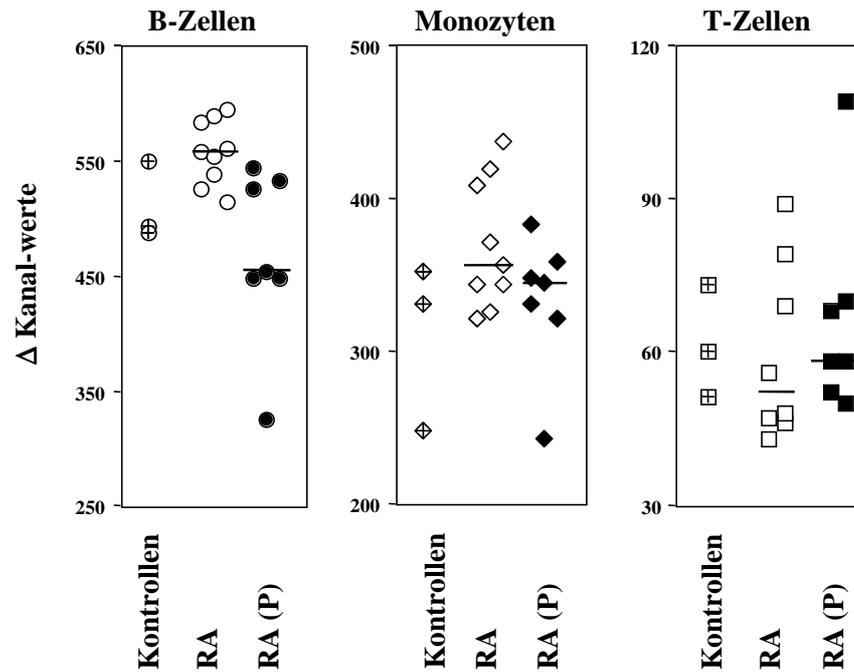


Abb.18 Erhöhte DR4 Expression auf den B-Zellen von RA-Patienten. Die DR4 Expression wurde auf B-Zellen, Monozyten und T-Zellen des peripheren Bluts von DR4 homozygoten gesunden Spendern (Kontrollen) und RA Patienten (RA) analysiert und wegen der unterschiedlichen Eigenfluoreszenz von Lymphozyten und Monozyten als Differenz der Kanalwerte zwischen gefärbten und ungefärbten Zellen angegeben. RA (P) steht für RA-Patienten unter dem Einfluß von 2.5-20mg Prednisolon/Tag. Kontrollen sind durch graue, RA-Patienten als weiße und RA-Patienten unter Prednisolon-Einfluß als schwarze Symbole dargestellt. Die Kreise symbolisieren die Expression auf B-Zellen, Rauten die Expression auf Monozyten und Quadrate die Expression auf T-Zellen. Die Balken entsprechen den Medianen. Der P Wert für die unterschiedliche DR4 Expression auf B-Zellen von Patienten unter Prednisolon-Einfluß und auf B-Zellen von Patienten, die keine Corticosteroide einnahmen, beträgt 0.0055.

3.2.4 Differentielle Regulation der Expression von DR4 und DRB4 auf Monozyten

Die Regulation der Expression von HLA-DRB4 und DR4 Genen wurde an mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut dreier DR4 homozygoter Spender untersucht. Dafür wurden die Zellen für zwei Tage *in vitro* mit PMA und LPS stimuliert und die DR4 sowie die Gesamt-DR Expression auf B-Zellen und auf Monozyten analysiert (Abb. 19). Aus der gesamt-DR Expression abzüglich der DR4 Expression ergeben sich dann Rückschlüsse auf die DRB4 Expression (s. auch Abb. 16). Beide, die DR4 und die gesamt-DR Expression waren auf B-Zellen stärker als auf den Monozyten. Die Stimulation mit PMA und LPS hatte auf die gesamt-DR Expression auf B-Zellen und auf die DR4 Expression auf B-Zellen und auf Monozyten kaum einen Einfluß. Bemerkenswert war ein 4-6facher Anstieg in der Expression von gesamt-DR auf den Monozyten der drei Spender, der die differentielle Regulation der Expression von DR4 und DRB4 zeigt.

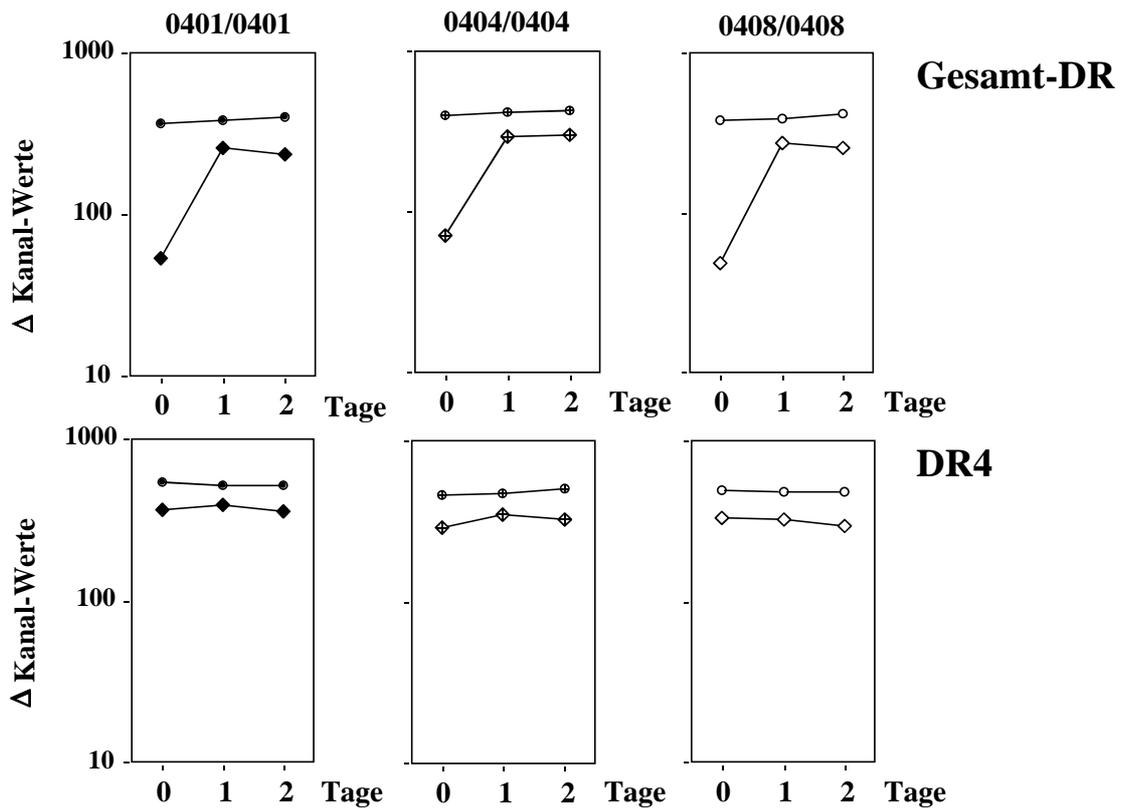


Abb.19 Differentielle Regulation von DRB4 und DR4 auf Monozyten. Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts dreier DR4 homozygoter gesunder Spender wurden für 2 Tage mit PMA und LPS stimuliert. Die Kinetik der DR4 und der DRB4 Expression auf B-Zellen und Monozyten wurde in Doppelfärbungen mit mAk gegen DR4 und Gesamt-DR sowie gegen CD19 und CD14 gemessen und als Differenz der Kanalwerte zwischen gefärbten und ungefärbten Zellen dargestellt. Die Expression auf B-Zellen ist durch Kreise, die Expression auf Monozyten durch Rauten symbolisiert.

3.2.5 Differentielle gesamt-DR Expression DR4 und DR7 homozygoter B-Zellen

Um die Anzahl der verschiedenen HLA DR Molekülen auf menschlichen APZ zu quantifizieren, wurden frische B-Zellen und Monozyten aus dem peripheren Blut von 6 DR4 und 3 DR7 homozygoten Kontrollspendern analysiert. Über Doppelfärbungen mit CD14 bzw. CD19 spezifischen mAk wurden die gesamten DR Moleküle sowie die DR4 oder DR7 Moleküle auf B-Zellen und Monozyten bestimmt. Die Menge aller DR Moleküle schwankte auf den DR4 homozygoten B-Zellen zwischen 32.000 und 98.000 Molekülen/Zelle und war damit im Median 3.3x höher als auf den DR7 homozygoten B-Zellen, wo die Werte zwischen 18.600 und 23.800 variierten (Abb. 20). Diese Unterschiede sind signifikant ($P = 0.0173$). Bei den Monozyten schwankt die Anzahl der gesamt-DR Moleküle zwischen 6.200 und 18.600 bei den DR4 positiven Spendern und ist damit 4,9x niedriger als auf den B-Zellen. Auf den DR7 homozygoten Monozyten habe wir zwischen 5.000 und 17.800 gesamt-DR Moleküle/Zelle gemessen und das entspricht im Median 2,6x weniger als auf den B-Zellen.

Wider unsere Erwartung waren die Unterschiede in der gesamt-DR Expression auf den B-Zellen

nicht auf die unterschiedliche Expression von DR4 und DR7 zurückzuführen. In Abbildung 20 ist im mittleren Feld die DRB1 Expression dargestellt: Die B-Zellen tragen zwischen 6.600 und 20.700 DR7 und zwischen 2.200 und 6.700 DR4 Moleküle auf der Oberfläche. Bei den Monozyten sind es zwischen 900 und 7.400 DR7 und zwischen 1.600 und 4.000 DR4 Moleküle. Keiner dieser Unterschiede ist signifikant.

Sehr signifikant hingegen ist der Unterschied in der DRB4 Expression auf B-Zellen, je nachdem ob das DRB4 mit einem DR4 oder einem DR7 gekoppelt ist. Da uns kein spezifischer anti-DRB4 mAk zur Verfügung stand, haben wir die DRB4 Expression über die gesamt-DR abzüglich der DRB1 Expression errechnet. Auf den DR4 homozygoten B-Zellen wurden zwischen 40.700 und 94.300 und auf den DR7 homozygoten B-Zellen wurden zwischen 3.065 und 14.800 DRB4 Moleküle bestimmt. Auf den DR4 homozygoten Monozyten waren es zwischen 4.000 und 17.000 und auf den DR7 homozygoten Monozyten zwischen 4.000 und 10.300 (Abb. 20). Zusätzlich tragen zwei der DR7 homozygoten Spender auf je einem Allel die DRB4 Splice-Variante (Sutton et al., 1989), so dass die DRB4 Expression ausschließlich von dem zweiten Allel stammen kann.

Durch den Vergleich der Mediane wird nicht nur die unterschiedliche Menge an DR Molekülen auf den B-Zellen DR4 und DR7 homozygoter Spender deutlich, sondern auch die unterschiedliche Zusammensetzung: Auf den DR7 positiven B-Zellen gibt es etwa 1,5x mehr DRB4 als DR7 Moleküle, wohingegen die DRB4 Moleküle auf den DR4 positiven B-Zellen 26x häufiger exprimiert werden (Abb. 20).

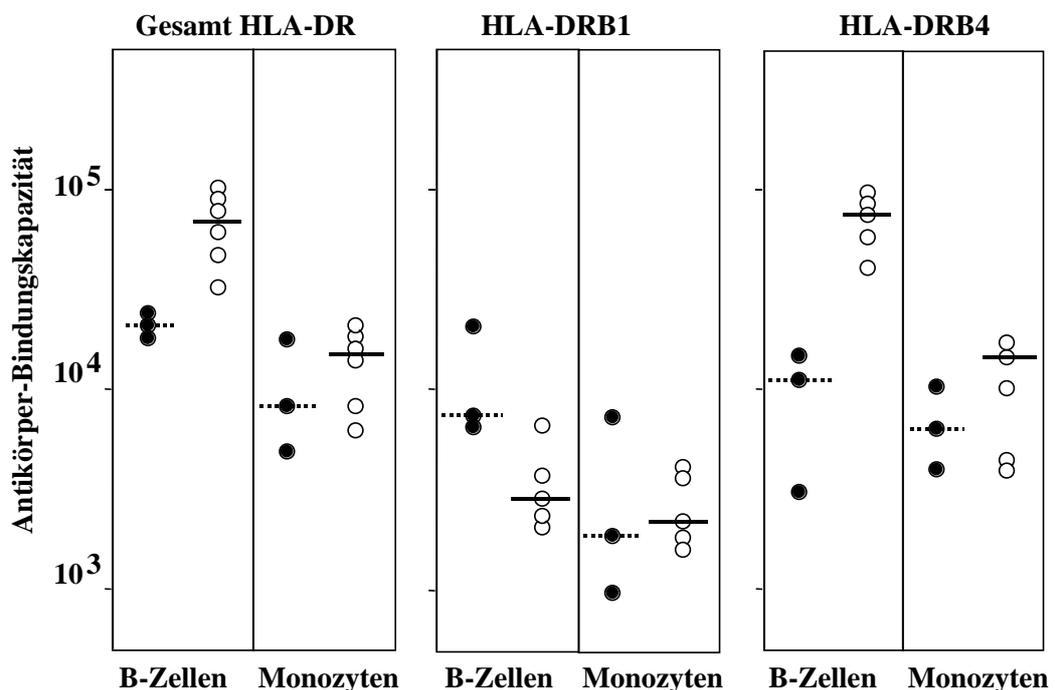


Abb.20 Differentielle gesamt-DR Expression bei B-Zellen und Monozyten DR4 und DR7 homozygoter Spender. Signifikante Unterschiede in der DRB4 Expression (s. auch Abb.16) führen zu einem unterschiedlichen Anteil von DR4 bzw. DR7 an der gesamt-DR Expression. Die jeweilige Menge der DR Moleküle ist in Antikörperbindungs-Kapazität gemessen, die weißen Kreise repräsentieren die Werte für die DR4 homozygoten und die schwarzen Kreise für die DR7 homozygoten B-Zellen und Monozyten.

3.2.6 Unterschiedliche Kopplung verschiedener DRB4-Promotoren mit DR4 und DR7

Um herauszufinden, ob die unterschiedliche Oberflächenexpression der DRB4 Moleküle auf den B-Zellen DR4 und DR7 homozygoter Spender auf einer unterschiedlichen Transkriptionsrate beruht, haben wir von DR4 und DR7 positiven Spendern die jeweiligen DRB4 Promotoren sequenziert und miteinander verglichen. Hauptsächlich haben wir dabei 3 verschiedene Sequenzen identifiziert, nämlich die in der Literatur bereits als DRB5, DRB(DR102) und DRBsDR53 bezeichneten Promotoren (Louis et al., 1994). Wir haben bei insgesamt 16 DNA Proben von DR4 bzw. DR7 positiven Spendern keine als DRB4 bezeichnete Promotorsequenz gefunden.

3.3 Immun-Deviation im drei-Zelltyp-Cluster

Autoimmunerkrankungen wie die Rheumatoide Arthritis und ihr Mausmodell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) sind durch ein Ungleichgewicht zwischen den Typ 1 und den Typ 2 Effektor Th-Zellen charakterisiert und von diesem Ungleichgewicht nimmt man an, dass es bei der Entstehung der Erkrankung oder für deren Verlauf von Bedeutung ist (Müller et al. 1998). Während ich mich in den ersten beiden Kapiteln mit der differentiellen Expression der MHC II Gene und deren möglichem Einfluß auf die Entstehung eines Ungleichgewichts zwischen diesen regulatorischen Effektor Th-Zellen und damit auf die Entstehung einer Erkrankung beschäftige, dreht sich das letzte Kapitel darum, wie man ein bereits bestehendes Ungleichgewicht beeinflussen könnte, um den Verlauf der Erkrankung abzuschwächen oder gar aufzuhalten.

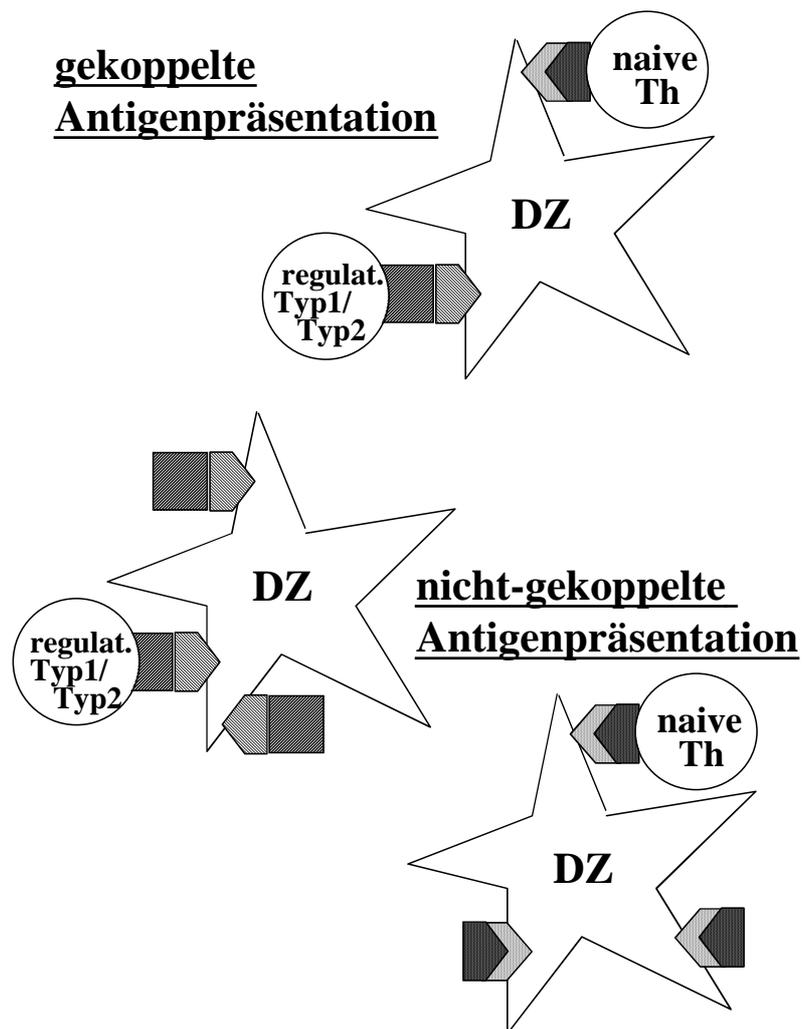


Abb.21 Schema des experimentellen Ansatzes zur Untersuchung der T-Zell-Kommunikation im drei-Zelltyp-Cluster. Bei der gekoppelten Antigen-Präsentation ist die DZ mit den beiden Antigenen Cytochrom C (CytC) und Ovalbumin (OVA) beladen, so dass die bereits polarisierte, regulatorische Typ 1 oder Typ 2 Effektor Th-Zelle über die DZ mit der naiven Th-Zelle in Kontakt treten kann. Bei der nicht-gekoppelten Antigen-Präsentation sind die DZ entweder mit CytC oder mit OVA beladen, so dass die bereits polarisierten Effektor Th-Zellen keinen direkten zellulären Kontakt mit den naiven Th-Zellen haben.

Die Voraussetzung für eine gezielte Manipulation der Zytokin-Produktion von Th-Zellen ist ein Verständnis darüber, wie T-Zellen überhaupt zur Zytokin-Produktion angeregt werden und das haben wir untersucht. Unser experimenteller Ansatz beinhaltet bereits polarisierte Typ 1 oder Typ 2 Effektor Th-Zellen als Regulatoren, die die Zytokinproduktion naiver Th-Zellen beeinflussen und damit die Polarisierung einleiten sollen. Für beide, die regulatorischen und die naiven Th-Zellen wird das Signal, Zytokine zu produzieren, durch eine Antigen-spezifische Stimulation ausgelöst, so dass unser System zusätzlich dendritische Zellen (DZ) als APZ enthält. Unser Hauptinteresse galt der Frage, ob die regulatorischen Typ 1 und Typ 2 Effektor Th-Zellen den direkten zellulären Kontakt mit der naiven Th-Zelle über die DZ benötigen, um ihren Einfluß auf die naiven Th-Zellen geltend zu machen, oder ob lösliche Faktoren wie Zytokine ausreichen, um die Polarisierung der naiven Th-Zellen zu induzieren. Wir haben deshalb die nicht-gekoppelte Antigenpräsentation mit der gekoppelten verglichen (Abb. 21) und als Maß für eine effektive Kommunikation zwischen den beteiligten Th-Zellen die Zytokinproduktion der naiven Th-Zellen nach dem ersten Antigen-spezifischen Kontakt mit DZ in Gegenwart bereits polarisierter Th-Zellen gemessen.

3.3.1 Das experimentelle System des drei-Zelltyp-Clusters

Um die regulatorischen Effektor Th-Zellen von den naiven Th-Zellen mit der Hilfe klonotypischer mAk unterscheiden zu können, haben wir mit zwei unterschiedlichen T-Zellrezeptor (TZR) transgenen Mausstämmen gearbeitet. Die regulatorischen Typ 1 oder Typ 2 Effektor Th-Zellen werden in unserem System aus 5CC7-Mäusen generiert. Diese Mäuse tragen einen Tauben-Cytochrom C (CytC)-spezifischen TZR, der das CytC-Peptid 88-104 im Zusammenhang mit dem I-E^k Molekül erkennt (Seder et al., 1992). Die naiven Th-Zellen stammen aus dem zweiten TZR-transgenen Mausstamm DO11.10, dessen T-Zellen das Hühnerei-Albuminpeptid 323-339 (OVA) erkennen, wenn es im Zusammenhang mit einem I-A^d Molekül präsentiert wird (Murphy et al., 1990). Damit Alloreaktionen *in vitro* weitestgehend ausgeschlossen werden und die DZ beide Antigene präsentieren können, haben wir sie aus dem Knochenmark von F1-Mäusen (B10.A x BALB/c), die eine Kreuzung der beiden Hintergrundstämme der TZR-transgenen Mäuse sind und damit sowohl das I-E^k als auch das I-A^d Molekül tragen, generiert.

Die DZ wurden *in vitro* nach einem veränderten Protokoll von Inaba et al. kultiviert, wobei Knochenmark-Vorläuferzellen in Gegenwart von GM-CSF für 6 Tage kultiviert, mit Antigen beladen und dann mit rTNF α zur terminalen Differenzierung angeregt wurden (Inaba et al., 1992). Am Tag 7 sind etwa 30% der Zellen dieser Kulturen CD11c⁺/MHC II⁺ DZ. Die naiven OVA-spezifischen Th-Zellen wurden jeweils frisch als CD62L⁺/CD4⁺ Fraktion aus den Lymphknoten und den Milzen von DO11.10 Mäusen isoliert. Für die Generierung von Th-Effektorzell-Linien werden naive CD4⁺ Th-Zellen aus den Lymphknoten und Milzen von 5CC7-Mäusen isoliert, *in vitro* in Gegenwart von APZ, Antigen und – für die Generierung von Typ 1 Effektor Th-Zellen – IL-12 und anti-IL-4 mAk oder – für die Generierung von Typ 2 Effektor Th-Zellen – IL-4, anti-IFN γ und anti-IL-12 mAk stimuliert und mindestens 2-mal im Abstand von nicht weniger als 14 Tagen restimuliert (Schuhbauer et al., 2000). Abbildung 22 zeigt exemplarisch die IFN γ und IL-4 Produktion je einer Typ 1 und einer Typ 2 Effektor Th-Zelllinie, wie sie für die nachfolgenden Experimente verwendet wurden. Etwa 96% der Typ 1 Effektor Th-Zellen produzierten IFN γ und kein IL-4 und in 81% der Typ 2 Effektor Th-Zellen konnten wir IL-4 und kein IFN γ nachweisen.

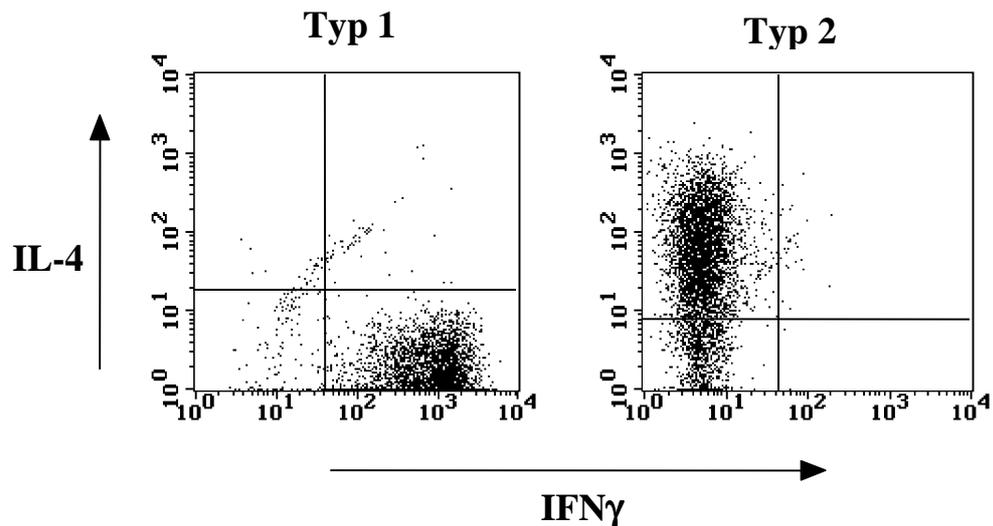


Abb.22 FACS-Analyse einer intrazellulären Zytokinfärbung von CytC-spezifischen Typ 1 und Typ 2 Effektor Th-Zellen. Für die Generierung dieser Typ 1 oder Typ 2 Effektor Th-Zelllinien werden naive $CD4^+$ Th-Zellen aus den 5CC7-Mäusen isoliert, *in vitro* in Gegenwart von APZ, $1\mu M$ Antigen und entweder 10ng/ml IL-12 und $10\mu\text{g/ml}$ anti-IL-4 mAk oder 30ng/ml IL-4, $10\mu\text{g/ml}$ anti-IFN γ mAk und $10\mu\text{g/ml}$ anti-IL-12 mAk stimuliert und mehrmals im Abstand von mindestens 14 Tagen restimuliert. Die Analyse zeigt die IFN γ bzw. IL-4 Produktion einer Typ 1 und einer Typ 2 Linie nach 3-maliger Stimulation. Die Prozentzahlen der $CD4^+$ Zytokin-produzierenden Th-Zellen sind in den jeweiligen Quadranten angegeben.

Um den Einfluß der regulatorischen CytC-spezifischen Effektor Th-Zellen auf die naiven OVA-spezifischen Th-Zellen zu messen, wurden drei-Zelltyp-Cluster angesetzt. Diese Cluster bestehen jeweils aus den regulatorischen Typ 1 oder Typ 2 Effektor Th-Zellen, naiven Th-Zellen und DZ. Bei der gekoppelten Antigen-Präsentation werden die DZ gleichzeitig mit OVA und CytC, bei der nicht-gekoppelten mit nur OVA oder CytC beladen (s.Abb. 21). Nach 5-7 Tagen Cluster-Kultur werden die OVA-spezifischen Th-Zellen mit APZ aus der Milz von BALB/c Mäusen und OVA restimuliert und anschließend die intrazelluläre IFN γ und IL-4 Produktion der klonotypischen $CD4^+$ Th-Zellen gemessen. Die Abbildungen 23a und b zeigen jeweils das Beispiel einer FACS- Analyse eines Typ 1 und eines Typ 2 Clusters. In Gegenwart regulatorischer Typ 1 Effektor Th-Zellen werden die OVA-spezifischen Th-Zellen überwiegend zur IFN γ und nicht zur IL-4 Produktion angeregt. Die Situation ist im Typ 2 Cluster genau umgekehrt, hier werden die OVA-spezifischen Th-Zellen überwiegend zu IL-4 produzierenden Typ 2 Th- Effektorzellen polarisiert (Abb. 23). In Abwesenheit von regulatorischen Effektor Th-Zellen und polarisierenden Zytokinen (negative Kontrolle) produzieren die OVA- spezifischen Th-Zellen nur wenig IFN γ (zwischen 1.5 und 6.3%) und IL-4 (zwischen 0.1 und 0.7%). In Gegenwart von 10ng/ml rekombinatem IL-12 oder 30ng/ml IL-4 (positive Kontrollen) produzierten 21.4% der OVA-spezifischen Th-Zellen IFN γ und nur 0.3% IL-4 (Abb. 23 a) bzw. 15.4% IL-4 und nur 1.8% IFN γ (Abb. 23 b).

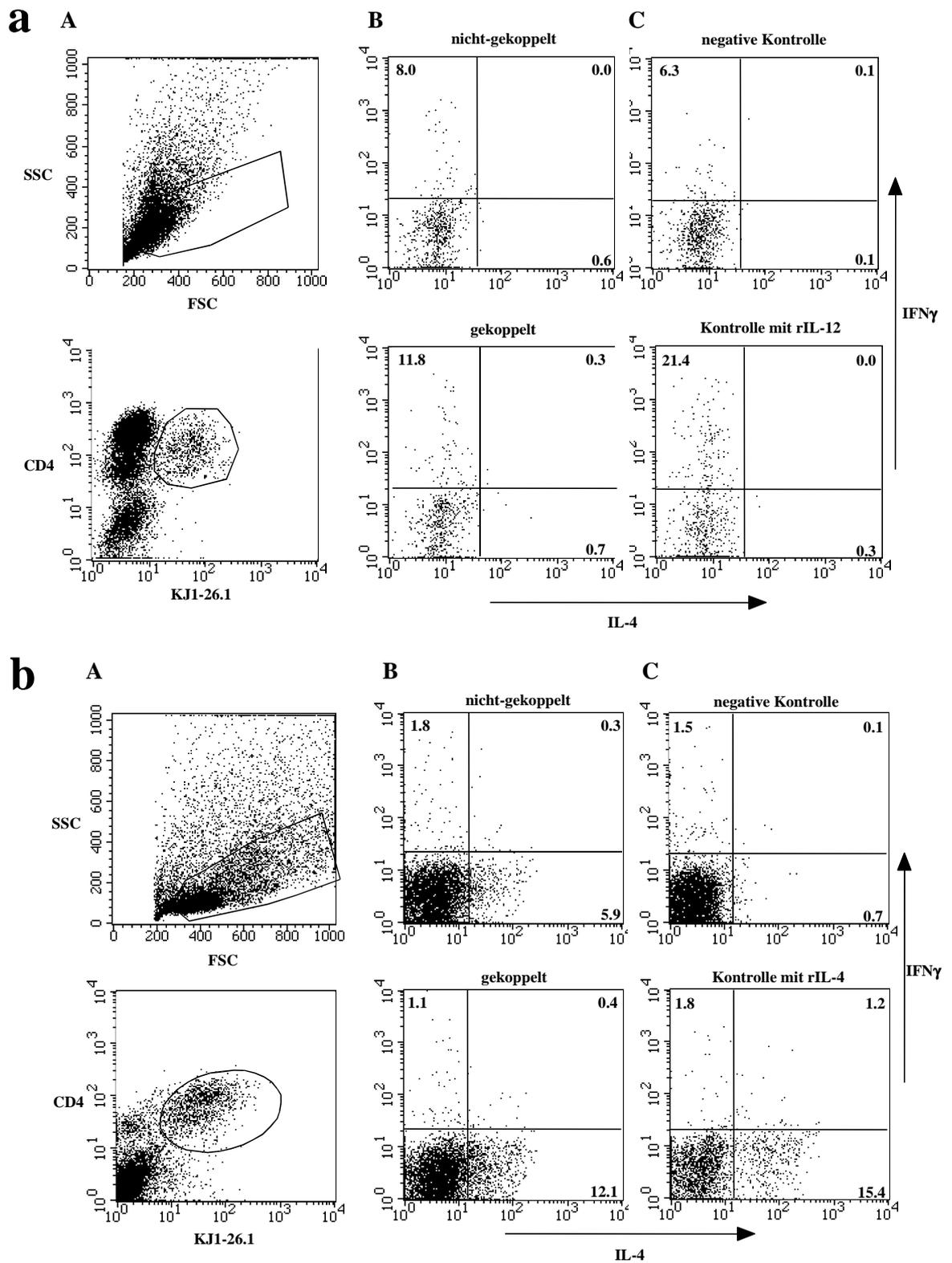


Abb.23 Zytokinproduktion der OVA-spezifischen Th-Zellen im Typ 1 (a) und Typ 2 (b) Cluster. Nach 5-7 Tagen Kultur im drei-Zelltyp-Cluster wurden die OVA-spezifischen Th-Zellen mit BALB/c-APZ und $1\mu\text{M}$ OVA für 6 Stunden in Gegenwart von Brefeldin A restimuliert, bevor ihre intrazelluläre IFN γ und IL-4 Produktion im FACS analysiert wurde. A) FSC/SSC-Diagramm mit eingekreisten Lymphozyten (oben) und Darstellung der klonotypischen CD4 $^+$ Zellen unten. B) Vergleich der Zytokinproduktion im Cluster mit nicht-gekoppelter (oben) und gekoppelter Antigen-Präsentation (unten). C) Zytokinproduktion der negativen Kontrolle (oben) mit F1-DZ und naiven OVA-spezifischen Th-Zellen und der positiven Kontrolle (unten) mit F1-DZ, naiven OVA-spezifischen Th-Zellen und entweder rIL-12 in (a) oder rIL-4 in (b). Die Prozentzahlen der positiv gefärbten Zellen sind für jeden Quadranten angegeben.

3.3.2 Für eine effektive Polarisierung der naiven Th-Zellen wird die gekoppelte Antigen-Präsentation benötigt

In drei-Zelltyp-Clustern mit regulatorischen Effektor Th-Zellen werden die OVA-spezifischen Th-Zellen dann am effektivsten polarisiert, wenn die beiden Antigene CytC und OVA gekoppelt präsentiert werden. Dadurch wird über die DZ ein zellulärer Kontakt zwischen regulatorischen und naiven Th-Zellen bewirkt und eine enge räumliche Nähe hergestellt. Abbildung 24 faßt die Ergebnisse aus 8 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten zusammen und vergleicht die unterschiedliche Zytokin Produktion der negativen Kontrollen mit denen der gekoppelten und nicht-gekoppelten Antigen-Präsentation im Typ 1 und Typ 2 Cluster. Für das drei-Zelltyp-Cluster mit Typ 1 regulatorischen Effektor Th-Zellen lag der Anteil der IFN γ produzierenden OVA-spezifischen Th-Zellen bei der negativen Kontrolle im Mittel bei $4.8 \pm 0.7\%$, bei der nicht-gekoppelten Antigen-Präsentation bei $6.9 \pm 0.8\%$ und bei der gekoppelten Antigen-Präsentation bei $9.6 \pm 0.9\%$. Für das drei-Zelltyp-Cluster mit regulatorischen Effektor Th-Zellen des Typs 2 wurde der Anteil der IL-4 produzierenden OVA-spezifischen Th-Zellen gemessen, der bei der negativen Kontrolle im Mittel bei $1.4 \pm 0.4\%$, bei der nicht-gekoppelten Antigen-Präsentation bei $4.7 \pm 0.5\%$ und bei der gekoppelten Antigen-Präsentation bei $8.6 \pm 0.9\%$ lag. Diese Unterschiede sind nach Durchführung des Studenten T-Tests für die Typ 1 Cluster statistisch sehr signifikant ($P=0.0027$) und für die Typ 2 Cluster statistisch extrem signifikant ($P<0.0001$) und deuten daraufhin, dass eine enge räumliche Nähe zwischen naiven und regulatorischen Th-Zellen, wie sie nur bei gekoppelter Antigen-Präsentation entstehen kann, für die Polarisierung von naiven Th-Zellen wichtig ist.

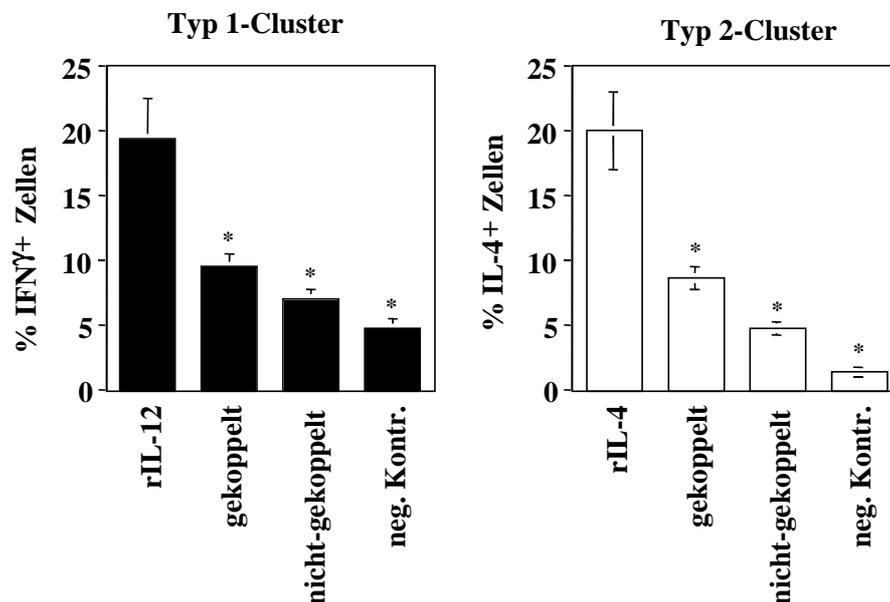


Abb.24 Eine effektive Polarisierung der naiven OVA-spezifischen Th-Zellen im drei-Zelltyp-Cluster erfordert den direkten zellulären Kontakt über die DZ mit den regulatorischen Effektor Th-Zellen. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen der intrazellulären Zytokinproduktion von 8 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (vgl. auch mit Abb. 23). Die Sternchen deuten die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen negativen Kontrollen und Ansätzen mit nicht-gekoppelter und gekoppelter Antigen-Präsentation an.

3.3.3 Polariserte Typ 1 Th-Zellen induzieren die IL-12 Produktion der DZ am effektivsten

Um die Rolle der DZ bei der Polarisierung der naiven OVA-spezifischen Th-Zellen näher zu untersuchen, wurde die IL-12 Produktion der DZ als Antwort auf verschiedene Stimuli analysiert. Dazu wurden DZ alleine, mit naiven OVA-spezifischen oder mit naiven OVA-spezifischen und Typ 1 regulatorischen Effektor Th-Zellen bei gekoppelter sowie bei nicht-gekoppelter Antigen-Präsentation inkubiert und die Kinetik der IL-12 Produktion durch intrazelluläre Anfärbung der DZ mit einem mAk, der die konstitutiv exprimierte p40 Untereinheit und den p70 Heterodimer erkennt, gemessen. Abbildung 25 zeigt exemplarisch eine solche Kinetik. Ohne zusätzlichen Stimulus produzierten die DZ so gut wie kein IL-12 und als Folge der Inkubation mit naiven OVA-spezifischen Th-Zellen ließen sich in dem in Abb. 25 dargestellten Experiment 1.7% IL-12⁺ Zellen nachweisen, die ihre maximale Produktion nach 8 Stunden erreichten (Abb. 25). Typ 1 regulatorische Effektor Th-Zellen induzierten schon nach 6 Stunden bei gekoppelter Antigen-Präsentation 16.6% und bei nicht-gekoppelter Antigen-Präsentation 12.6% IL-12 produzierende DZ. Der Unterschied in der IL-12 Produktion der DZ zwischen gekoppelter und nicht-gekoppelter Antigen-Präsentation liegt vermutlich an einem experimentellen Detail, da bei der gekoppelten Antigen-Präsentation alle mit Antigen beladenen DZ mit den polarisierten Typ 1 Effektor Th-Zellen interagieren können, wohingegen bei der nicht-gekoppelten Antigen-Präsentation nur die Hälfte der DZ mit CytC beladen ist und deswegen auch nur die Hälfte mit den Typ 1 Th-Zellen in Kontakt treten kann. Aus Abbildung 25 geht hervor, dass polarisierte Typ 1 Effektor Th-Zellen bei den DZ die IL-12 Produktion schneller und effektiver induzieren als naive Th-Zellen.

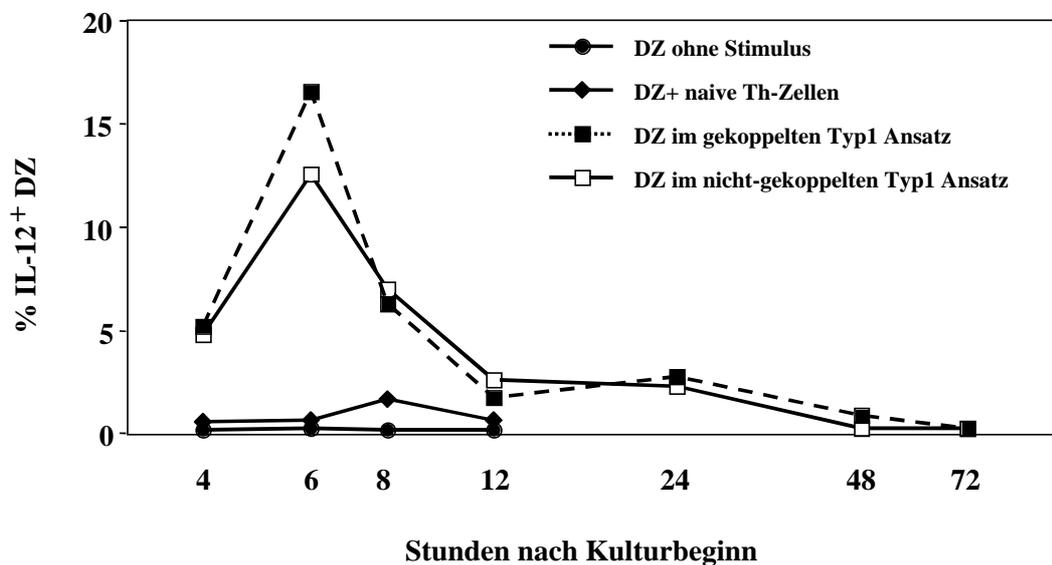


Abb.25 Kinetik der IL-12 Produktion von DZ im Typ 1 Cluster. DZ wurden entweder alleine (schwarze Kreise) oder mit naiven OVA-spezifischen (weiße Kreise) oder mit naiven OVA-spezifischen und Typ 1 regulatorischen Effektor Th-Zellen bei gekoppelter (schwarze Quadrate) sowie bei nicht-gekoppelter Antigen-Präsentation (weiße Quadrate) inkubiert. Jeweils 4 Stunden vor den angegebenen Zeitpunkten wurden die Kulturen mit Brefeldin A versetzt und zu den angegebenen Zeitpunkten mit PFA fixiert. Die IL-12 Produktion der CD11b⁺ DZ wurde intrazellulär im Durchflußzytometer bestimmt.

Um zu erklären, warum polarisierte Effektor Th-Zellen die IL-12 Produktion der DZ stärker induzieren können als die naiven OVA-spezifischen Th-Zellen, sollte untersucht werden, welche Rolle das CD40 Molekül bei der Induktion der IL-12 Produktion der DZ spielt. Dazu wurden DZ wieder alleine, mit einem stimulierenden anti-CD40 mAk, mit naiven OVA-spezifischen oder mit naiven und regulatorischen Typ 1 Effektor Th-Zellen bei gekoppelter Antigen-Präsentation inkubiert und nach 6 Stunden die intrazelluläre IL-12 Produktion der CD11b⁺ DZ gemessen. Ohne zusätzliche Stimulation produzierten nur 5.5% der CD11b⁺ DZ IL-12, die Inkubation mit dem anti-CD40 mAk bedingte 13.1% und mit naiven OVA-spezifischen Th-Zellen 19.6% IL-12 produzierende DZ. Die Inkubation mit naiven und Typ 1 Effektor Th-Zellen bei gekoppelter Antigen-Präsentation induzierte bei 50.9% der DZ die stärkste IL-12 Produktion (Abb. 26) und deutet auf eine untergeordnete Rolle des CD40 Molekül bei der Induktion der IL-12 Expression. Der Vergleich der Abbildungen 25 und 26 verdeutlicht die von Experiment zu Experiment recht unterschiedliche Fähigkeit der DZ, IL-12 zu produzieren.

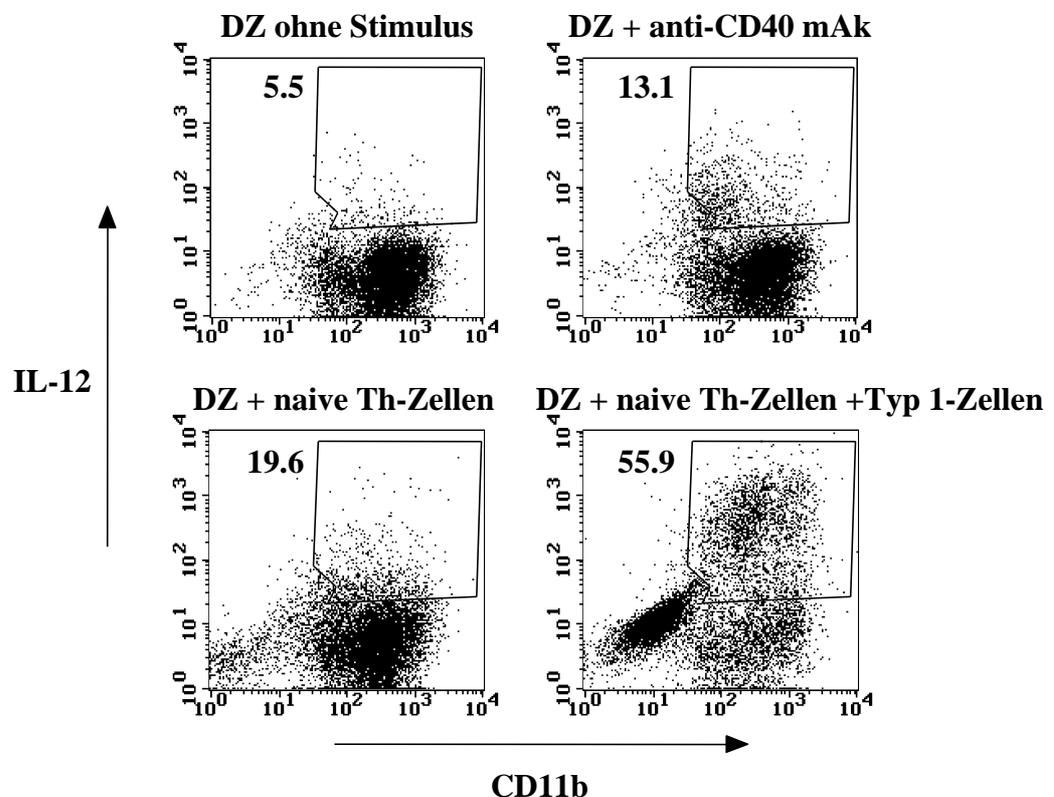


Abb.26 Die Stimulation über CD40 spielt bei der Induktion der IL-12 Expression in DZ eine untergeordnete Rolle. DZ wurden entweder alleine (oben links), mit 10µg/ml anti CD40 mAk (oben rechts), mit naiven OVA-spezifischen Th-Zellen (unten links) oder mit naiven und regulatorischen Typ 1 Effektor Th-Zellen bei gekoppelter Antigen-Präsentation (unten rechts) inkubiert und nach 6 Stunden die intrazelluläre IL-12 Produktion der DZ gemessen. Die jeweiligen Prozentzahlen der CD11b⁺ DZ sind angegeben. Die CD11b⁻ Zellen im unteren rechten Fenster der Abbildung sind Typ 1 Effektor Th-Zellen, die aufgrund des gleichen FSC/SSC Verhaltens wie DZ nicht ausgeblendet werden können.

3.3.4 Bei der Polarisierung von naiven Th zu Typ 1 Effektor Th-Zellen werden IFN γ und IL-12 nacheinander benötigt

Über die Blockierung von IFN γ oder IL-12 im Typ 1 Cluster wollten wir eine mögliche Hierarchie unter den Zytokinen, die für eine Typ 1 Polarisierung benötigt werden, untersuchen. In einer ersten Näherung wurden Typ 1 Cluster bei gekoppelter Antigen-Präsentation mit entweder 20 μ g/ml anti-IFN γ oder 20 μ g/ml anti-IL-12 mAk angesetzt. Entgegen unserer Erwartung reduzierten beide mAk etwa gleich stark die Polarisierung der OVA-spezifischen Th-Zellen: Im Vergleich zu Cluster-Ansätzen ohne blockierende mAk reduzierte der anti-IFN γ mAk die IFN γ produzierende OVA-spezifischen Th-Zellen auf 68 und der anti-IL-12 mAk auf 58.8% (Abb. 27). Aus diesem Ergebnis ging hervor, dass die Bedeutung von IFN γ und IL-12 nicht hierarchisch zu betrachten ist, sondern dass ein Unterschied in der Wirkung der beiden Zytokine eher in der zeitlichen Abfolge während einer Polarisierung zu suchen ist. Um diese zeitliche Abfolge zu analysieren, wurden wieder Typ 1 Cluster bei gekoppelter Antigen-Präsentation in Gegenwart von entweder anti-IFN γ oder anti-IL-12 mAk angesetzt. Diesmal wurden allerdings die blockierenden mAk erst nach 2, 4, 6 oder 8 Stunden nach Beginn der Cluster-Kulturen zugesetzt und die Anteile der IFN γ produzierenden OVA-spezifischen Th-Zellen wieder im Vergleich zu unblockierten Clustern in % errechnet. Abbildung 27 verdeutlicht, dass der anti-IFN γ mAk, wenn er zu Beginn der Cluster-Kulturen oder erst zwei Stunden später zugesetzt wird, die Polarisierung der OVA-spezifischen Zellen auf etwa 70% reduziert. Wird der mAk hingegen erst 4 Stunden oder später nach Beginn der Cluster-Kulturen zugesetzt, so zeigt er kaum mehr eine Wirkung auf die Polarisierung und räumt dem IFN γ somit nur während der ersten 4 Stunden eine Bedeutung ein. Im Gegensatz dazu reduziert der anti-IL-12

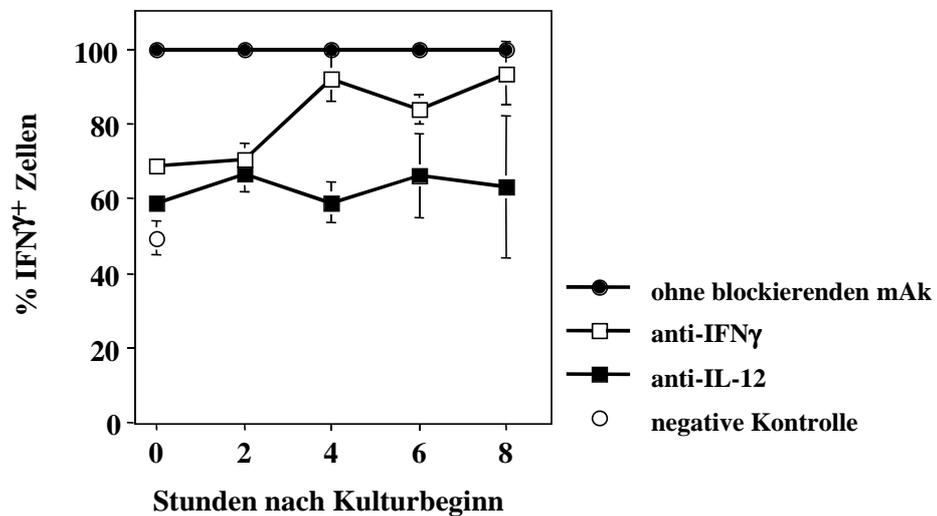


Abb.27 Bei der Polarisierung zu Typ 1 Th-Zellen werden IFN γ und IL-12 nacheinander in einem engen zeitlichen Rahmen benötigt. Drei-Zelltyp-Cluster mit Typ 1 Effektor Th-Zellen und gekoppelter Antigen-Präsentation wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Kulturbeginn mit 20 μ g/ml anti-IFN γ (weiße Quadrate) oder 20 μ g/ml anti-IL-12 (schwarze Quadrate) versetzt oder ohne blockierenden mAk (schwarze Kreise) kultiviert. Nach der Restimulation der gesamten Clusteransätze wurden die IFN γ Produzenten unter den OVA-spezifischen Th-Zellen in Bezug auf die Kontrolle ohne blockierenden mAk normalisiert. Die negative Kontrolle besteht aus naiven OVA-spezifischen Th-Zellen und DZ (weiße Kreise). Die Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwischen 3 und 5 Experimenten.

mAk die Polarisierung der OVA-spezifischen Zellen auf etwa 60%, wenn er zu Beginn oder während der ersten 8 Stunden nach Beginn der Cluster-Kulturen zugesetzt wird. Wir haben diese Blockierungsexperimente dahingehend gedeutet, dass IFN γ in den ersten 2-4 Stunden der Polarisierung wichtig ist, wohingegen IL-12 über einen längeren Zeitraum, nämlich mindestens 8 Stunden, benötigt wird (Abb. 27).

3.3.5 Übertragung der Arthritis durch adoptiven Transfer von Milz-Zellen aus CIA Tieren in SCID Mäuse

Abschließend sollte unser experimentelles drei-Zelltyp-Cluster dazu benutzen werden, am Mausmodell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) den Krankheitsverlauf zu beeinflussen. Kadowaki et al. haben bereits 1994 beschrieben, dass die CIA durch CD4⁺ Th-Zellen von einem erkrankten Tier auf SCID-Mäuse übertragen werden kann (Kadowaki et al., 1994). Dieses Modellsystem haben wir benutzt, um zunächst die Arthritis auszulösen, um sie dann durch regulatorische Effektor Th-Zellen abzuschwächen. Im Transfer werden die T-Zellen mit bovinem Kollagen Typ II restimuliert, und dieses Kollagen kann entweder in löslicher Form oder auf dendritischen Zellen präsentiert werden (Abb. 21). In unseren Experimenten löste die Restimulation der CIA-Th-Zellen durch Kollagen-beladene DZ einen höheren Arthritis-Index aus als die Restimulation mit löslichem Kollagen. Bei den negativ-Kontrollen lag der Median der Arthritis-Indices bei 3, bei den Mäusen, die mit löslichem Kollagen im Transfer stimuliert wurden, lag er bei 5.5 und bei den Mäusen, die mit Kollagen-beladenen DZ stimuliert wurden, lag der Median der Arthritis-Indices bei 6 (Abb. 28).

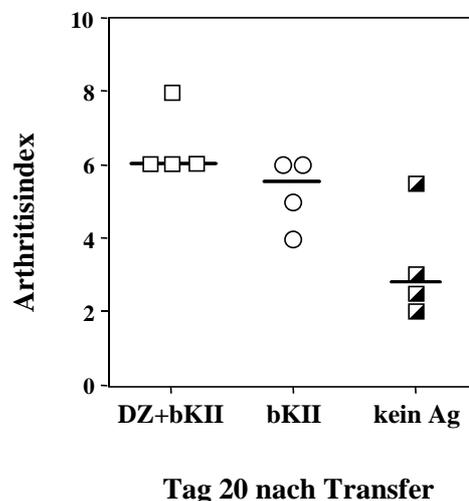


Abb.28 Übertragung der Arthritis durch adoptiven Transfer. 5×10^6 Milzzellen aus DBA/J Mäusen mit CIA wurden i.p. in SCID Mäuse transferiert, und am Tag 20 nach dem Transfer wurden die Arthritis-Indices nach Holmdahl bestimmt. Zusammen mit dem Transfer der Milzzellen erhielten die Empfängermäuse entweder mit bovinem Kollagen II (bKII) beladene DZ (weiße Quadrate), 250 μ g gelöstes bovines Kollagen (weiße Kreise) oder kein zusätzliches Antigen als negativ-Kontrolle (halb gefüllte Quadrate). Jedes Symbol repräsentiert den Arthritis-Index einer Empfängermaus und die Mediane für die jeweils 4 Mäuse pro experimenteller Gruppe sind als Linien gezeigt.

3.3.6 Verhinderung der CIA durch regulatorische Typ 2 Effektor Th-Zellen im drei-Zelltyp-Cluster

Da die Arthritis auslösenden Th-Zellen als Typ 1 Effektor Th-Zellen beschrieben worden sind, wollten wir diesen entgegenwirken und den Verlauf der Arthritis mit polarisierten Typ 2 Effektor Th-Zellen abschwächen. Zu diesem Zweck wurde unser *in vitro* drei-Zelltyp-Cluster modifiziert: Als Typ 2 Effektor Th-Zellen wurden OVA-spezifische T-Zelllinien, die zuvor in Richtung der Typ 2 Zytokinproduktion polarisiert worden waren, verwendet und mit diesen sollte die Zytokinproduktion der Kollagen Typ II-spezifischen Th-Zellen aus CIA Mäusen manipuliert werden. Die DZ werden für diese Experimente aus dem Knochenmark der F1 Generation von BALB/c und DBA/J Mäusen gewonnen.

Grundsätzlich zeichnen sich die CIA-Experimente durch eine geringe Reproduzierbarkeit aus. Obwohl für die Induktion der Arthritis mit Inzuchtstämmen gearbeitet wird, gibt es immer einen erheblichen Anteil an sogen. "non-respondern", die überhaupt keine Arthritis entwickeln. Und bei den Mäusen, die eine Arthritis entwickeln, gibt es erhebliche Unterschiede in den Arthritis-Indices (s.Abb. 28). Auch in unseren Experimenten gab es zwischen den einzelnen Transfers große Schwankungen und wir hätten, um unsere Ergebnisse statistisch abzusichern, viele Transfers mehr mit wesentlich höheren Zahlen an Tieren durchführen müssen.

Ich möchte mit Abbildung 29 einen Transfer zeigen, bei dem durch den adoptiven Transfer von Typ 2 Effektor Th-Zellen zusätzlich zu den Milzzellen aus CIA-Mäusen die Entstehung der Arthritis deutlich verhindert werden konnte. Zum Vergleich sind in Abb. 29 die Arthritis-Entwicklung in SCID Mäusen, die ausschließlich 5×10^6 Milzzellen aus CIA-Mäusen und 10^6 mit OVA und Kollagen Typ II

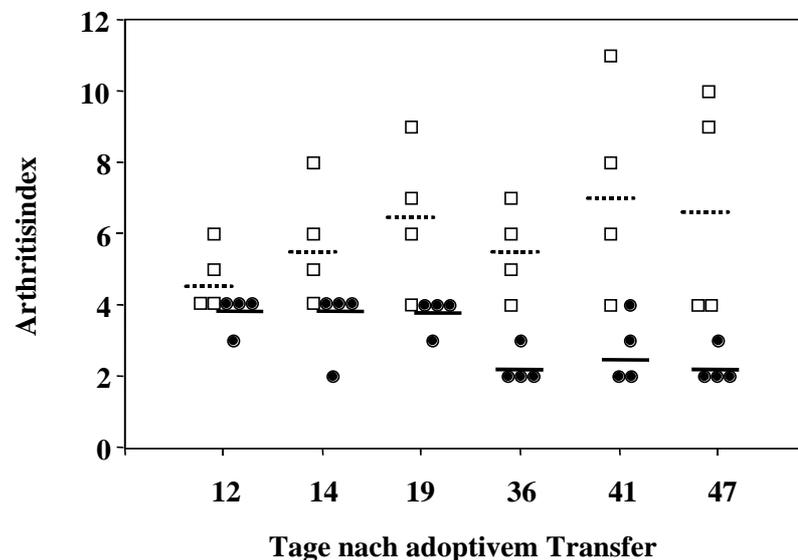


Abb.29 Verhinderung der CIA durch regulatorische Typ 2 Effektor Th-Zellen. 10^6 mit OVA und Kollagen Typ II beladene F1-DZ wurden zusammen mit 5×10^6 Milzzellen aus CIA-Mäusen (weiße Quadrate) oder 2×10^6 Milzzellen aus CIA-Mäusen und 2×10^6 OVA-spezifischen Typ 2 Effektor Th-Zellen (schwarze Kreise) i.p. in SCID-Mäuse transferiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Arthritis-Indices bestimmt. Die Mediane für die jeweils 4 Mäuse pro experimenteller Gruppe sind als Linien gekennzeichnet.

beladene F1-DZ i.p. transferiert bekamen, und die Verhinderung der Arthritis durch den gleichzeitigen Transfer von 2×10^6 OVA-spezifischen Typ 2 Effektor Th-Zellen dargestellt. Man erkennt auch bei diesen Transfers, dass der Arthritis-Index großen Schwankungen unterworfen ist. Bei den Mäusen, die mit Antigen beladene DZ und CIA-Milzzellen transferiert bekamen, entwickelten sich Arthritiden mit Indices zwischen 4 und 11 (Abb. 29). Bei den Mäusen, die zusätzlich Typ 2 Effektor Th-Zellen erhielten, überschritten die Arthritis-Indices nie den Wert 4 und entsprechen damit den negativen Kontrollen aus Abbildung 28. Trotz der geringen Anzahl von jeweils nur 4 Mäusen in den beiden experimentellen Gruppen ist das Ergebnis ermutigend.

4 Diskussion

4.1 Differentielle Expression als Mechanismus, mit dem MHC II Gene für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen prädisponieren

Mit dieser Arbeit gehe ich der Frage nach, wie bestimmte MHC II Gene für eine Autoimmunerkrankung prädisponieren bzw. vor deren Entstehung schützen können und untersuche als Mechanismus die differentielle Expression (Abb. 5). Dieses Modell beinhaltet, dass das Immunsystem durch eine differentielle Expression der unterschiedlichen Haplotypen auf den verschiedenen Antigen-präsentierenden Zellen eine stete Polarisierung erfährt, die im fortgeschrittenen Alter des betroffenen Individuums dazu führt, dass überwiegend nur noch Typ 1 oder Typ 2 Antworten erfolgen (Müller and Mitchison 97). In diesem polarisierten Milieu könnten Immunreaktionen, die unter ausgewogenen Zytokinbedingungen das auslösende Agens eliminieren und danach zum Erliegen kommen, in eine chronische Immunantwort gegen Selbst übergehen. Die Spezifität des MHC II Moleküls bei der Antigen-Präsentation spielt zwar auch eine Rolle, aber nur insofern, als das MHC II Molekül sowohl das krankheitsinduzierende Erreger-Epitop als auch ein ihm sehr ähnliches Selbst-Epitop präsentieren können muß, so dass über molekulare Mimikry die ursprünglich gegen den Erreger gerichtete Immunantwort auf Selbst umgeleitet werden kann. Dadurch, dass die regulatorische Region des MHC II Moleküls über die jeweilige Expression entscheidet und die Spezifität eine untergeordnete Rolle spielt, bietet der Mechanismus der differentiellen Expression eine Erklärung sowohl für die gleichzeitige Assoziation von einem HLA-DR Molekül mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen als auch für die fehlende Assoziation anderer MHC II Allele, die ein „shared epitope“ tragen (s. Tabelle 2 und Abb. 4).

Autoimmunerkrankungen sind durch ein Ungleichgewicht zwischen den regulatorischen Typ 1 und Typ 2 Effektor Th-Zellen charakterisiert (Müller et al. 1998, Mitchison et al. im Druck) und erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer Verschiebung des Zytokin-Gleichgewichts und protektiven/immunsuppressiven MHC II Allelen gab es in der Maus im Zusammenhang mit der Antikörper-Antwort auf eine Immunisierung mit allo-HPPD: Mäuse des empfänglichen Haplotyps I-A^d reagierten innerhalb von 24 Stunden mit einer kurzen IL-4 Ausschüttung und später mit einer Antikörper-Produktion. Die Anwesenheit von nur einem protektiven/immunsuppressiven I-A^b Allel reichte aus, die Typ 2 Zytokinproduktion und die spätere Antikörper-Antwort zu unterbinden (Brunner et al., 1995). Hesse und Mitchison haben diese Beobachtungen einen Schritt weiter getragen, als sie im System der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) den Effekt eines protektiven Allels durch die Verabreichung eines anti-IL-4 mAk zum Zeitpunkt der Immunisierung mit Kollagen ersetzt haben (Hesse et al., 1996).

Ein deutlicher Hinweis auf eine differentielle Expression von MHC II Molekülen ging später aus den Arbeiten von Janitz et al. hervor, die einen einzelnen Basenpaar-Austausch in der X-Box des Promotors des I-A^b Gens beschrieben haben, der ausschließlich in einer Makrophagen-Zelllinie zu einer erhöhten Transkription führt (Janitz et al., 1997).

4.1.1 Die Differentielle Expression der MHC II Gene auf murinen Makrophagen ist mit dem T-Zell-Zytokinprofil und protektiven/immunsuppressiven Effekten assoziiert

Ich habe in der vorliegenden Arbeit die differentielle Expression verschiedener MHC II Haplotypen auf den unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen zum ersten Mal auf Proteinebene bestimmt. Dabei habe ich sowohl mit unterschiedlichen als auch mit kongenen Mausstämmen gearbeitet und die Expression von I-A^b, I-A^d, I-A^k, I-A^q und I-E^k auf Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen quantifiziert. Die Analyse erfolgte *in vivo* an frisch isolierten und an *in vitro* aus Knochenmark-Vorläuferzellen generierten und aktivierten APZ. Die erstaunliche Beobachtung war, dass auf aktivierten Knochenmark-Makrophagen die protektiven I-A^b und I-E^k Moleküle 100-fach stärker exprimiert werden als das mit der Kollagen-induzierten Arthritis assoziierte I-A^q (s. Abb. 7 und 8). Auf B-Zellen und dendritischen Zellen haben wir diese differentielle Expression nicht gefunden. Unsere *in vitro* Daten konnten wir durch *in vivo* Ergebnisse insofern bestätigen, als die Expression des I-E^k im Lymphknoten auf Makrophagen stärker und die Expression des I-A^q auf Makrophagen schwächer war als auf B-Zellen (s. Abb. 6). Da wir unsere *in vivo* Daten nicht quantifiziert haben, können wir nur die durch die Färbung entstandenen mittleren Immunfluoreszenzen miteinander vergleichen, die zwar keine 100-fachen dafür aber 2- bis 3-fache Unterschiede ergaben. Eine doppelte Intensität der Immunfluoreszenz entspricht allerdings mehr als einer doppelten Anzahl an gefärbten Oberflächenmolekülen. Eine mögliche Erklärung für die geringeren Unterschiede in der *in vivo* verglichen mit der *in vitro* Expression von I-E^k und I-A^q könnte darin liegen, dass alle *in vitro* generierten Knochenmark-Makrophagen durch adherentes Wachstum aktiviert wurden, wohingegen *in vivo* nur ein kleiner Bruchteil der Makrophagen im Lymphknoten eine Aktivierung durchläuft und als Folge die MHC II Expression verstärkt.

Die auf Knochenmark-Makrophagen verstärkte MHC II Expression bewirkte bei I-A^b und I-E^k restringierten Th-Zellen *in vitro* eine erhöhte IFN γ -Produktion und damit eine Entwicklung zu Typ 1 Effektor Th-Zellen (s. Abb. 11). Im Gegensatz dazu antworteten Th-Zellen aus BALB Mäusen, die durch das auf Knochenmark-Makrophagen niedrig exprimierte I-A^d Molekül restringiert sind, mit einer stärkeren IL-4 Ausschüttung als die durch das hoch exprimierte I-A^b restringierte Th-Zellen (s. Abb. 13). Wir konnten somit unser Grundmodell der differentiellen MHC II Expression experimentell bestätigen und zeigen, dass eine unterschiedlich starke Expression auf Makrophagen zu einer unterschiedliche Polarisierung der mit ihnen interagierenden Effektor Th-Zellen führt (s. Abb. 5). Unsere Beobachtung der differentiellen MHC II Expression auf Makrophagen weist auf die Bedeutung der Makrophagen als Antigen-präsentierende Zelle hin und impliziert eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung naiver T-Zellen zu Beginn einer Immunantwort, die man bisher nur den dendritischen Zellen zugedacht hat, (Santin et al., 1999; Marland et al., 1996).

Wie könnte man nun die beiden Beobachtungen, dass einerseits die Kollagen-induzierte Arthritis in der Maus eine Erkrankung mit einem in Richtung der Typ 1 Zytokine verschobenen Gleichgewicht ist und andererseits die protektiven Allele durch ihre verstärkte Expression auf Makrophagen bevorzugt zu Typ 1 Th-Effektorzell-Antworten führen in Einklang bringen? Unsere Vorstellung der Entstehung von Kollagen-induzierter Arthritis ist in Abbildung 30 schematisch dargestellt: Die Immunisierung mit Kollagen Typ II (cII) bewirkt bei Mäusen des empfänglichen Haplotyps H-2q innerhalb von 24 Stunden eine IL-4 Ausschüttung, die für die Ausbildung von hoch-affinen anti-cII Antikörpern vom IgG1 Isotyp benötigt wird. Diese IgG1 Antikörper könnten dann über

Komplement-Fixierung den ersten Angriff auf den Gelenkknorpel vermitteln und werden erst im späteren Verlauf der Erkrankung von Typ 1 Effektor Th-Zellen abgelöst. In unserem Modell sorgt die Anwesenheit protektiver MHC II Allele überwiegend für Typ 1 Antworten und verhindert damit eine frühe IL-4 Ausschüttung und die Entstehung der Arthritis.

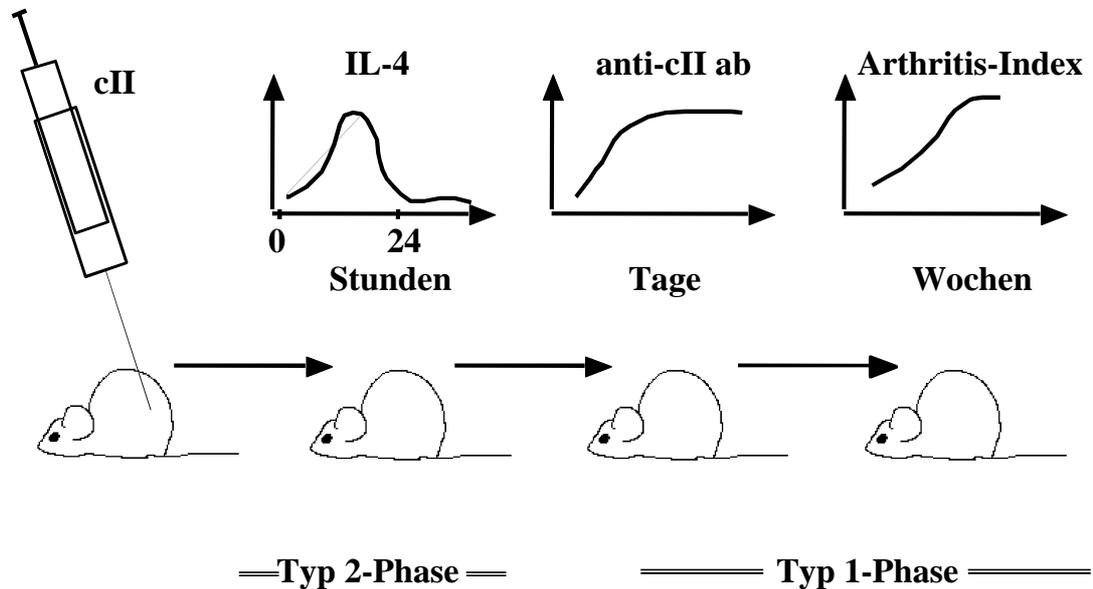


Abb.30 Abfolge von Typ 2- (IL-4 Ausschüttung, Antikörperproduktion) und Typ 1-Phase in der Arthritis-Entwicklung nach Immunisierung mit Kollagen Typ II (cII) in Mäusen eines empfänglichen H-2 Haplotyps.

4.1.2 Differentielle Expression der MHC II Gene beim Menschen

Der nächste Schritt meiner Arbeit bestand darin, unsere Untersuchungen auf den Menschen auszudehnen und zunächst einmal herauszufinden, ob es auch auf menschlichen APZ eine differentielle Expression der HLA Allele gibt. Als erstes haben wir bei einer Kohorte früher RA-Patienten die HLA-DR Gene typisiert und eine Assoziation zwischen DR4 und dem Auftreten von RA – wenn auch mit niedriger Frequenz – bestätigt (Listing et al., im Druck), (Abb. 14). Bei unserer Kohorte waren 37% der RA-Patienten positiv für DR4, bei der Studie von Lang et al. waren es 58%. Die in der Literatur beschriebene Assoziation mit DR10 mit der RA (Lang et al., 1990; Weyand et al., 1995; Valenzuela et al., 1999) konnten wir zwar ebenfalls an 4% der RA-Patienten beobachten, allerdings sind die Fallzahlen von 5 DR10 positiven Patienten im Vergleich zu keiner DR10 positiven Kontrollperson zu klein, um statistische Signifikanz zu erreichen. Eine Assoziation zwischen DR1 und dem Auftreten der RA konnten wir an unserer Kohorte nicht beobachten. Beide, die schwache Assoziation von DR4 mit dem Auftreten der RA sowie die fehlende Assoziation mit DR1 führen wir auf das frühe Krankheitsstadium der Patienten und damit verbunden, deren Heterogenität, zurück. Im Gegensatz zu den Studien von Weyand et al. oder Lang et al., die sich ausschließlich mit Patienten mit schwerem Verlauf im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung oder mit RF⁺ Patienten beschäftigen, umfasst unsere Studie ein noch völlig

heterogenes Patienten-Kollektiv, aus dem sowohl schwere und mildere Verläufe als auch Spontanremissionen hervorgehen werden. Dafür konnten wir die Assoziation von DR1 und DR4 mit einem schwereren Krankheitsverlauf beobachten, wobei 63% der DR1 und 67% der DR4 positiven RA Patienten einen Ratingen Score von > 0 zeigten (Abb. 15). Diese unterschiedlichen Assoziationen deuten unterschiedliche Wirkungen der MHC II Gene bei der Entstehung und dem Verlauf der RA an.

Die Analyse der Expression menschlicher MHC II Moleküle auf Proteinebene ist wegen des hohen Polymorphismus bei den HLA Allelen deutlich komplizierter als die entsprechende Untersuchung in der Maus. Es gibt allein über 200 verschiedene HLA-DRB Allele, bei denen sich der Polymorphismus in der kodierenden Region ausschließlich auf das Exon 2, das für die 3. hypervariable Region im Protein kodiert, beschränkt und in einzelnen Fällen auf einem einzigen Aminosäure-Austausch beruht. Aus dieser auf einen kleinen Genabschnitt beschränkten Diversität resultiert die Schwierigkeit, gegen jedes Allel einen spezifischen, monoklonalen Antikörper herzustellen, der für die Analyse der Proteinexpression nötig ist. Für unsere Arbeiten standen uns 4 verschiedene Antikörper zur Verfügung, von denen zwei sämtliche DR Moleküle, der dritte alle DR4 Moleküle und der vierte DR7 erkennt (s. Abb. 16). Damit konnten wir in homozygoten Individuen die Expression von DR4, DR7 und indirekt auch von DRB4 auf der Proteinebene analysieren und die differentielle Expression beobachten. Auf die folgenden Ergebnisse möchte ich im Einzelnen eingehen:

i) Die Expression von DR4 und DRB4 wird auf Monozyten unterschiedlich reguliert.

Wir haben mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut DR4 homozygoter Spender für 2 Tage unter stimulierenden Bedingungen in Kultur genommen und sowohl auf frischen als auch auf 1 und 2 Tage stimulierten B-Zellen und Monozyten die HLA-DR Expression analysiert (Abb. 19). Während die DR4 Expression auf beiden, den B-Zellen und Monozyten, über den Zeitraum von 2 Tagen unverändert blieb, nahm die gesamt-DR Expression auf Monozyten innerhalb der ersten 24 Stunden um das 4 - 6-fache an mittlerer Fluoreszenzintensität zu. Daraus schließen wir, dass DRB4 – im Gegensatz zu DR4 – in seiner Expression stimulierbar ist und dass die DRB4 Expression auf stimulierten Monozyten mindestens 4 - 6-fach höher sein muß als die DR4 Expression, da bei der Analyse der gesamt-DR Expression ein Anstieg in der Expression des geringer exprimierten Proteins nicht auffallen würde. Physiologisch könnte es von großem Vorteil sein, zwei unterschiedliche DR-Moleküle, die zwar beide konstitutiv exprimiert werden, von denen eines aber bei Bedarf noch hochreguliert werden kann, zu tragen. Wir könnten so flexibel auf die antigene Belastung reagieren und die Antigen-präsentierende Wirkung verstärken, wenn der Erreger persistiert. Die Tatsache, dass wir die Hochregulation der DRB4 Expression ausschließlich auf den Monozyten und nicht auf den B-Zellen beobachten konnten, weist erneut auf eine entscheidende Rolle der Monozyten bei der Antigen-Präsentation hin. Wir können an dieser Stelle keine Aussagen zur HLA-DR Expression auf menschlichen dendritischen Zellen treffen, da z.Zt. keine spezifischen monoklonalen Antikörper zur Verfügung stehen, mit denen wir unsere Analysen auf DZ hätten ausdehnen können.

ii) Die gesamt-HLA-DR Expression ist auf B-Zellen stärker als auf Monozyten.

Wir haben die auf den B-Zellen und Monozyten aus peripherem Blut von DR4 und DR7 homozygoten Spendern exprimierten HLA-DR Moleküle quantifiziert und für die gesamt-DR Moleküle auf den B-

Zellen eine 2.6 – 4.9-fach höhere Expression als auf den Monozyten festgestellt (Abb. 20). In der Maus ist die I-A bzw. I-E Expression auf den B-Zellen etwa 8-mal höher als auf den Makrophagen (s. Abb. 8) und damit liegen die Unterschiede in der MHC II Expression auf B-Zellen und Monozyten zwischen Mensch und Maus in der gleichen Größenordnung. In Anbetracht der geringeren Oberfläche von B-Zellen im Vergleich zu Monozyten muß die Dichte an MHC II Molekülen auf den B-Zellen erheblich größer sein, so dass die diskutierte Unfähigkeit von B-Zellen, naive Th-Zellen zu aktivieren, tatsächlich in der mangelnden Expression von kostimulatorischen Molekülen zu suchen sein könnte (Croft and Swain, 1995).

iii) DR4 homozygote B-Zellen exprimieren signifikant mehr HLA-DR Moleküle als DR7 homozygote. Die Analyse der Expression aller HLA-DR Moleküle auf den Oberflächen von B-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender ergab eine signifikant höhere gesamt-DR Expression auf den DR4 verglichen mit den DR7 homozygoten B-Zellen. Dieser Unterschied war 3.3-fach beim Vergleich der Mediane und beruhte zu unserer Überraschung nicht auf der unterschiedlichen Expression von DR4 und DR7 (Abb. 20). Auf der Transkriptionsebene haben Louis et al. bereits ähnliche Daten beschrieben, als sie die Transkriptionsaktivitäten von DR4 und DR7 in einer B-Zelllinie miteinander verglichen und maximal einen zweifachen Unterschied gezeigt haben (Louis et al., 1994). Unsere Beobachtung der unterschiedlichen gesamt-DR bei gleichbleibender DR4 und DR7 Expression deutet eine differentielle Expression der DRB4 Gene, je nachdem ob sie mit einem DR4 oder einem DR7 gekoppelt vererbt werden, an.

Um diese differentielle Expression der DRB4 Gene zu untersuchen und möglicherweise auch mit der Entstehung einer Autoimmunerkrankung zu assoziieren, haben wir aus verschiedenen DR4 oder DR7 positiven gesunden Spendern und RA-Patienten die DRB4 Promotoren sequenziert und miteinander verglichen. Tatsächlich fanden wir unterschiedliche und hauptsächlich die in der Literatur bereits als DRB5, DRB(DR102) und DRBs(DR53) genannten Promotoren (Louis et al., 1993). Hier wollen wir in nächster Zukunft zwei verschiedene Ziele verfolgen: Erstens möchten wir herausfinden, ob ein DR4 Allel mit einem anderen DRB4 Promotor gekoppelt ist als ein DR7 oder ein DR9. Und zweitens möchten wir von den verschiedenen DRB4 Promotoren die Transkriptionsaktivität bestimmen, um dann eine bestimmte Expression mit dem Auftreten der RA und ggf. einem milden oder schwereren Krankheitsverlauf zu korrelieren. In B-Zelllinien wurde die Transkriptionsaktivität einzelner DRB Gene bereits ermittelt und dabei wurde für das DRB4 Gen eine etwa 5-fach höhere Transkription als für das DRB5 beschrieben, wobei es zur Transkriptionsaktivität des DRBs(DR53) Promotors noch keine Daten gibt (Louis et al., 1994). Wir konnten bei den von uns sequenzierten Promotor-Sequenzen keine der als DRB4 bezeichneten Sequenzen erkennen und leiten daraus sowohl eine Diversität bei den Promotoren der mit DR4 oder DR7 gekoppelten DRB4 Genen als auch die Schwierigkeit, die an PCR-Produkten sequenzierten Promotoren den entsprechenden Strukturgenen zuzuordnen, ab. (Louis et al., 1993).

iv) DR4 wird auf den B-Zellen homozygoter RA Patienten erhöht exprimiert und durch die Behandlung mit Prednisolon signifikant herabgesänkt. Wir haben die DR4 und gesamt-DR Expression auf den B-Zellen von homozygoten gesunden Kontrollen und RA-Patienten mit und ohne Prednisolon-Behandlung analysiert und die mittleren Fluoreszenzintensitäten miteinander verglichen. Dabei zeigte sich eine erhöhte Expression des DR4 bei den RA-Patienten, die durch

die tägliche Einnahme von 2.5 – 20mg/Tag signifikant herabgesetzt wurde (Abb. 18 und Czerwony et al., 1999). Interessant war, dass Prednisolon auf die gesamt-DR Expression und damit auf die Expression des DRB4 kaum einen Einfluß zeigte und somit der entzündungshemmende Effekt über das DR4 Molekül vermittelt zu werden scheint.

4.1.3 Parallelen zwischen der differentiellen Expression in der Maus und beim Menschen

Wie können wir nun unsere Beobachtungen aus der Maus, wo die mit der CIA assoziierten Allele auf den Makrophagen schwächer exprimiert werden, mit den Ergebnissen beim Menschen, wo die RA-assoziierten HLA-DRB Haplotypen auf den B-Zellen verstärkt exprimiert werden, in Einklang bringen? Die Gemeinsamkeit besteht darin, dass sowohl eine abgeschwächte MHC II Expression auf Makrophagen als auch die verstärkte Expression auf B-Zellen eine Differenzierung der interagierenden Th-Zellen zu Typ 2 Effektorzellen begünstigt. Unter der Voraussetzung, dass für die Auslösung der Autoimmunreaktion im Menschen ebenfalls zuerst eine Typ 2 Antwort wichtig ist, wäre ein ähnlicher Mechanismus wie in Abb. 30 beschrieben, auch für den Menschen denkbar.

Das Neue am Modell der differentiellen Expression der MHC II Gene liegt darin, dass wir nicht nur den Polymorphismus in den kodierenden Regionen der Gene betrachten, sondern auch die vorhandenen Polymorphismen in den Promotor-Regionen mit einer funktionellen Bedeutung belegen (Mitchison et al. im Druck). Unterschiedliche Promotoren würden so durch unterschiedliche Transkriptionsaktivitäten differentielle Expressionen bewirken, wodurch der Population ein Höchstmaß an Flexibilität bei der Immunantwort auf die verschiedenen Erreger ermöglicht wird. Das hohe Maß an Diversität innerhalb der kodierenden Region der MHC II Gene deutet bereits daraufhin, dass es für das Überleben einer Art von Vorteil ist, vielfältig reagieren zu können. Die beobachteten Polymorphismen in den Promotor-Regionen deuten auf einen ähnlichen Vorteil durch differentielle Expression hin.

Die MHC II Promotoren sind zwischen Mensch und Maus so stark konserviert, dass an ihnen ursprünglich die Transkriptionsfaktor-bindenden Boxen definiert werden konnten. Diese starke Konservierung über die Evolution von der Maus zum Menschen deutet bereits an, dass diese Promotoren für eine kontrollierte und gewebespezifische Expression, die für das Überleben der jeweiligen Art wichtig ist, optimiert sind. Im Gegensatz zu den Unterschieden zwischen menschlichen und murinen MHC II Promotoren, die hauptsächlich außerhalb der S-, X- und Y-Boxen liegen, sind die bei verschiedenen Allelen der Maus auftretenden Polymorphismen genau auf diese Boxen konzentriert (Glimcher and Kara, 1992; Cowell et al., 1998). Diese innerhalb einer Art auftretenden Polymorphismen sind vermutlich nach der Trennung von Maus und Mensch eingeführt worden und deuten einen Vorteil in Form von Zugewinn an Flexibilität für die Gesamtpopulation an.

Von entscheidender Bedeutung für die Oberflächenexpression eines MHC II Proteins ist neben der Transkription und Translation die Heterodimer-Bildung. Dabei ist es möglich, dass bestimmte HLA-DR β -Ketten besser oder schlechter mit der α -Kette paaren, so dass bei gleicher Transkriptions- und Translationsrate mehr von dem einen als dem anderen Heterodimer auf die Oberfläche gelangt. Da bei unseren Ergebnissen die differentielle Expression jedoch auf jeweils einen Zelltyp

sowohl beim Menschen als auch bei der Maus beschränkt ist, schließe ich eine unterschiedliche Paarung der entsprechenden β - und α -Ketten aus. Zusätzlich wurde kürzlich in der Maus auf besondere Proteasen, die Cathepsine, hingewiesen, die eine Rolle bei der Degradierung der invarianten Kette (Ii) des MHC II Moleküls und damit bei der Beladung mit Peptid bzw. Transport an die Zelloberfläche spielen. In Cathepsin S^{-/-} Mäusen des H-2b Haplotyps exprimierten B-Zellen und DZ weit mehr Ii-beladene MHC II Oberflächenmoleküle als in Mäusen des H-2q Haplotyps. Allerdings hatte das Fehlen von Cathepsin S nicht die differentielle Oberflächenexpression der betroffenen MHC II Moleküle zur Folge (Nakagawa et al., 1999). Ich nehme daher an, dass die beobachtete differentielle Expression der MHC II Gene eher auf einer unterschiedlichen Transkription beruht und dass die jeweiligen Promotoren direkt für diese Unterschiede verantwortlich sind.

4.2 Immun-Deviation im drei-Zelltyp-Cluster

In den ersten beiden Abschnitten der vorliegenden Arbeit habe ich mich mit der differentiellen Expression der MHC II Gene beschäftigt und aufgezeigt, dass eine unterschiedliche Expression auf den verschiedenen APZ die Th-Effektorzell-Antworten polarisiert und damit die Voraussetzung für die Entstehung einer Autoimmunerkrankung schafft. In diesem letzten Abschnitt interessiert mich, wie bereits polarisierte Effektor Th-Zellen manipuliert werden können, so dass der weitere Krankheitsverlauf aufgehalten oder abgeschwächt wird. Als Alternative zu rekombinanten Zytokinen, die *in vivo* nur eine geringe Halbwertszeit haben und deswegen eine begrenzte therapeutische Wirkung erzielen, haben wir das drei-Zelltyp-Cluster entwickelt und sowohl *in vivo* am Modell der CIA als auch *in vitro* getestet.

Durch den adoptiven Transfer von gleichzeitig CIA-auslösenden Milzzellen, mit bovinem Kollagen Typ II (bKII) und Ovalbumin (OVA) beladenen dendritischen Zellen (DZ) sowie OVA-spezifischen Typ 2 Effektor Th-Zellen wurden die Voraussetzungen für die Generierung eines drei-Zelltyp-Clusters *in vivo* gebildet und die Entstehung der CIA drastisch verringert (Abb. 29). Wir haben uns für die Auslösung der Arthritis über einen adoptiven Transfer von CIA-auslösenden Milzzellen aus dem empfänglichen Mausstamm DBA/J in SCID-Mäuse entschieden, weil wir damit einen Einfluß des bei der Immunisierung benötigten Adjuvans auf die Th-Zellantworten umgehen. Allerdings müssen wir im Gegenzug grundsätzlich niedrigere Arthritis-Indices, eine „graft-vs-host“-Reaktion bei einigen Empfängermausen sowie hohe Hintergrundwerte beim Transfer von CIA-Milzzellen ohne lösliches bKII hinnehmen und wir haben deswegen in unseren Experimenten große Schwankungen erlebt. Mit dem in Abb. 29 dargestellten Experiment zeigen wir jedoch, dass drei-Zelltyp-Cluster therapeutische Bedeutung haben könnten und es wäre denkbar, diese Therapie auf RA-Patienten auszudehnen. Voraussetzung dafür sind die *in vitro* Generierung von autologen Typ 2 Effektor Th-Zellen und APZ, die über die zusätzliche Beladung mit einem Antigen, das für artikulären Knorpel spezifisch ist, in die Gelenke dirigiert werden. Eine Manipulation des für die Autoimmunerkrankung charakteristischen Th-Zell-Zytokinprofils könnte für die Patienten einen nur gering invasiven Eingriff bedeuten.

Die Analyse der drei-Zelltyp-Cluster *in vitro* hat uns grundlegende Erkenntnisse zur T-Zellkommunikation ermöglicht, die für die Entwicklung einer effektiven Therapie wichtig sind. Aus

Abb. 24 geht hervor, dass DZ innerhalb eines drei-Zelltyp-Clusters in der Lage sind, die Differenzierung zu Typ 1 oder zu Typ 2 Effektor Th-Zellen gleich gut zu vermitteln. Da wir die DZ einheitlich *in vitro* in Gegenwart von rGM-CSF aus Knochenmark-Vorläuferzellen generiert und durch die Zugabe von rTNF- α zur Reifung gebracht haben, sind in unserem System ausschließlich die regulatorischen Typ 1 oder Typ 2 Effektor Th-Zellen für die Differenzierung der naiven Th-Zellen im Cluster verantwortlich. Damit stehen unsere Daten im Widerspruch zu bereits veröffentlichten Ergebnissen, bei denen myeloische und lymphatische DZ unterschieden werden und letztere in der Maus für die Differenzierung zu Typ 1 Effektor Th-Zellen verantwortlich gemacht wurden (Pulendran et al., 1999). Menschliche DZ können *in vitro* in Gegenwart von rGM-CSF und rIL-4 aus peripherem Blut generiert und für einen therapeutischen Ansatz in genügend hoher Zahl gewonnen werden (Kalinski et al., 1997). Auch im Menschen unterscheidet man DZ1 und DZ2 und man stellt sich vor, dass sie durch ihre Herkunft oder rekombinante Zytokine instruiert werden, die Differenzierung zu entweder Typ 1 oder Typ 2 Effektor Th-Zellen zu bewirken (Kalinski et al., 1997; Kalinski et al., 1998; Rissoan et al., 1999).

Aus Abb. 24 geht ebenfalls hervor, dass in Abwesenheit hoher Konzentrationen rekombinanter Zytokine eine gekoppelte Antigen-Präsentation für eine effektive Manipulation der zu beeinflussenden Th-Zellen wichtig ist. Wir gehen davon aus, dass für die Immun-Deviation in unserem drei-Zelltyp-Cluster zweierlei benötigt wird: Das sind zum einen lösliche Faktoren wie die Zytokine, welche nur über sehr kleine Entfernungen zwischen zwei direkt benachbarten Zellen wirken. Und zum anderen sind es wahrscheinlich Oberflächenmoleküle, die durch den zellulären Kontakt stimuliert werden und eine Reaktion der betroffenen Zellen hervorrufen. In Abb. 26 sehen wir, dass der Kontakt mit polarisierten Typ 1 Effektor Th-Zellen bei den DZ die stärkste IL-12 Produktion bewirkt, die weder durch den Kontakt mit naiven Th-Zellen, polarisierten Typ 2 Effektor Th-Zellen (diese Daten sind nicht gezeigt), noch über die Stimulation mit einem anti-CD40 mAk erreicht wird. Da die IL-12 Produktion – ebenso wie die Produktion aller anderen bekannten Zytokine – bereits nach 6 Stunden ihren Höhepunkt erreicht (Abb. 25) nehme ich an, dass ein für Typ 1 Effektor Th-Zellen charakteristisches Oberflächenmolekül für die Stimulierung der DZ verantwortlich ist. Somit wäre *in vivo* gewährleistet, dass polarisierte Typ 1 Th-Effektor-Gedächtniszellen bei erneutem Kontakt mit dem entsprechenden Antigen für eine Differenzierung der frisch rekrutierten, naiven Th-Zellen zu Typ 1 Effektor Th-Zellen sorgen und die Antwort, die sich bei einem früheren Antigenkontakt bereits bewährt hat, schnell wiederholt werden kann. Die Identifizierung und Charakterisierung eines solchen Typ 1 Th-Effektorzell-typischen Oberflächenmoleküls, das die IL-12 Produktion in DZ stimuliert, wird uns in nächster Zukunft beschäftigen und wird nicht nur für die Grundlagenforschung, sondern auch therapeutisch von Interesse sein. Man könnte sich vorstellen, dass in einem drei-Zelltyp-Cluster die polarisierten Typ 1 Effektor Th-Zellen durch einen mAk gegen dieses Oberflächenmolekül ersetzt werden könnten, so dass die DZ auch ohne Typ 1 Effektor Th-Zellen zur maximalen IL-12 Produktion angeregt wird. Den in Abb. 27 angedeuteten, sequentiellen Bedarf von IFN γ und IL-12 bei der Polarisierung naiver Th-Zellen zu Typ 1 Effektor Th-Zellen deuten wir wie in Abb. 31 gezeigt: Der Kontakt zwischen der bereits polarisierten Typ 1 Effektor Th-Zelle und der DZ bewirkt bei der T-Zelle die Ausschüttung von IFN γ , welches in den ersten 4 Stunden der Polarisierung der naiven Th-Zellen benötigt wird und zweierlei induzieren könnte: Die Induktion der Expression des hoch-affinen IL-12 Rezeptors auf den naiven Th-Zellen (Guler et al., 1997; Szabo et al., 1997) und die Verstärkung der Expression

von MHC II auf den DZ (Akbar et al., 1996). An unseren Blockierungsexperimenten mit anti-IFN γ mAk konnten wir sehen, dass das von den Typ 1 Effektor Th-Zellen sekretierte IFN γ auf die IL-12 Produktion der DZ keinen Einfluß hat (diese Daten sind nicht gezeigt). Das IL-12 der DZ wird in den ersten 8 Stunden der Polarisierung – aber wahrscheinlich über einen längeren Zeitraum hinweg – benötigt und leitet die molekularen Veränderungen wie Demethylierung und Remethylierung ein, die mit Zellteilungen und mit der irreversiblen Differenzierung zu polarisierten Effektor Th-Zellen einhergehen (Agarwal and Rao, 1998; Bird et al., 1998; Brown et al., 1999; Richter et al., im Druck).

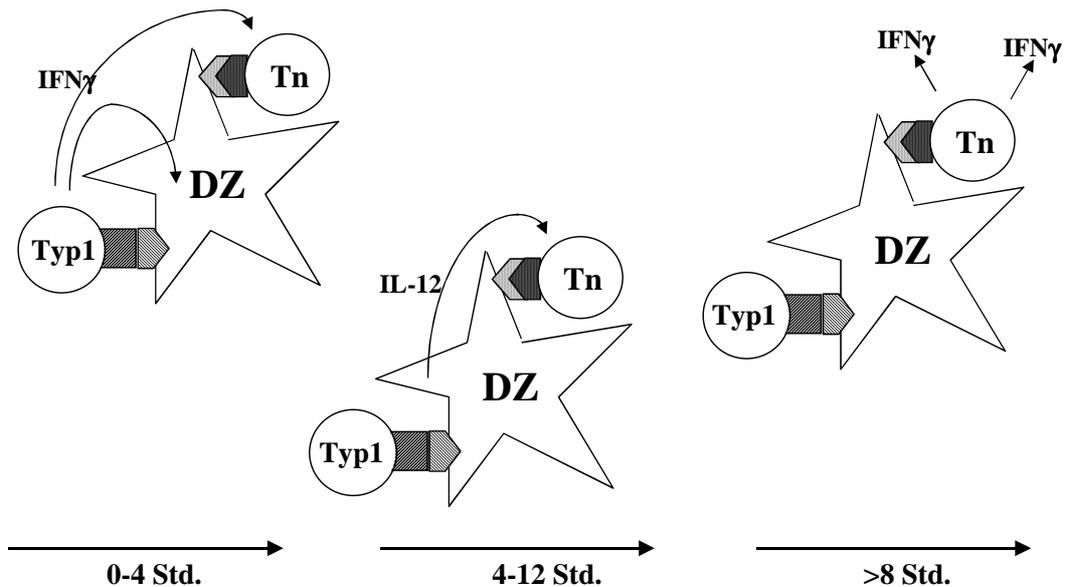


Abb.31 Sequentieller Bedarf von IFN γ und IL-12 bei der Polarisierung naiver Th-Zellen (Tn) im drei-Zelltyp-Cluster mit dendritischen Zellen (DZ) und bereits polarisierten Typ 1 Effektor Th-Zellen (Typ 1). Die Pfeile symbolisieren, von welchen Zellen welche Zytokine ausgeschüttet werden und auf welche Zellen sie wirken.

Der sequentielle Bedarf an einerseits Th-Effektorzell- und andererseits DZ-typischen Zytokinen deutet die Möglichkeit einer „temporal bridge“, einer zeitlichen Entzerrung der Ereignisse im drei-Zelltyp-Cluster, an (Ridge et al., 1998). *In vivo* ist die Wahrscheinlichkeit, dass zwei unterschiedliche Th-Zellen gleichzeitig auf eine DZ, die für beide Th-Zellen das jeweils spezifische Peptid präsentiert, treffen, äußerst gering. Es würde aber physiologisch Sinn machen, wenn eine DZ i) am Ort der Entzündung Antigen aufnimmt, ii) von bereits vorhandenen Th-Effektor-Gedächtniszellen vorbereitet wird, die gleiche Polarisierung auf naive Th-Zellen zu übertragen und iii) in den nächsten Lymphknoten wandert, um dort naive erregerspezifische Th-Zellen zu rekrutieren und diese iv) zu Effektor Th-Zellen polarisiert. Diese „temporal bridge“ würde zwar zeitlich durch die begrenzte Lebensdauer reifer DZ limitiert, würde aber in einem größeren räumlichen Umfeld erregerspezifische Th-Zellen in eine laufende Immunantwort rekrutieren (Ridge et al., 1998).

Unser drei-Zelltyp-Cluster erlaubt uns, die Aktivierung und das Gedächtnis von DZ *in vitro* zu

untersuchen, um unser Wissen später therapeutisch einzusetzen. Bei der Manipulation polarisierter Autoimmunreaktionen könnte es völlig ausreichend sein, DZ *ex vivo* vorzubehandeln, indem der Einfluß polarisierter Effektor Th-Zellen über mAk imitiert wird. Das mögliche Gedächtnis der DZ wird dann therapeutisch ausgenutzt und die auf eine bestimmte Polarisierung vorbereitete DZ wird mit einem für artikulären Knorpel spezifischen Antigen beladen und adoptiv in die Patienten transferiert. Der in Abb. 31 dargestellte kurze Bedarf an IFN γ könnte leicht durch die Verabreichung von rekombinantem Zytokin nachgeahmt werden und für den langfristigen Bedarf an IL-12 – im Fall einer erwünschten Polarisierung zu Typ 1 Effektor Th-Zellen – wären die transferierten DZ zuständig.

Unser Wissen über die für eine Polarisierung zu Typ 2 Effektor Th-Zellen benötigten löslichen Faktoren und Oberflächenmoleküle ist noch viel zu gering, als dass wir Therapien entwickeln könnten. An unserem *in vitro* drei-Zelltyp-Cluster konnten wir sehen, dass für die Polarisierung zu Typ 2 Effektor Th-Zellen IL-4 unabdingbar ist (Schuhbauer et al., eingereicht). Möglich wäre, dass DZ deswegen Typ 2 Polarisierungen vermitteln können, weil sie von den Typ 2 Effektor Th-Zellen im drei-Zelltyp-Cluster instruiert wurden, kein IL-12 auszuschütten. Ob lösliche Faktoren oder ebenfalls Interaktionen über Oberflächenmoleküle die DZ vorbereiten, Typ 2 Polarisierungen zu vermitteln, werden wir in der nächsten Zukunft untersuchen. Möglicherweise bieten sich B-Zellen als APZ besser für eine Manipulation autoreaktiver Immunreaktionen an.

Zusammenfassend habe ich in meiner Arbeit zuerst die differentielle Expression als Mechanismus, mit dem MHC II Gene für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen prädisponieren, untersucht und gezeigt, dass sie die Polarisierung der Effektor Th-Zellen beeinflusst. Im meinem letzten Teil zeige ich eine neue Möglichkeit auf, mit der man therapeutisch auf bestehende Polarisierungen, wie sie in den von der Autoimmun-erkrankungen betroffenen Geweben charakteristisch sind, eingreifen könnte. Somit leistet meine Arbeit einen Beitrag zur Erforschung von Autoimmunerkrankungen und leitet direkt aus meinen Ergebnissen eine neue Möglichkeit zur Therapie ab.

5 Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., K. M. Murphy, A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383: 787-93
- Agarwal, S., A. Rao. 1998. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity*. 9: 765-75
- Akbar, S. M., K. Inaba, M. Onji. 1996. Upregulation of MHC class II antigen on dendritic cells from hepatitis B virus transgenic mice by interferon-gamma: abrogation of immune response defect to a T-cell-dependent antigen. *Immunology*. 87: 519-27
- Arnett, F. C., S. M. Edworthy, D. A. Bloch, D. J. McShane, J. F. Fries, N. S. Cooper, L. A. Healey, S. R. Kaplan, M. H. Liang, H. S. Luthra, et al. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 31: 315-24
- Baumgart, M., V. Moos, D. Schuhbauer, B. Muller. 1998. Differential expression of major histocompatibility complex class II genes on murine macrophages associated with T cell cytokine profile and protective/suppressive effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 6936-40
- Berek, C., H. J. Kim. 1997. B-cell activation and development within chronically inflamed synovium in rheumatoid and reactive arthritis. *Semin Immunol*. 9: 261-8
- Bird, J. J., D. R. Brown, A. C. Mullen, N. H. Moskowitz, M. A. Mahowald, J. R. Sider, T. F. Gajewski, C. R. Wang, S. L. Reiner. 1998. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity*. 9: 229-37
- Bodmer, J. G., S. G. Marsh, E. D. Albert, W. F. Bodmer, R. E. Bontrop, D. Charron, B. Dupont, H. A. Erlich, R. Fauchet, B. Mach, W. R. Mayr, P. Parham, T. Sasazuki, G. M. Schreuder, J. L. Strominger, A. Svejgaard, P. I. Terasaki. 1997. Nomenclature for factors of the HLA System, 1996. *Hum Immunol*. 53: 98-128
- Brown, K. E., J. Baxter, D. Graf, M. Merkenschlager, A. G. Fisher. 1999. Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Mol Cell*. 3: 207-17
- Brunner, M., S. Larsen, A. Sette, A. Mitchison. 1995. Altered Th1/Th2 balance associated with the immunosuppressive/protective effect of the H-2Ab allele on the response to allo-4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Eur J Immunol*. 25: 3285-9
- Chan, O., M. J. Shlomchik. 1998. A new role for B cells in systemic autoimmunity: B cells promote spontaneous T cell activation in MRL-lpr/lpr mice. *J Immunol*. 160: 51-9
- Chan, O. T., L. G. Hannum, A. M. Haberman, M. P. Madaio, M. J. Shlomchik. 1999. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med*. 189: 1639-48
- Constant, S., C. Pfeiffer, A. Woodard, T. Pasqualini, K. Bottomly. 1995. Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells. *J Exp Med*. 182: 1591-6

- Cowell, L. G., T. B. Kepler, M. Janitz, R. Lauster, N. A. Mitchison. 1998. The distribution of variation in regulatory gene segments, as present in MHC class II promoters. *Genome Res.* 8: 124-34
- Croft, M., D. D. Duncan, S. L. Swain. 1992. Response of naive antigen-specific CD4+ T cells in vitro: characteristics and antigen-presenting cell requirements. *J Exp Med.* 176: 1431-7
- Croft, M., S. L. Swain. 1995. Recently activated naive CD4 T cells can help resting B cells, and can produce sufficient autocrine IL-4 to drive differentiation to secretion of T helper 2-type cytokines. *J Immunol.* 154: 4269-82
- Czerwony, G., R. Alten, E. Gromnica-Ihle, D. Hagemann, U. Reuter, H. Sorensen, B. Muller. 1999. Differential surface expression of HLA-DRB1 and HLA-DRB4 among peripheral blood cells of DR4 positive individuals. *Hum Immunol.* 60: 1-9
- Drover, S., R. W. Karr, X. T. Fu, W. H. Marshall. 1994. Analysis of monoclonal antibodies specific for unique and shared determinants on HLA-DR4 molecules. *Hum Immunol.* 40: 51-60
- Dustin, M. L., D. Olive, T. A. Springer. 1989. Correlation of CD2 binding and functional properties of multimeric and monomeric lymphocyte function-associated antigen 3. *J Exp Med.* 169: 503-17
- Ehrlich, P., J. Morgenroth. 1901. Über Hämolyse. *Berl. Klin. Wschr.* 38: 251
- Germann, T., M. K. Gately, D. S. Schoenhaut, M. Lohoff, F. Mattner, S. Fischer, S. C. Jin, E. Schmitt, E. Rude. 1993. Interleukin-12/T cell stimulating factor, a cytokine with multiple effects on T helper type 1 (Th1) but not on Th2 cells. *Eur J Immunol.* 23: 1762-70
- Glimcher, L. H., C. J. Kara. 1992. Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription. *Annu Rev Immunol.* 10: 13-49
- Gonzalez-Gay, M. A., G. H. Nabozny, M. J. Bull, E. Zanelli, J. Douhan, 3rd, M. M. Griffiths, L. H. Glimcher, H. S. Luthra, C. S. David. 1994. Protective role of major histocompatibility complex class II Ebd transgene on collagen-induced arthritis. *J Exp Med.* 180: 1559-64
- Gregersen, P. K., J. Silver, R. J. Winchester. 1987. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 30: 1205-13
- Grewal, I. S., R. A. Flavell. 1996. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev.* 153: 85-106
- Guler, M. L., N. G. Jacobson, U. Gubler, K. M. Murphy. 1997. T cell genetic background determines maintenance of IL-12 signaling: effects on BALB/c and B10.D2 T helper cell type 1 phenotype development. *J Immunol.* 159: 1767-74
- Hall, F. C., D. E. Weeks, J. P. Camilleri, L. A. Williams, N. Amos, C. Darke, K. Gibson, K. Pile, B. P. Wordsworth, J. D. Jessop. 1996. Influence of the HLA-DRB1 locus on susceptibility and severity in rheumatoid arthritis. *Qjm.* 89: 821-9
- Hanson, M. S., M. Cetkovic-Cvrlje, V. K. Ramiya, M. A. Atkinson, N. K. Maclaren, B. Singh, J. F. Elliott, D. V. Serreze, E. H. Leiter. 1996. Quantitative thresholds of MHC class II I-E expressed on hemopoietically derived antigen-presenting cells in transgenic NOD/Lt mice determine level of

- diabetes resistance and indicate mechanism of protection. *J Immunol.* 157: 1279-87
- Hesse, M., S. Bayrak, A. Mitchison. 1996. Protective major histocompatibility complex genes and the role of interleukin-4 in collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol.* 26: 3234-7
- Holmdahl, R., C. Vingsbo, H. Hedrich, M. Karlsson, C. Kvik, T. J. Goldschmidt, K. Gustafsson. 1992. Homologous collagen-induced arthritis in rats and mice are associated with structurally different major histocompatibility complex DQ-like molecules. *Eur J Immunol.* 22: 419-24
- Hosken, N. A., K. Shibuya, A. W. Heath, K. M. Murphy, A. O'Garra. 1995. The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J Exp Med.* 182: 1579-84
- Huang, H., W. E. Paul. 1998. Impaired interleukin 4 signaling in T helper type 1 cells. *J Exp Med.* 187: 1305-13
- Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* 176: 1693-702
- Janitz, M., A. Mitchison, L. Reiners-Schramm, R. Lauster. 1997. Polymorphic MHC class II promoters exhibit distinct expression pattern in various antigen-presenting cell lines. *Tissue Antigens.* 49: 99-106
- Jouvenne, P., A. Chaudhary, N. Buchs, F. S. Giovine, G. W. Duff, P. Miossec. 1999. Possible genetic association between interleukin-1alpha gene polymorphism and the severity of chronic polyarthritis. *Eur Cytokine Netw.* 10: 33-6
- Kadowaki, K. M., H. Matsuno, H. Tsuji, I. Tunru. 1994. CD4+ T cells from collagen-induced arthritic mice are essential to transfer arthritis into severe combined immunodeficient mice. *Clin Exp Immunol.* 97: 212-8
- Kalinski, P., C. M. Hilkens, A. Snijders, F. G. Snijdewint, M. L. Kapsenberg. 1997. Dendritic cells, obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE2, promote Th2 responses. *Adv Exp Med Biol.* 417: 363-7
- Kalinski, P., J. H. Schuitemaker, C. M. Hilkens, M. L. Kapsenberg. 1998. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol.* 161: 2804-9
- Kato, T., R. Hakamada, H. Yamane, H. Nariuchi. 1996. Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction. *J Immunol.* 156: 3932-8
- Koch, F., U. Stanzl, P. Jennewein, K. Janke, C. Heufler, E. Kampgen, N. Romani, G. Schuler. 1996. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med.* 184: 741-6
- Lang, B., I. Melchers, A. Urlacher, R. F. Tanzi-Fetta, S. Kohlbrenner, M. M. Tongio, H. H. Peter.

1990. HLA-DR1 and DRw6 association in DR4-negative rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int.* 10: 171-5
- Listing, J., R. Alten, D. Brauer, U. Eggens, E. Gromnica-Ihle, D. Hagemann, R. Hauer, D. Milleck, U. Reuter, R. Schlittgen, H. Sorensen, A. Zink. 1997. Importance of psychological well being and disease activity in termination of an initial DMARD therapy [see comments]. *J Rheumatol.* 24: 2097-105
- Listing, J., R. Rau, B. Müller, R. Alten, G. Czerwony, E. Gromnica-Ihle, D. Hagemann, A. Zink. 2000. HLA-DRB1 genes, rheumatoid factor and elevated CRP: independent risk factors of radiographic progression in early RA. *J. Rheumatol.* 27:2100-9
- Louis, P., J. F. Eliaou, S. Kerlan-Candon, V. Pinet, R. Vincent, J. Clot. 1993. Polymorphism in the regulatory region of HLA-DRB genes correlating with haplotype evolution. *Immunogenetics.* 38: 21-6
- Louis, P., V. Pinet, P. Cavadore, S. Kerlan-Candon, J. Clot, J. F. Eliaou. 1994. Differential expression of HLA-DRB genes according to the polymorphism of their regulatory region. *C R Acad Sci III.* 317: 161-6
- Lund, T., L. O'Reilly, P. Hutchings, O. Kanagawa, E. Simpson, R. Gravely, P. Chandler, J. Dyson, J. K. Picard, A. Edwards, et al. 1990. Prevention of insulin-dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice by transgenes encoding modified I-A beta-chain or normal I-E alpha-chain. *Nature.* 345: 727-9
- Marland, G., A. B. Bakker, G. J. Adema, C. G. Figdor. 1996. Dendritic cells in immune response induction. *Stem Cells.* 14: 501-7
- McDowell, T. L., J. A. Symons, R. Ploski, O. Forre, G. W. Duff. 1995. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 alpha polymorphism. *Arthritis Rheum.* 38: 221-8
- McGarry, F., R. Walker, R. Sturrock, M. Field. 1999. The -308.1 polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor gene is associated with ankylosing spondylitis independent of HLA-B27. *J Rheumatol.* 26: 1110-6
- Merino, R., M. Iwamoto, L. Fossati, P. Muniesa, K. Araki, S. Takahashi, J. Huarte, K. Yamamura, J. D. Vassalli, S. Izui. 1993. Prevention of systemic lupus erythematosus in autoimmune BXSB mice by a transgene encoding I-E alpha chain. *J Exp Med.* 178: 1189-97
- Mitchison, N. A., M. C. Brunner. 1995. Association of H2Ab with resistance to collagen-induced arthritis in H2-recombinant mouse strains: an allele associated with reduction of several apparently unrelated responses. *Immunogenetics.* 41: 239-45
- Mitchison, N. A., D. Schuhbauer, B. Müller. 2000. Natural and induced regulation of Th1/Th2 balance. *Springer Semin Immunopathol* 21:199-210
- Müller, B., A. Mitchison. 1997. The importance of the back-signal from T cells into antigen-presenting cells in determining susceptibility to parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 352: 1327-30

- Müller, B., U. Gimsa, N. A. Mitchison, A. Radbruch, J. Sieper, Z. Yin. 1998. Modulating the Th1/Th2 balance in inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol.* 20: 181-96
- Murphy, K. M., A. B. Heimberger, D. Y. Loh. 1990. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α thymocytes in vivo. *Science.* 250: 1720-3
- Nakagawa, T. Y., W. H. Brissette, P. D. Lira, R. J. Griffiths, N. Petrushova, J. Stock, J. D. McNeish, S. E. Eastman, E. D. Howard, S. R. Clarke, E. F. Rosloniec, E. A. Elliott, A. Y. Rudensky. 1999. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity.* 10: 207-17
- Nishimoto, H., H. Kikutani, K. Yamamura, T. Kishimoto. 1987. Prevention of autoimmune insulinitis by expression of I-E molecules in NOD mice. *Nature.* 328: 432-4
- Oliveira, D. B., N. Blackwell, A. E. Virchis, R. A. Axelrod. 1985. T helper and T suppressor cells are restricted by the A and E molecules, respectively, in the F antigen system. *Immunogenetics.* 22: 169-75
- Ollier, W., D. P. M. Symmons. 1992. *Autoimmunity. The Medical Perspectives*, eds. A. P. Read, T. Brown. Manchester, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Paimela, L., T. Palosuo, M. Leirisalo-Repo, T. Helve, K. Aho. 1995. Prognostic value of quantitative measurement of rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 34: 1146-50
- Paul, C., U. Schoenwald, H. Truckenbrodt, M. P. Bettinotti, G. Brunnler, E. Keller, C. Nevinny-Stickel, Z. Yao, E. D. Albert. 1993. HLA-DP/DR interaction in early onset pauciarticular juvenile chronic arthritis. *Immunogenetics.* 37: 442-8
- Pulendran, B., J. L. Smith, G. Caspary, K. Brasel, D. Pettit, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski. 1999. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 1036-41
- Radka, S. F., D. B. Amos, L. J. Quackenbush, P. Cresswell. 1984. HLA-DR7-specific monoclonal antibodies and a chimpanzee anti-DR7 serum detect different epitopes on the same molecule. *Immunogenetics.* 19: 63-76
- Rau, R., G. Herborn. 1995. A modified version of Larsen's scoring method to assess radiologic changes in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 22: 1976-82
- Reiner, S. L., R. M. Locksley. 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol.* 13: 151-77
- Richter, A., M. Löhning, A. Radbruch. in press. Instruction for cytokine expression in T helper lymphocytes in relation to proliferation and cell cycle progression. *J. Exp. Med.*
- Ridge, J. P., F. Di Rosa, P. Matzinger. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature.* 393: 474-8
- Rissoan, M. C., V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, R. de Waal Malefyt, Y. J. Liu. 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science.* 283: 1183-6

- Santin, A. D., P. L. Hermonat, A. Ravaggi, M. Chiriva-Internati, M. J. Cannon, J. C. Hiserodt, S. Pecorelli, G. P. Parham. 1999. Expression of surface antigens during the differentiation of human dendritic cells vs macrophages from blood monocytes in vitro. *Immunobiology*. 200: 187-204
- Scharf, S. J., R. L. Griffith, H. A. Erlich. 1991. Rapid typing of DNA sequence polymorphism at the HLA-DRB1 locus using the polymerase chain reaction and nonradioactive oligonucleotide probes. *Hum Immunol*. 30: 190-201
- Schuhbauer, D., N. A. Mitchison, B. Müller. 2000. Interaction within clusters of Dendritic cells and helper T cells during initial Th1/Th2 commitment. *Eur. J. Immunol*. 30:1255-1262
- Seder, R. A., W. E. Paul, M. M. Davis, B. Fazekas de St. Groth. 1992. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med*. 176: 1091-8
- Seder, R. A., R. Gazzinelli, A. Sher, W. E. Paul. 1993. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 10188-92
- Seder, R. A., W. E. Paul. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol*. 12: 635-73
- Serreze, D. V., S. A. Fleming, H. D. Chapman, S. D. Richard, E. H. Leiter, R. M. Tisch. 1998. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 161: 3912-8
- Shackelford, D. A., L. A. Lampson, J. L. Strominger. 1983. Separation of three class II antigens from a homozygous human B cell line. *J Immunol*. 130: 289-96
- Stanley, E. R., D. M. Chen, H. S. Lin. 1978. Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor. *Nature*. 274: 168-70
- Stastny, P., E. J. Ball, M. A. Khan, N. J. Olsen, T. Pincus, X. Gao. 1988. HLA-DR4 and other genetic markers in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*. 27: 132-8
- Stockinger, B., T. Zal, A. Zal, D. Gray. 1996. B cells solicit their own help from T cells. *J Exp Med*. 183: 891-9
- Sutton, V. R., B. K. Kienzle, R. W. Knowles. 1989. An altered splice site is found in the DRB4 gene that is not expressed in HLA-DR7,Dw11 individuals. *Immunogenetics*. 29: 317-22
- Szabo, S. J., A. S. Dighe, U. Gubler, K. M. Murphy. 1997. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med*. 185: 817-24
- Todd, J. A., J. I. Bell, H. O. McDevitt. 1987. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 329: 599-604
- Uehira, M., M. Uno, T. Kurner, H. Kikutani, K. Mori, T. Inomoto, T. Uede, J. Miyazaki, H. Nishimoto, T. Kishimoto, et al. 1989. Development of autoimmune insulinitis is prevented in E alpha d but not in A beta k NOD transgenic mice. *Int Immunol*. 1: 209-13

- Valenzuela, A., M. F. Gonzalez-Escribano, R. Rodriguez, I. Moreno, A. Garcia, A. Nunez-Roldan. 1999. Association of HLA shared epitope with joint damage progression in rheumatoid arthritis. *Hum Immunol.* 60: 250-4
- van Kooyk, Y., P. van de Wiel-van Kemenade, P. Weder, T. W. Kuijpers, C. G. Figdor. 1989. Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes. *Nature.* 342: 811-3
- Vyse, T. J., J. A. Todd. 1996. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell.* 85: 311-8
- Vyse, T. J., B. L. Kotzin. 1998. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol.* 16: 261-92
- Weyand, C. M., T. G. McCarthy, J. J. Goronzy. 1995. Correlation between disease phenotype and genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 95: 2120-6
- Yang, Y., J. M. Wilson. 1996. CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science.* 273: 1862-4
- Yoshimoto, T., W. E. Paul. 1994. CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med.* 179: 1285-95
- Zanelli, E., C. J. Krco, J. M. Baisch, S. Cheng, C. S. David. 1996. Immune response of HLA-DQ8 transgenic mice to peptides from the third hypervariable region of HLA-DRB1 correlates with predisposition to rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 1814-9

6 Antikörper, verwendete Mausstämme, Patienten-Daten

Tabelle 3: Liste der verwendeten monoklonalen Antikörper

Antigen	Klon
<i>murine MHC II Molekü</i>	
I-E ^k	HB6
I-A ^b	3TP
I-A ^d	30-10-8
I-A ^k	HB15, TIB92
I-A ^q	KH116
<i>murine Leukozyten-Marker</i>	
B220	RA3 2C2
CD3	145-2C11
OVA-TCR	KJ1-26.1
CD4	GK1.5
CD11b	M1/70 (Mac-1)
CD11c	N418
CD40 (Agonist)	3/23
CD62L	Mel-14
CD69	H1.2F3
<i>murine Zytokine</i>	
IL-4	11B11
IFN γ	XMG1.2, AN18.17.24
IL-12 (p40/p70)	C17.8, C17.15
<i>Humane MHC II Moleküle</i>	
HLA-DR	L243, Immu-357
HLA-DR4	NFLD.D1
HLA-DR7	SFR16-DR7G
<i>humane Leukozyten-Marker</i>	
CD3	OKT3
CD14	TÜK4
CD19	SJ25-C1

Tabelle 4: MHC II-Haplotypen der verwendeten Mausstämmen

Mausstamm	I-A Haplotyp	I-E Haplotyp	Spezifität des TZR
<i>kongene B10. Mäuse</i>			
B10.A	I-A ^k	I-E ^k	
B10.A (4R)	I-A ^k	I-E ⁻	
B10.A (5R)	I-A ^b	I-E ^{b/k}	
B10.BR	I-A ^k	I-E ^k	
B10.D2	I-A ^d	I-E ^d	
B10.Q	I-A ^q	I-E ⁻	
<i>kongene BALB Mäuse</i>			
BALB/b	I-A ^b	I-E ^b	
BALB/c	I-A ^d	I-E ^d	
<i>weitere Stämme</i>			
BDF1	I-A ^b	I-E ^k	
CBA/J	I-A ^q	I-E ⁻	
DBA/1	I-A ^q	I-E ⁻	
<i>TZR-transgene Mäuse</i>			
5CC7	I-A ^k	I-E ^k	CytC-Peptid 88-104
DO11.10	I-A ^d	I-E ^d	OVA-Peptid 323-339

Tabelle 5: Patienten-Daten

Patienten-Nr.	HLA-DRB1 Kombination		Ratingen-Score	RF
	Allel 1	Allel 2		
2001	4	2	1	+
2002	1	9	4	-
2003	7	7	10	+
2004	2	3	2	-
2008	4	3	0	+
2010	2	2	2	+
2101	4	1	14	+
2103	1	2	5	+
2104	4	7	2	+
2109	4	7	9	+
2110	6	6	9	+
2112	1	7	1	+
2113	3	6	1	-
2123	2	3	13	+
2126	4	4	21	+
2127	4	4	6	+
2128	4	4	6	-
2131	1	1	5	-
2132	5	6	8	+
6004	4	6	16	+
6011	4	7	0	+
6013	3	6	7	+
6019	4	4	38	+
6022	4	4	16	+
6028	2	6 od. 8	3	+
6029	1	7	13	+
8004	4	1	25	+
8019	4	3	7	+
8022	7	8	1	+
8024	1	6	0	+
10005	4	2	1	+
10008	4	5	6	+

10009	3	3	0	-
10011	4	2	0	+
10013	n.b.	4	7	+
10014	1	3	0	-
10015	3	7	0	+
10016	4	4	33	-
10017	4	1	0	-
10021	2	7	0	-
10022	2	5	0	+
10025	1	2	4	+
10026	3	n.b.	0	-
10028	1	3	0	+
10029	1	6	1	-
10031	6	n.b.	7	+
10033	1	5	8	+
10036	2	6	0	-
10037	2	n.b.	0	+
10039	5	7	0	-
10040	4	5	1	+
10041	4	4	0	-
10042	2	3	0	-
10046	3	5	0	+
10047	3	3	0	-
10050	2	7	0	-
10051	1	5	0	-
10052	4	4	0	+
10055	4	2	1	-
10058	2	5	0	+
10059	6	9	0	-
10060	1	2	21	+
10062	3	6	0	-
10063	3	6	0	+
10064	2	5	0	+
10065	4	9	0	-
10066	4	5	1	+

10067	1	5	0	+
10069	1	5	0	-
10070	5	6	0	-
10071	2	6	0	+
10072	3	5	1	-
10073	3	5	0	-
10076	3	7	0	-
10078	1	5	0	+
10079	5	7	0	-
10080	3	5	0	-
10081	5	9	0	-
10082	3	6	0	+
10083	n.b.	6	1	-
10085	4	6	0	+
10086	4	4	0	-
10087	2	7	0	+
10091	4	3	0	-
10095	3	5	0	-
10096	4	5	0	+
10099	5	8	0	-
10104	2	2	0	-
10105	6	10	0	-
10106	1	6	0	-
10107	2	5	0	-
10109	1	3	4	-
10111	3	3	0	-
10112	4	10	0	+
10113	2	5	0	-
10114	3	10	0	+
10115	3	10	2	-
10117	4	1	0	-
10118	6	6	0	-
10121	2	6	0	-
10122	3	5	0	-
10124	1	3	8	+

10126	6	9	0	-
20027	4	4	15	+
20036	2	6	3	-
20042	4	1	7	+
20044	4	4	19	+
20048	4	4	11	-
20049	4	4	1	-
20053	3	5	22	-
20055	4	1	8	-
20058	4	5	0	+
20060	4	6	5	+
20069	2	7	4	+
23001	2	5	25	+
23002	4	5	34	+
30001	6	10	5	+
32001	6	6	2	-
32002	3	5	0	-
32004	4	6	0	-
34003	4	4	0	+
34005	4	4	3	+
34006	4	1	10	+
34007	3	6	1	+

n.b.: nicht bestimmt

Die Tabelle listet nur die Daten derjenigen Patienten, von denen sowohl HLA-DRB Haplotyp als auch Ratingen-Score bestimmt werden konnte

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Av Mitchison, der in unzähligen Kaffee-Pausen ("let's have a coffee") mein Interesse an der Autoimmunität geweckt und in schwierigen Zeiten meine Moral aufrechterhalten hat ("is there more coffee?").

Für sein wachsendes Interesse und die konstruktive Unterstützung einer Alllast möchte ich mich bei Andreas Radbruch ganz herzlich bedanken.

Ohne die tatkräftige Zusammenarbeit mit Martin Baumgart, Grit Czerwony, Christian Heldt, Verena Moos, Diana Schuhbauer und Bianka Thies wäre diese Arbeit ein Fragment geblieben. Von unschätzbarem Wert war auch die allzeit freundliche und humorvolle Unterstützung von Heidi Hecker-Kia. Ihnen allen gebührt mein uneingeschränkter Dank.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei all denen Mitarbeitern des DRFZ, die dazu beigetragen haben, die letzten Jahre angenehm zu gestalten.

Bei der DFG möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung, die diese Arbeit ermöglichte, bedanken.

Meinen Eltern und Geschwistern gilt an dieser Stelle ganz großer Dank dafür, dass sie mich auf diesen Weg gebracht und immer wieder mit Zuneigung und Unterstützung begleitet haben.

Den doppelten Dank dem D. für seine im Verlauf dieser Arbeit gereifte Fähigkeit, im richtigen Moment zu- oder weghören zu können.

Lebenslauf

- 19.9.60 Geb. in Bonn
- Mai 79 Abitur am Amos-Comenius Gymnasium in Bonn-Bad Godesberg
- WS 79/80-WS 84/85 Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
- Abschluss: Diplom,
- Thema der Arbeit, "Thema der Arbeit: Nukleotidsequenz des Gens für die α -Untereinheit der Komponente C der Methyl Coenzym M-Reduktase aus *Methanococcus voltae*"
- Betreuer: Prof. Dr. A. Klein
- März 85 – Febr. 89 Promotion am Institut für Genetik der Universität Köln
- Thema der Arbeit, " Charakterisierung des VL-Gen Rearrangements in transformierten Abelson pre-B Zelllinien"
- Betreuer: Prof. Dr. K. Rajewsky, Dr. M. Reth
- März 89 – Aug. 89 Postdoc am Institut für Genetik in Köln
- Sept. 89 – April 93 Postdoc an der Harvard Medical School in Boston, MA, USA, im Labor von Prof. Dr. Cox Terhorst, Div. of Immunology, Dept. Of Medicine
- Seit Mai 93 Gruppenleiterin am Deutschen RheumaForschungs-Zentrum Berlin
- 17.12.1999 Einreichen der Habilitationsschrift
- 12.12.2000 Habilitation

Eidstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 30.12.2000

Brigitte Müller-Hilke