

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinderchirurgie
des Universitätsklinikum Halle (Saale)
(Direktor: Professor Dr. med. Rainer Finke)

Arthritis nach Expression des Superantigens Staphylokokkenenterotoxin A (SEA)
im Kniegelenk der Lewis-Ratte

Dissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg

von Christian Tomuschat
geboren am 13.04.1982 in Dessau

Gutachter: 1. Prof. Dr. M. Kornhuber
 2. Prof. Dr. K. S. Delank
 3. PD. Dr. U. Bühlingen (Leipzig)

Datum der Eröffnung: 09.09.2014

Tag der Verteidigung: 30.06.2015

„Nichts auf der Welt ist so genau, dass es nicht noch genauer sein könnte, nicht so gerade, dass es nicht noch gerader, nichts ist so wahr, dass es nicht noch wahrer sein könnte“ (Nikolaus von Kues)

Meiner Familie

Referat

Es gibt Hinweise, dass bei der rheumatoiden Arthritis als auch bei der juvenilen idiopathischen Arthritis neben bakteriellen Infektionen auch u.a. humane endogene Retroviren (HERV) an der Pathogenese beteiligt sein könnten. HERV-kodierte Hüllproteine können auf Immunzellen superstimulatorisch wirken. Die Wirkung derartiger Superantigene (SAG) begründet sich u.a. aus der Eigenschaft, MHC-II-Moleküle (MHC II) mit der V β -Untereinheit des T-Zell-Rezeptors (TCR) zu vernetzen. Daraus resultiert eine oligoklonale Aktivierung von T-Zellen. Aufgrund der nach der Aktivierung von T-Zellen resultierenden Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wird eine Beteiligung an der Initiierung von Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis vermutet. Ausgehend von dieser Hypothese erfolgte statt eines HERV-kodierten SAG die Applikation des bakteriellen SAGs Staphylokokken-Enterotoxin A (SEA) intraartikulär. Hierbei konnte im Verlauf histologisch eine Arthritis dargestellt werden. Weiterhin wurde das Entzündungsinfiltrat an den Tagen eins, fünf und zehn bezüglich der T-Zellantigene CD3, CD4, CD8, der B-Zell Marker CD138 und Pax-5 sowie der Expression von MHC-I und II immunhistochemisch an Paraffinschnitten differenziert. Nach intraartikulärer Injektion trat eine im Verlauf zunehmende Hyperplasie der Synovialmembran im rechten mit SAG injizierten Gelenk auf. Das Entzündungsinfiltrat wurde von CD8+ T-Lymphozyten geprägt. Demgegenüber nahm die Zahl an CD3+ als auch CD4+ T-Lymphozyten im Verlauf zu. Ebenfalls konnte ein kontinuierliches Ansteigen der Expression von MHC-II-Molekülen beobachtet werden. Die B-Zell-Marker stiegen an Tag 10 leicht an. Nach der vorliegenden Untersuchung ist anzunehmen, dass durch die Wirkung des SAGs Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten aktivierbar sind und nachfolgend ein proinflammatorisches Milieu unterhalten. Im Gegensatz zur Kollagen-II-Arthritis ist eine Immunisierung der Tiere nicht notwendig. Zudem finden sich Übereinstimmungen zur rheumatoiden Arthritis. Dieses neu etablierte SAG-Arthritis-Modell bietet einen viel versprechenden Ansatz, insbesondere wenn HERV-kodierte SAG als Auslöser der Entzündung bei rheumatoider Arthritis bzw. juveniler idiopathischer Arthritis in Erwägung gezogen werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Superantigene	1
1.2	Ätiologie und Pathogenese der rheumatoiden Arthritis	3
1.3	Juvenile Idiopathische Arthritis	5
1.4	Tiermodelle der Arthritis	8
1.4.1	Kollagen-II-induzierte Arthritis	8
1.5	Zielsetzung der Studie	9
2	Material und Methoden	10
2.1	Materialien	10
2.2	Versuchstiere	13
2.3	Intraartikuläre Injektion des Superantigens (Tag 0)	13
2.4	Entnahme der Gelenke (Tag 1, 5, 10 nach SEA-Injektion)	15
2.5	Herstellen der Paraffinschnitte	16
2.6	Immunhistochemische Färbung nach der Avidin-Biotin-Methode	16
2.7	Die untersuchten Antigene	18
2.7.1	CD3-Antigen	18

2.7.2	CD4-Antigen	18
2.7.3	CD8-Antigen	19
2.7.4	MHC-I-Antigen	19
2.7.5	MHC-II-Antigen	19
2.7.6	CD138-Antigen	19
2.7.7	PAX-5-Antigen	20
2.8	Positivkontrolle	20
2.9	Negativkontrolle	20
2.10	Auswertung	20
2.11	Fehlerbetrachtung	21
3	Ergebnisse	23
3.1	Allgemeine Befunde	23
3.2	Beurteilung des Durchmessers der Synovialmembran im Bereich der unterschiedlichen Gruppen (SEA/NaCl) des rechten injizierten Kniegelenkes im zeitlichen Verlauf	24
3.3	Beurteilung der Zellpopulationen im zeitlichen Verlauf an den drei Untersuchungszeitpunkten Tag eins, fünf und zehn nach intraartikulärer des Superantigens SEA im Bereich des rechten injizierten Kniegelenkes	29

3.4	Beurteilung der Zellpopulationen im zeitlichen Verlauf an den drei Untersuchungszeitpunkten Tag 1, 5 und 10 nach intraartikulärer Injektion von NaCl 0.9%	30
3.5	Auswertung der Wärmebildkameraaufnahmen	36
4	Diskussion	37
4.1	Pathophysiologie der Superantigenarthritis	37
4.2	Vergleich der Ergebnisse der Superantigen-Arthritis mit Befunden bei der rheumatoiden Arthritis	49
4.3	Vergleich der Ergebnisse der Superantigenarthritis mit Befunden von Patienten mit Juveniler idiopathischer Arthritis (JIA)	53
4.4	Vergleich der Ergebnisse der Superantigen - induzierten Arthritis mit Befunden vom Kollagen-II-Arthritis-Tiermodell	57
5	Zusammenfassung	61
6	Literaturverzeichnis	63
7	Thesen	72
8	Tabellarischer Lebenslauf	
9	Selbständigkeitserklärung	
10	Erklärung über frühere Promotionsversuche	

Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Das Superantigen (blau) bindet unprozessiert entfernt von der komplementaritäts-bestimmenden Region an die V β -Domäne des T-Zell Rezeptors sowie abseits der peptidbindenden Furche an die Außenseite des MHC-II-Moleküls	2
Abb. 2	Inhalationsnarkose der Tiere	14
Abb. 3	Subpatellare Injektion des SEA im Bereich des rechten Kniegelenkes	14
Abb. 4	Bedarfsmedikation mit Carprofen	14
Abb. 5	Wärmebildkameraaufbau	15
Abb. 6	HPF (ca. 50.000 μm^2 - Kantenlänge 200 μm x 250 μm) zur Auswertung der ausgewählten synovialen Abschnitte im untersuchten Gelenk. Insgesamt wurden sechs HPF pro Gelenk ausgewertet.	21
Abb. 7	Durchmesser der Synovialmembran in μm im zeitlichen Verlauf an Tag 1, Tag 5 und Tag 10 nach intraartikulärer Injektion des Superantigens Staphylokokken Enterotoxin A (SEA) im Bereich des rechten, injizierten (blau) und im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Injektion von NaCl (gelb) Weiterhin dargestellt: die Synovialmembran der nicht injizierten Kniegelenke, links (grün) und (lila), Beachte den im Verlauf deutlich zunehmenden Durchmesser der SM	25
Abb. 8	A)Übersicht. v.Giesson-Färbung. Vergrößerung. B)Pfeile. Neovaskularisationen. HE Färbung. Vergrößerung. C) Eingekreiste Fläche: Fibrinoide Nekrosen im Bereich der Subintima. HE-Färbung. Vergrößerung.	26
Abb.9	Immunhistochemische Färbungen. HE. Dargestellt ist die Dicke der Synovialmembran (S) im Zeitverlauf, A) Tag eins B) Tag fünf und C) Tag zehn nach intraartikulärer Injektion von SEA im Bereich	

	des rechten, injizierten Kniegelenks.	27
Abb. 10	Rundzellinfiltration oberer Recessus. Rechtes Kniegelenk nach intraartikulärer SEA Applikation. Tag 5. Synovialmembran: Schwarze Pfeile. Rechteckiger Ausschnitt s. Abb. 11	28
Abb. 11	Rechteckiger Ausschnitt (Abb. 10) Rundzellinfiltration Subintima und Intima.	28
Abb. 12	Synoviale Zellpopulation im Bereich des rechten injizierten Kniegelenkes und der Kontrollgruppe (NaCl) des rechten Kniegelenkes. Dargestellt ist die Zellzahl (Mittelwert aus den Absolutzahlen der einzelnen Gewebspräparate zum dargestellten Zeitpunkt) der einzelnen Antikörper. Die Zahlen beziehen sich auf eine Fläche von 300.000 μm^2 .	31
Abb. 13	Immunhistochemische Färbungen. Verwendet wurde der Antikörper gegen das CD3-Antigen. (braune Färbung der Immunzellen) Dargestellt ist Tag 10 nach intraartikulärer Injektion des SEA. Rechtes Kniegelenk.	32
Abb. 14	Immunhistochemische Färbungen. Verwendet wurde der Antikörper gegen das CD4-Antigen. (braune Färbung der Immunzellen) Dargestellt ist Tag 10 nach intraartikulärer Injektion des SEA. Rechtes Kniegelenk. Oberer Recessus.	32
Abb. 15	Immunhistochemische Färbungen. Verwendet wurde der Antikörper gegen das CD8-Antigen. (braune Färbung der Immunzellen) Dargestellt ist Tag 10 nach intraartikulärer Injektion des SEA. Rechtes Kniegelenk. Oberer Recessus.	33
Abb. 16	Immunhistochemische Färbungen. Verwendet wurde der Antikörper gegen das MHC-II-Antigen. (braune Färbung der MHC-II-tragenden Zellen) Dargestellt ist	

	Tag 10 nach intraartikulärer Injektion des SEA. Rechtes Kniegelenk. Oberer Recessus.	33
Abb. 17	Immunhistochemische Färbungen. Verwendet wurde der Antikörper gegen das MHC-I-Antigen. (braune Färbung der MHC-I-tragenden Zellen) Dargestellt ist Tag 10 nach intraartikulärer Injektion des SEA. Rechtes Kniegelenk. Oberer Recessus.	34
Abb. 18	Immunhistochemische Färbungen. Verwendet wurde der Antikörper gegen das CD138- und Pax-5-Antigen. (braune Färbung der Immunzellen) A) Pax-5 und B) CD138 Tag fünf nach intraartikulärer Injektion des SEA. Rechtes Kniegelenk. Oberer Recessus.	35
Abb. 19	Darstellung der Temperatur der Hautoberfläche beider Hinterläufe von ventral mit der Wärmebildkamera nach intraartikulärer SEA Injektion	36
Abb. 20	SEA interagiert mit den MHC-II-Molekülen auf den Typ A Synoviozyten, hierbei kommt es zur Sezernierung von TNF α und IL-1 und führt zur Aktivierung von Typ B Synoviozyten. Denkbar ist ebenfalls eine direkte Aktivierung über Toll-Like-Rezeptoren (TLR). Darüber hinaus kommt es zur Etablierung eines proinflammatorischen Milieus, was zur autokrinen Stimulierung von Typ A und B Synoviozyten führt und weiterhin über MHC-II/TCR zur oligoklonalen Expansion von V β -spezifischen T-Zellen. Denkbar ist weiterhin eine Apoptose-Induzierende Wirkung des SEA.	40
Abb. 21	Insgesamt führen die in der Studie gewonnenen Ergebnisse zu einer entzündlichen Phase im Gelenk. Hierbei ist der auslösende Reiz das SEA. SEA interagiert über MHC-II-Moleküle auf synovialen Fibrozyten (Typ A und B) oder tritt direkt mit dem TCR in Kontakt. Weiterhin ist eine Interaktion mit TLR möglich. Die Folge ist eine Aktivierung von synovialen Fibrozyten und CD8+ T-Zellen mit konsekutiver Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und zur Proliferation von synovialen Fibrozyten. Daraus resultiert	

eine Hyperplasie der Synovialmembran, weiterhin führt das einmal etablierte proinflammatorische Milieu zur Migration weiterer Immunzellen.

48

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Klassifikation der juvenilen Arthritis nach Subtypen und klinischen Symptomen. International League of Associations for Rheumatology	7
Tab. 2	Verdünnung der Primärantikörper	18
Tab. 3	Histopathologische Merkmale von Kollagen-II-Arthritis und Superantigen-Arthritis	60

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen präsentierende Zelle
Bcl-2	B-Cell-Lymphoma 2
CD	Cluster of Differentiation
COMP	Cartilage oligomatrix protein
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HERV	Humane Endogene Retroviren
HPF	High Powerfield Magnification
HRP	horseradish peroxidase
ICAM-1	Interzelluläres Adhensionsmolekül 1
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis
KIIA	Kollagen-II-Arthritis
MAM	Mycoplasma arthritidis Mitogen
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MHC-I	Major Histocompatibility Complex I
MHC-II	Major Histocompatibility Complex II
MS	Multiple Sklerose
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
P13K	Phosphoinositide 3 Kinase
RA	Rheumatoide Arthritis
SAG	Superantigen
SEA	Staphylokokkenterotoxin A
SEB	Staphylokokkenterotoxin B
SEE	Staphylokokkenterotoxin E
SDF	Stroma cell derived factor
STSS	Streptokokken – Toxisches Schock Syndrom
TCR	T-Zell-Rezeptor

Th	Helfer-T-Zelle
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNF- β	Tumornekrosefaktor- β
Treg	Regulatorische T-Zelle
Tris-Puffer	Trishydroxymethylaminomethan-gepufferte-Kochsalzlösung
TSS	Toxic Shock Syndrom
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1
VEFG	Vaskulärer Endothel Wachstumsfaktor
YPM	Yersinia pseudotuberculosis Mitogen

1 Einleitung

1.1 Superantigene

Superantigene (SAG) sind bakterielle oder virale Proteine, die stark immunstimulatorisch wirken. Dabei aktivieren T-Zell-SAG V β -spezifisch eine große Anzahl von T-Lymphozyten. Dies wird durch die Eigenschaft ermöglicht, den major histocompatibility complex II (MHC-II) mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) zu vernetzen (Macphail, 1999) (Abb. 1). Dabei bindet das SAG, im Gegensatz zu konventionellen Antigenen direkt, ohne vorher prozessiert zu werden an den MHC-II-Rezeptor (Omoe et al., 2010). Diese Bindung liegt außerhalb der klassischen Bindungsfurche. Es werden oligoklonal T-Lymphozyten sowohl aus dem CD4 als auch aus dem CD8 Kompartiment aktiviert (Fraser and Proft, 2008). Insgesamt führt diese Bindung zu einer massiven Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen aus den T-Lymphozyten, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Tumornekrosefaktor- β (TNF- β) oder Interleukin-2 (IL-2) (Papageorgiou and Acharya, 2000). Weiterhin ist eine direkte T-Zell-Aktivierung ohne vorherige Bindung an MHC-II-Molekülen möglich (Fraser and Proft, 2008). Es sind bisher 40 verschiedene bakterielle SAG identifiziert, die insbesondere von *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus equi* und *Streptococcus disgalactiae* produziert werden, weiterhin zählen als SAG das *Mycoplasma arthritidis* Mitogen (MAM) und das *Yersinia pseudotuberculosis* Mitogen (YPM) dazu (Fraser and Proft, 2008). Bisher sind drei Familien von Viren beschrieben, die SAG produzieren: Retroviren, Rhabdoviren und Herpesviren (Sutkowski et al., 2001). Neben diesen exogenen SAG sind endogene SAG mit stimulierender Wirkung auf Lymphozyten beschrieben (Posnett and Yarilina, 2001).

SAG als hoch potente Mitogene lösen akute Erkrankungen aus, z.B. das Toxische-Schock-Syndrom (TSS) als Staphylokokken-Toxin spezifische Erkrankung. Ebenfalls können Streptokokken-SAG ein TSS auslösen. Beide Toxine können über Fieber, Hypotonie, Schock und renales Versagen zum Tode führen. Neben diesen akuten Erkrankungen werden Superantigene zunehmend bei chronischen Erkrankungen wie allergischer Rhinitis, atopischer Dermatitis, Kawasaki-Syndrom, Psoriasis, Multipler Sklerose oder rheumatoider Arthritis diskutiert (Schiffenbauer, 1999).

Insbesondere sogenannte Autoimmunerkrankungen, die durch Erkrankungsschübe gekennzeichnet sind, lassen die Frage aufkommen, inwieweit Umweltfaktoren Einfluss auf den Verlauf haben können. SAG, entweder als bakterielle oder virale Substanzen oder auch

in Form von Hüllproteinen (envelope Proteine) von humanen endogenen Retroviren (HERV) besitzen die Fähigkeit T-Zellen oligoklonal zu aktivieren und damit die Möglichkeit immunstimulatorisch zu wirken. Auch bei der rheumatoiden Arthritis ist es denkbar, dass durch SAG aktivierte T-Zellen stimulatorisch auf synoviale Fibrozyten wirken und somit den typischen Verlauf der Erkrankung charakterisieren können.

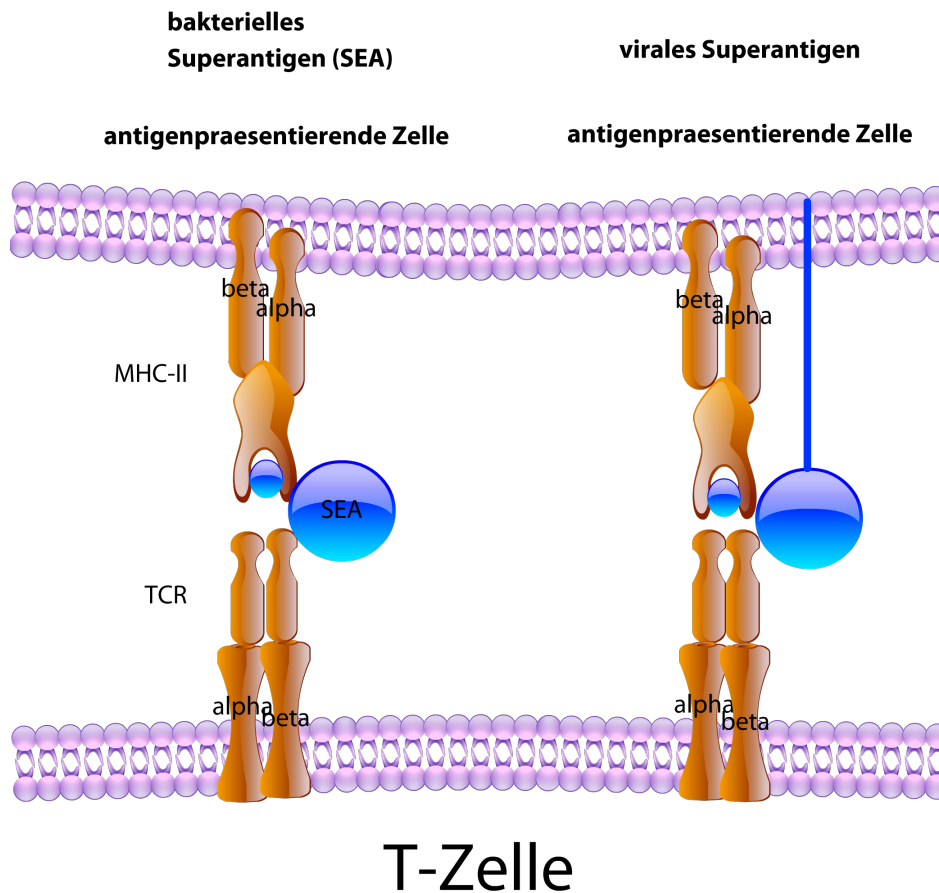


Abb.1 Das Superantigen (blau) bindet unprozessiert entfernt von der komplementaritätsbestimmenden Region an die V β -Domäne des T-Zell Rezeptors sowie abseits der peptidbindenden Furche an die Außenseite des MHC-II-Moleküls

1.2 Ätiologie und Pathogenese der rheumatoiden Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist durch eine Synovialitis, Inflammation und Autoantikörperproduktion (Rheuma Faktor, citrullinierte Peptide) charakterisiert (Scott et al., 2010). Hierbei führen mehrere entzündliche Kaskaden zu einer persistierenden Synovialitis mit konsekutiver Zerstörung des Gelenkknorpels sowie des angrenzenden Knochens mit folgender Gelenk-Deformierung und konsekutiver Einschränkung der Gelenkbeweglichkeit (Imboden, 2009). Typische radiologische Zeichen sind Usuren am processus styloideus ulnae, subchondrale Osteoporosen, Destruktion der umliegenden Knochen, Erosionen und Gelenkspaltversmälnerungen, und im Spätstadium Ankylosen sowie Gelenkfehlstellungen (Diekhoff and Hermann, 2012). 0.5 % - 1 % der Erwachsenen in den Industrieländern entwickeln im Verlauf ihres Lebens eine rheumatoide Arthritis. Sie ist bei Frauen dreimal häufiger als bei Männern. Die Prävalenz steigt mit dem Alter und ist am höchsten bei Frauen über 65 Jahren. Die Inzidenz variiert zwischen 5 - 50 pro 100.000 (Boonen and Severens, 2011). Zudem variiert sie geografisch und zeigt ein Nord-Süd-Gefälle. Als auslösende Faktoren werden neben der genetischen Disposition auch Umweltfaktoren diskutiert. Obwohl die rheumatoide Arthritis bisher als Autoimmunerkrankung diskutiert wird, fehlt ein Konsens zu kritischen Autoantigenen. Die Ätiologie ist bisher unbekannt. Genetische Faktoren sind vermutlich an der Pathogenese beteiligt. Dabei wurde dem HLA-DRB1, welcher die β -Kette der MHC-II-Moleküle kodiert eine wesentliche Bedeutung zugeschrieben (Imboden, 2009). Neben den klassischen Autoantikörpern der rheumatoiden Arthritis wie IgM und IgA, die gegen das Fc Fragment von IgG gerichtet sind, finden sich Autoantikörper gegen citrullinierte Peptide (ACPA). Die Synovialmembran scheint bei der Erkrankung zuerst betroffen zu sein (Finnegan et al., 2011). Normalerweise besteht die Synovialmembran aus einer dünnen Schicht von Synoviozyten, in deren subintimalem Gewebe Blutgefäße, Fettzellen und Fibrozyten eingebettet sind. Typische histopathologische Zeichen der RA sind eine Verdickung der Synovialmembran als ein Resultat von Proliferation und reduzierter Apoptose von Synoviozyten (Baeten et al., 2000). Weiterhin zeigt sich eine Neovaskularisation der Subintima und Infiltration mit T- und B-Lymphozyten, sowie Plasmazellen (Baeten et al., 2000). Die entzündlich veränderte Synovialmembran enthält große Mengen an T-Zellen, die u.a. Aggregate mit B-Zellen bilden können (Scheel et al., 2011). Neben CD4+ T-Lymphozyten, finden sich auch CD8+ T-Lymphozyten. Gemeinhin wird ein (CD4+:CD8+)-Verhältnis von 2:1 beschrieben (Yanni et al., 1992). Davon abweichend gibt es demgegenüber auch Hinweise dafür, dass in der Initialphase die CD8+ T-Lymphozyten überwiegen (Carvalho et al., 2012). Neben typischen Th1- und Th2-assoziierten Zytokinen, trägt eventuell der sog. Th17-Pfad aufgrund seiner

proinflammatorischen Effekte maßgeblich zur Aufrechterhaltung der Arthritis bei (Hashimoto and Mimori, 2012). Hierbei führt die Produktion von IL-17 zur Freisetzung von IL-1 β , IL-6 und TNF- α , multiplen Chemokinen, Cyclooxygenase-2, Prostaglandin E₂ und Matrix-Metalloproteinasen. Weiterhin führt er zur Aktivierung von Osteoklasten (Hirota et al., 2007). Zudem werden in letzter Zeit CD4⁺ und CD8⁺ regulative T-Zellen (Tregs) angeführt; in ihrer veränderten Funktion wird vermutet, dass sie ihre normale suppressive Wirkung nicht entfalten können und somit indirekt zur persistierenden Entzündung beitragen (Ehrenstein et al., 2004). Weitere Schlüsselzellen sind Makrophagen und Monozyten, die ebenfalls proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6 produzieren und die Entzündung weiter unterhalten (Pratt et al., 2009). Sie exprimieren den Chemokin-Rezeptor CCR9 der essentiell für die Migration und Retention von Leukozyten ist. Als wichtigstes Zytokin gilt TNF- α . Dieses Zytokin spielt in der Pathophysiologie eine wichtige Rolle, da es Interaktionen zwischen T- und B-Lymphozyten, synovialen Fibrozyten und Makrophagen vermittelt (Maini, 1996). Meist führen diese Prozesse zu Überproduktionen von weiteren proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, welches ebenfalls die Persistenz der Entzündung und Gelenkzerstörung unterstützt (Choy et al., 2002). Synoviale Fibrozyten sind der dominante Zelltyp in der hyperplastischen Synovialmembran (Pap et al., 2000). Sie spielen eine Rolle in der Verstärkung der proinflammatorischen Kaskade, verlinken angeborenes und adaptives Immunsystem und initiieren die Migration von Monozyten in der Synovialmembran. Des Weiteren fungieren sie als Antigen-präsentierende Zellen (Pap et al., 2000). Auch können sie durch die Erhöhung der Expression von VCAM-1 und ICAM-1 und Matrix-Metalloproteinasen proinflammatorisch wirken. Die Expression von Aquaporinen (Plasmazellprotein welches die Wasserversorgung reguliert) ist mit Hydrarthrose und Gelenkzerstörung verbunden. Die Masse an synovialen Fibrozyten verringert die Sauerstoffversorgung, was zu Laktatanhäufung führt und ebenfalls die Entzündung verstärkt (Nagahara et al., 2010). Weiterhin können synoviale Fibrozyten in den Knorpel einwandern und diesen schädigen (Bartok and Firestein, 2010). Durch die von ihnen ausgelöste Aktivierung von Osteoklasten wird gleichzeitig eine Knochenerosion initiiert und das Gelenk zunehmend zerstört (Bartok and Firestein, 2010). Es bleibt jedoch weiterhin unklar, was der Auslöser dieser inflammatorischen Kaskade ist. Bakterien wie Streptokokken, Mykoplasmen, Proteus mirabilis und Escherichia coli sowie Viren wie Epstein-Barr-Virus (EBV), Parvovirus B19 und Retroviren (u.a. HERV) werden in Zusammenhang von Infektionen als mögliche Ursache genannt (Carty et al., 2004). Bei 10-20% der Patienten mit rheumatoider Arthritis, wurde serologisch der Nachweis für zurückliegende Infektionen mit diesen Erregern erbracht (Colebatch and Edwards, 2011). Weiterhin können sie Stimulatoren (EBV) der polyklonalen B-Zell-Proliferation sein, was

wiederum zur Antikörperproduktion führen kann. Als pathogener Faktor, der bei der Entzündungsentstehung im Zusammenhang mit Bakterien oder auch Viren eine Rolle spielen könnte werden u.a. SAG diskutiert (Hsiao et al., 2006). In der Gelenkflüssigkeit konnte Doppelstrang-DNS nachgewiesen werden, die von den meisten Viren gebildet werden kann. Ein spezifisches Virus konnte demgegenüber bisher nicht nachgewiesen werden und die Herkunft dieser „viralen“ DNA ist bisher weiter unbekannt. Dahingehend ist es interessant, dass erhöhte Expressionsmuster von humanen endogenen Retroviren (HERV)-K18 nach Induktion durch IFN- α im Blut von Patienten mit juveniler idiopathische Arthritis nachgewiesen wurde (Sicat, Sutkowski et al., 2005).

1.3 Juvenile idiopathische Arthritis

Jede Arthritis die mehr als sechs Wochen besteht und ihren Beginn vor dem 16. Lebensjahr hat, bezeichnet man als juvenile idiopathische Arthritis (JIA), sofern andere Ursachen ausgeschlossen sind (reaktiv, infektiös, Arthritiden bei entzündlichen Darmerkrankungen) (Marzan and Shaham, 2012). Dabei werden acht heterogene Untergruppen unterschieden (Tab. 1). Der häufigste Subtyp ist die Oligoarthritis. Die Geschlechterverteilung unterscheidet sich je nach Subtyp. So findet man eine Knabenprädominanz bei der Enthesitis-assoziierten Variante, wohingegen bei der systemischen Verlaufsform das weibliche Geschlecht dominiert (Ravelli and Martini, 2007). Die Prävalenz beträgt 16-150/100.000 Kinder. Neben typischen klinischen Zeichen der Arthritis wie Rötung, Schwellung und Bewegungseinschränkung, führt insbesondere der Beginn im Kleinkindalter zu lokalen Wachstumsstörungen. Bei einem systemischen Krankheitsverlauf findet man zudem eine Einschränkung des Längenwachstums. Als schwerwiegende Komplikation sind das Makrophagenaktivitätssyndrom und die Amyloidose zu nennen.

Die juvenile idiopathische Arthritis (JIA) zeigt wie die rheumatoide Arthritis eine starke Assoziation zu bestimmten HLA-Typen, wie HLA A-2 und HLA B27 sowie HLA-Klasse-II Molekülen (HLA DRB1 und HLA DP) (Ravelli and Martini, 2007). Des Weiteren werden Umweltfaktoren als Auslöser der JIA diskutiert. Hierzu zählen u.a. mütterliches Rauchen während der Schwangerschaft und Infektionen (Jaakkola and Gissler, 2005). Patienten mit JIA haben eine höhere Rate von zurückliegenden Infektionen mit Mycoplasma pneumonia, Streptococcus, Parvovirus B19 und Epstein-Barr-Virus (Barash and Goldzweig, 2007; Massa et al., 2002; Oguz et al., 2002). Der Mechanismus, der zur chronischen Inflammation der Synovialmembran mit konsekutiver Schädigung von Knorpel und Knochen führt, bleibt unklar.

Histopathologisch gleicht die JIA der rheumatoiden Arthritis und führt unbehandelt zur Zerstörung der betroffenen Gelenke (Murray et al., 1996). Lichtmikroskopische wie elektronenmikroskopische Untersuchungen unterstreichen die Ähnlichkeit des histologischen Bildes. So findet sich eine prominente Infiltration mit Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen, sowie eine lokale Proliferation von synovialen Fibrozyten (Grom and Hirsch, 2000). Neben einer diffusen Infiltration, finden sich auch Aggregate oder Follikelbildungen (Grom and Hirsch, 2000). Aggregate finden sich vornehmlich perivaskulär und sind umgeben von einer diffusen Infiltration mit Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und Monozyten (Yanni et al., 1992). Diese Aggregate beinhalten weiterhin Cluster von CD4+ T-Lymphozyten umgeben von einem Mantel CD4+/CD8+ T-Lymphozyten, sowie B-Lymphozyten (Yanni et al., 1992). Darüberhinaus gibt es Hinweise, dass in kleineren Foci hauptsächlich CD8+ T-Lymphozyten nachzuweisen sind (Yanni et al., 1992). Zusätzlich findet sich eine CD8+ T-Lymphozyten Anreicherung in der Synovialflüssigkeit (Yanni et al., 1992). So ist der Anteil der CD4+ T-Lymphozyten in der polyartikulären Form der juvenilen Arthritis größer ausgeprägt als in der oligoartikulären (< 4 Gelenke) Form. Hierbei verschiebt sich das Verhältnis zu Gunsten der CD8+ T-Lymphozyten (Yanni et al., 1992). Des Weiteren finden sich erhöhte Level von aktivierten CD8+ T-Lymphozyten bei der oligoartikulären Form (Murray et al., 1996). Die polyartikuläre Form weist mehr Ähnlichkeiten zur adulten rheumatoiden Arthritis auf. Es wird postuliert, dass die JIA eine Th1-vermittelte Erkrankung mit Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 und IL-6 ist. So finden sich auch Hinweise für die Erhöhung von endogenen SAG (HERV-K18) im peripheren Blut von Patienten mit JIA (Sicat et al., 2005). Das entsprechende endogene SAG ist in der Lage, periphere Blutzellen zu aktivieren und damit zur Exazerbation der JIA beizutragen, in dem T-Zellen aktiviert werden (Sicat et al., 2005). HERV-K18 kann durch die Infektion mit EBV induziert werden, ebenso durch die Anwesenheit von IFN- α . Es wird postuliert, dass eine exogene, in diesem Falle, virale Infektion zur Transaktivierung des HERV-K18 führt und konsekutiv zur Aktivierung der T-Lymphozyten (Sicat et al., 2005). Diese Ergebnisse unterstreichen einen möglichen Einfluss von Infektionen auf die Initiierung der juvenilen idiopathischen Arthritis.

Tab.1 Klassifikation der juvenilen Arthritis nach Subtypen und klinischen Symptomen. International League of Associations for Rheumatology (Huang, 2012).

Oligoarthritis	Arthritis von 4 oder weniger betroffenen Gelenken in den ersten sechs Monaten Nicht mehr als 4 betroffene Gelenke Im Verlauf werden mehr als 4 Gelenke betroffen
<i>Persistierend</i>	
<i>Fortschreitend</i>	
Polyarthritis	Arthritis mit mehr als 5 betroffenen Gelenken
<i>RF positiv</i>	
<i>RF negativ</i>	
Systemische Arthritis	Arthritis begleitend mit Fieber und folgenden weiteren Symptomen: <ol style="list-style-type: none"> 1. flüchtiges Erythem 2. Lymphadenopathie 3. Hepatosplenomegalie 4. Serositis
Psoriasis Arthritis	Arthritis und Psoriasis oder Arthritis mit mindestens 2 der folgenden Symptome: <ol style="list-style-type: none"> 1. Daktylitis 2. Tüpfelnägel oder Onycholyse 3. Psoriasis bei Verwandten 1. Grades
Enthesitis-assoziierte Arthritis	Arthritis und Enthesitis oder Arthritis oder Enthesitis und 2 der folgenden Symptome: <ol style="list-style-type: none"> 1. Druckschmerz über den Iliosakralgelenken und/oder entzündlicher Rückenschmerz im Lumbosakralbereich 2. HLA-B27-Nachweis 3. Erkrankungsbeginn >6 Jahre bei Jungen 4. HLA-B27 assoziierte Erkrankung bei einem Angehörigen 1. Grades
Undifferenzierte Arthritis	Krankheitsbild entspricht keiner oder mehr als einer der definierten Kategorien

1.4 Tiermodelle der Arthritis

Tiermodelle sind effektive Methoden, Vorgänge die bei der RA ablaufen zu untersuchen (Hu et al., 2012). An der Ratte können mehrere Modelle unterschieden werden. Neben der cartilage oligomatrix protein (COMP)-induzierten Arthritis (Carlsen et al., 1998), der Adjuvant- (Meyer et al., 2010), der Avridine- (Vingsbo et al., 1995), Pristan- (Meng et al., 2010), Öl- (Jansson et al., 2000) (Meng et al., 2010) und Streptokokken-Zellwand-induzierten Arthritis ist das häufigste genutzte Modell die Kollagen-II-Arthritis (KIIA) (Gonzalez et al., 2007).

1.4.1 Kollagen-II-induzierte Arthritis

Bei der KIIA werden die Ratten mit Typ II Kollagen immunisiert. Es erfolgt die intradermale Injektion von 200 µl einer Emulsion von Kollagen-II und Freund's Adjuvans. Am Tag zehn erfolgt eine weitere Injektion mit 100 µl Typ II Kollagen (Booster-Injektion). Die Entwicklung der KIIA basiert auf der Überlegung, dass arthritogene Antigene endogenen Ursprungs sind. Kollagen-II stellt den größten Anteil im Knorpel dar. Auch ist eine MHC-Molekül-Restriktion beschrieben worden (Brand et al., 2003). Durch die Immunisierung kommt es nach 10 bis 12 Tagen zur Entwicklung einer schweren Arthritis, die zur Zerstörung des Gelenkes führt (Brand et al., 2003). Histopathologisch ist die Arthritis durch eine Synovialmembranhyperplasie charakterisiert. Weiterhin findet man eine massive Infiltration mit Neutrophilen, Makrophagen und T-Lymphozyten in der Subintima. Dabei entspricht die Verteilung der T-Lymphozyten im Wesentlichen die der T-Lymphozyten in der Synovialmembran der rheumatoiden Arthritis. Zu dem findet sich eine Proliferation der synovialen Fibrozyten (Brand et al., 2003). Ebenfalls wird eine Neovaskularisation und Pannusbildung im Verlauf beobachtet (Gonzalez et al., 2007). Obwohl es eindeutig ist, dass T-Lymphozyten eine große Rolle bei der Entwicklung der KIIA spielen, ist deren genaue Funktion weiterhin unklar. Es wird vermutet, dass es hauptsächlich CD4⁺ T-Zellen sind, die zur Chronifizierung bei der KIIA durch ihr TH1-Zytokinprofil beitragen. Dennoch wurden sich widersprechende Beobachtungen gemacht, so dass IFN- γ , als Th1-Zytokin offensichtlich nicht zur Entwicklung einer KIIA benötigt wird (Brand et al., 2003). Weiterhin können Autoantikörper, Immunglobulin G (IgG)a/b, gegen KIIA im Serum isoliert werden und unterstreichen auch die pathogene Rolle von B-Zellen in diesem Modell.

1.5 Zielsetzung der Studie

In vorangegangenen Untersuchungen konnte nach intrazerebraler Injektion des SAG SEA eine der Multiplen Sklerose (MS) ähnlichen Entzündung initiiert werden (Kornhuber et al., 2002) (Emmer et al., 2008; Emmer et al., 2010). Dieses SAG-basierte Entzündungsmodell wurde unter der Vorstellung entwickelt, dass ein HERV-kodiertes SAG die Entzündung bei MS auslösen könnte. Das kommerziell erhältliche SEA wurde dabei als Ersatz für ähnlich wirkende, bislang aber kaum verfügbare SAG humaner endogener Retroviren eingesetzt. Bei der rheumatoiden Arthritis werden ähnliche pathogenetische Mechanismen diskutiert wie bei der MS. U.a. wird über eine Beteiligung von HERV bzw. von HERV-kodierten SAG nachgedacht (Friedman et al., 1991; He et al., 1992; Schiffenbauer, 1999). Tatsächlich wurde in der Vergangenheit bereits das SAG SEB eingesetzt, um eine autoimmune Arthritis im Tiermodell zu beeinflussen (Omata et al., 1997). Allerdings führte die SEB-Injektion (in Verbindung mit komplettem Freund-Adjuvans) in die Hinterpfote nicht zu einer Verstärkung der mit Kollagen-II ausgelösten Arthritis (Omata et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit soll demgegenüber untersucht werden, ob lokal im Gelenk exprimiertes SAG eine Arthritis auslösen kann. Nach intraartikulärer Injektion von SEA in das rechte Kniegelenk, soll das Entzündungsinfiltrat zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 1, 5 und 10) immunhistochemisch auf unterschiedliche Zellpopulationen wie CD3+, CD4+, CD8+ T-Lymphozyten, sowie CD138+ und Pax-5+ B-Zellen und MHC-I und MHC-II+ Zellen untersucht werden.

Bisher wurde nicht über eine durch lokale Expression von SAG im Gelenk ausgelöste Arthritis berichtet. Die erhobenen histologischen Befunde der hier gefundenen Superantigenarthritis sollen mit den Ergebnissen der rheumatoiden und idiopathischen juvenilen Arthritis verglichen werden. Zudem wird geprüft, inwieweit die durch ein SAG induzierte Arthritis als Tiermodell evtl. zukünftig zum Verständnis der rheumatoiden Arthritis beitragen könnte.

2 Material und Methoden

2.1. Materialien

Aqua dest.	Universitätsapotheke
Citratpuffer (10mmol) ph 6,0	Firma Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Firma Roth
Ethanol	Universitätsapotheke
Glukose	Firma Roth
Hämalaun	Vektor
Kaiser-Glycerin-Gelatine	Firma Merck
L-Lysin-Monochlorid	Firma Roth
Methanol	Firma Roth
Na ₂ HPO ₄	Firma Roth
NaOH	Firma Roth
Paraffin	Firma Roth
Paraformaldehyd	Firma Roth
PBS (phosphate buffered saline, 10 mM)	Firma AppliChem
Roticlear	Firma Roth
Sodiumperjodat	Firma Roth
Staphylokokkenterotoxin A	Toxin Technology, Sarasota, USA
Verdünnungspuffer für Primärantikörper	Firma Zytomed
Wasserstoffperoxid (30%)	Firma Merck
ZytoChem – Plus HRP Polymer – Kit	Firma Zytomed

CD3

Primärantikörper:	CD3 BD Pharmingen™	Art. Nr. 550295
Polymer-Kit ZytoChem-Plus HRP:	HRP Polymer anti Rabbit Blocking Solution PostBlock ABC Chromogen/ABC Buffer (2 Tropfen AEC Chromogen + 5ml AEC Buffer)	

CD4

Primärantikörper:	CD4 Biozol	Art. Nr. LS-C62705-100
Polymer-Kit ZytoChem-Plus HRP:	HRP Polymer anti Rabbit Blocking Solution PostBlock ABC Chromogen/ABC Buffer (2 Tropfen AEC Chromogen + 5ml AEC Buffer)	

CD8

Primärantikörper:	CD8 BD Pharmingen™	Art. Nr. 550298
Polymer-Kit ZytoChem-Plus HRP:	HRP Polymer anti Rabbit Blocking Solution PostBlock ABC Chromogen/ABC Buffer (2 Tropfen AEC Chromogen + 5ml AEC Buffer)	

CD138

Primärantikörper:	CD 138 BD Pharmingen™	Art. Nr. 553712
Polymer-Kit ZytoChem-Plus HRP:	HRP Polymer anti Rabbit Blocking Solution PostBlock ABC Chromogen/ABC Buffer (2 Tropfen AEC Chromogen + 5ml AEC Buffer)	

Pax-5

Primärantikörper:	Pax-5 Zytomed	RBK 008
Polymer-Kit ZytoChem-Plus HRP:	HRP Polymer anti Rabbit Blocking Solution PostBlock ABC Chromogen/ABC Buffer (2 Tropfen AEC Chromogen + 5ml AEC Buffer)	

MHC-I

Primärantikörper:	RT 1 A BD Pharmingen™	Art.Nr. 554927
Polymer-Kit ZytoChem-Plus HRP:	HRP Polymer anti Rabbit Blocking Solution PostBlock ABC Chromogen/ABC Buffer (2 Tropfen AEC Chromogen + 5ml AEC Buffer)	

MHC-II

Primärantikörper:	RT 1 B BD Pharmingen™	Art. Nr. 554926
Polymer-Kit ZytoChem-Plus HRP:	HRP Polymer anti Rabbit Blocking Solution PostBlock ABC Chromogen/ABC Buffer (2 Tropfen AEC Chromogen + 5ml AEC Buffer)	

2.2 Versuchstiere

Es wurden insgesamt 15 männliche 300 g schwere Lewis-Inzuchtratten (Charles-River-Laboratories) verwendet. Diese haben sich bereits in Versuchen zur SAG-Enzephalitis suszeptibel hinsichtlich der SEA-Wirkung gezeigt (Emmer et al., 2008; Emmer et al., 2010; Kornhuber et al., 2002). Eine Injektion in das Kniegelenk ist über eine in der Mittellinie unmittelbar subpatellar gelegene Punktion möglich. Die Ratten wurden unter Standardbedingungen (klimatisierte Räume, 12:12 Hell-Dunkel-Rhythmus, Makrolonkäfige, pelletiertes Rattenalleinfutter, täglich Frischwasser) gehalten und durch qualifiziertes Personal betreut.

2.3 Intraartikuläre Injektion des Superantigens (Tag 0)

Vor der Injektion wurden die Tiere mittels Farbe am Schwanz markiert und gewogen. Daraufhin erfolgte die Narkose mittels Isofluran unter Einleitung in der Inkubationskammer (Flow 2,5 bis 3 Vol.%). Eingesetzt wurde das Tischnarkosegerät Univet Porta von der Firma Groppler. Nach Erlöschen der Stellreflexe wurde das Tier aus der Inkubationskammer genommen und die Narkose weiter über eine Maske erhalten (Flow ca. 2 Vol.%). Die Narkosetiefe wurde abhängig vom Erlöschen des Schmerzreizes (phalangealer Schmerzreiz) überwacht (Abb. 2). Die Ausschaltung der Schmerzempfindung wurde anhand interphalangealer Schmerzstimuli sichergestellt. Nach Rasur und Desinfektion des zu injizierenden Gelenkes erfolgte die Applikation von 100 µl Superantigenlösung (5mg/ml=200µl/ml SEA) subpatellar (Abb. 3). Die Injektion galt als erfolgreich, wenn die Konturen des Gelenkes verschwanden und sich das Gelenk ballonierte. Nach Injektion erfolgte die Abschlussdesinfektion. Post injectionem wurden die Tiere noch einige Zeit beobachtet. Bedarfsmedikation bei Anzeichen von Schmerzen mit Carprofen (Abb. 4). Insgesamt dauerte die Narkose ca. 15 min. Nach kurzer Erholungszeit zeigten die Tiere ein normales Gangbild. In der Kontrollgruppe erfolgte die Injektion der gleichen Menge NaCl 0,9 % physiologischer Kochsalzlösung unter identischen Versuchsbedingungen.

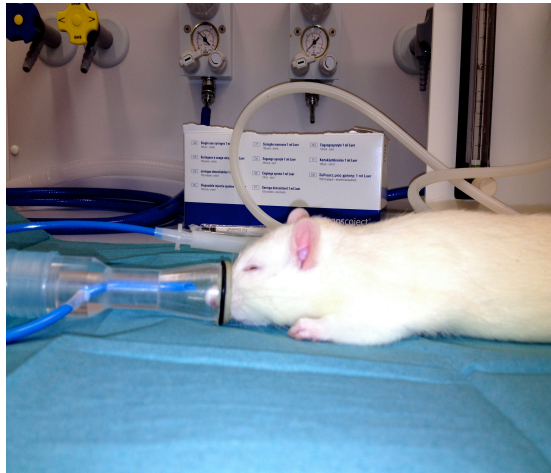


Abb. 2 Inhalationsnarkose der Tiere

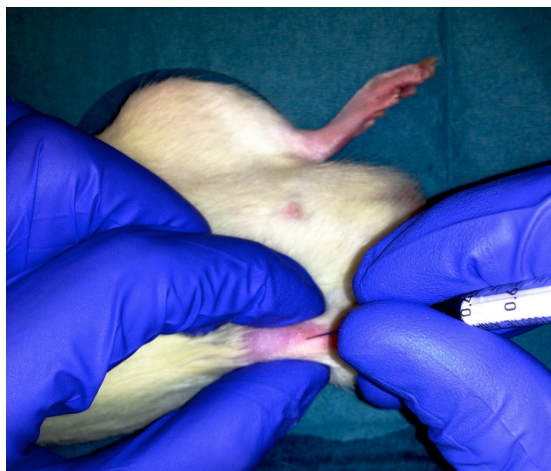


Abb. 3 Subpatellare Injektion des SEA im Bereich des rechten Kniegelenkes

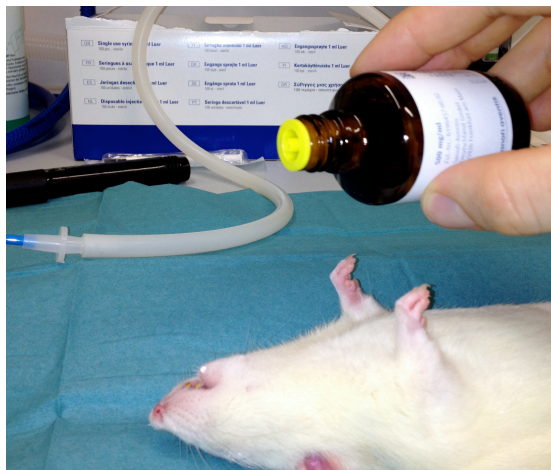


Abb. 4 Bedarfsmedikation mit Carprofen

2.4 Entnahme der Gelenke (Tag 1, 5, 10 nach SEA-Injektion)

An Tag 1 wurden fünf Versuchstiere in tiefer CO₂-Narkose geopfert. Davon waren drei Tiere mit SEA behandelt worden, zwei Tiere gehörten der Kontrollgruppe (NaCl 0,9%-Injektion) an. Identisches Vorgehen an Tag 5 und 10. Nach Tötung wurden zunächst Fell und anteilige Weichgewebe, einschließlich Muskulatur vom Knochen von der unteren Extremität gelöst. Dabei wurde darauf geachtet, die Gelenkkapsel intakt zu lassen. Anschließend erfolgte das Herauslösen des rechten Kniegelenkes durch eine elektrische Kreissäge, indem der distale Femur als auch die proximale Tibia sowie Fibula durchtrennt wurden. Identisches Vorgehen auf der Gegenseite. Die entnommenen Kniegelenke wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C Grad gelagert. Zuvor wurden an den Tagen 1, 5 und 10 in Narkose Wärmebildkameraaufnahmen zur Objektivierung möglicher Temperaturunterschiede durchgeführt. Hierzu erfolgte die sorgfältige Rasur beider Gelenke. Die Aufnahmen wurden mit der Kamera FLIR „Thermovision 550“ aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der Software FLIR „Irwin 2.01“. Die Thermovision 550 Kamera misst eine Temperatur von -20 °C bis 1.500 °C mit einer Genauigkeit von 2 °C und einer Sensitivität von 0,1 °C. Die Aufnahmen wurden in einem Raum aufgenommen, in dem eine konstante Umgebungstemperatur von 20 °C herrschte. Die Infrarotkamera wurde 70 cm über den Ratten positioniert (s. Abb. 5).



Abb. 5 Wärmebildkameraraufbau

2.5 Herstellen der Paraffinschnitte

Vor Einbetten der Gelenke wurden diese fixiert. Dabei wurde eine PLP-Stammlösung benutzt. Diese setzte sich aus PLP-A (18,26 g L-Lysin Monochlorid/500 ml A. dest.), PLP-B (7,1 g Na₂HPO₄/500 ml A. dest), PLP-C (5g Ad + Glucose/100ml A. dest., 8 g Paraformaldehyd, 2-4 Tropfen 1ml NaOH) und PLP-D (0,855 g Natriumperjodat) zusammen. Kurz vor Gebrauch wurden 100 ml PLP-A, 100 ml PLP-B, 6,452 ml PLP-C und 0,855 g Natriumperjodat angesetzt. Die gesamte Fixierungszeit betrug vier Stunden. Anschließend erfolgte das Spülen der Gelenke mit PBS für 3 x 30 Minuten. Nach der Fixierung wurden die Gelenke entkalkt. Hierfür wurde eine EDTA Lösung (280 g EDTA, 26 g NaOH in 2 L A. dest) angesetzt. Die Entkalkung der Gelenke wurde insgesamt für 14 Tage bei 37 °C durchgeführt. Die Lösung wurde täglich gewechselt. Nach der Entkalkung wurden die Gelenke in Paraffin eingebettet. Die Gelenke wurden seitlich in die Einbettschalen gelegt. Die Einbettung erfolgte im Einbettautomat Lica (2 x 70% Ethanol je 30 min. , 1 x 80 % Ethanol 1 Stunde, 2 x 96 % Ethanol je 1 Stunde, 2 x abs. Ethanol je 1 h, 2 x Roticlear je 1 Stunde, 1 x Roticlear je 1 Stunde, 1 mal Roticlear je 2 Stunden und 2 x Paraffin 60 °C je 2 Stunden). Die gesamte Dauer des Einbettprogramms betrug 14 Stunden. Nach abgeschlossener Einbettung erfolgte die Ausbettung und anschließend das Schneiden in einer Dicke von 6 µm je Schnitt am Mikrotom HM 355S. Die Schnitte wurden dann auf Superfrost beschichtete Objektträger aufgetragen. Polylysin beschichtete Objektträger wurden nur beim CD4-Antigen angewendet.

2.6 Immunhistochemische Färbung nach der Avidin-Biotin-Methode

Zur Darstellung der maximalen Entzündung ist an ausgewählten Schnittpräparaten eine HE-Färbung durchgeführt wurden. Weitere Präparate des Schnittes wurden für die spezielle Immunhistochemie weiter verwendet. Die verwendete immunhistochemische Methode basiert auf der Fähigkeit des Eiweißglycoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Bei dieser Technik bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen. Nachfolgend bindet der Sekundärantikörper (biotinylierter Antikörper), der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist. Die freien Stellen am Peroxidase konjugierten Avidin des Avidin-Biotin-Komplexes ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase wird mit einem geeigneten Chromogen sichtbar gemacht.

Zunächst wurden die Präparate entparaffiniert. Hierbei wurden sie zwanzig Minuten in Rotihistol gewaschen. Die Entwässerung der Präparate erfolgte in der absteigenden Alkoholreihe für je fünf Minuten (100%, 96%, 70%, 40%, Aqua dest.). Die endogene Peroxidaseaktivität wurde mit 3 % Wasserstoffperoxid Lösung für zehn Minuten geblockt. Dieser Schritt ist notwendig da die Substrat-Chromogenreaktion zur Darstellung der Peroxidase keine Unterscheidung zulässt und ob es sich somit bei dem sichtbar gemachten Enzym um das durch die Immunreaktion nachzuweisende spezifische zelluläre Antigen oder um schon vorhandene endogene enzymatische Aktivität handelt. Anschließend erfolgte das Spülen mit PBS-Lösung, zwei mal für je fünf Minuten. Daraufhin Auftragen der Blocking-Solution für zwanzig Minuten. Diese Lösung vermindert die Hintergrundfärbung, die durch unspezifische Bindung des Antikörpers entstehen kann. Daraufhin erfolgte ein erneuter Waschschriff mit PBS-Lösung zweimalig für je fünf Minuten. Danach wurde der Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (s. Tab. 2) aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Spülen mit PBS-Lösung für je fünf Minuten wurde das Post-Block-Reagenz für dreißig Minuten (Verstärkungsreagenz) aufgetragen. Anschließend folgte ein erneuter Waschschriff mit PBS-Lösung zweimalig für je fünf Minuten. Daraufhin Auftragen des HRP-Polymer für dreißig Minuten. In diesem Enzym-Polymer sind mehrere Moleküle Sekundärantikörper mit mehreren Molekülen Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) kovalent verbunden. Die Visualisierung erfolgte über eine Enzym-Substrat Reaktion in Gegenwart einer farbgebenden Komponente, die schließlich eine mikroskopische Auswertung ermöglicht. Hierbei kann durch endogenes Biotin verursachte Hintergrundfärbung umgangen werden. Anschließend Spülen mit PBS-Lösung zweimalig für je fünf Minuten und Applikation des AEC-Chromogen für zehn Minuten und nachfolgender Spülung mit PBS-Lösung zweimalig für je fünf Minuten. Das AEC-Chromogen bildet am Ort des Zielantigens ein rotbraunes Reaktionsprodukt. Erneutes kurzes Spülen mit Leitungswasser und Gegenfärbung mit Hämalaun für 30-45 Sekunden. Abschließend erneutes Spülen mit Aqua dest. und Eindecken mit Kaisers Glyceringelatine.

Dieses Vorgehen war bei allen verwendeten Antikörpern identisch. Eine Ausnahme wurde beim CD4-Antigen gemacht. Hierbei wurde die Blockung der endogenen Peroxidaseaktivität mit 0,3 % Wasserstoffperoxid für zehn Minuten durchgeführt. Daraufhin folgte ein Wasserbad mit 90 °C in 10 mM Citratpuffer pH 6,0 für insgesamt zehn Minuten. Anschließend identisches Vorgehen (s. o.).

Tab.2 Verdünnung der Primärantikörper

Primärer Antikörper	Verdünnung
CD3	1 : 20 Antibody Diluent
CD4	1 : 20 mit 1% BSA/PBS-Lösg.
CD8	1 : 30 Antibody Diluent
CD138	1 : 100 Antibody Diluent
Pax-5	1 : 100 Antibody Diluent
MHC-I	1 : 100 Antibody Diluent
MHC-II	1 : 100 Antibody Diluent

2.7 Die untersuchten Antigene

2.7.1 CD3-Antigen

CD3 ist ein mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) assoziiertes Oberflächenantigen auf Thymozyten und T-Lymphozyten. Im funktionsfähigen TCR-Komplex sind die $\alpha\beta$ -Heterodimere mit einem Komplex aus vier anderen Signalproteinketten assoziiert. (zwei ϵ -Ketten, eine δ - und eine γ -Kette). Dieser Komplex wird als CD3 bezeichnet. Zwar erkennt das $\alpha\beta$ -Heterodimer des TCR seinen Peptid-MHC-Liganden und bindet daran, kann jedoch keine Signaltransduktion ausführen. Dies ist nur mit Hilfe der CD3-Moleküle möglich. Diese Zusammensetzung des TCR ist dynamisch und kann sich nach Stimulation des Rezeptors durch seine Liganden ändern (Call et al., 2002; Kuhns and Badgandi, 2012).

2.7.2 CD4-Antigen

CD4 ist ein einzelkettiges Molekül aus vier Immunglobulinartigen Domänen. CD4 bildet auf der T-Lymphozyten Oberfläche Homodimere, die MHC-II-Moleküle erkennen. Der intrazelluläre Anteil von CD4 interagiert stark mit einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase (Lck) und führt sie mit den Signalkomponenten des TCR-Komplexes zusammen. Das führt zu einer Verstärkung des Signals. CD4 wird auf Thymozyten, MHC-II assoziierten T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und eosinophilen Granulozyten exprimiert (Wang and Reinherz, 2002).

2.7.3 CD8-Antigen

CD8 ist ein Dimer aus zwei verschiedenen Ketten (α und β), die durch eine Disulfidverbindung verbunden sind. CD8 ist ein Antigen Co-Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen, der mit dem MHC-I-Molekül Antigen-präsentierender Zellen interagiert. Wie CD4 aktiviert er die zytoplasmatische Tyrosinkinase. CD8 erhöht die Empfindlichkeit von T-Zellen für durch MHC-I-Moleküle präsentierte Antigene. Es wird auf der Oberfläche von Thymozyten, MHC-Klasse-I restringierten T-Zellen, einschließlich T-Suppressor und zytotoxischen T-Zellen exprimiert (Julius et al., 1993; Maroun and Julius, 1994).

2.7.4 MHC-I-Antigen

T-Zellen erkennen ein Antigen in Form eines Komplexes aus einem fremden Peptid und einem daran gebundenen MHC-Molekül.

MHC-I-Moleküle bestehen aus zwei Polypeptidketten, einer größeren α -Kette und einer kleineren, nichtkovalent angelagerten Kette, dem β 2-Mikroglobulin. MHC-Klasse-I-Moleküle binden kurze, acht bis zehn Aminosäuren lange Peptide an beiden Enden. MHC-I-Moleküle interagieren mit dem Oberflächenantigen CD8 und führen zur T-Lymphozyten Aktivierung. Sie werden auf T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und neutrophilen Zellen exprimiert (Bouvier, 2003).

2.7.5 MHC-II-Antigen

MHC-II-Moleküle bestehen aus einem nichtkovalenten Komplex der zwei Ketten α und β . Die Länge der Peptide, die von MHC-Klasse-II-Molekülen gebunden werden, ist nicht beschränkt. Sie interagieren mit dem CD4-Oberflächenantigen und führen zur Aktivierung des T-Zell-Rezeptors. Sie werden auf B-Zellen, dendritischen Zellen, epithelialen Zellen des Thymus und Makrophagen exprimiert (Fremont et al., 1996).

2.7.6 CD138-Antigen

CD 138 (Syndecan-1) wird auf Prä-B-Zellen und Plasmazellen exprimiert, nicht jedoch auf reifen B-Zellen. Dieses Membranprotein ist kovalent an Heparonsulfat und Chondroinsulfat gebunden und verbindet das Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix. Es fungiert hauptsächlich in Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktionen über die Bindung von

Kollagen-I. Neben Plasmazellen wird es auch von malignen B-Zellen exprimiert (O'Connell et al., 2004).

2.7.7 Pax-5-Antigen

Pax-5 ist ein Transkriptionsfaktor und essentiell für die B-Zell-Reifung. Wenn Pax-5 fehlt, können sich Pro-B-Zellen entlang des B-Zell-Weges nicht weiterentwickeln. Es wirkt auf das Gen einer Komponente von CD19 und auf das Gen für Ig- α . Pax-5 ist ein Pan-B-Zell-Marker und kann bereits auf der frühen Pro-B-Zelle nachgewiesen werden (Torlakovic et al., 2002).

2.8 Positivkontrolle

Die Positivkontrolle für alle untersuchten Antikörper wurde an Milzgewebe der untersuchten Ratten für alle Primärantikörper durchgeführt. Aufgrund der hohen Anzahl von T-Lymphozyten und B-Lymphozyten erweist sich die Milz als lymphatisches Organ ideal für die Positivkontrolle.

2.9 Negativkontrolle

Als Negativkontrolle wurden Schnitte des gleichen Materials ohne Verwendung des Primärantikörpers mit PBS inkubiert. Sie durchliefen das Standardfärbeverfahren.

2.10 Auswertung

Es wurden Schnitte ausgewählt, die in der Übersichtsaufnahme die Femurkondylen, das Tibiaplateau, beide Menisci sowie den Recessus suprapatellaris darstellten. Nach der HE Färbung wurden jene Präparate ausgewählt die eine maximale Entzündungsinfiltration in der Synovialmembran aufwiesen. Weiterhin wurden sechs Felder in der Größe von $50.000 \mu\text{m}^2$ (HPF – high power field), die die Synovialmembran und das subintimale Gewebe mit einschlossen, ausgewählt und ausgewertet (s. Abb. 6). Hierbei wurde das Mikroskop Axioplan® (Zeiss) verwendet. Neben den Zellschichten der Synovialmembran, wurden die in den entsprechend definierten Feldern positiv gefärbten Zellen ausgezählt und die erhobene Summe aus den Feldern addiert. Die visuelle Darstellung erfolgte bei 20- und 40facher Vergrößerung mit Hilfe der Mikroskopkamera AxiocamHrc®, sowie rechnergestützt am Bildschirm mit der Software Axiovision 4.8.2. Aufgrund der

vorliegenden Stichprobengröße ($n < 30$) kann man nicht von einer Normalverteilung ausgehen. Diesbezüglich wurden zu statistischen Auswertung nichtparametrische Testverfahren angewendet. Zur Testung der Signifikanz zwischen den unterschiedlichen Gruppen (SEA/NaCl), ist der Man-Whitney-U-Test angewendet worden. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf 5 % festgelegt ($p < 0,05$). Die Darstellung erfolgte mit Hilfe von Balkendiagrammen. Die Berechnungen und die Diagramme sind mit SPSS 17 erstellt worden.

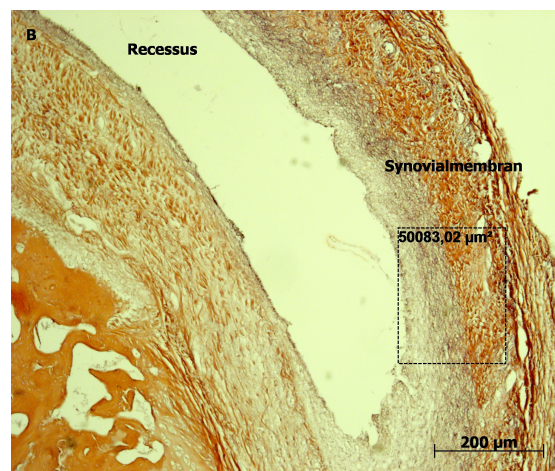


Abb. 6 HPF (ca. 50.000 μm^2 - Kantenlänge 200 μm x 250 μm) zur Auswertung der ausgewählten synovialen Abschnitte im untersuchten Gelenk. Insgesamt wurden sechs HPF pro Gelenk ausgewertet.

2.11 Fehlerbetrachtung

Trotz einer entsprechenden Lernkurve in Vorversuchen und großer Sorgfalt ist die Injektion des Staphylokokkenterotoxin A schwierig. Es kann mit der Injektionsnadel höchstens zwei mm in das Gelenk vorgedrungen werden, da aufgrund der engen räumlichen Verhältnisse ansonsten eine Fehlinjektion droht. Weiterhin besteht bei der Präparation der Gelenke die Gefahr der Zerreißung der dünnen Synovialmembran mit möglichem Verlust von entzndungsrelevanten Abschnitten. Daraus kann eine Fehlinterpretation des Entzündungsinfiltrates resultieren. Die Wirkung der Antikörper für in Paraffin eingebetteten Rattengewebe, insbesondere CD4, musste für dieses Modell neu etabliert werden, deshalb besteht die Möglichkeit einer nicht idealen Färbung der immunpositiven Zellen. Obwohl die manuelle Auszählung der immunpositiven Zellen den semiquantitativen Analysen und der digitalen Bildanalysen an Validität und Durchführbarkeit überlegen sein kann, ist die Verlässlichkeit der erhobenen Befunde Untersucher gebunden (Smith et al., 2006).

Um eine Verzerrung der Ergebnisse so gering wie möglich zu halten und um eine umfassende Abbildung des intraartikulären Entzündungsgeschehen wieder zu geben, wurden sechs Felder (HPF) im Gelenk ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Befunde

Die untersuchten HE-Schnitte bildeten die proximale Tibia, den distalen Femur und die gesamte Gelenkkapsel mit beiden Menisci und der erhaltenen Synovialmembran ab (Abb. 6). Hierbei wurde die Intima, zumeist eine zwei bis dreilagige Zellschicht bestehend aus synovialen Fibrozyten (Typ A und Typ B, Abb. 8) untersucht. Diese Zellen stehen in direkten Kontakt zu Synovia. Weiterhin wurde das subintimale Gewebe untersucht, dieses setzt sich aus locker gebildeten unspezifischen Zellverbänden von synovialen Fibrozyten und Makrophagen zusammen, weiterhin findet man Gefäßanschnitte (Edwards, 2000).

Die histologische Analyse ergab eine bis zum Tag 5 nach intraartikulärer Injektion von Staphylokokkenterotoxin A (SEA) im Verlauf zunehmende Rundzellinfiltration, vorwiegend im subintimalen Bereich des rechten Kniegelenkes (Abb. 9). Die Rundzellinfiltration war nicht homogen im subintimalen Gewebe der Gelenke verteilt sondern vornehmlich im oberen Recessus und an der Basis des medialen und lateralen Meniskus gelegen. Das Entzündungsinfiltrat war an Tag 5 nach intraartikulärer Injektion von SEA im Bereich des injizierten Kniegelenkes am stärksten ausgeprägt. Darüber hinaus kam es zu beginnender Aggregatbildung aus eingewanderten inflammatorischen Rundzellen an Tag 10 nach intraartikulärer SEA-Injektion (Abb. 10). Weiterhin fanden sich im subsynovialen Gewebe im zeitlichen Verlauf zunehmend Rundzellen, Neovaskularisationen und insbesondere an Tag 10, mukoide Auflockerungen im Bereich des Entzündungsgewebes entsprechend kleiner fibrinoider Nekrosen (Abb. 7 und Abb.8).

Es wurden die T-Zell-Marker CD3, CD4 und CD8 sowie die B-Zell-Antigene Pax-5 und CD138 und MHC-I und MHC-II untersucht (Abb. 12-17). Im Bereich des rechten injizierten Kniegelenkes zeigte sich eine von CD8+ T-Lymphozyten dominierte Entzündung. Die Zahl der CD8+ T-Lymphozyten war zu jedem Messzeitpunkt größer als die Anzahl an CD3+ - und CD4+ T-Lymphozyten. Das Maximum der Anzahl an CD8+ T-Lymphozyten lag an Tag fünf nach Injektion von SEA und fiel an Tag zehn leicht ab. Die Zahl der CD3+- und CD4+- T-Lymphozyten stieg im Verlauf der drei Untersuchungszeitpunkte leicht an.

Die Zahl der MHC-I+ Zellen war im Vergleich zu den anderen untersuchten Oberflächenantigenen am stärksten ausgebildet. Deren Anzahl nahm an Tag zehn leicht ab. Die Zahl der MHC-II+ Zellen stieg im Verlauf der drei Untersuchungszeitpunkte

kontinuierlich an. Es fanden sich nur wenige CD138+ - und Pax-5+-Zellen, im Verlauf nahm deren Zahl im Entzündungsinfiltrat leicht zu (Abb. 7).

Im Bereich des linken nicht injizierten Kniegelenks fand sich eine signifikant schwächer ausgeprägte Rundzellinfiltration zu allen Untersuchungszeitpunkten. Das Maximum der Zellen fand sich an Tag eins nach intraartikulärer Injektion des SEA rechts. Die Anzahl MHC-I+ Zellen war wie im Bereich des rechten injizierten Gelenkes am stärksten ausgebildet und nahm ab Tag eins kontinuierlich ab. Ebenfalls fand sich nur eine geringe Anzahl von CD138+ und Pax-5+ Zellen.

3.2 Beurteilung des Durchmessers der Synovialmembran im Bereich der unterschiedlichen Gruppen (SEA/NaCl) des rechten injizierten Kniegelenkes im zeitlichen Verlauf

Es ließ sich bereits an Tag eins nach Injektion des SAg SEA eine im Vergleich zur NaCl-Gruppe, eine signifikante Hyperplasie der Synovialmembran feststellen, die bis zum Tag zehn nach intraartikulärer Injektion kontinuierlich zunahm. Am Tag 10 wurde eine maximale Schichtdicke von 70 µm gemessen. In der NaCl-Gruppe kam es zu keiner Veränderung der Synovialmembran. Der Durchmesser der Synovialmembran entsprach im Wesentlichen der nicht injizierten Gelenke (Abb. 2). Sie zeigte im gesamten Untersuchungszeitraum eine Dicke von ca. 3-4 µm und nahezu keine Rundzellinfiltration. Diese war signifikant geringer ausgeprägt als im Bereich der rechten injizierten Seite ($p < 0,05$). Auch im zeitlichen Verlauf konnte keine Änderung der Rundzellinfiltration beobachtet werden.

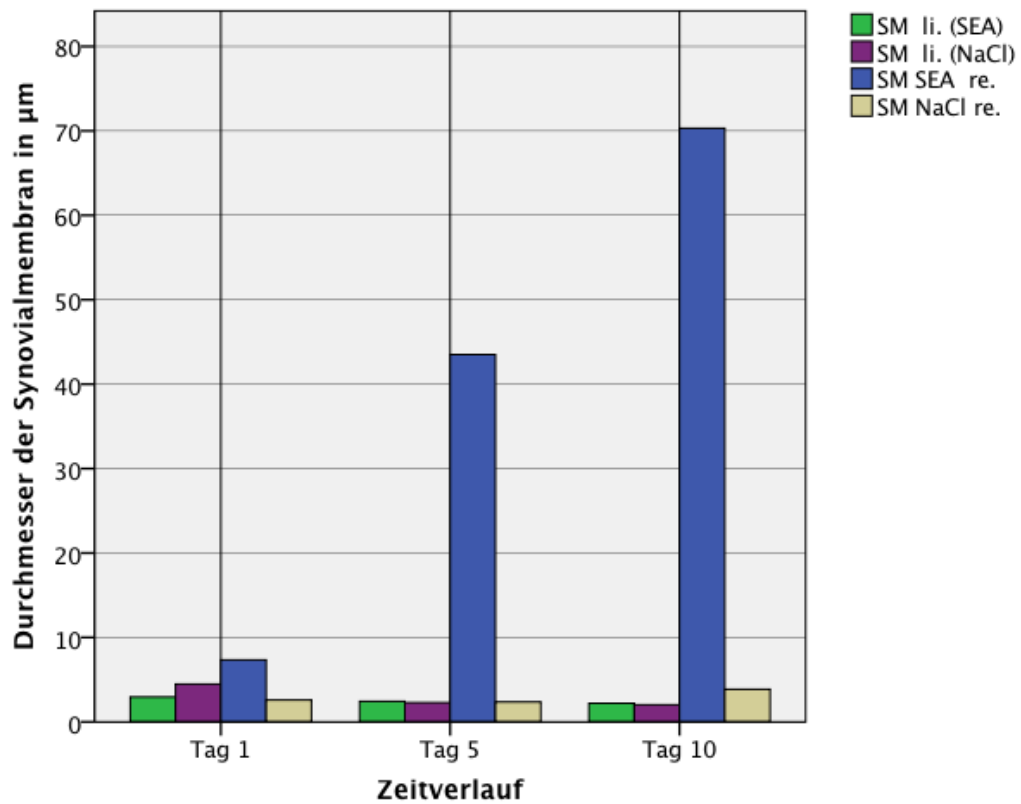


Abbildung 7: Durchmesser der Synovialmembran in μm im zeitlichen Verlauf an Tag 1, Tag 5 und Tag 10 nach intraartikulärer Injektion des Superantigens Staphylokokken Enterotoxin A (SEA) im Bereich des rechten, injizierten (blau) und im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Injektion von NaCl (gelb). Weiterhin dargestellt: die Synovialmembran der nicht injizierten Kniegelenke, links (grün) und (lila). Beachte den im Verlauf deutlich zunehmenden Durchmesser der SM.

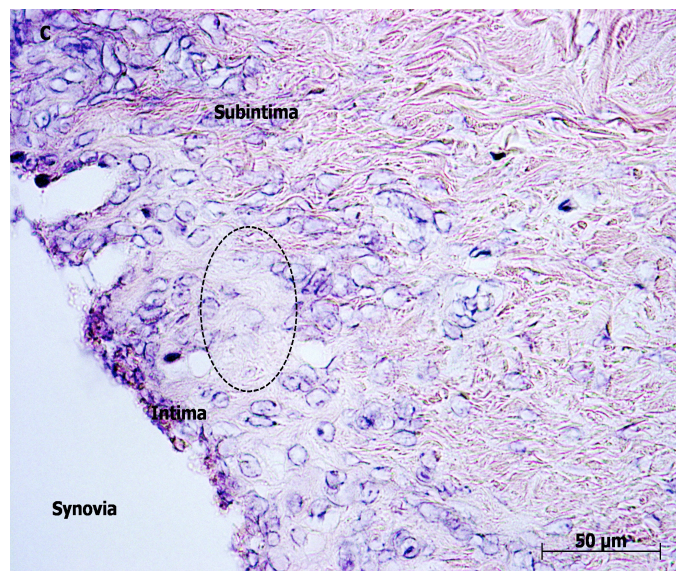
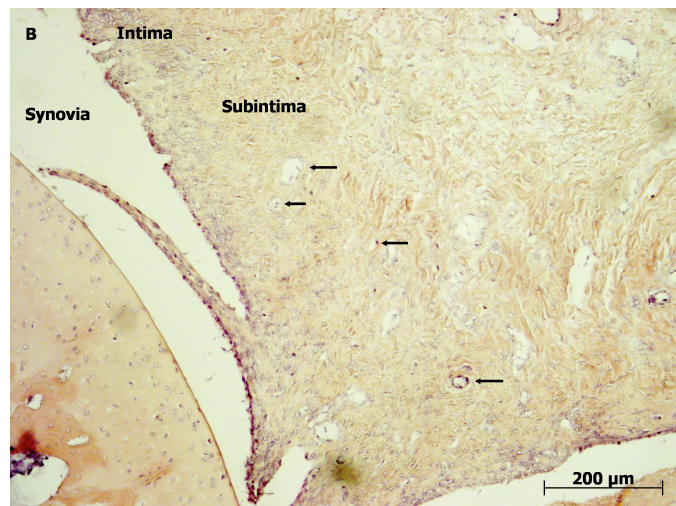
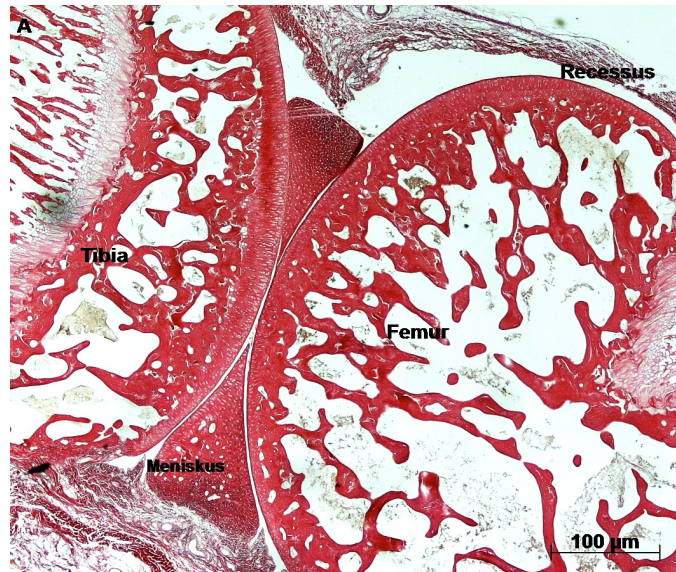


Abbildung 8: A) Übersicht. v. Gieson-Färbung. B) Pfeile. Neovaskularisationen. HE Färbung. C) Eingekreiste Fläche: Fibrinoide Nekrosen im Bereich der Subintima. HE-Färbung.

Synovialmembran

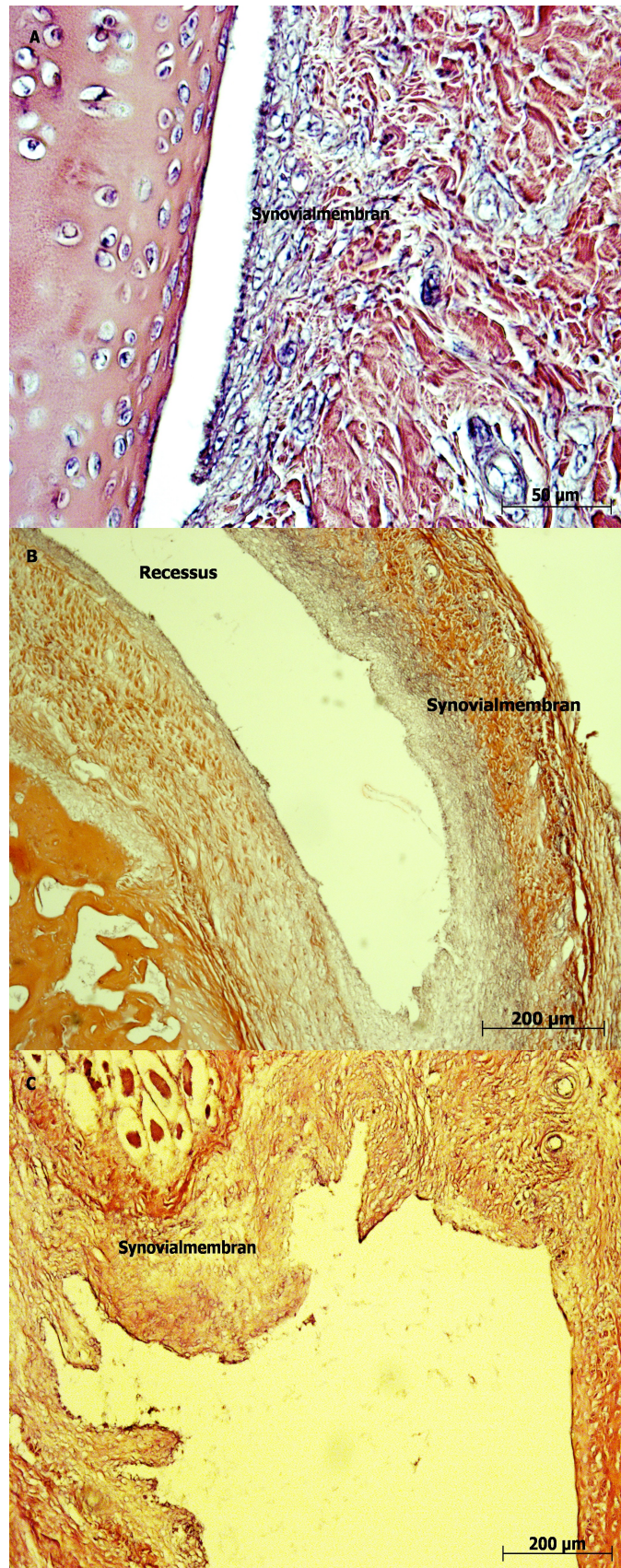


Abbildung 9: HE-Färbung. Dargestellt ist die Dicke der Synovialmembran (S) im Zeitverlauf, A) Tag eins B) Tag fünf und C) Tag zehn nach intraartikulärer Injektion von SEA im Bereich des rechten, injizierten Kniegelenks.

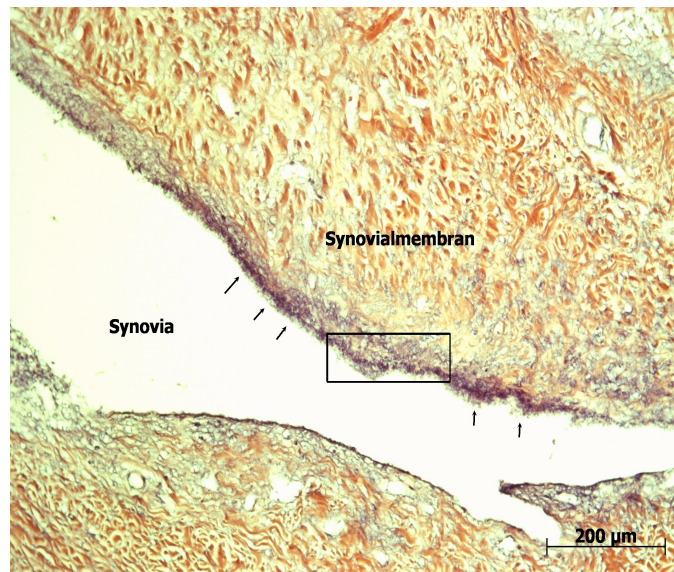


Abbildung 10: Rundzellinfiltration oberer Recessus. Rechtes Kniegelenk nach intraartikulärer SEA Applikation. Tag 5. Synovialmembran: Schwarze Pfeile. Rechteckiges Areal s. Abb. 11

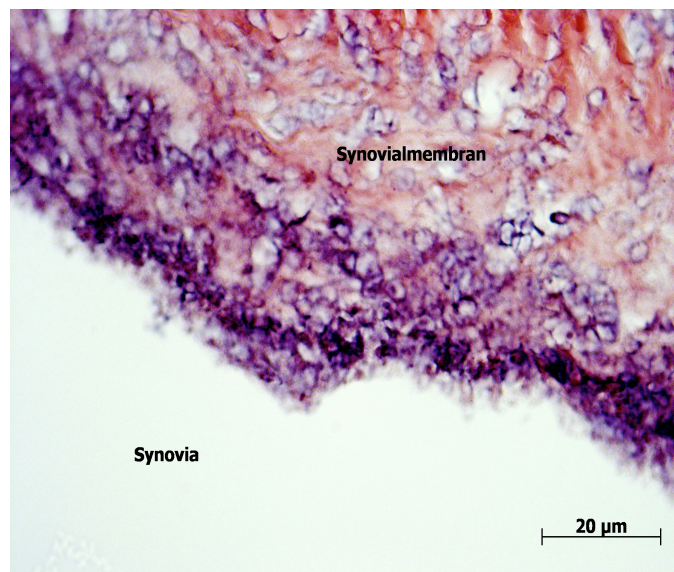


Abbildung 11: Rechteckiger Ausschnitt (Abb. 10) Rundzellinfiltration Subintima und Intima.

3.3 Beurteilung der Zellpopulationen im zeitlichen Verlauf an den drei Untersuchungszeitpunkten Tag 1, 5 und 10 nach intraartikulärer Injektion des Superantigens SEA im Bereich des rechten injizierten Kniegelenks

Die Rundzellinfiltration zeigte ein Maximum der Aktivität an Tag 5 nach intraartikulärer Injektion von SEA. Das Rundzellinfiltrat wurde von CD8+ T-Lymphozyten dominiert.

CD3: An Tag eins nach intraartikulärer Injektion von SEA waren nur einzelne (ca. 2% Zellen aus der Gesamtzellpopulation CD3+ T-Lymphozyten; ihr Anteil stieg an den weiteren zwei Untersuchungszeitpunkten leicht an (6% an Tag fünf, 11% an Tag zehn) (Abb.12). Die Anzahl CD3+ T-Lymphozyten lag zu allen Untersuchungszeitpunkten über der Anzahl CD4+ T-Lymphozyten, aber zu allen Untersuchungszeitpunkten unter der Anzahl CD8+ T-Lymphozyten sowie der MHC-II+ Zellen.

CD4: Der Anteil CD4+ T-Lymphozyten war zu allen Untersuchungszeitpunkten geringer als der Anteil CD3+- und CD8+ T-Lymphozyten und lag auch deutlich unter der Anzahl MHC-II+ Zellen. Weniger als 1 % aller untersuchten Zellen an Tag 1 nach intraartikulärer Injektion von SEA war CD4+. An den weiteren Untersuchungszeitpunkten stieg die Zahl CD4+ T-Lymphozyten leicht an und erreicht fast 5 % an Tag 10 nach SEA-Injektion.

CD8: CD8+ T-Lymphozyten dominierten das Entzündungsbild zu allen drei Untersuchungszeitpunkten. Mehr als 30 % aller untersuchten Zellpopulationen waren an Tag 1 nach intraartikulärer Injektion von SEA CD8+. Das Maximum der gezählten CD8+ T-Lymphozyten lag an Tag 5, dem Zeitpunkt der maximalen Entzündungsaktivität im Bereich des rechten injizierten Kniegelenks und fiel an Tag 10 deutlich ab. Während an Tag 1 und 5 nach Injektion von SEA die Zahl der MHC-II+ Zellen niedriger als die Zahl CD8+ T-Lymphozyten war, überwog die Zahl MHC-II +Zellen an Tag 10 nach Injektion von SEA im Vergleich zu CD8+ T-Zellen. Die Zahl MHC-I+ Zellen war zu allen Untersuchungszeitpunkten höher als die Anzahl CD8+ T-Lymphozyten.

MHC-I: Der Hauptteil der untersuchten Zellen war MHC-I + an allen drei Untersuchungszeitpunkten. Im zeitlichen Verlauf fiel der Anteil der MHC-I-Population an der Gesamtzellpopulation von > 57 % an Tag 1 auf > 35 % an Tag 10 nach intraartikulärer Injektion von SEA.

MHC-II: Der Anteil der MHC-II-Population stieg über die drei Untersuchungszeitpunkte bis Tag 10 kontinuierlich an und lag am dritten Untersuchungszeitpunkt über der Zahl CD8+ T-Lymphozyten, Der Anteil MHC-II+ -Zellen war an allen drei Zeitpunkten über der Anzahl CD3+, bzw. CD4+ T-Lymphozyten, aber geringer als die Zahl CD8+ T-Lymphozyten.

Pax-5 und CD138: Zu allen Untersuchungszeitpunkten fanden sich im Vergleich zu den übrigen untersuchten Zellpopulationen nur eine geringe Anzahl Pax-5 und CD138+ - Zellen, deren Anteile über die drei Messpunkte gesehen leicht anstieg. (Tag eins 0,4 %, Tag fünf 1,2 %, Tag zehn 6,5 %)

3.4 Beurteilung der Zellpopulationen im zeitlichen Verlauf an den drei Untersuchungszeitpunkten Tag 1, 5 und 10 nach intraartikulärer Injektion von NaCl 0.9%

Die Entzündungsaktivität im Bereich der NaCl-Gruppe des rechten Kniegelenkes war zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant ($p < 0,05$; Man-Whitney-U) geringer ausgeprägt als im Bereich des rechten injizierten Gelenkes.

CD3: Der Anteil von CD3+ Zellen an der Gesamtpopulation betrug an Tag 1 5% und fiel an Tag 5 auf 4%, sowie an Tag 10 auf 3%. Die Anzahl der CD3+ T-Lymphozyten lag an allen Untersuchungszeitpunkten über der Anzahl von CD8 + T-Lymphozyten, wohingegen sie nur an den Untersuchungszeitpunkten eins und fünf über der Anzahl der CD4+ - T-Lymphozyten lagen.

CD4: Der Anteil von CD4+ Zellen der Gesamtpopulation betrug an Tag eins $<1\%$ und stieg im Verlauf der Messzeitpunkt kontinuierlich auf 3% an Tag 10. Ihr Anteil war an allen Messzeitpunkten höher als die der CD8+ - T-Lymphozyten und geringer als die der MHC-II+ Zellen.

CD8: Der Anteil an der Gesamtpopulation der CD8+ Zellen betrug während des gesamten Untersuchungszeitpunkt weniger als ein $< 1\%$. Ihr Anteil war an allen Zeitpunkten geringer als CD3+ und CD4 + T-Lymphozyten.

MHC-I: Der Hauptteil der untersuchten Zellen war MHC-I+ an allen drei Untersuchungszeitpunkten. Ihr Anteil blieb im Verlauf nahezu konstant. (80% an Tag 1, deren Anteil stieg an Tag 5 auf 81% um an 10 Tag auf 77% zu fallen)

MHC-II: Der Anteil MHC-II+ Zellen betrug an Tag 1 13% und blieb an den Tagen 5 und 10 bei 12% und war somit die zweitstärkste Zellpopulation. Auch ihr Anteil blieb über den Untersuchungszeitpunkten nahezu konstant.

Pax-5 und CD138: Zu allen Untersuchungszeitpunkten fanden sich im Vergleich zu den übrigen untersuchten Zellpopulationen nur eine geringe Anzahl Pax-5 und CD138+ B-Lymphozyten

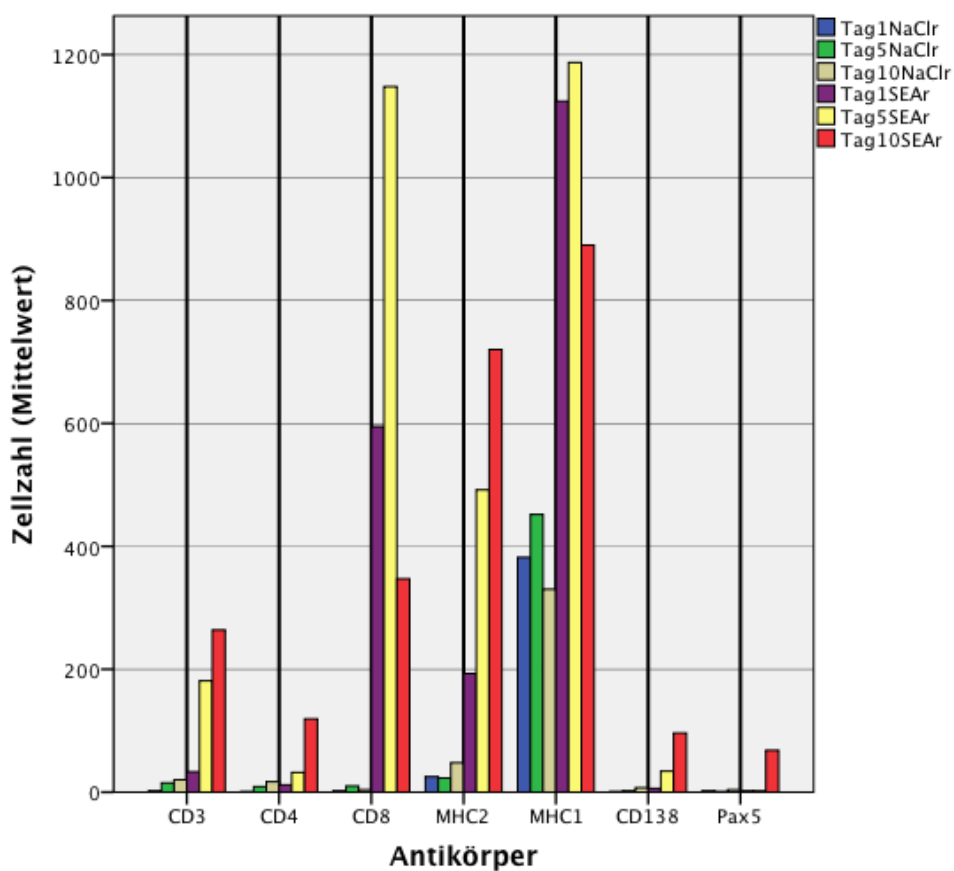


Abbildung 12: Synoviale Zellpopulation im Bereich des mit SEA injizierten rechten Kniegelenkes (SEAr) und der Kontrollgruppe (NaCl) des rechten Kniegelenkes (NaClr). Dargestellt ist die Zellzahl (Mittelwert aus den Absolutzahlen der einzelnen Gewebspräparate zum dargestellten Zeitpunkt an Tag 1, 5 und 10) der einzelnen Antikörper. Die Zahlen beziehen sich auf eine Fläche von 300.000 μm^2 (Summe aus 6 x 50.000 μm^2)

CD-3-Antigen

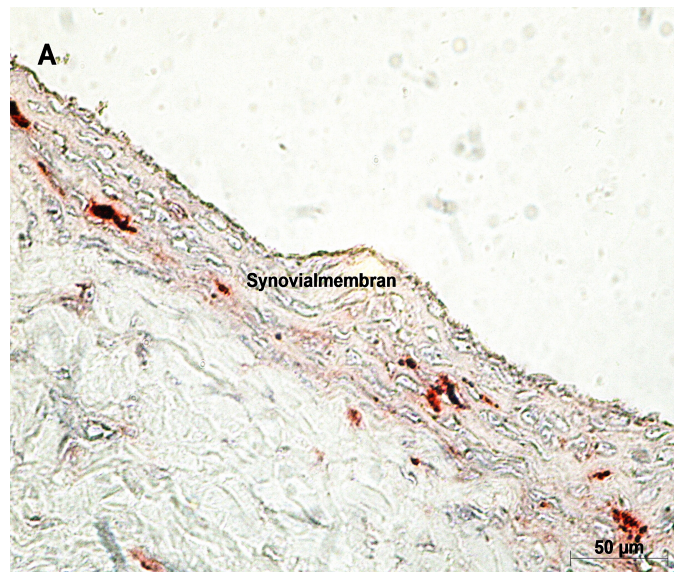


Abb. 13 : Immunohistochemische Färbungen. Verwendet wurde der Antikörper gegen das CD3-Antigen. (braune Färbung der Immunzellen) Dargestellt ist Tag 10 nach intraartikulärer Injektion des SEA. Rechtes Kniegelenk. Oberer Recessus.

CD4-Antigen

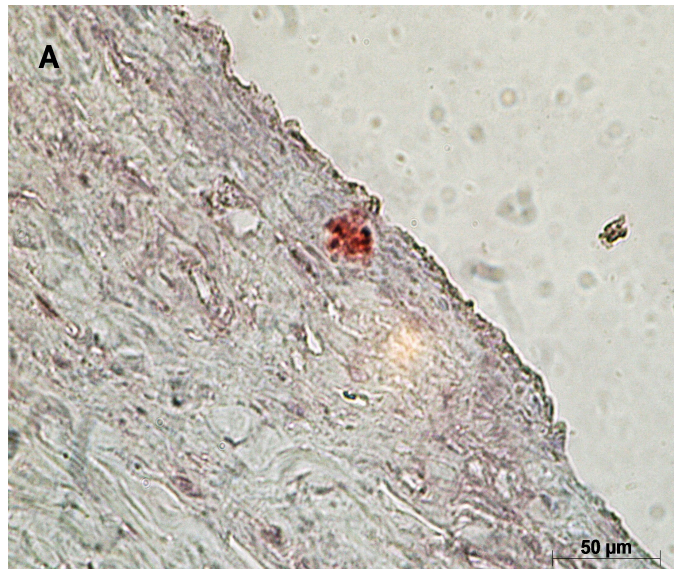


Abb. 14: Immunohistochemische Färbungen. Verwendet wurde der Antikörper gegen das CD4-Antigen. (braune Färbung der Immunzellen) Dargestellt ist Tag 10 nach intraartikulärer Injektion des SEA. Rechtes Kniegelenk. Oberer Recessus.

CD8-Antigen

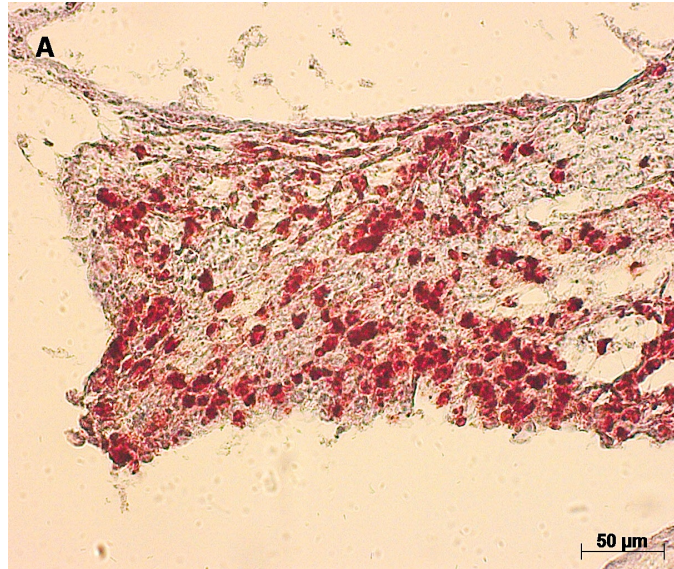


Abb. 15: Immunohistochemische Färbungen. Verwendet wurde der Antikörper gegen das CD8-Antigen. (braune Färbung der Immunzellen) Dargestellt ist Tag 10 nach intraartikulärer Injektion des SEA. Rechtes Kniegelenk. Oberer Recessus.

MHC-II-Antigen



Abb. 16: Immunohistochemische Färbungen. Verwendet wurde der Antikörper gegen das MHC-II-Antigen. (braune Färbung der MHC-II-tragenden Zellen) Dargestellt ist Tag 10 nach intraartikulärer Injektion des SEA. Rechtes Kniegelenk. Oberer Recessus.

MHC-I-Antigen

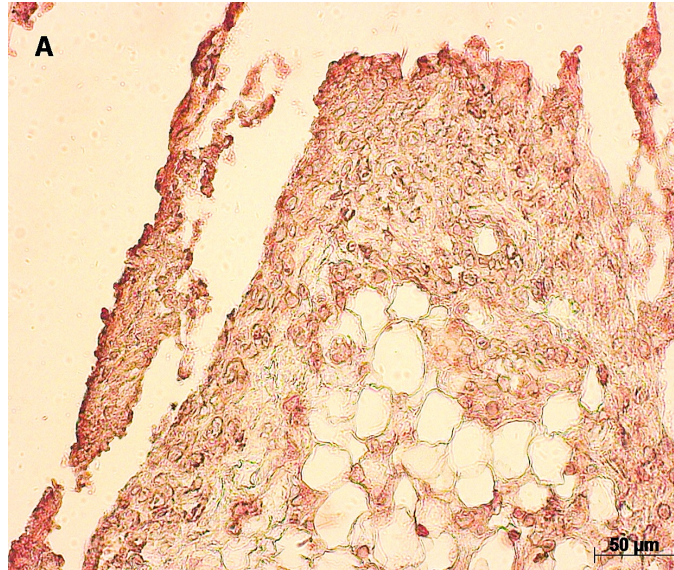


Abb. 17: Immunohistochemische Färbungen. Verwendet wurde der Antikörper gegen das MHC-I-Antigen. (braune Färbung der MHC-I-tragenden Zellen) Dargestellt ist Tag 10 nach intraartikulärer Injektion des SEA. Rechtes Kniegelenk. Oberer Recessus.

CD138 und Pax-5-Antigen

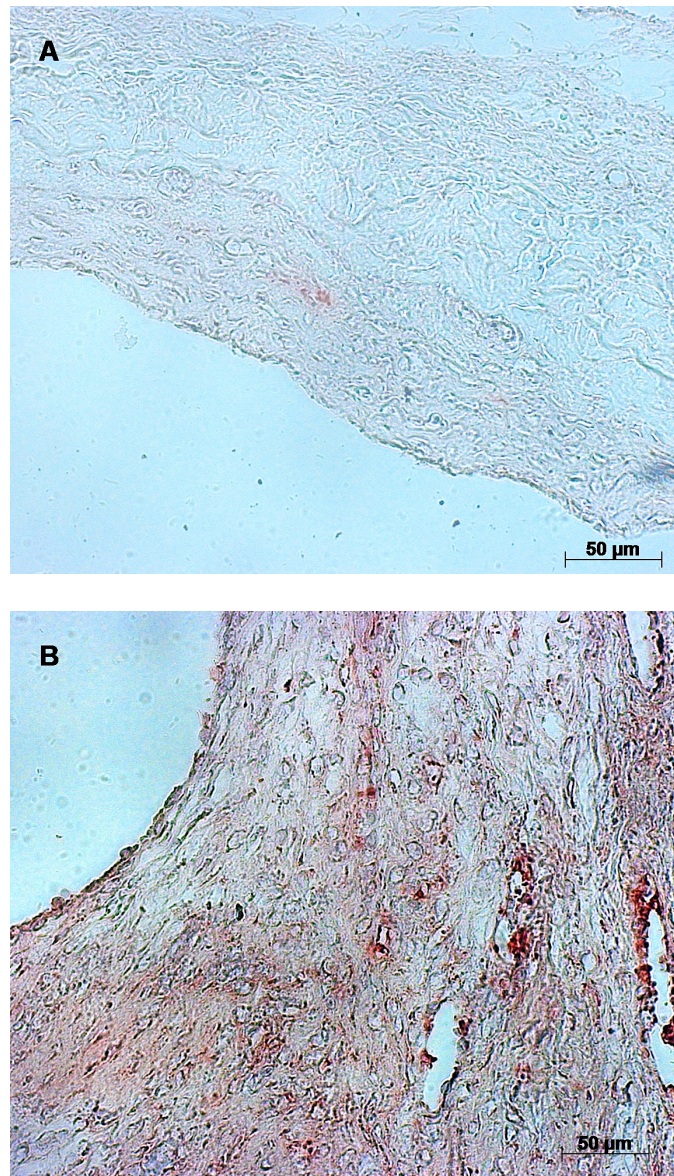


Abb. 18: Immunhistochemische Färbungen. Verwendet wurde der Antikörper gegen das CD138- und Pax-5-Antigen. (braune Färbung der Immunzellen) A) Pax-5 und B) CD138 Tag 5 nach intraartikulärer Injektion des SEA. Rechtes Kniegelenk. Oberer Recessus.

3.5 Auswertung der Wärmebildkameraaufnahmen

Im Verlauf der drei Messzeitpunkte (Tag 1, Tag 5 Tag 10) kam es zu keiner signifikanten Temperaturänderung ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis-Test). Im Vergleich zur nicht injizierten linken Gegenseite fand sich kein signifikanter Temperaturunterschied. ($p > 0,05$; Wilcoxon-Test) Die durchschnittliche Temperatur an allen drei Meßzeitpunkten rechts betrug $35,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, links $35,2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

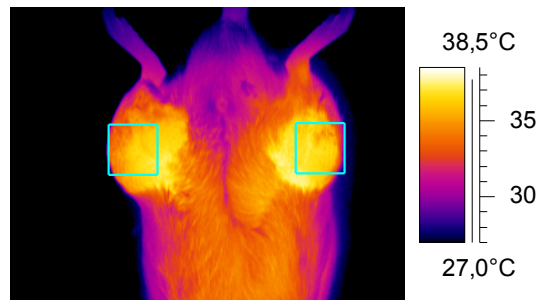


Abbildung 19: Darstellung der Temperatur der Hautoberfläche beider Hinterläufe von ventral mit der Wärmebildkamera nach intraartikulärer SEA Injektion

4 Diskussion

Die intraartikuläre Injektion des SAG Staphylokokkenterotoxin A (SEA) in das Kniegelenk der Lewis-Ratte verursacht eine ausgeprägte lokale Entzündung. Das histologische Bild ist geprägt durch Rundzellinfiltrate und eine Hyperplasie der Synovialmembran. Im Verlauf fanden sich auch Zeichen von Neovaskularisationen und mukoide Auflockerungen im Bereich des Entzündungsgewebes entsprechend kleiner fibrinoider Nekrosen (Abb. 8 B und C). Bei den mit NaCl 0.9% behandelten Tieren war im Gelenk keine nennenswerte Entzündungsreaktion zu beobachten. Nachfolgend werden mögliche Aspekte der Pathogenese der Superantigen-induzierten Arthritis (SAG-Arthritis) diskutiert. Die Befunde der SAG-Arthritis werden ferner mit der rheumatoiden- und der juvenilen idiopathischen Arthritis verglichen. Weiterhin werden die dargestellten Ergebnisse mit dem gängigsten Tiermodell, der Kollagen-II-Arthritis, als Modell der rheumatoiden Arthritis verglichen.

4.1 Pathophysiologie der Superantigenarthritis

Es wurde gezeigt, dass das SAG Staphylokokken Enterotoxin E (SEE) mit MHC-II-Molekülen auf synovialen Fibroblasten interagiert (Kraft et al., 1998). In ähnlicher Weise bindet SEA ebenfalls an MHC-II (Gross et al., 2006). Dabei bestehen vier mögliche Varianten der Interaktion. Einerseits besteht die Möglichkeit der Interaktion an der α -Kette des MHC-II-Moleküls außerhalb der Peptidbindungsfurche (Peptid-unabhängig) und andererseits mit Überragen der Peptidbindungsfurche (Peptid-abhängig). Weiterhin wird eine Zink-vermittelte Interaktion an der β -Kette mit Überragen der Peptidbindungsfurche (Peptid-abhängig) beschrieben. Die vierte Möglichkeit besteht in einer Kombination von der ersten und zweiten Variante mit Quervernetzung von MHC-II-Molekülen (Fraser and Proft, 2008), die zugleich die effektivste Art darstellt, die Wirkung des SEA zu entfalten. Es wird angenommen, dass diese unterschiedlichen Bindungsmöglichkeiten die Wirkungen der SAG beeinflussen.

Tatsächlich haben SAG dabei vermutlich nicht nur eine Wirkung auf die Zielzellen der Antigenpräsentation (T-Lymphozyten) sondern können evtl. auch eine Wirkung auf die Antigen-präsentierenden Zellen (APC) entfalten. So resultiert ebenfalls eine Aktivierung der MHC-II-Molekül-tragenden Zellen nach Bindung des SEA am MHC-II-Molekül durch Hochregulation von kostimulatorischen Signalen (Tiedemann and Fraser, 1996). Diese

kostimulatorischen Signale wirken dabei zusätzlich zur T-Lymphozyten-Aktivierung über direkten Zell-Zell-Kontakt mit APC (Tiedemann and Fraser, 1996). Eine weitere Folge der Aktivierung ist die vermehrte Expression von MHC-II-Molekülen auf der APC selbst (Macphail, 1999), die zu einer weiteren Aktivierung von APCs beitragen kann.

In der Synovialmembran (SM) des Gelenkes fungieren Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen und synoviale Fibrozyten als APC (Kinne et al., 2007; Kraft et al., 1998; Yamamura et al., 2001). Hierbei finden sich intimal zwei unterschiedliche Zellpopulationen: Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten oder Typ B Synoviozyten und Makrophagen-ähnliche Synoviozyten oder Typ A Synoviozyten. Die Intima steht in direktem Kontakt zur Synovia und besteht in der Regel aus einer 2 bis 3-lagigen Zellschicht aus Typ B Synoviozyten und Typ A Synoviozyten. Typ A Synoviozyten exprimieren MHC-II-Moleküle, wohingegen Typ B Synoviozyten nur in geringem Maß MHC-II Moleküle konstitutionell exprimieren. Letztere werden erst im Rahmen einer Aktivierung heraufreguliert, um schließlich als echte APC fungieren zu können (Leech and Morand, 2013). Die Bindung des SEA am MHC-II-Molekül führt zur Aktivierung von Synoviozyten (Yamamura et al., 2001). Dabei wird vermutlich der Erstkontakt mit dem injizierten SEA durch Typ A Synoviozyten hergestellt. Diese Makrophagen-ähnlichen Synoviozyten (Typ A) sind in der Lage, nach Bindung eines SEA Moleküls T-Lymphozyten zu aktivieren (Yamamura et al., 2001). Dies führt zur Migration von T-Lymphozyten aus der Blutbahn in das Gelenk. Diese migrierten Lymphozyten sezernieren proinflammatorische Zytokine und unterstützen eine Entzündungsreaktion im Gelenk sowie eine Hyperplasie der Synovialmembran. Des Weiteren aktivieren Typ A Synoviozyten Typ B Synoviozyten durch die Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α und IL-1 (Neumann et al., 2010). Weiterhin ist eine Aktivierung durch Zell-Zell-Kontakt zwischen beiden Synoviozytenpopulationen über CD14 möglich (Kinne et al., 2007). Diese kann zu einer verstärkten Expression von MHC-II-Molekülen beitragen (Kinne et al., 2007).

Die ausgeschütteten proinflammatorischen Zytokine, insbesondere TNF- α führen zu einer autokrinen Stimulation der Typ B Synoviozyten (Kinne et al., 2007), zum anderen unterstützen sie die Entzündung, indem sie die Angiogenese fördern, Leukozyten und Lymphozyten rekrutieren, Synoviozyten-Proliferation unterstützen und schließlich Proteasen ausschütten, die eine zunehmende Gelenkzerstörung initiieren (Abeles and Pillinger, 2006). Diese große Menge freigesetzter Zytokine wie etwa TNF- α und IL-1 trägt hierbei zur Entwicklung und Aufrechterhaltung der Inflammation bei. Eine weitere, direkte, Aktivierung kann durch Toll-Like-Rezeptoren (TLR) auf den Synoviozyten

erfolgen (Leech and Morand, 2013). TLR sind Teil des angeborenen Immunsystems und erkennen molekulare Muster auf verschiedenen Pathogenen und leiten eine Immunantwort ein. (Luft, 2012). SAG wie SEA können via MHC-II-Moleküle die Hochregulation von TLR induzieren und darüber die proinflammatorische Antwort verstärken (Hopkins et al., 2005), weiterhin werden TLR allein durch proinflammatorische Moleküle wie IL-1 und TNF- α auf Fibroblasten-ähnlichen-Synoviozyten (Typ B) exprimiert (Mor et al., 2005). Ebenfalls sind TLR in der Angiogenese involviert. Es konnte gezeigt werden, dass TLR-2 Aktivierung die Expression von VEGF und IL-8, beides potente angiogene Faktoren, erhöht (Cho et al., 2007). Neben der Hochregulation via TLR, wird VEGF insbesondere nach Aktivierung der Fibroblasten-ähnlichen-Synoviozyten (Typ B) exprimiert (Szekanecz et al., 2010). Weiterhin interagieren SAG nach Bindung an das MHC-II-Molekül simultan mit dem TCR, oder treten direkt mit ihm in Kontakt, indem sie primär an der variablen Region der β -Kette (V β -Region) binden. Dabei ist die Bindung der SAG an den V β -Regionen spezifisch für die einzelnen SAG und führt zur oligoklonalen Aktivierung des T-Zell-Repertoires (Fraser and Proft, 2008). So lassen sich für die unterschiedlichen SAG verschiedene TCR V- β Profile erstellen (Li et al., 1999). Die Aktivierung bestimmter T-Lymphozyten-Subpopulationen führt dann zur Initiierung einer Entzündungsreaktion. In diesem Rahmen kommt es u.a über die Freisetzung von Zytokinen zur "Bystander"-Migration und Akkumulation weiterer Entzündungszellen in der Synovialmembran. Diese unterstützen und fördern ihrerseits durch Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-6 und IFN- γ eine zunehmende Entzündung (Abb. 21).

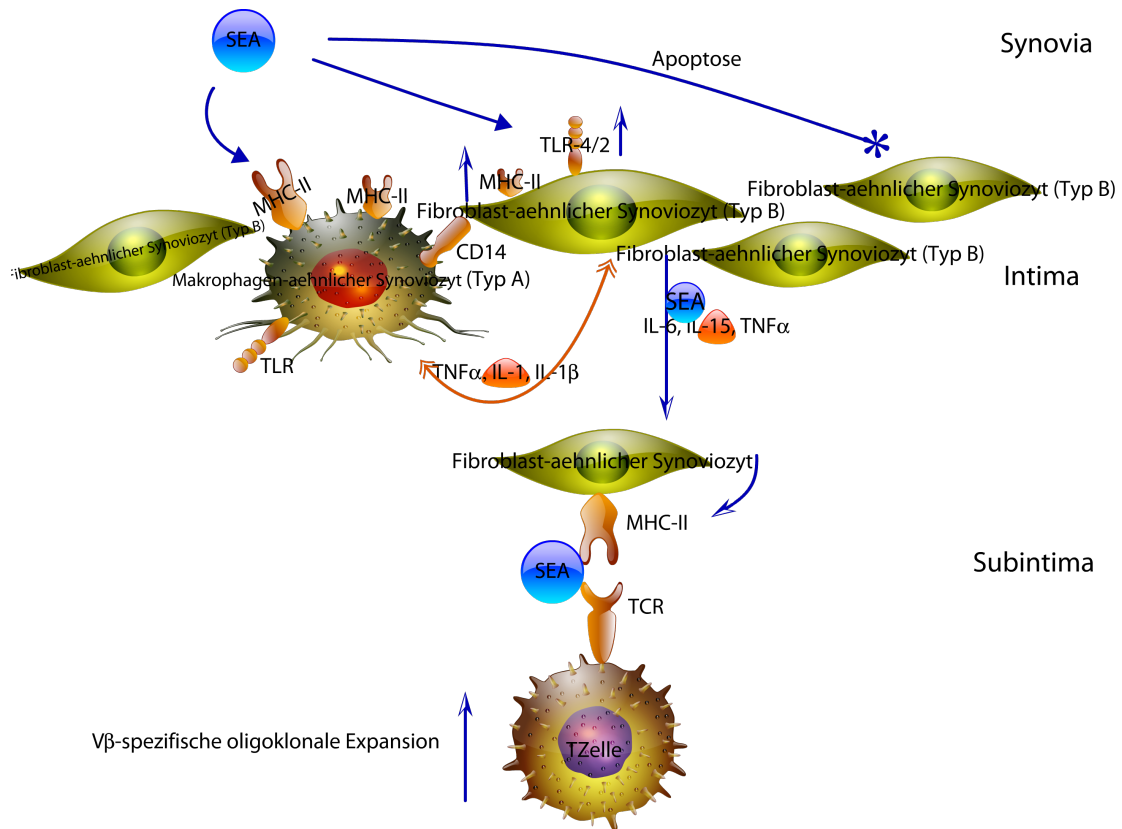


Abb. 20. SEA interagiert mit den MHC-II-Molekülen auf den Typ A Synoviozyten, hierbei kommt es über Sezernierung von TNF- α und IL-1 zur Aktivierung von Typ B Synoviozyten. Denkbar ist ebenfalls eine direkte Aktivierung über Toll-Like-Rezeptoren (TLR). Darüber hinaus kommt es zur Etablierung eines proinflammatorischen Milieus, was zur autokrinen Stimulierung von Typ A und B Synoviozyten führt und weiterhin über MHC-II/TCR zur oligoklonalen Expansion von V β -spezifischen T-Zellen. Denkbar ist weiterhin eine Apoptose-induzierende Wirkung des SEA.

Die einmal etablierte Entzündung wird dabei nicht nur durch die Einwanderung inflammatorischer Zellen aufrecht erhalten sondern auch durch die Aktivierung Fibroblasten-ähnlicher-Synoviozyten (Typ B). Dabei sorgen einmal aktivierte Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten (Typ B) für das Überleben der inflammatorischen Zellen durch Freisetzung weiterer Zytokine (Smith et al., 1997). Die aktivierten Synoviozyten können über CD14 direkt mit Makrophagen interagieren und die Inflammation weiter unterstützen (Bombara et al., 1993; Chomarat et al., 1995). Weitere Zytokine wie IL-6, IL-7, IL-8 und IL-15 werden ebenfalls von aktivierten Synoviozyten freigesetzt und unterstützen die Aktivierung von inflammatorischen Zellen (Buckley et al., 2001). Dabei spielt IL-6 eine besondere Rolle, da es die Antigen-unabhängige Inflammation unterstützt (Baumann and Kushner, 1998). Ebenfalls wird der stroma cell derived factor (SDF) von aktivierten Synoviozyten freigesetzt, dieser SDF hemmt

zusätzlich die Apoptose bei T-Lymphozyten (Nanki et al., 2000). Es konnte hierbei gezeigt werden, dass aktivierte Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten (Typ B) die Apoptose von inflammatorischen Zellen verhindern (Salmon et al., 1997). Dies wird durch direkten Zell-Zell Kontakt vermittelt (Salmon et al., 1997). Diese Inflammation kann schließlich sowohl durch Akkumulation der inflammatorischen Zellen als auch durch die Proliferation ansässiger synovialer Fibrozyten zur Hyperplasie der Synovialmembran führen. Eine solche im Zeitverlauf zunehmende Hyperplasie ist im Rahmen der vorliegenden Untersuchung tatsächlich beobachtet worden (Abb. 9). Synoviale Fibrozyten können ebenfalls von pro-apoptotischen Peptiden über TLR aktiviert werden und dann wiederum proinflammatorische Zytokine ausschütten. Es ist bekannt, dass SAG die Expression von TLR induzieren können (Hopkins et al., 2005).

Neben der Aktivierung von MHC-II-exprimierenden Zellen und oligoklonaler Aktivierung von V- β -spezifischen T-Zellen, können SAG auch zytotoxisch wirken, in dem sie Apoptose induzieren (Dohlsten et al., 1991). Dabei handelt es sich nicht um eine direkte zytotoxische Wirkung sondern höchstwahrscheinlich eine über T-Zellen-vermittelte Apoptose. Es konnte bereits eine Zytotoxizität an mit SEB behandelten Synoviozyten nachgewiesen werden. Diese Zytotoxizität ist von CD4+ T-Zellen unterstützt gewesen (Kawakami et al., 1998). Weiterhin konnte an Hepatozyten nachgewiesen werden, dass das SAG SEA Apoptose über Fas-Ligand vermittelt (Klintman et al., 2004). Betrachtet man die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse, so fanden sich zwar mukoiden Auflockerungen im Bereich des Entzündungsgewebe entsprechend kleiner fibrinoider Nekrosen, die indirekt auf eine Apoptose-induzierende Wirkung des SEA hinweisen könnten, jedoch nicht aussagekräftig genug sind, um auf eine direkte Zytotoxizität des SAG SEA zu schließen. Darüber hinaus ist es ebenfalls möglich, dass die beobachteten nekrotischen Veränderungen Ursache einer Makrophagen vermittelten Apoptose über TNF- α und FasL oder durch die zytotoxische Wirkung der V β -spezifischen CD8+ T-Zellen ist (Nakajima et al., 1995). Im Verlauf kommt es zu einer Hochregulation der MHC-II-Moleküle (s. o.), das zum Beispiel durch den Anstieg von Typ A Makrophagen-ähnlichen Synoviozyten bedingt sein könnte. Weiterhin exprimieren aktivierte T-Lymphozyten MHC-II-Moleküle (Abdulkadir and Ono, 1995). Darüber hinaus können durch die etablierte Entzündung andere professionelle Antigen-präsentierende Zellen angelockt werden und zu diesem Anstieg beitragen. Wir gehen davon aus, dass die zunehmende und deutlich ausgeprägte Hyperplasie der SM am ehesten durch Aktivierung der Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (Typ B) durch das intraartikulär applizierte SAg zum einen als auch durch die Migration von aktivierten T-Lymphozyten und anderen Immunzellen zum anderen bedingt ist.

Den Typ A Makrophagen-ähnlichen Synoviozyten kommt als APC evtl. eine Schlüsselstellung zu. Sie haben als erste ortsständige Zellen Kontakt mit dem SAg (SEA) und können über die Freisetzung von Zytokinen die Entzündung aktivieren und aufrechterhalten. Weiterhin aktivieren sie Typ B Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten (Bartok and Firestein, 2010). Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse lassen vermuten, dass aktivierte Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten (Typ B) im Verlauf der SEA-Arthritis als APC fungieren könnten und als solche das SAg (SEA) binden und es T-Zellen präsentieren. Diese Einschätzung stützt sich auf eine deutlich zunehmende Hyperplasie der Synovialmembran, die nicht nur durch die Migration von Rundzellen bedingt ist, sondern vornehmlich durch die Proliferation von aktivierten Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (Typ B), die ihrerseits durch Typ A Makrophagen-ähnliche Synoviozyten aktiviert wurden (Abb. 8 und 9). Dabei unterstützen aktivierte Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten (Typ B) das Einwandern von CD8⁺ T-Lymphozyten, die zuvor mutmaßlich V β -spezifisch aktiviert wurden (s.u.). Diese Annahme wird insofern unterstützt, dass bereits in früheren Studien gezeigt werden konnte, dass aktivierte synoviale Fibrozyten (Typ B) eine APC-Funktion für das SAg SEB zeigten (Origuchi et al., 1995).

Im Rahmen der SEA-Arthritis dominieren CD8⁺ T-Lymphozyten die Entzündung. SAg können T-Lymphozyten über die V β -Untereinheit des TCR $\alpha\beta$ aktivieren, und zwar unabhängig von dem CD4- oder CD8-Molekül. Determinierend ist die V β -Untereinheit (Omoe et al., 2010). So ist denkbar, dass das injizierte SAg (SEA) über die Bindung spezifischer V β -Untereinheiten der T-Lymphozyten hauptsächlich CD8⁺ T-Lymphozyten aktiviert (Taylor et al., 2012). Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung von CD8⁺ T-Lymphozyten wäre über $\gamma\delta$ T-Lymphozyten möglich. Diese Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der adaptiven Immunantwort. Ihre Anzahl steigt bei Infektionen mit Bakterien im peripheren Blut deutlich an (Brandes et al., 2009). Sie exprimieren einen besonderen T-Zell-Rezeptor, den V γ 2V δ 2 T-Zell Rezeptor und erkennen damit speziell Isopentylpyrophosphate und verwandte Prenylpyrophosphat-Komponenten, sowie Alkylamin-Komponenten. Diese Strukturen werden bei der Biosynthese wesentlicher Strukturen an Bakterien benötigt (Izcue et al., 2001). Diese Bestandteile werden dann unabhängig von MHC-I/II vom T-Zell Rezeptor erkannt und aktivieren $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten (Brandes et al., 2009). Nach Aktivierung verwandeln sich $\delta\gamma$ -T-Lymphozyten in professionelle APC und sind in der Lage, über den konventionellen MHC-I-Weg native CD8⁺ T-Lymphozyten zu aktivieren. Diese Zellen können über die V- δ 2 Domäne des TCR (sie ist identisch zur V β -Domäne) von SEA aktiviert werden (Morita et al., 2001). Wir haben $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten nicht untersucht. Dennoch wäre es denkbar, dass ein Teil der

CD8+T-Lymphozyten über diesen Weg indirekt aktiviert werden könnten. Wir gehen jedoch in unserem Modell davon aus, dass vorwiegend CD8+ T-Lymphozyten über MHC-II-Moleküle oder direkten Kontakt mit dem SEA aktiviert worden sind (Abb. 12; Taylor et al., 2012). Nach Bindung eines trimolekularen Komplexes aus MHC-II-TCR- und SEA bzw. einer direkten Interaktion zwischen SEA und TCR kommt es zu einer lokalen T-Zell-Aktivierung, primär insbesondere von CD8+ T-Lymphozyten und Migration weiterer T-Zellen und Initiierung einer Entzündung.

CD8+ T-Lymphozyten besitzen zytotoxische sowie immunsuppressive Wirkungsweisen. In ihrer Eigenschaft als zytotoxische Zellen können sie durch die Freisetzung von Granzyme A/B und Perforin Zellen lysieren. Weiterhin können sie die Apoptose über Fas-Liganden induzieren (Wong and Pamer, 2003). Somit ist vorstellbar, dass sie durch ihre Aktivierung zytotoxisch auf die synovialen Fibrozyten gewirkt haben und die am Tag 10 vermehrt aufgetretenen fibrinoide Nekrosen erklären. Primär gehen wir jedoch davon aus, dass die SAg-Wirkung eine Aktivierung der Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (Typ B) in unserem Modell darstellt, da die Proliferation der Synovialmembran im Gegensatz der zu beobachteten Apoptose überwiegt. Weiterhin haben CD8+ T-Lymphozyten das Potential über die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-17 und TNF- α die Entzündung fortlaufend zu unterstützen. Daneben besitzen sie die Eigenschaft immunsuppressiv zu wirken. Regulative CD8+ T-Lymphozyten (CD8+Tregs) sind durch die Expression von CD25 und des Transkriptionsfaktors FoxP3 gekennzeichnet (Mahic et al., 2008). Es ist beschrieben worden, dass die Ausbildung von CD8+Tregs, Teil einer normalen, angeborenen Immunantwort ist und sie parallel zur Expression von zytotoxischen Molekülen entstehen (Mahic et al., 2008). Sie entfalten ihren suppressiven Effekt kontaktabhängig und auch über sezernierte immunsuppressive Moleküle wie IL-10 und TNF- β (Mahic et al., 2008). Es ist bekannt, dass diese Untergruppe der CD8+ T-Zellen ebenfalls von SAG aktiviert werden kann (Mahic et al., 2008; Taylor et al., 2012) Weiterhin konnte in *in vitro* durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden, dass diese durch SEB induzierten CD8+ Tregs suppressiv auf die Zytokinproduktion und Proliferation von CD4+ T-Zellen wirkten (Mahic et al., 2008). Weiterhin behielten sie die Charakteristika von zytotoxischen Zellen mit Ausbildung der intrazellulären Moleküle wie Granzyme A /B bei, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese CD8+Tregs zytotoxische Eigenschaften besitzen (Mahic et al., 2008). Darüber hinaus konnten Taylor et al. zeigen, dass die Immunsuppression kontaktabhängig ist sowie die Anwesenheit von MHC-II+ Zellen erfordert (Taylor et al., 2012). Aufgrund der oben aufgeführten Eigenschaften, stehen CD8+ Tregs im Verdacht in der Initialphase der rheumatoiden Arthritis eine Rolle zu spielen, indem sie eine geringer ausgeprägte oder veränderte immunsuppressive

Wirkung zeigen (Costantino et al., 2008). Obwohl eine Differenzierung der CD8+ T-Lymphozyten in der vorgelegten Untersuchung nicht vorgenommen worden ist, erscheint es denkbar, dass verschiedene Untergruppen der CD8+ T-Lymphozyten durch das SAg SEA aktiviert worden sind. So ist zum einen die direkte Aktivierung in V β spezifischer Weise hauptverantwortlich für das Einwandern von CD8+ T-Lymphozyten. Dennoch besteht auch die Möglichkeit der indirekten Aktivierung von CD8+ T-Lymphozyten über den Weg der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten, die nach ihrer Aktivierung als professionelle APCs fungieren und über MHC-I spezifische Weise CD8+ T-Lymphozyten aktivieren. Neben rein zytotoxischen CD8+ T-Lymphozyten muss der Aspekt der Aktivierung von suppressiven CD8+ T-Lymphozyten berücksichtigt werden. Prinzipiell besteht die Möglichkeit ihrer Aktivierung mit dem möglichen Effekt, die eigentliche Wirkung des SEA zu unterdrücken und eine überschießende Reaktion des Immunsystems zu verhindern.

In der vorliegenden Untersuchung war der Anteil der CD3+ T-Lymphozyten zu jedem Zeitpunkt der Untersuchungen geringer als der Anteil der CD4+ - bzw. CD8+ T-Lymphozyten. CD3 ist Bestandteil des TCR und kann auf allen ruhenden reifen T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Während der unterschiedlichen Phasen der Aktivierung der T-Lymphozyten wird CD3 unterschiedlich stark exprimiert; insbesondere im Frühstadium der Aktivierung durch Mitogene ist CD3 nur gering nachweisbar (Cush and Lipsky, 1988; Matsui, 1987). Da SEA als sehr starkes Mitogen gilt und zu einer Aktivierung der T-Lymphozyten führt, ist es durchaus denkbar, dass aufgrund dieser Wirkung des SAG SEA, CD3 nur gering nachweisbar ist. Darüberhinaus ist beschrieben worden, dass es zur Herunterregulation des TCR/SAG-Komplexes auf T-Lymphozyten kommt. Es ist ferner denkbar, dass durch diesen Effekt die zytotoxischen Eigenschaften des SEA abgemildert werden können (Damle et al., 1993). Ebenfalls zeigten in vitro Experimente, dass SAG V β -spezifisch zur Herunterregulation des TCR/CD3 Komplexes führen. Dieser Mechanismus war dosis- und temperaturabhängig (Makida et al., 1996). Weiterhin wird vermutet, dass die Internalisation und das Recycling des TCR durch SAG beeinflusst werden kann. SAG führen zu einer erhöhten Herunterregulation des TCR-CD3 Komplexes (von Essen et al., 2004). Dabei konnte eine erhöhte Menge an TCR-CD3 in intrazellulären Vesikeln beobachtet werden (von Essen et al., 2004). SAG erhöhen die Effizienz der Internalisation (von Essen et al., 2004). Ebenfalls wurde das Recycling des TCR beeinflusst, einmal internalisierte TCR-CD3 Komponenten trugen nicht wieder zur Wiederherstellung eines TCR-CD3 Komplexes auf der Zelloberfläche bei (von Essen et al., 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass SAG direkt an den TCR-CD3 ohne Anwesenheit von MHC-II+ Zellen binden und eine Aktivierung auslösen (von Essen et al., 2004). Darüber hinaus konnte anhand von SEB nachgewiesen werden, dass SEB eine TCR-

Herunterregulation durch Bindung an den TCR auslöst, jedoch die Bindung nicht stabil genug erscheint um das SEB selbst mit zu endozytieren (Niedergang et al., 1995). Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass ebenfalls das SAG SEA an einer Vielzahl von T-Lymphozyten eine TCR-CD3 Herunterregulation induzieren. Diese Herunterregulation, so kann vermutet werden, führt zur Anergie der betreffenden Zelle. Dabei ist nicht klar, ob diese Anergie reversibel ist (Fraser and Proft, 2008; Li et al., 1999).

Die Anzahl der CD3+ T-Lymphozyten stieg im Verlauf der SEA-Arthritis an (Abb. 12). Dies könnte ein Hinweis sein, dass die SAG-Wirkung abgeschwächt wurde. Weiter ist denkbar, dass die zuvor induzierte Anergie durch SAG reversibel ist und es zur normalen Expression von TCR-CD3 Komplexen auf der T-Zell Oberfläche kommt. Dies würde eine Erklärung dafür bieten, warum deren Anteil gegen Ende der Untersuchung wieder ansteigt. Alternativ könnten T-Zellen, die nicht SAG-Kontakt hatten, zunehmend rekrutiert werden.

Der Anteil an CD4+ T-Lymphozyten nahm im Verlauf der SEA-Arthritis stetig zu (Abb. 10). Ihr zunächst sehr geringer Anteil an Tag 1, kann über die V β -spezifische Wirkung des SAG erklärt werden, selektiv CD8+ T-Lymphozyten zu aktivieren (Papageorgiou and Acharya, 2000). Denkbar ist, dass erst nach Etablierung eines proinflammatorischen Milieus CD4+T-Lymphozyten in die Synovialmembran migrieren. Zusammen mit der V β -spezifischen Wirkung des SAG SEA kann dies zunächst die geringe Anzahl von CD4+T-Lymphozyten erklären. Das Ansteigen der CD4+ T-Lymphozyten, könnte auch einen rein regulativen Effekt haben. Neben CD8+ Tregs gibt es synchron mit der Ausprägung der spezifischen Oberflächenrezeptoren CD25 und FoxP3, CD4+ regulative T-Lymphozyten (Allan et al., 2008). Dabei ermöglicht es ihnen, über die Freisetzung von TGF β und IL-10 immunsuppressiv zu wirken (Li and Boussiotis, 2011). Weiterhin sezernieren sie Effektmoleküle wie IFN- γ und IL-17 (Li and Boussiotis, 2011). Denkbar wäre hierbei ein Versuch des Immunsystems, die zytotoxischen Effekte der CD8+ T-Lymphozyten einzugrenzen. Weiterhin ist bekannt, dass SAG zur Apoptose und Anergie im T-Zell Kompartiment führen. Das könnte evtl. zur geringen Anzahl von CD4+ T-Lymphozyten beitragen (Webb and Gascoigne, 1994). Demgegenüber liegt es allerdings nahe, dass die initial niedrige Anzahl CD4+ T-Lymphozyten dadurch bedingt ist, dass SEA vorwiegend CD8+ T-Zellen aktiviert und nicht CD4+T-Zellen (s.o.). Am ehesten als Folge der Freisetzung verschiedener Zytokine werden dann auch CD4+ T-Lymphozyten rekrutiert. Das spiegelt sich in einem Ansteigen der CD4+ T-Lymphozyten im Verlauf wieder. Der regulative Effekt der CD4+ T-Lymphozyten zeigt sich möglicherweise an Tag zehn der Untersuchung, da an diesem Tag die maximale Intensität der Entzündung bereits

überschritten ist (Abb. 12). Letztendlich bleibt aber offen, ob die Abnahme der Entzündungsaktivität an Tag zehn durch die regulative Wirkung der CD4⁺ T-Lymphozyten mitbedingt ist, oder ob das SAG zu diesem Zeitpunkt aus dem Gelenk eliminiert wurde und der Reiz, die Entzündung aufrecht zu erhalten fehlt.

Generell kann die Aktivierung von T-Zellen durch ein SAG auch zu einer Inaktivierung jener T-Zellen führen (s.o.). Dies kann bis zur klonalen Löschung dieser Zellen als Folge von Apoptose gehen (Li et al., 1999). Dagegen umgeht der chronische Reiz eines SAG in geringen Dosierungen die klonale Löschung und die dabei aktivierten Zellen gelangen zunächst in einen Status der Hyperreaktivität (Li et al., 1999). Ferner wäre es prinzipiell denkbar, dass die SEA Wirkung auf das untersuchte CD4⁺ T-Zellkompartiment auch eine klonale Löschung widerspiegeln könnte und deren Anstieg an Tag 10 zumindest, indirekt, ein Nachlassen der SEA Wirkung bedeuten würde. Im Gegensatz dazu zeigt das CD8⁺ T-Zellkompartiment eine deutliche Reaktion auf SEA. Ob diese einer Hyperreaktivität entspricht oder partiell auch mit einer Anergie der entsprechenden Zelle verbunden ist, kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Immerhin spricht z.B. die zunehmende Schichtdecke der Synovialmembran eher für eine Hyperreaktivität als für eine Anergie der stimulierten Zellen.

Sowohl Pax-5 als auch CD138 stellten die Zellpopulationen mit der geringsten nachgewiesenen Dichte dar. Sie stehen für das B-Zell Kompartiment. Im Verlauf und insgesamt an Tag 10 nach SEA-Injektion stieg deren Anteil kontinuierlich an (Abb. 12). Da in der verwendeten Studie ein T-Zell SAG verwendet wurde, ist anzunehmen, dass primär T- und nicht B-Lymphozyten durch SEA aktiviert worden sind. Der Anstieg der B-Zell Marker kann jedoch durch die aktivierten T-Lymphozyten in der Synovialmembran ermöglicht werden. Hierbei handelt es sich evtl. u.a. um CD4⁺ (Memory)T-Lymphozyten (Friedman et al., 1991). Sie sind auch in der Lage, über Hochregulation des Oberflächenliganden CD40 (CD154) B-Zellen zu stimulieren (Thomas et al., 1992). Der Anteil der CD138⁺ Zellen ist höher als der von Pax-5⁺ Zellen, so dass anzunehmen ist, dass es sich hierbei um aktivierte B-Zellen bzw. Plasmazellen handelt. Diese Beobachtung kann über den Anstieg der CD4⁺ T-Lymphozyten (s. oben) zusätzlich unterstützt werden. Die Hauptaufgabe von Plasmazellen ist die Produktion von Antikörpern (Shlomchik et al., 2001). Weiterhin gehören sie zu den effektivsten Antigen-präsentierenden Zellen (Shlomchik et al., 2001). Sie produzieren Zytokine wie IL-4 und IL-10, die das Überleben von anderen mononuklearen Zellen sichern (Finnegan et al., 2012). B-Zellen generieren und aktivieren chemotaktische Faktoren, die für die Leukozytenmigration verantwortlich sind, weiterhin bilden sie Granulationsgewebe und verlängern das immunologische

Gedächtnis (Silverman and Carson, 2003). Es ist durchaus möglich, dass das T-Zell SAG SEA via CD4+ (Memory)T-Lymphozyten B-Zellen und Plasmazellen zu aktivieren vermag. Das würde eventuell den Anstieg von CD138+ und Pax5+ Zellen an Tag 10 in der vorliegenden Arbeit erklären, da zu diesem Zeitpunkt auch die CD4+ T-Lymphozyten ansteigen.

Die Anzahl der MHC-I+Zellen ist bereits bei den Kontrolltieren relativ hoch. Dies entspricht der Tatsache, dass MHC-I konstitutiv auf nahezu allen Körperzellen exprimiert wird (Bouvier, 2003). Dementsprechend werden MHC-I-Moleküle auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten mit unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. Auf lymphoiden Zellen, Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen ist MHC-I stark vorhanden, wohingegen auf dem Epithel der Kornea, den exokrinen Zellen von Parotis und Pankreas, Neuronen und Trophoblasten MHC-I-Moleküle nicht konstitutionell exprimiert werden (Bouvier, 2003). Bei den mit SEA behandelten Tieren zeigt die Expression von MHC-I bereits an Tag 1 einen steilen Anstieg. An Tag 5 kommt es zu einer weiteren leichten Zunahme, an Tag 10 demgegenüber zu einer geringen Abnahme (Abb. 12). Der Anstieg der MHC-I+ Zellen kann durch die Einwanderung der aktivierten inflammatorischen Zellen erklärt werden, weiterhin durch die Aktivierung von Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (Typ B) und der damit verbundenen MHC-I-Hochregulation (Edwards, 2000). An Tag 10 fällt die Anzahl der MHC-I+ Zellen, dies kann zum einen durch die Zunahme von apoptotischen Zellen erklärt werden. Weiterhin sinkt auch die Zahl der T-Lymphozyten. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass SAG auch an MHC-I-Moleküle binden können (Chapes and Herpich, 1998).

Aufgrund der eindeutigen Veränderungen im Bereich des rechten, injizierten Gelenkes im Gegensatz zum rechten Kniegelenk der Kontrolltiere, sind die oben aufgeführten Veränderungen höchst wahrscheinlich auf die lokale Wirkung des SEA zurückzuführen, d.h. dass SEA nach Bindung an MHC-II-Moleküle bzw. an MHC-I-Moleküle (s.o.) in der Lage ist, T-Lymphozyten und hier besonders CD8+ T-Lymphozyten zu aktivieren. Im Rahmen der ablaufenden Entzündungskaskade werden pro- und antinflammatorische Zytokine freigesetzt, die zur Einwanderung weiterer Immunzellen führen (CD4+T-Lymphozyten, CD138+- und Pax5+-Zellen.) Während zu Beginn die proinflammatorische Wirkung überwiegt (Tag 1 und 5), kommt es im Verlauf zu einer abklingenden Entzündung (Tag 10). Hier stellt sich die Frage, ob die Abnahme der Entzündungsaktivität auf die Wirkung antinflammatorischer Zytokine zurück zu führen ist, oder ob die Wirkung des SEA nachlässt, indem es z.B. phagozytiert oder anderweitig aus dem Gelenk eliminiert wird. Es kann sein, dass durch Abwesenheit des SEA intraartikulär der Reiz fehlt, weitere

Entzündungszellen zu rekrutieren. Insgesamt ist auf Grund der vorliegenden Ergebnisse davon auszugehen, dass sich die Entzündung als Folge der SEA-Wirkung lokal abspielt, da bereits in der Umgebung der entzündeten Synovialmembran kaum eine Entzündung anzutreffen war, und da diese in mit Lösungsmittel injizierten Gelenken fehlt.

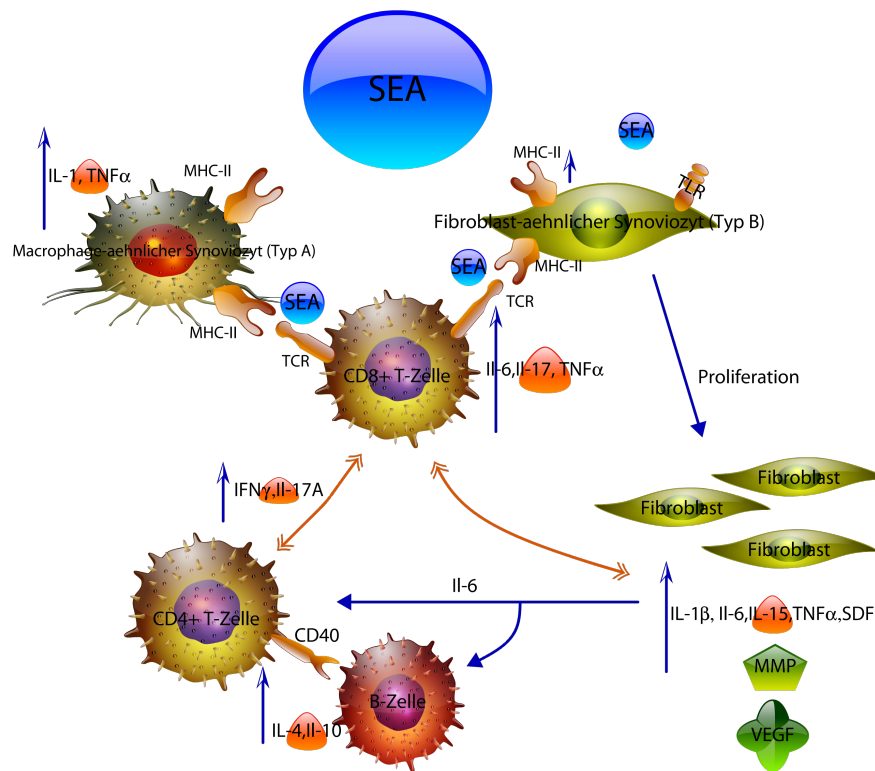


Abb. 21: Schema zur Pathogenese der SEA-Arthritis. SEA interagiert über MHC-II-Moleküle bzw. MHC-I-Moleküle auf synovialen Fibrozyten (Typ A und B) oder tritt direkt mit dem TCR in Kontakt. Weiterhin ist eine direkte Interaktion des SEA mit TLR möglich. Die Folge ist eine Aktivierung von synovialen Fibrozyten und CD8+ T-Zellen mit konsekutiver Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und zur Proliferation von synovialen Fibrozyten. Daraus resultiert eine Hyperplasie der Synovialmembran, weiterhin führt das einmal etablierte proinflammatorische Milieu zur Bystander-Aktivierung weiterer Immunzellen.

4.2 Vergleich der Ergebnisse der Superantigen-Arthritis mit Befunden bei der rheumatoiden Arthritis

Typisches Charakteristikum der entzündlich veränderten Synovialmembran (SM) bei Patienten mit rheumatoiden Arthritis (RA) ist neben der Hyperplasie die Neovaskularisation (Muller-Ladner, 1995). In dem hier vorgestellten Versuch nimmt die Hyperplasie der Synovialmembran kontinuierlich zu und ist im Vergleich zur nicht injizierten Gegenseite signifikant erhöht. Die Hyperplasie der SM bei der RA ist hauptsächlich durch die Proliferation der Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (Typ B) und Infiltration von inflammatorischen Zellen bedingt. Dies konnte durch die Überexpression von Proliferationsregulatoren nachgewiesen werden (Abeles and Pillinger, 2006). In der vorgelegten Studie kann die Hyperplasie durch die Infiltration von Entzündungszellen, initial besonders durch CD8+ T-Lymphozyten bedingt sein, weiterhin kann jedoch auch die Proliferation der Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (Typ B) hierzu beigetragen haben (Mor et al., 2005). Hierbei erscheint die Aktivierung der Typ A Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten durch ein SAG, in diesem Fall SEA prinzipiell möglich zu sein (s. o.). Als Indiz könnte, wenn auch indirekt, der Anstieg der MHC-II+ Zellen im Verlauf gelten, da synoviale Fibrozyten im aktivierten Zustand als APC fungieren können (Yamamura, 2001).

Darüber hinaus proliferieren die synovialen Fibrozyten und unterstützen die Hyperplasie (Abb. 9 B, C) Jedoch wird nicht nur die zunehmende Proliferation als Grund der Hyperplasie angeführt, sondern auch die Hemmung der Apoptose in den Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (Typ B) (Mor et al., 2005). Apoptose wird über Fas-reguliert und führt über die Aktivierung der an der Kaskade beteiligten Caspasen (3 und 8) zur Apoptose (Mountz et al., 2001). Fas löst ein „Todessignal“ über CD95 (Fas-Ligand) aus (Mountz et al., 2001). Eine Hemmung der Apoptose führt zur Kumulierung der Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (Typ B) (Kammouni et al., 2007). Eine Hemmung des Fas-regulierten Signalweges ist durch das Protoonkogen Bcl-2 möglich (Salmon et al., 1997). Bcl-2 selbst ist insbesondere in den aktivierten Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (Typ B) der RA deutlich erhöht (Kammouni et al., 2007). Bcl-2 wird durch TNF- α induziert und durch IL-15 reguliert (Kammouni et al., 2007). Bcl-2 korreliert mit der Hyperplasie und Entzündung in der rheumatoiden Arthritis (Kammouni et al., 2007). Das Tumor-Suppressor-Gen p53 induziert ebenfalls die Apoptose und kann bei Mutationen ebenfalls zu einer Hemmung der Apoptose führen (Yamanishi et al., 2002). Weiterhin sind aktivierte Fibroblasten-ähnliche-Synoviozyten (Typ B) in der Lage Apoptose von T-Zellen zu hemmen, in dem SDF-1 α produzieren, das seinerseits und dieser

an CXCR4 bindet und somit die Apoptose über P13K und MAPK-Pfade hemmt (Bartok and Firestein, 2010).

Im Modell der SAG-Arthritis ist zu vermuten, dass anhand der im Verlauf kontinuierlich zunehmenden Dicke der Synovialmembran Typ B Fibroblasten-ähnliche-Synoviozyten nach ihrer Aktivierung proliferieren und darüberhinaus in der Lage sind Entzündungszellen anzulocken.

Die hyperplastische Synovialmembran mit proliferierenden Synoviozyten und Rundzellinfiltration ist ein Charakteristikum der präarthritischen/subklinischen Phase der rheumatoiden Arthritis (Soden et al., 1989). In den in der vorliegenden Studie gewonnenen Ergebnissen findet sich ebenfalls eine Synovialmembranhyperplasie mit einer kräftigen Rundzellinfiltration. Auch Anschnitte von Gefäßen, die eine Neovaskularisation widerspiegeln, wie sie in der entzündlichen veränderten Synovialmembran der RA zu finden sind (Soden et al., 1989) ließen sich in den hier durchgeführten Experimenten darstellen (Abb. 8 b). Ebenfalls konnte bereits gezeigt werden, dass einmal aktivierte Typ B Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten über VEGF, IL-8 und SDF-1 die Angiogenese induzieren (Bartok and Firestein, 2010). So führt die Kombination aus einer verstärkten Angiogenese, vermehrter Ausbildung von Adhäsionsmolekülen sowie die Expression von proinflammatorischen Chemokinen zu einer ausgeprägten Synergie, die Migration und Proliferation von proinflammatorischen Zellen unterstützen (Bartok and Firestein, 2010). Zeichen einer klinisch manifesten Arthritis (Rötung, Schwellung, Bewegungseinschränkung) konnten wir bei den untersuchten Lewis-Ratten zu keinem Zeitpunkt nachweisen, auch zeigten die Wärmekamera-Aufnahmen keine signifikanten Temperaturunterschiede, so dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit am ehesten die präarthritische Phase widerspiegeln. Als auslösendes Agens der SAG-Arthritis wurde SEA verwendet. Die auslösenden Faktoren, die zur Ausbildung der RA führen sind bisher nicht identifiziert. Es wird aber vermutet, dass neben Bagatelltraumata auch virale Infektionen als auslösende Ursache für die Synovialmembranhyperplasie mit chronischer Synoviositis in Betracht kommen könnten (van de Sande et al., 2011).

Im Zellinfiltrat der Intima und Subintima der Synovia von Patienten mit RA finden sich T-Lymphozyten (ca. 30-50%), lymphoide Aggregate, organisiert von dendritischen Zellen (15-20%) und B-Lymphozyten (ca. 5%) (Bartok and Firestein, 2010). Ebenfalls kommt es zu erkennbaren Veränderungen der Intima, hierbei kommt es zu Hyperplasie bis zu 20 Zell-Lagen Dicke (Bartok and Firestein, 2010), eine allgemeine Hyperzellularität wird beobachtet, wobei ein Großteil davon aus eingewanderten Typ A Makrophagen-ähnlichen

Synoviozyten besteht und Typ B Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten einen hochaktivierten Phänotyp aufweisen. (Bartok and Firestein, 2010; Tran et al., 2005). Die in dieser Studie nachgewiesene Entzündung war von CD8+ T-Lymphozyten dominiert, wohingegen der Anteil der CD4+ T-Lymphozyten erst im Verlauf anstieg. Obwohl bei der frühen RA ein Verhältnis CD4/CD8 von 2:1 (Soden et al., 1989) beschrieben wird, gibt es Hinweise, dass bei der RA initial CD8+ dominieren (Carvalho et al., 2012). Tatsächlich zeichnet sich ferner ein im Verlauf der Entzündung zunehmender Anteil an CD4+ Lymphozyten im Rahmen der SEA-Arthritis ab. Es könnte also sein, dass bei fortgesetztem SAG-Stimulus mit SEA auch schließlich ein CD4+/CD8+ Verhältnis ähnlich wie bei der RA auftritt.

Ferner konnte eine hohe Anzahl Granzyme B+-Zellen in der Synovialmembran, insbesondere bei der frühen RA (Erkrankungsdauer < 1 Jahr), nachgewiesen werden (Tak et al., 1994). Granzyme B wird von natürlichen Killer-Zellen (NK) als Untergruppe von CD8+ T-Lymphozyten produziert (Kummer et al., 1994; Tak et al., 1994). Weiterhin wies jene Studie nach, dass nur eine geringe Menge dieser Granzyme B+-Zellen T-Zell-Marker (CD3) exprimiert. Auch bei der hier untersuchten SAG-Arthritis, findet sich eine niedrige Expression von CD3, die am ehesten durch eine SAG-spezifische Herunterregulation bedingt ist. Weiterhin konnte im Blut von RA-Patienten nachgewiesen werden, dass 40% dieser Zellen CD8+ sind und darüberhinaus einer oligoklonalen Expansion unterliegen (Fitzgerald et al., 1995). Dieses oligoklonale TCR-Repertoire war spezifisch für EBV, Cytomegalie und Influenza-Virus (Carvalho et al., 2012). Es gibt bereits Hinweise, dass insbesondere die Infektionen mit EBV aber auch von anderen Viren die Transaktivierung von endogenen SAG induzieren (Posnett and Yarilina, 2001). Diese Befunde unterstreichen unsere Hypothese, dass SAG in Form von Hüllprotein humaner endogener Retroviren eine Rolle im Rahmen der Pathogenese der Erkrankung spielen könnten.

Ein weiteres histologisches Merkmal der rheumatisch veränderten Synovialmembran ist die Bildung von Aggregaten aus T- und B-Zellen (Corsiero et al., 2012). In diesen Aggregaten führen folliculäre CD4+ T-Helfer-Zellen zur B-Zell-Differenzierung (Dong et al., 2011). Diese Aggregate, die eine Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen produzieren, entstehen nicht ohne die Anwesenheit von CD8+ T-Lymphozyten. Eine Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper der zur Depletion der CD8+ T-Lymphozyten führte, führte gleichermaßen zu einer Desintegration der Aggregate (Dong et al., 2011). So ist es denkbar, dass durch die Aktivierung von synovialen Fibrozyten und die Mobilisierung von CD8+ T-Lymphozyten ein proinflammatorisches Milieu entsteht, das über Chemokine CD4+ T-Lymphozyten anlockt und sich darüber hinaus im Verlauf solche

Aggregate aus T- und B-Lymphozyten bilden. Dies würde sich mit den Ergebnissen in dieser Studie decken, denn erst im Verlauf stieg die Anzahl der CD4+ T-Lymphozyten und die der B-Zellen.

Gleichermaßen mit dem initialen Anstieg von CD8+ T-Lymphozyten im SAG-Arthritis-Modell kommt es zum Anstieg von MHC-II+ Zellen. Neben Monozyten/Makrophagen und B-Zellen tragen aktivierte T-Zellen (CD4+, CD8+) MHC-II-Moleküle. Auch auf Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (Typ B) der rheumatoiden Arthritis sind MHC-II-Moleküle beschrieben worden. (s. o.) In der vorliegenden Studie ist davon auszugehen, dass die MHC-II+ Zellen initial vorwiegend Typ A Makrophagen-ähnliche Synoviozyten sind, die als APC fungieren. Der Anstieg von MHC-II im Verlauf ist mit der Einwanderung der aktivierten T- und B-Lymphozyten vereinbar.

Bei RA Patienten war die Anzahl der B-Zellen initial geringer als die der T-Zellen (Pratt et al., 2009). Auch in unserem Modell stieg die Anzahl der B-Zellen erst im Verlauf an. Die Einwanderung der B-Zellen wird wahrscheinlich durch das bereits etablierte proinflammatorische Zytokinmilieu bedingt. B-Zellen wird eine Rolle in der präklinischen Phase der RA durch Produktion von Auto-Antikörpern zugeschrieben (Kotzin, 2005). Wie oben beschrieben ist die Bildung von Aggregaten und der damit verbundenen B-Zell-Reifung, initiiert durch CD8+ T-Lymphozyten möglich. Zudem wird ihr Einwandern durch CD4+ T-Lymphozyten unterstützt (s.o.). Es ist also denkbar, dass trotz Abfall der CD8+ T-Lymphozytenpopulation, das weitere Ansteigen der MHC-II-Moleküle durch eingewanderte B-Zellen mit zu erklären ist. Weiterhin exprimieren Monozyten/Makrophagen MHC-II-Moleküle die jedoch in der vorgelegten Studie nicht weiter differenziert wurden. Es ist aber anzunehmen, dass diese Zellpopulation durch das proinflammatorische Milieu angelockt wird und zur Hyperplasie der Synovialmembran beiträgt (Bartok and Firestein, 2010; Brand et al., 2003). In der vorliegenden Studie wurde ein T-Zell-SAG eingesetzt, bei dem die Aktivierung von B-Zellen a.e. sekundär i.S. einer Bystander-Aktivierung erfolgt. Diese würde vermutlich eine polyklonale Aktivierung der B-Zellen darstellen. Es gibt allerdings auch B-Zell-SAG wie etwa das gp120 Hüllprotein des HI-Virus. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass gp120 eine oligoklonale B-Zell Reaktion hervorrufen kann. Es wäre also prinzipiell denkbar, dass die Produktion von Autoantikörpern bei der RA auf die Wirkung eines B-Zell SAG zurückgeht.

4.3 Vergleich der Ergebnisse der Superantigenarthritis mit Befunden von Patienten mit Juveniler idiopathischer Arthritis (JIA)

Das Entzündungsinfiltrat im Bereich der Synovialmembran bei Patienten mit JIA weist aktivierte T-Lymphozyten, aktivierte Makrophagen, B-Lymphozyten und Plasmazellen auf (Grom and Hirsch, 2000; Hahn and Kim, 2010) und zeigt somit Übereinstimmungen zum Entzündungszellinfiltrat bei der SAG-Arthritis, das in den vorliegenden Untersuchungen mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden konnte. Neben einer diffusen Infiltration mit T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen finden sich auch perivaskuläre Aggregate und Follikelformationen (Grom and Hirsch, 2000) im subintimalen Bereich der Synovialmembran. Es finden sich bei der JIA diffuse Infiltrate mit CD8+ T-Lymphozyten, insbesondere in kleineren Foci (Yanni et al., 1992). Diese typische Follikelbildung ist in unserem Modell nicht nachweisbar gewesen und tritt eventuell erst zu einem späteren Untersuchungszeitpunkt auf. In den Aggregaten werden CD4+ T-Lymphozyten beschrieben, umgeben von einem Mantel aus CD4/CD8 T-Lymphozyten und B-Lymphozyten (Grom and Hirsch, 2000). Betrachtet man die verschiedenen Subtypen der JIA, so finden sich fokale Aggregate aus B- und T-Zellen bei 60 % der Patienten mit der polyartikulären Form, bei 73 % der Patienten mit extended-oligoartikulärer Form und bei 48 % der persistierend oligoartikulären Form (Finnegan et al., 2011). In den immunhistochemischen Untersuchungen des Entzündungsinfiltrates hinsichtlich der T-Zell-Marker konnten Finnegan et al. 2011 zeigen, dass in allen drei Subgruppen der JIA die Anzahl der CD3+ T-Lymphozyten unter der Anzahl der Summe aus CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten lag, es einen signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl der CD4+ T-Zellen gab (am stärksten bei der polyartikulären Form) und keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der CD8+ T-Lymphozyten. Es wurde eine Dominanz der CD4+ T-Lymphozyten vor allem bei der polyartikulären Form nachgewiesen, während bei der oligoartikulären Form CD8+ T-Lymphozyten dominierten (Murray et al., 1996). Hier fanden sich in der Expression der CD3+ T-Lymphozyten Übereinstimmungen zum Modell der SAG-Arthritis, in dem auch eine nur geringe Zahl an CD3+ T-Lymphozyten im Vergleich zur Anzahl bzw. Summe aus CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten gefunden wurde. Unsere Ergebnisse zeigen eine an Tag fünf nach SEA-Injektion maximale Entzündungsaktivität im Bereich des rechten, injizierten Kniegelenkes, die Entzündung wurde zu diesem Zeitpunkt von CD8+ T-Lymphozyten getragen und spiegelt damit evtl. am ehesten das Entzündungsbild der oligoartikulären Form der JIA wieder.

Es wird davon ausgegangen, dass Antigen-spezifische T-Lymphozyten eine zentrale Rolle im Entzündungsprozess bei der Pathogenese der JIA spielen (Hahn and Kim, 2010). Diese

synovialen T-Lymphozyten werden wahrscheinlich entweder durch ein oder mehrere intraartikuläre Antigene lokal stimuliert und klonal expandiert oder wandern antigenspezifisch als sogenannte Memory-T-Lymphozyten in das Gelenk ein (Black et al., 2002; Silverman and Carson, 2003). Eine andere Hypothese geht davon aus, dass in der Peripherie aktivierte T-Lymphozyten in das Gelenk migrieren und dort einen Entzündungsprozess initiieren (Silverman et al., 1993). Diese aktivierten T-Zellen sind oligoklonal (Sakkas and Platsoucas, 1995). SAG führen auch zu einer oligoklonalen T-Zell-Aktivierung (Fraser and Proft, 2008). Im vorliegenden Modell der SAG-Arthritis werden T-Zellen oligoklonal im Gelenk, lokal durch das SAG SEA aktiviert. Damit bestätigten die hier vorgelegten Befunde die Hypothese einer intraartikulären Stimulation von T-Lymphozyten durch (Super-)Antigene. Solche aktivierten T-Lymphozyten führen über die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zur Einwanderung weiterer Entzündungszellen wie z.B. B-Lymphozyten und Makrophagen (Naldini et al., 2003) (Sibilia et al., 2005) (Ziff, 1989).

Eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der T-Lymphozyten spielen wahrscheinlich die synovialen Fibroblasten (Typ A/B). Fibroblasten-ähnliche-Synoviozyten können unter bestimmten Umständen, z.B. durch Freisetzung verschiedener Zytokine, wie IFN- γ oder TNF- α von Makrophagen-ähnlichen-Synoviozyten, zu Antigen-präsentierenden Zellen werden (Ivanaga et al. 2000). Die Antigen-Präsentation bei der JIA erfolgt über MHC-Klasse-II-Moleküle (Sakkas and Platsoucas, 1995). Auch unsere Ergebnisse zeigen eine im Verlauf steigende Zahl MHC-II positiver Zellen. Diese dienen initial der Antigenpräsentation für die T-Lymphozyten und unterhalten dann im Verlauf wahrscheinlich die Entzündungsaktivität durch Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen und konsekutiver Rekrutierung weiterer T-Lymphozyten. Da die MHC-II-Moleküle interindividuell verschieden sind, ist davon auszugehen, dass die Aktivierung der T-Lymphozyten neben der Art des Antigens auch vom HLA-Typ und der V β -Kette des TCR abhängig (Grom et al., 1996) ist. Die V β -Region des TCR führt zu einer spezifischen Antigenerkennung.

Im Rahmen der Entzündung bei der JIA werden vorwiegend Th1-Zellen, die in den Entzündungsinfiltraten betroffener Patienten zu finden sind, aktiviert (Lin et al., 2011). Über die Freisetzung verschiedener Zytokine werden synoviale Fibrozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen aktiviert, die ihrerseits TNF- α und IL-1 freisetzen, die wiederum zur Gewebeerstörung durch Metalloproteinasen führen (Grom et al., 1996) (Kutukculer et al., 1998) und VEGF sezernieren. Über die neu gebildeten Gefäße können dann weitere Immunzellen einwandern und den Entzündungsprozess unterhalten (Scola

et al., 2001). Auch im vorliegenden Modell findet sich im Zeitverlauf eine zunehmende Vaskularisierung der Synovialmembran (Abb. 8).

Interessant ist auch, dass bei Patienten mit JIA in der Synovialflüssigkeit im Vergleich zu Untersuchungen im peripheren Blut die Anzahl der Lymphozyten in der Gelenkflüssigkeit deutlich höher lag (Silverman et al., 1993). Eine lokale Aktivierung der T-Lymphozyten im Bereich der Synovia, also im Gelenk, unterstreicht unsere Vorstellung einer mutmaßlich nicht autoimmunogenen Genese der Erkrankung. Zwar liegen aktuell keine Blutuntersuchungen der behandelten Lewis-Ratten vor, aber auf Grund der intraartikulären Injektion von SEA ist vorstellbar, dass in der Peripherie im Vergleich zum Entzündungsinfiltrat im Gelenk weniger aktivierte Lymphozyten zu finden sind, zumal die Tiere klinisch gesund waren und keine systemischen Entzündungszeichen aufwiesen. Darüber hinaus fand sich nahezu keine Entzündungsreaktion in mit Lösungsmittel injizierten Gelenken der Kontrolltiere, sodass eine systemische Aktivierung von Entzündungszellen im Rahmen der SAG-Arthritis wie auch bei der JIA vorstellbar erscheint.

Folgt man den oben aufgeführten Überlegungen, so ist anzunehmen, dass eine oligoklonale Aktivierung der T-Zellen zum Beispiel durch als SAG fungierende Hüllproteine humaner endogener Retroviren (HERVs) z.B. innerhalb der Synovialmembran ausgelöst werden könnten. Unter HERVs versteht man Polynukleotidsequenzen, die sich im humanen Genom durch Infektion von exogenen Retroviren implementiert haben (Ejtehadi et al., 2006). Tatsächlich besteht ca. 8-9% des humanen Genoms aus diesen Sequenzen, jedoch sind die meisten davon inaktiviert (Reynier et al., 2009a). Dabei lassen sich eine Vielzahl von Untergruppen unterscheiden. Jedoch konnten HERV-W, HERV-H und insbesondere HERV-K mit der rheumatoiden Arthritis in Verbindung gebracht werden (Tugnet et al., 2013). Dabei ist die HERV-K Familie die einzige bekannte Familie der Viren, die intakte Viruspartikel produzieren kann (Tugnet et al., 2013). Dazu gehören Hüllproteine mit mutmaßlichen superantigenen Eigenschaften (s.o.). Tatsächlich konnte eine hohe Expression von HERV in der Synovia nachgewiesen werden, darüber hinaus korrelierte die Überexpression auch mit der Krankheitsaktivität als auch der Schwere des Verlaufs (Tugnet et al., 2013). Neben der SAG-Funktion von HERV-produzierten Proteinen, modulieren diese möglicherweise das adaptive Immunsystem über molekulare Mimikry und auch das angeborene Immunsystem über TLR (Partikel von HERV RNA/DNA) (Brodziak et al., 2012). Weiterhin ist bekannt, dass HERVs über exogene Viren (EBV, HHV-6, Parvovirus B19) transaktiviert werden können (Brodziak et al., 2012). So wurde bereits gezeigt, dass HERV-K18 über EBV transaktiviert wird und das Hüllprotein von HERV-K18

(env) als SAG funktioniert (Sicat et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass HERV-K18 bei der JIA überexprimiert wird. Des Weiteren wurde ebenfalls eine HERV-K18 Transkription in kultivierten Synoviozyten von RA-Patienten nachgewiesen (Reynier et al., 2009b). Eine weitere Transaktivierung erfolgt über proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 oder auch epigenetische Faktoren (Hypomethylation) (Brodziak et al., 2012).

Es ist also denkbar, dass durch eine lokale Transaktivierung von HERVs im Gelenk eine lokale SAG-Produktion entsteht und zu den oben aufgeführten Veränderungen im Gelenk führen kann. Allerdings ist derzeit unklar ob HERV allein als Triggerfaktoren fungieren oder ob nur deren Transaktivierung lediglich die Folge eines vorbestehenden proinflammatorischen Milieus bedingt ist.

Der Anteil der B-Lymphozyten ist an den ersten zwei Untersuchungszeitpunkten (Tag 1 und Tag 5) relativ gering. Der Anstieg der B-Lymphozyten an Tag zehn nach intraartikulärer Injektion von SEA ist mit einer Aktivierung über die von den T-Lymphozyten ausgeschütteten Zytokine, wie IL-4, IL-5 u.a. erklärbar (Cope et al., 2007). Die Effekte von B-Zellen bzw. Plasmazellen, wie die Produktion von Antikörpern und Rückkopplungsprozesse auf andere an der Entzündung beteiligte Zellen, wären wahrscheinlich erst zu einem späteren Zeitpunkt im vorliegenden Modell der SAG-Arthritis nachweisbar. Vorstellbar ist auch, dass die B-Zellen als Antigen-präsentierende Zellen fungieren und somit T-Lymphozyten stimulieren und so den Entzündungsprozess aufrecht erhalten (Morbach et al., 2011). Vor allem bei der polyartikulären Form der JIA finden sich zahlreiche B-Zell-Infiltrate (Finnegan et al., 2011), dort läßt sich auch häufig der RF lokal nachweisen. In der Synovialflüssigkeit selbst finden sich unterschiedliche IG-Klassen, deren Höhe abhängig von der Krankheitsaktivität ist, wobei zwischen den einzelnen JIA-Subtypen keine Unterschiede bestehen (Sediva et al., 2001). Das zeigt, dass die humorale Abwehr bei der JIA eher unspezifisch ist und eher als Marker für die Krankheitsaktivität genutzt wird. Möglicherweise könnten nach mehrmaliger oder dauerhafter SAG-Injektion höhere Zahlen an B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Es ist davon auszugehen, dass nach oligoklonaler T-Zell-Aktivierung auch in unserem Modell verschiedene IG-Klassen nachweisbar wären. Im Rahmen einer solchen Bystander-Aktivierung würden wir allerdings eher von einer polyklonalen Aktivierung ausgehen. Das zu bestätigen erfordert weitere Untersuchungen. Vorstellbar ist, dass möglicherweise verschiedene Antigene, die bevorzugt B- oder T-Lymphozyten aktivieren und an der Pathogenese der einzelnen Unterformen beteiligt sind. Das würde zumindest das teilweise heterogene Bild von Entzündungszellen der einzelnen Untergruppen erklären (Finnegan

et al., 2011; Murray et al., 1996) Vor allem bei Patienten, die an der polyartikulären Form erkrankt sind, lassen sich häufig Rheumafaktoren nachweisen (Barron et al., 1989; Silverman et al., 1990).

Eine weitere Übereinstimmung zwischen dem vorliegenden Modell und der JIA ist die synoviale Hyperplasie, die während der akuten Phase der JIA nachweisbar ist, allerdings auch zwischen den Formen variiert und bei der polyartikulären RF+ Form am stärksten ausgeprägt ist (Finnegan et al., 2011). Auch in den vorliegenden Untersuchungen zeigt sich eine im Zeitverlauf zunehmende Hyperplasie der Synovialmembran mit einem Maximum an Tag zehn. Möglicherweise ist diese Hyperplasie an Tag zehn durch Zellen bedingt, die nicht immunhistochemisch dargestellt wurden, wie z.B. synoviale Fibrozyten, die nicht als Antigen-präsentierende Zellen fungieren. Aktuell wird davon ausgegangen, dass die oligo- und die polyartikuläre Form der JIA auf eine Dysfunktion des adaptiven Immunsystems zurück zu führen ist, während bei der systemischen Form eine Störung des angeborenen Immunsystems vorliegt. Diese Hypothese findet Bestätigung im unterschiedlichen Entzündungszellinfiltrat der Synovia. Es zeigen sich im Modell der SAG-Arthritis Übereinstimmungen im Entzündungsinfiltrat und der Hyperplasie der Synovialmembran mit allen Formen der JIA, wobei das vorliegende Modell keine Form der JIA vollständig abbildet. Die Ergebnisse der SAG-Arthritis zeigen vor allem histologische Gemeinsamkeiten im Entzündungsbild zur oligoartikulären Form. Hierbei konnte neben der Hyperplasie der Synovialmembran, ebenfalls Neovaskularisationen und Migration von lymphozytären Rundzellen mit Nachweis von CD8+, CD3+ und CD4+ T-Zellen beobachtet werden.

4.4 Vergleich der Ergebnisse der Superantigen-induzierten Arthritis mit Befunden vom Kollagen-II-Arthritis-Tiermodell

Die Kollagen-II-Arthritis ist das am häufigsten verwendete Tiermodell, um die Vorgänge die bei Arthritiden rheumatischer Genese ablaufen, nachzubilden (Gonzalez et al., 2007). Dabei werden T-Lymphozyten mehrmals hintereinander intradermal (1 x initial + Boosterinjektion am zehnten Tag) mit Kollagen-II (Chicken-Typ; Bovine-Typ) immunisiert. Dies führt zur Ausbildung einer Arthritis die dem klinischen Bild einer rheumatoiden Arthritis ähnelt (Gonzalez et al., 2007).

Die ersten histologischen Veränderungen in der Kollagen-II-induzierten Arthritis erscheinen um den zehnten Tag nach vorheriger mehrmaliger (2-fach) Immunisierung (Gonzalez et al., 2007). Das Bild ist geprägt von einer Hyperplasie der Synovialmembran,

maßgeblich durch das Einwandern von inflammatorischen Rundzellen und die Proliferation von synovialen Fibrozyten bedingt. Später kommt es zur Neovaskularisation und Ausbildung von Pannus (Gonzalez et al., 2007). Im Modell der SAG-Arthritis wird keine vorherige Immunisierung der T-Lymphozyten vorgenommen. Das SAG wurde einmalig intraartikulär injiziert. Bereits nach fünf Tagen war eine signifikante Hyperplasie der Synovialmembran zu beobachten (Abb. 9) Die Hyperplasie erklärt sich a.e. durch eine Proliferation von synovialen Fibrozyten und eingewanderten Entzündungszellen, evtl. in Kombination mit einem durch Entzündungsmediatoren ausgelösten vasogenen Ödem.

Bei der Kollagen-II-induzierten Arthritis fehlen zelluläre Infiltrate in der Synovialmembran bis zum zehnten Tag nach der Immunisierung mit dem Autoantigen, wohingegen bereits an Tag fünf nach intraartikulärer Injektion von SEA im Modell der SAG-Arthritis (SAA) eine dichte Infiltration von inflammatorischen Rundzellen nachzuweisen ist, die zur Progression der Hyperplasie, zur Apoptose und Neovaskularisation der Synovialmembran führen. Eine frühzeitige Neovaskularisation ist ebenfalls in der Kollagen-II-Arthritis ab Tag 5 zu finden (Knoerzer et al., 1997). Im weiteren Verlauf kommt es ab dem Tag 20 zur Ankylose der betroffenen Gelenke im Rahmen der KIIA. Erste Veränderungen wie Knorpelerosionen finden sich bereits ab Tag 13 (Knoerzer et al., 1997). Dagegen finden sich keine Erosionen in der SAG-Arthritis bis Tag 10 des Knorpels der beteiligten Gelenkflächen.

Die einmalige Injektion von SEA in das Kniegelenk der Lewis-Ratte ohne vorherige Immunisierung der Tiere führt ähnlich wie bei der Kollagen-II-induzierten Arthritis zu einer ausgeprägten Hyperplasie der Synovialmembran sowie zur Einwanderung von Entzündungszellen.

Es konnte gezeigt werden, dass T-Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der Initiierung der KIIA spielen (Tada et al., 1996), und dass diese entscheidend den Krankheitsprogress unterstützen. So lassen sich im synovialen Infiltrat der KIIA CD4+ T-Lymphozyten darstellen (Wang et al., 2007). Weiterhin finden sich CD8+ T-Lymphozyten, B-Zellen und Makrophagen, die zur Gelenkdestruktion führen.

Das Entzündungsinfiltrat der SAG-Arthritis setzt sich vornehmlich aus CD8+ T-Lymphozyten und MHC-II+ Zellen zusammen. MHC-II tragende Zellen können Makrophagen-ähnliche Synoviozyten, Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten, B-Zellen (deren Marker Pax-5, CD138 steigen im Verlauf), sowie CD4+ T-Lymphozyten oder Monozyten bzw. Makrophagen sein.

Die einmalige Injektion von SEA reicht entweder nicht aus, um eine Gelenkdestruktion zu initiieren oder der Beobachtungszeitraum der Tiere müsste in Folgeversuchen verlängert werden, da die Gelenkdestruktion zu einem späteren Zeitpunkt der Untersuchung auftreten könnte. Die Neovaskularisation, die auch bei der KIIA beschrieben wurde, könnte anhand spezifischer Endothelmarker ebenfalls in Folgeversuchen näher untersucht werden. Zusammenfassend kann jedoch gezeigt werden, dass eine einmalige Injektion des SAG SEA zu einer deutlichen Hyperplasie der Synovialmembran, massiver Rundzellinfiltration mit zunächst CD8+ Dominanz führt und im Verlauf durch den Anstieg von CD4+ T-Lymphozyten einerseits und den Anstieg der B-Zellen andererseits charakterisiert ist. Damit finden sich Übereinstimmungen im Entzündungsinfiltrat und in Veränderungen der SM im Modell der KIIA und SAG-Arthritis wieder.

Tab. 3 Histopathologische Merkmale von Kollagen-II-Arthritis und Superantigen-Arthritis

	Kollagen-II-Arthritis	Superantigen-Arthritis
Vorgehen/Methode	<ul style="list-style-type: none"> • Mehrfache Immunisierung intradermal mit Kollagen II • Tag 1 200 µl • Tag 10 100µl Boosterinjektion 	<ul style="list-style-type: none"> • Einmalige Intraartikuläre Injektion von SEA 100µl/2.5ml
Klinischer Verlauf	<ul style="list-style-type: none"> • Monophasisch • Beginn am 10. Tag mit Rötung, Schwellung • Functio laesa im Verlauf • Ankylosis ab dem 13. Tag • Keine Restitutio ad integrum 	<ul style="list-style-type: none"> • Monophasisch • Bis zum 10. Tag keine klinischen Zeichen • Biphasisch? • Restitio ad integrum? • Bisher Darstellung einer akuten Entzündung • Weiterer Verlauf ?
Histologie	<ul style="list-style-type: none"> • Synovialhyperplasie erst ab Tag 10 • Neovaskularisation ab Tag 5 • Kein Nachweis von inflammatorischen Zellen vor dem zehnten Tag • Vornehmlich CD4+-T-Lymphozyten, weniger CD8+-T-Lymphozyten, Monozyten-Makrophagen, B-Zellen • Erosion des Knorpels ab dem 13. Tag/ Pannus • Nekrotisierende Vaskulitis 	<ul style="list-style-type: none"> • Synovialhyperplasie nach 5 Tagen die kontinuierlich zunimmt • beg. Neovaskularisation ab dem 5. Tag • Dichte Infiltration von inflammatorischen Zellen ab Tag 5 • Initial viele CD8+T-Lymphozyten, im Verlauf Anstieg CD4+, • Anstieg der B-Zellen (CD138/Pax-5), MHC-II Zellen als indirekte Marker für Monozyten-Makrophagen? • Beginnende Aggregatbildung • Apoptose

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Untersuchung ging von der Überlegung aus, ob HERV-kodierte Hüllproteine mit superantigenen Eigenschaften evtl. an der Pathogenese rheumatoider Arthritiden beteiligt sein könnten. In Ermangelung von HERV-kodierten Superantigenen (SAG) wurde als Ersatz das ganz ähnlich wirkende SAG Staphylokokken Enterotoxin A (SEA) eingesetzt. Ziel unserer Untersuchung war es, durch intraartikuläre Injektion von SEA in das rechte Kniegelenk der Lewis-Ratte eine Arthritis zu etablieren. Weiterhin sollte eine immunhistochemische Differenzierung des Entzündungsinfiltrates erfolgen. 15 Lewis-Ratten wurden an drei verschiedenen Zeitpunkten (Tag 1, 5 und 10) nach intraartikulärer Injektion von SEA bzw. Lösungsmittel geopfert. Dabei wurde bei jeweils drei Tieren pro Gruppe (Tag 1, 5 und 10) 100 µl/2.5ml SEA in das rechte Kniegelenk injiziert und bei der Kontrollgruppe das gleiche Volumen NaCl 0,9%. An Paraffinschnitten wurden immunhistochemisch die T-Zell Marker CD3, CD4 und CD8; sowie die B-Zell-Marker Pax-5 und CD138, als auch die Expression der MHC-Moleküle I und II untersucht. Es wurde eine ausgeprägte Entzündung der Synovialmembran beobachtet. In den mit NaCl-injizierten Gelenken der Kontrolltiere wurde eine signifikant geringere Entzündung nachgewiesen ($p < 0,05$; Mann-Whitney U-Test). Die Entzündung war durch eine Rundzellinfiltration der Synovialmembran gekennzeichnet. Allerdings zeigte sich eine inhomogene Verteilung der Entzündungszellen, vorwiegend im Bereich der oberen Recessus und Menisci. Die nachweisbare Synovialmembranhyperplasie war mutmaßlich bedingt durch die Einwanderung von Entzündungszellen und Proliferation von synovialen Fibrozyten, sie nahm im Verlauf kontinuierlich zu. Das Entzündungsinfiltrat wurde an sechs verschiedenen Stellen (HPF) à 50.000 µm² des betreffenden Gelenkes näher untersucht. Bei dem Entzündungsinfiltrat handelte es sich um eine CD8⁺ dominierte Entzündung, wohingegen CD3⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten initial relativ gering ausgeprägt waren, jedoch im Verlauf anstiegen. Insbesondere die niedrige Anzahl an CD3⁺ T-Lymphozyten scheint eine SEA-spezifische Wirkung zu sein. Pax-5 und CD138⁺ B-Zellen waren zum ersten Untersuchungszeitpunkt nur gering nachweisbar. Im weiteren Verlauf nahm ihre Anzahl leicht zu. Die MHC-II⁺ Zellen stiegen kontinuierlich an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten an. Dies war a. e. durch die Einwanderung weiterer Immunzellen bedingt, wohingegen die Anzahl der MHC-I⁺ Zellen ab Tag fünf etwas sank und evtl. durch die sich zum Teil in Apoptose befindlichen Zellen zu erklären ist. Daneben fanden sich als Zeichen einer erhöhten Entzündungsaktivität Neovaskularisationen und Apoptosen. Vergleicht man die histopathologischen Befunde von Patienten die an rheumatoider Arthritis (RA) oder an juveniler idiopathischer Arthritis (JIA) erkrankt sind, finden sich partielle Übereinstimmungen zum Modell der SEA-Arthritis. Das

Entzündungsinfiltrat ist jeweils von T-Lymphozyten, aktivierten synovialen Fibrozyten, B-Zellen und Monozyten-Makrophagen geprägt. Die dargestellten Untersuchungsergebnisse nach SEA-Injektion bilden sehr gut die initiale Phase der Gelenkentzündung ab, so dass das Modell der vorgestellten SEA-Arthritis evtl. eine Möglichkeit bietet, die im Gelenk ablaufenden Entzündungsvorgänge näher zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

- Abdulkadir, S. A., and S. J. Ono. 1995. How are class II MHC genes turned on and off? *FASEB J.* 9:1429-1435.
- Abeles, A. M., and M. H. Pillinger. 2006. The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis: cartilage destruction and the regulation of matrix metalloproteinases. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 64:20-24.
- Allan, S. E., R. Broady, S. Gregori, M. E. Himmel, N. Locke, M. G. Roncarolo, R. Bacchetta, and M. K. Levings. 2008. CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol Rev.* 223:391-421.
- Baeten, D., P. Demetter, C. Cuvelier, F. Van Den Bosch, E. Kruithof, N. Van Damme, G. Verbruggen, H. Mielants, E. M. Veys, and F. De Keyser. 2000. Comparative study of the synovial histology in rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, and osteoarthritis: influence of disease duration and activity. *Ann Rheum Dis.* 59:945-953.
- Barash, J., and O. Goldzweig. 2007. Possible role of streptococcal infection in flares of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 57:877-880.
- Barron, K. S., C. L. DeCunto, J. F. Montalvo, F. M. Orson, and D. E. Lewis. 1989. Abnormalities of immunoregulation in juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 16:940-948.
- Bartok, B., and G. S. Firestein. 2010. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 233:233-255.
- Baumann, H., and I. Kushner. 1998. Production of interleukin-6 by synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol.* 152:641-644.
- Black, A. P., H. Bhayani, C. A. Ryder, J. M. Gardner-Medwin, and T. R. Southwood. 2002. T-cell activation without proliferation in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res.* 4:177-183.
- Bombara, M. P., D. L. Webb, P. Conrad, C. W. Marlor, T. Sarr, G. E. Ranges, T. M. Aune, J. M. Greve, and M. L. Blue. 1993. Cell contact between T cells and synovial fibroblasts causes induction of adhesion molecules and cytokines. *J Leukoc Biol.* 54:399-406.
- Boonen, A., and J. L. Severens. 2011. The burden of illness of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 30 Suppl 1:S3-S8.
- Bouvier, M. 2003. Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective. *Mol Immunol.* 39:697-706.
- Brand, D. D., A. H. Kang, and E. F. Rosloniec. 2003. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol.* 25:3-18.
- Brandes, M., K. Willmann, G. Bioley, N. Levy, M. Eberl, M. Luo, R. Tampe, F. Levy, P. Romero, and B. Moser. 2009. Cross-presenting human gamma delta T cells induce robust CD8+ alpha beta T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:2307-2312.
- Brodziak, A., E. Ziolkow, M. Muc-Wierzgon, E. Nowakowska-Zajdel, T. Kokot, and K. Klakla. 2012. The role of human endogenous retroviruses in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Med Sci Monit.* 18:RA80-RA88.
- Buckley, C. D., D. Pilling, J. M. Lord, A. N. Akbar, D. Scheel-Toellner, and M. Salmon. 2001. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol.* 22:199-204.
- Call, M. E., J. Pyrdol, M. Wiedmann, and K. W. Wucherpfennig. 2002. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell.* 111:967-979.
- Carlsen, S., A. S. Hansson, H. Olsson, D. Heinegard, and R. Holmdahl. 1998. Cartilage

- oligomeric matrix protein (COMP)-induced arthritis in rats. *Clin Exp Immunol.* 114:477-484.
- Carty, S. M., N. Snowden, and A. J. Silman. 2004. Should infection still be considered as the most likely triggering factor for rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis.* 63 Suppl 2:ii46-ii49.
- Carvalho, H., J. A. da Silva, and M. M. Souto-Carneiro. 2012. Potential roles for CD8(+) T cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.*
- Chapes, S. K., and A. R. Herpich. 1998. Complex high affinity interactions occur between MHCI and superantigens. *J Leukoc Biol.* 64:587-594.
- Cho, M. L., J. H. Ju, H. R. Kim, H. J. Oh, C. M. Kang, J. Y. Jhun, S. Y. Lee, M. K. Park, J. K. Min, S. H. Park, S. H. Lee, and H. Y. Kim. 2007. Toll-like receptor 2 ligand mediates the upregulation of angiogenic factor, vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunol Lett.* 108:121-128.
- Chomarat, P., M. C. Rissoan, J. J. Pin, J. Banchereau, and P. Miossec. 1995. Contribution of IL-1, CD14, and CD13 in the increased IL-6 production induced by in vitro monocyte-synoviocyte interactions. *J Immunol.* 155:3645-3652.
- Choy, E. H., D. A. Isenberg, T. Garrod, S. Farrow, Y. Ioannou, H. Bird, N. Cheung, B. Williams, B. Hazleman, R. Price, K. Yoshizaki, N. Nishimoto, T. Kishimoto, and G. S. Panayi. 2002. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum.* 46:3143-3150.
- Colebatch, A. N., and C. J. Edwards. 2011. The influence of early life factors on the risk of developing rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 163:11-16.
- Cope, A. P., H. Schulze-Koops, and M. Aringer. 2007. The central role of T cells in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 25:S4-11.
- Corsiero, E., M. Bombardieri, A. Manzo, S. Bugatti, M. Ugucconi, and C. Pitzalis. 2012. Role of lymphoid chemokines in the development of functional ectopic lymphoid structures in rheumatic autoimmune diseases. *Immunol Lett.* 145:62-67.
- Costantino, C. M., C. M. Baecher-Allan, and D. A. Hafler. 2008. Human regulatory T cells and autoimmunity. *Eur J Immunol.* 38:921-924.
- Cush, J. J., and P. E. Lipsky. 1988. Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31:1230-1238.
- Damle, N. K., G. Leytze, K. Klussman, and J. A. Ledbetter. 1993. Activation with superantigens induces programmed death in antigen-primed CD4+ class II+ major histocompatibility complex T lymphocytes via a CD11a/CD18-dependent mechanism. *Eur J Immunol.* 23:1513-1522.
- Diekhoff, T., and K. G. Hermann. 2012. [Imaging in rheumatic diseases. Rheumatoid arthritis and differential diagnostics]. *Radiologe.* 52:937-48; quiz 949.
- Dohlsten, M., G. Hedlund, and T. Kalland. 1991. Staphylococcal-enterotoxin-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today.* 12:147-150.
- Dong, W., P. Zhu, Y. Wang, and Z. Wang. 2011. Follicular helper T cells in systemic lupus erythematosus: a potential therapeutic target. *Autoimmun Rev.* 10:299-304.
- Edwards, J. C. 2000. Fibroblast biology. Development and differentiation of synovial fibroblasts in arthritis. *Arthritis Res.* 2:344-347.
- Ehrenstein, M. R., J. G. Evans, A. Singh, S. Moore, G. Warnes, D. A. Isenberg, and C. Mauri. 2004. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med.* 200:277-285.
- Ejtehadi, H. D., G. L. Freimanis, H. A. Ali, S. Bowman, A. Alavi, J. Axford, R.

- Callaghan, and P. N. Nelson. 2006. The potential role of human endogenous retrovirus K10 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: a preliminary study. *Ann Rheum Dis.* 65:612-616.
- Emmer, A., K. Gerlach, M. S. Staeger, and M. E. Kornhuber. 2008. Cerebral gene expression of superantigen encephalitis in the lewis rat induced by staphylococcal enterotoxin a. *Scand J Immunol.* 67:464-472.
- Emmer, A., K. Gerlach, M. S. Staeger, and M. E. Kornhuber. 2010. T-cell subsets of the encephalitis induced by the superantigen Staphylococcal Enterotoxin A (SEA) in the Lewis rat: an immunohistochemical investigation. *Cell Immunol.* 264:93-96.
- Finnegan, A., S. Ashaye, and K. M. Hamel. 2012. B effector cells in rheumatoid arthritis and experimental arthritis. *Autoimmunity.* 45:353-363.
- Finnegan, S., S. Clarke, D. Gibson, C. McAllister, and M. Rooney. 2011. Synovial membrane immunohistology in early untreated juvenile idiopathic arthritis: differences between clinical subgroups. *Ann Rheum Dis.* 70:1842-1850.
- Fitzgerald, J. E., N. S. Ricalton, A. C. Meyer, S. G. West, H. Kaplan, C. Behrendt, and B. L. Kotzin. 1995. Analysis of clonal CD8+ T cell expansions in normal individuals and patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 154:3538-3547.
- Fraser, J. D., and T. Proft. 2008. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol Rev.* 225:226-243.
- Fremont, D. H., W. A. Hendrickson, P. Marrack, and J. Kappler. 1996. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science.* 272:1001-1004.
- Friedman, S. M., D. N. Posnett, J. R. Tumang, B. C. Cole, and M. K. Crow. 1991. A potential role for microbial superantigens in the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Arthritis Rheum.* 34:468-480.
- Gonzalez, C., P. Abello, R. Cepeda, L. Salazar, O. Aravena, B. Pesce, D. Catalan, and J. C. Aguillon. 2007. Inflammation, synovial angiogenesis and chondroid apoptosis in the evolution of type II collagen-induced arthritis. *Eur Cytokine Netw.* 18:127-135.
- Grom, A. A., and R. Hirsch. 2000. T-cell and T-cell receptor abnormalities in the immunopathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 12:420-424.
- Grom, A. A., K. J. Murray, L. Luyrink, H. Emery, M. H. Passo, D. N. Glass, T. Bowlin, and C. Edwards. 1996. Patterns of expression of tumor necrosis factor alpha, tumor necrosis factor beta, and their receptors in synovia of patients with juvenile rheumatoid arthritis and juvenile spondylarthropathy. *Arthritis Rheum.* 39:1703-1710.
- Gross, U., A. K. Schroder, R. S. Haylett, S. Arlt, and L. Rink. 2006. The superantigen staphylococcal enterotoxin A (SEA) and monoclonal antibody L243 share a common epitope but differ in their ability to induce apoptosis via MHC-II. *Immunobiology.* 211:807-814.
- Hahn, Y. S., and J. G. Kim. 2010. Pathogenesis and clinical manifestations of juvenile rheumatoid arthritis. *Korean J Pediatr.* 53:921-930.
- Hashimoto, M., and T. Mimori. 2012. [Role of Th17 cells and innate immunity for the induction of autoimmune arthritis]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* 35:463-469.
- He, X. W., J. Goronzy, and C. Weyand. 1992. Selective induction of rheumatoid factors by superantigens and human helper T cells. *J Clin Invest.* 89:673-680.
- Hirota, K., M. Hashimoto, H. Yoshitomi, S. Tanaka, T. Nomura, T. Yamaguchi, Y. Iwakura, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. 2007. T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17+ Th cells that cause

- autoimmune arthritis. *J Exp Med.* 204:41-47.
- Hopkins, P. A., J. D. Fraser, A. C. Pridmore, H. H. Russell, R. C. Read, and S. Sriskandan. 2005. Superantigen recognition by HLA class II on monocytes up-regulates toll-like receptor 4 and enhances proinflammatory responses to endotoxin. *Blood.* 105:3655-3662.
- Hsiao, F. C., M. Lin, A. Tai, G. Chen, and B. T. Huber. 2006. Cutting edge: Epstein-Barr virus transactivates the HERV-K18 superantigen by docking to the human complement receptor 2 (CD21) on primary B cells. *J Immunol.* 177:2056-2060.
- Hu, Y., W. Cheng, W. Cai, Y. Yue, J. Li, and P. Zhang. 2012. Advances in research on animal models of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.*
- Huang, J. L. 2012. New advances in juvenile idiopathic arthritis. *Chang Gung Med J.* 35:1-14.
- Imboden, J. B. 2009. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annu Rev Pathol.* 4:417-434.
- Izcue, A., G. Morales, S. Minguet, A. Sanchez-Movilla, P. Morales, J. A. Martinez-M, M. L. Gaspar, and M. A. Marcos. 2001. Both B and gammadelta TCR(+) lymphocytes regulate alphabeta TCR(+) lymphocytes involved in superantigen specific responses. *Eur J Immunol.* 31:2811-2817.
- Jaakkola, J. J., and M. Gissler. 2005. Maternal smoking in pregnancy as a determinant of rheumatoid arthritis and other inflammatory polyarthropathies during the first 7 years of life. *Int J Epidemiol.* 34:664-671.
- Jansson, A. M., J. C. Lorentzen, and A. Bucht. 2000. CD8+ cells suppress oil-induced arthritis. *Clin Exp Immunol.* 120:532-536.
- Julius, M., C. R. Maroun, and L. Haughn. 1993. Distinct roles for CD4 and CD8 as co-receptors in antigen receptor signalling. *Immunol Today.* 14:177-183.
- Kammouni, W., K. Wong, G. Ma, G. S. Firestein, S. B. Gibson, and H. S. El-Gabalawy. 2007. Regulation of apoptosis in fibroblast-like synoviocytes by the hypoxia-induced Bcl-2 family member Bcl-2/adenovirus E1B 19-kd protein-interacting protein 3. *Arthritis Rheum.* 56:2854-2863.
- Kawakami, A., N. Matsuoka, M. Tsuboi, S. Urayama, T. Nakashima, Y. Kawabe, T. Koji, T. Aoyagi, K. Maeda, and K. Eguchi. 1998. CD4+ T-cell-mediated cytotoxicity against staphylococcal enterotoxin B-pulsed synovial cells. *Immunology.* 95:38-46.
- Kinne, R. W., B. Stuhlmuller, and G. R. Burmester. 2007. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Res Ther.* 9:224.
- Klintman, D., X. Li, T. Sato, Y. Wang, B. Jeppsson, and H. Thorlacius. 2004. Staphylococcal enterotoxin A-induced hepatotoxicity is predominantly mediated by Fas ligand (CD95L). *Ann Surg.* 240:1065-72; discussion 1072.
- Knoerzer, D. B., M. G. Donovan, B. D. Schwartz, and L. J. Mengle-Gaw. 1997. Clinical and histological assessment of collagen-induced arthritis progression in the diabetes-resistant BB/Wor rat. *Toxicol Pathol.* 25:13-19.
- Kornhuber, M. E., C. Ganz, R. Lang, T. Brill, and W. Schmahl. 2002. Focal encephalitis in the Lewis rat induced by intracerebral enterotoxin superantigen and amplified by activated intravenous splenocytes. *Neurosci Lett.* 324:93-96.
- Kotzin, B. L. 2005. The role of B cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl.* 73:14-8; discussion 29.
- Kraft, M., S. Filsinger, K. L. Kramer, D. Kabelitz, G. M. Hansch, and M. Schoels. 1998. Synovial fibroblasts as target cells for staphylococcal enterotoxin-induced T-cell cytotoxicity. *Immunology.* 93:20-25.
- Kuhns, M. S., and H. B. Badgandi. 2012. Piecing together the family portrait of TCR-CD3 complexes. *Immunol Rev.* 250:120-143.

- Kummer, J. A., P. P. Tak, B. M. Brinkman, A. A. van Tilborg, A. M. Kamp, C. L. Verweij, M. R. Daha, A. E. Meinders, C. E. Hack, and F. C. Breedveld. 1994. Expression of granzymes A and B in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Immunol Immunopathol.* 73:88-95.
- Kutukculer, N., S. Caglayan, and F. Aydogdu. 1998. Study of pro-inflammatory (TNF-alpha, IL-1alpha, IL-6) and T-cell-derived (IL-2, IL-4) cytokines in plasma and synovial fluid of patients with juvenile chronic arthritis: correlations with clinical and laboratory parameters. *Clin Rheumatol.* 17:288-292.
- Leech, M. T., and E. F. Morand. 2013. Fibroblasts and synovial immunity. *Curr Opin Pharmacol.* 13:565-569.
- Li, H., A. Llera, E. L. Malchiodi, and R. A. Mariuzza. 1999. The structural basis of T cell activation by superantigens. *Annu Rev Immunol.* 17:435-466.
- Li, L., and V. A. Boussiotis. 2011. Molecular and functional heterogeneity of T regulatory cells. *Clin Immunol.* 141:244-252.
- Lin, Y. T., C. T. Wang, M. E. Gershwin, and B. L. Chiang. 2011. The pathogenesis of oligoarticular/polyarticular vs systemic juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmun Rev.* 10:482-489.
- Luft, F. C. 2012. Staphylococcus aureus, Toll-like receptors, superantigens, and their derivatives. *J Mol Med (Berl).* 90:1091-1093.
- Macphail, S. 1999. Superantigens: mechanisms by which they may induce, exacerbate and control autoimmune diseases. *Int Rev Immunol.* 18:141-180.
- Mahic, M., K. Henjum, S. Yaqub, B. A. Bjornbeth, K. M. Torgersen, K. Tasken, and E. M. Aandahl. 2008. Generation of highly suppressive adaptive CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells by continuous antigen stimulation. *Eur J Immunol.* 38:640-646.
- Maini, R. N. 1996. The role of cytokines in rheumatoid arthritis. The Croonian Lecture 1995. *J R Coll Physicians Lond.* 30:344-351.
- Makida, R., M. F. Hofer, K. Takase, J. C. Cambier, and D. Y. Leung. 1996. Bacterial superantigens induce V beta-specific T cell receptor internalization. *Mol Immunol.* 33:891-900.
- Maroun, C. R., and M. Julius. 1994. Distinct roles for CD4 and CD8 as co-receptors in T cell receptor signalling. *Eur J Immunol.* 24:959-966.
- Marzan, K. A., and B. Shaham. 2012. Early juvenile idiopathic arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 38:355-372.
- Massa, M., F. Mazzoli, P. Pignatti, F. De Benedetti, M. Passalia, S. Viola, R. Samodal, A. La Cava, F. Giannoni, W. Ollier, A. Martini, and S. Albani. 2002. Proinflammatory responses to self HLA epitopes are triggered by molecular mimicry to Epstein-Barr virus proteins in oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 46:2721-2729.
- Matsui, Y. 1987. Increased density of class I major histocompatibility complex antigens and decreased density of T-cell differentiation antigens in the early stages of T-cell activation. *Hum Immunol.* 18:123-133.
- Meng, L., W. Zhu, C. Jiang, X. He, W. Hou, F. Zheng, R. Holmdahl, and S. Lu. 2010. Toll-like receptor 3 upregulation in macrophages participates in the initiation and maintenance of pristane-induced arthritis in rats. *Arthritis Res Ther.* 12:R103.
- Meyer, D. M., M. I. Jesson, X. Li, M. M. Elrick, C. L. Funckes-Shippy, J. D. Warner, C. J. Gross, M. E. Dowty, S. K. Ramaiah, J. L. Hirsch, M. J. Saabye, J. L. Barks, N. Kishore, and D. L. Morris. 2010. Anti-inflammatory activity and neutrophil reductions mediated by the JAK1/JAK3 inhibitor, CP-690,550, in rat adjuvant-induced arthritis. *J Inflamm (Lond).* 7:41.
- Mor, A., S. B. Abramson, and M. H. Pillinger. 2005. The fibroblast-like synovial cell in

- rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol.* 115:118-128.
- Morbach, H., V. Wiegering, P. Richl, T. Schwarz, N. Suffa, E. M. Eichhorn, M. Eyrich, and H. J. Girschick. 2011. Activated memory B cells may function as antigen-presenting cells in the joints of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 63:3458-3466.
- Morita, C. T., H. Li, J. G. Lamphear, R. R. Rich, J. D. Fraser, R. A. Mariuzza, and H. K. Lee. 2001. Superantigen recognition by gammadelta T cells: SEA recognition site for human Vgamma2 T cell receptors. *Immunity.* 14:331-344.
- Mountz, J. D., H. C. Hsu, Y. Matsuki, and H. G. Zhang. 2001. Apoptosis and rheumatoid arthritis: past, present, and future directions. *Curr Rheumatol Rep.* 3:70-78.
- Muller-Ladner, U. 1995. T cell-independent cellular pathways of rheumatoid joint destruction. *Curr Opin Rheumatol.* 7:222-228.
- Murray, K. J., L. Luyrink, A. A. Grom, M. H. Passo, H. Emery, D. Witte, and D. N. Glass. 1996. Immunohistological characteristics of T cell infiltrates in different forms of childhood onset chronic arthritis. *J Rheumatol.* 23:2116-2124.
- Nagahara, M., Y. Waguri-Nagaya, T. Yamagami, M. Aoyama, T. Tada, K. Inoue, K. Asai, and T. Otsuka. 2010. TNF-alpha-induced aquaporin 9 in synoviocytes from patients with OA and RA. *Rheumatology (Oxford).* 49:898-906.
- Nakajima, T., H. Aono, T. Hasunuma, K. Yamamoto, T. Shirai, K. Hirohata, and K. Nishioka. 1995. Apoptosis and functional Fas antigen in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum.* 38:485-491.
- Naldini, A., A. Pucci, C. Bernini, and F. Carraro. 2003. Regulation of angiogenesis by Th1- and Th2-type cytokines. *Curr Pharm Des.* 9:511-519.
- Nanki, T., K. Hayashida, H. S. El-Gabalawy, S. Suson, K. Shi, H. J. Girschick, S. Yavuz, and P. E. Lipsky. 2000. Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol.* 165:6590-6598.
- Neumann, E., S. Lefevre, B. Zimmermann, S. Gay, and U. Muller-Ladner. 2010. Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. *Trends Mol Med.* 16:458-468.
- Niedergang, F., A. Hemar, C. R. Hewitt, M. J. Owen, A. Dautry-Varsat, and A. Alcover. 1995. The Staphylococcus aureus enterotoxin B superantigen induces specific T cell receptor down-regulation by increasing its internalization. *J Biol Chem.* 270:12839-12845.
- O'Connell, F. P., J. L. Pinkus, and G. S. Pinkus. 2004. CD138 (syndecan-1), a plasma cell marker immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 121:254-263.
- Oguz, F., C. Akdeniz, E. Unuvar, O. Kucukbasmaci, and M. Sidal. 2002. Parvovirus B19 in the acute arthropathies and juvenile rheumatoid arthritis. *J Paediatr Child Health.* 38:358-362.
- Omoe, K., W. Nunomura, H. Kato, Z. J. Li, O. Igarashi, M. Araake, K. Sano, H. K. Ono, Y. Abe, D. L. Hu, A. Nakane, H. Kiyono, Y. Takakuwa, K. Shinagawa, T. Uchiyama, and K. Imanishi. 2010. High affinity of interaction between superantigen and T cell receptor Vbeta molecules induces a high level and prolonged expansion of superantigen-reactive CD4+ T cells. *J Biol Chem.* 285:30427-30435.
- Origuchi, T., K. Eguchi, Y. Kawabe, A. Mizokami, H. Ida, and S. Nagataki. 1995. Synovial cells are potent antigen-presenting cells for superantigen, staphylococcal enterotoxin B (SEB). *Clin Exp Immunol.* 99:345-351.

- Pap, T., U. Muller-Ladner, R. E. Gay, and S. Gay. 2000. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2:361-367.
- Papageorgiou, A. C., and K. R. Acharya. 2000. Microbial superantigens: from structure to function. *Trends Microbiol.* 8:369-375.
- Posnett, D. N., and A. A. Yarilina. 2001. Sleeping with the enemy--endogenous superantigens in humans. *Immunity.* 15:503-506.
- Pratt, A. G., J. D. Isaacs, and D. L. Matthey. 2009. Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 23:37-48.
- Ravelli, A., and A. Martini. 2007. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet.* 369:767-778.
- Reynier, F., T. Verjat, F. Turrel, P. E. Imbert, H. Marotte, B. Mougin, and P. Miossec. 2009a. Increase in human endogenous retrovirus HERV-K (HML-2) viral load in active rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol.* 70:295-299.
- Reynier, F., T. Verjat, F. Turrel, P. E. Imbert, H. Marotte, B. Mougin, and P. Miossec. 2009b. Increase in human endogenous retrovirus HERV-K (HML-2) viral load in active rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol.* 70:295-299.
- Sakkas, L. I., and C. D. Platsoucas. 1995. Immunopathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis: role of T cells and MHC. *Immunol Res.* 14:218-236.
- Salmon, M., D. Scheel-Toellner, A. P. Huissoon, D. Pilling, N. Shamsadeen, H. Hyde, A. D. D'Angeac, P. A. Bacon, P. Emery, and A. N. Akbar. 1997. Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium. *J Clin Invest.* 99:439-446.
- Schiffenbauer, J. 1999. Superantigens and their role in autoimmune disorders. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 47:17-24.
- Scola, M. P., T. Imagawa, G. P. Boivin, E. H. Giannini, D. N. Glass, R. Hirsch, and A. A. Grom. 2001. Expression of angiogenic factors in juvenile rheumatoid arthritis: correlation with revascularization of human synovium engrafted into SCID mice. *Arthritis Rheum.* 44:794-801.
- Scott, D. L., F. Wolfe, and T. W. Huizinga. 2010. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 376:1094-1108.
- Sediva, A., J. Hoza, D. Nemcova, D. Pospisilova, J. Bartunkova, and J. Vencovsky. 2001. Immunological investigation in children with juvenile chronic arthritis. *Med Sci Monit.* 7:99-104.
- Shlomchik, M. J., J. E. Craft, and M. J. Mamula. 2001. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol.* 1:147-153.
- Sibilia, J., C. Sordet, D. Mrabet, and D. Wachsmann. 2005. [Understanding rheumatoid arthritis]. *Rev Prat.* 55:2134-2142.
- Sicat, J., N. Sutkowski, and B. T. Huber. 2005. Expression of human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen is elevated in juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 32:1821-1831.
- Silverman, E. D., B. Isacovics, D. Petsche, and R. M. Laxer. 1993. Synovial fluid cells in juvenile arthritis: evidence of selective T cell migration to inflamed tissue. *Clin Exp Immunol.* 91:90-95.
- Silverman, E. D., C. Somma, M. M. Khan, K. L. Melmon, and E. G. Engleman. 1990. Abnormal T suppressor cell function in juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 33:205-211.
- Silverman, G. J., and D. A. Carson. 2003. Roles of B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 5 Suppl 4:S1-S6.
- Smith, M. D., D. Baeten, A. K. Ulfgren, I. B. McInnes, O. Fitzgerald, B. Bresnihan, P. P. Tak, and D. Veale. 2006. Standardisation of synovial tissue infiltrate analysis: how far have we come? How much further do we need to go? *Ann Rheum Dis.* 65:93-100.

- Smith, R. S., T. J. Smith, T. M. Blieden, and R. P. Phipps. 1997. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol.* 151:317-322.
- Soden, M., M. Rooney, A. Cullen, A. Whelan, C. Feighery, and B. Bresnihan. 1989. Immunohistological features in the synovium obtained from clinically uninvolved knee joints of patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 28:287-292.
- Sutkowski, N., B. Conrad, D. A. Thorley-Lawson, and B. T. Huber. 2001. Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity.* 15:579-589.
- Szekanecz, Z., T. Besenyei, A. Szentpetery, and A. E. Koch. 2010. Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 22:299-306.
- Tada, Y., A. Ho, D. R. Koh, and T. W. Mak. 1996. Collagen-induced arthritis in CD4- or CD8-deficient mice: CD8+ T cells play a role in initiation and regulate recovery phase of collagen-induced arthritis. *J Immunol.* 156:4520-4526.
- Tak, P. P., J. A. Kummer, C. E. Hack, M. R. Daha, T. J. Smeets, G. W. Erkelens, A. E. Meinders, P. M. Kluin, and F. C. Breedveld. 1994. Granzyme-positive cytotoxic cells are specifically increased in early rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 37:1735-1743.
- Taylor, A. L., E. L. Cross, and M. J. Llewelyn. 2012. Induction of contact-dependent CD8(+) regulatory T cells through stimulation with staphylococcal and streptococcal superantigens. *Immunology.* 135:158-167.
- Thomas, R., M. McIlraith, L. S. Davis, and P. E. Lipsky. 1992. Rheumatoid synovium is enriched in CD45RBdim mature memory T cells that are potent helpers for B cell differentiation. *Arthritis Rheum.* 35:1455-1465.
- Tiedemann, R. E., and J. D. Fraser. 1996. Cross-linking of MHC class II molecules by staphylococcal enterotoxin A is essential for antigen-presenting cell and T cell activation. *J Immunol.* 157:3958-3966.
- Torlakovic, E., G. Torlakovic, P. L. Nguyen, R. D. Brunning, and J. Delabie. 2002. The value of anti-pax-5 immunostaining in routinely fixed and paraffin-embedded sections: a novel pan pre-B and B-cell marker. *Am J Surg Pathol.* 26:1343-1350.
- Tran, C. N., S. K. Lundy, and D. A. Fox. 2005. Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology.* 12:183-189.
- Tugnet, N., P. Rylance, D. Roden, M. Trela, and P. Nelson. 2013. Human Endogenous Retroviruses (HERVs) and Autoimmune Rheumatic Disease: Is There a Link? *Open Rheumatol J.* 7:13-21.
- van de Sande, M. G., M. J. de Hair, C. van der Leij, P. L. Klarenbeek, W. H. Bos, M. D. Smith, M. Maas, N. de Vries, D. van Schaardenburg, B. A. Dijkmans, D. M. Gerlag, and P. P. Tak. 2011. Different stages of rheumatoid arthritis: features of the synovium in the preclinical phase. *Ann Rheum Dis.* 70:772-777.
- Vingsbo, C., R. Jonsson, and R. Holmdahl. 1995. Avridine-induced arthritis in rats; a T cell-dependent chronic disease influenced both by MHC genes and by non-MHC genes. *Clin Exp Immunol.* 99:359-363.
- von Essen, M., C. M. Bonfeld, V. Siersma, A. B. Rasmussen, J. P. Lauritsen, B. L. Nielsen, and C. Geisler. 2004. Constitutive and ligand-induced TCR degradation. *J Immunol.* 173:384-393.
- Wang, F., W. Tan, D. Guo, and S. He. 2007. Reduction of CD4 positive T cells and improvement of pathological changes of collagen-induced arthritis by FTY720. *Eur J Pharmacol.* 573:230-240.
- Wang, J. H., and E. L. Reinherz. 2002. Structural basis of T cell recognition of peptides bound to MHC molecules. *Mol Immunol.* 38:1039-1049.
- Webb, S. R., and N. R. Gascoigne. 1994. T-cell activation by superantigens. *Curr Opin*

- Immunol.* 6:467-475.
- Wong, P., and E. G. Pamer. 2003. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol.* 21:29-70.
- Yamamura, Y., R. Gupta, Y. Morita, X. He, R. Pai, J. Endres, A. Freiberg, K. Chung, and D. A. Fox. 2001. Effector function of resting T cells: activation of synovial fibroblasts. *J Immunol.* 166:2270-2275.
- Yamanishi, Y., D. L. Boyle, M. J. Pinkoski, A. Mahboubi, T. Lin, Z. Han, N. J. Zvaifler, D. R. Green, and G. S. Firestein. 2002. Regulation of joint destruction and inflammation by p53 in collagen-induced arthritis. *Am J Pathol.* 160:123-130.
- Yanni, G., A. Whelan, C. Feighery, and B. Bresnihan. 1992. Analysis of cell populations in rheumatoid arthritis synovial tissues. *Semin Arthritis Rheum.* 21:393-399.
- Ziff, M. 1989. Pathways of mononuclear cell infiltration in rheumatoid synovitis. *Rheumatol Int.* 9:97-103.

7 Thesen

1. Ursache und Pathogenese der rheumatoiden Arthritis sind weitgehend unbekannt. Neben einer sog. chronischen Autoimmunreaktion kommt u.a. in Betracht, dass infektaergische Mechanismen oder auch humane endogene Retroviren (HERV) eine Rolle spielen.
2. HERV kodieren für Hüllproteine. Diese können superantigene Eigenschaften besitzen und daher für die Entzündungsreaktion bei rheumatoider Arthritis eine Bedeutung besitzen.
3. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde anstelle der (nicht verfügbaren) HERV-Hüllproteine das Superantigen Staphylokokkenterotoxin A (SEA) eingesetzt, um eine Arthritis auszulösen.
4. Die Injektion von SEA in das rechte Kniegelenk führt zu einer entzündlichen Rundzellinfiltration und Verdickung der gleichseitigen Synovialmembran, und zwar insbesondere im Bereich des oberen Recessus und der Menisci.
5. Das Entzündungsinfiltrat ist von CD8+T-Lymphozyten dominiert. Die Anzahl der CD3+ und CD4+T-Lymphozyten steigt im Verlauf, insbesondere die initial niedrige Anzahl der CD3+T-Lymphozyten wird auf eine direkte Wirkung des Superantigens SEA zurückgeführt.
6. Die Anzahl der MHC-II+Zellen steigt im Bereich der entzündeten Synovialmembran kontinuierlich im zeitlichen Verlauf an, wohingegen die Anzahl der MHC-I+Zellen ab dem zweiten Untersuchungszeitpunkt (Tag 5 nach SEA-Injektion) sinkt.
7. Das Maximum der Entzündungsaktivität liegt an Tag 5 nach intraartikulärer Injektion des SEA links. Im Bereich der Kontrollgruppe (Injektion des Lösungsmittels) findet sich eine signifikant schwächere Entzündung.
8. Die Wirkung des Superantigens SEA geht auf Präsentation des MHC-II an die V β -Region des T-Zellrezeptors zurück. Im Bereich der Synovialmembran erfolgt die Antigenpräsentation mutmaßlich über Fibrozyten an die o.g. Lymphozyten, die die Entzündung unterhalten.
9. Die histopathologischen Charakteristika der Arthritis nach SEA-Injektion sind der bei rheumatoider Arthritis und auch bei der experimentellen autoimmunen Arthritis nach Kollagen-II-Immunisierung sehr ähnlich.
10. Das hier erstmalig vorgestellte Modell der SAg-Arthritis mit SEA könnte einer HERV-Superantigen Arthritis entsprechen. Aus diesem Grund erscheint es viel versprechend zu sein, dieser Möglichkeit der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis weiter nachzugehen.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Tomuschat, Christian
Geburtsdatum-/ort: 13.04.1982 - Dessau
Familienstand: ledig
Nationalität: Deutsch

Ausbildung

08/93 - 07/00 Gymnasium "Ludwigsgymnasium" - Köthen

Zivildienst

10/00 - 08/01 Städtisches Klinikum Dessau

Universität

08/01 - 12/07 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
03/07 - 08/07 Tel-Aviv University/Sackler Faculty of Medicine

Studien und praktische Erfahrung

10/01 - 12/07 Medizinische Hochschule - Martin-Luther-Universität
03/04 - 03/04 Allgemein - und Visceralchirurgie Berufsgenossenschaftliche
Kliniken (Dr. med. Zaage)
07/04 - 08/04 Klinik für Innere Medizin, Bereich Kardiologie Städtisches Klinikum
Dessau (Prof. Dr. med. Plauth)
01/05 - 03/05 Tropenmedizinischer Lehrgang - Universität Leipzig
(Prof. Dr. med. Schubert)

07/05 - 08/05	ambulante Pädiatrie mit Schwerpunkt Asthmaerkrankungen, Pulmologie
08/05 - 09/05	Universitätsklinik und Poliklinik für Pädiatrische Kardiologie (Prof. Dr. med. Grabitz)
02/06 - 04/06	Department of Orthopaedic Surgery (Assaf Harofeh Medical Center", Sackler University Tel Aviv)

Praktisches Jahr

08/06 - 12/06	Block I (Chirurgie) Allgemein – und Visceralchirurgie Berufsgenossenschaftliche Kliniken Bergmansstr. 10 (Dr. med. Zaage)
12/06 - 04/07	Block II (Pädiatrie) Universitätsklinik - und Poliklinik für Kinder - und Jugendmedizin Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Prof. Dr. med. Körholz
04/07 - 08/07	Block III (Innere Medizin) Beilinson Hospital-Rabin Medical Center, Petach Tikva, Israel, Davidoff Center, Sackler University Tel Aviv Prof. Sulkes

Assistenzarzt

04/08 – 08/09 -	St. Elisabeth und St. Barbara Halle (Saale) - Kinderchirurgie Dr. med. P. Göbel
01/09 – 08/10 -	St. Elisabeth und St. Barbara Halle (Saale) - Pädiatrie PD Dr. med. L. Patzer
09/10 – 03/11 -	St. Elisabeth und St. Barbara Halle (Saale) - Kinderchirurgie Dr. med. P. Göbel

- 4/11 – 12/11 - Universitätsklinik und Poliklinik für Kinderchirurgie
Halle (Saale) - Kinderchirurgie – Prof. Dr. med. R. Finke
- 01/12 – 6/12 - Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder und -
Jugendmedizin/Intensivmedizin - Prof. Dr. med. D. Körholz
- 7/12 - 3/13 - Universitätsklinik und Poliklinik für Kinderchirurgie
Halle (Saale) - Kinderchirurgie - Prof. Dr. med. R. Finke
- 4/13 – 3/14 - Tygerberg Children’s Hospital/Stellenbosch University - Cape
Town/South Africa – Paediatric Surgery
Prof. Dr. S. Moore/Prof. Dr. D. Sidler
- 4/14 – aktuell - Universitätsklinik und Poliklinik für Kinderchirurgie Halle (Saale) -
Kinderchirurgie - Prof. Dr. med. R. Finke

Selbständigkeitserklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Es fanden keine früheren Promotionsversuche statt. Die Arbeit ist bisher weder im In - noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungskommission vorgelegt worden.

Halle an der Saale,

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir bei der Realisierung dieser Arbeit behilflich waren.

Für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betratung und die unermüdliche Unterstützung möchte ich meinen Betreuern Herrn Prof. Dr. med. R. Finke, Direktor der Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie und insbesondere Prof. Dr. med. M. Kornhuber, Oberarzt in der Universitätsklinik für Neurologie, recht herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Angela Rosemeyer für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen sowie für einige sehr hilfreiche Anregungen.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. med. A. Emmer und Dr. med. K. Gerlach für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Durchführung und praktischen Realisierung der Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei den Freunden und Kollegen bedanken, die mich moralisch unterstützten, besonderen Dank hierbei an Dorothee Altmann die mir in schwierigen Zeiten immer zur Seite stand.

Der größte Dank gilt meiner lieben Familie, die mir dies alles ermöglicht hat.