

Medizinische Fakultät der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Immunhistochemische Untersuchungen der Zell-Antigene CD3, CD4,  
CD8, CD 138, Pan-B-Zellmarker, MHC I und MHC II nach intraartikulärer  
Injektion des Superantigens gp120  
am Tiermodell der Superantigen-Arthritis.**

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

von Jakob Gerhardt

geboren am 17.10.1988 in Jena

Betreuer: Prof. Dr. med. habil. Rainer Finke

Gutachter\*innen:

- Prof. Dr. Rainer Finke
- Prof. Dr. Malte Kronhuber
- Prof. Dr. Felicitas Eckoldt-Wolke, Jena

06.10.2020

18.01.2022



## Referat

Die Ätiologie der rheumatoiden Arthritis und der juvenilen idiopathischen Arthritis ist unklar. Bisher wird ganz allgemein von einer autoimmunen Ursache als Erklärung ausgegangen, welche allerdings im Detail betrachtet immer wieder herausgefordert wird. Humane endogene Retroviren (HERV) und Superantigene (SAg) könnten bei der Ätiologie eine entscheidende Rolle spielen. Zur Erforschung von Pathomechanismen und Entwicklung neuer Therapieansätze wurden verschiedene Tiermodelle in der Vergangenheit etabliert. Zuletzt wurde die Superantigen-Arthritis als mögliches Tiermodell entwickelt. Die vorliegende Arbeit greift dieses Modell und die damit verbundene HERV/SAg-Theorie erneut auf. In der vorliegenden Studie erfolgte eine immunhistochemische Untersuchung von Kniegelenken der Lewis-Ratte nach intraartikulären Injektion des Glykoproteins 120. Dabei handelt es sich um ein virales Superantigen und steht dabei anstelle eines HERV-kodierten Proteins. Bei der immunhistochemischen Untersuchung wurden T-Zell-Marker (CD8, CD4, CD3), B-Zell-Marker (CD138, Pan-B-Zell-Marker) und MHC-Marker verwendet. Die Untersuchung der Oberflächenantigene erfolgte zu fünf verschiedenen Untersuchungszeitpunkten nach intraartikulärer Injektion des SAg. Zuvor erfolgten die aufwändige Entkalkung und Herstellung der Paraffinschnitte. Nach Auswertung der Präparate zeigte sich in dem mit SAg behandelten Tieren eine Arthritis. Das immunhistochemische Bild ähnelt dem Erscheinungsbild der Arthritis nach Injektion des T-Zell-SAg Staphylokokken Enterotoxin A stark. Die synoviale Entzündungsreaktion war durch CD8+-Zellen dominiert und auf den oberen Recessus des Kniegelenks konzentriert. Es gab partielle Übereinstimmungen mit Untersuchungsbefunden der juvenilen idiopathischen Arthritis, der rheumatoiden Arthritis und HIV-assoziierten Gelenkerkrankungen. Die vorliegende Arbeit unterstützt eine mögliche HERV/SAg-Hypothese bei autoimmunen Arthritiden.

# INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Rheumatoide Arthritis	1
1.2	Juvenile idiopathische Arthritis	3
1.3	Tiermodelle der Arthritis	6
1.4	Synoviozyten	10
1.5	Superantigene	11
1.6	Glykoprotein 120 als Superantigen	15
1.7	Humane endogene Retroviren – HERV	16
1.8	Zielsetzung der Studie	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Materialien	19
2.2	Ablauf der Versuche	24
2.3	Untersuchte Antigene	29
2.4	Auswertung	34
2.5	Fehlerdiskussion	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Allgemeine Befunde	37
3.2	Spezielle Befunde	37

4	Diskussion	44
4.1	Pathophysiologie der gp120-Superantigenarthritis	44
4.2	Superantigenarthritis und HIV-Infektion	50
4.3	Vergleich der Ergebnisse mit Befunden der Staphylokokkenenterotoxin-A (SEA) Superantigenarthritis	51
4.4	Vergleich der Ergebnisse mit Befunden der Kollagen-II-Arthritis	53
4.5	Vergleich der Ergebnisse mit Befunden rheumatoiden Arthritis	54
4.6	Vergleich der Ergebnisse mit Befunden der juvenilen idiopathischen Arthritis	55
4.7	Superantigenarthritis und humane endogene Retroviren	55
5	Zusammenfassung	58
6	Literaturverzeichnis	59
7	Thesen	71
8	Selbstständigkeitserklärung	VIII
9	Danksagung	IX

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1 Interaktion eines Superantigens (SAg, dunkelblau) außerhalb der spezifischen Bindungsregion konventioneller Antigene (Ag, hellblau) am MHC-II-Moleküle und an der variablen  $\beta$ -Kette des TCR 14
- Abb. 2 Bindung eines B-Zell-Superantigens außerhalb der Antigen-Bindungsstelle (\*) für konventionelle Antigen eines Oberflächenimmunglobulins auf einer B-Zelle 15
- Abb. 3 Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Färbemethode.  
1. Spezifische Bindung des Primärantikörpers an das nachzuweisende Oberflächenantigen der Zelle. 2. Bindung des biotinylierten Sekundärantikörpers mit der Antigenbindungsstelle an dem F<sub>c</sub>-Fragment des Primärantikörpers. 3. Enzymatische Reaktion des Chromogens mittels gebundener Horseradish-Peroxidase (HRP) und damit zu einer Einfärbung der Zelloberfläche. 29
- Abb. 4 Schematische Darstellung der Antigenpräsentation der Antigenpräsentierenden Zelle an einen CD4+T-Lymphozyt 31
- Abb. 5 Schematische Darstellung der Antigenpräsentation der Antigenpräsentierenden Zelle an einen CD8+T-Lymphozyt 32

- Abb. 6 Synoviale Zellpopulation von CD3-, CD 4- und CD8-  
+-Zellen zu den fünf Untersuchungszeitpunkten  
(A=Tag 1, B=Tag 3, C=Tag 6, D=Tag 10, E=Tag 14)  
nach Injektion des SAg gp 120 bzw. NaCl-Lösung  
(Kontrolle). 38
- Abb. 7 Synoviale Zellpopulation von Pan-B-Zell und CD138-  
+-Zellen zu den fünf Untersuchungszeitpunkten  
(A=Tag 1, B=Tag 3, C=Tag 6, D=Tag 10, E=Tag 14)  
nach Injektion des SAg gp 120 bzw. NaCl-Lösung  
(Kontrolle). 39
- Abb. 8 Synoviale Zellpopulation von MHC-I- und MHC-II-+-  
Zellen zu den fünf Untersuchungszeitpunkten  
(A=Tag 1, B=Tag 3, C=Tag 6, D=Tag 10, E=Tag 14)  
nach Injektion des SAg gp 120 bzw. NaCl-lösung  
(Kontrolle). 40
- Abb. 9 HE-Färbung des oberen Recessus mit verdicktem  
Synovialgewebe an Tag 3 nach Injektion von gp 120  
unter 2,5x Vergrößerung. 41
- Abb. 10 HE-Färbung des oberen Recessus an Tag 3 nach  
Injektion von NaCl-Lösung unter 2,5x Vergrößerung. 41
- Abb. 11 Immunhistochemische Färbung des oberen Recessus  
mit CD 8-Antikörpern an Tag 3 nach Injektion von gp  
120 unter 2,5x Vergrößerung. 42

Abb. 12	Immunhistochemische Färbung des oberen Recessus mit CD 8-Antikörpern an Tag 3 nach Injektion von NaCl-Lösung unter 2,5x Vergrößerung.	42
Abb. 13	Immunhistochemische Färbung des oberen Recessus mit CD 8-Antikörpern an Tag 3 nach Injektion von gp 120 unter 10x Vergrößerung.	43
Abb. 14	Modell einer HERV/SAG vermittelten Neurodegeneration und Entzündung (Emmer et al., 2014)	57

## **TABELLENVERZEICHNIS**

Tab. 1	Klassifikationskriterien der International League of Associations of Rheumatology (ILAR) für die JIA (Petty et al., 2001).	5
Tab. 2	Tiermodelle der Arthritis	9
Tab. 3	Verdünnung der Primärantikörper	27



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC	Antigen-präsentierende Zelle
BCR	B-Zellrezeptor
CCP	cyclisches citrulliniertes Peptid
CD	Cluster of differentiation
CIA	Kollagen-II-Arthritis
CMV	Cytomegalievirus
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fc	konstanter Bereich eines Antikörpers
Fc $\epsilon$ RI	hoch-affiner Rezeptor der Fc-Region von Immunglobulin
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden-Faktor
Gp120	Glykoprotein 120
HE	Hämatoxylin-Eosin
HERV	Humane endogene Retroviren
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPF	high power field
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NaOH	Natriumhydroxid
PADI-4	Peptidylarginindeiminase 4
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PGPS	Peptidoglycan-Polysacchariden
PLP	Paraformaldehyd-Lysin-Prejodat
RA	Rheumatoide Arthritis
SAg	Superantigen
SCA	Streptokokken-Zellwand-Arthritis
SEA	Staphylokokken Enterotoxin A
SPA	Staphylokokken Protein A
STAT4	Signalüberträger und -aktivator der Transkription 4
TCR	T-Zellrezeptor
TNF-a	Tumornekrosefaktor alpha
TRAF 1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor assoziierter Faktor 1
UV	ultraviolett

# 1 Einleitung

## 1.1 Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis ist eine entzündliche Systemerkrankung, bei der es zu einer progressiven Gelenkzerstörung kommt. Ihr liegt ein komplexer und noch nicht ganz verstandener Pathomechanismus zu Grunde. Die Trias synoviale Hyperplasie (welche durch die Zunahme ortständiger Fibroblasten und Entzündungszellen verursacht wird), chronische Entzündung und pathologische Immunantwort hat eine Destruktion der Gelenke zur Folge. (Meinecke et al., 2006) Mit einer Prävalenz von 1,6 – 0,6 % ist die rheumatoide Arthritis die häufigste chronisch-entzündliche Gelenkerkrankung Deutschlands. (Hense et al., 2016)

CD4+-Zellen spielen als aktivierte Effektorzellen des Immunsystems eine wichtige Rolle, aber auch der Funktionsverlust von CD4+ -Zellen mit immunmodulierenden Fähigkeiten (CD25+) hat entscheidende Folgen. (Müller et al., 2006) So wird der Verlust der peripheren Toleranz des Immunsystems und eine Chronifizierung des chronisch-entzündlichen Prozess der Erkrankung erklärt. Die zytotoxischen CD8+-T-Zellen tragen offenbar zur Gewebszerstörung bei der RA bei. (Müller et al., 2006) Neben einer Proliferation und verminderten Apoptose von Synoviozyten bilden sich im Bereich der Subintima neue Gefäße. Entzündungszellen, wie B- und T-Lymphozyten, sowie Plasmazellen sind hierbei nachweisbar. (Beaten et al., 2000).

Bisher konnte kein Beweis von Autoantigenen, gegen die sich T-Zellen richten, erbracht werden. Es zeigte sich lediglich das Collagen-II in vitro eine gesteigerte IFN- $\gamma$  Antwort bei T-Zellen von Patienten mit RA auslöst. (Berg et al., 1999)

Entzündungszellen ordnen sich zum einen diffus an, zum anderen werden perivaskuläre und herdartige Infiltrate beobachtet. Generell werden drei typische histologische Befunde beschrieben. Zum häufigsten Muster gehört eine diffuse und eine herdartige Anordnung der Entzündungszellen. Seltener wird eine granulomatöse Entzündung beschrieben. (Gravallese und Monach, 2008) Diese histologischen Muster sind mit typischen Konzentrationen verschiedener

Zytokine assoziiert. (Klimiuk et al., 1997) Zur Pathogenese kommen auch T-Zell-unabhängige Mechanismen hinzu. Die synovialen Fibroblasten werden nicht nur durch Zytokine von Makrophagen und Lymphozyten stimuliert, sondern sind auch selbst für den Unterhalt des Entzündungsprozesses verantwortlich. Wahrscheinlich fungieren die Fibroblasten selbst als antigen-präsentierende Zellen und greifen so in den Prozess der chronischen Entzündung aktiv ein. (Boots et al., 1994) Es wird angenommen, dass es über Freisetzung von matrixzerstörenden Proteinen, wie z. B. Kathepsine und Matrix-Metallproteinase, aus synovialen Fibroblasten zu einer entscheidenden Zerstörung von Knorpel und Knochen kommt. (Meinecke et al., 2006) Ebenso scheinen B-Zellen in der Pathogenese eine Rolle zu spielen. Neben der Autoantikörperproduktion sind auch Zell-Zell-Kontakte zwischen B-Zellen und fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten beschrieben. (Wang et al., 2011) B-Zellen können ebenso wie T-Zellen diffus und herdartige Entzündungsinfiltrate im synovialen Gewebe bilden. (Gravallese und Monach, 2008) Des Weiteren sind B-Zellen in Form von Plasmazellen im Gewebe nachweisbar. Diese Plasmazellen sind für die Produktion von RA typischen Autoantikörpern verantwortlich. Auch neutrophile Granulozyten haben bei der Entzündung des Gelenks eine Bedeutung, hier sind sie allerdings vor allem in der Gelenkflüssigkeit nachzuweisen. Neben den bereits erwähnten Zelltypen spielen auch dendritische Zellen, Mastzellen, natürliche Killerzellen und endovaskuläre Zellen eine Rolle in der Pathogenese der RA. (Gravallese und Monach, 2008)

Genauso unklar wie die Pathogenese scheint auch nach jahrzehntelanger Forschung die Ätiologie der RA zu sein. Nichtsdestotrotz werden viele verschiedene Thesen diskutiert. In Zusammenschau der Befunde kann man bei der Betrachtung der Ursachen zwischen Umweltfaktoren, Genetik und anderen prädisponierenden Faktoren unterscheiden. Dabei sind die genauen Mechanismen, die zur Krankheitsentstehung beitragen noch unklar. Es wird jedoch von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen, bei dem epigenetische, immunologische und biochemische Prozesse eine Rolle spielen. (Chang et al., 2014) Neben den genannten Faktoren scheinen auch Mikroorganismen bei der Pathogenese von Bedeutung zu sein. Hierfür gibt es einige Indizien, so konnten zum Beispiel Antikörper gegen *Proteus mirabilis* und Oberflächenproteine von Mykoplasmen im Serum von RA-Patienten nachgewiesen werden. Des Weiteren scheint der Darm von RA-Patienten ein

anderes Mikrobiom an *E. coli* Subtypen aufzuweisen als bei gesunden Probanden, was die Beteiligung von Bakterien an der Pathogenese der RA vermuten lässt. Auch Viren können mit der Polyarthrit in Zusammenhang gebracht werden. Hierbei sind Parvovirus B-19, Epstein-Barr-Virus (EBV) und das Cytomegalievirus (CMV) zu nennen. (Taneja, 2014)

Bereits 1986 konnten Aho und dessen Kollegen durch Zwillingsstudien zeigen, dass die Genetik als prädisponierender Faktor einen entscheidenden Hinweis bei der Entstehung von RA liefert. (Aho et al., 1986) Es wurden bestimmte HLA-Allele, welche für gemeinsame Epitope von HLA-Proteinen kodieren und mit einem erhöhten Risiko an einer RA zu erkranken assoziiert sind, identifiziert. Durch HLA-Gene konnten nur 30-50% der Erkrankung erklärt werden, so dass auch nach anderen Genen gesucht wurde, die im Zusammenhang mit der Erkrankung stehen konnten. Dabei ist vor allem der HLA-DRB1 Genlokus mit einer RA assoziiert. (Seldin et al., 1999, Gregersen et al., 1987, Nepom et al. 1995) Es gibt andere Gen-Assoziationen außerhalb der HLA-Gene, z.B. STAT4, PADI-4 und TRAF1. (Okada et al., 2014) Ebenso wurde vorangegangene Infektionen, z. B. mit Mykoplasmen, HRV 5 und EBV mit dem Auftreten einer RA in Verbindung gebracht (Carty et al. 2004). Dies ist ein Hinweis dafür, dass Superantigene in der Pathogenese und Ätiologie der RA eine Rolle spielen könnten. (Howell et al., 1991)

## **1.2 Juvenile idiopathische Arthritis**

Die juvenile idiopathische Arthritis (JIA) ist eine im Kindesalter auftretende, chronische (> 6 Wochen) entzündliche Erkrankung der Gelenke. Dabei umfasst die Erkrankung allerdings eine sehr heterogene Gruppe aus sieben Formen. Die Unterformen unterscheiden sich dabei in dem Befallsmuster der Gelenke, der Epidemiologien, der extraartikulären Manifestation, der Laborkonstellation und dem Therapieregime. Die häufigste Form ist die Oligoarthrit. Die Ätiologie der JIA ist unklar. Auch die unterschiedlichen Formen lassen dabei auch mehrere Ursachen der Erkrankung in Betracht kommen. So sind die juvenile Psoriasis-Arthritis und die Entesitis-assoziierte Arthritis mit HLA-B27 vergesellschaftet. (Hersh und Prahalad, 2017) Des Weiteren gibt es Hinweise das virale und bakterielle Infektionen die Erkrankung triggern können. (Rigante et al., 2015)

Die Prävalenz der Erkrankung beträgt 100/100.000 Kinder. (Weiss et al., 2007) Untersucht man das Synovialgewebe von Patienten mit JIA so zeigen sich oligoklonal aktivierte T-Zellen. Damit scheint die JIA durch Antigene ausgelöst und durch T-Zellen vermittelt zu werden. (Grom und Hirsch, 2000) Bei der Analyse der TCR ergibt sich ein Spektrum aus verschiedenen TCR Vb Klonen, wobei Vbeta 8 und Vbeta 20 gehäuft auftreten. (Thompson et al., 1998) Letztlich konnte bisher kein Rückschluss auf ein einzelnes Antigen, welches die oligoklonale T-Zell-Aktivierung auslöst, gezogen werden.

Tab. 1. Klassifikationskriterien der International League of Associations of Rheumatology (ILAR) für die JIA (Petty et al., 2001)

<b>JIA-Subgruppen</b>	<b>Definition</b>
<b>Systemische Form</b>	Arthritis und Fieber (intermittierend, Dauer min. 2 Wochen) und mindestens ein weiteres Kriterium:  Flüchtiger erythematöser Hautausschlag, Generalisierte Lymphknotenvergrößerung, Hepato- und Splenomegalie, Serositis
<b>Oligoarthritis</b>	Arthritis von 1-4 Gelenken innerhalb der ersten 6 Erkrankungsmonate  Kumulativ im Verlauf max. 4 Gelenke in den Entzündungsprozess einbezogen ( <b>Persistierend</b> )  Nach den ersten 6 Erkrankungsmonaten werden 5 und mehr Gelenke in den Entzündungsprozess einbezogen ( <b>Erweitert</b> )
<b>Seronegative Polyarthritis</b>	Arthritis in > 4 Gelenken während der ersten 6 Erkrankungsmonate und ein neg. Test auf RF
<b>Seropositive Polyarthritis</b>	Arthritis in > 4 Gelenken während der ersten 6 Erkrankungsmonate und ein pos. Test auf RF
<b>Psoriasis-Arthritis</b>	Arthritis und Psoriasis oder Arthritis oder Psoriasis mit 2 der folgenden Symptome: Daktylitis, Nagelveränderungen, Psoriasis bei einem Verwandten 1. Grades
<b>Enthesitis-assoziierte Arthritis</b>	Arthritis und Enthesitis oder Arthritis oder Enthesitis mit 2 der folgenden Symptome: Druckschmerz über dem Iliosakralgelenk und/oder entzündlicher Rückenschmerz lumbosakral, HLA-B27-Nachweis, Junge mit einem Erkrankungsalter > 6 Jahre, akute ant. Uveitis, ankylosierende Spondylitis, EAA, Sakroiliitis bei entzünd. Darmerkrankung, Reiter-Syndrom oder akute ant. Uveitis bei einem Angehörigen 1. Grades
<b>Andere Arthritis</b>	Arthritiden, die nicht eindeutig den definierten Subgruppen 1-6 zugeordnet werden können

### 1.3 Tiermodelle der Arthritis

Tiermodelle der rheumatoiden Arthritis dienen der Erforschung der Pathogenese, Ätiologie, möglicher Therapieansätze und diagnostischer Tests. Die Untersuchung von organpezifischen Effekten und immunologischen Prozessen ist am Modellorganismus im Gegensatz zu zellulär basierten Modellen möglich. Diese Tiermodelle können dabei immer nur einen bestimmten Teil der Erkrankung abbilden. Zur Induktion einer Arthritis gibt es verschiedene Möglichkeiten.

Bereits 1956 konnten Pearson und seine Kollegen eine Arthritis am Tiermodell auslösen. Durch unspezifische Stimulation des Immunsystems mittels einer Emulsion aus Bestandteilen von Mykobakterien und Mineralöl wird diese Reaktion nach 14 Tagen bei bestimmten Rattenstämmen hervorgerufen. (Pearson, 1956) Die verwendete Emulsion wird Freundesches Adjuvans genannt. Nach intrakutaner Injektion inkompletten Freundeschen Adjuvans, das heißt unter Verzicht von Bestandteilen von Mykobakterien, kommt es zu einer langsamer auftretenden und schubförmigen Arthritis. Die so durch mineralische Öle wie z. B. Pristan ausgelöste Arthritis eignet sich deshalb zur Erforschung der Ätiologie und Pathogenese der RA. (Holmdahl et al., 2001)

Ein anderes Modell, das zur Erklärung der entzündlichen Vorgänge im Gelenk herangezogen wird, ist das Collagen-II-Arthritis-Modell. Dabei wird das Versuchstier letztlich mit Collagen-II, welches im Knorpelgewebe ubiquitär vorkommt, immunisiert. Nach circa 10 Tagen kommt es durch einwandern von T-Lymphozyten, Makrophagen und Neutrophilen zum Vollbild einer akuten Arthritis. Wie auch bei der rheumatoiden Arthritis kann eine Beteiligung des Synovialgewebes, im Sinne einer Proliferation der synovialen Fibroblasten, nachgewiesen werden. (Brand et al. 2003, Gonzalez et al 2007) Auch die chronische Gelenkentzündung weist in der Pathohistologie Ähnlichkeiten mit der RA auf. Wie bei der RA zeigt sich eine schwere Gelenkzerstörung mit synovialer Hyperplasie und Bildung von Pannus. (Joosten et al., 1996; Trentham et al., 1977) Die auf Zell- und Molekularebene ablaufenden Prozesse während der Chronifizierung sind offensichtlich ein diffiziles Zusammenspiel



aus T-Zellen und Zytokinen, welches noch nicht ganz verstanden ist. (Brand et al. 2003) In der histologischen Untersuchung konnten Infiltrate von Rundzellen im Bereich des Meniskus gesehen werden. Eine weitere immunhistochemische Untersuchung erfolgte nicht. Des Weiteren kommt es zur Proliferation von Fibroblasten und Synoviozyten Typ A. (Terato et al, 1982)

In Hinblick auf die mögliche Beteiligung von Mikroorganismen bei der Pathogenese der RA hat man Tiermodelle entwickelt, bei denen infektiöse Bestandteile eine Arthritis auslösen können. Die wichtigste Methode ist hier die von Cromartie und dessen Kollegen 1977 durch Zufall entdeckte Streptokokken-Zellwand-Arthritis (SCA). Bei der SCA wird durch eine einmalige intraperitoneale Injektion von Peptidoglycan-Polysacchariden (PGPS), welche aus Zellwänden von Streptokokken der Gruppe A gewonnen werden, vor allem beim weiblichen Ratten eine Arthritis ausgelöst. Zunächst zeigt sich in der akuten Phase (1. – 5. Tag) eine Entzündung mit sichtbarer Schwellung des Gelenks, gefolgt von einer Remission. Im Anschluss kommt es, im Gegensatz zur initialen Phase, zu einer T-zellabhängigen Reaktivierung und Chronifizierung der Entzündung, welche Monate anhalten kann. Histologisch ist die akute Entzündung geprägt von fibrinösem Exsudat, synovialer Hyperplasie, Hypertrophie der *Villi synoviales* und einem entzündlichen Infiltrat aus Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten. Eine weitere immunhistochemische Untersuchung erfolgte nicht. (Kannan et al., 2005; Cromartie, 1977)

Bei den bisher genannten Modellen wurde durch systemische Verabreichung eines Agens eine Arthritis bei den Versuchstieren ausgelöst. Bei der Antigen-induzierten-Arthritis erfolgt nach vorheriger Immunisierung mit Freundschens Adjuvans eine intraartikuläre Injektion mit einem Antigen. Das kann zum Beispiel Fibrin sein. Die Kniegelenke der für den Versuch verwendeten Kaninchen wurden histopathologisch aufgearbeitet. Dabei zeigte sich in den ersten vier Tagen typische Zeichen einer akuten Entzündung sowie eine Verdickung der synovialen Zellschicht und granulozytenreiche Exsudation im Gelenkspalt. Nach circa vier Wochen waren monozytäre Infiltrate mit T- und Plasma-Zellen nachweisbar. (Dumonde und Glynn, 1962)

Neben diesen durch bestimmte Stimuli induzierten Arthritis-Modellen gibt es auch Modelle, welche auf genetischer Manipulation basieren und bei denen transgene Tiere verwendet werden. Dabei sind die TNF-transgene und die IL-1 transgene Arthritis zu nennen.

Wie anfangs bereits erwähnt, haben die beschriebenen Tiermodelle ihre Bedeutung beim Verständnis der RA, sind aber aufgrund der experimentellen Voraussetzungen nur bedingt auf die Realität anwendbar. So werden z. B. beim SCW-Modell die Versuchstiere mit Muramly-di-peptid vorbehandelt, um das Immunsystem zu stimulieren. Bei der Kollagen-induzierten Arthritis wird ebenso Freundesches Adjuvants zur Präimmunisierung eingesetzt. (Rosloniec et al., 2010) Im KRNxNOD-Modell werden immundefiziente, transgene Tiere eingesetzt um eine Arthritis auslösen zu können. (Kouskoff et al., 1996)

Tab. 2: Tiermodelle der Arthritis

<b>Tiermodell</b>	<b>Bestandteil</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verlauf</b>
<b>Öl-induzierte Arthritis</b>	Emulsion aus Mykobakterien und Mineralöl	DA Ratte	Langsame, schubförmige Arthritis
<b>Pristan-induzierte Arthritis</b>	Pristan	DA Ratte	Langsame, schubförmige Arthritis
<b>Collagen-II-Arthritis</b>	Collagen II	DBA Maus	Nach 10 Tagen akute Arthritis, danach Chronifizierung
<b>Streptokokken-Zellwand Arthritis</b>	Peptidoglykan-Polysaccharid aus der Zellwand von Streptokokken	Lewis Ratte	1-5 Tage akute Arthritis, danach Monate anhaltende chronische Entzündung
<b>Antigen-induzierte Arthritis</b>	Freudsches Adjuvans und intraartikuläres Antigen (z.B. bovines Serumalbumin)	Kaninchen, Maus	Nach 4 Wochen monozytäre Infiltrate mit T- und Plasmazellen
<b>IL-1-transgene Arthritis</b>	IL-1 Überexpression	Transgene Maus	4 Wochen nach der Geburt schwere Arthritis

## 1.4 Synoviozyten

Entscheidender Bestandteil eines Gelenks ist die Membrana synovialis – die Auskleidung der Gelenkkapsel. Diese besteht aus zwei Typen von Synoviozyten. Zum einen sind das Synoviozyten Typ A, bei denen es sich um Makrophagen handelt und zum anderen die Synoviozyten Typ B. Die Typ B-Zellen sind synoviale Fibroblasten und machen den Großteil der Gelenkinnenhaut aus. Sie sorgen für eine Produktion von Hyaluron, einem wesentlichen Bestandteil der Synovialflüssigkeit. Die Makrophagen übernehmen im gesunden Gelenk eine Reinigungsfunktion, indem sie Zelldetritus abtragen. Des Weiteren können sie wie Makrophagen in anderen Geweben körperfremde Bestandteile erkennen und phagozytieren. (Iwanaga et al. 2000) Auf diese Weise wirken sie als antigenpräsentierende Zellen und können T-Zellen aktivieren. Über Zytokine und Zell-Zellkontakte wird so das erworbene Immunsystem in Gang gesetzt. Synoviozyten Typ A phagozytieren Proteine und spalten diese durch Proteasen in Peptide im Endolysosomen. Dort werden die fremden Peptide mit MHC-II-Molekülen verbunden und an der Zelloberfläche präsentiert. (Villadangos et al. 2000, Honey et al. 2003) Die Peptide werden an CD4+Zellen präsentiert und können diese aktivieren. Hierzu sind kostimulatorische Signale über CD2 und CD18 notwendig. Bleiben diese Signale aus, kommt es zu einer antigenspezifischen Anergie. Dieser Mechanismus ist wichtig bei der Selbsttoleranz eines Organismus. (Dustin et al. 2002)

Synoviozyten Typ B können über zytosolische Proteine, welche über das Proteasom in Peptide aufgespalten und an MHC I gebunden werden, CD8+Zellen präsentieren. (Craiu et al. 1997) Auch hier sind wieder kostimulierende Signale wie z.B. über die B7:CD28-Bindung notwendig. (Stamper et al. 2001) Von dieser strikten Trennung der Antigenpräsentation von zytosolischen und exogenen Antigenen sind Abweichungen möglich. So können auch phagozytierte exogene Antigene letztlich über MHC-I an CD8+-Zellen präsentiert werden. (Adiko et al. 2015)

## 1.5 Superantigene

Superantigene sind Proteine bakteriellen oder viralen Ursprungs, die eine massive Proliferation von Lymphozyten hervorrufen können. Dabei können sowohl Exotoxine als auch Endotoxine von Bakterien und Hüllproteine von Viren als Superantigene wirken. (Torres et al. 2001) Zum ersten Mal wurde der Begriff 1989 im Zusammenhang mit den Eigenschaften von Staphylokokkentoxinen auf T-Zellen erwähnt. (Kappler et al.,1989) Es wurde eine überschießende Zytokinfreisetzung als Ursache des Toxic-Schock-Syndroms beschrieben. (Todd et al., 1978) Hierbei wurde festgestellt, dass das auslösende Agens ein durch Bakterien produziertes Protein ist. (Bhakdi, 2004) Später entdeckte man die oligoklonale T-Zell-Aktivierung und bezeichnete sie als SAg-Folge.

SAg sind neben dem toxischen Schocksyndrom auch für andere akute Erkrankungen verantwortlich, wie z. B. die Symptome einer Lebensmittelvergiftung. Neben diesen akuten Effekten stehen sie im Verdacht bei chronischen Erkrankungen wie Psoriasis, rheumatoider Arthritis, multipler Sklerose und Diabetes mellitus Typ 1 eine Rolle zu spielen. (Torres et al., 2001, Conrad et al., 1994, Paillard et al. 1994).

Konventionelle exogene Antigene müssen zunächst von einer antigenpräsentierenden Zelle phagozytiert und prozessiert werden, bevor sie über das MHC-II-Klasse-Molekül mit dem am T-Zellrezeptor (TCR) in Kontakt treten. Nur wenn das spezifische Peptid im MHC-II-Molekül von der T-Zelle über den entsprechenden TCR und unter Verstärkung durch den CD4-Rezeptor erkannt wird, kann eine immunologische Reaktion nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip ausgelöst werden. Analog erfolgt die Antigenerkennung endogener Antigene auf dem konventionellen Weg über die Präsentation desselben mit Hilfe des MHC-Moleküls und das CD8-Molekül des TCR. Um die Aktivierung und Differenzierung der naiven T-Zelle zu vervollständigen, sind kostimulierende Signalwege notwendig. Besondere Schlüsselstellen im Aktivierungsweg sind die Interaktionen von CD28 und B7-Molekülen, sowie IL-2:IL-2-Rezeptor Verbindung zu nennen.

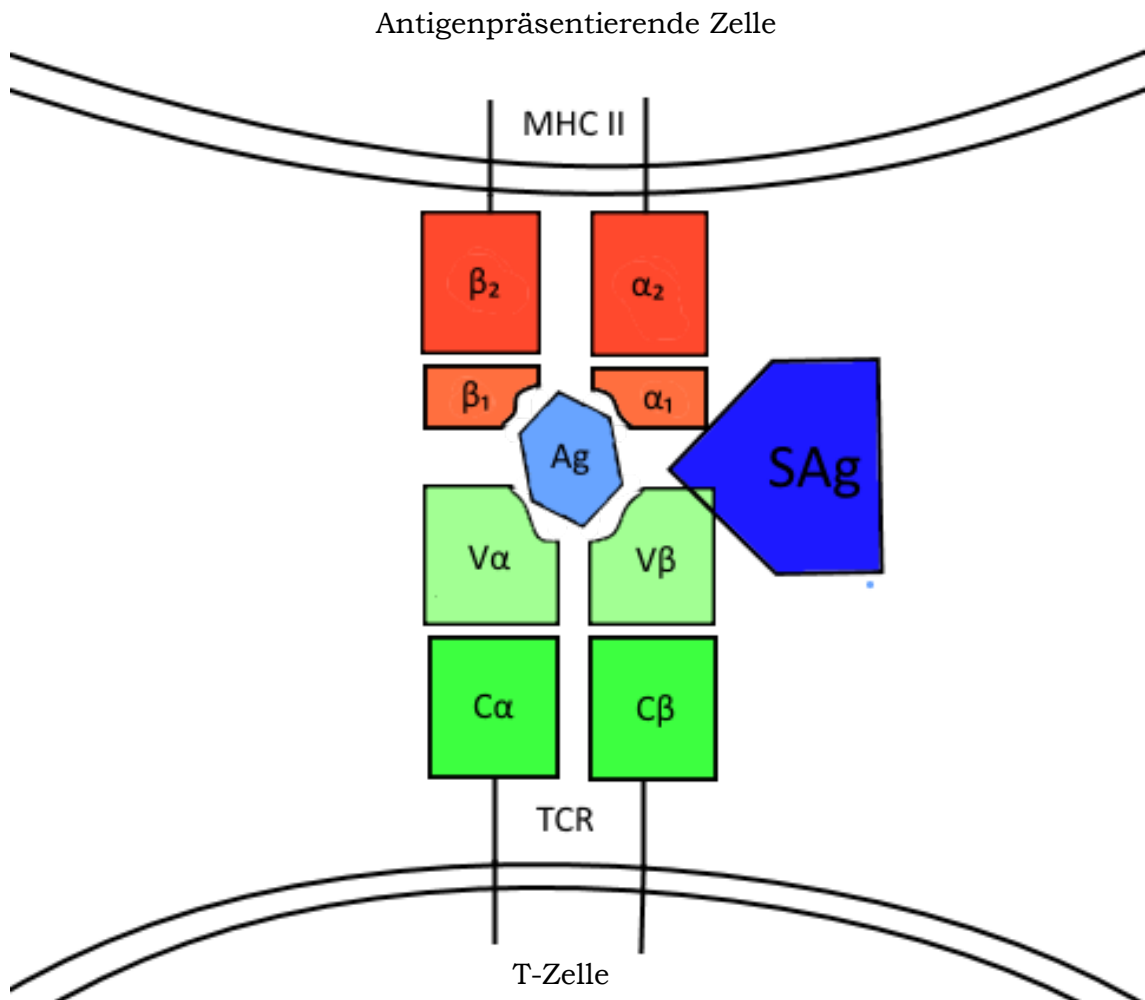
Die Antigenerkennung von Superantigenen unterscheidet sich von den konventionellen Antigenen. Hierbei bindet das vollständige, unprozessierte Protein an den Komplex aus MHC-II-Molekül und TCR (Abbildung 1). Die SAg treten dabei über Bindung an das MHC-Molekül in Kontakt mit der variablen Region der  $\beta$ -Kette der TCR. Wichtig ist dabei, dass die Bindung zwischen MHC-Molekül und Superantigen außerhalb der typischen Antigenbindungsstelle liegt. Auf Grund dieser Interaktion zwischen MHC-Molekül und SAg kann diese Bindung eine massive Zytokinfreisetzung initiieren. Die Aktivierung einer großen Zahl an T-Zellen (bis zu 20 %) ist die Folge. Im Gegensatz zu den konventionellen Antigenen können Superantigene wie z. B. das bakterielle SAg Staphylokokken Enterotoxin A (SEA) die T-Zellen eines Individuums oligoklonal aktivieren. (Fraser et al., 2000, Gonzalo et al., 2001, Appleman et al., 2001) Die Umgehung der T-Zell-Aktivierung nach Präsentation des Antigens nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip führt zu einer oligoklonalen Aktivierung von T-Lymphozyten. Damit kommt es zu einer besonderen, teilweise unkontrollierten Immunreaktion.

Zusammenfassend gibt es verschiedene Möglichkeiten der Interaktion zwischen SAg, TCR und MHC-II-Molekülen: Bindung des SAg an verschiedenen Stellen der variablen  $\beta$ -Kette des TCR oder Bindung im Bereich der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Kette des MHC-II-Moleküls. Seltener tritt die Bindung zwischen SAg und der  $\alpha$ -Kette des TCR auf. Des Weiteren wurde eine Quervernetzung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette der MHC-II-Moleküle beobachtet, welche auch zu einer Aktivierung der Antigen-präsentierenden Zelle führte. (Petersson et al., 2004)

Ebenso wie eine SAg-induzierte T-Zell-Aktivierung wurde eine Aktivierung von B-Zellen nach Kontakt mit SAg beschrieben (Levinson et al., 1995). Als Beispiel für ein virales SAg ist das Glykoprotein 120 (Gp 120) in der Lage membranständige IgM einer humanen B-Zelle zu verbinden und als virales B-Zell-Superantigen zu wirken. (Karray und Zouali, 1997) Diese SAg werden als B-Zell-Superantigene bezeichnet, dazu gehören neben gp 120 das Staphylokokken Protein A (SPA) und ein Sialoprotein, welches Protein Fv genannt wird. (Silverman, 1997) Das Staphylokokken Protein A ist hinsichtlich seiner Bindung am besten erforscht. Es bindet an das Fc Fragment der membranständigen IgG der B-Zelle. (Levinson et al., 1995)

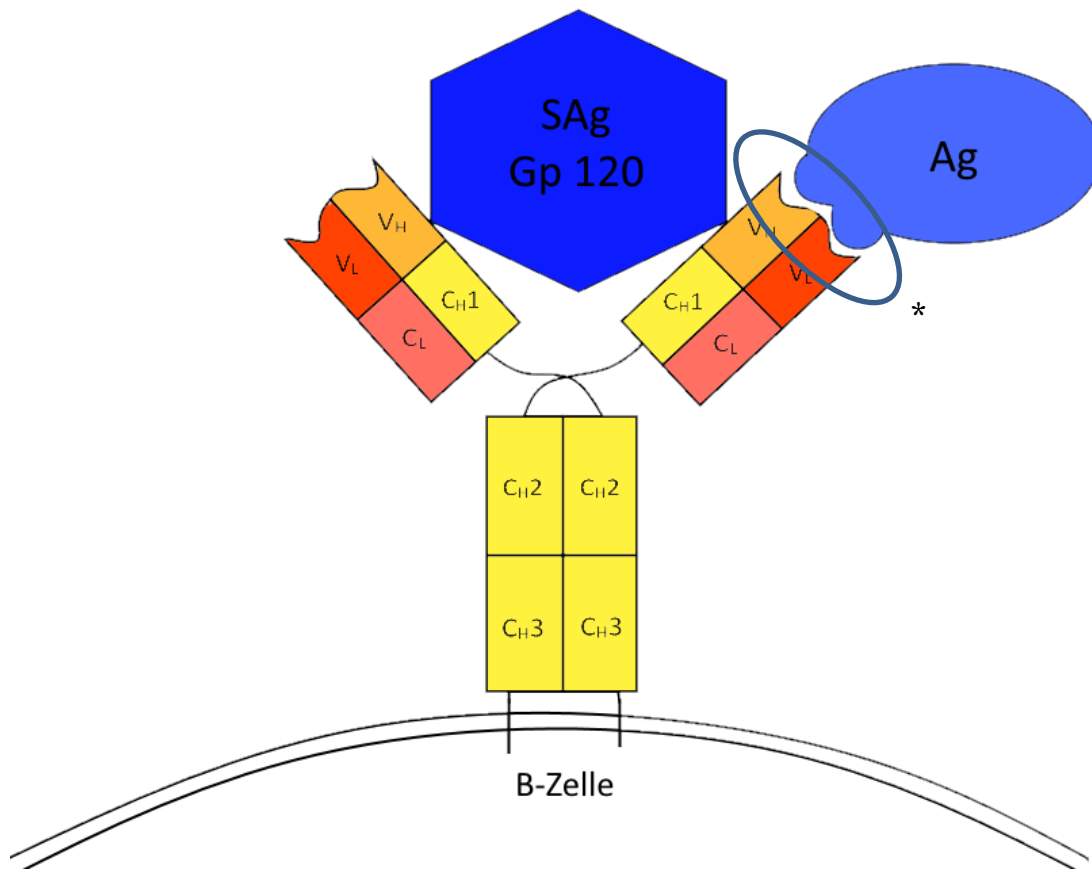
Neben der Aktivierung von B- und T-Lymphozyten werden Faktoren des Komplementsystems aktiviert, bei denen vermutet wird, dass sie eine starke Gewebsentzündung auslösen können. (Levinson et al, 1995) Im Gegensatz dazu werden bei der konventionellen Aktivierung von B-Zellen zwei Signale benötigt. Zunächst muss ein Antigen über den membranständigen Antigenrezeptor gebunden und durch Endozytose internalisiert werden. In einem zweiten Schritt muss durch starke Quervernetzung der membranständigen IgM durch das Antigen selbst oder mit Hilfe einer antigenspezifischen T-Helferzelle die B-Zelle aktiviert werden. Die T-Helferzelle setzt nach Bindung von CD 40 durch dessen Liganden und Erkennung des antigenspezifischen Peptids auf MHC-II-Molekülen Zytokine frei um die B-Zelle zu aktivieren. Zu den Zytokinen gehören IL-4, IL-5 und IL-6. (Cancro et al., 2009)

Neben bakteriellen Exotoxinen können auch Bestandteile von Viren als Superantigene wirken, so z. B. des EBV, des CMV und des murinen Herpesvirus. (Tai und Huber, 2007) Neben diesen Viren zeigt sich auch bei dem Hüllprotein Gp 120 des HIV-1 eine Superantigen-typische Aktivität. Gp 120 bindet an eine große Population (4 - 6%) endogener B-Zellen über membranständige Immunglobuline. In Zellkulturen stimuliert das SAg so B-Zellen und regt diese zur Produktion von Immunglobulinen an. (Berberian et al., 1993) Neben dieser Interaktion mit B-Zellen kann EBV in besonderer Weise zu einer Superantigen-ähnlichen Reaktion führen. Das Virus kann in infizierten B-Lymphozyten das genetisch verschlüsselte HERV-K18 SAg transaktivieren und so indirekt über ein endogenes SAg wirken. (Hsiao et al., 2006)



**Abb. 1** Interaktion eines Superantigens (SAg, dunkelblau) außerhalb der spezifischen Bindungsregion konventioneller Antigene (Ag, hellblau) am MHC-II-Moleküle und an der variablen  $\beta$ -Kette des TCR





**Abb. 2** Bindung eines B-Zell-Superantigens außerhalb der Antigen-Bindungsstelle (\*) für konventionelle Antigenen eines Oberflächenimmunglobulins auf einer B-Zelle

## 1.6 Glykoprotein 120 als Superantigen

In der vorliegenden Arbeit soll die Wirkung des SAg gp120 nach intraartikulärer Injektion bei der Lewis-Ratte untersucht werden.

Gp120 ist ein Glykoprotein, welches sich in der Hülle des HI-Virus befindet. Über eine nicht-kovalente Bindung ist gp120 mit gp41 verbunden und ist 160kD groß. Gp41 sorgt für die transmembrane Bindung in der Virushülle. (Townsend-Fuchs et al., 1997) Mit Hilfe von gp120 kann das HI-Virus über Corezeptoren an CD4+ T-Lymphozyten binden und spielt so eine große Rolle bei der Infektion der T-Zelle mit dem HI-Virus. (Kahn et al. 1998, Dragic et al. 1996)

Um Makrophagen zu infizieren muss das HI-Virus an CD4 und den Chemokin-Rezeptor CCR5 binden. (Alkhatib et al. 1996)

Die Wirkung von gp120 als Superantigen erfolgt über die Bindung an Immunglobuline (Ig) der V<sub>H</sub>-3-Familie. (Townsend-Fuchs et al., 1997) Bei der V<sub>H</sub>-3-Familie handelt es sich um eine Gruppe von Genen, welche für die variable Region der schweren Kette eines Antikörpers kodieren und eine gewisse Homologie aufweisen. (Matsuda et al. 1998) Gp120 ist in der Lage über die schwere variable Kette V<sub>H</sub>-3 des IgM an naive B-Zellen gesunder Individuen zu binden und diese zu aktivieren. Dies geschieht unabhängig von HIV und somit unabhängig von CD4 (Berberian et al., 1993) Konventionelle Antigene können etwa nur  $\leq 0,01\%$  der B-Zellpopulation gleichzeitig aktivieren, während das B-Zell-Superantigen gp120 etwa 2 – 6 % der B-Zellen, in Abhängigkeit von der V<sub>H</sub>-3-Kette des Ig, aktivieren kann. (Townsend-Fuchs et al., 1997) Des Weiteren zeigte sich, dass mittels gp120 basophile FcεRI<sup>+</sup>-Zellen gesunder Individuen aktiviert werden können. Bei FcεRI handelt es sich um einen hoch-affinen IgE-Rezeptor. Die so membrangebundenen IgE interagieren über die V<sub>H</sub>3-Region mit gp120. Infolgedessen kommt es zu einer Ausschüttung der Zytokine IL-4 und IL-13. Diese Ergebnisse zeigen das Vermögen von gp 120, als virales SA<sub>g</sub> zu wirken. (Patella et al., 2000)

## **1.7 Humane endogene Retroviren – HERV**

Endogene Retroviren sind Proviren, welche im Lauf der Evolution in das Genom durch Infektion von Keimbahnzellen gelangten und weitergegeben wurden. Im Gegensatz zu exogenen Retroviren wie dem HI-Virus werden diese Viren nicht exprimiert. (Doerr et al. 2002) Auch im menschlichen Genom kommen solche Proviren vor und werden als humane endogene Retroviren bezeichnet. Der Anteil von retroviralen Elementen im Genom beträgt circa 8 %. (Venter et al., 2001) Trotz ihrer starken Methylierung, sowie Inaktivierung durch Mutationen und der damit fehlenden Expression, haben die HERVs Einfluss auf den menschlichen Organismus. Insbesondere mit Erkrankungen assoziierte HERV, wie z.B. HERV-W, weisen einen fast vollständigen offenen Leserahmen auf und können so für Proteine kodieren. (Doerr et al., 2002, Voisset et al. 2000) So wurde zum Beispiel von HERV kodierte Hüll-Proteine wie Syncitin-1 und

Syncytin-2 bei der Entwicklung der Plazenta und deren immunsuppressive Eigenschaft verantwortlich gemacht. (Kämmerer et al., 2011) Des Weiteren ist eine erhöhte Expression von HERV-K in Melanomen festgestellt worden, so dass es Hinweise gibt das HERVs an der Tumorgenese und/oder Tumorprogression eine Rolle spielen. (Serafino et al., 2009) Auch bei den Autoimmunerkrankungen wie systemischem Lupus erythematoses werden HERVs als mögliche Auslöser dieser Erkrankungen ausfindig gemacht. (Tugnet et al., 2013) Des Weiteren konnten HERV-assoziierte Hüllproteine in Gehirnen von Multiple Sklerose (MS)-Patienten gefunden werden, so dass hier eine auch HERV eine Rolle in der Pathogenese der MS eine Rolle spielen. (Perron et al., 2001; van Horssen et al., 2016) Nicht zuletzt gibt es mehrere Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen HERV und rheumatoider Arthritis. In der Analyse von peripherem Blut von RA-Patienten zeigte sich eine gesteigerte Expression von mRNA, welche für ein Strukturprotein (gag) von HERV K10 kodierten. (Ejtehadi et al., 2006) Im Synovialgewebe von RA-Patienten sind erhöhte Anteile von mRNA Transkripten für HERV K zu messen. (Ehlhardt et al. 2006) Des Weiteren konnte im Tiermodell gezeigt werden das eine retrovirale Infektion zu Arthritiden führte und so eine Assoziation mit HERV hergestellt werden konnte. (Michaels et al., 1991) Wie bereits erwähnt sind HERV in ihrer Expression stark reguliert. Sie können allerdings durch Umwelteinflüsse transaktiviert werden. Das Epstein-Barr Virus (EBV/HHV4) ist in der Lage eine Expression von HERV K-18 Env-Protein zu erzeugen. (Sutkowski et al. 2001) Auch die gesteigerte Exkretion von Zytokinen wie Interferon- $\alpha$  können HERV K-18 transaktivieren. (Stauffer et al. 2001)

## 1.8 Zielsetzung der Studie

1. Induktion einer Entzündungsreaktion im Kniegelenk der Lewis-Ratte nach intraartikulärer Injektion des viralen B-Zell-SAg gp120.
2. Histologische und immunhistochemische Charakterisierung des Entzündungszellinfiltrates des Kniegelenks der Lewis-Ratte im zeitlichen Verlauf für die Antigene CD3, CD4, CD8, CD138, MHC I, MHC II und Pan-B-Zell Marker (Anti- KiB1R).
3. Vergleich der Ergebnisse dieser Studie mit histologischen/immunhistochemischen Befunden von Patienten mit rheumatoider Arthritis bzw. juveniler idiopathischer Arthritis und HIV assoziierten Gelenkerkrankungen.
4. Vergleich der Befunde nach intraartikulärer Injektion des Superantigen Staphylokokkenenterotoxin A im Tiermodell der Lewis-Ratte.
5. Vergleich der histologischen und immunhistochemischen Befunde etablierter Tiermodelle der RA mit dem Tiermodell der vorliegenden Untersuchung.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Aqua dest.	Apotheke des UKH
Citratpuffer (10mmol) ph 6,0	Merck KGaA
EDTA	Roth GmbH & Co. KG
Ethanol	Apotheke des UKH
Glukose	Roth GmbH & Co. KG
Glykoprotein 120	ProSpec Ltd.
Hämalaun	Roth GmbH & Co. KG
Kaiser-Glycerin-Gelatine	Merck KGaA
L-Lysin-Monochlorid	Roth GmbH & Co. KG
Methanol	Roth GmbH & Co. KG
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth GmbH & Co. KG
NaOH	Roth GmbH & Co. KG
Paraffin	Roth GmbH & Co. KG
Paraformaldehyd	Roth GmbH & Co. KG
PBS (phosphate buffered saline, 10 mM)	AppliChem GmbH
Roticlear	Roth GmbH & Co. KG

Sodiumperjodat	Roth GmbH & Co. KG
Verdünnungspuffer für Primärantikörper	Zytomed Systems GmbH
Wasserstoffperoxid (3%)	Merck KGaA
ZytoChem – Plus HRP Polymer – Kit	Zytomed Systems GmbH

## 2.1.2 Antikörper

### 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 gtt. AEC Chromogen + 5ml AEC Buffer)	

### CD4

Primärantikörper:	CD 4 Biozol	Art.Nr. 31179
Polymer-Kit ZytoChem-Plus HRP:	HRP Polymer Anti Rabbit	
	Blocking Solution	
	PostBlock	
	ABC Chromogen/ABC Buffer	
	(2 gtt. 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 gtt. AEC Chromogen + 5ml AEC Buffer)

## CD138

Primärantikörper: CD138 BD Pharmingen™ Art.Nr. 553712

Polymer-Kit ZytoChem-Plus HRP: HRP Polymer Anti Rabbit

Blocking Solution

PostBlock

ABC Chromogen/ABC Buffer

(2 gtt. AEC Chromogen + 5ml AEC Buffer)

## Pan-B-Zell

Primärantikörper: Pan-B-Zell dianova GmbH Art.Nr.T-3106

Polymer-Kit ZytoChem-Plus HRP: HRP Polymer Anti Rabbit

Blocking Solution

PostBlock

ABC Chromogen/ABC Buffer

(2 gtt. 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 gtt. 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 gtt. AEC Chromogen + 5ml AEC Buffer)

### **2.1.3 Versuchstiere**

Insgesamt wurden für die vorliegende Untersuchung 25 männliche, circa 300 g schwere Lewis-Inzuchtratten (Charles River Germany GmbH & Co. KG) genutzt. Die Versuchsreihe wurde unter dem Aktenzeichen 42502-2-1162 MLU genehmigt. Ihre Suszeptibilität hinsichtlich SAg konnte bereits an verschiedenen Geweben unter Verwendung von SEA gezeigt werden. (Paterson et al., 1970) In Bezug auf das virale SAg gp 120 zeigten sich die Ratten in Vorversuchen und Untersuchungen an anderen Geweben suszeptibel. Die Ratten wurden unter Standardbedingungen (klimatisierte Räume, 12:12 Hell-Dunkel-Rhythmus, Makrolonkäfige, pelletiertes Rattenalleinfutter, täglich Frischwasser) gehalten und durch qualifiziertes Personal betreut.

## **2.2 Ablauf der Versuche**

### **2.2.1 Vorbereitung der Versuche**

Zu Beginn der Versuche wurden die 25 Tiere zufällig in die Experimental- und Kontrollgruppe aufgeteilt. 15 Tiere erhielten intraartikuläre Injektionen in beide Kniegelenke. Analog dazu wurden zehn Tieren gepufferte isotonische NaCl-Lösung ebenfalls in beide Kniegelenke injiziert und dienten so als Kontrollgruppe (Tag 0) Es erfolgte die Markierung der Ratten an der Schwanzwurzel mittels Permanentmarker.

Um die Entzündungsreaktion zu augmentieren wurden die Tiere einer kurzen Stressreaktion ausgesetzt. Für 5 min wurden die Tiere in ein mit 37 °C warmen Wasser gefülltem Becken gegeben und unter Aufsicht schwimmen gelassen. Begonnen wurde mit diesem Vorgehen einen Tag vor der Injektion des SAg bzw. NaCl. Bis zur Opferrung der Versuchstiere erfolgte diese Stressaussetzung täglich.

Als sinnvolle Zeitpunkte der Opferrung wurden aus Erfahrungen der Vorversuche und der Studien der SEA-Arthritis der 1., 3., 6., 10., und 14. Tag *post injectionem* aufgrund von Vorversuchen angesehen und festgesetzt. Es wurden jeweils 3 Tiere der Verumgruppe und 2 Tiere der Kontrollgruppe am jeweiligen Zeitpunkt geopfert.

### **2.2.2 Intraartikuläre Injektion des Superantigens**

Die intraartikuläre Injektion erfolgte in Allgemeinnarkose. Die Narkose wurde mittels Inhalation von Isofluran über ein Tischnarkosegerät Univet Porta durchgeführt. Es erfolgte eine Einleitung mit 3 Vol.% Isofluran in einer Inhalationskammer. Die Narkose wurde als ausreichend tief bewertet, wenn die Schmerzreflexe nicht mehr ausgelöst werden konnten. Für die nun folgende Injektion wurde die Narkose mittels Maske unter 0,4 Vol. % Isofluran aufrechterhalten. Nach Sicherstellung, dass das Tier keine Reaktion auf Schmerzreize zeigte (intraparyngealer Schmerzstimulus), wurde das Fell abrasiert und die Haut über den Gelenken desinfiziert.

Bei leicht gebeugtem Kniegelenk erfolgte die intraartikuläre Injektion von 40 µl der zuvor streng steril hergestellten Superantigenlösung (Konzentration von 500µg/ml) bzw. NaCl-Lösung (0,9 %ig). Die Injektionsstelle wurde zwischen *Patella* und *Tibia* gewählt. Dabei wurde die Gelenkkapsel median durch das *Ligamentum patellae* punktiert.

Die Injektion wurde als erfolgreich angesehen, wenn es zu einer Ballonierung des oberen Recessus kam. Dieses Phänomen konnte bei allen Injektionen beobachtet werden. Nach erfolgter Injektion wurde die Narkose beendet. Zur postoperativen Analgesie wurde nach Einsetzen der Schutzreflexe ein Tropfen Metamizol (Konz.= 500mg/ml, 1gtt  $\cong$  25mg  $\cong$  0,05ml) p.o. appliziert. In den Makrolonkäfigen wurden die Versuchstiere bis zum vollständigen Erwachen nachbeobachtet. Die Narkose dauerte circa 15 min.

### **2.2.3 Opferung und Entnahme der Kniegelenke**

Die Tötung der Tiere mittels CO<sub>2</sub> erfolgte am ersten, dritten, sechsten, zehnten und vierzehnten Tag nach Injektion des SAg gp120 bzw. dessen Lösungsmittel NaCl, nachdem die Versuchstiere einer Inspektion des Gangbildes und der Punktionsstelle unterzogen wurden. Es konnten keine Auffälligkeiten des Gangbildes beobachtet werden. Des Weiteren erfolgte eine Palpation der Kniegelenke. Die Kniegelenke waren nicht überwärmt bzw. wiesen keinen ballonierten Recessus auf. Nach der Opferung wurden jeweils beide Kniegelenke entnommen, dazu wurden zunächst die Weichteile unter Schonung der Gelenkkapsel mittels Skalpell und Schere entfernt und das *Femur*, die *Tibia* und die *Fibula* freigelegt. Anschließend wurden die Knochen mit Hilfe einer oszillierenden Säge durchtrennt. In der Folge wurden die gewonnenen Präparate von restlichem Muskelgewebe entfernt und nach sorgfältiger Markierung bei -80 °C eingefroren.

## 2.2.4 Herstellung der Paraffinschnitte

Die Fixierung der tiefgefrorenen Präparate erfolgte mit Paraformaldehyd-Lysin-Prejodat(PLP)-Lösung. Hierzu wurden zunächst drei PLP-Stammlösungen hergestellt. Die kühl gelagerten Stammlösungen setzten sich wie folgt zusammen:

PLP-A: 18,26g L-Lysin Monohydrochlorid/ 500 ml *Aqua dest.*

PLP-B: 7,1g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/500ml *Aqua dest*

PLP-C: 5g Glucose /100ml *Aqua dest.* + 8g Paraformaldehyd + 2-4 Tropfen 1m NaOH-Lsg.

Für die Fixierlösung wurden 100ml PLP-A und 100ml PLP B bei einem pH von 6,0 gemischt und anschließend 0,855g Natriumperjodat gelöst. Nach Zufügen von 6,452ml PLP-C konnte die frisch angesetzte Lösung zu Fixierung der Präparate verwendet werden. Die Kniegelenke wurden insgesamt für 12 Stunden im Kühlschrank fixiert. Danach erfolgte die dreimalige Auswaschung mit gepufferter PBS-Lösung für insgesamt 30 min.

Der Fixierung der Präparate schloss sich die für die Herstellung der histologischen Schnitte am Mikrotom notwendige Entkalkung an; dazu wurden die Präparate in 37 °C warmer Entkalkungslösung für insgesamt 14 Tage entkalkt. Die Entkalkungslösung (700 g Tetripex (EDTA /4830 ml *Aqua dest.* + 65 g NaOH bei pH:7,4) wurde täglich gewechselt.

Nun wurden die Proben gründlich gespült um verbliebene Entkalkungslösung zu entfernen. Im Anschluss daran fertigte man in bewährter Art und Weise mit Hilfe des Einbettautomaten Leica TP 1020 und Ethanollösungen in aufsteigender Konzentration paraffinierte Proben an.

Der Anschnitt der Präparate am Mikrotom HM 355S erfolgte in sagittaler Ebene. Zuvor wurde die streng plane Lage der Proben in der Einbettschale kontrolliert und ggf. korrigiert. Zunächst wurde reichlich Material von der Probe bei Schichtdicken von 10 µm abgetragen. Unter Zuhilfenahme von HE-Färbungen konnte die Ebene bei der die *Menisci* der bearbeiteten Kniegelenke gerade noch

über eine schmale Gewebsbrücke verbunden waren. Nach Identifizierung der gewünschten Ebene konnten die Präparate im Wasserbad aufgefangen werden, um anschließend auf einem für immunhistochemische Färbungen geeigneten Objektträger luftgetrocknet zu werden. Nach 24 Stunden Trocknung wurden die Schnitte noch entparaffiniert um für die immunhistochemische Färbung weiter verarbeitet werden zu können.

### **2.2.5 Die immunhistochemische Aufarbeitung der Paraffinschnitte mittels Avidin-Biotin-Methode**

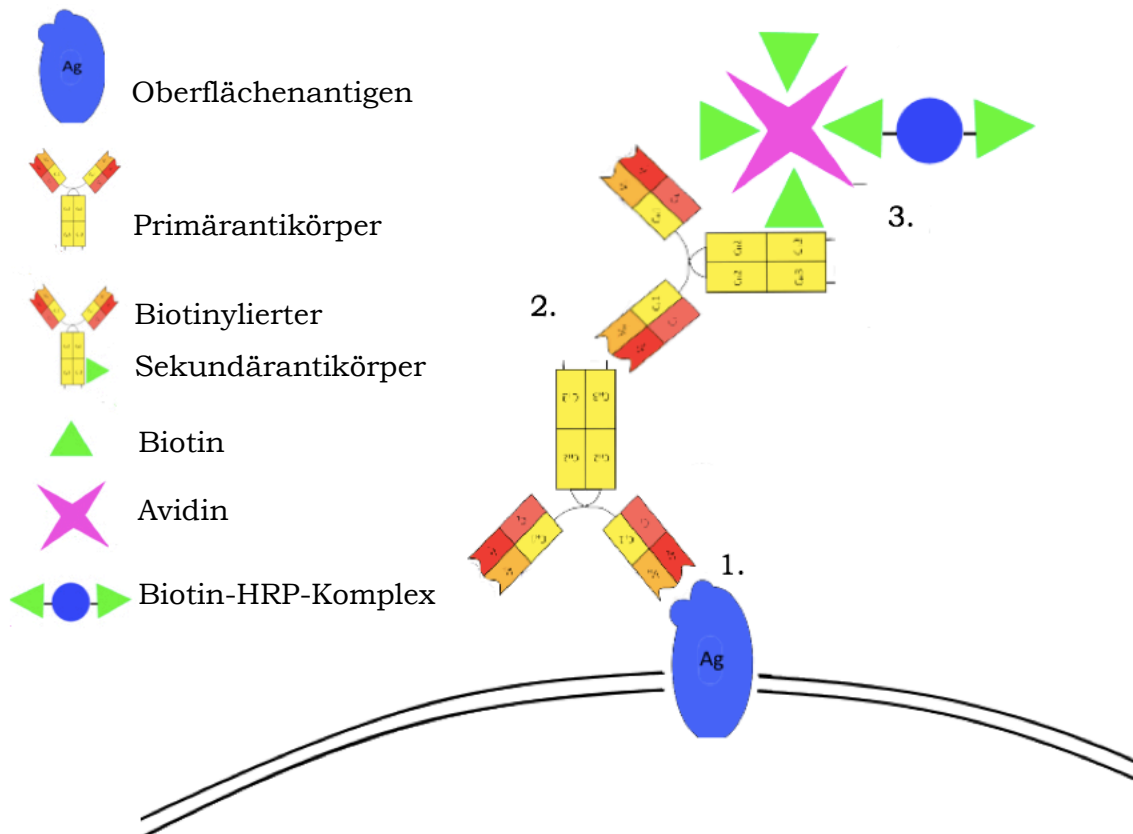
Grundlage der immunhistochemischen Färbung ist Avidin-Biotin-Methode. Durch die starke Affinität des gentechnisch hergestellten Avidins und des Vitamins Biotin ist es möglich, dass ein Enzym an einen biotinylierten Sekundärantikörper gebunden werden kann. Der Sekundärantikörper hat wiederum eine hohe Affinität zum F<sub>c</sub>-Fragment eines Primärantikörpers. Durch Zugabe des Substrats kann über die enzymatische Reaktion des gebundenen Enzyms Peroxidase ein Chromogen oxidiert und so gefärbt werden. Damit werden die Bereiche eines immunhistochemischen Präparats eingefärbt, in denen der Primärantikörper das gesuchte Antigen gebunden hat.

*Tab. 3. Verdünnung der Primärantikörper*

Primärer Antikörper	Verdünnung
CD 3	1: 20
CD 4	1: 20 mit 1%BSA/PBS-Lösung
CD 8	1: 30
CD 138	1: 100
Pan-B-Zell	1: 100
MHC I	1: 100
MHC II	1: 100

Nach 24h-iger Trocknung wurden die Paraffinschnitte nun in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Aqua dest., 40%, 70%, 96%, 100%) entwässert. Danach wurden die Präparate für zehn Minuten mit einer 3%igen Wasserstoffperoxid-Lösung behandelt. Zur Reduzierung einer unspezifischen Reaktion der Peroxidase und einer damit verbundenen Hintergrundfärbung ist dieser Schritt wichtig. Die Proben mit CD4-Antigen wurden mit einer 0,3 % Wasserstoffperoxid-Lösung gespült und anschließend für zehn Minuten in einem Citratpuffer bei 90°C behandelt. Bei allen übrigen Antikörpern wurde auf diesen Schritt verzichtet. Anschließend wurde für jeweils fünf Minuten mit PBS-Lösung gespült. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Es folgte das Auftragen der Blocking-Solution für zwanzig Minuten. Vor dem Auftragen der Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (s. Tab 2) wurden die Präparate erneut mit PBS-Lösung gespült. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde der nicht-spezifisch gebundene Primärantikörper mit PBS-Lösung durch fünf minütiges Spülen entfernt. Im nächsten Schritt folgte das Auftragen des Verstärkungsreagenz (PostBlock). Vor Auftragen des Meerrettich-Peroxidase-Polymers schloss sich ein erneuter zweimaliger Spülvorgang mit PBS-Lösung für jeweils fünf Minuten an. Das HRP-Polymer verblieb für insgesamt dreißig Minuten auf dem Präparat. Die in dem Polymer enthaltenen biotinylierten Sekundärantikörper und ein Avidin-Biotin-Enzym-Komplex binden nun im Bereich der zuvor gebundenen spezifischen Primärantikörper. Nicht gebundene Sekundärantikörper werden durch erneutes zweimaliges Spülen mit PBS-Lösung entfernt. Das für zehn Minuten tropfenweise applizierte AEC-Chromogen wird nun in einer Farbreaktion umgesetzt. Der gebundene Primärantikörper wird durch diese Methode sichtbar gemacht. Die Schnitte werden mit Leitungswasser gespült. Es folgt eine Gegenfärbung mit Hämalaun für ca. 45 Sekunden. Das Präparat wird am Ende ein letztes Mal gespült und mit Kaiser-Glycerin-Gelatine bedeckt.

### Legende:



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Färbemethode. 1. Spezifische Bindung des Primärantikörpers an das nachzuweisende Oberflächenantigen der Zelle. 2. Bindung des biotinylierten Sekundärantikörpers mit der Antigenbindestelle an dem Fc-Fragment des Primärantikörpers. 3. Enzymatische Reaktion des Chromogens mittels gebundener Horseradish-Peroxidase (HRP) und damit zu einer Einfärbung der Zelloberfläche.

## 2.3 Untersuchte Antigene

### 2.3.1 MHC I

Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse I Moleküle werden auf jeder kernhaltigen Zelle exprimiert. (Agrawal und Kishore, 2000) Sie binden Peptidfragmente, welche von intrazellulären Proteinen stammen und präsentieren sie an der Zelloberfläche. So kann z.B. Infektion der Zelle mit einem Virus oder Tumorzellen durch CD8<sup>+</sup>-Zellen erkannt werden.

### 2.3.2 MHC II

Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse II Moleküle werden von epithelialen Thymuszellen und professionellen antigen-präsentierenden Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert. Auf ihnen können nun Peptide von Fremdantigenen über den TCR der entsprechenden T-Zellen präsentiert werden. (Tsai und Santamaria, 2013) Zu den antigenpräsentierende Zellen gehören dendritische Zellen, B-Lymphozyten und Monozyten. Bei Monozyten handelt es sich um Vorläufer von Makrophagen, welche auch im Gelenk als Synoviozyten Typ A Phagozytose betreiben und Antigene präsentieren können.

### 2.3.3 CD3

CD ist die Abkürzung von cluster of differentiation und ordnet Zellen nach ihren jeweiligen Oberflächenantigenen in Gruppen ein.

Das CD3-Molekül ist Bestandteil des TCR. Es ist notwendig für die Signaltransduktion nach Interaktion von Antigen, MHC-Molekül und TCR (Klausner und Samelson 1991, Call et al., 2002). Der CD3-TCR-Komplex setzt sich aus  $\alpha:\beta$ -, bzw.  $\gamma:\delta$ - Ketten sowie den nicht veränderlichen Untereinheiten CD3 $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  sowie den dimeren  $\zeta$ -Ketten zusammen (Göbel und Bollinger, 2000). Über diese unveränderlichen Untereinheiten erfolgt die Signalübertragung. Über Tyrosinkinase werden entsprechende Gene aktiviert. Das CD3-Molekül kommt sowohl auf Thymozyten als auch auf allen T-Lymphozyten vor. (Malissen et al., 1999)

### 2.3.4 CD4

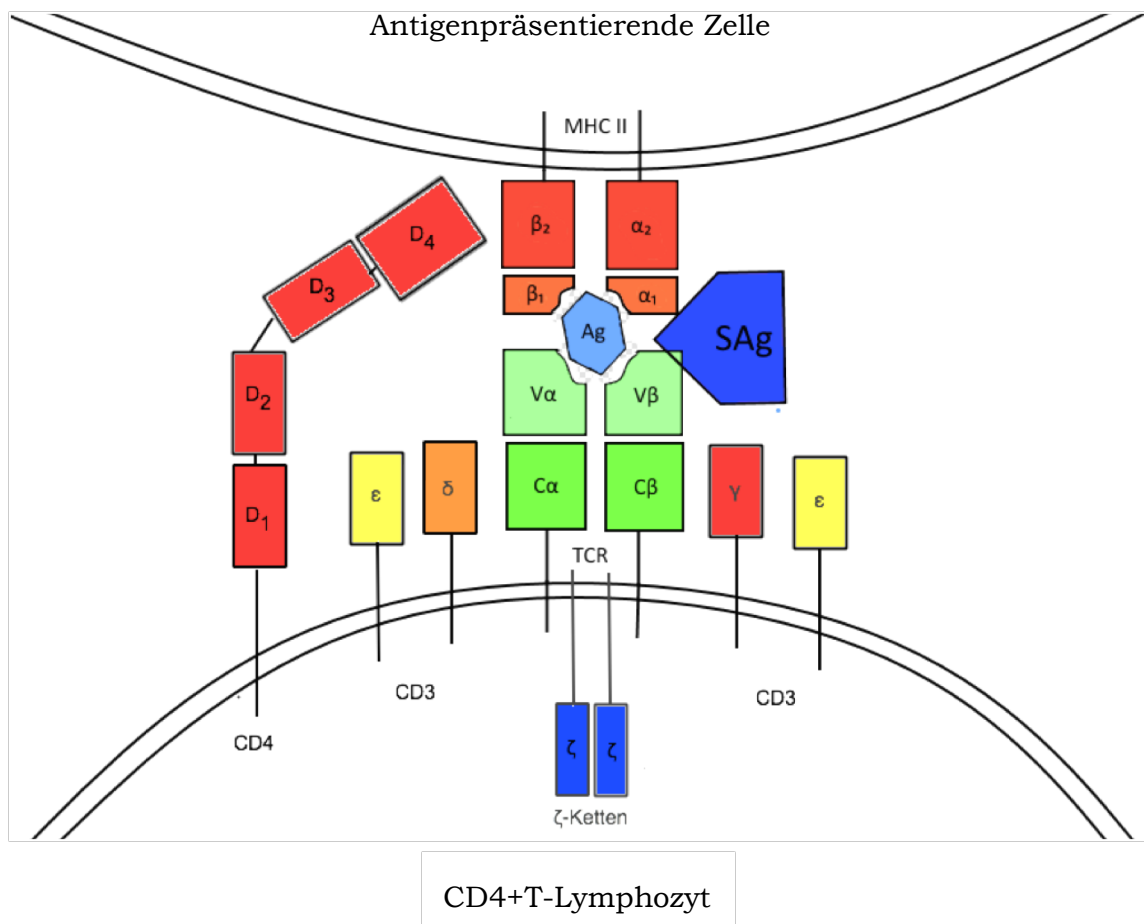
Das CD 4 Rezeptormoleküle interagiert mit dem MHC II Molekül und verstärkt so die T-Zellaktivierung. Es hat ein Molekulargewicht von 56 kD und ähnelt im Aufbau den Immunglobulinen. Es besteht aus vier extrazellulären Domänen und findet sich auf Th-1 und Th-2- Lymphozyten. (Wu et al., 1997) Das CD4-Molekül kommt auch auf Monozyten, Makrophagen und Thymozyten vor. Das CD4-Molekül dient vor allem der Expression prozessierter exogener Antigene. Zum anderen dient der CD 4 Rezeptor dem HIV dem Eindringen in die entsprechende Zelle. Dies ist durch die Bindung von gp 120 an den CD4 Rezeptor möglich. (Ryu et al., 1994) Zu den CD-4 positiven Zellen gehören vor allem die für die Aktivierung einer Immunantwort entscheidenden T-Helfer-



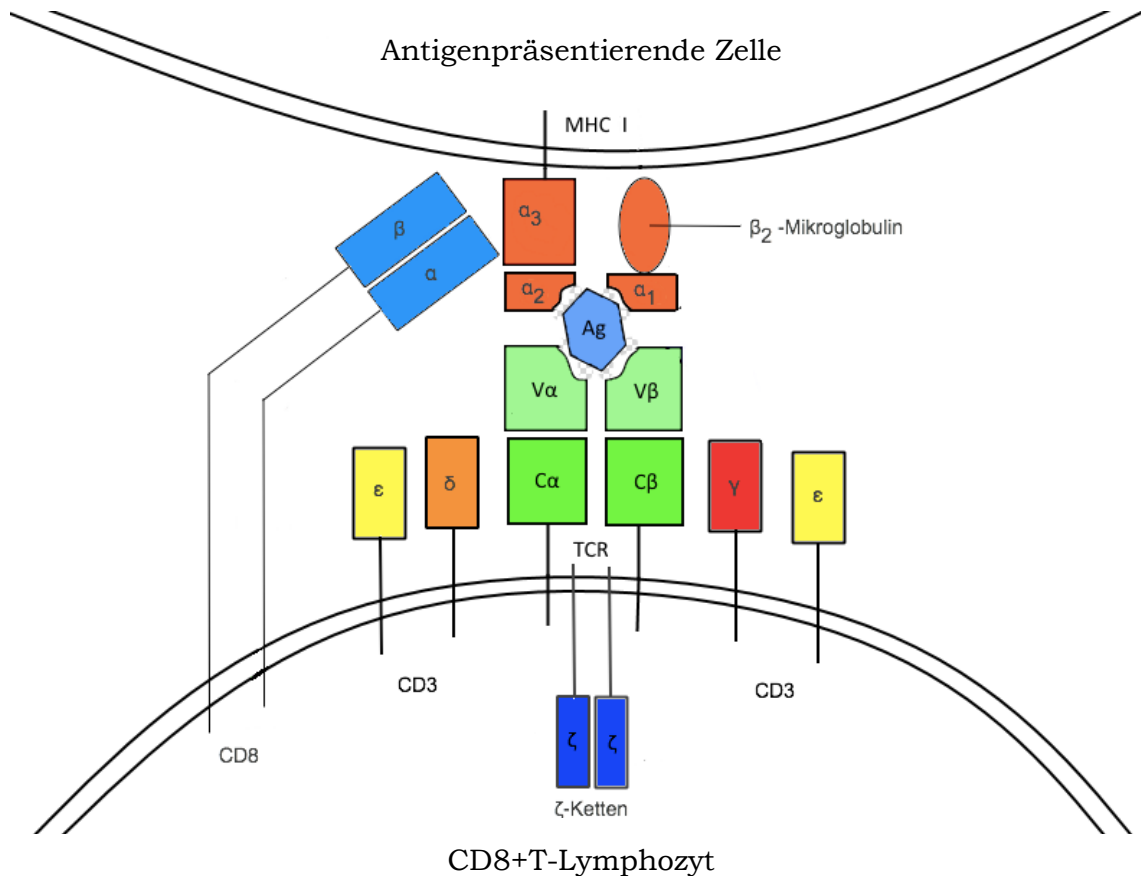
Zellen. Neben diesen Zellen exprimieren auch Monozyten bzw. Makrophagen diese Antigene. (Abbas et al., 1996)

### 2.3.5 CD8

Das CD8-Rezeptormolekül fungiert als Korezeptor bei der Bindung von MHC I an den TCR. Zytotoxische T-Zellen können so fremde Peptide auf antigenpräsentierenden Zellen erkennen und die Zielzelle zerstören. (Elgert et al., 2009) Daneben wird CD8 auf natürlichen Killerzellen, Thymozyten und dendritischen Zellen exprimiert. (Leong et al., 2003)



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Antigenpräsentation der Antigenpräsentierenden Zelle an einen CD4+T-Lymphozyt



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Antigenpräsentation der Antigenpräsentierenden Zelle an einen CD8+T-Lymphozyt

### 2.3.6 CD138

Bei CD138 handelt es sich um ein transmembranes Proteoglykan, welches auch als Syndecan-1 bezeichnet wird. (Dhodapkar und Sanderson, 1999) CD 138 spielt eine Rolle bei Zell-Zell-Kontakten und fungiert auch als Extrazellulärmatrix-Rezeptor bei Zell-Matrix-Interaktionen (Palaiologou et al., 2013) Das Oberflächenmolekül ist ein nützlicher Marker bei der Identifikation von Plasmazellen. (Rawstron, 2006) Im Wesentlichen dient CD 138 der Differenzierung von Plasmazellen. Des Weiteren wird es auch im Prozess der Reifung einer B-Zelle und in Epithelien exprimiert.

### 2.3.7 Pan-B-Zellmarker

Beim Pan-B-Zellmarker handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper (KiB1R) gegen ein bisher nicht weiter charakterisiertes Oberflächenprotein. Das Molekulargewicht des Antigens beträgt 47 kD. Es wird auf allen reifen B-Zellen und Plasmazellen exprimiert.

### **2.3.8 Positivkontrolle und Negativkontrolle**

Als Positivkontrolle wurde Milzgewebe der Versuchstiere verwendet. Milzgewebe ist aufgrund seiner zahlreichen Lymphozyten, welche erfahrungsgemäß gut auf die hier verwendeten Primärantikörper positiv reagieren, besonders geeignet. Die Positivkontrollen wurden nach gleichem Protokoll, wie es auch bei den mit SAg behandelten Präparaten der Fall war, bearbeitet. Auf eine Isotypenkontrolle im Sinne einer Negativkontrolle des Primärantikörpers wurde verzichtet.

## 2.4 Auswertung

Die Hämatoxylin-Eosin gefärbten Paraffinschnitte wurden zunächst auf die Verteilung der Entzündungsinfiltrate, Veränderungen an Gefäßen, Synovialgewebe, Knorpel und Knochen untersucht. Es folgte die eigentliche qualitative Auswertung auf Vorhandensein von Immunzellen. Dabei wurde eine Schnittebene gewählt, bei der ein guter Überblick der Strukturen am Kniegelenk möglich war. Es wurde die Schnittebene gewählt, in der gleichzeitig der Knorpel einschließlich Synovialgewebe von *Condylus femoris medialis* und *Condylus tibialis medialis*, *Meniscus medialis* sowie der *obere Recessus* zu detektieren waren.

Aus Voruntersuchungen und eigenen Pilotversuchen wurde die stärkste Entzündungsaktivität des Synovialgewebes im Bereich des oberen Recessus und am Übergang zwischen Meniscus und Synovialgewebe gesehen. (Gerlach et al., 2017)

Danach erfolgte die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Präparate. Dabei wurde jedes der beiden Kniegelenke des NaCl- und gp120-Tieres in der gleichen Ebene mittels Mikroskop Axioplan (Zeiss) untersucht. Letztlich wurden 8 Präparate in der zuvor gewählten Schnittebene für die folgenden Färbungen hergestellt: HE, CD3, CD4, CD8, Pan-B-cell, CD138, MHC-I und MHC-II.

Unter 20- und 40facher Vergrößerung mit dem Okular Zeiss-Plan-NEOFLUAR (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland) erfolgte die Festlegung von sechs 50.000  $\mu\text{m}^2$  großen Rechtecken mit einer Kantenlänge 300 $\mu\text{m}$  x 166,6 $\mu\text{m}$ . (HPF - high power field) Durch die rechteckige Form konnte der längliche Recessus und die darin enthaltene Immunzellen gut abgebildet werden. Sechs HPF waren in Vorversuchen hinsichtlich der statistischen Auswertung als ausreichend beurteilt wurden. (Gerlach et al., 2017) Es wurde die Areale mit der maximal ausgeprägten Entzündungsinfiltration ausgewählt. Hierbei wurden hauptsächlich Synovialgewebe erfasst. Teilweise wurden kleine Anteile von Knochen-, Muskel und Fettgewebe mit einbezogen.

Mit Hilfe der Software Axiovision 4.8.2 und der Mikroskopkamera AxioCam Hrc® erfolgte die visuelle Auszählung aller mit dem jeweiligen Antikörper positiv markierten Zellen im entsprechenden HPF. Die Auszählung erfolgte bei 40-facher Vergrößerung manuell unterstützt von Software Axiovision. Bei dieser 40-fachen Vergrößerung konnten alle positiv markierten Zellen eindeutig identifiziert werden, eine Differenzierung zu den nicht markierten Rundzellen war dabei sicher möglich.

Anschließend wurden die entsprechend gewonnenen Daten mittels Statistikprogramm (IBM ® SPSS Statistics Version 22) ausgewertet und analysiert. Die Stichprobengröße unserer Versuchsreihe betrug 25 Tiere, worunter sich 15 Falltiere und 10 Kontrolltiere befanden. Die jeweiligen Kniegelenke eines Tieres wurden zu den fünf definierten Untersuchungszeitpunkten (Tag 1(A),3(B),6(C),10(D) und 14(E)) betrachtet. Bei den so gewonnenen Daten ist von einer relativ kleinen Stichprobengröße auszugehen, so dass keine Normalverteilung angenommen wurde. In Folge dessen wurde zum Vergleich zwischen Tieren mit gp 120 Injektion und Tieren mit NaCl-Injektion von unabhängigen Stichproben ausgegangen und der Mann-Whitney-U-Test zur Datenanalyse angewendet. Hierzu wurde das Statistikprogramm SPSS Version 22 verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt und auf eine Signifikanz zwischen NaCl- und Verumgruppe untersucht. Zur Prüfung auf Signifikanz im zeitlichen Verlauf wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die dargestellten Diagramme wurden mit dem Softwareprogramm Origin (Version 9) erstellt, dabei wurden sogenannte Box-Plots verwendet. Bei dem Strich im Plot handelt sich um den Median der gesamten Werte. Das Quadrat in der Grafik bezeichnet das arithmetische Mittel der gesamten Werte dar. Extremwerte werden mit einem Sternchen markiert. Mit den sogenannten Antennen wird der gesamte Wertebereich dargestellt. Die Enden der „Box“ begrenzen das obere und untere Quartil.

## 2.5 Fehlerdiskussion

Im gesamten Prozess der Aufarbeitung und Auswertung der Gelenkpräparate sind zufälligen und systematischen Fehlern möglich und entsprechend zu diskutieren.

Aufgrund der Größe des Ratten-Gelenks sind die Injektionen erschwert und eine partielle Fehlinjektion war trotz größter Sorgfalt nicht vollständig auszuschließen.

Die genutzte Entkalkungslösung hat Einfluss auf die Immunogenität der Oberflächenantigene. EDTA-Lösung hat dabei im Vergleich zu anderen Entkalkungslösungen die besten Eigenschaften in Bezug auf immunhistochemische Untersuchungen (Liu et al., 2017) Im Rahmen der vorliegenden immunhistochemischen Färbungen konnten Zellen eindeutig positiv markiert werden.

Betrachtet man die B-Zellmarker Pan-B-Zell und CD 138, so zeigt sich beim Pan-B-Zell eine starke Hintergrundfärbung. Diese konnte trotz intensiver Titrationsversuche der Gegenfärbung nicht sicher vermieden werden, so dass der Anteil der vom Pan-B-Zellmarker markierten Zellen überschätzt wurde. Im Gegensatz dazu ist die Färbung von CD138 schwach ausgeprägt, allerdings ließen sich sicher CD 138+-Zellen identifizieren.

Bei dem Kniegelenkspräparat handelt es sich um ein dreidimensionales Gebilde, so dass durch die gewählten Schnittebenen ggf. die Ausprägung des Entzündungsinfiltrates des Synovialgewebes unterschätzt wird.

Die verwendeten Antikörper sind in ihrer Präzision nicht fehlerfrei und können andere Proteinstrukturen neben den gewünschten Oberflächenantigenen binden, dies wird als Hintergrundfärbung wahrgenommen. Um diesem Aspekt zu begegnen, wurden zu jeder Färbereihe des jeweiligen Antikörpers Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Allgemeine Befunde**

Die klinische Untersuchung der Kniegelenke vor der Opfierung zeigte weder in der Verum- noch in der Placebo-Gruppe eine ausgeprägte Rötung oder Überwärmung.

Das Synovialgewebe zeigte bei den Verum-Tieren eine Auflockerung und Rundzellinfiltrationen. Diese Infiltration wies ein fleckiges Verteilungsmuster mit punktuellen Ansammlungen von Rundzellen auf. Die stärkste Entzündungsreaktion war jedoch im oberen Recessus nachweisbar. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf, so war am 3. Tag der Untersuchung die größte Ausprägung im Vergleich zur NaCl-Gruppe festzustellen. Insgesamt waren zum Teil Auflockerungen des Synovialgewebes zu sehen.

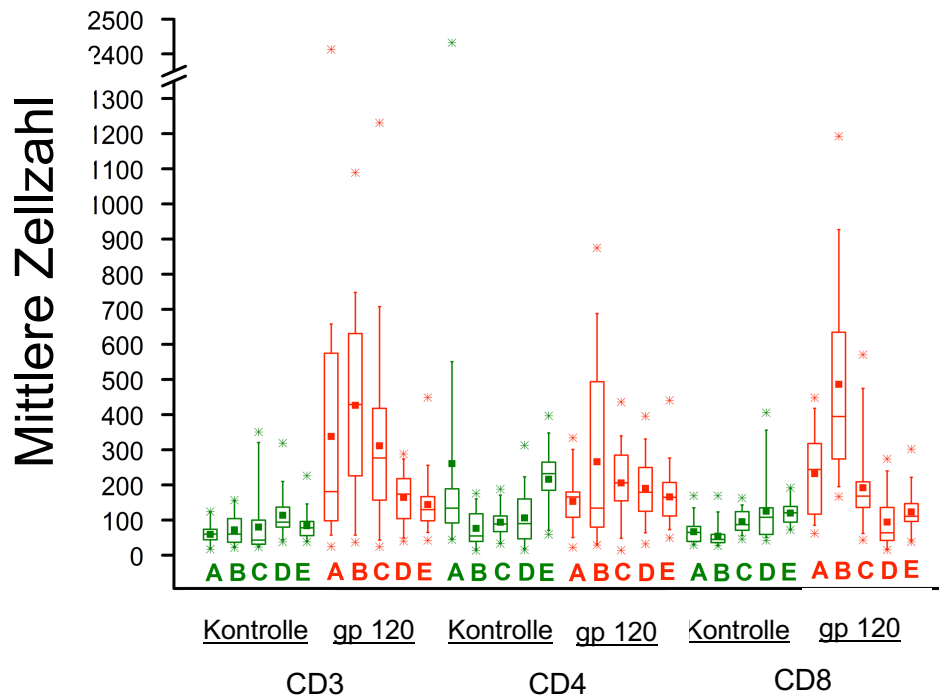
### **3.2 Spezielle Befunde**

CD3: Bereits an Tag 1 nach Injektion von gp 120 zeigt sich eine ausgeprägte Rundzellinfiltration CD3+-Zellen. Um Tag 3 erreicht diese Reaktion ihr Maximum und nimmt im weiteren Verlauf wieder ab. An Tag 10 ist der Unterschied zwischen NaCl- und Gp120 in der Rundzellinfiltration auf das untersuchte Antigen nicht signifikant. An Tag 14 ist erneut eine erhöhte Rundzellinfiltration von CD3+-Zellen zu dokumentieren. An allen fünf Untersuchungszeitpunkten (A, B, C, D, E) sind die Maximalwerte bei denen mit gp120 behandelten Gelenken deutlich höher.

CD4: Auch bei der Untersuchung von CD4 zeigt sich ein ähnlicher Verlauf der Zellzahl an den fünf unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten. Wobei hier an Tag 6 ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu NaCl- injizierten Gelenken sichtbar wird. Die maximal ausgezählten positiven Zellen sind bei denen mit gp120 behandelten Gelenken deutlich höher.

CD8: Bei der Betrachtung der CD8+-Zellen fällt bis zum Tag 6 der Untersuchung ein deutlich erhöhter Anteil der Zellzahl im Vergleich zur NaCl-

Gruppe auf. Die Reaktion ist an Tag 3 der Untersuchung am stärksten und fällt im weiteren Verlauf wieder ab. An Tag 10 und 14 lassen sich bei der Anzahl der CD8+-Zellen keine signifikanten Unterschiede ausmachen.



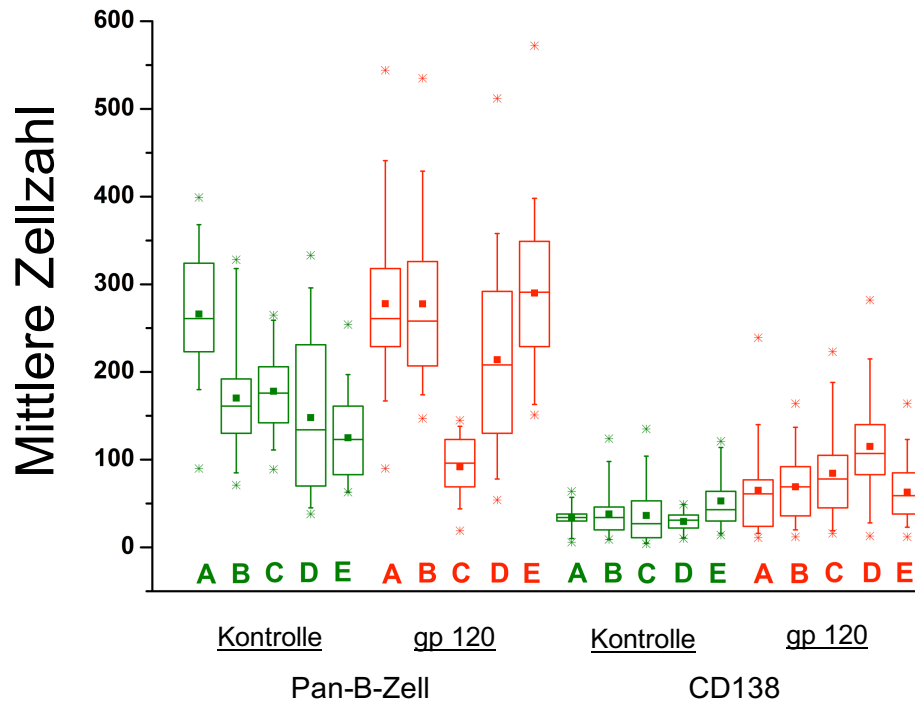
**Abb. 6:** Synoviale Zellpopulation von CD3-, CD 4- und CD8+-Zellen zu den fünf Untersuchungszeitpunkten (A=Tag 1, B=Tag 3, C=Tag 6, D=Tag 10, E=Tag 14) nach Injektion des SAg gp 120 bzw. NaCl-Lösung (Kontrolle).

Pan-B-Zellmarker: Vergleicht man die Zellpopulationen der Pan-B-Zell+-Zellen ergibt sich ein vielfältiges Bild. Am 3 und 14 Tag sind signifikant mehr Pan-B-Zell+-Zellen in den Gelenken nach Injektion von gp120 nachzuweisen. Nach Tag 3 fällt die Zellzahl sogar unter das Niveau der NaCl-Kniegelenk ab, um dann wieder anzusteigen. Die Maximalwerte sind an den Tagen 1, 3, 10 und 14 deutlich höher als im Vergleich zur NaCl-Gruppen.

CD 138: Betrachtet man CD138, so ist die Zellzahl am Tag 6 und 10 am höchsten im Vergleich zu den übrigen Tagen und weist einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur NaCl-Gruppen auf. An Tag 10 erreicht die Reaktion auf den Zellmarker in der gp120-Gruppe ihr Maximum. Zu Beginn des Beobachtungszeitraums an Tag 1 und 3 ist kein Unterschied zu sehen, es zeigen



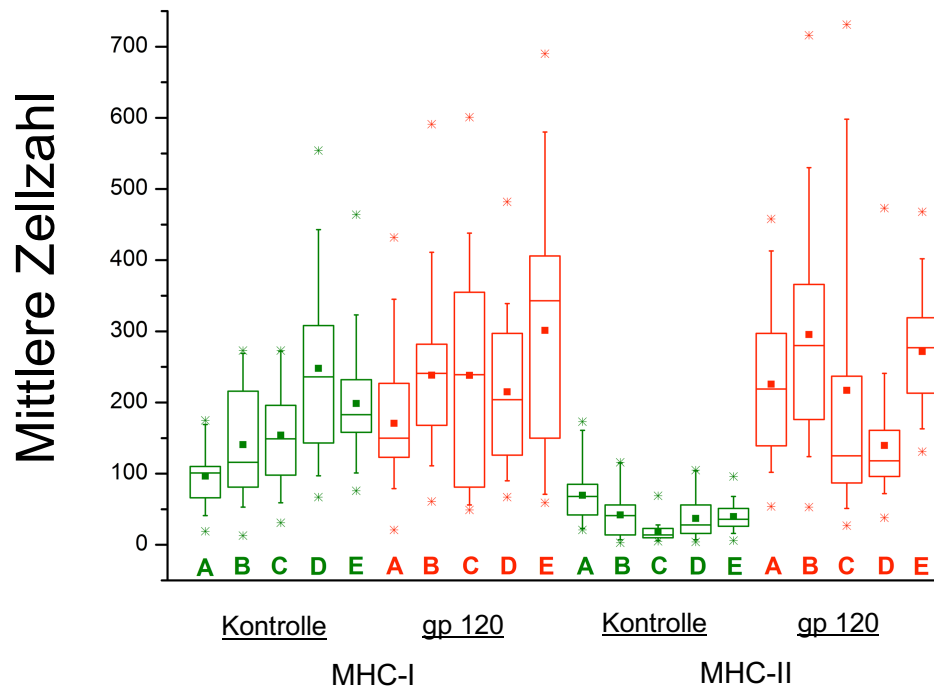
sich lediglich in der gp120-Gruppe höhere Maximalwerte in der Zellzahl. Am Ende, also an Tag 14, gibt es ebenso keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Zellzahl der CD138+-Zellen.



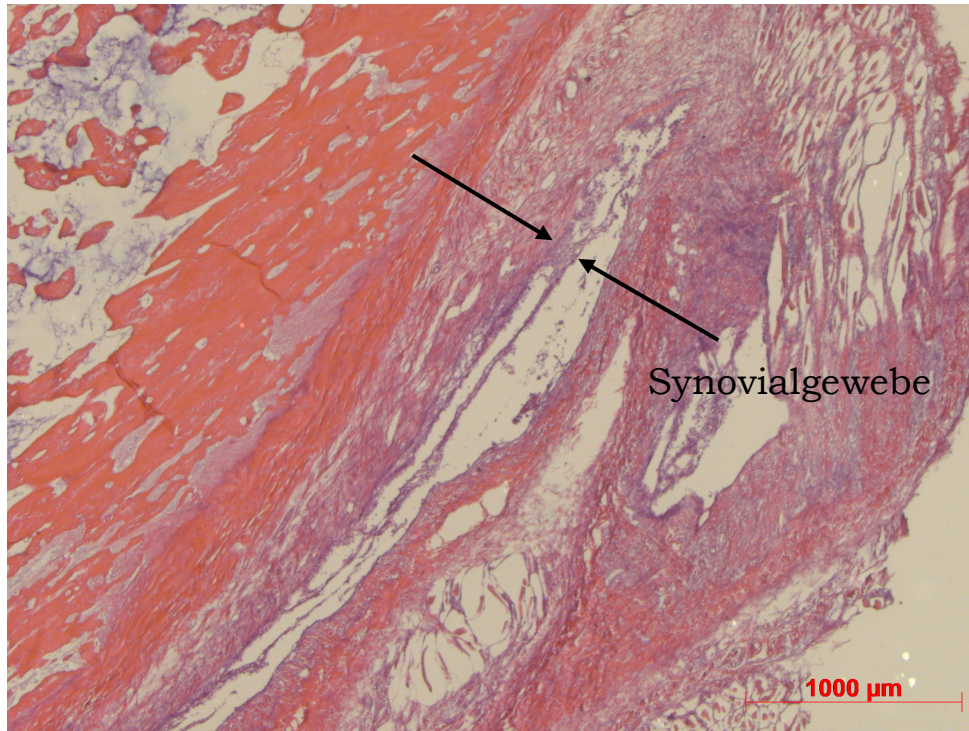
**Abb. 7:** Synoviale Zellpopulation von Pan-B-Zell und CD138+-Zellen zu den fünf Untersuchungszeitpunkten (A=Tag 1, B=Tag 3, C=Tag 6, D=Tag 10, E=Tag 14) nach Injektion des SAg gp 120 bzw. NaCl-Lösung (Kontrolle).

MHC I: Vergleicht man die MHC-I+-Zellen so finden sich in den unterschiedlich behandelten Gruppen an den einzelnen Tagen keine signifikanten Unterschiede. Im zeitlichen Verlauf bleibt die Zellzahl in beiden Gruppen relativ konstant.

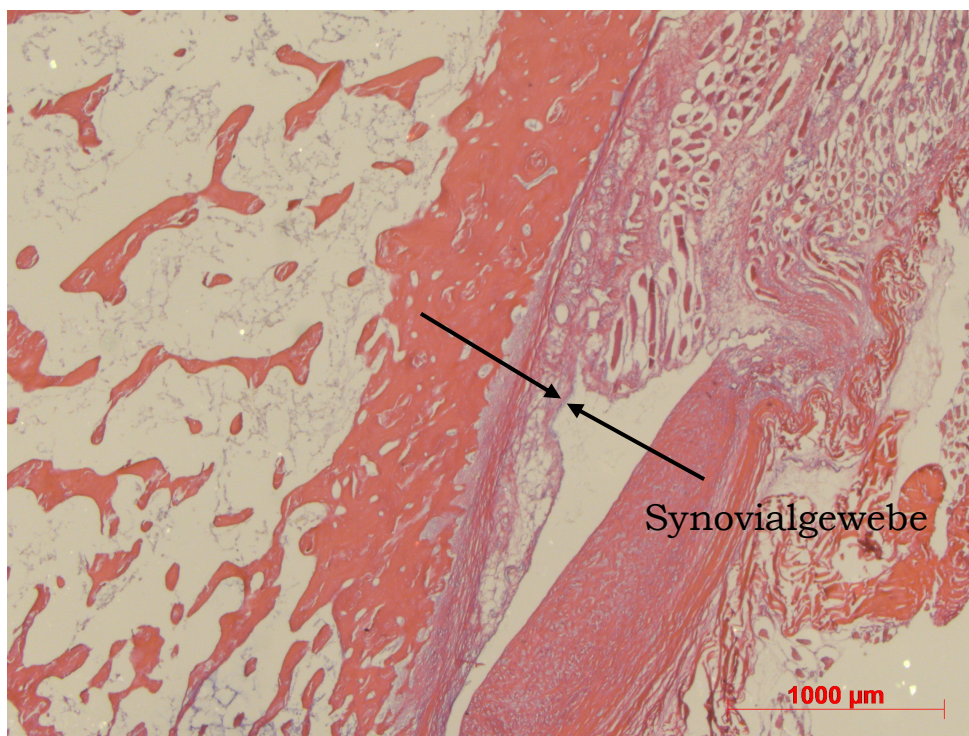
MHC II: Hierbei zeigt sich zu allen Untersuchungszeitpunkten eine erhöhte Zellzahl von MHC-II+-Zellen der gp120-Gruppe im Vergleich zu den mit NaCl behandelten Kniegelenken. Die stärkste Reaktion auf gp120 ist an Tag 3 zu dokumentieren. Betrachte man die maximale Zellzahl an MHC-II+-Zellen, so ist diese an Tag 6 der gp120-Gruppe zu finden.



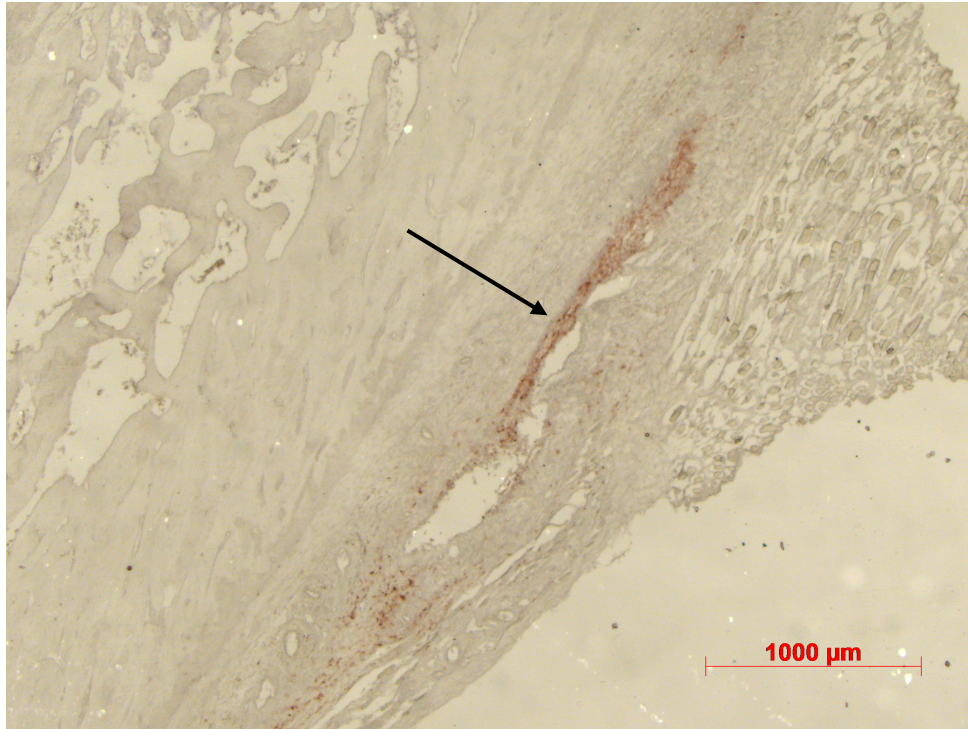
**Abb. 8:** Synoviale Zellpopulation von MHC-I- und MHC-II+-Zellen zu den fünf Untersuchungszeitpunkten (A=Tag 1, B=Tag 3, C=Tag 6, D=Tag 10, E=Tag 14) nach Injektion des SAg gp 120 bzw. NaCl-Lösung (Kontrolle).



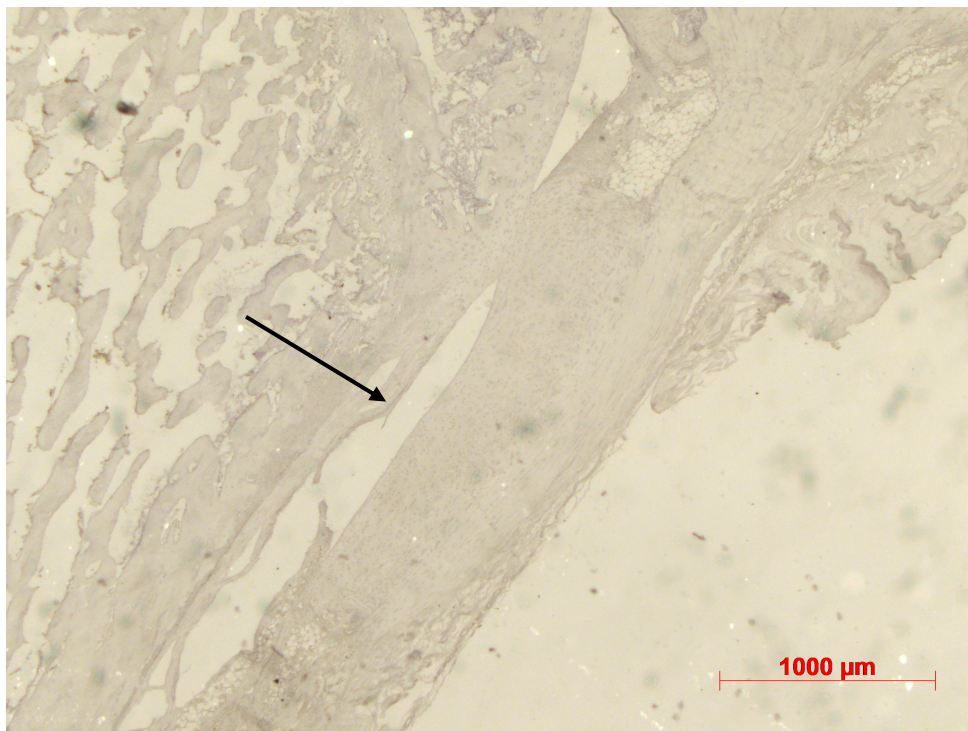
**Abb. 9:** HE-Färbung des oberen Recessus mit verdicktem Synovialgewebe an Tag 3 nach Injektion von gp 120 unter 2,5x Vergrößerung.



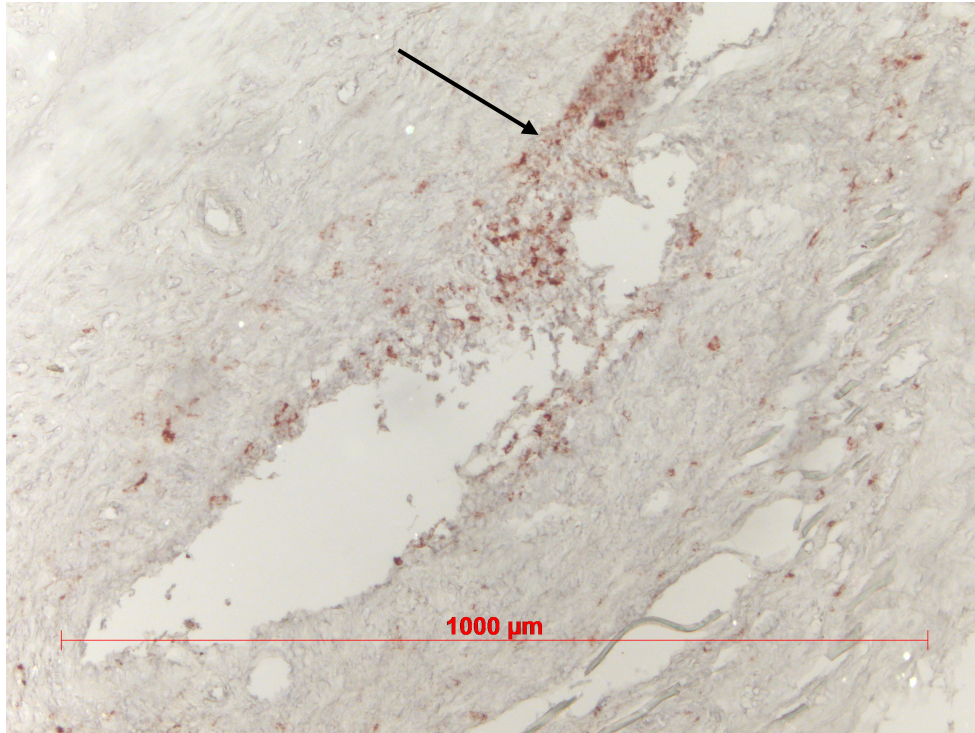
**Abb. 10:** HE-Färbung des oberen Recessus an Tag 3 nach Injektion von NaCl-Lösung unter 2,5x Vergrößerung.



**Abb. 11:** Immunhistochemische Färbung des oberen Recessus mit CD 8-Antikörpern an Tag 3 nach Injektion von gp 120 unter 2,5x Vergrößerung.



**Abb. 12:** Immunhistochemische Färbung des oberen Recessus mit CD 8-Antikörpern an Tag 3 nach Injektion von NaCl-Lösung unter 2,5x Vergrößerung.



**Abb. 13:** Immunhistochemische Färbung des oberen Recessus mit CD 8-Antikörpern an Tag 3 nach Injektion von gp 120 unter 10x Vergrößerung.

## **4 Diskussion**

Die vorliegende Dissertation widmet sich der Pathogenese der autoimmunen Arthritis, deren verschiedene Formen als Erkrankungen beim Menschen bislang ungeklärt sind. Ursächliche Autoantigene konnten bisher trotz intensiver Suche bei humanen autoimmunen Arthritiden nicht eindeutig nachgewiesen werden. Tatsächlich sind korrespondierend dazu nur Autoantikörper bekannt, welche Einblicke in die Pathogenese geben. (Derksen et al., 2017) Alternativ zur Erklärung der Pathogenese wird vorgeschlagen, dass autoimmune Arthritiden evtl. auf einen Dualismus von endogenen Retroviren und von ihnen kodierten, stark immunstimulierenden Hüllproteinen zurückgehen könnten. (Tugnet et al., 2013) Da Hüllproteine endogener Retroviren bislang kaum verfügbar sind, ist es legitim auf kommerziell erhältliche immunstimulierend wirkende Hüllproteine zurückzugreifen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit das HIV-Hüllprotein gp120 auf eine mögliche Arthritis-induzierende Wirkung hin untersucht. Tatsächlich sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit der Auffassung vereinbar, dass das HIV-Hüllprotein gp120 eine Arthritis auslösen kann.

Auch zwischen dem Hüllprotein von HERV K env und der rheumatoiden Arthritis zeigen sich Zusammenhänge, so konnten im Blut von RA-Patienten signifikante Spiegel von Antikörpern gegen Peptide von HERV K (env-su19-37) gemessen werden. Die Autoren gehen von einer sekundären Immunantwort auf die Hüllproteine aus, da keine andere Assoziation zwischen klinischen und serologischen Merkmalen der Patienten gab. (Mameli et al., 2017) Andererseits ist eine direkte Wirkung des HERV K env als virales SAg denkbar. (siehe Kapitel 4.6)

### **4.1 Pathophysiologie der gp120-Superantigenarthritis**

In der vorliegenden Studie führte die intraartikuläre Injektion des Superantigens gp120 im Vgl. zur Injektion mit NaCl-Lösung zu einer Entzündungsreaktion des Synovialgewebes der Lewis-Ratte, welche durch die Dominanz von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten gekennzeichnet ist und 3 Tage nach Injektion von gp120 am stärksten ausgeprägt ist. Darüber hinaus wurden CD4<sup>+</sup>- und CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und MHC-II<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen. Des

Weiteren konnten B-Lymphozyten (pan-B-Zell-Marker) und insbesondere CD138+-Plasmazellen detektiert werden. Im Vergleich dazu wurde in der Kontrollgruppe (NaCl-Lösung) des jeweiligen Untersuchungszeitpunktes eine nur marginale Entzündungszellinfiltration des Synovialgewebes nachgewiesen.

Die durch gp120 induzierte Superantigen-Arthritis wird von CD8+-Lymphozyten dominiert. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass das SAg SEA eine CD8 dominierte Superantigenarthritis auslösen kann. Dabei wird eine direkte Wirkung von SEA auf den T-Lymphozyten außerhalb der Antigenbindungsstelle über die variable Region der Beta-Kette des TCR vermutet (Müller-Alouf et al., 2001, Gerlach et al., 2017). Auch gp 120 interagiert direkt mit T-Lymphozyten (Yoon et al., 2010). So kann das HI-Virus eine oligoklonale Expansion von T-Lymphozyten mit bestimmten Genen der variablen Region der Beta-Kette des TCR auslösen (Laurence et al., 1992). Dabei ist eine Stimulation von CD8+-T-Lymphozyten über die variable Region des TCR denkbar. Über diesen Mechanismus könnte die in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesene, von CD8+ T-Lymphozyten dominierte Entzündungsreaktion erklärt werden. Auch bei rheumatoiden Arthritiden wurde eine oligoklonale T-Zellaktivierung detektiert (Goronzy et al., 1995, Kato et al., 1997). Wir gehen in Analogie zu den zurückliegenden Arbeiten zur immunogenen Wirkung von gp120 von einer oligoklonalen Aktivierung der Lymphozyten in der vorliegenden Studie aus, obwohl diesbezüglich keine Untersuchungen durchgeführt wurden. Neben einer direkten T-Zellaktivierung durch das SAg ist auch eine costimulatorische Aktivierung der T-Zellen über antigen-präsentierende Zellen oder B-Zellen denkbar. (Balakrishna und Adams, 1999). Es gibt Hinweise, dass die T-Zell Aktivierung von B-Lymphozyten abhängig sein kann (Takemura et al., 2001). In der vorliegenden Untersuchung ist allerdings von einer direkten Wirkung auf die T-Lymphozyten durch das SAg auszugehen, da die Zahl der B-Lymphozyten zu Beginn der Untersuchung allenfalls sehr gering ausgeprägt ist. Des Weiteren wird die Zahl der B-Lymphozyten durch die starke Hintergrundfärbung des Pan-B-Zellmarkers eher überschätzt. In vitro interagiert gp120 mit B-Lymphozyten und bindet über V<sub>H</sub>-3 Immunglobuline (Berberian et al., 1993). In der vorliegenden Untersuchung ist davon auszugehen, dass *a priori* im gesunden Gelenk keine Immunglobuline vorliegen und kaum eine direkte Wirkung auf die B-Lymphozyten möglich ist. Dies unterstützt indirekt die Annahme, dass es eine direkte Wirkung des SAg

auf die in der Untersuchung detektierten CD8+-Lymphozyten gibt. Die durch gp120 aktivierten CD8+-T-Lymphozyten werden auch zytotoxische T-Zellen genannt. Im gesunden Immunsystem können sie durch von ihnen ausgeschüttete Perforine und Granzyme den Zelltod etwa von Virus-infizierten oder entarteten Zellen herbeiführen. (Pipkin und Lieberman, 2017) Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis sind diese Perforine vermehrt exprimiert nachgewiesen worden (Naneh et al., 2014). Tatsächlich wurde bereits eine Assoziation von Viren wie z.B. EBV bei der rheumatoiden Arthritis nachgewiesen (Klatt et al., 2005). Der direkte Nachweis von Viren war bisher nicht möglich, eher ist von latenten Infektionen oder auch Reaktivierungen auszugehen. Darüber hinaus ist eine Aktivierung des Immunsystems eben durch immunstimulatorisch wirksame Hüllproteine ähnlich wie bei gp120 zu diskutieren.

Im Verlauf der Untersuchung fällt die Zahl der CD8+-Zellen deutlich ab, nämlich von Tag 3, über Tag 6 und 10 bis Tag 14 nach SAg-Injektion. Zum einen könnte dies Beleg für eine Abschwächung des insgesamt proinflammatorischen Milieus sein. Dies lässt sich aufgrund fehlender Untersuchungen von Zytokinen nicht beweisen. Andererseits ist eine Regulation durch CD4+-Treg-Zellen möglich, welche die zytotoxische Reaktion von CD8+-Zellen begrenzt. Diese Zellen sind für eine natürliche Regulation der Selbsttoleranz des Immunsystems verantwortlich und sind nur eine kleine Untergruppe der Population der CD4+-Lymphozyten (Khazaie et al., 2006). Ein Anstieg der CD4+-Lymphozyten ist aufgrund des geringen Anteils an der Gesamtpopulation in der vorliegenden Untersuchung nicht zu erwarten. Diese abgeschwächte CD8+-T-Zellreaktion und die Abschwächung des proinflammatorischen Mileus der Superantigenarthritis könnte das chronische Stadium der RA modellhaft abbilden.

CD4+-Zellen konnten am 3. Tag der Untersuchung in erhöhter Anzahl gemessen werden. Eine Interaktion von gp120 und MHC-II mit CD4-Molekülen wurde bereits beschrieben. (Lamarre et al., 1989) Des Weiteren ist eine direkte Aktivierung wie auch bei CD8+-Zellen möglich. (Deng et al., 2016) Im weiteren Verlauf der Untersuchung fällt die Zahl der CD4+-Zellen stetig ab. Dies könnte Hinweis für einen sich abschwächenden direkten Effekt des SAg sein; auch hier könnte ein chronisches Stadium eintreten.



Die CD3<sup>+</sup>-Zellen steigen nach Injektion des SAg gp 120 zunächst stark an und nehmen dann ab dem 3. Tag stetig ab. Damit nehmen sie einen ähnlichen Verlauf wie die anderen untersuchten T-Zell-Marker. Per Definition ist CD3 auf allen T-Zellen exprimiert, da es Bestandteil des TCR ist. Allerdings zeigt sich in der Untersuchung eine Diskrepanz zwischen der Summe aus CD4/CD8<sup>+</sup>-Zellen und der Anzahl der CD3<sup>+</sup>-Zellen. In vivo kommen T-Zellen ohne CD3-Expression nur sehr selten vor und sind in Ihrer Funktion eingeschränkt (Klausner und Samelson, 1991). Durch die andauernde Stimulation über APC kann es zu einer Herunterregulation des TCR und damit von CD3 kommen (Valitutti et al., 1996). Die CD3-Depression ist hier durch die oligoklonale T-Zellaktivierung und die damit verbundene überschießende Zytokinfreisetzung nach Kontakt mit einem Superantigen zu erklären. Nach Kontakt mit dem TCR kommt es über intrazelluläre Signaltransduktion zur Ausschüttung von Interleukin 2 (IL-2). Interleukin 2 wiederum ist ein starker Induktor der T-Zellproliferation, was zur erneuten Verstärkung der Immunreaktion und Zytokinausschüttung führen würde. (Zehn et al., 2012) Dies würde zu einer schädlichen Reaktion auf den Körper führen. (Lappin und Ferguson, 2009) Durch Endozytose des TCR-Komplexes kann dieser Signalweg unterbrochen werden. (Essen et al., 2004) Die CD-3 Depression gilt als Mechanismus zum Schutz des Körpers und kann solchen Immunprozessen vorbeugen. (Niedergang et al., 1995) Auch bei der gp120-Myositis konnte eine CD3 Depression gezeigt werden. (Hirsch, 2016) Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei gp120 nicht um ein nur B-Lymphozyten stimulierendes Protein handelt, sondern dass auch T-Lymphozyten aktiviert werden können. Diese Annahme wird durch o.g. überwiegende Expression von T-Lymphozyten gestützt. Die somit vorausgegangene Annahme, dass das sogenannte B-Zell-SAg gp 120 überwiegend B-Zellen stimuliert, scheint nicht haltbar zu sein. Es ist eher anzunehmen, dass eine primäre Aktivierung von T-Lymphozyten und eine sekundäre Stimulation von B-Lymphozyten durch das SAg gp120 vorliegt.

Der Mechanismus der CD3 Depression wird in der vorliegenden Arbeit insbesondere ab Tag 3 überschätzt, da auch nach Injektion von NaCl eine Diskrepanz von CD4/CD8 im Vergleich zu CD3 vorliegt und dieser Effekt ab Tag 3 überwiegt.

Neben der Aktivierung von T-Lymphozyten ist eine Interaktion von gp 120 mit MHC-II exprimierenden Synoviozyten (Typ B) möglich. Diese Zellen sitzen im Bereich des Synovialgewebes und haben demnach vermutlich als erste Kontakt mit dem in die Gelenkhöhle eingebrachten Superantigen. Seit längerem ist bekannt, dass MHC-II und gp120 interagieren können. (Lammare et al. 1989)

Des Weiteren sind drei weitere mögliche Bindungen von Superantigenen mit MHC-II beschrieben: peptid-abhängig, peptid-unabhängig zinkvermittelte Interaktion mit  $\beta$ -Ketten und Quervernetzungen von MHC-II-Molekülen. (Fraser und Proft, 2008)

Eine weitere wichtige Rolle bei der Pathophysiologie der Superantigenarthritis scheinen die Synoviozyten zu spielen. Wie bereits erwähnt besteht das Synovialgewebe aus zwei Typen von Synoviozyten. Typ B Synoviozyten sind synoviale Fibroblasten und wirken im entzündeten Gelenk als APC. Im gesunden Gelenk wird MHC-II nicht auf synovialen Fibroblasten exprimiert. Im entzündeten Gelenken von RA-Patienten können Synoviozyten Typ B als APC wirken. Diese Zellen exprimieren hierbei MHC-II bzw. wird MHC-II zunehmend heraufreguliert (Boots et al. 1994, Leech und Morand 2013). In der vorliegenden Untersuchung lassen sich nach intraartikulärer Injektion von gp120 im Vergleich zur NaCl-injektion signifikant mehr MHC-II+-Zellen nachweisen. Abschließend kann jedoch nicht geklärt werden ob es sich bei den als MHC-II+-Zellen identifizierten Zellen um synoviale Fibroblasten oder um antigenpräsentierte B-Lymphozyten handelt. Tatsächlich können B-Zellen im Entzündungsinfiltrat nachgewiesen werden. Wir gehen aber davon aus, dass die immunhistochemischen Untersuchungen die Zahl der B-Zellen mittels Pan-B-Zell-Marker (AK gegen das Oberflächenantigen KiB1R) aufgrund von Hintergrund-Färbeartefakten überschätzt wird, sodass eine Korrelation mit MHC-II nicht sicher möglich ist. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen deshalb am ehesten für eine überwiegende Aktivierung der synovialen Fibroblasten durch gp 120. Zusätzlich sind antigenpräsentierenden Zellen, wie Synoviozyten Typ B in der Lage, B-Zellen über parakrine Prozesse zu aktivieren und nach Transformation in Plasmazellen zur Produktion von Antikörpern anzuregen. (Seyler et al., 2005) Dies spricht wiederum gegen eine primäre Aktivierung von B-Lymphozyten und eher für eine sekundäre Aktivierung durch die synovialen Fibroblasten.

Synoviale Fibroblasten haben in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis eine wichtige aktive Bedeutung und sind nicht passiver Bestandteil des Entzündungsprozesses. (Huber et al. 2006)

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit ein Anstieg der CD-138<sup>+</sup>-Zellen gesehen. Dies spricht für das Vorliegen von Plasmazellen im Laufe der Superantigenarthritis. Eine Antikörperbildung gegen das SAg gp120 ist denkbar. Das Maximum der CD-138<sup>+</sup>-Zellen konnte am 10 Tag der Untersuchung gesehen werden und spricht so für die verzögerte klonale Immunantwort sowie Antikörperbildung, welche eine Plasmazelle durchläuft. Auch in den Seren von RA-Patienten konnten erhöhte Titer von anti-SAg-Antikörpern gemessen werden. (Sawitzke et al., 2000) Plasmazellen sind Teil der Histopathologie in der rheumatoiden Arthritis. Sie produzieren Immunglobuline, welche einen Stellenwert in der Diagnostik der rheumatoiden Arthritis besitzen (Anti-CCP, Rheumafaktoren) und Ansatzpunkt für eine zielgerichtete Therapie mit monoklonalen CD-20 Antikörpern sind (Rituximab).

Betrachtet man das MHC-II so stellt man fest, dass ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrolltieren vorliegt. MHC-II<sup>+</sup>-Zellen sind im gesamten Verlauf in erhöhter Anzahl zu verzeichnen. Das bakterielle SAg SEA kann direkt an MHC II binden und so eine Entzündungskaskade mit Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen zur Folge haben. (Gerlach et al., 2017) Bisher konnte eine Bindung des viralen Superantigens gp120 über MHC-II nicht nachgewiesen werden. Hingegen scheint ein indirekter Mechanismus über die Vermittlung von aktivierten T-Zellen möglich zu sein. Des Weiteren wird auf aktivierten T-Zellen auch MHC-II exprimiert. Ebenso könnten Synoviozyten Typ A, also Makrophagen im gesamten Verlauf der Entzündungsreaktion beteiligt sein und so einen großen Anteil der MHC-II<sup>+</sup>-Zellen ausmachen. (Abdulkadir und Ono, 1995).

Vergleicht man Versuchstiere mit Kontrolltieren hinsichtlich des MHC-I ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Im Verlauf der Untersuchungszeitpunkte bleibt die Anzahl der MHC-I<sup>+</sup>-Zellen relativ konstant. Dies ist nicht verwunderlich, da MHC-I auf allen Zellen exprimiert wird. Das virale Superantigen gp120 hat folglich keinen Einfluss auf die Expression von MHC-I. An Monozyten des Schweins konnte gezeigt werden, dass bakterielle SAg zu

einer erhöhten Expression von MHC-I führen. (Kametani et al., 2012) Eine verringerte Expression von MHC-I konnte in der vorliegenden Studie nicht festgestellt werden. Eine Herunterregulation ist zum Beispiel in Tumorzellen oder Virus-infizierten Zellen gezeigt worden, dies wurde als Schutz vor der zytotoxischen Abwehr über natürliche Killerzellen interpretiert. (Wang et al., 2008) In der vorliegenden Studie deuten die anderen untersuchten Oberflächenantigene auf eine Zellproliferation bzw. Migration, so dass bei gleichzeitig erhöhter Zellzahl mit Herunterregulation des MHC-I möglich ist. Somit könnte der Mechanismus einer verringerten MHC-I-Expression in der SAg-Arthritis, trotz fehlendem Unterschied zwischen Verum- und Placebogruppe hinsichtlich MHC-I, Ausdruck der Entzündungsreaktion und unter anderem Schutz vor einer zytotoxischen Zellabwehr sein.

## **4.2 Superantigenarthritis und HIV-Infektion**

Die HIV-Infektion ist mit unterschiedlichen Gelenkerkrankungen assoziiert. Dabei ist die Pathophysiologie der Arthritis bei vorliegender HIV-Infektion nicht vollständig verstanden, man geht allerdings von einer direkten Rolle von HIV bei der Entstehung einer Synovitis aus. (Allgrogen et al., 2005). Man unterscheidet zwischen einer akut nach der HIV-infektion auftretenden und nur weniger als 24 Stunden anhaltenden Arthritis, der HIV-assoziierten Arthritis und dem diffus infiltrativen Lymphozytose Syndrom (DILS). (Nguyen et al., 2009) Dabei sind die beiden zuletzt genannten Entitäten vor dem Hintergrund der vorliegenden Untersuchung interessant. Das DILS ist ein seltenes, vor allem bei unbehandelten HIV-Patienten, vorkommendes Syndrom, welches mehrere Organe betrifft und zu einer Infiltration von CD 8+-T-Lymphozyten führt. (Ghrenassia et al., 2015) Dabei ist denkbar, dass wie in der vorliegenden Untersuchung die CD 8 dominierende Entzündung durch das virale Superantigen gp120, welches aufgrund der HIV-Infektion vorliegt, ausgelöst wird. Des Weiteren gibt es einen Zusammenhang zwischen antiviral wirkenden Medikamenten und HIV-assoziiertes Arthritis. Es gibt Berichte, dass der Protease-Inhibitor Indinavir signifikant häufiger eine Oligoarthritis bei HIV-Infizierten auslöst. (Allgrogen et al., 2005) Es konnte bereits gezeigt werden das Indinavir die Apoptose von Lymphozyten hemmt. (Chavan et al., 2001) Dabei wäre es denkbar, dass Indinavir einen durch ein Superantigen z.B. gp120

ausgelöste oligoklonale T-Zellantwort durch die gehemmte Apoptose aufrecht erhält und so zur der HIV-assoziierten Arthritis führt. Auch hinsichtlich des klinischen Erscheinungsbildes und des Verlaufs gibt es Parallelen zwischen der in der Untersuchung vorliegenden Arthritis und der HIV-assoziierten Arthritis. Beide sind durch ein akutes Auftreten gekennzeichnet, eine kurz anhaltende Dauer der Arthritis und fehlende Gelenkzerstörung. (Berman et al., 1999)

### **4.3 Vergleich der Ergebnisse mit Befunden der Staphylokokken-enterotoxin-A (SEA) Superantigenarthritis**

Vergleicht man die vorliegende Untersuchung mit der SEA-Superantigenarthritis ergeben sich einige Gemeinsamkeiten. Es konnte ebenfalls eine Rundzellinfiltration gesehen werden. Wie auch bei der SEA-Arthritis zeigte sich die stärkste Entzündungsreaktion im oberen Recessus des Kniegelenks.

In der Untersuchung der Superantigenarthritis mit SEA wurde mittels Wärmebildkamera die Oberflächentemperatur der Kniegelenke gemessen. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied nach SAg Injektion. Aktuell wurde auf diese Untersuchung verzichtet, allerdings waren dahingehend in der täglichen klinischen Untersuchung der Tiere keine Auffälligkeiten zu beobachten. Wie auch die SEA-Superantigenarthritis ist nach Injektion von gp 120 eine lokal begrenzte Entzündung zu vermuten. Weitere Untersuchungen von parenchymatösen Organen oder weiterführenden Blutuntersuchungen wurde zwar nicht durchgeführt, allerdings gab es aufgrund der täglichen Beobachtungen der Tiere hierzu auch keinen Anlass.

Bei gp 120 handelt es sich um ein sogenanntes B-Zell-SAg. Dennoch ist die Superantigenarthritis in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls CD8<sup>+</sup>-T-Zell dominiert. Ein direkter Mechanismus eine Interaktion zwischen TCR und gp 120 ist denkbar.

Wie in der vorliegenden Untersuchung wird bei der SEA-Arthritis ebenfalls davon ausgegangen, dass zunächst das SAg in Kontakt mit den ortsständigen Synoviozyten Typ A tritt. Es konnte ebenfalls eine Überexpression von MHC-II

gemessen werden. Hierbei zeigt sich im Gegensatz zur SEA-Arthritis eine gesteigerte Zahl von MHC-II+-Zellen bereits an Tag 1. Nach Exposition von SEA ist die MHC-II Expression im Beobachtungszeitraum kontinuierlich angestiegen. Möglicherweise ist gp120 im Hinblick auf die Expression von MHC-II potenter, dies könnte ein Hinweis für eine direkte Interaktion des SAg zwischen MHC-II sein. Insgesamt ist zu beobachten, dass die maximale Entzündungsreaktion an Tag 3 zu verzeichnen ist. In der SEA-Arthritis ist das Maximum am 5. Untersuchungstag zu sehen, dies wiederum spricht für eine raschere Wirkung von gp 120. Des Weiteren wurde ein früherer Anstieg der CD4+-T-Lymphozyten verzeichnet. Nach Exposition von SEA war das Maximum der CD4-Zellzahl erst an Tag 10 und bereits am 3. Untersuchungstag zu verzeichnen. Der rasche Anstieg von MHC-II und CD4 unterstützt die bereits in vitro beobachtete direkte Wirkung von gp120. (Lamarre et al., 1989) Im Gegensatz dazu wurde bei der SEA-Arthritis eher kein direkter Mechanismus durch das SAg auf CD4+-Lymphozyten vermutet. (Gerlach et al., 2017)

Zur Augmentation einer entzündlichen Reaktion wurde das Schwimmen der Lewis-Ratten als Stressor für die Versuchstiere angewendet, hierbei zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zur SEA-Arthritis in der allerdings ein solcher externer Einflussfaktor nicht vorgenommen wurde.

Im Gegensatz zur Superantigenarthritis mit SEA bleiben die Zellpopulationen mit Expression von MHC-I nach Kontakt mit gp120 konstant, nach SEA-Exposition war an Tag 10 des Beobachtungszeitraumes ein geringer Anstieg zu verzeichnen. MHC-I scheint mit gp120 also eher nicht direkt zu interagieren.

Sowohl in der vorliegenden Untersuchung als auch in der SEA-Arthritis gelingt der Nachweis von CD138+-Zellen an Tag 10. Dies spricht für die Bildung von Plasmazellen. Ob diese Zellpopulation eine Folge direkter B-Zellstimulation durch das Superantigen ist oder indirekte Folge einer „Bystander-Aktivierung“ ist, bleibt derzeit offen. (Gerlach et al., 2017)

Abschließend lässt sich sagen, dass die Pathomechanismen der Superantigenarthritis unterschiedlich sein mögen, allerdings zeigen sich einige histologische und immunhistologische Gemeinsamkeiten.

## 4.4 Vergleich der Ergebnisse mit Befunden der Kollagen-II-Arthritis

Zur Erforschung der Pathogenese, Ätiologie, möglicher Therapieansätze und diagnostischer Test der rheumatoiden Arthritis behilft man sich verschiedener Modelle. Dabei wurden bereits unterschiedliche Tiermodelle erläutert. Das aktuell am häufigsten angewendete ist das der Kollagen-II-Arthritis (CIA).

Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass sich das Modell der Superantigenarthritis als weiteres Modell etablieren könnte. (Gerlach et al., 2017) In ihrer Auslösung unterscheiden sich die Modelle grundlegend. Bei der CIA werden die Versuchstiere durch mehrfache Injektion gegen Kollagen immunisiert. Bei der SAg-Arthritis reicht die einmalige Injektion des SAg gp120 aus. Was bei einer mehrfachen Injektion eines SAg, welches in der HERV/SAg-Hypothese einer wiederkehrenden Expression von HERV entspräche, passieren würde, bleibt unklar. Im weiteren Verlauf kommt es bei der CIA nach circa 10 Tagen zur Einwanderung von Immunzellen und zu einem Vollbild einer akuten Arthritis, welche sich diffus im gesamten Synovialgewebe abspielt. Im Gegensatz dazu tritt das Maximum der Entzündungsreaktion bei der SAg-Arthritis bereits am 3. Tag nach Injektion von gp 120 im Bereich des oberen Recessus ein. Eine schwere Gelenkzerstörung wie bei der CIA blieb im vorliegenden Untersuchungszeitraum aus. Insofern bildet die CIA mit Mehrfachimmunisierung den destruktiven Prozess, der bei der RA auftritt, besser ab. Im Tiermodell der Superantigen-Arthritis ist bei verlängertem Betrachtungszeitraum (> 14 Tage) und durch Mehrfachinjektionen auch eine Gelenkzerstörung denkbar. Des Weiteren konnten in der CIA aktivierte Plasmazellen, welche IgG-Antikörper gegen Kollagen-II produzieren, nachgewiesen werden. (Joosten et al., 1996; Trentham et al., 1977, Brand et al. 2003, Gonzalez et al 2007) In der vorliegenden SAg-Arthritis wurde bereits auf die Bedeutung der nachgewiesenen CD138+-Zellen bzw. Plasmazellen hingewiesen. Eine wesentliche Bedeutung in der Pathogenese der CD8+-Zellen wurde in der CIA bisher nicht nachgewiesen. (Williams et al., 1989) Im Gegensatz dazu ist die SAg-Arthritis von CD8+-Zellen dominiert. In der CIA haben CD4+-Zellen, welche auch in der SAg-Arthritis nachweisbar waren, eine

wichtige Rolle bei der Induktion und Aufrechterhaltung der Erkrankung. (Mauri et al., 1997)

## **4.5 Vergleich der Ergebnisse mit Befunden der rheumatoiden Arthritis**

In der vorliegenden Untersuchung konnten CD4+- und CD8+-T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Der Nachweis von T-Lymphozyten ist ein immunhistologisches Merkmal der RA. Bei Patienten mit RA sind oligoklonale CD8+- und CD4+-Lymphozyten in der Gelenkflüssigkeit nachweisbar. (Goronzy et al., 1995, Kato et al., 1997) In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Oligoklonalität der T-Zellen nicht untersucht. Vor allem in der frühen Phase der RA spielen CD8+-Lymphozyten eine Rolle (Carvalho et al., 2013) Auch in der vorliegenden Untersuchung sind vor allem CD8+-Zellen zu finden. Im weiteren Verlauf der Untersuchung ändert sich das Verhältnis zu Gunsten der CD4+-Zellen. Neben den immunhistologischen Veränderungen gibt es histologische Gemeinsamkeiten der RA und der SAg-Arthritis mit gp120. So ist wie bei der RA eine synoviale Entzündung zu verzeichnen, welche durch Synoviozyten Typ A verursacht wird. (Izquierdo et al., 2011) Bei Patienten mit RA konnten in der Synovialmembran perivaskuläre Infiltrate von B- und T-Zellen nachgewiesen werden, in der SAg-Arthritis waren diese Aggregate nicht nachzuweisen. Trotzdem gehen wir aufgrund der zellulären Infiltrate in der vorliegenden Untersuchung von einer Migration von Immunzellen aus. (Corsi et al., 2012) Bei der RA kommt es in der präklinischen Phase zur Bildung von Antikörpern durch B-Zellen (Dekkers et al., 2016). Antikörper werden von Plasmazellen produziert. Diese sind in der vorliegenden Arbeit ab dem sechsten Tag der Untersuchungen mittels CD138 nachweisbar. Die Versuchstiere zeigten keinerlei klinische Zeichen einer Arthritis, so dass die vorliegenden Untersuchungen möglicherweise die frühe präklinische Phase der RA abbilden könnten.



## **4.6 Vergleich der Ergebnisse mit Befunden der juvenilen idiopathischen Arthritis**

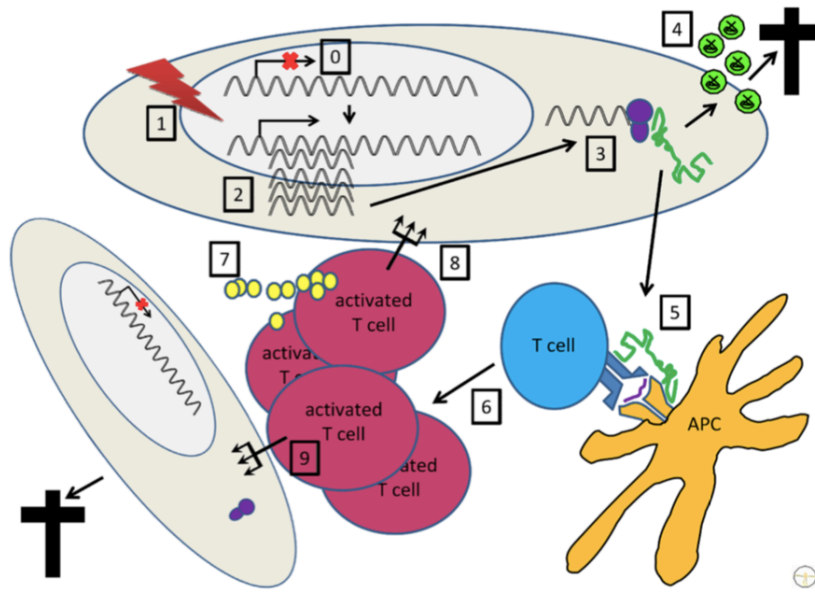
In der Histologie ähneln sich die JIA und die RA. Folglich gibt es auch mit der der SAg-Arthritis Gemeinsamkeiten. Es wurden Infiltrate von T-Zellen, Plasmazellen und aktivierten Makrophagen nachgewiesen. (Hahn und Kim, 2010)

In der JIA scheinen aktivierte T-Lymphozyten ebenso wie bei der RA eine Bedeutung in der Initialisierung und Aufrechterhaltung der Entzündung zu spielen. Wenn man das synoviale Gewebe betrachtet, ist der Anteil der CD8+-Zellen größer als der der CD4+-Zellen, wie auch bei unserer Untersuchung ist die Entzündung durch CD8+-Zellen dominiert. (Black et al., 2002) Allerdings ist zu bedenken, dass die JIA eine relativ heterogene Krankheitsgruppe umfasst, bei der die Analyse der T-Zell-Infiltrate eine unterschiedliche Pathogenese vermuten lässt. So dominieren CD8+-Zellen in der oligoartikulären Form. (Murray et al., 1996) Betrachtet man die TCR der Zellen von JIA-Patienten so zeigt sich eine Oligoklonalität, wobei einzelne TCR-Regionen gehäuft auftreten. (Thompson et al., 1998) Dies lässt die Vermutung zu, dass ein einzelnes Antigen im Sinne eines SAg die T-Zellen oligoklonal aktivieren könnte. *In-vitro*-Untersuchungen zeigten bereits eine direkte Interaktion des SAg mit den CD8+-Lymphozyten. (Kmieciak et al., 1998).

## **4.7 Superantigenarthritis und humane endogene Retroviren**

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass durch das virale Superantigen gp120 im Tiermodell eine Arthritis ausgelöst werden kann. Letztlich konnte damit demonstriert werden, dass virale Hüllproteine eine Entzündung, welche der RA und der JIA ähnlich sind, auslösen. HERV-K18 ist ebenso ein virales Protein und wird durch HERV kodiert. Durch bestimmte Reize kann die Expression von HERV-K18 hochreguliert werden. (Sutkowski et al., 2004) Somit ist ein Auslösen einer sich selbst erhaltenden Entzündungsreaktion durch HERV denkbar. Hinweise dafür, dass es einen Zusammenhang zwischen RA und HERV gibt, zeigen Untersuchungen von RA-Patienten. Dabei konnte HERV-K im erhöhten Maß im Blut und in der

Synovialflüssigkeit festgestellt werden. (Reynier et al., 2009) Ebenso konnten erhöhte Spiegel von HERV K18 im Blut von Patienten mit JIA gefunden werden. (Sicat et al., 2005) Exogene Faktoren wie UV-Strahlung sowie hormonelle Veränderungen können zur HERV-Expression führen. (Ono et al., 1987, Hohenadl et al., 1999) Ebenso können Infektionen mit EBV zur einer Transaktivierung von HERV führen. (Sutkowski et al., 2004, Nellåker et al., 2006, Assinger et al., 2013) Durch Emmer und Kollegen wurde ein hypothetischer Pathomechanismus von HERV und Superantigenen bei der MS bereits diskutiert. (Emmer et al., 2014) So ist denkbar, dass durch exogene Faktoren eine Expression von HERV ausgelöst werden kann. In der Folge kann HERV-kodierte RNA mit offenen Leserastern übersetzt und zu Proteinen synthetisiert werden. Ein Teil dieser Proteine kann wiederum (z.B. HERV-K18) als Superantigen wirken. Es werden nun T-Zellen oligoklonal aktiviert. Durch Reaktion des Immunsystems mit Hilfe von Zytokinen und zytotoxischen Zellen kommt es mutmaßlich nachfolgend zur Neurodegeneration. (Emmer et al., 2014) Dieses Modell ist sicherlich auf die RA übertragbar, da alle Voraussetzungen für den vorgestellten Pathomechanismus auch im Gelenk gegeben sind. Unklar bleibt dabei, welche Akteure im Bereich des Gelenks die einzelnen Rollen übernehmen. (siehe Abb. 14) Obwohl Vorversuche eine lokal begrenzte Reaktion zeigten, so ist eine unentdeckte Aktivierung außerhalb des Gelenks denkbar. Die vorliegende Untersuchung beschränkte sich im Wesentlichen auf die immunhistochemische Auswertung des Gelenks. Untersuchungen von Blut und anderen Organen neben der Milz sind nicht erfolgt. Die HERV/SAg Theorie unterstreicht sowohl die genetische also auch die durch exogene Faktoren getriggerte Krankheitskomponente von RA und JIA. Durch äußere Reize können rezidivierend HERV abgelesen und deren Hüllproteine exprimiert werden, welche den Entzündungsprozess aufrechterhalten. Der chronisch-schubförmige Verlauf lässt sich mit der HERV/SAg-Hypothese ebenfalls erklären. Abschließend lässt sich sagen, dass es mit der HERV/SAG Theorie neue Denkanstöße zur Erforschung der Pathogenese von RA und JIA gibt.



**Abb. 14:** Modell einer HERV/SAG vermittelten Neurodegeneration und Entzündung (nach Emmer et al., 2014).

## 5 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass gp 120 als virales SAg eine Entzündungsreaktion im Kniegelenk der Lewis-Ratte ausgelöst hat. Dabei kam es zur Infiltration von Immunzellen und einer synovialen Entzündung. Die synoviale Entzündung war vornehmlich im oberen Recessus des Kniegelenkes der Lewis-Ratte nachzuweisen. In der weiteren immunhistochemischen Untersuchung konnten T-Zellen und B-Zellen gesehen werden. Des Weiteren konnten mittels CD138 Plasmazellen im Synovialgewebe nachgewiesen werden. Die Auswertung der T-Zell-Marker zeigte eine durch CD8-Zellen dominierte Entzündung, wobei hierfür eine direkte Wirkung von gp120 verantwortlich ist. Der erhöhte Anteil von MHC-II nach SAg Exposition spricht für einen erhöhten Anteil von antigen-präsentierenden Zellen, sowie eine rasche und direkte Interaktion von gp 120 mit MHC-II. Trotz der unterschiedlich postulierten Pathomechanismen sowohl in der vorliegenden Untersuchung als auch in der SEA-Arthritis ist eine Dominanz der CD8+-Lymphozyten festzustellen. Im Vergleich mit Untersuchungen der oligoartikulären Form der JIA zeigt sich ebenfalls eine durch CD8+-Lymphozyten dominierte Entzündung. Mit dem Nachweis von Plasmazellen und T-Lymphozyten, sowie dem Nachweis einer synovialen Entzündung konnten Merkmale einer RA nachgewiesen werden. Sowohl bei der JIA als auch bei der RA gibt es Hinweise auf eine Oligoklonalität der Entzündungsreaktion und somit ein Indiz für eine Rolle der SAg in der Pathogenese der Erkrankungen. Des Weiteren gibt es partielle Gemeinsamkeiten zwischen der durch gp120 ausgelösten Superantigenarthritis und Gelenkerkrankungen, welche mit einer HIV-Infektion assoziiert sind. Letztlich könnte auch die HERV/SAg-Hypothese für autoimmune Arthritiden einen möglichen Pathomechanismus liefern.

## 6 Literaturverzeichnis

Abbas AK, Murphy KM, Sher A (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383(6603):787.

Abdulkadir SA, Ono SJ (1995) How are class II MHC genes turned on and off. *FASEB J* 9(14):1429-1435.

Adiko AC, Babdor J, Gutiérrez-Martínez E, Guermonprez P, Saveanu L (2015) Intracellular transport routes for MHC I and their relevance for antigen cross-presentation. *Front Immunol* 6:335.

Agrawal S, Kishore M C (2000) MHC class I gene expression and regulation. *J Hematother* 9(6):795-812.

Aho K, Koskenvuo M, Tuominen J, Kaprio J (1986) Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. *J Rheumatol* 13(5):899-902.

Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA (1996) CC CKR5: A RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1. *Science* 272(5270):1955-1958.

Allroggen A, Frese A, Rahmann M, Gaubitz M, Husstedt IW, Evers S (2005) HIV associated arthritis: case report and review of the literature. *Eur J Med Res* 10(7):305.

Altemeier WA, Lewis SA, Schlievert PM, Bergdoll MS, Bjornson H S, Staneck JL, Crass BA (1982) *Staphylococcus aureus* associated with toxic shock syndrome: phage typing and toxin capability testing. *Ann Intern Med* 96(6):978-982.

Appleman LJ, Berezovskaya A, Grass I, Boussiotis VA (2000) CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J Immunol* 164(1):144-151.

Assinger A, Yaiw KC, Göttesdorfer I, Leib-Mösch C, Söderberg-Nauclér C (2013) Human cytomegalovirus (HCMV) induces human endogenous retrovirus (HERV) transcription. *Retrovirology* 10(1):132.

Baeten D, Demetter P, Cuvelier C, Van den Bosch F, Kruithof E, Van Damme N, De Keyser F (2000) Comparative study of the synovial histology in rheumatoid arthritis, spondyloarthropathy, and osteoarthritis: influence of disease duration and activity. *Ann Rheum Dis* 59(12):945-953.

Balakrishnan K, Adams LE (1995) The role of the lymphocyte in an immune response. *Immunol Invest* 24(1-2):233-244.

Bauer K, Knipper A, Tu-Rapp H, Koczan D, Kreutzer HJ, Nizze H, Ibrahim SM (2005) Perforin deficiency attenuates collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 7(4):877.

- Baumgarth N (2000) A two-phase model of B-cell activation. *Immunol Rev* 176:171-180.
- Berberian L, Goodglick L, Kipps TJ, Braun J (1993) Immunoglobulin VH3 gene products: natural ligands for HIV gp120. *Science* 261(5128):1588-1591.
- Berg L, Rönnelid J, Sanjeevi CB, Lampa J, Klareskog L (1999) IFN- $\gamma$  production in response to in vitro stimulation with collagen type II in rheumatoid arthritis is associated with HLA-DRB1\* 0401 and HLA-DQ8. *Arthritis Res Ther* 2(1):75.
- Berman A, Cahn P, Perez H, Spindler A, Lucero E, Paz S, Espinoza LR (1999) Human immunodeficiency virus infection associated arthritis: clinical characteristics. *Journal Rheum* 26(5):1158-1162.
- Bhakdi S: Mikrobielle Pathogenitätsfaktoren und Virulenzmechanismen. In: Adam D, Doerr HW, Link H, Lode H (Hrsg) *Die Infektiologie*. Springer, Berlin Heidelberg, 2004, S. 4-24.
- Black AP, Bhayani H, Ryder CA, Gardner-Medwin JM, Southwood TR (2002) T-cell activation without proliferation in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther* 4(3):177.
- Boots AM, Wimmers-Bertens AJ, Rijnders AW (1994) Antigen-presenting capacity of rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunology* 82(2):268.
- Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF (2003) Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Semin Immunopathol* 25(1):3-18.
- Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig KW (2002) The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* 111(7):967-979.
- Calmon-Hamaty F, Audo R, Combe B, Morel J, Hahne M (2015) Targeting the Fas/FasL system in Rheumatoid Arthritis therapy: Promising or risky. *Cytokine* 75(2):228-233.
- Cancro M, Carter R H, Kearney J, Kelsoe G, Neuberger M: Aktivierung von B-Zellen und Produktion von Antikörpern. In: Murphy K, Trvers P, Walport M (Hrsg.): *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009, S. 481-483.
- Carty SM, Snowden N, Silman AJ (2003) Should infection still be considered as the most likely triggering factor for rheumatoid arthritis. *J Rheum* 30(3):425-429.
- Carvalho H, da Silva JAP, Souto-Carneiro MM (2013) Potential roles for CD8+ T cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 12(3):401-409.
- Chang K, Yang SM, Kim SH, Han KH, Park SJ, Shin JI (2014) Smoking and rheumatoid arthritis. *Int J of Mol Sci* 15(12):22279-22295.

Chavan S, Kodoth S, Pahwa R, Pahwa S. (2001) The HIV protease inhibitor Indinavir inhibits cell-cycle progression in vitro in lymphocytes of HIV-infected and uninfected individuals. *Blood* 98(2):383-389.

Cole BC, Atkin CL (1991) The *Mycoplasma arthritidis* T-cell mitogen MAM: a model superantigen. *Immunol Today* 12(8):271-276.

Corsiero E, Bombardieri M, Manzo A, Bugatti S, Ugucioni M, Pitzalis C (2012) Role of lymphoid chemokines in the development of functional ectopic lymphoid structures in rheumatic autoimmune diseases. *Immunol Lett* 145(1-2):62-67.

Craiu A, Akopian T, Goldberg A, Rock KL (1997) Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide. *P Natl Acad Sci USA* 94(20):10850-10855.

Derksen V, Huizinga T, van der Wouden D (2017) The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol* 39(4):437-446.

De Souza EP, Segundo PTE, José FF, Lemaire D, Santiago M (2001) Rheumatoid arthritis induced by  $\alpha$ -interferon therapy. *Clin Rheumatol* 20(4):297-299.

Dekkers J, Toes RE, Huizinga TW, van der Woude D (2016) The role of anticitrullinated protein antibodies in the early stages of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 28(3):275-281.

Deng J, Mitsuki YY, Shen G, Ray JC, Cicala C, Arthos J, Hioe CE (2016) HIV envelope gp120 alters T-cell receptor mobilization in the immunological synapse of uninfected CD4 T cells and augments the T cell activation. *J Virol* 90(23):10513-10526.

Dhodapkar MV, Sanderson RD (1999) Syndecan-1 (CD 138) in myeloma and lymphoid malignancies: a multifunctional regulator of cell behavior within the tumor microenvironment. *Leuk Lymphoma* 34(1-2):35-43.

Donaldson JG, Williams DB (2009) Intracellular assembly and trafficking of MHC class I molecules. *Traffic* 10(12):1745-1752.

Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Paxton W A (1996) HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381(6584):667.

Dumonde DC, Glynn LE (1962) The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br J Exp Pathol* 43(4):373.

Dustin ML (2002) The immunological synapse. *Arthritis Res Ther* 4(3):119.

Ehlhardt S, Seifert M, Schneider J, Ojak A, Zang KD, Mehraein Y (2006) Human endogenous retrovirus HERV-K (HML-2) Rec expression and transcriptional activities in normal and rheumatoid arthritis synovia. *J Rheumatol* 33(1):16-23.

Ejtehadi HD, Freimanis GL, Ali HA, Bowman S, Alavi A, Axford J, Nelson PN (2006) The potential role of human endogenous retrovirus K10 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: a preliminary study. *Ann Rheum Dis* 65(5):612-616.

Elgert KD: *Immunology: understanding the immune system*. 2. Aufl. John Wiley & Sons, Blacksburg, 2009, S. 264-267.

Emmer A, Staege MS, Kornhuber ME (2014) The retrovirus/superantigen hypothesis of multiple sclerosis. *Cell Mol Neurobiol* 34(8):1087-1096.

Emmer A, Gerlach K, Staege MS, Kornhuber ME (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(1):93-96.

Eyre DR (2004). Collagens and cartilage matrix homeostasis. *Clin Orthop Relat R* 427:118-122.

Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Shmookler B (2002) Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *Int J Surg Pathol* 10(2):81-89.

Fraser J, Arcus V, Kong P, Baker E, Proft T (2000) Superantigens—powerful modifiers of the immune system. *Mol Med Today* 6(3), 125-132.

Gerlach K, Tomuschat C, Finke R, Staege MS, Brütting C, Brandt J, Kornhuber ME (2017) Experimental arthritis in the rat induced by the superantigen staphylococcal enterotoxin A. *Scand J Immunol* 85(3):191-196.

Ghrenassia E, Martis N, Boyer J, Burel-Vandenbos F, Mekinian A, Coppo P (2015) The diffuse infiltrative lymphocytosis syndrome (DILS). A comprehensive review. *J Autoimmun* 59:19-25.

Göbel TWF, Bolliger L: Evolution of the T cell receptor signal transduction units. In: Pasquier LD, Litman GW (Hrsg.): *Origin and Evolution of the Vertebrate Immune System*. Springer, Berlin-Heidelberg, S. 303-320.

González C, Abello P, Cepeda R, Salazar L, Aravena O, Pesce B, Aguillón JC (2007) Inflammation, synovial angiogenesis and chondroid apoptosis in the evolution of type II collagen-induced arthritis. *Eur Cytokine Netw* 18(3):9-18.

Gonzalo JA, Delaney T, Corcoran J, Goodearl A, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ (2001) Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation. *J Immunol* 166(1):1-5.

Goodglick L, Zevit N, Neshat MS, Braun J (1995) Mapping the Ig superantigen-binding site of HIV-1 gp120. *J Immunol* 155(11):5151-5159.

Goronzy JJ, Weyand CM (1995) T and B cell-dependent pathways in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 7(3):214-221.



Gravallese EM, Monach PA: the rheumatic joint: synovitis and tissue destruction. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH (Hrsg.): Rheumatology. Mosby Elsevier, Philadelphia, 2008, S. 811-862.

Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ (1987) The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30(11):1205-1213.

Gupta G, Kunkel M Countermeasures against Superantigens: Structure-Based Design of Bispecific Receptor Mimics. In: Kotb M, Fraser JD (Hrsg.): Superantigens: molecular basis for their role in human diseases. American Society of Microbiology Press, Washington, 2007, S.245-254.

Hahn YS, Kim JG (2010) Pathogenesis and clinical manifestations of juvenile rheumatoid arthritis. *Korean J Pediatr* 53(11):921-930.

Haworth C, Brennan FM, Chantry D, Turner M, Maini RN, Feldmann M (1991) Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Eur J Immunol* 21(10):2575-2579.

Hersh AO, Prahalad S (2015) Immunogenetics of juvenile idiopathic arthritis: A comprehensive review. *J of autoimmun* 64:113-124.

Hirsch S. 2016. Myositis nach intramuskulärer Injektion des Superantigens gp120 bei der Lewis-Ratte [Dissertation]. Halle: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Hohenadl C, Germaier H, Walchner M, Hagenhofer M, Herrmann M, Stürzl M, Leib-Mösch C (1999) Transcriptional activation of endogenous retroviral sequences in human epidermal keratinocytes by UVB irradiation. *J Invest Dermatol* 113(4):587-594.

Holmdahl R, Lorentzen JC, Lu S, Olofsson P, Wester L, Holmberg J, Pettersson U (2001) Arthritis induced in rats with non-immunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 184(1):184-202.

Honey K, Rudensky AY (2003) Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3(6):472.

Howell MD, Diveley JP, Lundeen KA, Esty A, Winters ST, Carlo DJ, Brostoff S W (1991) Limited T-cell receptor beta-chain heterogeneity among interleukin 2 receptor-positive synovial T cells suggests a role for superantigen in rheumatoid arthritis. *P Natl Acad Sci USA* 88(23):10921-10925.

Hsiao FC, Lin M, Tai A, Chen G, Huber BT (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(4):2056-2060.

Huber LC, Distler O, Tarner I, Gay RE, Gay S, Pap T (2006) Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 45(6):669-675.

- Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K (2000) Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histo Cytol* 63(1):17-31.
- Izquierdo E, Cañete JD, Celis R, Del Rey MJ, Usategui A, Marsal S, Pablos JL (2011) Synovial fibroblast hyperplasia in rheumatoid arthritis: clinicopathologic correlations and partial reversal by anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis Rheum* 63(9):2575-2583.
- Joosten LA, Helsen MM (2008) Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice: a comparative study using anti-TNFalpha, anti-IL-1alpha/beta and IL-1Ra. *Arthritis Rheum* 58(2):22-110.
- Kahn JO, Walker BD (1998) Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *Engl J Med* 339(1):33-39.
- Kametani Y, Ohshima S, Kita YF, Shimada S, Kamiguchi H, Shiina T, Ando A (2012) Porcine MHC classical class I genes are coordinately expressed in superantigen-activated mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* 148(3-4):252-259.
- Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D (2005) Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology* 12(3):167-181.
- Kappler J, Kotzin B, Herron L, Gelfand EW, Bigler RD, Boylston A, Marrack P (1989) V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 244(4906):811-813.
- Karray S, Zouali M (1997) Identification of the B cell superantigen-binding site of HIV-1 gp120. *P Natl Acad Sci USA* 94(4):1356-1360.
- Kato T, Kurokawa M, Masuko-Hongo K, Sasakawa H, Sekine T, Ueda S, Nishioka K (1997) T cell clonality in synovial fluid of a patient with rheumatoid arthritis: persistent but fluctuant oligoclonal T cell expansions. *J Immunol* 159(10):5143-5149.
- Khazaie K, Von Boehmer H (2006) The impact of CD4+ CD25+ Treg on tumor specific CD8+ T cell cytotoxicity and cancer. *Semin Cancer Biol* 16(2):124-136.
- Klatt T, Ouyang Q, Flad T, Koetter I, Bühring HJ, Kalbacher H, Müller CA (2005) Expansion of peripheral CD8+ CD28-T cells in response to Epstein-Barr virus in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 32(2):239-251.
- Klausner RD, Samelson LE (1991) T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. *Cell* 64(5):875-878.
- Klimiuk PA, Sierakowski S, Latosiewicz R, Skowronski J, Cylwik JP, Cylwik B, Chwiecko J (2005) Histological patterns of synovitis and serum chemokines in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 32(9):1666-1672.
- Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D (1996). Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 87(5):811-822.

- Lamarre D, Capon DJ, Karp DR, Gregory T, Long EO, Sekaly RP (1989) Class II MHC molecules and the HIV gp 120 envelope protein interact with functionally distinct regions of the CD4 molecule. *EMBO J* 8(11):3271-3277.
- Lappin E, Ferguson AJ (2009) Gram-positive toxic shock syndromes. *Lancet Infect Dis* 9(5):281-290.
- Laurence J, Hodtsev AS, Posnett DN (1992) Superantigen implicated in dependence of HIV-1 replication in T cells on TCR V  $\beta$  expression. *Nature* 358(6383):255.
- Leech MT, Morand EF (2013) Fibroblasts and synovial immunity. *Curr Opin Pharmacol* 13(4):565-569.
- Leong ASY, Cooper K, Leong FJWM: *Manual of Diagnostic Cytology*. 2. Aufl. Greenwich Medical Media Ltd., Cambridge, 2003, S. 73.
- Levinson AI, Kozlowski L, Zheng Y, Wheatley L (1995) B-cell superantigens: definition and potential impact on the immune response. *J Clin Immunol* 15(6):26-36.
- Liu H, Zhu R, Liu C, Ma R, Wang L, Chen B, Fu M (2017) Evaluation of decalcification techniques for rat femurs using HE and immunohistochemical staining. *Biomed Res Int* 2017:1-6
- Li H, Llera A, Malchiodi EL, Mariuzza RA (1999) The structural basis of T cell activation by superantigens. *Annu Rev Immunol* 17(1):435-466.
- Malissen B, Ardouin L, Lin SY, Gillet A, Malissen M (1999) Function of the CD3 subunits of the pre-TCR and TCR complexes during T cell development. *Adv Immunol* 72:103-148
- Mameli G, Erre GL, Caggiu E, Mura S, Cossu D, Bo M, Buscetta G (2017) Identification of a HERV-K env surface peptide highly recognized in Rheumatoid Arthritis (RA) patients: a cross-sectional case-control study. *Clin Exp Immunol* 189(1):127-131.
- Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, Kuma KI, Hayashida H, Miyata T, Honjo T (1998) The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J Exp Med* 188(11):2151-2162.
- Mauri C, Chu CQ, Woodrow D, Mori L, Londei M (1997) Treatment of a newly established transgenic model of chronic arthritis with nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody. *J Immunol* 159(10):5032-5041.
- Meinecke I, Pap T (2006) Rheumatoide Arthritis-T-Zell-unabhängige Mechanismen. *Aktuel Rheumatol* 31(1):41-47.
- Michaels FH, Banks KL, Reitz JM (1991) Lessons from caprine and ovine retrovirus infections. *Rheum Dis Clin N Am* 17(1):5-23.

- Müller-Alouf H, Carnoy C, Simonet M, Alouf JE (2001) Superantigen bacterial toxins: state of the art. *Toxicon* 39(11):1691-1701.
- Naneh O, Avčin T, Zavec AB (2014) Perforin and human diseases. *Subcell Biochem* 80:221-239.
- Nellåker C, Yao Y, Jones-Brando L, Mallet F, Yolken RH, Karlsson H (2006) Transactivation of elements in the human endogenous retrovirus W family by viral infection. *Retrovirology* 3(1):44.
- Nepom BS, Nepom GT (1995) Polyglot and polymorphism. An HLA update. *Arthritis Rheum* 38(12):1715-1721.
- Nguyen BY, Reveille JD (2009) Rheumatic manifestations associated with HIV in the highly active antiretroviral therapy era. *Curr Opin Rheumatol* 21(4):404-410.
- Niedergang F, Hemar A, Hewitt CR, Owen MJ, Dautry-Varsat A, Alcover A (1995) The Staphylococcus aureus enterotoxin B superantigen induces specific T cell receptor down-regulation by increasing its internalization. *J Biol Chem* 270(21):12839-12845.
- Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Graham RR (2014) Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 506(7488):376.
- Omata S, Sasaki T, Kakimoto K, Yamashita U (1997) Staphylococcal enterotoxin B induces arthritis in female DBA/1 mice but fails to induce activation of type II collagen-reactive lymphocytes. *Cell Immunol* 179(2):138-145.
- Ono M, Kawakami M, Ushikubo H (1987) Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D. *J Virol* 61(6):2059-2062.
- Palaiologou M, Delladetsima I, Tiniakos D (2014) CD138 (syndecan-1) expression in health and disease. *Histol Histopathol* 29(2):177-189.
- Patella V, Florio G, Petraroli A, Marone G (2000) HIV-1 gp120 induces IL-4 and IL-13 release from human FcεRI+ cells through interaction with the VH3 region of IgE. *J Immunol* 164(2):589-595.
- Paterson PY, Drobish DG, Hanson MA, Jacobs AF (1970) Induction of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *Int Arch Allergy Imm* 37(1):26-40.
- Pearson CM (1956) Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med* 91(1):95-101.
- Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, Ounanian-Paraz A, Camelo S, Dumon A, Gebuhrer L (2001) Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vβ16 T-lymphocyte activation. *Virology* 287(2):321-332.

- Petersson K, Forsberg G, Walse B (2004) Interplay between superantigens and immunoreceptors. *Scand J Immunol* 59(4):345-355.
- Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J, Suarez-Almazor ME (2004) International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol* 31(2):390.
- Pipkin ME, Lieberman J (2007) Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* 19(3):301-308.
- Rawstron AC (2006) Immunophenotyping of plasma cells. *Curr Protoc Cytom* 36(1):6-23.
- Reynier F, Verjat T, Turrel F, Imbert PE, Marotte H, Mouglin B, Miossec P (2009) Increase in human endogenous retrovirus HERV-K (HML-2) viral load in active rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 70(3):295-299.
- Rigante D, Bosco A, Esposito S (2015) The etiology of juvenile idiopathic arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 49(2):253-261.
- Rosloniec EF, Cremer M, Kang AH, Myers LK, Brand DD (2010) Collagen-induced arthritis. *Curr Protoc Immunol* 89(1):5-15.
- Ryu SE, Truneh A, Sweet RW, Hendrickson WA (1994) Structures of an HIV and MHC binding fragment from human CD4 as refined in two crystal lattices. *Structure* 2(1):59-74.
- Sawitzke A, Joyner D, Knudtson K, Mu HH, Cole B (2000) Anti-MAM antibodies in rheumatic disease: evidence for a MAM-like superantigen in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 27(2):358-364.
- Schwab JH, Brown RR, Anderle SK, Schlievert PM (1993) Superantigen can reactivate bacterial cell wall-induced arthritis. *J Immunol* 150(9):4151-4159.
- Scola MP, Imagawa T, Boivin GP, Giannini EH, Glass DN, Hirsch R, Grom AA (2001) Expression of angiogenic factors in juvenile rheumatoid arthritis: correlation with revascularization of human synovium engrafted into SCID mice. *Arthritis Rheum* 44(4):794-801.
- Seldin MF, Amos CI, Ward R, Gregersen PK (1999) The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 42(6):1071-1079.
- Seyler TM, Park YW, Takemura S, Bram RJ, Kurtin PJ, Goronzy JJ, Weyand CM (2005) BLYS and APRIL in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 115(11):3083-3092.
- Sicat J, Sutkowski N, Huber BT (2005) Expression of human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen is elevated in juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 32(9):1821-1831.
- Silverman GJ (1997) B-cell superantigens. *Immunol today* 18(8):379-386.

- Skapenko A, Müller R, Schulze-Koops H (2006) Rheumatoide Arthritis-eine T-Zell-abhängige Erkrankung. *Aktuel Rheumatol* 31(02):88-93.
- Stamper CC, Zhang Y, Tobin JF, Erbe DV, Ikemizu S, Davis SJ, Mosyak L (2001) Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature* 411(6837):617.
- Stastny P (1978) Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 298(16):869-871.
- Stauffer Y, Marguerat S, Meylan F, Ucla C, Sutkowski N, Huber B, Conrad B (2001) Interferon- $\alpha$ -induced endogenous superantigen: a model linking environment and autoimmunity. *Immunity* 15(4):591-601.
- Stow NW, Douglas R, Tantilipikorn P, Lacroix JS (2010) Superantigens. *Otolaryng Clin N Am* 43(3):489-502.
- Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA, Huber BT (2001) Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity* 15(4):579-589.
- Tai AK, Huber BT: Viral Superantigens in Mice and Humans In: Kotb M, Fraser JD (Hrsg.): *Superantigens: molecular basis for their role in human diseases*. American Society of Microbiology Press, Washington, 2007, S. 59-76.
- Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM (2001) T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* 167(8):4710-4718.
- Taneja V (2014) Arthritis susceptibility and the gut microbiome. *FEBS Lett* 588(22):4244-4249.
- Terato K, Hashida R, Miyamoto K, Morimoto T, Kato Y, Kobayashi S, Nagai Y (1982) Histological, immunological and biochemical studies on type II collagen-induced arthritis in rats. *Biomed Res* 3(5):495-505.
- Thompson SD, Murray KJ, Grom AA, Passo MH, Choi E, Glass DN (1998) Comparative sequence analysis of the human T cell receptor  $\beta$  chain in juvenile rheumatoid arthritis and juvenile spondylarthropathies: evidence for antigenic selection of T cells in the synovium. *Arthritis Rheum* 41(3):482-497.
- Todd J, Fishaut M, Kapral F, Welch T (1978) Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I Staphylococci. *Lancet* 312(8100):1116-1118.
- Torres BA, Kominsky S, Perrin GQ, Hobeika AC, Johnson HM (2001) Superantigens: the good, the bad, and the ugly. *Exp Biol Med* 226(3):164-176.
- Townsley-Fuchs J, Neshat MS, Margolin DH, Braun J, Leegoodglick (1997) HIV-1gp120: a novel viral B cell superantigen. *Int Rev Immunol* 14(4):325-338.
- Trentham DE, Townes AS, Kang AH (1977) Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 146(3):857-868.

- Tsai S, Santamaria P (2013) MHC class II polymorphisms, autoreactive T-cells, and autoimmunity. *Front Immunol* 4:321.
- Tugnet N, Rylance P, Roden D, Trela M, Nelson P (2013) Human endogenous retroviruses (HERVs) and autoimmune rheumatic disease: is there a link. *Open J Rheumatol* 7:13.
- Valitutti S, Müller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A (1995) Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 375(6527):148.
- Van Horssen J, van der Pol S, Nijland P, Amor S, Perron H (2016) Human endogenous retrovirus W in brain lesions: Rationale for targeted therapy in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* 8:11-18.
- Veale DJ, Orr C, Fearon U (2017) Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol* 39(4): 343-354.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Gocayne JD (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291(5507):1304-1351.
- Villadangos JA, Ploegh HL (2000) Proteolysis in MHC class II antigen presentation. *Immunity* 12(3):233-239.
- Wang Q, Ma Y, Liu D, Zhang L, Wei W (2011) The roles of B cells and their interactions with fibroblast-like synoviocytes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Int Arch Allergy Immunol* 155(3):205-211.
- Wang Z, Zhang LI, Qiao A, Watson K, Zhang J, Fan GH (2008) Activation of CXCR4 triggers ubiquitination and down-regulation of major histocompatibility complex class I (MHC-I) on epithelioid carcinoma HeLa cells. *J Biol Chem* 283(7):3951-3959.
- Weiss JE, Ilowite NT (2007) Juvenile idiopathic arthritis. *Rheum Dis Clin N Am* 33(3):441-470.
- Williams RO, Feldmann M, Maini RN (1992) Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *P Natl Acad Sci USA* 89(20):9784-9788.
- Williams RO, Whyte A, Waldmann H (1989) Resistance to collagen-induced arthritis in DBA/1 mice by intraperitoneal administration of soluble type II collagen involves both CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Autoimmunity* 4(4):237-245.
- Wu H, Kwong PD, Hendrickson WA (1997) Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature* 387(6632):527.
- Von Essen M, Bonefeld CM, Siersma V, Rasmussen AB, Lauritsen JPH, Nielsen BL, Geisler C (2004) Constitutive and ligand-induced TCR degradation. *J Immunol* 173(1):384-393.

Yoon V, Fridkis-Hareli M, Munisamy S, Lee J, Anastasiades D, Stevceva L (2010) The GP120 molecule of HIV-1 and its interaction with T cells. *Curr Med Chem* 17(8):741-749.

Zehn D, Lee SY, Bevan MJ (2009) Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* 458(7235): 211.



## 7 Thesen

1. Die rheumatoide Arthritis ist eine entzündliche Systemerkrankung bei der es zu einer progressiven Gelenkzerstörung kommt. Die Ätiologie der rheumatoiden Arthritis ist bisher unklar. Es existieren mehrere Tiermodelle zur Erforschung der Ätiologie und Pathogenese. Neben anderen Faktoren werden Superantigene zur Erklärung der Ätiologie herangezogen.
2. Die intraartikuläre Injektion von 40µl des Superantigens gp120 mit einer Konzentration von 500µl/ml führt zu einer Entzündungsreaktion des Kniegelenks der Lewis-Ratte.
3. Das Entzündungsinfiltrat ist durch CD8<sup>+</sup>-Zellen dominiert und überwiegend im oberen Recessus zu finden. Das Maximum der Entzündungsaktivität wird an Tag 3 nach der Injektion erreicht. Die Entzündungsreaktion ist überwiegend auf direkte Wirkungen des Superantigens gp120 zurückzuführen.
4. Es zeigen sich immunhistochemische und histopathologische Gemeinsamkeiten der ausgelösten Entzündungsreaktion und der rheumatoiden sowie juvenile idiopathischen Arthritis. Des Weiteren zeigten sich Ähnlichkeiten zur SEA-Superantigenarthritis und zu HIV-assoziierten Gelenkerkrankungen.
5. Die Herabregulierung des CD3/TCR-Komplexes nach Superantigenkontakt ist ein bereits beobachteter Mechanismus zur Verhinderung eines schädlichen Zytokinsturms. Die CD3-Depression und somit eine Herabregulierung des CD3/TCR-Komplexes konnte auch bei der Superantigenarthritis mit gp120 beobachtet werden.

## **8 Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unter Zuhilfenahme anderer der angegebenen Quellen und Materialien angefertigt habe. Des Weiteren erkläre ich, dass keine früheren Promotionsversuche stattgefunden haben und die Arbeit weder im In- und Ausland bereits veröffentlicht wurde. Mir ist bekannt, dass ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß §16 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

Halle (Saale), den 19.10.2020

## 9 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 Beratung und die unermüdliche Unterstützung möchte ich mich bei meinen Betreuern Herrn Prof. Dr. med. R. Finke, ehemaliger Direktor der Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie und insbesondere Prof. Dr. med. M. Kornhuber, Chefarzt der Klinik für Neurologie des Helios Krankenhaus Sangerhausen, recht herzlich danken.

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

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

Mein größter Dank gilt meiner Ehefrau Celina Kränzlein für die moralische Unterstützung in schwierigen Zeiten.