

ontwikkende deelgebied, een indruk van de vraagstukken en complexiteit, maar niet minder van de thans gebruikte benaderingen en voorhanden zijnde oplossingen. Het nummer biedt aldus een caleidoscoop die kan boeien voor zowel de algemeen klinisch chemicus als de immunologische specialist, en die van nut kan zijn bij diagnostiek en behandeling van auto-immuunziekten.

Literatuur

1. Ehrlich P. Die Schutzstoffe des Blutes. 73 Verh Ges Dtsch Naturforsch Aertze 1902; 1: 250-275.
2. Donath J, Landsteiner K. Über paroxysmale Hämoglobulinurie. Münch Med wochenschr 1904; 51: 1590-1593.
3. Novotny VMJ, Overbeeke MAM. Auto-immuun hemolytische anemie: klinisch een laboratoriumaspecten. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2006; 31: 269-274.
4. Rijkers GT, Prakken BJ. Verstoorde immuunregulatie bij auto-immuniteit. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2006; 31: 248-256.
5. Hooijkaas H, Smeenk R, Gmelig Meyeling F. Systemische auto-immuunziekten: passende serologische diagnostiek. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2006; 31: 257-268.
6. Witebsky E, Rose NR, Terplan K, Paine JR, Egan RW. Chronic thyroiditis and autoimmunization. J Am Med Assoc 1957; 164: 1439-1447.
7. Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, Moore CV. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura (reprinted from 1951). J Lab Clin Med 1990; 115: 636-45.
8. Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). Immunology Today 1991; 14: 426-430.
9. Batstra MR, Drexhage HA. Auto-immuunziekten van endocriene organen. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2006; 31: 275-281.
10. Bakker-Jonges LE, van Buuren HR. Auto-immuunziekten van de lever. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2006; 31: 281-289.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2006; 31: 248-256

Verstoorde immuunregulatie bij auto-immuniteit

G.T. RIJKERS^{1,2,3} en B.J. PRAKKEN^{1,3}

Tijdens de vorming van T-lymfocyten in de thymus worden de cellen met reactiviteit tegen lichaamseigen autoantigenen verwijderd of onschadelijk gemaakt (centrale tolerantie). Omdat dit systeem niet perfect is, bestaan er in de periferie daarnaast aanvullende regelmechanismen die voorkómen dat ongewenste reactiviteit tegen autoantigenen kan ontstaan. Regulatorische T-lymfocyten (Tregs), met het fenotype CD4⁺ CD25⁺ en die de FOXP3-transcriptiefactor tot expressie brengen, hebben een belangrijke functie bij deze regulatie. Tregs produceren onder andere IL-10, waardoor mede de balans in cytokineproductie wordt gehandhaafd en daarmee de hoogte, de duur en de richting van de immuunrespons gereguleerd. Defecten in deze regulatiemechanismen kunnen leiden tot orgaanspecifieke of systemische auto-immuunziekten. Hierbij wordt een verstoord cytokinenpatroon gevonden, met verhoogde pro-inflammatoire cytokinen en vaak verminderde Treg-functie. De primaire (mole-

culaire of omgeving) oorzaak van systemische auto-immuunziekten, alsmede de betrokken autoantigenen zijn onbekend, maar een belangrijke rol kan worden toebedacht aan 'heat shock'-eiwitten (HSP's). De HSP's komen voor bij zowel bacteriën als de mens en de sequentie is zeer sterk geconserveerd tijdens de evolutie. Een respons van T-lymfocyten tegen bacterie-specifieke sequenties induceert artritis, terwijl een respons van Tregs tegen geconserveerde sequenties juist beschermend werken. Algemeen ingrijpen in de verstoorde immuunregulatie bij auto-immuunziekten door middel van TNF-blokkade is klinisch zeer effectief, maar kent bijwerkingen. Bijsturing van antigeenspecifieke immuunregulatie (bijvoorbeeld tegen HSP's) biedt voor de toekomst wellicht een alternatieve therapeutische strategie.

Trefwoorden: auto-immuniteit; tolerantie; regulatorische T-cellen; cytokinebalans; 'heat shock'-eiwitten

Afdeling Pediatrische Immunologie, Universitair Medisch Centrum, Utrecht¹, Laboratorium voor Medische Microbiologie en Immunologie, St. Antoniusziekenhuis, Nieuwegein² en IACOPO Institute for Translational Medicine, San Diego en Utrecht³

Correspondentieadres: dr. G.T. Rijkers, Sint Antonius Ziekenhuis, Afdeling Medische Microbiologie en Immunologie, Koekoekslaan 1, Postbus 2500, 3430 EM Nieuwegein
E-mail: g.rijkers@antoniushuis.net

Het immuunsysteem heeft het vermogen om op een ogenschijnlijk oneindig aantal antigenen te reageren en kan dit doen omdat het een zeer groot repertoire aan T- en B-lymfocyten (klonen) omvat, ieder met een unieke antigeenreceptor. Het is onvermijdelijk dat binnen het repertoire van T-lymfocyten zich ook cellen bevinden met antigeenreceptoren specifiek voor lichaamseigen eiwitten, de zogenaamde autoreactieve T-lymfocyten, en dat die kunnen leiden tot schadelijke auto-immuniteit. Het is daarom belangrijk om

deze autoreactieve T-lymfocyten onder controle te houden. Deze controlemechanismen dienen ervoor om auto-immuniteit te vermijden maar de beschermende immuniteit intact te laten.

Centrale tolerantiemechanismen

Bij de vorming van T-lymfocyten migreren voorlopercellen naar de thymus, waar, door genherschikking, de antigeenreceptor wordt gevormd. De meerderheid van T-cel-antigeenreceptoren bestaat uit 2 ketens, α en β , en wordt $\alpha\beta$ -T-celreceptor ($\alpha\beta$ TCR) genoemd. Deze receptoren herkennen immunogene peptiden, indien die in de groeve van MHC-moleculen worden gepresenteerd (MHC: major histocompatibility complex, HLA bij de mens). De TCR bindt zowel aan het peptide als aan het MHC-molecuul. Tijdens de vorming van T-lymfocyten in de thymus wordt geselecteerd op het vermogen om aan (eigen) MHC te binden. Dit proces heet positieve selectie; alleen die T-lymfocyten waarvan de TCR met voldoende sterkte bindt aan MHC blijven in leven en de anderen sterven door apoptose. Een ingebouwd gevaar van dit selectieproces is dat hierbij T-lymfocyten die lichaamseigen eiwitten herkennen in het voordeel zijn. Een MHC-molecuul dat aan het oppervlak van epitheelcellen en andere antigeenpresenterende cellen in de thymus tot expressie komt bevat altijd peptiden in de groeve; 'lege' MHC-moleculen komen niet voor. In heel veel gevallen zal het peptide in de groeve een lichaamseigen ('zelf')-peptide zijn, een product van de normale fysiologische eiwitturnover in de cel. Er is echter een tweede proces, negatieve selectie genoemd, dat er voor zorg draagt dat T-lymfocyten met een hoge affiniteit voor zelf-peptiden sterven. Negatieve selectie is daarmee het belangrijkste mechanisme voor tolerantie tegen lichaamseigen antigenen (autoantigenen). We noemen deze vorm van tolerantie centrale tolerantie, en wanneer deze faalt kan dat resulteren in auto-immuunziekten (1, 2).

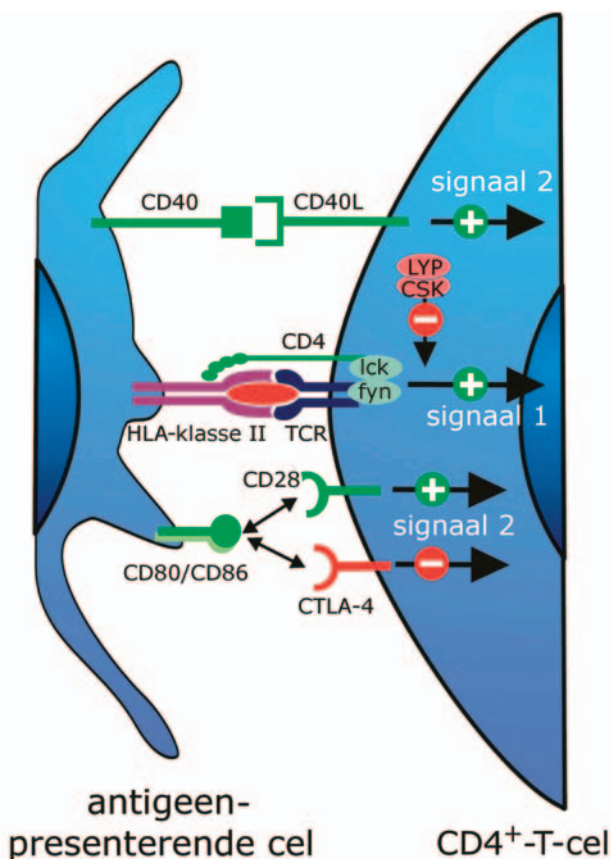
Na het proces van receptorherschikking en 2 rondes selectie resteert slechts 3 procent van alle voorlopers; de selectieprocessen zijn dus heel strikt. De T-lymfocyten zijn geselecteerd op basis van zwakke binding aan autoantigenen (de eerste positieve selectie) terwijl met hoge affiniteit exogene antigenen dienen te worden herkend. De bindingssterkte aan autoantigenen was dus niet hoog genoeg om in de thymus geëlimineerd te worden, maar mogelijk wel voldoende hoog om in de periferie tot auto-immuunziekten aanleiding te geven. Bovendien worden niet alle autoantigenen in de thymus tot expressie gebracht. Daarom bestaan er ook in de periferie een aantal regulatiemechanismen die moeten voorkomen dat ongewenste reactiviteit tegen autoantigenen ontstaat.

Intrinsieke regulatie van de immuunrespons

Iedere immuunrespons is erop gericht om het antigeen uiteindelijk te elimineren. Wanneer het antigeen onderdeel uitmaakt van een infectieus micro-organisme is het belangrijk dat het proces van eliminatie zo snel en volledig mogelijk plaatsvindt. Op het moment dat de 'laatste' bacterie door antistoffen en complement gedood is, of virusgeïnfecteerde cel door een

cytotoxische T-lymfocyt is gedood, worden de specifieke T- en B-lymfocyten niet langer gestimuleerd en kan de immuunrespons als het ware uitdoven. Dit gebeurt doordat effectorlymfocyten niet het eeuwige leven hebben, maar uiteindelijk sterven door apoptose (zie ook hieronder). Voor het laten beëindigen van een immuunrespons is het dus niet per sé nodig om suppressieve mechanismen te postuleren. Voor autoantigenen ligt dit anders, immers een autoantigeen is functioneel dus noodzakelijk en zou niet door het immuunsysteem geëlimineerd mogen worden. Zo zal de respons op dubbelstrengs-DNA bij patiënten met SLE altijd kunnen blijven worden onderhouden (zie ook de bijdrage van Hooijkaas (3)). Bij diabetes mellitus type 1 worden de eilandjes van Langerhans nagenoeg volledig gedestruëerd door de auto-immuunrespons.

Er bestaan een aantal intrinsieke mechanismen die de hoogte, de duur en de richting van de immuunrespons



Figuur 1. Interactie tussen T-celreceptor en HLA-peptide-complex en tussen co-stimulatoire moleculen bij CD4-T-cel-activatie. Binding van de T-celreceptor (TCR) aan peptide gepresenteerd door HLA-klasse-II-moleculen wordt gestabiliseerd door CD4. Vervolgens worden de tyrosinekinases Lck en Fyn geactiveerd. De activiteit van deze kinases kan negatief worden beïnvloed door het lymfoïd tyrosinefosfatase (LYP), indien geassocieerd met het C-terminale Src-kinase (CRK). Een geactiveerde CD4-T-cel brengt CD40-ligand (CD40L) tot expressie, dat kan binden aan CD40 op de antigeenpresenterende cel. Deze interactie leidt tot een signaal 2 voor de T-cel en tot expressie van CD80- en CD86-moleculen op de antigeenpresenterende cel. Zowel CD80 als CD86 kunnen worden gebonden door CD28 op de T-cel en (ook) dit levert een signaal 2 voor T-celactivatie. Op de geactiveerde T-cel komt CTLA-4 tot expressie. Dit kan eveneens aan CD80 en CD86 binden en geeft dan een negatief signaal aan de T-cel.

bepalen. Allereerst de aviditeit en de duur van de interactie tussen TCR en MHC-peptidecomplex (signaal 1): een langdurige, sterke interactie leidt tot activatie, een kort, vluchtig contact niet. Naast de interactie tussen TCR en MHC-peptide, zijn vervolgens verschillende receptor-ligandinteracties tussen co-stimulatoire moleculen nodig om tot daadwerkelijke T-celactivatie leiden (signaal 2) (figuur 1). Eén daarvan is de CD40-ligand, een molecuul dat tot expressie komt op geactiveerde T-lymfocyten en dat noodzakelijk is voor T-lymfocytafhankelijke B-lymfocytenactivatie tot antilichaamsynthese. De interactie tussen CD40-ligand met CD40 op dendritische cellen is ook noodzakelijk voor cellulair immuneresponsen (4). Als gevolg van de interactie tussen CD40-ligand en CD40 komen 2 andere eiwitten op dendritische cellen tot expressie: CD80 en CD86. Zowel CD80 als CD86 kunnen binden aan het CD28-molecuul op T-lymfocyten en dit leidt tot versterking van T-lymfocytenactivatie. CD80 kan ook binden aan een ander molecuul op T-lymfocyten, het cytotoxische T-lymfocytgeassocieerde antigeen 4: CTLA-4 (figuur 1). Binding aan CTLA-4 leidt niet tot versterking, maar tot blokkering van T-lymfocytenactivatie: anergie of tolerantie (5). Het samenspel tussen (diverse receptor-ligandcombinaties op) dendritische cellen en T-lymfocyten bepaalt dus de richting en de sterkte van de daaropvolgende respons. Er bestaat een aanzienlijk polymorfisme binnen het CTLA-4-gen en sommige allelen/mutaties zijn geassocieerd met het optreden van auto-immuunziekten. Het meest duidelijk is dit voor de CT60*G-SNP, die geassocieerd is met productie van verhoogde hoeveelheden oplosbaar CTLA-4 (sCTLA-4). sCTLA-4 kan binden aan CD80 en CD86 zonder dat daarbij een negatief signaal aan de T-cel wordt gegeven en op deze manier dan bijdragen aan het doorbreken van tolerantie tegen autoantigenen. Inderdaad zijn een aantal auto-immuunziekten, zowel systemische als orgaanspecifieke, geassocieerd met het CT60*A/G-polymorfisme van CTLA-4 (tabel 1). Ook polymorfismen in een an-

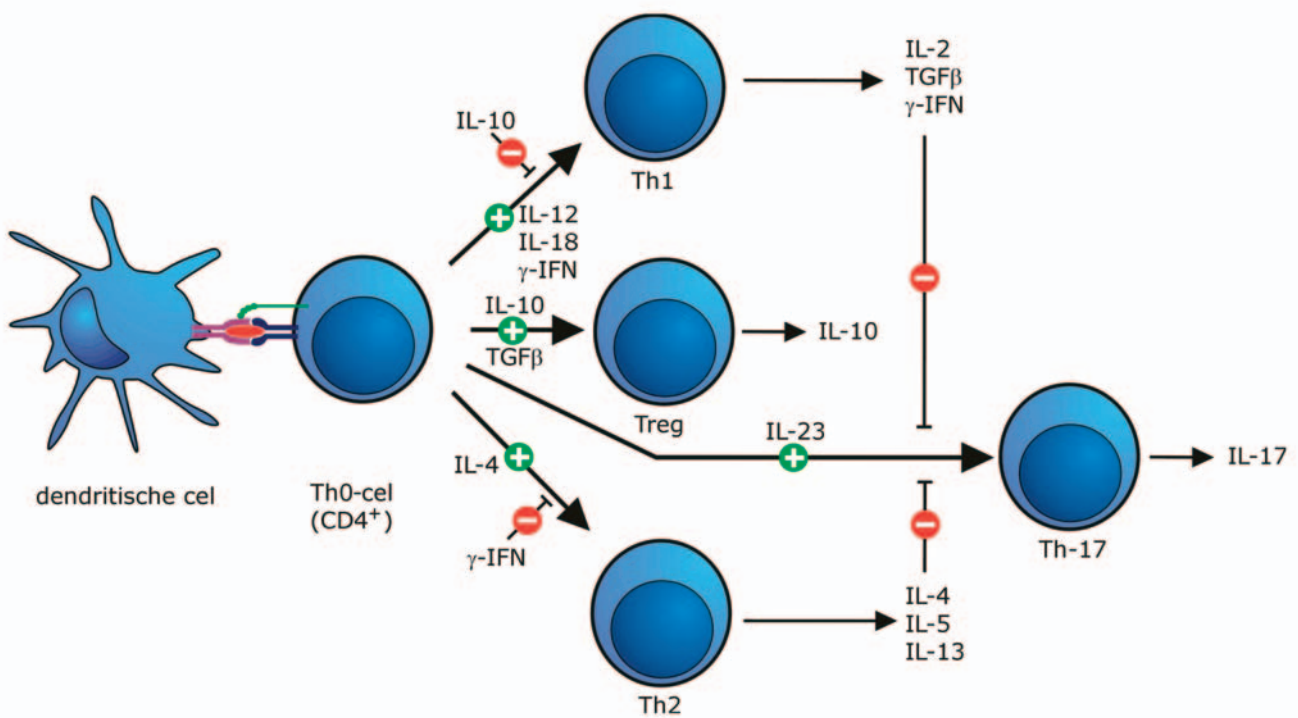
der eiwit betrokken bij de regulatie van T-celactivatie, het tyrosinefosfatase LYP (figuur 1), dragen bij aan de gevoeligheid voor het ontwikkelen van een auto-immuunziekte (tabel 1).

De activatie van CD4-T-lymfocyten leidt tot differentiatie in T-helper-1-cellen (Th1) of T-helper-2-cellen (Th2). Th1- en Th2-cellen kunnen worden onderscheiden door het patroon van cytokinen dat ze produceren en secreteren. Th1-cellen secreteren de cytokinen γ -interferon en interleukine-2 (IL-2), belangrijke cytokinen bij de inductie en regulatie van de cellulair immunerespons. Th2-cellen secreteren IL-4, IL-5, en IL-13, cytokinen die de respons van B-lymfocyten versterken. Regulatorische T-lymfocyten (zie onder) produceren vooral IL-10 en 'transforming growth factor β ' (TGF- β). Recent is Th-17 gedefinieerd, een CD4-cel die onder invloed van IL-23 wordt aangezet tot productie van IL-17 (6) (figuur 2). De verstoorde immuneregulatie bij auto-immuniteit komt dan ook tot uiting in het cytokinepatroon in het bloed. Reumatoïde artritis wordt beschouwd als een zogenaamde Th1-gemedieerde auto-immuunziekte. In het bloed van deze patiënten worden verhoogde concentraties van typische Th1-cytokinen zoals γ -interferon en IL-2 gevonden (figuur 3) (7). Ook pro-inflammatoire (ontstekingsbevorderende) cytokinen als IL-1 α , IL-1 β , IL-6 en TNF α zijn verhoogd ten opzichte van vormen van artritis die niet op auto-immuniteit berusten en ten opzichte van gezonde volwassenen (7). Daarnaast kunnen nog andere cytokinen, zoals het hierboven genoemde IL-17, toegenomen zijn (7). Vergelijking van een groep patiënten met reumatoïde artritis laat overeenkomsten zien in cytokinepatroon, maar ook grote individuele verschillen (figuur 3). Niet altijd (of misschien beter: meestal niet) zijn de cytokinepatronen zoals waarneembaar in het bloed een goede afspiegeling van de situatie op de daadwerkelijke plaatsen van ontsteking, zoals in de aangedane gewrichten. Analyse van bijvoorbeeld synoviaalvocht is dan geïndiceerd.

Tabel 1. Overeenkomsten in genetische associatie en regulatorische T-celdefecten bij veelvoorkomende auto-immuunziekten

| Ziekte | HLA-allel | CTLA-4 | | PTPN22 | | Tregs | |
|-------------------------|-------------|--------|----------------|------------|--------|---------|--|
| | | OR | (CT60*G) OR | 620W OR | Aantal | Functie | |
| Reumatoïde artritis | HLA-DR4 | 3,0 | 1,3 | 1,7 | = | ↓ | |
| SLE | HLA-DR3/DR2 | 2,2 | 1,6 | 1,4 | ↓ | ↓ | |
| Ziekte van Graves | HLA-DR3 | 2,5 | 1,5 | 1,7 | (↓) | (=) | |
| Hashimoto's thyroiditis | HLA-DR3/DR4 | 2,0 | 1,45 | 1,7 | (↓) | (=) | |
| Ziekte van Addison | HLA-DR3 | 3,5 | 1,4 | 1,7 | ↓ | – | |
| Auto-immuun hepatitis | HLA-DR3/DR4 | 2,1 | 2,1 | – | ↓ | ↓ | |
| Coeliakie | HLA-DQ2/DQ8 | >20 | | | | | |
| | HLA-DR3 | 4,0 | 1,4 | 1,3 | – | – | |

Odds ratios (OR) voor de belangrijkste HLA-associatie en voor de CT60*G-variant in CTLA-4 en de variant van het PTPN22, proteïne tyrosinefosfatase-22-gen (coderend voor LYP, figuur 2) met arginine-naar-tryptofaansubstitutie op codon 620 (620W). Tevens zijn afwijkingen in het aantal regulatorische T-cellen (Tregs) of hun functie aangegeven: ↓, verlaagd; =, normaal; () beperkte gegevens; –, geen gegevens. Data ontleend aan refs. 18, 19, 35.

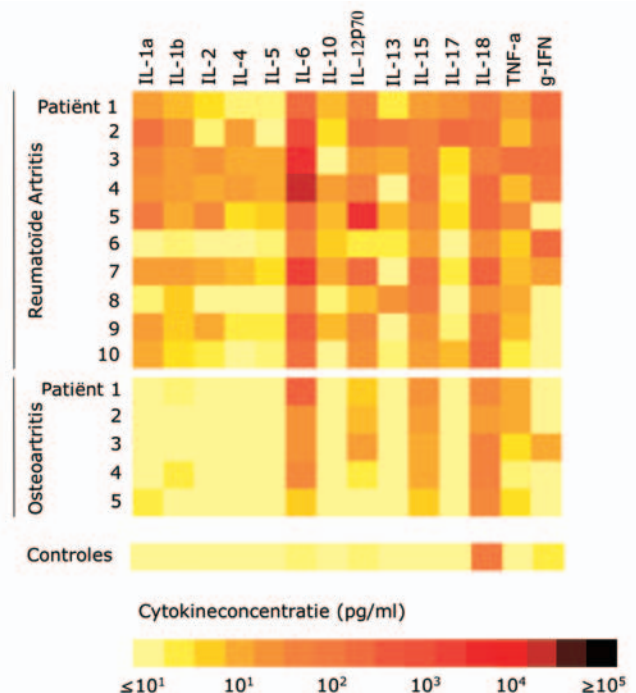


Figuur 2. Subsets van CD4⁺-Th-cellen en hun cytokineproductiepatroon.

Apoptose en auto-immuniteit

Wanneer tijdens het proces van herschikking van TCR-genen er een T-lymfocyt ontstaat met specificiteit voor een lichaamseigen eiwit, dan zal die cel tijdens de negatieve selectieronde in de thymus in apoptose gaan. Apoptose is ook het mechanisme waardoor effectorcellen in de periferie uiteindelijk doodgaan. Het proces van apoptose (geprogrammeerde celdood) wordt in gang gezet na interactie tussen Fas (CD95) en FasLigand (CD178). Activatie van Fas leidt intracellulair tot activatie van een serie van cysteineproteases (de caspases), die als een cascade uiteindelijk DNases activeren waardoor het DNA wordt gefragmenteerd en de cel sterft. Dit hele proces wordt uiteraard nauwkeurig gereguleerd en hierbij zijn zowel apoptosebevorderende eiwitten (Bax en Bad) als apoptoseremmende eiwitten (bcl-2 en bcl-X_L) betrokken (8). Mutaties in het Fas-gen leiden bij de mens tot defecten in apoptose van lymfocyten, zich uitend in het zogenaamde auto-immuun lymfoproliferatief syndroom (ALPS). Deze ziekte wordt gekenmerkt door een sterk verhoogd aantal (van vooral T-)lymfocyten in het bloed, lymfadenopathie en splenomegalie. Vaak wordt in bloed een toename gevonden van overigens zeer zeldzame 'dubbel negatieve' T-lymfocyten. Dat zijn T-lymfocyten met een αβTCR die negatief zijn voor zowel CD4 als CD8. Ook wordt een spectrum van autoantistoffen, waaronder antistoffen tegen trombocyten, neutrofielen, cardiolipine en IgG (reumafactor) gevonden met bijbehorende auto-immuuncytopeniën. ALPS op basis van Fas-mutaties worden type Ia genoemd. ALPS type Ib berust op mutaties in FasLigand, ALPS type II betreft caspase-8- of caspase-10-mutatie en type III vormt een restgroep met onbekende genetische oorzaak (9). Bij sommige patiënten met ALPS

vertoont de klinische expressie van de ziekte overeenkomsten met systemische lupus erythematosus (SLE). Deze relatie wordt verder gesuggereerd doordat een muizenmodel voor SLE (de *lpr*-muis) eveneens een verhoogd aantal dubbelnegatieve T-lymfocyten heeft en gestoorde Fas-expressie en lymfocytenapoptose. Toch is SLE meer dan een apoptose-deficiëntie en blijft de moleculaire oorzaak (of oorzaken) onbekend.



Figuur 3. Cytokinepatroon in serum van patiënten met reumatoïde artritis en osteoarthritis. Gegevens ontleend aan referentie 7.

Regulatoire T-cellen

T-lymfocyten worden klassiek onderverdeeld in CD4-(helper-) en CD8-(effector)cellen. De CD8-T-lymfocytenpopulatie omvat cytotoxische T-lymfocyten en binnen deze subset werden midden jaren '80 van de vorige eeuw ook suppressor-T-lymfocyten gedefinieerd. Onderzoek naar suppressor-T-lymfocyten bleek moeizaam en verdween naar de achtergrond. Recent wordt weer gesproken over CD8-regulatoire cellen: deze cellen zijn in staat om autoantigenen, gepresenteerd door niet-klassieke klasse-1-MHC-moleculen (HLA-E) op geactiveerde, autoreactieve T-lymfocyten, te herkennen en vervolgens deze cellen te onderdrukken of te doden (10) De gegevens zijn met name nog afkomstig uit proefdiermodellen en de betekenis voor de mens is voornamelijk onduidelijk.

Binnen de CD4⁺-T-lymfocyten wordt een aparte categorie van regulatoire T-cellen onderscheiden, de CD4⁺CD25⁺ regulatoire T-cellen (Tregs) (11, 12). Ze hebben het vermogen om een response van T-lymfocyten te onderdrukken. Ze spelen daarmee een belangrijke rol in de regulatie van het immuunsysteem.

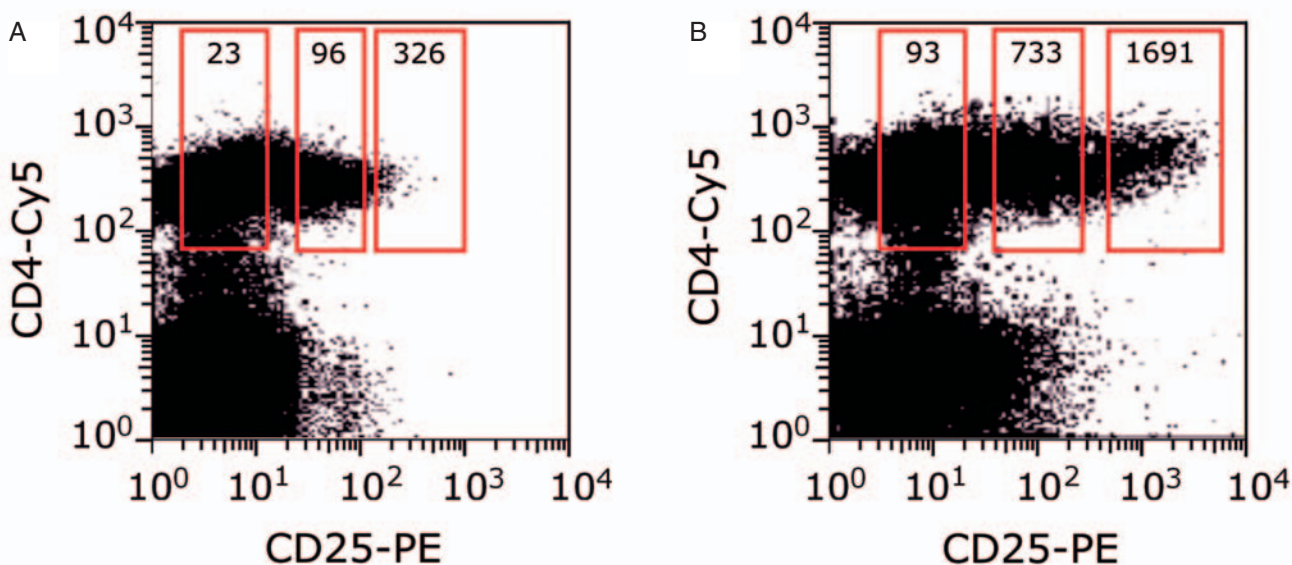
De ontdekking van CD4⁺CD25⁺-Tregs vloeyde voort uit experimenten bij muizen waar werd gevonden dat neonatale thymectomie leidt tot een auto-immuunziekte waarbij meerdere organen zijn betrokken. De cruciale experimenten werden uitgevoerd in het laboratorium van Sakaguchi, waar men vond dat het inspuiten van CD25⁻-T-lymfocyten in een naakte muis leidt tot een systemische auto-immuunziekte met tekenen van colitis, gastritis, auto-immuundiabetes en thyroïditis (13). Het toevoegen van een kleine hoeveelheid CD4⁺CD25⁺-T-lymfocyten aan de CD25⁻-T-lymfocyten voorkwam het ontstaan van ziekte (13). Ook bij de mens komen CD4⁺CD25⁺-T-lymfocyten voor. In het perifere bloed vormen ze een kleine fractie (1-3%) van de CD4⁺-T-lymfocyten.

Alhoewel er in de laatste jaren meer dan 1000 publicaties over deze cellen zijn verschenen, zijn er nog veel onduidelijkheden, bijvoorbeeld over het wer-

kingsmechanisme van deze cellen. Het CD25-molecuul is de α -keten van de IL-2-receptor. Een functionele IL-2-receptor bestaat uit een α -, β -, en γ -keten. Omdat Tregs geen β - en γ -keten tot expressie brengen bezitten ze daardoor geen functionele IL-2-receptor. Tregs bezitten nog andere moleculen die mogelijk functionele betekenis hebben zoals CTLA-4 en GITR (glucocorticoïd-geïnduceerd tumornecrosisfactorreceptorfamilie-gerelateerd gen). Zowel CD25, CTLA-4 en GITR worden allemaal geïnduceerd op CD4⁺CD25⁺-T-lymfocyten na activatie via de TCR, en kunnen dus niet worden beschouwd als absolute markers voor de Tregs (14).

In CD4⁺CD25⁺-cellen komt de transcriptiefactor FOXP3 (behorend tot de 'forkhead'-familie van DNA-bindende transcriptiefactoren) verhoogd tot expressie (figuur 4). De Tregs met de hoogste expressie van CD25 bezitten ook de hoogste FOXP3-activiteit en hebben de sterkste functionele activiteit in invitrosuppressietesten. Echter, zelfs wanneer FOXP3, CTLA-4 en GITR bij de fenotypische karakterisering van CD4⁺CD25⁺-Tregs worden betrokken is dat nog onvoldoende om functionele uitspraken te kunnen doen.

De CD4⁺CD25⁺-cellen zoals hierboven beschreven worden natuurlijk voorkomende Tregs genoemd (nTregs), om ze te onderscheiden van Tregs die worden geïnduceerd tijdens een respons op lichaamsvreemd of lichaamseigen antigeen (induced Tregs; iTregs). Binnen de iTregs wordt weer verder onderscheid gemaakt tussen Th1-cellen, die grote hoeveelheden IL-10 kunnen produceren, en Th3, die TGF- β produceren (15). Voor zowel de natuurlijk voorkomende als de geïnduceerde Tregs is het in een aantal gevallen nog onduidelijk of de suppressorfunctie antigeen-specifiek is. In een aantal studies is aange- toond dat direct cel-celcontact vereist is, maar het is nog onbekend welke oppervlaktereceptoren hierbij betrokken zijn. Andere studies suggereren dat Tregs hun functie uitoefenen via secretie van IL-10 en TGF- β , of via perforine-afhankelijke cytotoxiciteit (16).



Figuur 4. FOXP3-expressie in regulatoire T-cellen in bloed en synovium. Mononucleaire cellen uit bloed (A) of synovium (B) zijn aangekleurd met CD4 en CD25, geanalyseerd met flowcytometrie. Vervolgens zijn de cellen gesorteerd (gekaderd). In de gesorteerde cellen is FOXP3-mRNA bepaald met kwantitatieve PCR en uitgedrukt ten opzichte van β 2M-mRNA. Gegevens ontleend aan referentie 36.

Regulatoire T-cellen bij auto-immuunziekten

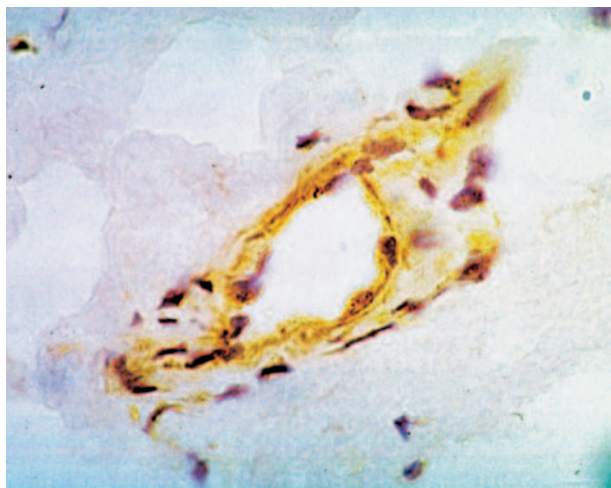
Een belangrijke taak van het systeem van immuunregulatie, zoals uitgevoerd door Tregs, is om te voorkomen dat T- en B-lymfocyten met specificiteit voor lichaamseigen antigenen (en die bij ieder individu aanwezig zijn in de perifere circulatie) gaan reageren met autoantigenen en zo auto-immuunziekten veroorzaken.

Mutaties in FOXP3, de transcriptiefactor die voorkomt in Tregs, leiden bij de mens tot het IPEX-syndroom, een agressieve auto-immuunziekte waarbij immuundysregulatie, polyendocrinopathie en enteropathie voorkomen (17). Bij de muis veroorzaakt een mutatie in FOXP3 een fatale auto-immuun- en inflammatoire ziekte ('scurfy'). In beide gevallen leidt FOXP3-deficiëntie tot sterk verlaagde CD4⁺CD25⁺-celaantallen en -functie. Overexpressie van FOXP3 (in muizen) leidt tot sterke suppressieve activiteit, niet alleen van CD4⁺CD25⁺-cellen maar ook van CD4⁺CD25⁻-cellen, hetgeen aangeeft dat FOXP3 functioneel betrokken is.

In een groot aantal auto-immuunziekten, waaronder reumatoïde artritis, SLE, multipale sclerose, type-1-diabetes, juveniele idiopathische artritis, worden verlaagde aantallen en/of verminderde functionele activiteit van Tregs beschreven (tabel 1, referenties 18, 19). Omdat er een algehele vermindering van aantallen en functie wordt gevonden, is het (nog) niet goed mogelijk om uitspraken te doen over anti-geenspecificiteit van Tregs bij verschillende auto-immuunziekten. Omgekeerd is het ook niet duidelijk waarom een algehele verlaging van Tregs een causaal verband met een specifieke auto-immuunziekte kan hebben. Klaarblijkelijk zijn er meer factoren betrokken bij de ontwikkeling van een auto-immuunziekte, zoals hieronder in een pathofysiologisch model zal worden uitgewerkt.

Regulatie van de respons op autoantigenen: een pathofysiologisch model

Jarenlang is gedacht dat een immuunrespons gericht tegen lichaamseigen antigenen ('zelf') per definitie zou leiden tot een auto-immuunziekte. Zoals hierboven al uiteengezet leidt het selectieproces in de thy-



Figuur 5. Expressie van humaan HSP60 in synoviaal weefsel van een patiënt met juveniele idiopathische artritis (37, 38).

mus ertoe dat er altijd T-lymfocyten in de periferie terecht zullen komen met een (lage) affiniteit voor zelfantigenen. T-lymfocyten van gezonde individuen reageren met dezelfde autoantigenen als T-lymfocyten van patiënten met een auto-immuunziekte. Het verschil zit echter in de wijze waarop deze herkenning plaatsvindt: in gezonde personen heeft deze respons een duidelijk anti-inflammatoir karakter, bij patiënten wordt een respons met een pro-inflammatoir (dat wil zeggen: ontstekingsbevorderend) profiel gevonden.

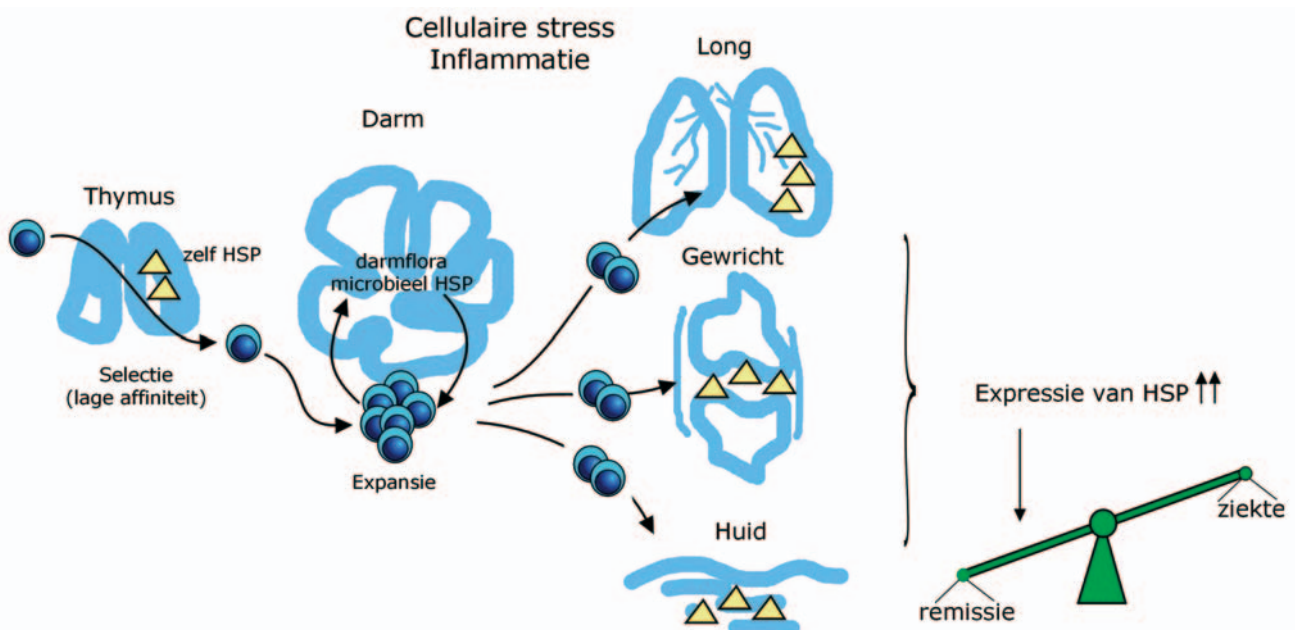
De functie van de regulatoire T-lymfocyten is tweërlei. Ten eerste dragen ze er zorg voor dat een immuunrespons die op gang komt als reactie op bijvoorbeeld een bacteriële infectie tijdig weer onderdrukt wordt om zo te voorkomen dat zo'n inflammatoire respons leidt tot ongewilde, secundaire weefsel schade (de intrinsieke controle zoals boven beschreven). Ten tweede zijn regulatoire T-lymfocyten nodig voor de inductie van tolerantie tegen zelfantigenen. Maar welke autoantigenen zijn nu betrokken bij activatie van regulatoire T-lymfocyten, hoe leidt dit tot beter inzicht in pathofysiologische processen bij auto-immuunziekten, hoe kunnen aldus ontwikkelende concepten leiden tot vormen van behandeling? Bij orgaanspecifieke auto-immuunziekten is het betrokken autoantigeen in veel gevallen wel duidelijk, zie daartoe de bijdragen van Batstra (20) en Bakker (21) elders in dit themanummer. Bij systemische auto-immuunziekten is dat veel minder evident. De autoantistoffen die hierbij worden gevonden (reumafactoren en anti-CCP bij reuma, anti-dubbelstrengs DNA bij SLE) zijn weliswaar belangrijke diagnostische hulpmiddelen maar ze zijn niet betrokken bij de pathofysiologie van de ziekte. Stress-eiwitten, ook wel 'heat-shock'eiwitten (HSPs) genaamd, vormen een belangrijke groep van (auto)antigenen, die betrokken zijn bij de inductie van auto-immuunziekten zoals reuma. De eerste aanwijzingen voor een rol van HSP bij artritis kwamen uit het werk van Irun Cohen en Willem van Eden die vonden dat ratten die ze inspotten met *Mycobacterium tuberculosis*, ernstige artritis ontwikkelden (22). Het bleek ook vrijwel meteen dat de artritis een T-lymfocyt-gemedieerde ziekte is, omdat het inspuiten van T-lymfocyten van zieke dieren in naïeve dieren hetzelfde ziektebeeld kon oproepen (23). Bij de mens kan een infectie met mycobacteriën (zoals bij tuberculose) eveneens leiden tot artritis. Het verantwoordelijke antigeen uit de mycobacteriën bleek een 60 kDa groot HSP te zijn, HSP60. HSPs zijn eiwitten die worden gesynthetiseerd ten tijde van cellulaire stress (zoals bijvoorbeeld een hitteshock; vandaar de naam). De HSPs hebben een beschermende functie voor kwetsbare enzymsystemen in cellen. Dit kunnen zowel bacteriën zijn als menselijke cellen: HSPs zijn in de evolutie zeer sterk geconserveerd. Tussen microbiel en humaan HSP bestaat een homologie van 40-50% in aminozuurvolgorde. Onder invloed van cellulaire stress, bijvoorbeeld als gevolg van koorts of ontsteking, neemt de intracellulaire productie van HSP toe en is er toegenomen expressie van HSP op de celmembraan (figuur 6). Ondanks de grote homologie tussen microbiel en humaan HSP60, zijn HSPs sterk immunogeen

en worden HSPs herkend zowel door cellen van het aangeboren immuunsysteem (via 'Toll-like' receptoren) als door B- en T-lymfocyten. Bij veel infecties is de immunrespons gericht tegen epitopen van het bacteriële HSP60. Deze ogenschijnlijk tegenstrijdige eigenschappen (evolutionair geconserveerd eiwit maar desondanks sterk immunogeen) maken HSP60 bij uitstek geschikt om auto-immuniteit uit te lokken door het principe van antigene mimicrie: de immunrespons die in eerste instantie gericht is tegen een microbieel antigeen kan in tweede instantie leiden tot een pathogene (kruis)reactie met een homologe lichaamseigen antigeen. Toch is het zeker niet zo dat bij ieder individu na een bacteriële infectie, koortsepisode of mechanische stress, chronische gewrichtsontsteking ontstaat. De laatste jaren is het duidelijk geworden dat expressie van endogeen HSP60 en herkenning hiervan door T-lymfocyten leidt tot beschermende (regulatoire) responsen in plaats van tot immunopathologie (24, 25). T-lymfocytenreactiviteit tegen lichaamseigen HSP wordt dan ook bij gezonde personen gevonden. De tolerantie tegen lichaamseigen HSP zou kunnen betekenen dat deze respons onderdeel uitmaakt van een systeem van natuurlijke immuunsurveillance, dat ingrijpt op het moment dat het lichaam lokaal onder stress staat (figuur 6). T-lymfocyten met een lage affiniteit voor autoloog HSP komen op het niveau van de darm in contact met de commensale microbiële flora, en daardoor met microbieel HSP. Dit constante of herhaalde contact leidt tot activatie en expansie van 'tolerante' HSP-specifieke T-lymfocyten in de circulatie. Een ontstekingsproces op een gegeven plaats in het lichaam leidt tot een toename van de lokale expressie van autoloog HSP en vervolgens tot lokale expansie van kruisreagerende, HSP-specifieke regulatoire T-lymfocyten. Een respons van T-lymfocyten op HSP60 blijkt dus (in diermodellen) artritis te kunnen opwekken, maar ook geassocieerd te zijn met bescherming (in diermodellen en in de mens). Deze ogenschijnlijke paradox

kan worden verklaard door een nadere analyse van de epitopen van HSP60 die worden herkend door de ziekmakende (artritogene) T-lymfocyten en de beschermende (regulatoire) T-lymfocyten: de regulatoire T-lymfocyten herkennen de sterk geconserveerde sequenties in HSP60, artritogene T-lymfocyten herkennen de bacteriespecifieke sequenties (26). Deze bevinding opent de weg tot antigeenspecifieke interventie, omdat immunisatie met geconserveerde sequentie van HSP60 zou kunnen beschermen tegen artritis. In diermodellen is het al mogelijk om met geschikte peptiden van HSP60 de door *M. tuberculosis* geïnduceerde artritis te voorkomen. Ook bij de mens is herstel van de natuurlijke regulatoire mechanismen tegen HSP-antigenen een veelbelovende manier om immunotherapie te ontwikkelen voor reumatische ziekten (28). Voor daadwerkelijke toepassing bij de mens dienen nog een groot aantal obstakels te worden genomen: welke epitopen van het HSP60-molecuul dienen te worden geselecteerd, hoe is de interactie met HLA-DR in verband met antigeenpresentatie, welke cytokinen zullen worden geïnduceerd, etc. (27, 28)?

Ingrijpen in immunoregulatie als therapie bij auto-immuunziekten

Immuunsuppressiva en ontstekingsremmers, als methotrexaat en prednison, vormen, naast symptomatische pijnbestrijding, de standaardbehandeling van reumatische auto-immuunziekten. Langdurig gebruik van deze middelen kent echter zeer ernstige bijwerkingen, nog afgezien van de soms beperkte klinische effectiviteit. Toenemend inzicht in de cytokinen die het ontstekingsproces onderhouden, gekoppeld aan de mogelijkheden van de biotechnologie, heeft anti-TNF- α -therapie mogelijk gemaakt. Toediening van anti-TNF-monoklonale antilichamen (influximab, Remicade[®]) of recombinant-oplosbare-TNF-receptor (etanercept, Enbrel[®]) wordt goed verdragen en leidt tot indrukwekkende klinische verbetering van reuma-



Figuur 6. Model voor regulatie van auto-immuniteit door HSP-specifieke regulatoire T-lymfocyten.

toïde artritis (29, 30). Interessant is dat anti-TNF-therapie ook gepaard gaat met een verbetering van de functie van Tregs. Ook bij de ziekte van Crohn en bij psoriasis worden nu goede resultaten behaald met anti-TNF-therapie. Geïnspireerd door het succes van anti-TNF-therapie worden nu ook behandelingen op basis van interferentie met IL-1 (anti-IL1, IL-1-receptorantagonist) of IL-6 ontwikkeld. Deze worden op kleinere schaal al toegepast. Ook komen andere 'biological response modifiers' binnen bereik (31). Deze vorm van behandeling kent ook schaduwzijden: langdurig gebruik verhoogt het risico op fataal verlopende (mycobacteriële) infecties en op het ontstaan van maligniteiten. Het gevaar van ingrijpen in de immuunregulatie is dit voorjaar in ander verband dramatisch duidelijk geworden in een fase-1-studie met een CD28-activerend monoklonaal antilichaam. Het betrof TGN1412, een antilichaam dat is ontwikkeld voor de behandeling van reumatoïde artritis, multiple sclerose en kanker. Alhoewel pre-klinische studies met konijnen en apen gunstige resultaten lieten zien (sterke inductie van functionele Tregs), werden 6 van de 8 vrijwilligers die dit middel kregen ingespoten ernstig ziek en 4 van hen werden met multiorgaanfalen op de intensive care opgenomen (32).

Een alternatieve manier om in te grijpen in de verstoorde immuunregulatie bij auto-immuunziekten is om het complete immuunsysteem opnieuw te laten uitrijpen door autologe stamceltransplantatie (ASCT). Tijdens de voorbehandeling voor de ASCT (met immunosuppressieve medicatie) raakt de auto-immuunziekte in remissie en blijft in remissie na reconstitutie van het immuunsysteem (33). Na ASCT is ook een duidelijke verbetering van Treg-functie aantoonbaar (34), waarmee een mechanistische onderbouwing voor het succes van de behandeling kan worden gegeven. ASCT is een vorm van behandeling met de risico's gerelateerd aan de transplantatieprocedure. Daarom is deze vorm van behandeling tot nu toe voorbehouden aan patiënten met zeer ernstige, therapieresistente vormen van auto-immuunziekten.

Voor de toekomst is antigeenspecifieke immunotherapie, gericht op verbetering van Treg-functie, daarom misschien de aangewezen therapeutische strategie omdat die de minste kans geeft op ongewenste bijwerkingen (27). De hindernissen zoals boven al genoemd dienen dan eerst genomen te worden, en dat vormt de uitdaging om de huidige inzichten in de immunologie, gekoppeld aan de mogelijkheden van de biotechnologie in te zetten om te komen tot effectieve en veilige behandeling van patiënten met deze ernstige, invaliderende, en soms levensbedreigende ziekten.

Literatuur

- Kyewski B, Klein L. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 571-606.
- Siggs OM, Makaroff LE, Liston A. The why and how of thymocyte negative selection. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 175-183.
- Hooijkaas H, Smeenk R, Gmelig Meyeling F. Systemische auto-immuunziekten: passende serologische diagnostiek. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2006; 31: 257-268.
- Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 307-328.
- Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 65-97.
- Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006; 24: 677-688.
- Jager W de, Prakken BJ, Bijlsma JW, Kuis W, Rijkers GT. Improved multiplex immunoassay performance in human plasma and synovial fluid following removal of interfering heterophilic antibodies. *J Immunol Methods* 2005; 300: 124-135.
- Rieux-Laucat F, Fischer A, Deist FL. Cell-death signaling and human disease. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 325-331.
- Worth A, Thrasher AJ, Gaspar HB. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *Br J Haematol* 2006; 133: 124-140.
- Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T-cells. *N Engl J Med* 2006; 354: 1166-1176.
- Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T-cells. *Adv Immunol* 2003; 81: 331-371.
- Sakaguchi. Regulatory T cells: Meden Agan. *Immunol Rev* 2006; 212: 5-7.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-1164.
- Baecher-Allan C, Hafler DA. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006; 212: 203-216.
- Wraith DC, Nicolson KS, Whitley NT. Regulatory CD4+ T cells and the control of autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 695-701.
- Von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T-cells. *Nature Immunol* 2005; 6: 338-344.
- LeBras S, Geha RS. IPEX and the role of FOXP3 in the development and function of human Tregs. *J Clin Invest* 2006; 116: 1473-1475.
- Wraith DC, Nicolson KS, Whitley NT. Regulatory CD4+ T-cells and the control of autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 695-701.
- Taams LS, Palmer DB, Akbar AN, Robinson DS, Brown Z, Hawrylowicz CM. Regulatory T-cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology* 2006; 118: 1-9.
- Batstra MR, Drexhage HA. Auto-immuunziekten van endocriene organen. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2006; 31: 275-281.
- Bakker-Jonges LE, van Buuren HR. Auto-immuunziekten van de lever. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2006; 31: 281-289.
- Eden W van, Thole JE, Zee R van der, Noordzij A, Embden JD van, Hensen EJ, Cohen IR. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 1988; 331: 171-173.
- Eden W van, Holoshitz J, Nevo Z, Frenkel A, Klajman A, Cohen IR. Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to Mycobacterium tuberculosis and to cartilage proteoglycans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 5117-5120.
- Graeff-Meeder ER de, Eden W van, Rijkers GT, Prakken BJ, Kuis W, Voorhorst-Ogink MM, van der Zee R, Schuurman HJ, Helders PJ, Zegers BJ. Juvenile chronic arthritis: T-cell reactivity to human HSP60 in patients with a favorable course of arthritis. *J Clin Invest* 1995; 95: 934-940.

25. Prakken AB, Eden W van, Rijkers GT, Kuis W, Toebes EA, Graeff-Meeder ER de, Zee R van der, Zegers BJ. Autoreactivity to human heat-shock protein 60 predicts disease remission in oligoarticular juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1826-1832.
26. Kamphuis S, Kuis W, de Jager W, Teklenburg G, Massa M, Gordon G, Boerhof M, Rijkers GT, Uiterwaal CS, Otten HG, Sette A, Albani S, Prakken BJ. Tolerogenic immune responses to novel T-cell epitopes from heat-shock protein 60 in juvenile idiopathic arthritis. *Lancet* 2005; 366: 50-56.
27. Kamphuis S, Albani S, Prakken BJ. Heat-shock protein 60 as a tool for novel therapeutic strategies that target the induction of regulatory T-cells in human arthritis. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6: 579-589.
28. Albani S, Prakken B. T-cell epitope-specific immune therapy for rheumatic diseases. *Arthritis Rheumatism* 2006; 54: 19-25.
29. Feldmann M, Brennan FM, Foxwell BM, Taylor PC, Williams RO, Maini RN. Anti-TNF therapy: where have we got to in 2005? *J Autoimmun* 2005; 25 Suppl: 26-28.
30. Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA* 2006; 295: 2275-2285.
31. Genovese MC. Biologic therapies in clinical development for the treatment of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 2005; 11: S45-S54.
32. Hansen S, Leslie RG. TGN1412: scrutinizing preclinical trials of antibody-based medicines. *Nature* 2006; 441: 282.
33. Hough RE, Snowden JA, Wulffraat NM. Haemopoietic stem cell transplantation in autoimmune diseases: a European perspective. *Br J Haematol* 2005; 128: 432-459.
34. Kleer I de, Vastert B, Klein M, Teklenburg G, Arkesteijn G, Yung GP, Albani S, Kuis W, Wulffraat N, Prakken B. Autologous stem cell transplantation for autoimmunity induces immunologic self-tolerance by reprogramming autoreactive T-cells and restoring the CD4+CD25+ immune regulatory network. *Blood* 2006 15; 107: 1696-1702.
35. Pearce SH, Merriman TR. Genetic progress towards the molecular basis of autoimmunity. *Trends Mol Med* 2006; 12: 90-98.
36. Kleer IM de, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, Jager W de, Pugayung G, Giannoni F, Rijkers G, Albani S, Kuis W, Prakken B. CD4+CD25 bright regulatory T-cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol* 2004; 172: 6435-6443.
37. Graeff-Meeder ER de, Rijkers GT, Voorhorst-Ogink MM, Kuis W, Zee R van der, Eden W van, Zegers BJ. Antibodies to human HSP60 in patients with juvenile chronic arthritis, diabetes mellitus, and cystic fibrosis. *Pediatr Res* 1993; 34: 424-428.
38. Boog CJ, Graeff-Meeder ER de, Lucassen MA, Zee R van der, Voorhorst-Ogink MM, Kooten PJ van, Geuze HJ, Eden W van. Two monoclonal antibodies generated against human hsp60 show reactivity with synovial membranes of patients with juvenile chronic arthritis. *J Exp Med* 1992; 175: 1805-1810.

Summary

Disturbed immunoregulation in autoimmunity. Rijkers GT, Prakken BJ. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2006; 31: 248-256.

During the development of T lymphocytes in the thymus, the cells with reactivity against self antigens are deleted or rendered inactive (central tolerance). Because this system is not perfect, an additional number of regulatory mechanisms in the periphery prevent the unwanted reactivity against self antigens. Regulatory T lymphocytes (Tregs), with the phenotype CD4⁺CD25⁺ and which express the FOXP3 transcription factor, play an important role in this regulation. Tregs produce IL-10, a cytokine which is important for maintaining a balanced cytokine production and thus a well regulated immune response in terms of direction, magnitude, and duration. Defects in these regulatory mechanisms can lead to organ specific or systemic autoimmune diseases. In these diseases abnormal cytokine-production patterns are found with increased levels of pro-inflammatory cytokines and often reduced Treg function. The primary (molecular or environmental) cause of systemic autoimmune diseases, as well as the relevant autoantigens are unknown, but an important role can be attributed to heat shock proteins (HSPs). The HSPs are found in bacteria as well as man and their sequence is strongly conserved during evolution. A T lymphocyte response against bacterial specific sequences induces arthritis, while a response of Tregs against conserved sequences protects. The general intervention in the disturbed immune regulation in autoimmune diseases by TNF blockade clinically is very effective, but does have serious side effects. Restoration of antigen specific immune regulation (e.g. against HSPs) for the future would offer an alternative therapeutic strategy.

Keywords: autoimmunity; tolerance; regulatory T-lymphocytes; cytokine balance; heat shock proteins