

Analyse peripherer B-Lymphozyten und ihrer Immunglobuline in Rheumatoider Arthritis

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Steffi Lindenau
aus Halle/Saale

November 2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2000 bis September 2004 am Deutschen Rheumaforschungszentrum (DRFZ) Berlin unter Betreuung durch PD Dr. Claudia Berek und Prof. Dr. Andreas Radbruch angefertigt. Die Arbeit wurde vom Sonderforschungsbereich 421 - "Protektive und pathologische Folgen der Antigen-Verarbeitung" unterstützt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Radbruch

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am: 23.03.2005

Meinen lieben Großeltern,
meiner fabelhaften Mutter
und Henrik.

Inhalt

1.	Einleitung	5
1.1	B-Zellen und Antikörper	5
1.1.1	Aufbau von Antikörpern	5
1.1.2	Vielfalt von Antikörpern	7
1.1.3	Funktionen von Antikörpern	8
1.1.4	Bildung naiver B-Zellen	9
1.1.5	Bildung von Gedächtnis- und Plasmazellen	11
1.2	Autoimmunität	15
1.3	Rheumatoide Arthritis	16
1.3.1	Vorkommen und Prädisposition der Rheumatoiden Arthritis	16
1.3.2	Symptome der Rheumatoiden Arthritis	17
1.3.3	Pathophysiologie der Rheumatoiden Arthritis	18
1.3.4	Diagnostizierung der Rheumatoiden Arthritis	19
1.3.5	Therapie der Rheumatoiden Arthritis	22
1.4	Ziele dieser Arbeit	24
2.	Material und Methoden	25
2.1	Materialien	25
2.1.1	Chemikalien	25
2.1.2	Primer	26
2.1.3	Antikörper	27
2.1.4	Puffer	27
2.1.5	Kits	27
2.1.6	Verbrauchsmaterialien	27

	Inhalt	
2.1.7	Geräte	28
2.1.8	Software	28
2.2	Methoden	28
2.2.1	Blutabnahme bei RA-Patienten und gesunden Kontrollpersonen	28
2.2.2	Erhebung der klinischen Daten der RA-Patienten	28
2.2.3	Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen	29
2.2.4	Färbung von Oberflächenmolekülen und Immunglobulinen	29
2.2.5	Durchflußzytometrie	30
2.2.6	RT-PCR der Immunglobulin-mRNA von Plasmazellen	32
2.2.7	Nachweis der RT-PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese	34
2.2.8	Reamplifikations-PCR der Immunglobulin-cDNA	35
2.2.9	DNA-Präparation aus der Gelelektrophorese	35
2.2.10	Klonierung der Immunglobulin-cDNA in <i>E. coli</i>	36
2.2.11	Plasmid-DNA-Präparation aus <i>E. coli</i>	39
2.2.12	Restriktionsverdau der Plasmide	40
2.2.13	Sequenzierung der Immunglobulin-cDNA	41
2.2.14	RT-PCR zum Nachweis der mRNA sezernierter Immunglobuline peripherer Plasmazellen	43
2.2.15	Statistische Auswertung der Daten	44
3.	Ergebnisse	45
3.1	Analyse der peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten	45
3.1.1	Charakterisierung der peripheren B-Zellpopulationen	45
3.1.2	Veränderte Anzahl und Frequenz der peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten	48
3.1.3	Ausschluß eines Einflusses des Geschlechts auf die veränderten peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten	50
3.1.4	Ausschluß eines Einflusses des Alters auf die veränderten peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten	50

	Inhalt	
3.1.5	Ausschluß eines Einflusses der Krankheitsdauer auf die veränderten peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten	52
3.1.6	Ausschluß eines Einflusses der Therapie auf die veränderten peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten	53
3.1.7	Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und peripheren B-Zellenpopulationen der RA-Patienten	58
3.2	Analyse der Immunglobuline der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten	62
3.2.1	Immunglobulinklassen der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten	62
3.2.2	Selektiertes V-(D-)J-Repertoire der Immunglobulingene der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten	64
3.2.3	Vermehrte somatische Hypermutationen der V-Gene der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten	69
3.2.4	R- und S- Mutationen der V-Gene der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten	72
3.2.5	CDR3-Länge der Immunglobulingene der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten	74
4.	Diskussion	76
4.1	Analyse der peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten	76
4.1.1	Charakterisierung der peripheren B-Zellpopulationen	76
4.1.2	Veränderte Anzahl und Frequenz der peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten	77
4.1.3	Ausschluß eines Einflusses des Geschlechts auf die veränderten peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten	78
4.1.4	Ausschluß eines Einflusses des Alters auf die veränderten peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten	79

	Inhalt	
4.1.5	Ausschluß eines Einflusses der Krankheitsdauer auf die veränderten peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten	80
4.1.6	Ausschluß eines Einflusses der Therapie auf die veränderten peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten	80
4.1.7	Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und peripheren B-Zellenpopulationen der RA-Patienten	81
4.2	Analyse der Immunglobuline der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten	84
4.2.1	Immunglobulinklassen der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten	84
4.2.2	Selektiertes V-(D-)J-Repertoire der Immunglobulingene der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten	86
4.2.3	Vermehrte somatische Hypermutationen der V-Gene der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten	88
4.2.4	R- und S- Mutationen der V-Gene der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten	89
4.2.5	CDR3-Länge der Immunglobulingene der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten	91
4.3	Ausblick	92
5.	Zusammenfassung	93
6.	Anhang	96
6.1	Literaturverzeichnis	96
6.2	Verwendete Abkürzungen	112
6.3	Berechnung des Krankheitsaktivitätsindex	115
6.4	Schwere Immunglobulinketten peripherer Plasmazellen der RA-Patienten	116
6.5	Leichte Immunglobulinketten peripherer Plasmazellen der RA-Patienten	117

1. Einleitung

Höhere Wirbeltiere haben spezifische Mechanismen entwickelt, mit denen sie eingedrungene Pathogene eliminieren können. Diese Fähigkeit wird Immunität genannt und durch spezielle Zellen und Moleküle vermittelt, die in ihrer Gesamtheit das Immunsystem bilden. Auf eine Infektion werden als erstes Zellen des angeborenen Immunsystems tätig, welche relativ unspezifisch diese Pathogene erkennen, phagozytieren und entzündliche Prozesse einleiten. Sie sind in der Lage, die Zellen (B- und T-Lymphozyten, auch: B- und T-Zellen) des erworbenen (adaptiven) Immunsystems zu aktivieren. Diese erkennen lösliche Pathogene und infizierte Zellen mittels sehr vielfältiger, spezifischer, aber jeweils einzigartiger Rezeptoren auf der Zelloberfläche. T-Zellen können einerseits die Eliminierung infizierter Zellen und somit die zelluläre Immunität vermitteln. Außerdem können sie B-Zellen, die lösliche Pathogene erkannt haben, aktivieren. Diese entwickeln sich zu Plasma- und Gedächtnis-B-Zellen. Plasmazellen sezernieren Antikörper, welchen mittels verschiedener Effektorfunktionen die Eliminierung des Pathogens und somit die humorale Immunität vermitteln.

1.1 B-Zellen und Antikörper

1.1.1 Aufbau von Antikörpern

Immunglobuline (Ig) existieren in membranständiger (B-Zell-Rezeptor, BCR) und sezernierter Form (Antikörper). Prinzipiell ähnelt der Aufbau von Antikörpern dem der BCR, ersteren fehlt jedoch die carboxyterminale hydrophobe Sequenz zur Verankerung in der Zellmembran. Sie werden in einen carboxyterminalen konstanten und einen aminoterminalen variablen Bereich untergliedert, der sich proteolytisch in 2 Fab (fragment antigen binding) und ein Fc (fragment crystallizable) spalten läßt. Antikörper bestehen aus zwei identischen schweren (IgH) und zwei identischen leichten (IgL) Glykoproteinketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abb. 1a). Der konstante Bereich wird bei den schweren Ketten durch drei C- (constant) Domänen gebildet, die entweder

μ , δ , γ , α oder ϵ sind. Von diesen ist abhängig, welcher Klasse bzw. Isotyp (IgD, IgM, IgG, IgA oder IgE) das Immunglobulin angehört. Der konstante Bereich wird bei den leichten Ketten durch eine C-Domäne gebildet, die ebenfalls zwei Klassen angehören kann: λ oder κ . Der variable Bereich wird bei den schweren Ketten aus V- (variable), D- (diversity) und J- (joining) Regionen und bei den leichten Ketten aus V- und J-Regionen gebildet (Abb. 1b).

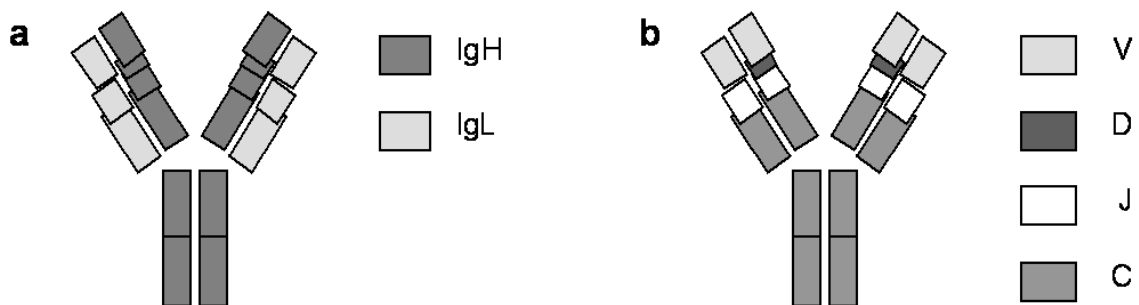


Abb. 1: Aufbau von Antikörpern. a) schwere (IgH) und leichte (IgL) Immunglobulinketten eines Antikörpers. b) V- (variable), D- (diversity) und J- (joining)- Regionen eine Antikörpers.

Im variablen Bereich der Immunglobuline liegen 3 komplementaritätsbestimmende Regionen (complementary determining regions, CDR), die durch Faltung einen antigenbindenden Bereich bilden. Als Antigene werden alle Stoffe, die eine Immunreaktion auslösen, bezeichnet. Dies sind z.B. Toxine, virale Hüllproteine oder bakterielle Polysaccharide. Mit den CDR-Regionen wird zumeist dabei nicht das ganze Antigen, sondern eine immunogene Determinante (Epitop) darauf erkannt und nichtkovalent gebunden [1]. Vor und zwischen den CDR liegen die Gerüstregionen (framework regions, FR, Abb. 2).

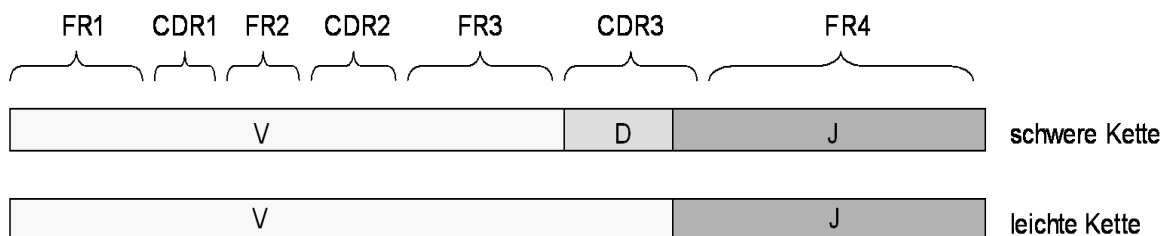


Abb. 2: Variabler Bereich von Antikörpern. Dargestellt sind die variablen (V), diversity (D) und joining (J)-Regionen sowie die komplementaritätsbestimmenden (CDR) und Gerüst- (FR) Regionen des variablen Bereichs einer schweren und leichten Immunglobulinkette.

1.1.2 Vielfalt von Antikörpern

Durch die somatische Rekombination der V-(D-)J-Gensegmente der Immunglobulingene während der Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark (siehe 1.1.4) wird die sogenannte kombinatorische Vielfalt der B-Zell-Rezeptoren und damit auch der Antikörper zustande gebracht. Die kombinatorische Vielfalt läßt sich unter Einbeziehung sämtlicher funktioneller V-(D-)J-Gensegmente der schweren und leichten Ig-Ketten [2] berechnen. Das humane IgH-Gen ist auf Chromosom 14 lokalisiert. Es beinhaltet 51 funktionelle und 9 nichtfunktionelle V_H -Gensegmente, 25 funktionelle und 2 nichtfunktionelle D-Gensegmente sowie 6 funktionelle J_H -Gensegmente. Die Anzahl der Möglichkeiten zur Bildung einer funktionellen schweren Kette ergibt sich aus der Multiplikation der Anzahl der funktionellen V_H -Gensegmente mit der Anzahl der funktionellen D_H -Gensegmente und der Anzahl funktionellen J_H -Gensegmente = 7650 Möglichkeiten. Das humane Ig $_{\kappa}$ -Gen ist auf Chromosom 2 lokalisiert. Es beinhaltet 40 funktionelle und 9 nichtfunktionelle V_{κ} -Gensegmente sowie 5 funktionelle J_{κ} -Gensegmente. Die Anzahl der Möglichkeiten zur Bildung einer funktionellen Ig $_{\kappa}$ Kette ergibt sich aus der Multiplikation der Anzahl der funktionellen V_{κ} -Gensegmente mit der Anzahl der funktionellen J_{κ} -Gensegmente = 200 Möglichkeiten. Das humane Ig $_{\lambda}$ -Gen ist auf Chromosom 22 lokalisiert. Es beinhaltet 31 funktionelle und 8 nichtfunktionelle V_{λ} -Gensegmente sowie 4 funktionelle und 3 nichtfunktionelle J_{λ} -Gensegmente. Die Anzahl der Möglichkeiten zur Bildung einer funktionellen Ig $_{\lambda}$ -Kette ergibt sich aus der Multiplikation der Anzahl der funktionellen V_{λ} -Gensegmente mit der Anzahl der funktionellen J_{λ} -Gensegmente = 124 Möglichkeiten. Die Anzahl der Möglichkeiten zur Bildung einer leichten Kette ist somit die Summe der Möglichkeiten zur Bildung einer Ig $_{\kappa}$ -Kette und einer Ig $_{\lambda}$ -Kette = 324 Möglichkeiten. Es lassen sich wiederum die Möglichkeiten zur Bildung eines funktionellen B-Zell-Rezeptors durch die Multiplikation der Anzahl der möglichen schweren und der möglichen leichten Ketten berechnen, was etwa $2,5 \times 10^6$ rein keimbahnkodierte Möglichkeiten der Bildung funktioneller B-Zell-Rezeptoren (und somit auch Antikörper) ergibt [3]. Durch das Einfügen von N-Nukleotiden in die Verknüpfungsbereiche der Gensegmente schätzt man eine zusätzliche Erhöhung der Vielfalt der Antikörper um den Faktor 10^7 („Junktionale Vielfalt“) [4]. Damit ergeben sich theoretisch $2,5 \times$

10^{13} Möglichkeiten der Spezifität reifer naiver B-Zellen. Praktisch besitzt der Mensch jedoch ein B-Zell-Repertoire von etwa 10^8 - 10^{11} unterschiedlichen Spezifitäten, womit die B-Zellen bzw. deren Antikörper in der Lage sind, eine entsprechend hohe Zahl unterschiedlicher Antigene zu erkennen [5] [6] [7] [8].

1.1.3 Funktionen von Antikörpern

Antikörper können durch Bindung an Pathogene drei Funktionen erfüllen: 1. Neutralisation des Pathogens. Damit verhindern sie das Eindringen von Viren oder intrazellulär lebenden Bakterien in Zellen und neutralisieren bakterielle Toxine. 2. Oponisierung des Pathogens. So werden z.B. extrazellulär lebende Bakterien erkennbar für verschiedene Zelltypen gemacht, die mittels Fc-Rezeptoren den konstanten Teil der Antikörper erkennen und das Pathogen phagozytieren. 3. Aktivierung des Komplementsystems. Dieses besteht aus einer Anzahl von Plasmaproteinen, die das Pathogen opsonisieren oder Mikroorganismen direkt lysieren oder Phagozyten helfen, Bakterien zu erkennen. Welche dieser Effektorfunktion zum Einsatz kommt, hängt von der Immunglobulinklasse des Antikörpers ab. Lösliches IgM, ein Pentamer aus fünf Antikörpereinheiten, wirkt sehr stark klassisch komplementaktivierend. Es wird im Zuge einer akuten Infektion als erstes gebildet und kann daher zum Nachweis einer erst kürzlich erfolgten Infektion herangezogen werden. IgD wird in geringen Mengen ebenfalls im Serum gefunden, seine Funktion ist jedoch bis heute nicht geklärt [9]. IgG ist bei einer Infektion die am häufig anzutreffende Ig-Klasse. Es erscheint im Verlauf einer Immunantwort später als IgM und tritt in vier Subklassen auf (IgG₁₋₄). Eine Funktion besteht in der Neutralisation von Viren oder Toxinen. IgG₁, IgG₂ und IgG₃ führen zur klassischen Komplementaktivierung. IgG₁ und IgG₃ wirken opsonisierend: sie können von Makrophagen, Phagozyten und neutrophilen Zellen gebunden werden, was zu deren Aktivierung führt. IgG₂ und IgG₄ werden aktiv über die Plazentabarriere in den Embryo bzw. Foetus transportiert und sorgen noch 2-3 Monate nachgeburtlich für einen Immunschutz des Neugeborenen. IgA kommt im Blut als Monomer vor, wird jedoch in Form eines Dimers über aktive Transportmechanismen (Transzytose) zum Schutz äußerer Oberflächen des Organismus in Körperflüssigkeiten wie Tränen, Speichel oder Muttermilch sezerniert und führt dort zur alternativen Komplementaktivierung. IgE dient der

Bekämpfung von in den Körper eingedrungenen Parasiten (Würmern und Protozoen). Es wird von Mastzellen und basophilen Granulozyten der Schleimhäute über $Fc\epsilon$ -Rezeptoren gebunden. Bei Kontakt mit einem passenden multivalenten Antigen findet eine Quervernetzung von benachbarten IgE-Molekülen statt. Dadurch werden von den Granulozyten und Mastzellen Entzündungsmediatoren freigesetzt, die Histamin und ein für eosinophile Granulozyten chemotaktisch wirkendes Molekül enthalten. Die so entstehende Entzündung erleichtert das Herankommen von eosinophilen Granulozyten, die wiederum über ihre $Fc\epsilon$ -Rezeptoren an den mit IgE bedeckten Erreger binden und den toxischen Inhalt ihrer Granula darüber ausschütten. Außerdem wirkt IgE muskelkontrahierend, was das Ausscheiden der Erreger über Lunge oder Darm erleichtert. Diese Mechanismen können jedoch auch zu Immunreaktionen gegen eigentlich ungefährliche Antigene (Allergien) führen.

1.1.4 Bildung naiver B-Zellen

Aus den allgemeinen hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark entstehen B-Vorläuferzellen, in denen bis zum reifen naiven B-Zell-Stadium Umordnungen (Rearrangierungen) der V-, (D-) und J- Gensegmente der schweren und leichten Immunglobulinketten vonstatten gehen (somatische Rekombination, Abb. 3). Dabei werden mit Hilfe von Enzymen, u.a. RAG (recombination activating genes), Gensegmente aus der DNA der B-Zelle herausgeschnitten und deren Enden mittels DNA-Reparaturmechanismen ungenau miteinander verbunden [10] [11]. In diese Übergangsbereiche der Gensegmente der schweren Ig-Ketten werden durch die terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) sog. N-Nukleotide eingefügt. Diese Mechanismen dienen einerseits der Bereitstellung funktioneller B-Zell-Rezeptoren (BCR), und andererseits der mit relativ geringer Genzahl erreichten hohen Vielfalt des B-Zell-Rezeptor- bzw. Antikörper-Repertoires für verschiedenste Antigene. Dabei wird eine "allele Exklusion" vollzogen: nur jeweils ein Allel der schweren und leichten Kette wird für die somatische Rekombination verwendet. Kommt es jedoch mit diesem Allel nicht zur Bildung eines funktionstüchtigen Antiköpers, wird auch das andere Allel rekombiniert. Durch die allele Exklusion wird gesichert, daß die Immunglobuline einer B-Zelle und deren Nachkommen nur eine Spezifität aufweisen [12] [13].

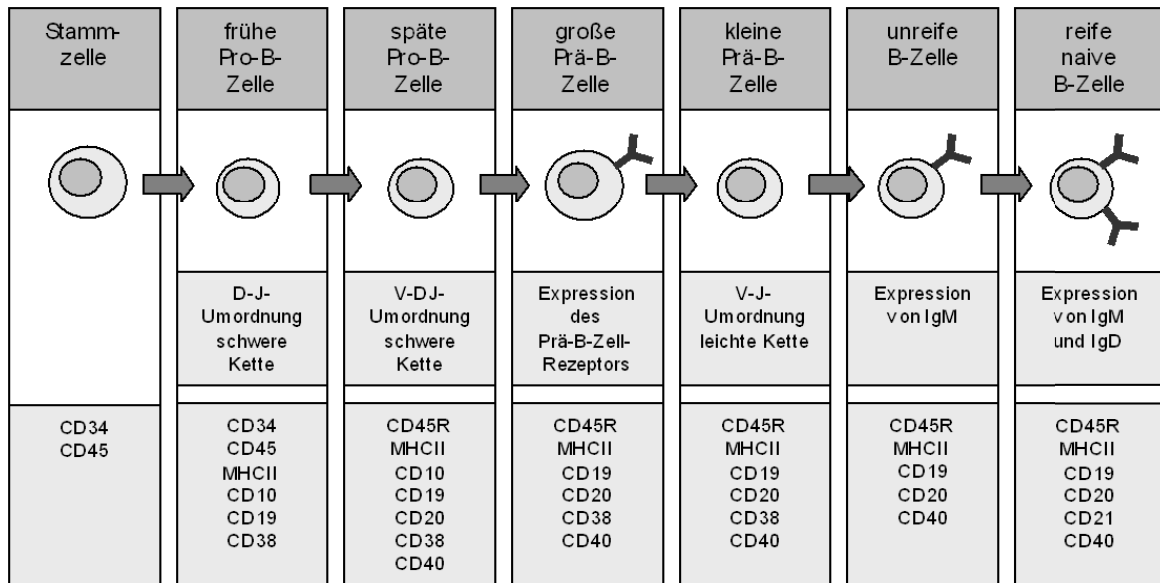


Abb. 3: Bildung naiver B-Zellen. Dargestellt sind die Stadien der Entwicklung von der Stammzelle zur reifen naiven B-Zelle mit den V-(D-)J-Gensegment-Rearrangierungen sowie der Expression von CD-Oberflächenmarkern (verändert nach [14]).

Zuerst, in den frühen Pro-B-Zellen wird eines der D- mit einem der J_H -Gensegmente verknüpft. Dazwischenliegende D- und J_H -Gensegmente werden aus der DNA herausgeschnitten. Danach, in den späten Pro-B-Zellen, wird das D- J_H -Gensegment mit einem der V_H -Gensegmente verknüpft, wobei ebenfalls wieder zwischenliegende D- und V_H -Gensegmente aus der DNA entfernt werden. Im darauffolgenden Stadium der großen Prä-B-Zelle werden die Gene der schweren Ig-Ketten zusammen mit jeweils zwei leichten Ig-Ersatzketten (sIgL – surrogate Immunglobulin light chain) als sog. Prä-B-Zell-Rezeptor (Prä-BCR) exprimiert [15] [16]. Nur diejenigen B-Zellen, die eine erfolgreiche V-D-J-Verknüpfung tätigen – d.h. funktionstüchtige schwere Kette exprimieren können, werden positiv selektiert – vermutlich durch Bindung an Autoantigene - und es erfolgt eine starke Proliferation dieses Pools von Prä-B-Zellen. Die großen Prä-B-Zellen entwickeln sich zu den kleinen Prä-B-Zellen. In diesem Stadium werden die Gensegmente für die leichte Kette umgeordnet. Dabei wird eines der V_K -Gensegmente mit einem der J_K -Gensegmente durch Herausschneiden der dazwischenliegenden DNA verknüpft. Wenn dies fehlschlägt, wird die Ig_λ -Kette umgeordnet [17] [18]. War dies erfolgreich, entwickeln sie sich zu den unreifen B-Zellen, die ihre rearrangierten Ig-Gene als oberflächenständigen B-Zell-Rezeptor (BCR) der IgM-Klasse

exprimieren. Autoreaktive unreife B-Zellen unterliegen einer negativen Selektion. Sie haben jedoch die Möglichkeit, mittels „receptor-editing“ durch die Umordnung der Gene der anderen leichten Kette eine nichtautoreaktive Spezifität erlangen und somit dieser Selektion zu entgehen [19] [20] [21] [22] [23]. Durch alternatives Spleißen der mRNA für die μ - und δ -Exons für die konstante Region der schweren Ig-Ketten entwickeln sich die unreifen B-Zellen zu membranständig IgM und IgD koexprimierenden reifen, naiven (antigenunerfahrenen) B-Zellen [24].

1.1.5 Bildung von Gedächtnis- und Plasmazellen

Die reifen naiven B-Zellen zirkulieren durch Blut, Lymphe und sekundäre lymphatische Organe (Lymphknoten, Milz und Mucosa-assoziierte lymphatische Gewebe der Bronchien, Mandeln, des Blind- und Dünndarmes, Abb. 4).

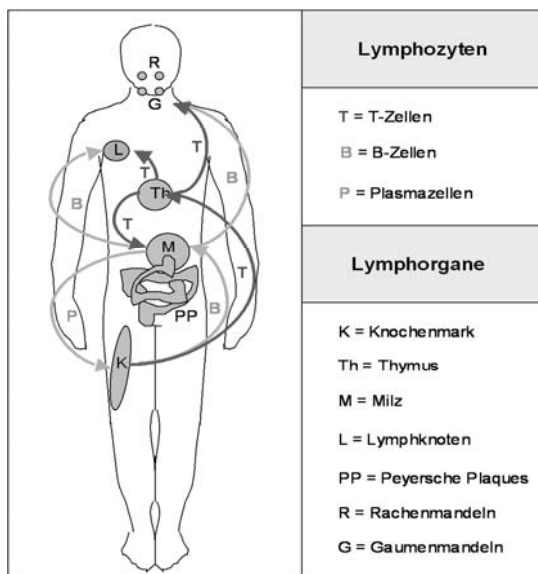


Abb. 4: Lymphorgane des Menschen. Dargestellt sind primäre und sekundäre Lymphorgane sowie die Wanderung der B- Lymphozyten (helle Pfeile) und T- Lymphozyten (dunkle Pfeile) von und zu diesen Lymphorganen während ihrer Entwicklung, Aktivierung und Differenzierung. Es wurde beispielhaft nur ein Lymphknoten dargestellt.

Diese Lymphorgane sind im Prinzip ähnlich aufgebaut. Um eine zentrale Arterie befinden sich T-Zell-Bereiche, daran angrenzend die B-Zell-Bereiche. Letztere, auch B-Zell-Follikel genannt, sind von einem Netzwerk follikulärer dendritischer Zellen (FDC) durchzogen (siehe Abb. 5). Von den FDC erhalten die zirkulierenden B-Zellen für 2 bis 3 Wochen Überlebenssignale. Binden zirkulierende naive B-Zellen mit ihren B-Zell-Rezeptoren ein natives, lösliches Antigen, werden die Rezeptoren samt gebundenen Antigenen in die Zelle aufgenommen. Die Antigene werden proteolytisch gespalten und als Peptidfragmente von 13 bis 17

Aminosäuren an MHC-II-Moleküle gebunden. Diese MHC-II-Antigenpeptid-Komplexe werden auf der Zellmembran präsentiert. Diese B-Zellen erreichen dann die T-Zell-Bereiche sekundärer lymphatischer Organe. Wenn sich dort für das selbe Antigen spezifische, bereits aktivierte T-Helfer-Zellen befinden, erkennen diese mit ihren T-Zell-Rezeptoren die von den B-Zellen präsentierten MHC-II-Antigenpeptid-Komplexe und unterstützen die B-Zellaktivierung mittels kostimulatorischer Signale. Sie bilden mit ihnen in der T-Zell-Zone einen primären Focus, in dem die B-Zellen proliferieren (Abb. 5a). Erhalten die B-Zellen jedoch keine Kostimulation, werden sie anergisiert. Ein Teil der Nachkommen dieser B-Zellen wandert aus den primären Foci aus und bildet extrafollikuläre Foci z.B. in der roten Pulpa der Milz oder in den Marksträngen der Lymphknoten (Abb. 5b), in denen sie proliferieren und zu Plasmazellen differenzieren (Abb. 5c). Diese sezernieren in den Foci vorwiegend IgM mit niedriger Antigenaffinität. Die meisten sind kurzlebig und besitzen eine 50%-Überlebensrate von 3 bis 5 Tagen [25]. Gedächtnis-B-Zellen werden hierbei jedoch nicht gebildet. Damit ist das Immunsystem in der Lage, innerhalb von 2-3 Tagen, also noch bevor antigenspezifische affinitätsgereifte Plasmazellen das Keimzentrum verlassen, dem Körper einen Antikörper vermittelten Schutz vor den eingedrungenen Erregern zu bieten. Die Foci verschwinden nach etwa 14 Tagen [26] [27] [28]. Der andere Teil der B-Zellen aus den primären Foci wandert zusammen mit den T-Zellen, von denen sie aktiviert wurden, zu den primären B-Zell-Follikeln (Abb. 5b), wo sie noch an der Grenze zur T-Zell-Zone Keimzentren bilden. Dort unterliegen die aktivierten B-Zellen einer massiven klonalen Expansion, wobei sich die Zellen alle 6-8h teilen [29] [30] [31]. Man nennt diese B-Zellen Zentroblasten, und das B-Zellfollikel wird als ein sekundäres bezeichnet. Da durch die dichter aneinanderliegenden Zellen diese Bereiche im Lichtmikroskop dunkler als umliegende erscheinen, nennt man diese die „dunkle Zone“ eines Keimzentrums. Dort unterliegen die CDR-kodierenden Bereiche der Immunglobulingene der leichten und schweren Ketten der Zentrozyten einer hohen Mutationsrate [32]. Dieses Einfügen von Punktmutationen, auch als „somatische Hypermutation“ bezeichnet, trägt neben der kombinatorischen und junktionalen Vielfalt zur Erhöhung der Anzahl unterschiedlicher Antikörperspezifitäten bei [33] [34].

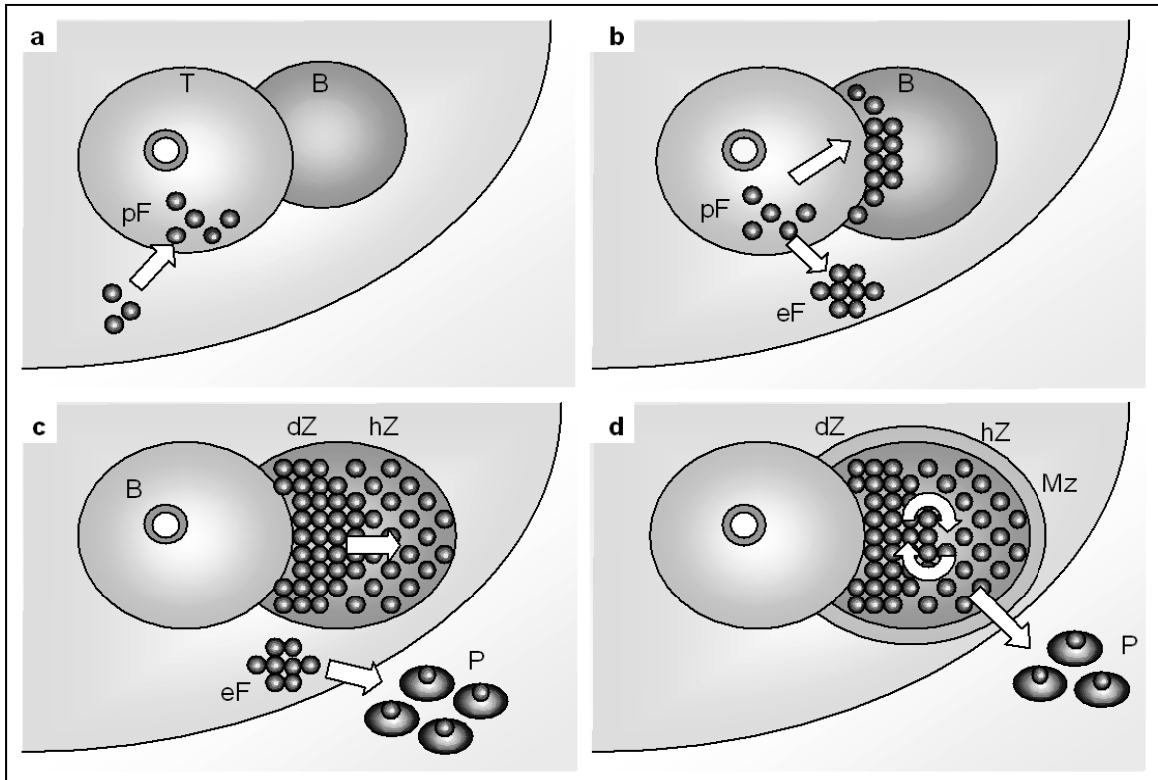


Abb. 5: B-Zellen während der Keimzentrumsreaktion in sekundären lymphatischen Organen. a) Einwanderung von B-Zellen in die T-Zellzone (T), Aktivierung der B-Zellen durch antigenspezifische T-Zellen, Bildung eines primären Fokus (pF) durch starke Proliferation der aktivierten B- und T-Zellen. b) Auswanderung eines Teils der B-Zell-Nachkommen in extrafollikuläre Foci (eF) und in die B-Zellzone (B) c) starke Proliferation der aktivierten B-Zellen, Entstehung der dunklen Zone (dZ), Klassenwechsel und Hypermutation der B-Zellen, Einwanderung der B-Zellen in die helle Zone (hZ), Bildung von kurzlebigen Plasmazellen (P) in den extrafollikulären Foci (eF) d) Selektion affinitätsgereifter Zentrozyten bzw. Rückkehr ins Keimzentrum, Bildung von Gedächtniszellen in der Marginalzone (Mz) und Plasmazellen (P).

Die somatische Hypermutation kann prinzipiell zu einer Erhöhung oder Erniedrigung der Affinität der B-Zell-Rezeptoren zu ihrem Antigen führen. Die B-Zellen wandern dann aus der dunklen Zone heraus in das um die dunkle Zone herum liegende Netzwerk follikulärer dendritischer Zellen (FDC). Da sie hier zwischen den FDC weniger dicht aneinander liegen als in der dunklen Zone, nennt man diesen Bereich „helle Zone“ eines Keimzentrums (Abb. 5c). Diese B-Zellen (Zentrozyten) sind nicht mehr zur Zellteilung befähigt. Die follikulären dendritischen Zellen besitzen an ihrer Oberfläche Fc- und Komplementrezeptoren, mit denen sie Immunkomplexe aus Komplement, Antikörpern und Antigenen präsentieren. Man nimmt an, daß die Zentrozyten miteinander um die von den FDC präsentierten Antigene konkurrieren. Bei ausreichender Rezeptoraffinität

können sie diese Antigene binden und involvieren, abbauen und die Peptidfragmente, gebunden an MHC-II, auf der Zelloberfläche exprimieren. Die Zentrozyten wandern nun an den Rand der hellen Zone des Keimzentrums, wo sie auf die ebenfalls klonal vermehrten T-Helferzellen treffen und ihnen ihre MHC-II-Peptid-Komplexe präsentieren. Jene B-Zellen erhalten Überlebenssignale, die sie vor der Apoptose retten [35] [36] [37]. B-Zellen, die jedoch Autoreaktivität erlangt haben, unterliegen einer negativen Selektion [38] [39] [40]. Im Verlauf einer Immunantwort und bei wiederholtem Kontakt mit dem Antigen kann die Antikörperaffinität um das zehnfache steigen – deshalb nennt man diesen Vorgang auch „Affinitätsreifung“ [41]. Außerdem kann, vermittelt durch T-Zell-Hilfe und AID (activation-induced cytidine deaminase), ein Klassen- bzw. Isotypenwechsel der schweren Kette des B-Zell-Rezeptors stattfinden [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48]. Die Exons der konstanten Region der schweren Immunglobulinkette (C_H) liegen in der DNA in der Reihenfolge $IgM/IgD \rightarrow IgG_3 \rightarrow IgG_1 \rightarrow IgA_1 \rightarrow IgG_2 \rightarrow IgG_4 \rightarrow IgE \rightarrow IgA_2$. Beim Klassenwechsel werden die bereits genutzten C_H -Exons aus der DNA deletiert. Damit rückt das nächstfolgende Exon in die unmittelbare Nachbarschaft des V-D-J-Bereichs.

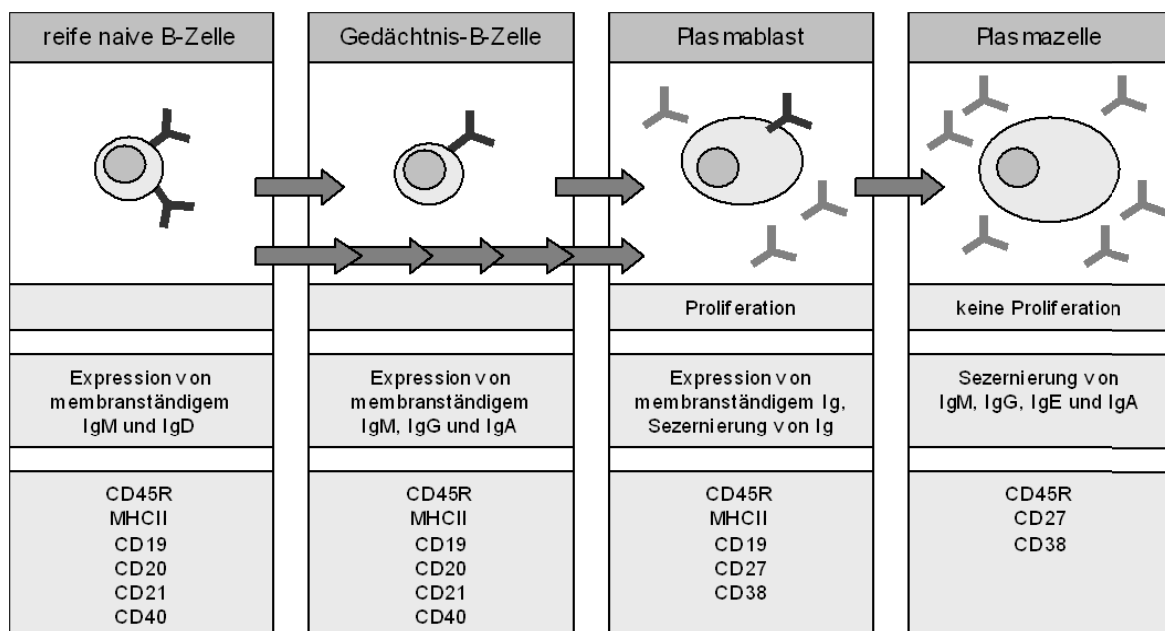


Abb. 6: Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen. Dargestellt sind die Stadien der Entwicklung von der reifen naiven B-Zelle zur Effektorzelle mit ihrer Expression von Immunglobulinen und CD-Oberflächenmarkern (verändert nach [14] und [49]).

Der Klassenwechsel kann sich daher immer nur in der Reihenfolge, in der die C_H-Exons der konstanten Region in der DNA liegen, vollziehen. Die B-Zellen, die die Affinitätsreifung erfolgreich überstanden haben, können daraufhin zu Gedächtnis- oder zu Plasmazellen (Abb. 5d und 6) differenzieren [25] [50] [51]. Die Gedächtnis-B-Zellen zirkulieren durch das Blut oder ruhen in mukosalen Epithelien oder der Marginalzone um die Keimzentren, bis sie erneut mittels Antigenkontakt und T-Zell-Hilfe aktiviert werden [52]. Da sie während der Keimzentrumsreaktion ebenso wie Plasmazellen klonal vermehrt und für hypermutierte B-Zell-Rezeptoren mit hoher Affinität für ein bestimmtes Antigen selektiert wurden, tragen sie bei einer erneuten Begegnung mit dem Pathogen zu einer effektiveren und spezifischeren Immunreaktion und somit zum „immunologischen Gedächtnis“ bei. Je nach Klasse wandern die Plasmazell-Vorläufer (Plasmablasten) mittels Chemotaxis durch das Blut in das Knochenmark, in die Mukosa oder zu entzündeten Geweben [53] [54] [55]. Im Knochenmark erhalten sie von Stromazellen bzw. Fibroblasten terminale Differenzierungs- und Überlebenssignale [56] [57]. Lichtmikroskopisch erscheinen Plasmazellen mit exzentrischem Nukleus und großem Zytoplasma. Sie sezernieren zum Antigen hochaffine Antikörper und können wahrscheinlich lange Zeit überleben [58] [59] [60] [61] [62].

1.2 Autoimmunität

Es existiert die Annahme, daß das Immunsystem zwischen „selbst“ und „nichtselbst“ bzw. zwischen „körpereigenen“ und „körperfremden“ Stoffen unterscheidet und entsprechend nur auf pathogene Erreger reagiert. „Selbst“ ist unterschiedlich definiert worden, z.B. als alles, was vom Genom codiert wird, alles, was sich unter der Haut befindet, als alle Gewebe, die von Lymphozyten erreicht werden können, für T-Zellen als Thymusepithel und antigenpräsentierende Zellen [63], für B-Zellen als alle Zelloberflächen und lösliche Moleküle [64] oder einfach als alle Proteine, die mengenmäßig einen bestimmten Schwellenwert überschreiten [65]. „Nichtselbst“ wiederum ist definiert worden als z.B. alles, was sich normalerweise außerhalb der Haut befindet oder nicht vom Genom codiert

wird. Bei dieser Definition besteht das Problem, daß es eine Vielzahl von Fremdstoffen gibt, die vom Immunsystem nicht angegriffen werden, wie z.B. Silikon, Haptene, verschiedenste Peptide und Nahrung. Andere vermuten, daß all das als „fremd“ erkannt wird, was Marker der „Fremdheit“ trägt. Diese Marker könnten z.B. konservierte Oberflächenmoleküle infektiöser Organismen sein [66] [67] [68]. Parallel existiert die Annahme, daß Immunsystem unterscheidet nicht zwischen „selbst“ und „nichtselbst“, sondern zwischen „gefährlichen“ und „ungefährlichen“ Stoffen [69] [70]. Dennoch existieren pathologische Zustände, in denen das Immunsystem chronisch „körpereigene“ Strukturen angreift - diese werden als Autoimmunerkrankungen bezeichnet. Dazu zählen z.B. Systemischer Lupus Erythematoses (SLE), insulinabhängiger Diabetes Mellitus, Multiple Sklerose und Rheumatoide Arthritis (RA). Ein interessantes Beispiel zur Möglichkeit der Erklärung der Entstehung solcher Autoimmunerkrankungen z.B. durch Gendefekte bietet ein Mausmodell, welches für das AIRE-Gen defizient ist. AIRE ist ein Transkriptionsfaktor, der dafür sorgt, daß Proteine, die normalerweise nur spezifisch in bestimmten Geweben exprimiert werden, auch im Thymus gebildet werden, so daß hier eine negative Selektion von T-Zellen, die spezifisch für diese Proteine sind, stattfinden kann. Ein Defekt in AIRE führt zur Entlassung potentiell autoreaktiver T-Zellen aus dem Thymus, die in diesem Mausmodell zu Autoimmunreaktionen in den verschiedensten Organen führen [71]. Jedoch - die meisten Autoimmunerkrankungen des Menschen entstehen mit Sicherheit nicht aufgrund eines einzelnen Gendefekts, sondern aufgrund von Fehlfunktionen des sehr komplexen Beziehungsgeflechts zwischen den Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. So offensichtlich auch bei der Rheumatoiden Arthritis:

1.3 Rheumatoide Arthritis

1.3.1 Vorkommen und Prädisposition der Rheumatoiden Arthritis

Mit einer Prävalenz von 0,5-2% ist die Rheumatoide Arthritis die häufigste chronische entzündliche Erkrankung in Industrieländern. Die Inzidenz von RA ist bei Frauen 3 mal so hoch wie bei Männern [72]. Das typische Erkrankungsalter liegt zwischen dem 35. und 45. oder über dem 60. Lebensjahr. Allerdings können

auch Kinder betroffen sein („juvenile RA“). RA wird mit bakteriellen Infektionen [73] [74], aber auch genetischen Faktoren wie bestimmten $Fc\gamma$ - [75] sowie MHC-II-Allelen assoziiert [76] [77] [78] [79]. Bei eineiigen Zwillingen besteht eine Konkordanz von 32-35% für RA [80].

1.3.2 Symptome der Rheumatoiden Arthritis

Hauptmerkmal der Rheumatoiden Arthritis ist die chronische Entzündung der Gelenke, besonders der Schulter-, Ellenbogen-, Hand-, Finger- sowie Kniegelenke, was zu einer Verdickung und Versteifung dieser Gelenke führt und sich für den Patienten in Bewegungsunfähigkeit („Morgensteifigkeit“) äußert [81]. Oft jedoch ist auch das Bindegewebe anderer Organe (Augen, Herz, Blutgefäße) in die entzündlichen Prozesse einbezogen. Neben den Schmerzen in den Gelenken besteht durch die systemischen entzündlichen Vorgänge außerdem ein allgemeines Krankheitsgefühl, geprägt von leichtem Fieber, Müdigkeit, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust. Oft ist eine milde Anämie, Granulozytose und Thrombozytose feststellbar. In schweren und andauernden Krankheitsfällen kommt es auch zu extraartikulären Krankheiten. Ein verbreitetes Symptom sind sich an manchen Gelenken bildende Hautknötchen; auch kommen Fibrosen der Lungen, seltener der Leber und Nieren vor. Sehr selten (in weniger als 1% der Patienten) besteht das „Felty-Syndrom“, als welches eine Vergrößerung der Milz mit einhergehender erhöhter Leukozyten- und Blutplättchenbildung bezeichnet wird. Häufig verläuft die rheumatoide Arthritis in krankheitsaktiven Phasen („Schub“). Dann klingen zwischen den einzelnen Schüben die Beschwerden der Betroffenen wieder ab. Zurück bleiben aber die Gelenkschäden, die sich bei jedem neuen Schub summieren. Bei anderen Betroffenen entwickelt sich die Rheumatoide Arthritis über Jahre langsam und steigernd. Bei diesem Verlauf kommt es nur selten zu Schüben. Zusammen mit den Nebenwirkungen der Medikamente führt dies zu erheblichen Einschränkungen der physischen und psychischen Konstitution der Betroffenen und oft zu deren Arbeitsunfähigkeit. Auch leichte Fälle von RA gehen oft mit einer verringerten Lebenserwartung einher, welcher schwere Infektionen, kardiovaskuläre Krankheiten aber auch Lymphome zugrunde liegen. Bei Fällen mit schwerer RA besteht nur eine 10-Jahres-Überlebensrate von 40% [82] [83] [84].

1.3.3 Pathophysiologie der Rheumatoiden Arthritis

Die Pathogenese von Rheumatoider Arthritis ist kaum verstanden. Das normale Synovium ist eine relativ azelluläre Struktur bestehend aus einer Schicht Synoviozyten (Synovialmembran) und einer extrazellulären Matrix, in der Blutgefäße, Fettzellen, Fibroblasten und selten mononukleäre Zellen zu finden sind. Die Synoviozyten sezernieren Synovialflüssigkeit als Gleitmittel in Synovialkammer. In der rheumatischen Synovialmembran hingegen ist eine enorme Infiltration inflammatorischer mononukleärer Zellen wie Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen, T-Zellen und B-Zellen zu beobachten. Dies führt zu einer Entzündung der Synovialmembran (Synovitis) und deren Verdickung (Hyperplasie). Innerhalb des chronischen Entzündungsprozesses bildet sich bei einem geringen Anteil der RA-Patienten in der Synovialmembran zusätzliches (tertiäres) Lymphgewebe aus, welches strukturell und funktionell Eigenschaften von Keimzentren aufweist. Es wurde gezeigt, daß in solchen ektopen Keimzentren somatische Hypermutation und Klassenwechsel aktivierter B-Lymphozyten wie auch deren Differenzierung zu Gedächtnis- und Plasmazellen geschehen kann [85] [86] [87] [88]. Letztere sind verantwortlich für die Produktion der großen Mengen lokaler Antikörper [89] [90].

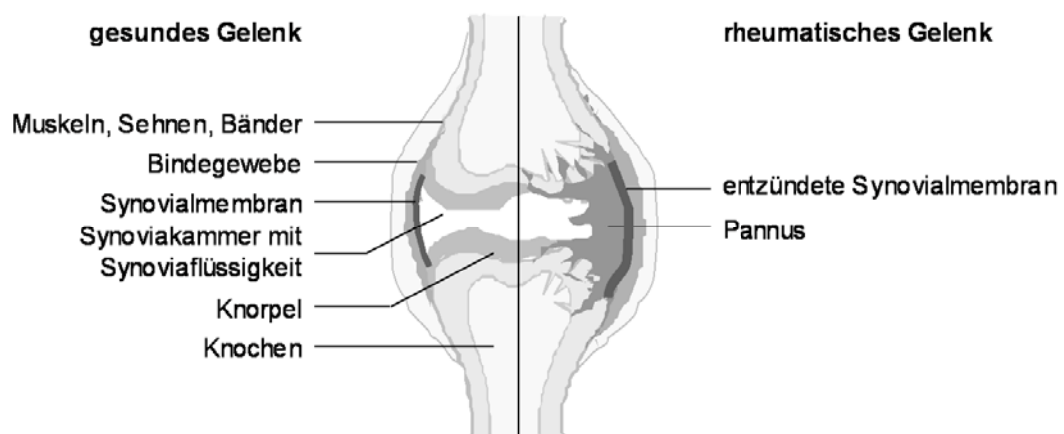


Abb. 7: Morphologische Veränderungen im Gelenk bei RA. Querschnitt durch ein Gelenk einer gesunden Person (links) und eines RA-Patienten (rechts).

Es wird außerdem in diesen Synovien eine lokale Überexpression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α nachgewiesen [91]. Dies führt u.a. zur Aktivierung synovialer Fibroblasten, welche daraufhin

Proteasen sezernieren, die das Knorpelgewebe abbauen [92] [93] [94]. Im Zuge des Knorpelschwundes findet eine Verknöcherung und Verschmelzung dieser Bereiche statt, was zu einer weiteren Verdickung und Versteifung der Gelenke (Pannus, Abb. 7) und massiven Bewegungsbeeinträchtigungen („Morgensteifigkeit“) der Patienten führt.

1.3.4 Diagnostizierung der Rheumatoiden Arthritis

Die Diagnose der Rheumatoiden Arthritis wird unter Zuhilfenahme von Labordiagnostik des Blutes, bildgebender Verfahren und anderer klinischer Befunde gestellt.

Labordiagnostik

Die Untersuchung des Blutbildes kann unspezifische Hinweise über akut stattfindende entzündliche Vorgänge aber auch rheumaspezifische Hinweise erbringen. Zu den unspezifischen zählen z.B. die Blutsenkgeschwindigkeit (BSG) und das C-reaktive Protein (CRP). Die BSG repräsentiert die Sinkgeschwindigkeit der Erythrozyten im Blutplasma. Dazu wird das Blut (z.B. mittels EDTA oder Heparin) ungerinnbar gemacht und der Höhenunterschied der Erythrozyten zwischen frisch abgenommenem Blut und nach einstündigem in Ruhe stehendem Blut in mm gemessen. Der BSG-Wert beträgt für gesunde Menschen meist weniger als 12mm/1h, wobei er bei Männern im Durchschnitt geringer (3-8mm/1h) als bei Frauen (6-11mm/1h) ausfällt (Normwerte der Rheumatologie, Charite, Berlin). CRP und andere Akute-Phase-Proteine werden als generelle unspezifische Antwort auf entzündliche Prozesse durch IL-6 und andere Zytokine in der Leber induziert und sind ebenfalls im Blut nachweisbar. Der CRP-Wert beträgt bei gesunden Personen maximal Werte bis 0,5 mg/dL (Normwerte der Charite, Berlin). Werte der BSG und des CRP über den Normwerten deuten auf inflammatorische Prozesse hin. RA-Patienten in aktiver Krankheitsphase weisen oft erhöhte BSG- und CRP-Werte auf. Als spezifisches Diagnosekriterium für RA hat sich außerdem der Nachweis verschiedener Autoantikörper im Serum, besonders der Rheumafaktoren (RF), etabliert. Als Rheumafaktoren werden Antikörper, die Spezifität für die Fc-Domäne von körpereigenen IgG-Antikörpern besitzen, bezeichnet [95]. Sie kommen vorwiegend in den Immunglobulinklassen

IgM, IgG, aber auch als IgA vor. In der Klinik werden zumeist IgM-RF bestimmt - Werte bis 24 IU/mL IgM-RF (Normwerte der Rheumatologie, Charite, Berlin) gelten als normal bzw. seronegativ. Erhöhte IgM-Rheumafaktoren sind bei ca. 80% der Patienten mit RA, jedoch auch bei chronischen Verläufen reaktiver Arthritiden, bei einigen anderen Autoimmunerkrankungen sowie bei gesunden älteren Menschen nachweisbar [96] [97]. IgM-RF-seropositive Patienten weisen im Vergleich zu seronegativen Patienten oft eine aggressivere Krankheit mit schlechter Prognose auf. Das Auftreten erhöhter IgA-RF jedoch korreliert besonders gut mit der Krankheitsaktivität, Knochenerosionen, extraartikulären Symptomen sowie der notwendigen Intensität der Behandlung [98] [99] [100] [101]. Einen weiteren Parameter zu serologischen Diagnostik der RA stellen die Antikörper gegen zyklisches zitruelliniertes Peptid (CCP) dar. Antikörper gegen CCP sind bereits in frühen Phasen der Erkrankung nachweisbar und korrelieren mit dem Schweregrad der Erkrankung. Mit der im Vergleich zu den IgM-Rheumafaktoren außerordentlich hohen Spezifität von 91% stellen die Antikörper gegen CCP einen geeigneten Parameter zur serologischen Differentialdiagnose der RA dar. Bei gleichzeitiger Bestimmung der Rheumafaktoren und der Antikörper gegen CCP steigt die Diagnosesicherheit auf bis zu 99% [102]. Desweiteren können im Serum von RA-Patienten Autoantikörper für z.B. RA33 [103] [104] [105], Histone [106], Sa [107], Kollagen Typ II [108] [109], Calpastatin [110] [111] und BiP [112] nachgewiesen werden.

Klinische Befunde

Ein weiteres wesentliches Merkmal der RA sind die auf beiden Körperseiten symmetrisch geschwollenen und schmerzhaften Gelenke der Patienten. Oftmals wird vom Arzt der „28-joint-count“ für schmerzhaft und geschwollene Gelenke der Patienten ermittelt, was bedeutet, daß nicht die gesamte Anzahl der schmerzhaften und der geschwollenen Gelenke, sondern nur 28 „rheumaspezifische“ einbezogen werden. Dazu zählen die Schultergelenke, die Ellenbogengelenke, die carpometacarpalen (CMC), metacarpophalangealen (MCP) und proximalen interphalangealen (PIP) Gelenke der Hände sowie die Kniegelenke. Oft wird vom Arzt das PGA (patients global assessment) ermittelt, was die subjektive Selbsteinschätzung des Patienten seiner Beschwerden durch

die Rheumatoide Arthritis seit seinem letzten Arztbesuch bedeutet. Der Patient hat dazu auf einer waagerechten unskalierten Linie mit einer Länge von 100mm einen senkrechten Strich zu machen, wobei 0 völlige Beschwerdefreiheit, 100 jedoch unerträgliche Schmerzen repräsentiert. Der Abstand vom linken Ende der waagerechten Linie zum vom Patienten gemachten Striches ergibt den PGA-Wert in mm. Der DAS (disease activity score) ist ein Wert, der als (einheitsloser) Krankheitsaktivitätsindex für Rheumatoide Arthritis anerkannt ist. Er wird aus der Anzahl schmerzhafter und geschwollener Gelenke (28-joint-count), der BSG (mm/1h) und dem PGA (mm) berechnet ($DAS = 0,56\sqrt{\text{Anzahl schmerzhaftes Gelenke}} + 0,28\sqrt{\text{Anzahl geschwollene Gelenke}} + 0,70\ln(\text{BSG}) + 0,014\text{PGA}$, siehe auch Anhang, Tab. 3). Werte von 0 bis 2,6 repräsentieren keine Krankheitsaktivität bzw. Remission, Werte über 2,6 bis 3,2 repräsentieren eine geringe Krankheitsaktivität, Werte über 3,2 bis 5,1 repräsentieren eine moderate Krankheitsaktivität und Werte über 5,1 repräsentieren eine hohe Krankheitsaktivität [113] [114] [115].

ACR-Kriterien

1987 wurden vom American College of Rheumatology (ACR) Kriterien für die Klassifikation verschiedener rheumatischer Erkrankungen als Hilfsmittel für die Vergleichbarkeit von Patienten in sogenannten klinischen Studien erstellt [116]. Die ACR-Kriterien sind keine Diagnosekriterien im eigentlichen Sinne, sie können allerdings als Diagnosehilfe herangezogen werden. Sie schließen die Ergebnisse der Labordiagnostik und bildgebender Verfahren sowie klinische Befunde ein. Wenn mindestens vier der sieben folgenden ACR-Kriterien (Kriterien 1-4 für mindesten 6 Wochen) erfüllt sind, so gilt als wahrscheinlich, daß der betreffende Patient unter Rheumatoider Arthritis leidet: 1) Morgensteifigkeit der Gelenke von mindestens 1 Stunde Dauer. 2) Entzündung, Schwellungen oder Flüssigkeitsansammlungen an mindestens 3 Gelenkbereichen gleichzeitig. 3) Entzündung, Schmerzen und Schwellungen in mindestens einem Hand- oder Fingergelenk. 4) symmetrische Beteiligung derselben Gelenkbereiche beider Körperhälften. 5) subkutane Rheumaknoten (über den Knochenvorsprüngen vieler Gelenke oder an den Streckseiten von Händen und Füßen (Fußrücken) bilden sich gelenknah kleine Knötchen unter der Haut. Sie bestehen aus einer

Anhäufung von Immunzellen, oft ummauert von Bindegewebe). 6) Nachweis von erhöhter Rheumafaktorwerte im Blut. 7) Radiographischer Nachweis (Röntgen) typischer Veränderungen vor allem an den Händen (z.B. gelenknahe Osteoporose, Erosionen).

1.3.5 Therapie der Rheumatoiden Arthritis

Eine Möglichkeit der Heilung von Rheumatoider Arthritis ist bis heute unbekannt. Jedoch existieren eine Anzahl verschiedenster Medikamente, die aufgrund ihrer entzündungshemmenden, antiproliferativen und immunsuppressiven Wirkung relativ erfolgreich zur Bekämpfung der Symptome eingesetzt werden, sowie die Möglichkeit operativer Eingriffe (Synovektomie und prothetischer Gelenkersatz). Im folgenden werden wichtige Medikamentengruppen vorgestellt.

Nichtsteroidale Antirheumatika

Zu den nichtsteroidalen Antirheumatika (non-steroidal anti-rheumatics, NSAR bzw. non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) zählen z.B. Diclofenac oder Indometacin, sie sind anti-inflammatorisch wirkende Schmerzmittel und haben als gemeinsames Wirkprinzip die Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase (COX), welches zur Prostaglandinproduktion notwendig ist. Eine häufige Nebenwirkung ist die Begünstigung der Entstehung von Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren. Dies kann insbesondere dann auftreten, wenn diese Medikamente zusammen mit Glukokortikoiden eingenommen werden. Eine neuere Klasse von NSAR sind die selektiven Cyclooxygenase-2(COX-2)-Hemmer. Sie blockieren nur die Produktion der Prostaglandine, die bei Entzündungen entstehen, nicht aber der Prostaglandine, welche z.B. zum Schutz der Magenschleimhaut nötig sind. Zu den NSAR gehören außerdem Schmerzmittel wie z.B. Acetylsalicylsäure oder Ibuprofen.

Kortikoide

Einen weiteren wesentlichen Stützpfiler der Therapie der Rheumatoiden Arthritis bilden die Präparate, die sich vom Cortison ableiten (Glukokortikoide). Sie wirken schnell anti-inflammatorisch und bringen somit dem Patienten rasch Linderung seiner Beschwerden. Bei längerdauernder niedrig-dosierter Therapie zeigt sich

auch eine Verlangsamung des Fortschreitens der Gelenkzerstörung, die jedoch durch Kortikoide nicht völlig aufgehalten werden kann. Leider treten bei längerdauernder oder hochdosierter Therapie mit Glukokortikoiden Nebenwirkungen auf, z.B. Osteoporose.

Basistherapie

Neben nichtsteroidalen Antirheumatika und Kortikoiden kommen Medikamente der Basistherapie bzw. DMARD (disease modifying anti-rheumatic drugs) zum Einsatz. Bei geringer Krankheitsaktivität wird Sulfasalazin (Azulfidine), Chloroquin, Hydroxychloroquin und Auranofin (orales Gold) gegeben. Bei mittlerer Krankheitsaktivität werden Sulfasalazin, Azathioprin (Imurek) und Aurothioglukose (injizierbares Gold) verwendet. Bei hohem Krankheitsverlauf erfolgt eine Behandlung mit Methotrexat (MTX), Cyclophosphamid, D-Penicillamin, Cyclosporin A und Leflunomid. Zur Basistherapie zählt auch eine neuere Art von Medikamenten, die sog. „Biologicals“, welche bei Patienten, denen durch die herkömmlichen Basistherapie nicht ausreichend geholfen werden kann, angewandt werden. Dazu gehören diverse Antagonisten für Zytokine wie z.B. IL-1, und TNF- α und deren Rezeptoren. Etanercept (Enbrel) ist ein humaner rekombinanter löslicher TNF- α -Rezeptor und bindet zirkulierendes TNF- α [117]. Anakinra (Kineret) ist ein rekombinanter IL1-Rezeptorantagonist, der an den IL1-Rezeptor bindet und diesen blockiert [118]. Auch anti-TNF-Antikörper werden zur Therapie genutzt. Diese binden spezifisch an TNF- α und verhindern so deren Interaktion mit TNF-Rezeptoren auf Zelloberflächen. Infliximab (Remicade) ist ein chimärischer monoklonaler anti-TNF- α -Antikörper aus humanem variablem Teil und murinem konstantem Teil und bindet an lösliches und membranständiges TNF [119]. Adalimumab (Humira, D2E7) ist ein humaner monoklonaler anti-TNF- α -Antikörper [120].

1.4 Ziele dieser Arbeit

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische Autoimmunerkrankung, die sich bevorzugt in der Entzündung und Zerstörung der Gelenke äußert. In betroffenen Gelenken wurden tertiäre lymphatische Gewebe nachgewiesen, die eine lokale antigenabhängige Differenzierung von B-Zellen zu Gedächtnis- und Plasmazellen zu unterstützen scheinen. Im Blut von RA-Patienten werden häufig Autoantikörper nachgewiesen, wobei besonders Rheumafaktoren mit der Krankheitsaktivität korrelieren. Bei der chronischen Autoimmunerkrankung SLE wurde gezeigt, daß sich mit zunehmender Krankheitsaktivität die Population peripherer Plasmazellen vergrößert [49]. Daher besteht das Ziel dieser Arbeit darin, eine Datengrundlage für die Einschätzung der Relevanz von peripheren B-Zellen an der Pathogenese und in der Diagnostik der RA zu liefern. Dazu wird untersucht, ob im Blut von RA-Patienten Veränderungen der B-Zellen und ihrer Subpopulationen nachweisbar sind und ein Zusammenhang zu klinischen Entzündungsparametern besteht. Desweiteren werden die Immunglobulingene der peripheren Plasmazellen von RA-Patienten auf Immunglobulinklassen, V-(D-)J-Repertoire, somatische Hypermutationen sowie CDR3-Länge analysiert, um Aussagen über den Aktivierungsstatus und die Antigenaffinität dieser Plasmazellen treffen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

123bp-Leiter	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
1Kb-Leiter	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
Agarose	Appligene Oncor, Heidelberg, Deutschland
Ampicillin	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Borsäure	Calbiochem, Stadt, Land
Bromphenolblau	Biozym, Hamburg, Deutschland
BSA	Fraction V, Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Dimethylformamid	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
EcoRI & 10xH-Puffer	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland
Ficoll Paque	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
IPTG	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
NaCl	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
NaH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
nukleasefreies H ₂ O	Biozym, Hamburg, Deutschland
NuSieve GTG Agarose	Biowhittaker Molecular Applications, Rockland, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
POP6	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Saponin	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
SDS	Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
Selekt Agar	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Streptavidin-PE	PharMingen, Heidelberg, Deutschland
Tris	ICM Biomedicals, Eschwege, Deutschland
Tris-HCl	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
TSR	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Ultrapure dNTP Set	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
X-Gal	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylenyanol	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
YT Broth-Medium	Bio 101 Inc, Carlsbad, USA

2.1.2 Primer

Primer für den pCRII-TOPO-Vektor

+40 M13 5'-CAG gAA ACA gCT ATg AC-3'
-40 M13 5'-gTT TTC CCA gTC ACg A-3'

Primer zum Nachweis der cDNA von sezerniertem und membranständigem IgG₁

G1CH2 5'-ggC AAg gAg TAC AAg TgC AAg g-3'
G1MemCy 5'-gTC ggg gAT gAT ggT CTg CTT CAg-3'
G1UT 5'-CAA gCA TCC TCg TgC gAC CgC g-3'

Backward-Primer für C_H

humM3' 5'-ACg ggg AAT TCT CAC Agg AgA C-3'
humG3' 5'-CAC gCT gCA gAT gTA ggT CTg g-3'
α1/2 5'-gAg gCT Cag Cgg gAA gAC CTT g-3'
γ4 5'-gAg ggC gCC Agg ggg AAg AC-3'

Forward-Primer-Mix für V_H

V_H2 5'-AgA TCA CCT TgA Agg AgT CTg g-3'
V_H1/3/5 5'-g TgC AgC Tgg TgS AgT CTg g-3'
V_H4N 5'-Agg TgC AgC TAC AgC AgT gg-3'
V_H4 5'-Agg TgC AgC TgC Agg AgT Cg-3'
V_H6 5'-C AgC TgC AgC AgT Cag gTC C-3'

Backward-Primer für C_K

K-110 5'-AA gAT gAA gAC AgA Tgg TgC AgC CAC-3'

Forward-Primer-Mix für V_K

V_K1 5'-C ATC Cag WTg ACC Cag TCT CC-3'
V_K2b 5'-gAT RTT gTg Atg ACT Cag TCT CC-3'
V_K2/4/6 5'-T ATT gTg ATg ACC Cag ACT CC-3'
V_K3 5'-CTK TgT CTC Cag ggg AAA gAg-3'
V_K5 5'-A ACC ACA CTC Acg Cag TCT CC-3'

Backward-Primer für C_λ

L-115 5'-ggg Cgg gAA Cag AgT gAC Cg-3'

Forward-Primer-Mix für V_λ

V_λ1 5'-gTC TgT gTT gAC gCA gCC gC-3'
V_λ2 5'-CA gTC TgC CCT gAC TCA gCC-3'
V_λ3a 5'-CTA TgT gCT gAC TCA gCC ACC-3'
V_λ3b 5'-C TTC TgA gCT gAC TCA ggA CC-3'
V_λ4b 5'-gCT TgT gCT gAC TCA ATC gCC-3'
V_λ7/8 5'-gAC TgT ggT gAC YCA ggA gC-3'

Alle Primer wurden von der Firma TIB MolBiol, Berlin, Deutschland, synthetisiert.

2.1.3 Antikörper

ahCD19-Biotin	Klon SJC25-C1	Southern Biotechnology Associates, Wedel, Deutschland
ahCD20-FITC	Klon B-Ly1	Southern Biotechnology Associates, Wedel, Deutschland
ahCD38-FITC	Klon HIT 2	PharMingen, Heidelberg, Deutschland
ahCD27-Cy5	Klon 2E4	eine freundliche Gabe von René van Lier, Amsterdam, Niederlande
ahlgG ₁ -FITC	Klon JDC-1	PharMingen, Heidelberg, Deutschland
ahlgG ₂ -FITC	Klon G18-21	PharMingen, Heidelberg, Deutschland
ahlgG ₃ -FITC	Klon G18-3	PharMingen, Heidelberg, Deutschland
ahlgG ₄ -FITC	Klon JDC-14	PharMingen, Heidelberg, Deutschland
ahlgA-FITC	Klon M24A	Cymbus Biotechnology, Chandlers Ford, Großbritannien

2.1.4 Puffer

PBS	16,36g NaCl 3,27g Na ₂ HPO ₄ 0,312g NaH ₂ PO ₄ 2L ddH ₂ O (pH 7,4)
TBE-Puffer	0,1M Tris-HCl, 0,1M Borsäure, 3mMEDTA (pH 8,0)
TENS-Puffer	10mM Tris-HCl, 1mMEDTA, 0,1N NaOH, 0,5% SDS (pH 8,0)
FACS-Puffer	PBS, 0,5% BSA, 4mMEDTA (pH 8,0)

2.1.5 Kits

OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
AmpliTaqGold-PCR Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Jetsorb-Kit	Genomed, Löhne, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TOPO 5min PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen, Hilden, Deutschland
Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Heparinröhrchen (Vacutainer)	Becton Dickinson, San Diego, USA
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermostrips	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Einmalskalpelle (Solofix)	Braun, Melsungen, Deutschland
Falkonröhrchen	Greiner, Nürtingen, Deutschland
Petrischalen	Greiner, Nürtingen, Deutschland

2.1.7 Geräte

FACSCalibur	Becton Dickinson, San Diego, USA
FACSVantage	Becton Dickinson, San Diego, USA
ABI Prism Sequencer 310	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.8 Software

Cell Quest 3.2.1f1X	Becton Dickinson, San Diego, USA
ABI Sequence Analysis 3.4.1	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
DNA Strider 1.1	Freeware
SPSS 10.x und 11.x	SPSS Inc., Chicago, USA

2.2 Methoden

2.2.1. Blutabnahme bei RA-Patienten und gesunden Kontrollpersonen

In Übereinstimmung mit den Richtlinien der Ethikkommission der Charité Berlin und vorliegender Einverständniserklärung der Patienten wurden durch einen Arzt jeweils 10mL peripheres Blut in Heparinröhrchen von insgesamt 98 Patienten mit gesicherter Diagnose von Rheumatoider Arthritis, basierend auf den Klassifikationskriterien des American College of Rheumatology (ACR) von 1987 [116], sowie 17 gesunden Kontrollpersonen (NHS, normal healthy subject) entnommen.

2.2.2 Erhebung der klinischen Daten der RA-Patienten

Vom untersuchenden Arzt bzw. vom Labor der Charite Berlin wurden individuelle Daten der RA-Patienten wie Geschlecht, Alter, Datum der Diagnosestellung, Anzahl der Leukozyten/nL Blut, Frequenz der Lymphozyten (Anteil an Leukozyten), Blutsenkgeschwindigkeit (BSG, mm/1h), IgM-Rheumafaktoren (RF, IU/mg), C-reaktives Protein (CRP, mg/dL), Anzahl schmerzhafter und geschwollener Gelenke („28 joint count“), Selbsteinschätzung des Patienten (PGA,

mm) sowie Angaben zur Therapie zur Verfügung gestellt. Die Namen wurden kodiert sowie alle Daten vertraulich behandelt.

2.2.3 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen

Die Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC, umfassen Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten) aus dem entnommenen Blut der RA-Patienten und gesunden Kontrollpersonen erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Dabei werden PBMC aufgrund ihrer Dichte im Ficoll-Gradienten von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen getrennt. Das Blut wurde 1:3 mit PBS verdünnt und auf 15mL Ficoll Paque geschichtet. Nach 25min Zentrifugation bei 1500rpm 21°C ohne Bremse wurde die PBMC-Bande abgenommen, mit FACS-Puffer auf 15mL aufgefüllt und 10min bei 1500rpm und 21°C mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in der Restflüssigkeit resuspendiert, in 1mL FACS-Puffer aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden daraufhin gewaschen, d.h. 5min bei 2000rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet resuspendiert und in 1mL FACS-Puffer aufgenommen. Dieser Waschschrift wurde wiederholt.

2.2.4 Färbung von Oberflächenmolekülen und Immunglobulinen

Färbung von Oberflächenmolekülen

Es wurde bei den RA-Patienten und gesunden Kontrollpersonen eine Färbung der Oberflächenmoleküle der PBMC durchgeführt, um die B-Zellen sowie B-Zellsubpopulationen mittels FACS zu typisieren. Pro Färbung wurden 100µL aus 1mL isolierten gewaschenen PBMC (entspricht 10% der PBMC eines 10mL-Heparin-Blut-Röhrchens) entnommen, 5min bei 200rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets resuspendiert. Diese wurden in 100µL Färbelösung mit folgenden Antikörpern in FACS-Puffer 10min auf Eis im Dunkeln inkubiert: anti-human CD19-Biotin (5µg/mL), anti-human CD20-FITC (4µg/mL) und anti-human CD27-Cy5 (1,25µg/mL). Diese Färbung wurde bei einem Teil der RA-Patienten statt mit anti-human CD20-FITC mit anti-human CD38-FITC (10µg/mL) durchgeführt. Danach wurden die Zellen in FACS-Puffer gewaschen und mit 100µL Streptavidin-PE (5µg/mL) in FACS-Puffer 10min auf Eis im Dunkeln

inkubiert, um CD19-Biotin nachzuweisen. Die Zellen wurden daraufhin in FACS-Puffer gewaschen und in 0,5mL FACS-Puffer aufgenommen. Kurz vor der FACS-Analyse wurde Propidiumiodid (PI, 1µg/mL) zugegeben. Dieser fluoreszierende Farbstoff dringt in nekrotische Zellen durch die geschädigte Zell- und Kernmembran ein, interkaliert in die DNA und macht somit tote Zellen im FACS detektierbar.

Intrazelluläre Färbung von Immunglobulinen

Es wurden bei 9 der untersuchten RA-Patienten Färbungen für intrazelluläres IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ und bei 13 der untersuchten RA-Patienten für intrazelluläres IgA durchgeführt. Um eine Zerstörung der membrangebundenen Moleküle CD19 und CD27 zu vermeiden, wurden diese vor der Fixierung der Zellen wie oben beschrieben gefärbt. Dann wurde die Fixierung der Zellen durchgeführt. Die Fixierung mittels Formaldehyd führt zur Quervernetzung von Proteinen und erhält damit den Proteinstatus der Zellen. Dazu wurden die Zellen 2 mal in PBS/4mMEDTA gewaschen und dann in 1mL 2%Paraformaldehyd in PBS 20min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen 2 mal in PBS und daraufhin 1 mal in PBS/0,5%BSA gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit anti-human IgG₁₋₄- oder anti-human IgA-Antikörpern (je 10µg/mL) in 5%Saponin in PBS/0,5%BSA inkubiert. Bei den Negativkontrollen enthielt die Färbelösung kein Saponin. Saponin ist ein Detergenz, welches die Zellmembran permeabilisiert. Da dieser Vorgang reversibel ist, erfolgte das anschließende zweimalige Auswaschen ungebundener Antikörper aus den mit Saponin gefärbten Zellen ebenfalls in 5%Saponin in PBS/0,5%BSA. Schließlich wurden die Zellen in 0,5mL PBS/0,5%BSA aufgenommen.

2.2.5 Durchflußzytometrie

Mittels FACS (fluorescence activated cell sorting = fluoreszenzaktivierte Zellsortierung) können einzelne Zellen anhand ihrer Lichtstreueigenschaften und ihrer emittierten Fluoreszenz analysiert werden. Mittels Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht kann ein FACS-Gerät Größe und Granularität von Zellen erkennen. Werden extra- oder intrazelluläre Moleküle von Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. FITC [Fluoresceinisothiocyanat], PE [Phycoerythrin],

Cy5 [Cyanin 5]) gekoppelten Antikörpern gefärbt, werden diese Farbstoffe im FACS-Gerät durch entsprechende Laser angeregt und emittieren Licht verschiedener Wellenlängen. Vom Gerät wird dieses Licht von Detektoren für die entsprechenden Wellenlängen gemessen und seine Intensität pro Zelle in einem Diagramm dargestellt (Abb. 8).

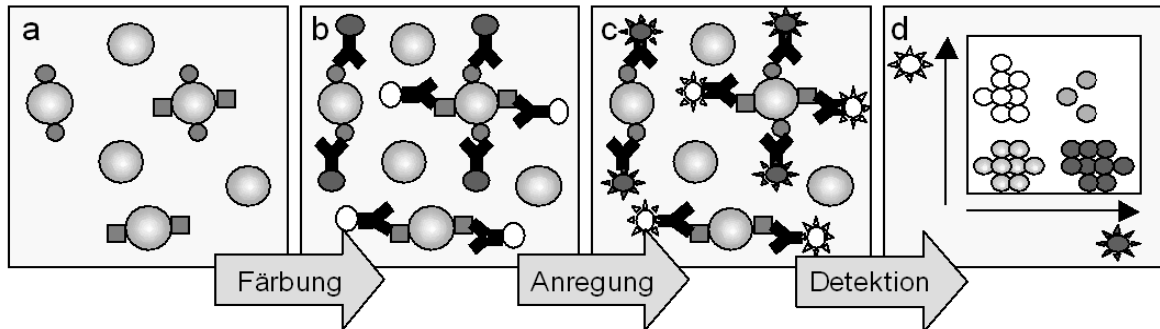


Abb. 8: Funktionsweise des FACS. a) Zu analysierende Zelltypen mit unterschiedlichen Oberflächenmolekülen. b) Färbung dieser Oberflächenmoleküle mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern. c) Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe durch Laser im FACS-Gerät. d) Detektion der Fluoreszenz pro Zelle durch das FACS-Gerät und graphische Darstellung der Zelltypen.

Analyse von Zellen mittels FACS

Es wurden pro Färbung 100.000 Zellen mit dem Durchflußzytometer (FACScalibur) gemessen und die Ergebnisse mit CellQuest-Software analysiert. Zuerst wurden die PBMC im Vorwärtsstreulicht/Seitwärtsstreulicht-Punkte-Diagramm dargestellt. Von diesen Zellen wurden nur jene in die weitere Analyse eingeschlossen, die aufgrund ihrer Streulichteigenschaften Lymphozyten repräsentieren. Diese wurden daraufhin im CD19/Probidiumiodid-Punkte-Diagramm dargestellt. Bei Oberflächenfärbungen wurden von diesen Zellen nur jene in die weitere Analyse eingeschlossen, die Probidiumiodid-negativ (PI^-) erschienen und somit lebende Lymphozyten repräsentieren. Diese wurden daraufhin in einem weiteren CD19/Probidiumiodid-Punkte-Diagramm dargestellt, welchem die Frequenzen der CD19-positiven ($CD19^+$) Zellen, welche B-Zellen repräsentieren, entnommen wurden. Die B-Zellen wurden daraufhin im CD20/CD27- bzw. CD38/CD27-Punkte-Diagramm dargestellt, welchem die Frequenzen der einzelnen B-Zell-Subpopulationen entnommen wurden. Für die Analyse der Zusammenhänge zwischen B-Zell-Subpopulationen und

Krankheitsaktivität, Therapie etc. wurden die durch die CD20/CD27-Färbung ermittelten Frequenzen/-zahlen der B-Zell-Subpopulationen verwendet. Die Anzahl der B-Zellen wurde mittels der durchflußzytometrisch ermittelten B-Zellfrequenz und der von der Klinik ermittelten Lymphozytenanzahl errechnet. Die Anzahl der B-Zellen der drei B-Zell-Subpopulationen wurde mittels der B-Zellanzahl berechnet. Bei intrazellulären Färbungen wurden die Lymphozyten im CD19/PI-Punkte-Diagramm dargestellt und die CD19⁺ B-Zellen in die weitere Analyse eingeschlossen. Die CD19⁺ B-Zellen wurden daraufhin im CD27/IgG- bzw. im CD27/IgA-Punkte-Diagramm dargestellt, welchem die Frequenzen der einzelnen B-Zell-Subpopulationen anhand ihrer CD27- und IgG- bzw. IgA-Expression entnommen wurden.

Sortierung von B-Zellen mittels FACS

Neben der reinen Analyse der Zellpopulationen wurde ein spezielles Durchflußzytometer (FACSVantage) genutzt, um B-Zellen zu sortieren. Dazu werden die Zellen zweier unterschiedlich gefärbter Zellpopulationen nacheinander einzeln in einem Flüssigkeitsstrahl vom Gerät elektrisch geladen und dann durch Ablenkung dieses Strahls in zwei unterschiedliche Auffanggefäße geleitet. Mit Hilfe des FACSVantage wurden aus den für CD19, CD20 und CD27 gefärbten PBMC 1 und 10 Plasmazellen (CD20⁻CD27⁺⁺) sowie 1, 10 und 100 Gedächtnis-B-Zellen (CD20⁺CD27⁺) in 20µL Puffer (OneStep RT-PCR-Kit) in jeweils ein 0,2mL Reaktionsgefäß eines 8er-Streifen (Thermostrips) sortiert und diese bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

2.2.6 RT-PCR der Immunglobulin-mRNA von Plasmazellen

Mittels reverser Transkription (RT) wurde der variable Teil der Immunglobulin-mRNA der FACS-sortierten Plasmazellen in cDNA umgeschrieben. Dabei wird mit Hilfe der reversen Transkriptaseaktivität einer DNA-Polymerase und Primern spezifisch für die konstante Region von schweren und leichten Immunglobulinketten die Ig-mRNA in 5'->3'-Richtung zu cDNA transkribiert. Eine Isolierung der mRNA aus den Zellen war hierbei nicht notwendig. Nach der RT wurde zur Blockierung der reversen Transkriptase- und zur Aktivierung der Polymerase-Funktion des Enzyms der Ansatz 15min bei 95°C inkubiert.

Darauffolgend wurde eine Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) durchgeführt, um die durch die reverse Transkription gewonnene Immunglobulin-cDNA zu amplifizieren. Dazu wurde pro Reaktion derselbe Reaktionsansatz aus der reversen Transkription verwendet. Dies ist aufgrund der hier verwendeten Polymerase möglich, da diese in sich zwei Funktionen, die einer Reversen Transkriptase und die einer DNA-Polymerase, in sich vereint. Jeder RT-Ansatz wurde zu gleichen Teilen (jeweils 16 μ L) auf 3 neue 0,5mL-Eppendorfgefäße aufgeteilt, um die PCR für schwere und leichte Ig-Ketten mit der cDNA getrennt durchführen zu können. Zum V_H -Ansatz wurde jeweils 1 μ L eines Forward- V_H -Primer-Mixes (je 10pmol/ μ L), zum V_K -Ansatz jeweils 1 μ L eines Forward- V_K -Primer-Mixes (je 10pmol/ μ L) und zum V_λ -Ansatz jeweils 1 μ L eines Forward- V_λ -Primer-Mixes (je 10pmol/ μ L) zugegeben. Backward-Primer, die im konstanten Teil der Ig-cDNA binden, wurden nicht erneut zugegeben, da sie bereits bei der reversen Transkription in ausreichender Menge zugegeben wurden. Bei der PCR wird zuerst die doppelsträngige cDNA durch 1-minütige Erhitzung auf 94°C denaturiert (einzelnsträngig gemacht). Danach erfolgt eine schnelle Temperaturerniedrigung auf 67°C während 1min, wodurch sich zwei Oligonukleotid-Primer an das zu amplifizierende cDNA-Fragment anlagern (annealen): der erste Primer an das komplementäre 5'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes des einen Stranges, der zweite Primer an das komplementäre 5'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes des anderen Stranges. Nach Temperaturerhöhung auf 72°C verdoppelt die Polymerase beide DNA-Stränge von 5'- in 3'-Richtung durch Verknüpfen von dNTP (Desoxynukleosidtriphosphaten) an die Strangenden mit dem anderen Strang als Matrize. Diese sogenannte Elongation dauert hier 1min. Die Primer sind so angeordnet, daß die DNA-Synthese auf dem DNA-Abschnitt zwischen den beiden Primern verläuft, wodurch die Menge dieses DNA-Abschnittes effektiv verdoppelt wird. Die Amplifikate sind zueinander komplementär, deshalb hybridisieren sie nach der Elongation miteinander. Im zweiten Zyklus werden diese beiden DNA-Stränge wieder denaturiert, die Primer annealen und die Taq-Polymerase verdoppelt die Zielsequenz. Durch Wiederholung solcher Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation können die ursprünglichen cDNA-

Fragment exponentiell in der Lösung angereichert werden. In dieser Arbeit wurden zusätzlich 40 Zyklen getätigt, so daß das DNA-Fragment schließlich in etwa 2^{40} Kopien vorlag. Im letzten Zyklus betrug die Zeit der Elongation statt 1min 10min, damit die DNA-Polymerase auch bei mittlerweile wahrscheinlich recht niedriger dNTP-Konzentration das entsprechende DNA-Fragment vollständig verdoppeln konnte. Bei jeder RT-PCR wurde ein RT-PCR-Ansatz (Negativkontrolle) mitamplifiziert, der statt der Einzelzellen die entsprechende Menge an RT-PCR-Puffer enthält.

50µL-RT-Ansatz (OneStep RT-PCR-Kit)

20µL FACS-sortierte Zelle(n)
6µL 5×RT-PCR-Puffer (Kit)
10µL Q-Solution (Kit)
2µL 10mM dNTP
1µL Backward-Primer für C_H (10pmol/µL)
1µL Backward-Primer für C_K (10pmol/µL)
1µL Backward-Primer für C_λ (10pmol/µL)
2µL Polymerase (Kit)
7µL nukleasefreies H₂O

RT-PCR-Programm

Schritt 1	50°C	1h
Schritt 2	95°C	15min
Aufteilung des Ansatzes		
Schritt 3	94°C	1min
Schritt 4	67°C	1min
Schritt 5	72°C	1min
40 Zyklen	Schritt 5 → Schritt 3	
Schritt 6	72°C	10min
Schritt 7	4°C	ohne Zeitbegrenzung

17µL-PCR-Ansatz

16µL aus RT-Ansatz
1µL Forward-Primer für V_H, V_K oder V_λ (10pmol/µL)

2.2.7 Nachweis der RT-PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese

Je 10µL der aus der RT-PCR erhaltenen cDNA-Fragmente wurden mit 1µL Ladepuffer (enthält Bromphenol bzw. Xylenxyanol) mittels einer Gelelektrophorese der Größe nach in einem 100mL-NuSieveGTG-Agarosegel (1,5-2% in TBE) aufgetrennt. Dem Gel wurde 1µL Ethidiumbromid (1mg/mL) zugefügt. Es lagert sich in die DNA-Doppelhelix ein, fluoresziert unter UV-Licht und macht somit die Position der cDNA-Fragmente im Gel sichtbar. Bromphenol und Xylenxyanol geben einen optischen Anhaltspunkt für den Fortschritt der Elektrophorese. Außerdem wurden 7µL einer 123bp-DNA-Leiter sowie einer 1Kb-DNA-Leiter als Größenstandards im Gel mitaufgetrennt. Das Gel wurde mit TBE-Puffer bedeckt und in eine Gelkammer aus Plexiglas gegeben. Dann wurde an den Puffer ein elektrisches Feld von 80V bis 100V angelegt, wobei die (negativ geladenen) cDNA-Fragmente im Gel mit einer Geschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe zum positiven Pol (Anode) hinwandern. Nach der Gelelektrophorese wurde das im Gel enthaltene Ethidiumbromid mit UV-Licht

(302nm) angeregt und die Positionen der Banden der DNA-Leitern und der Banden der cDNA-Fragmente sichtbar gemacht, fotografiert, miteinander verglichen und somit die Größe letzterer bestimmt.

2.2.8 Reamplifikations-PCR der Immunglobulin-cDNA

Aus den Elektrophoreseansätzen, die keine sichtbaren cDNA-Banden enthielten, wurden mit Einmalskalpellen Stücke aus dem Gel in zu erwartender Position der cDNA ausgeschnitten. Diese wurden mit 200µL ddH₂O 30min bei 70°C im Heizblock unter mehrmaligem Vortexen geschmolzen und so für eine Hot-Start-Reamplifizierungs-PCR eingesetzt. Die Reamplifikations-PCR erfolgt prinzipiell ähnlich der unter 2.2.6 beschriebenen PCR, jedoch wird der Ansatz zur Aktivierung der Polymerase-Funktion anfangs 9min bei 95°C inkubiert. Der Vorteil der Hot-Start-PCR liegt in ihrer Spezifität, da durch die hohe Temperatur zur Aktivierung der Polymerase unspezifische Primerbindungen vermindert werden. Bei jeder Reamplifikations-PCR wurde ein PCR-Ansatz (Negativkontrolle) mitamplifiziert, der statt DNA die entsprechende Menge an PCR-Puffer enthält.

50µL-Reamplifikations-PCR-Ansatz (AmpliTaqGold-PCR-Kit)

5µL 10×PCR-Puffer
1µL DNA
5µL 2mM dNTP
0,4µL Forward-Primer-Mix für V_H, V_K oder V_λ (je 30pmol/µL)
0,4µL Backward-Primer für C_H, C_K oder C_λ (je 10pmol/µL)
0,25µL Polymerase
4µL MgCl₂
34µL H₂O

PCR-Programm

Schritt 1	95°C	9min
Schritt 2	94°C	1min
Schritt 3	67°C	1min
Schritt 4	72°C	1min
40 Zyklen	Schritt 4 → Schritt 2	
Schritt 5	72°C	10min
Schritt 6	4°C	ohne Zeitbegrenzung

Die Produkte der Reamplifikations-PCR wurden wie unter 2.2.7 beschrieben mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.9 DNA-Präparation aus der Gelelektrophorese

Nach der Gelelektrophorese der RT- bzw. Reamplifikations-PCR-Produkte wurden ca. 100 bis 200mg der unter UV-Licht sichtbaren Banden mit Einmalskalpellen aus dem Gel ausgeschnitten, in Eppendorfgefäße überführt und gewogen.

DNA-Präparation aus Agarosegelen mittels Jetsorb-Kit

Dazu wurden pro 100mg Gel 300µL Puffer A1 und 10µL JetSorb-Lösung zugegeben und gevortext. Dann erfolgte 15min eine Inkubation bei 50°C, während dieser Zeit wurde dies alle 3min durch leichtes Schwenken des Gefäßes gemischt. Es erfolgte dann 30s eine Zentrifugation bei 14.000rpm, der Überstand wurde verworfen, 300µL Puffer A1 zugegeben und 30s bei 14.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, 300µL Puffer A2 zugegeben und 30s bei 14.000rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen dieses Überstandes wurden 300µL Puffer A2 zugegeben und 30s bei 14.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 10min bei 50°C mit offenem Deckel des Gefäßes im Heizblock getrocknet. Schließlich wurde die DNA in 20µL ddH₂O aufgenommen und zum Lösen von der JetSorb-Matrix 5min bei 50°C im Heizblock inkubiert. Danach erfolgten zwei Waschschriffe der gelösten DNA: Sie wurde 1-2min bei 14.000rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues 0,5mL-Eppendorfgefäß überführt, erneut 1-2min bei 14.000rpm zentrifugiert und der Überstand in neues 0,5mL Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wurde bei 4°C gelagert.

DNA-Präparation aus Agarosegelen mittels QIAquick Gel Extraction Kit

Pro 100mg Gel wurden 300µL QG-Puffer zugegeben und 10min bei 50°C inkubiert, wobei alle 3min gevortext wurde. Dann wurden pro 100mg Gel 100µL Isopropanol zugegeben und gevortext. Dies wurde auf eine Säule auf einem 2mL-Gefäß gegeben, 1min bei 13.000rpm zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Daraufhin wurden 750µL PE-Puffer (mit 99% Ethanol versetzt) zugegeben, 1min bei 13.000rpm zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Es wurde ein zweites mal 1min bei 13.000rpm zentrifugiert, die Säule auf ein neues 1,5mL-Tube gestellt, 50µL H₂O zugegeben und schließlich 1min bei 13.000rpm zentrifugiert. Die DNA wurde bei 4°C gelagert.

2.2.10 Klonierung der Immunglobulin-cDNA in *E. coli*

In dieser Arbeit wurde die amplifizierte Immunglobulin-cDNA des variablen Teils der schweren bzw. leichten Immunglobulinketten FACS-sortierter CD19⁺CD20⁻CD27⁺⁺ B-Zellen von RA-Patienten teilweise direkt sequenziert (siehe 2.2.13), jedoch vorwiegend vor dem Sequenzieren kloniert. Gründe dafür lagen in der

relativ geringen Konzentration einiger cDNAs nach der RT-PCR, was eine Klonierung zur Vermehrung der DNA notwendig machte. Außerdem wurden von manchen Patienten nicht nur jeweils eine, sondern 10 Plasmazellen mit FACS sortiert - daher war durch eine Klonierung eine Vereinzelung dieser cDNAs notwendig, um sie sequenzieren zu können. Desweiteren wurden aufgrund erster Klonierungsergebnisse festgestellt, daß teilweise (im Rahmen des Gerätefehlers) nicht nur eine, sondern zwei bzw. drei Plasmazellen vom Gerät in ein Gefäß sortiert wurden, was eine Klonierung der cDNA zur Vereinzelung der cDNA erforderte. Dazu wurde die cDNA mit einem Vektorplasmid ligiert und in *E.coli*-Bakterien transformiert. Unter Transformation versteht man die Aufnahme von freier DNA (Plasmide oder Genomteilstücke) in eine Bakterien- oder eukaryotische Zelle. Der hier verwendete *E. coli*-Stamm TOPO 10F' trägt eine sogenannte M15-Deletion des *lac*-Operons, d.h. die Sequenz, welche die Aminosäuren 11-41 der β -Galaktosidase kodiert, fehlt, so daß nur noch der C-Terminus des Enzyms vorliegt (β -Peptid). β -Galaktosidase hydrolisiert normalerweise in *E. coli* das Disaccharid Laktose zu den Monosacchariden Galaktose und Glukose. Dieser *E. coli*-Stamm kann somit keine eigene funktionelle β -Galaktosidase synthetisieren, deshalb erfolgt die Anzucht auf glukosehaltigem Medium. Der hier verwendete pCR2.1-TOPO-Vektor enthält einen Polylinker (multiple cloning side) zum Einklonieren der cDNA-Fragmente. Außerdem trägt er ein Antibiotikaresistenzgen für Ampicillin. Damit wird sichergestellt, daß nur erfolgreich mit dem Vektorplasmid transformierte Bakterien auf dem Selektionsmedium, welches Ampicillin enthält, überleben. Außerdem enthält das Vektorplasmid die *lac*-regulatorische Region (Promoter, Operator), sowie einen Teil des *lacZ*-Gens, der für die N-terminalen 141 Aminosäuren des Enzyms β -Galactosidase (α -Peptid) kodiert. In dieser Sequenz befindet sich der Polylinker, der weder der Leserahmen noch die enzymatische Aktivität des α -Peptids beeinflusst. Erfolgt bei der Ligation keine Insertion des cDNA-Fragments und ist die Transformation der *E. coli* mit diesem Vektor erfolgreich, kann das β -Galaktosidase-Genfragment des Vektors das mutierte β -Galaktosidase-Gen des Bakteriums transkomplementieren, d.h. es werden in der Bakterienzelle zwei enzymatisch inaktive Polypeptide (α - und β -Peptide) synthetisiert, die sich zu einem enzymatisch aktiven Aggregat, der

funktionstüchtigen β -Galaktosidase, zusammenlagern. Als Induktor für die Reaktion wird statt Laktose IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) eingesetzt, das die Expression des *lac*-Operon erst induziert. Als Substrat für die β -Galaktosidase wird statt Galaktose X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid) verwendet. X-Gal wird durch die β -Galaktosidase in ein Indolyl-Derivat hydrolysiert, so daß eine Blaufärbung der Bakterienkolonie eintritt. Wird die cDNA jedoch erfolgreich mit dem Vektor ligiert, inseriert sie in den Polylinker und unterbricht die Sequenz, die für das α -Peptid kodiert. Damit geht die Fähigkeit des Vektors zur α -Komplementation der β -Galaktosidase verloren. Es kann also keine aktive β -Galaktosidase mehr gebildet werden, folglich kann X-Gal nicht umgesetzt werden und es tritt keine Blaufärbung der Bakterienkolonie ein - sie bleibt weiß. Somit besitzen die blauen Bakterienkolonien nur den Vektor, die weißen Bakterienkolonien jedoch den Vektor und das Insert.

Ligation der Immunglobulin-cDNA mit dem Vektor

Zuerst wurden die aus der RT-PCR und der Reamplifikations-PCR erhaltenen cDNA-Fragmente mit einem Klonierungsvektor (Plasmid) ligiert. Für die Ligation wurde der TOPO 5min PCR Cloning Kit verwendet. Die Ligation des cDNA-Fragments mit dem Vektor ist möglich, da die der RT-PCR eingesetzten Taq-Polymerase an die 3'-Enden des PCR-Produktes jeweils ein überhängendes Desoxyadenosin (A) fügt und der Vektor an den 3'-Enden jeweils ein überhängendes Desoxythymidin (T) besitzt, die an Topoisomerase I kovalent gebunden ist. Für 6 μ L Ligationsansatz wurden 0,5-4 μ L cDNA (abhängig von der DNA-Bandenstärke im Gel), 1 μ L pCR2.1-TOPO-Vektor, 1 μ L Salt Solution sowie 0-3,5 μ L H₂O eingesetzt. Dann erfolgte 5min eine Inkubation bei Raumtemperatur.

Transformation von E. coli

Da die Bakterien bei -70°C lagerten, wurden sie zuerst zum langsamen Auftauen 10min auf Eis inkubiert. Dann wurden jeweils 2 μ L aus einem Ligationsansatz zu einem Tube der kompetenten *E. coli* (One Shot Top 10F', TOPO TA cloning Kit) zugegeben und mit einer Pipettenspitze leicht verrührt. Danach erfolgte eine 30min Inkubation auf Eis. Der darauffolgende Hitzeschockschritt wurde 30s bei 42°C in einem Heizblock durchgeführt. Die Zellen wurden 2min auf Eis inkubiert

und schließlich 200µL auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium (TOPO TA cloning Kit) zugegeben. Danach wurden die Bakterien 1h bei 37°C mit 200-225rpm geschüttelt. Schließlich wurden jeweils 20-40µL bzw. 160-180µL eines Transformationsansatzes auf einer 17mL-Agarplatte ausgestrichen. Die Agarplatten wurden daraufhin über Kopf mindestens 18h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Intensivierung der Farbentwicklung erfolgte nach Bedarf bis zu 2h eine Inkubation der Agarplatten bei 4°C. Dann wurden pro Platte etwa 4 bis 6 weiße Bakterienkolonien mit 1mL-Pipettenspitzen entnommen. Diese wurden jeweils samt Pipettenspitze in 1,5mL Flüssigmedium in ein 50mL-Falkonröhrchen gegeben und mindestens 6h bei 37°C bei 200-225rpm geschüttelt.

500mL YT-Broth-Agar

9 Kapseln YT-Broth-Medium
4,5g Selekt Agar
300mL H₂O
150µL Ampicillin (100mg/mL H₂O)
700µL X-Gal (20mg/mL in Dimethylformamid)
80µL 1M IPTG

300mL YT-Broth-Flüssigmedium

6 Kapseln YT-Broth-Medium
200mL H₂O
100µL (100mg/mL in H₂O) Ampicillin

2.2.11 Plasmid-DNA-Präparation aus *E. coli*

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus den *E. coli* wurden zwei verschiedene Protokolle angewandt: die im Labor etablierte TENS-Plasmid-Minipräparation und die Präparation mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit.

TENS-Plasmid-Minipräparation

Die Bakterienflüssigkultur wurde in 1,5mL-Eppendorfgefäße überführt und 10s bei 14.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet resuspendiert. Dann wurden 300µL TENS-Lösung zugegeben, ausgiebig gevortext (nicht länger als 2min in TENS-Lösung stehen gelassen, dann auf Eis), 150µL 3M Natriumacetat (pH 5,2) zugegeben, gevortext, 5min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 900µL kaltem 99,8% Ethanol, einer 20min Inkubation bei -20°C und einer 20min Zentrifugation bei 14.000rpm. Der Überstand wurde abgegossen und der Rest der Flüssigkeit mit Zellstoff abgenommen. Zum Waschen der DNA wurden 150µL 70% Ethanol zum Pellet gegeben, gemischt und 5min bei 14.000rpm zentrifugiert. Der Überstand

abgegossen und der Rest der Flüssigkeit mit Zellstoff abgenommen. Schließlich wurde das Pellet 10min bei 50°C im Heizblock getrocknet, in 20µL RNase-haltigem H₂O resuspendiert und bei Raumtemperatur mindestens 30min zum Lösen inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde bei 4°C gelagert.

Plasmid-DNA-Präparation mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit

Hierzu wurden die Lösungen, Gefäße und Säulen des E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit laut Herstellerprotokoll verwendet. Die Bakterienflüssigkultur wurde in 1,5mL-Eppendorfgefäße überführt und 1min bei 10.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet resuspendiert. Dann wurden 250µL Lösung I (mit RNase A versetzt) zugegeben, gevortext, 250µL Lösung II zugegeben und durch Schwenken des Gefäßes gemischt, bis ein klares Lysat entstand. Daraufhin wurden 350µL Lösung III zugegeben und durch Schwenken des Gefäßes gemischt, bis ein flockiges Präzipitat entstand. Nach 8min Zentrifugation bei 10.000-14.000rpm wurde klare Überstand in eine Säule auf 2mL-Eppendorfgefäße gegeben und 1min bei 10.000rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, 500µL HB-Puffer auf die Säule gegeben und 1min bei 10.000rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, 750µL Waschpuffer (mit 99% Ethanol versetzt) auf die Säule gegeben und 1min bei 10.000rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. Schließlich wurde die Säule zum Trocknen 1min bei 14.000rpm zentrifugiert und auf ein neues 1,5mL- Eppendorfgefäß gestellt. Es wurden 50µL ddH₂O auf die Säulenmatrix gegeben und 1min bei 10.000rpm zentrifugiert. Die nun im Eppendorfgefäß befindliche Plasmid-DNA wurde bei 4°C gelagert.

2.2.12 Restriktionsverdau der Plasmide

Um sicherzustellen, daß die Plasmide das gewünschte cDNA-Insert besitzen, wurde nach der Plasmid-DNA-Präparation aus *E. coli* ein Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI durchgeführt. Dies ist möglich, da der pCR2.1-TOPO-Vektor je zwei das Insert flankierende EcoRI-Schnittstellen besitzt. Dazu wurden zu 5µL der Plasmid-DNA, 1µL EcoRI, 1µL 10×H-Puffer sowie 3µL H₂O zugegeben. Danach erfolgte 1h eine Inkubation bei 37°C im Heizblock. Die Fragmente wurden nach dem Verdau wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben mittels einer Gelelektrophorese in 1%- bis 2%-iger Agarose bei 100V bis 120V aufgetrennt.

2.2.13 Sequenzierung der Immunglobulin-cDNA

Sequenzierungs-PCR der Immunglobulin-cDNA

Jene Klone, bei denen der Restriktionsverdau und die darauffolgende Gelelektrophorese das gewünschte cDNA-Fragment in der richtigen Größe anzeigte, wurden daraufhin einer DNA-Sequenzierung basierend auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger [121], unterzogen. Eine DNA-Polymerase kann einerseits mit Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) eine fehlerfreie Kopie an einer einzelsträngigen DNA-Matrize synthetisieren; andererseits kann sie dazu auch 2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTP) verwenden. Wird nun die zu sequenzierende DNA mit dNTP und fluoreszenzmarkierten ddNTP mittels des Klenow-Fragmentes, einem Teil der DNA-Polymerase, welchem die 5'→3'-Exonucleaseaktivität fehlt, verdoppelt, werden diese Basenanaloga in die wachsende DNA-Kette eingebaut und die DNA-Synthese kommt jeweils nach Einbau eines entsprechenden ddNTP zum Erliegen, da an den 3'-Enden keine Hydroxygruppe, eine Voraussetzung für die Kettenverlängerung, vorhanden ist.

10µL-Sequenzierungs-PCR-Ansatz (Terminator Cycle Sequencing Kit)

2µL Big Dye (ddNTP, dNTP, Polymerase, Puffer, MgCl₂)
1µL -40 M13-Primer oder +40 M13-Primer (10pmol/µL)
1µL DNA
6µL H₂O

Positivkontrolle (Terminator Cycle Sequencing Kit)

4µL Big Dye
4µL -21 M13-Primer
2µL Kontroll-DNA

Sequenzierungs-PCR-Programm

Deckel auf 105°C vorheizen
Schritt 1 96°C 10s
Schritt 2 45°C 5s
Schritt 3 60°C 4min
25 Zyklen Schritt 3 → Schritt 1
Schritt 4 4°C ohne Zeitbegrenzung

Es entsteht nun eine Mischung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge, die zwar alle das gleiche 5'-Ende, aber mit hoher Wahrscheinlichkeit alle möglichen 3'-Enden besitzen, also daß insgesamt soviele unterschiedliche Fragmente vorliegen, daß, geordnet nach ihrer Größe, nach dem kleinsten jedes nächstgrößere jeweils nur ein Nukleotid länger, nämlich jeweils das bei der Synthese eingearbeitete ddNTP, ist.

Ethanol-fällung der Immunglobulin-cDNA

Nach der Sequenzierungs-PCR wurde zur Aufreinigung der DNA eine Ethanol-fällung vorgenommen. Dazu wurden pro Sequenzansatz 80µL H₂O, 10µL 3M Natriumacetat (pH 4.6) und 250µL 99,8% Ethanol zugegeben, gevortext und 20min bei 14.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 350µL 70% Ethanol zugegeben, gevortext und 10min bei 14.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde 10min bei 50°C im Heizblock getrocknet und 20µL TSR (Template Suppression Reagent) oder ddH₂O zugegeben, gevortext und direkt vor der Sequenzierung kurz herunterzentrifugiert.

Sequenzierung der Immunglobulin-cDNA

Zur automatisierten Sequenzierung wurde ein ABI Prism Sequencer verwendet, welcher mit POP6-Polymer beladen wurde. Die Injektionszeiten (10-50s) wurden je nach DNA-Menge, und die Laufzeiten (25-40min) je nach Größe des zu sequenzierenden DNA-Fragments gewählt. Die PCR-Produkte werden hierbei auf ein Gel aufgezogen und wandern wie bei einer Gelelektrophorese ihrer Größe nach in einem elektrischen Feld. Dabei mißt das Gerät mittels Detektoren die Fluoreszenz der vorbeiwandernden DNA-Fragmente und stellt diese Abfolge der jeweils letzten ddNTP graphisch in einem Elektropherogramm dar.

Auswertung der Immunglobulin-cDNA-Sequenzen

Die erhaltenen Elektropherogramme bzw. cDNA-Sequenzen wurden mit ABI Prism-Software manuell auf offensichtliche Fehler bei der Interpretation durch die Software kontrolliert und gegebenenfalls verbessert. Dann wurden die Sequenzen mit Hilfe der DNA Strider-Software bearbeitet (z.B. in 5'-3'-„sense“-Richtung umgekehrt) und mit Hilfe der V-Base-Datenbank [2] mit Keimbahngenen unter Einhaltung der Kabat-Nomenklatur verglichen [122]. Die Keimbahngene mit der höchsten Homologie wurden als Referenz zur Ermittlung der V-(D-)J-Rearrangierungen und der somatischen Mutationen in den untersuchten Sequenzen verwendet.

2.2.14 RT-PCR zum Nachweis der mRNA sezernierter Immunglobuline peripherer Plasmazellen

Um nachzuweisen, daß es sich bei den FACS sortierten CD20⁻CD27⁺⁺ B-Zellen der RA-Patienten um Antikörper sezernierende Zellen (Plasmazellen) handelt, wurde deren mRNA auf das Vorhandensein der mRNA für sezerniertes und membranständiges Immunglobulin untersucht, hierbei beispielhaft für IgG. Die Produktion von membranständigem und sezerniertem Immunglobulin wird durch alternatives Spleißen der Ig-mRNA reguliert. Die IgG-DNA enthält nach dem CH₃-Exon der konstanten Region u.a. ein Exon für das Polyadenylisierungssignal und den hydrophilen COOH-Terminus des sezernierten Immunglobulins, eine untranslatierte Region (UT), zwei Exons für die hydrophobe Transmembrandomäne (M1 und M2) sowie eine weitere untranslatierte Region (UT'). Endet die Transkription nach UT, entsteht die sezernierte Form des Immunglobulins. Endet die Transkription jedoch nach UT', wird das erste Exon und UT aus der mRNA herausgespleißt, die mRNA einschließlich der Membran-Exons (M1 und M2) translatiert und somit entsteht die membranständige Form des Immunglobulins [123] [124].

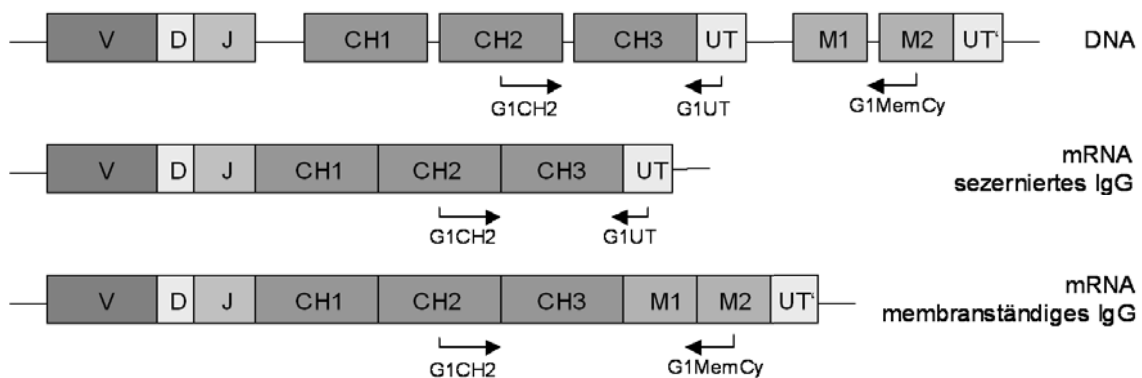


Abb. 9: Bindungsstellen (Pfeile) der Primer (G1CH2, G1UT und G1MemCy) in der C_γ-mRNA für eine RT-PCR zum Nachweis membranständigen und sezerniertem IgG.

Es wurden jeweils einzelne und zehn Plasmazellen sowie als Kontrolle einzelne, zehn und einhundert Gedächtnis-B-Zellen mittels FACS sortiert. Deren Ig-mRNA wurde daraufhin in einer RT-PCR (siehe 2.2.6) in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Dazu wurden Primer verwendet, die im IgG-CH₂-Exon (Forward-Primer G1CH2), in UT (Backward-Primer G1UT) und im M2-Exon (Backward-

Primer G1MemCy) binden. Besitzt eine B-Zelle mRNA für die sezernierte Form von IgG₁, wird mittels der RT-PCR das kürzere cDNA-Stück von CH₂ bis zu UT (459bp) synthetisiert.

50µL-RT-PCR-Ansatz (OneStep RT-PCR-Kit)	RT-PCR-Programm
20µL FACS-sortierte Zelle(n)	Schritt 1 50°C 1h
6µL 5×RT-PCR-Puffer (OneStep RT-PCR-Kit)	Schritt 2 95°C 15min
10µL Q-Solution (OneStep RT-PCR-Kit)	Schritt 3 94°C 1min
2µL 10mM dNTP	Schritt 4 67°C 1min
1µL G1CH2-Primer (30pmol/µL)	Schritt 5 72°C 1min
1µL G1MemCy-Primer (30pmol/µL)	40 Zyklen Schritt 5 → Schritt 3
1µL G1UT-Primer (30pmol/µL)	Schritt 6 72°C 10min
2µL Polymerase (OneStep RT-PCR-Kit)	Schritt 7 4°C ohne Zeitbegrenzung
7µL nukleasefreies H ₂ O	

Besitzt eine B-Zelle mRNA für die membranständige Form von IgG₁, wird mittels der RT-PCR das längere cDNA-Stück von CH₂ bis zu M2 (570bp) synthetisiert (Abb. 9). Die RT-PCR-Produkte wurden wie unter 2.2.7 beschrieben mittels einer Gelelektrophorese in 1%- bis 2%-iger Agarose bei 100V bis 120V aufgetrennt.

2.2.15 Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS-Software. Der Kruskal-Wallis-Test wurde verwendet, um jeweils mehrere Gruppen auf signifikante Unterschiede in einer bestimmten Variable zu testen. Der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test wurde verwendet, um jeweils zwei Gruppen auf signifikante Unterschiede in einer bestimmten Variable zu testen. Es wurden Unterschiede als signifikant gewertet, wenn eine asymptotische Signifikanz von $p < 0,05$ vorliegt. Der Zusammenhang zwischen zwei Variablen wurde mittels des zweiseitigen Pearson- und Spearman-Tests überprüft. Ergebnisse beider Tests wurden bei einem Korrelationskoeffizienten r_p bzw. $r_s < 0,2$ als keine, 0,2-0,5 als geringe, 0,5-0,7 als mittlere und $> 0,7$ als hohe Korrelation gewertet [125].

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten

3.1.1 Charakterisierung der peripheren B-Zellpopulationen

Für die Charakterisierung der peripheren B-Zellen und deren Subpopulationen wurden aus dem Blut von 98 RA-Patienten und 17 gesunden Kontrollpersonen periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) isoliert, mit Antikörpern für CD19, CD20 und CD27 bzw. für CD19, CD38 und CD27 gefärbt und mittels Durchflußzytometrie (FACS) analysiert. Im Bereich R1 des Vorwärtsstreulicht/Seitwärtsstreulicht-Punkte-Diagramm sind die Lymphozyten dargestellt. Ruhende Lymphozyten stellen sich in diesem Diagramm klein und wenig granulär dar. Jedoch erscheint bei den RA-Patienten zusätzlich eine große und granuläre Zellpopulation (Bereich R1, Abb. 10a), welche Plasmazellen zu repräsentieren scheinen [49] und somit in die Analyse eingeschlossen wurden. Im CD19/Probidiumiodid(PI)-Punkte-Diagramm ist der Bereich der CD19⁺PI⁻ Zellen markiert (Bereich R2, Abb. 10b). Durch die PI-Färbung konnten tote PI⁺ Zellen aus der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Die CD19-Expression diente als Charakterisierungsmerkmal für die B-Zellen. CD19 ist Teil des Korezeptors von B-Zellen und spielt bei der B-Zell-Entwicklung, -Aktivierung und -Differenzierung durch Signaltransduktion bei der Regulation intrinsischer und B-Zell-Rezeptor-induzierter Signale eine Rolle. CD19 wird als erster B-Zell-spezifischer Differenzierungsmarker bereits auf Pro-B-Zellen im Knochenmark, während aller peripheren B-Zellstadien und auf Plasmazellen im Knochenmark exprimiert [126] [127] [128] [129] [130]. Im CD20/CD27- bzw. CD38/CD27-Punkte-Diagramm erscheinen drei B-Zell-Subpopulationen (Abb. 10c,d): CD27⁻ (Bereich R3), CD27⁺ (Bereich R4) und CD27⁺⁺ (Bereich R5) B-Zellen. CD27 vermittelt für B-Zellen bei der Interaktion mit CD70 (auf T-Zellen) kostimulatorische Signale, reguliert deren Aktivierung, Immunglobulin-Synthese bzw. Differenzierung zu Plasmazellen [131] [132] [133] [134] [135]. Es wurde gezeigt, daß nur antigenerfahrene B-Zellen, die somatische Hypermutationen in der variablen Region der Immunglobulingene

aufweisen, CD27 tragen [136] [137] [138] [139], wobei Plasmazellen mehr CD27-Moleküle als Gedächtnis-B-Zellen auf ihrer Oberfläche exprimieren [140]. Daher ist davon auszugehen, daß die in dieser Arbeit durchflußzytometrisch ermittelten CD27-differentiell exprimierenden B-Zell-Subpopulation naive B-Zellen (CD27⁻), Gedächtnis-B-Zellen (CD27⁺) und Plasmazellen (CD27⁺⁺) darstellen.

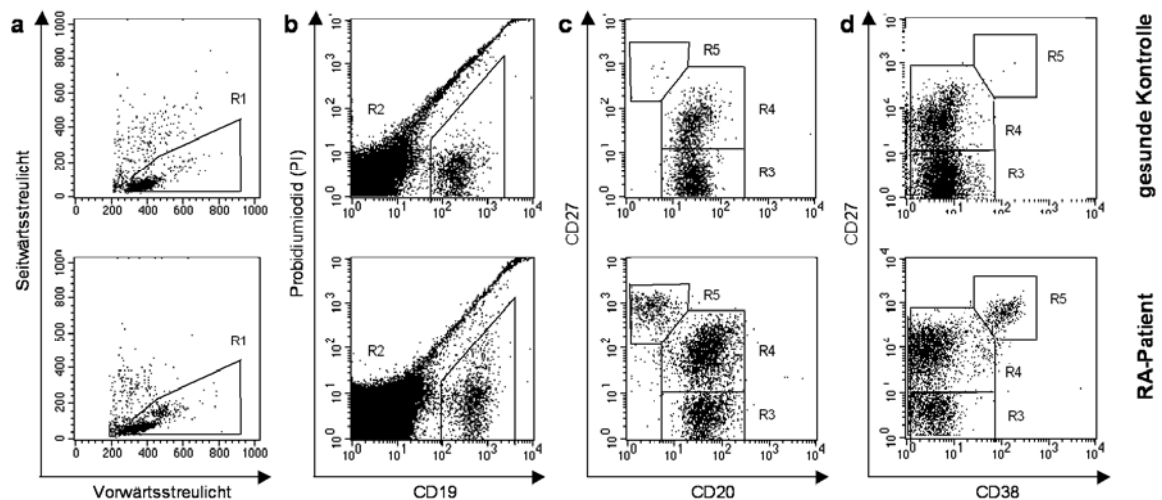


Abb. 10: Repräsentative FACS-Analyse für CD19, CD20, CD38 und CD27 gefärbter PBMC einer gesunden Kontrollperson (oben) und eines RA-Patienten (unten). Es sind a) Lymphozyten (Bereich R1) im Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht-Punkte-Diagramm, b) CD19⁺PI⁻ lebende B-Zellen (Bereich R2) im CD19/Propidiumiodid-Punkte-Diagramm sowie im c) CD20/CD27- bzw. im d) CD38/CD27-Punkte-Diagramm CD20⁺CD38⁻CD27⁻ naive B-Zellen (Bereich R3), CD20⁺CD38⁻CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen (Bereich R4) und CD20⁻CD38⁺CD27⁺⁺ Plasmazellen (Bereich R5) dargestellt.

Im CD20/CD27- bzw. CD38/CD27-Punkte-Diagramm (Abb. 10c,d) ist außerdem ersichtlich, daß die einzelnen CD27-differentiell exprimierenden B-Zell-Subpopulationen Unterschiede in ihrer CD20- sowie CD38-Expression aufweisen. Während die naiven (CD27⁻) und Gedächtnis- (CD27⁺) B-Zellen CD20, jedoch kein CD38 exprimieren (Bereiche R3 und R4), ist hingegen auf Plasmazellen (CD27⁺⁺) kein CD20, jedoch CD38 zu finden (Bereich R5). Im Vergleich der beiden Dreifachfärbungen für CD19/CD20/CD27 und CD19/CD38/CD27 zeigen die einzelnen B-Zell-Subpopulationen keine erheblichen Unterschiede in ihrer Frequenz (Abb. 10c,d). CD20 ist auf B-Zellen aller Stadien, jedoch nicht auf Antikörper sezernierenden B-Zellen bzw. Plasmazellen zu finden und scheint grundlegend an der Regulation der B-Zell-Aktivierung beteiligt zu sein [130] [141] [142] [143] [144] [145]. CD38 wird auf Keimzentrums-B-Zellen und auf

Plasmazellen exprimiert [130] [145] [56] [146] [147]. Jung et al. konnten eine Korrelation zwischen der CD38- und CD27-Expression auf verschiedenen Differenzungsstadien von Keimzentrums-B-Zellen nachweisen [140]. Die Expression von CD20 und CD38 auf den in dieser Arbeit durchflußzytometrisch charakterisierten B-Zell-Subpopulationen bestätigt somit deren Einteilung aufgrund ihrer CD27-Expression und sie können somit als CD27⁻CD20⁺CD38⁻ naive, CD27⁺CD20⁺CD38⁻ Gedächtnis- und CD27⁺⁺CD20⁻CD38⁺ Plasmazellen charakterisiert werden.

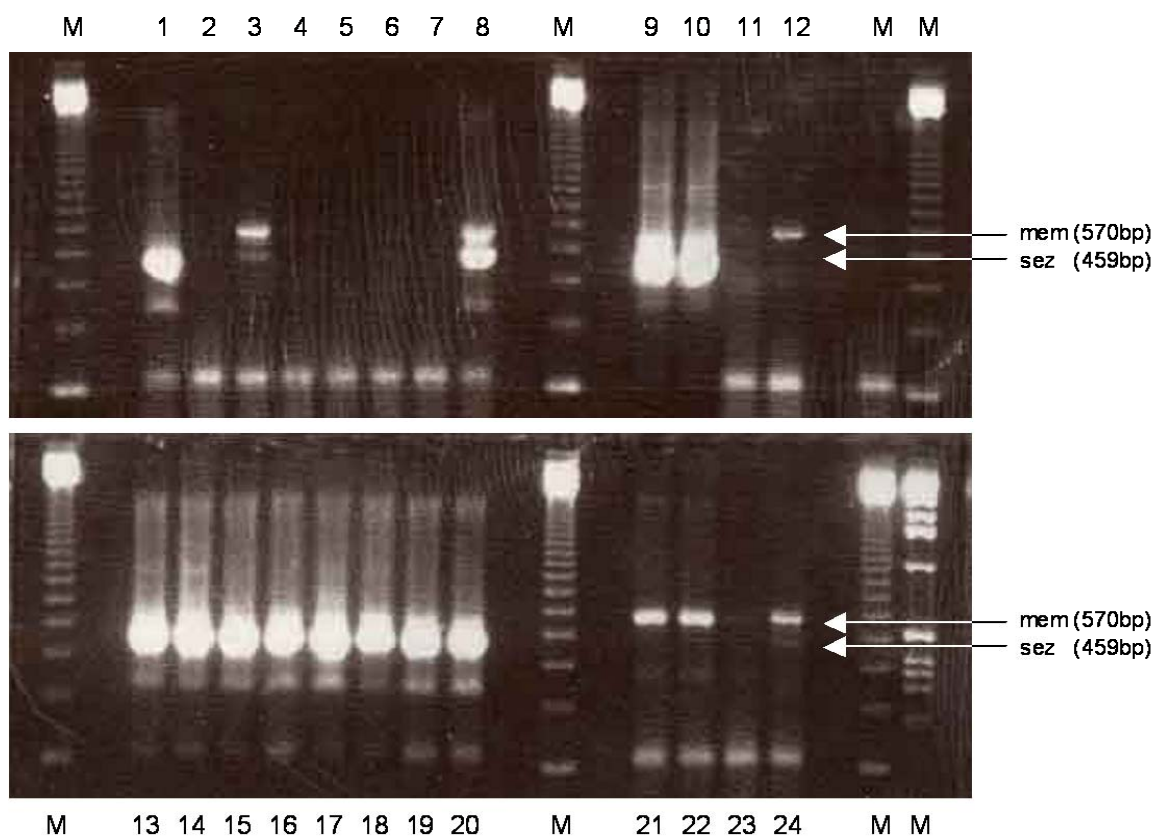


Abb. 11: Gelelektrophorese zum Nachweis der cDNA für membranständiges (mem) und sezerniertes (sez) IgG in peripheren Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen von RA-Patienten. M: 123bp-DNA-Leiter. Spalten 1 – 8: cDNA je einer Plasmazelle. Spalten 9 – 10 und 13 – 20: cDNA von je zehn Plasmazellen. Spalten 11 und 23: cDNA von je einer Gedächtnis-B-Zelle. Spalten 12 und 24: cDNA von je zehn Gedächtnis-B-Zellen. Spalten 21 – 22: cDNA von je einhundert Gedächtnis-B-Zellen.

Um zu bestärken, daß es sich bei den CD20⁻CD27⁺⁺ B-Zellen der RA-Patienten um Antikörper sezernierende Plasmazellen handelt, wurden von einem RA-Patienten jeweils einzelne und zehn CD20⁻CD27⁺⁺ B-Zellen sowie einzelne, zehn und einhundert Gedächtnis-B-Zellen mittels FACS sortiert und auf das

Vorhandensein der mRNA für sezernierte und membranständige Immunglobuline geprüft. Dazu wurde die Ig-mRNA dieser Zellen mittels spezifischer Primer für die sezernierte und membranständige Form von IgG in einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Besitzt eine B-Zelle mRNA für die sezernierte Form von IgG, wird mittels der RT-PCR das kürzere cDNA-Stück (459bp) synthetisiert. Besitzt eine B-Zelle mRNA für die membranständige Form von IgG, wird mittels der RT-PCR das längere cDNA-Stück (570bp) synthetisiert. Die Gedächtnis-B-Zellen weisen mRNA für ausschließlich membranständiges IgG auf (Spalten 11,12 und 21-24), die Plasmazellen weisen entweder mRNA für sezerniertes IgG (Spalte 1) oder mRNA für sezerniertes wie auch membranständiges IgG auf (Spalten 3 und 8, Abb. 20). Somit ist beispielhaft für IgG nachgewiesen, daß es sich bei den CD20⁻CD27⁺⁺-B-Zellen um die sezernierte Form von Immunglobulin-mRNA produzierende B-Zellen und somit um Plasmazellen handelt.

3.1.2 Veränderte Anzahl und Frequenz der peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten

Die Anzahl und Frequenz der B-Zellpopulationen der untersuchten RA-Patienten wurde mit der Anzahl und Frequenz der B-Zellpopulationen gesunder Kontrollpersonen verglichen. Die Anzahl der B-Zellen (Abb. 11a) und ihrer Subpopulationen - naive (Abb. 11c), Gedächtnis- (Abb. 11e) und Plasmazellen (Abb. 11g) - ist bei den RA-Patienten gegenüber gesunden Kontrollpersonen stark erniedrigt, wobei nur wenige der Patienten normale Werte erreichen. Die Frequenz der B-Zellen ist bei den RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nur gering erniedrigt (Abb. 11b) und streuen über einen fast ebenso großen Wertebereich wie die Kontrollen. Die Frequenz der naiven und Gedächtnis-B-Zellen ist unverändert (Abb. 11d,f). Die Frequenz der Plasmazellen ist jedoch gegenüber den gesunden Kontrollpersonen stark erhöht (Abb. 11h). Während letztere einen Maximalwert von 2,5% an Plasmazellen erreichen, weist die Mehrheit der RA-Patienten eine Plasmazellfrequenz darüber auf, was sich bereits in der FACS-Analyse deutlich zeigte (Abb. 10c,d). Somit ist eine starke Erniedrigung der Zahl aller B-Zellpopulationen und eine starke Erhöhung der Frequenz der Plasmazellen der Patienten festzustellen.

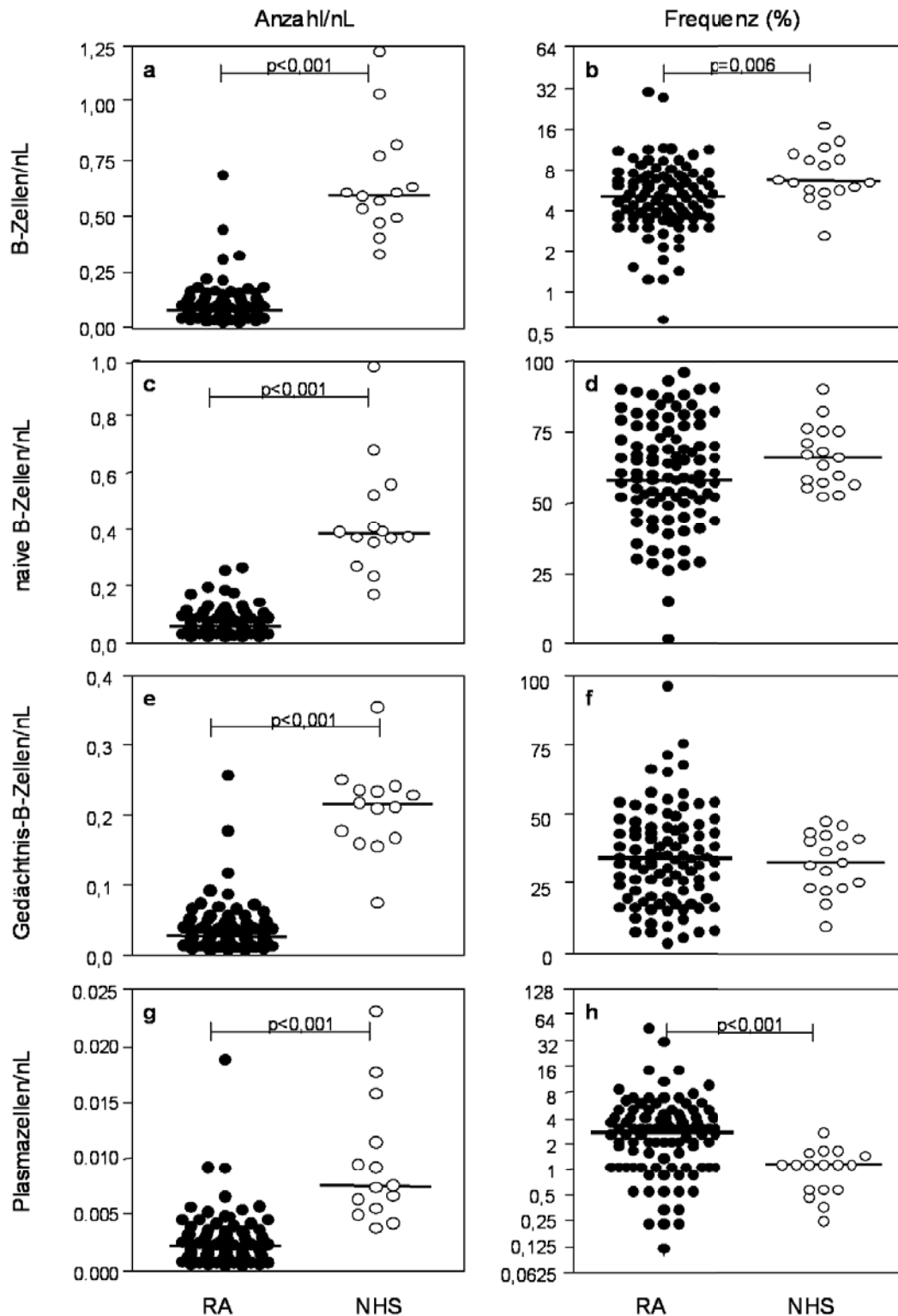


Abb. 11: Veränderte periphere B-Zellpopulationen der RA-Patienten. Dargestellt ist die Anzahl (links) und Frequenz (rechts) der B-Zellen (a,b), naiven B-Zellen (c,d), Gedächtnis-B-Zellen (e,f) und Plasmazellen (g,h) der RA-Patienten (RA) und gesunden Kontrollpersonen (NHS). Die Anzahl der B-Zellen von gesunden Kontrollpersonen wurden in mit in dieser Arbeit verwendeten vergleichbaren FACS-Analyse ermittelt (AG „Autoimmunologie“, Charite Berlin). Jeder Punkt stellt den Median der einzelnen Meßwerte einer Person dar. Die horizontale Linie repräsentiert jeweils den Median. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet.

3.1.3 Ausschluß eines Einflusses des Geschlechts auf die veränderten peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten

Von den 98 untersuchten RA-Patienten sind 76,5% Frauen und 23,5% Männer. Bei den RA-Patienten ist somit das Verhältnis von Frauen zu Männern etwa 3:1, dieses Verhältnis entspricht der bestehenden 3-fach höheren Inzidenz für RA bei Frauen im Vergleich zu Männern [148]. Es besteht die Frage, ob die durchflußzytometrisch nachgewiesenen Veränderungen der Anzahl und Frequenz der B-Zellen und deren Subpopulationen bei untersuchten Patienten nicht auf die Erkrankung allein, sondern auf geschlechtsspezifische Unterschiede zurückzuführen sind. Deshalb wurden die männlichen mit den weiblichen RA-Patienten mittels des Mann-Whitney-Tests auf signifikante Unterschiede bezüglich der B-Zellpopulationen verglichen, in denen bei den RA-Patienten Unterschiede zu gesunden Kontrollpersonen nachweisbar sind. Es kann in der Anzahl und Frequenz der B-Zellen, der Anzahl naiver B-Zellen, der Anzahl der Gedächtnis-B-Zellen sowie der Anzahl und Frequenz der Antikörper sezernierende B-Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Patienten festgestellt werden. Somit ist ein Einfluß des Geschlechts der untersuchten RA-Patienten auf die im Vergleich zu gesunden Kontrollen veränderten Werte der B-Zellen und deren Subpopulationen auszuschließen.

3.1.4 Ausschluß eines Einflusses des Alters auf die veränderten peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten

Das Alter der untersuchten RA-Patienten beträgt im Median 52 Jahre, das Alter der gesunden Kontrollpersonen ist geringer, es beträgt im Median 34,5 Jahre. Die RA-Patienten besitzen somit ein höheres Alter als die gesunden Kontrollpersonen. Es besteht deshalb die Frage, ob die durchflußzytometrisch ermittelten Veränderungen der B-Zellen und deren Subpopulationen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nicht auf die Erkrankung allein, sondern auf altersbedingte Veränderungen dieser Zellpopulationen zurückzuführen ist. Im folgenden soll mittels dem Spearman- und Pearson-Test deshalb überprüft werden, ob zwischen dem Alter und den B-Zellen und deren Subpopulationen ein Zusammenhang existiert. Es besteht zwischen dem Alter und der Anzahl ($r_s = -0,318$) bzw. Frequenz ($r_s = -0,245$) der B-Zellen eine schwache negative Korrelation

(Abb. 12a,b). Es besteht außerdem zwischen dem Alter und der Anzahl der naiven B-Zellen ($r_p=-0,298$, $r_s=-0,312$, Abb. 12c), der Anzahl der Gedächtnis-B-Zellen ($r_s=-0,259$, Abb. 12d) sowie der Anzahl der Plasmazellen ($r_s=-0,218$, Abb. 12e) eine schwache negative Korrelation. Somit besteht bei denjenigen B-Zellen und deren Subpopulationen, in denen eine Verringerung in Anzahl und Frequenz zu gesunden Personen festgestellt wurde, eine negative Korrelation zum Alter.

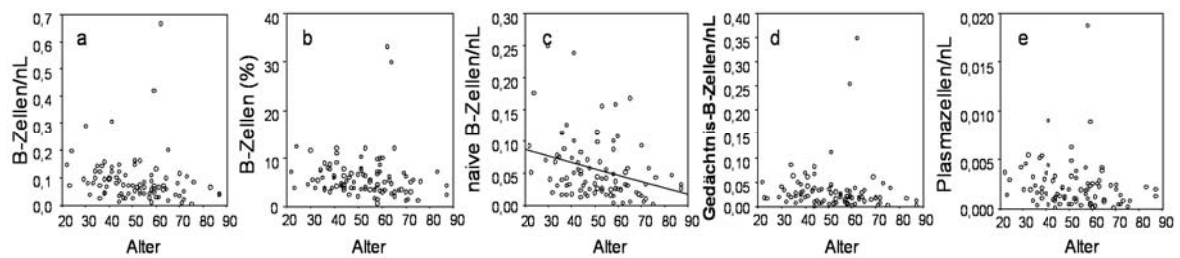


Abb. 12: Zusammenhang zwischen dem Alter und peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten. Dargestellt ist a) die Anzahl der B-Zellen, b) die Frequenz der B-Zellen, c) die Anzahl der naiven B-Zellen, d) die Anzahl der Gedächtnis-B-Zellen und e) die Anzahl Plasmazellen in Korrelation zum Alter der Patienten. Bei nachgewiesener Pearson-Korrelation ist die Regressionsgerade dargestellt.

Um zu klären, ob der Zusammenhang zwischen Alter und Zellzahl bzw. -frequenz diese Unterschiede zu Gesunden hervorzurufen vermag, wurden die RA-Patienten bezüglich ihres Alters in zwei Gruppen unterteilt: Gruppe 1: Alter bis einschließlich 40 Jahre, Gruppe 2: Alter 41 Jahre und höher. Das Alter der jüngeren, in Gruppe 1 zusammengefaßten Patienten beträgt im Median 33,8 Jahre und ist damit dem Altersmedian der untersuchten gesunden Kontrollpersonen vergleichbar. Die jüngeren wurde mit der älteren Patientengruppe mittels des Mann-Whitney-Tests bezüglich der B-Zellpopulationen verglichen, die bei den RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen Veränderungen aufweisen. Es besteht zwischen jüngeren und älteren RA-Patienten kein signifikanter Unterschied in der Frequenz der B-Zellen, der Anzahl naiver und Gedächtnis-B-Zellen sowie in der Frequenz der Plasmazellen. Jedoch weisen die jüngeren Patienten eine schwach signifikant höhere Anzahl an B-Zellen ($p=0,034$) und Plasmazellen ($p=0,048$) als die älteren Patienten auf. Bei den jüngeren Patienten ist die Anzahl dieser beiden Zellpopulationen dennoch hochsignifikant geringer ist als bei gesunden Kontrollpersonen ($p<0,001$, Abb. 13). Die altersbedingten Unterschiede sind somit

zu gering, um die starke Erniedrigung dieser beiden Zellpopulationen bei den RA-Patienten insgesamt gegenüber gesunden Kontrollpersonen erklären zu können. Es kann somit geschlußfolgert werden, daß die Veränderungen der Anzahl und Frequenz der B-Zellen und deren Subpopulationen im Vergleich zu gesunden Kontrollen nicht auf das hohe Alter der Patienten zurückzuführen ist.

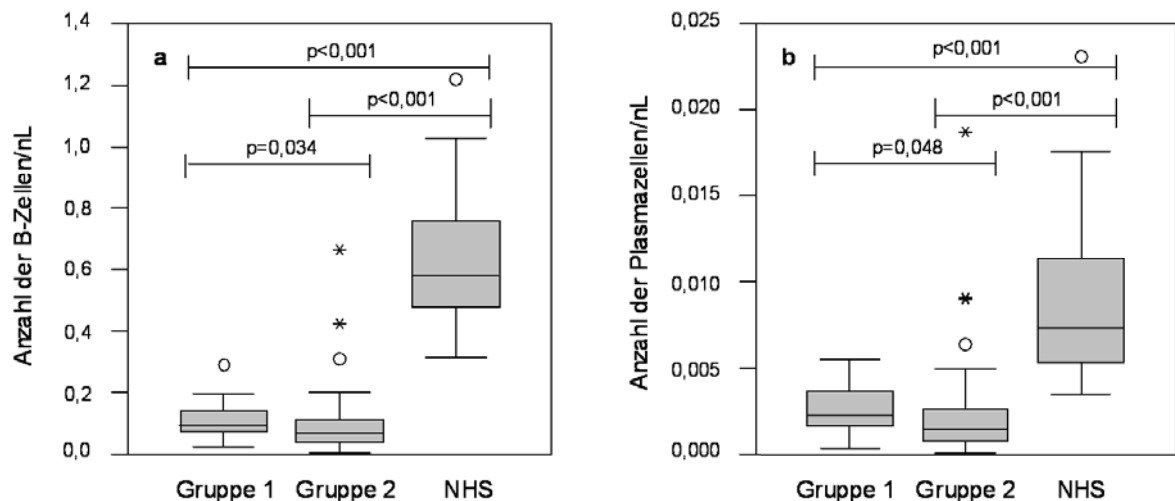


Abb. 13: Zusammenhang zwischen dem Alter und peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten. Dargestellt ist a) die Anzahl der B-Zellen/nL und b) die Anzahl Plasmazellen/nL jüngerer RA-Patienten (Gruppe 1), älterer RA-Patienten (Gruppe 2) sowie gesunder Kontrollpersonen (NHS, ermittelt durch die AG „Autoimmunologie“ der Charite Berlin). Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet. Punkte und Sternchen illustrieren Ausreißer.

3.1.5 Ausschluß eines Einflusses der Krankheitsdauer auf die veränderten peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten

Es wurde untersucht, ob zwischen der Krankheitsdauer und den im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen veränderten der B-Zellen und der B-Zell-Subpopulationen der RA-Patienten ein Zusammenhang besteht. Zwischen männlichen und weiblichen bzw. jüngeren und älteren Patienten besteht kein Unterschied in ihrer Krankheitsdauer. Zwischen der Krankheitsdauer und der Anzahl bzw. Frequenz der B-Zellen sowie in der Anzahl der naiven wie auch der Gedächtnis-B-Zellen besteht keine Korrelation. Daher ist auszuschließen, daß die Unterschiede in Anzahl und Frequenz der B-Zellen sowie der Anzahl der naiven und der Gedächtnis-B-Zellen der RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen durch die Krankheitsdauer vermittelt werden bzw. überhaupt eine allein krankheitsdauerbedingte Veränderung dieser Zellpopulationen besteht. Jedoch

besteht zwischen der Krankheitsdauer und der Anzahl ($r_p=0,307$) bzw. Frequenz ($r_p=0,291$) an Plasmazellen eine geringe Korrelation (Abb. 14). Da die Anzahl der Plasmazellen sich somit mit zunehmender Krankheitsdauer erhöht, kann die Krankheitsdauer nicht als Ursache für die Erniedrigung der Plasmazellzahl der RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen herangezogen werden. Ein Einfluß der Krankheitsdauer auf die erhöhte Frequenz der Plasmazellen im Vergleich zu gesunden Personen ist jedoch nicht auszuschließen.

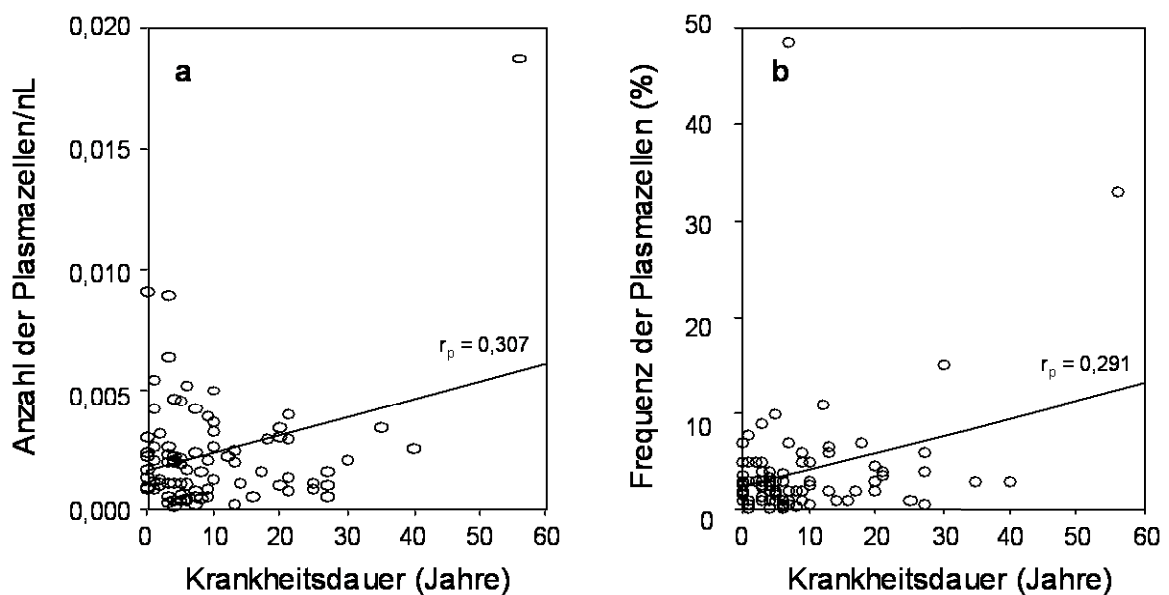


Abb. 14: Zusammenhang zwischen Krankheitsdauer und Plasmazellen der RA-Patienten. Dargestellt ist a) die Anzahl und b) die Frequenz der Plasmazellen in Korrelation zur Krankheitsdauer. Über der Regressionsgerade ist jeweils der Korrelationskoeffizient (r_p) dargestellt.

3.1.6 Ausschluß eines Einflusses der Therapie auf die veränderten peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten

Der Großteil der untersuchten RA-Patienten befand sich zum Zeitpunkt der Blutabnahme in medikamentöser Behandlung mit Basistherapeutika oft in Kombination mit nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR/NSAID) und Kortikoiden. Um den Einfluß der Therapie auf die B-Zellen und die B-Zell-Subpopulationen zu untersuchen, wurden die RA-Patienten in zwei Gruppen – ohne Basistherapie (völlig unbehandelt, temporär unbehandelt, NSAR/NSAID oder Kortikoide) und mit Basistherapie eingeteilt. Zuerst wurde ermittelt, ob signifikante Unterschiede in den Aktivitätsmarkern zwischen nichtbasistherapierten und basistherapierten RA-

Patienten nachweisbar sind. Die basistherapierten weisen gegenüber den nichtbasistherapierten RA-Patienten signifikant erniedrigte Werte der Blutsenkgeschwindigkeit ($p < 0,001$), des C-reaktiven Proteins ($p = 0,018$) sowie der Anzahl schmerzhafter ($p = 0,016$) und geschwollener ($p = 0,004$) Gelenke auf (Abb. 15), was den positiven Effekt der Therapie verdeutlicht.

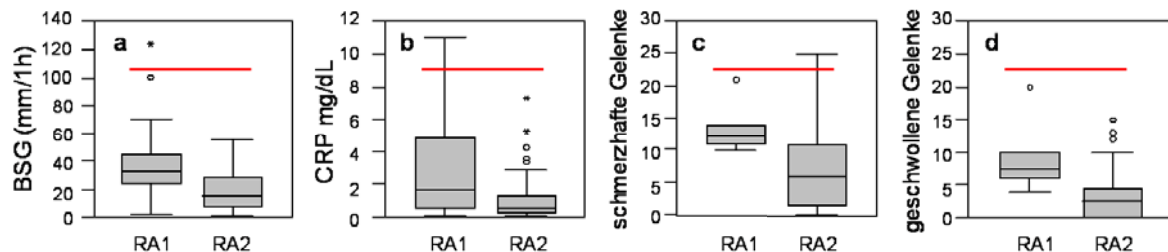


Abb. 15: Zusammenhang zwischen Therapie und Aktivitätsmarkern der RA-Patienten. Dargestellt sind a) Blutsenkgeschwindigkeit (BSG) b) C-reaktives Protein (CPR) c) Anzahl schmerzhafter Gelenke d) Anzahl geschwollener Gelenke von RA-Patienten ohne (RA1) und mit (RA2) Basistherapie. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind gekennzeichnet. Punkte und Sternchen illustrieren Ausreißer.

Es eröffnet sich nun die Frage, ob eine Therapie gleichermaßen wie auf die Entzündungsmarker auch auf die B-Zellen und deren Subpopulationen einen Einfluß besitzt. Beide Patientengruppen sowie gesunde Kontrollpersonen wurden daher auf Unterschiede bezüglich ihrer B-Zellen sowie den B-Zell-Subpopulationen analysiert. Die beiden Patientengruppen weisen in Bezug auf Geschlecht und Alter keine Unterschiede auf. Die zwischen den RA-Patienten und gesunden Kontrollpersonen bestehenden Unterschiede der B-Zellpopulationen bleiben auch bei dieser Untereinteilung der Patienten bestehen. So ist die Anzahl der B-Zellen, der naiven und Antikörper sezernierenden B-Zellen bei unbehandelten aber auch behandelten RA-Patienten erniedrigt (Abb. 16a,b,d), die Frequenz der Plasmazellen jedoch bei beiden Gruppen erhöht (Abb. 16h), wobei zwischen den nichtbasistherapierten und basistherapierten RA-Patienten keine signifikanten Unterschiede bezüglich dieser Werte bestehen. Die bei den RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen bestehende Verringerung der Frequenz der B-Zellen existiert nur bei den basistherapierten RA-Patienten (Abb. 16e), während die nichtbasistherapierten Patienten normale B-Zellzahlen aufweisen. Daraus läßt sich ein B-Zellfrequenz-erniedrigender Effekt der Therapie schließen. Die basistherapierten RA-Patienten weisen zwar eine höhere Anzahl an

Gedächtnis-B-Zellen ($p=0,047$) als die nichtbasistherapierten Patienten auf, jedoch sind beide Patientengruppen mit ihrer Anzahl an Gedächtnis-B-Zellen gegenüber Kontrollwerten erniedrigt (Abb. 16c). Hier ist somit ein geringer normalisierender Effekt der Therapie auf die Zahl der Gedächtnis-B-Zellen erkennbar. Auch jene Parameter, die bei den RA-Patienten zu den Kontrollpersonen unverändert sind, bleiben bei unbehandelten und behandelten Patienten gleichermaßen zu Kontrollwerten unverändert, so die Frequenz der Gedächtnis- und der naiven B-Zellen (Abb. 16g,f). Bei letzterer bestehen lediglich zwischen beiden Patientengruppen Unterschiede: die basistherapierten RA-Patienten weisen eine niedrigere Frequenz an naiven B-Zellen ($p=0,033$) als die nichtbasistherapierten Patienten auf (Abb. 16f), was einen die Frequenz der naiven B-Zellen erniedrigenden Effekt der Therapie erkennen läßt. Es ist somit zu schlußfolgern, daß eine Therapie an sich keine Normalisierung der veränderten Anzahl und Frequenz der B-Zellen und deren Subpopulationen der RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen bewirkt, jedoch für die erniedrigte B-Zellfrequenz verantwortlich gemacht werden kann.

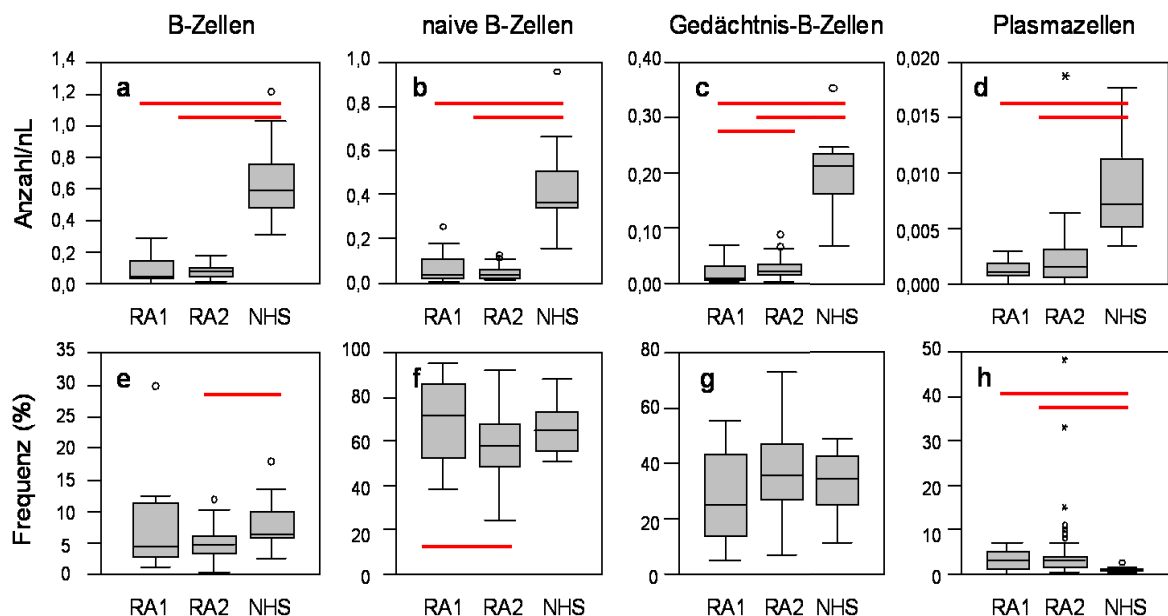


Abb. 16: Zusammenhang zwischen Therapie und peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten. Dargestellt sind Anzahl (oben) und Frequenz (unten) der B-Zellen (a,e), naiven B-Zellen (b,f), Gedächtnis-B-Zellen (c,g) und Plasmazellen (d,h) bei RA-Patienten ohne (RA1) und mit (RA2) Basistherapie sowie gesunden Kontrollpersonen (NHS). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind rot gekennzeichnet. Punkte und Sternchen illustrieren Ausreißer.

Im folgenden soll daher untersucht werden, ob die Art der Basistherapie einen Einfluß auf die B-Zellen und deren Subpopulationen besitzt. Dazu wurden die untersuchten RA-Patienten bezüglich ihrer Basistherapie 6 Gruppen (1. ohne Basistherapie [völlig unbehandelt, temporär unbehandelt, NSAR/NSAID oder Kortikoide], 2.-5. Basistherapie mit „Biologicals“ {2. mit humanisierten anti-TNF- α -Antikörpern [D2E7], 3. mit chimären anti-TNF- α -Antikörpern [Remicade], 4. mit löslichen TNF- α -Rezeptoren [Enbrel], 5. mit IL-1-Rezeptorantagonisten}, 6. Basistherapie ohne „Biologicals“ [MTX, Azulfidine, Gold, Imurek]) zugeordnet und auf Unterschiede in ihren Krankheitsaktivitätsmarkern sowie B-Zell-Werten untersucht. Die einzelnen Therapiegruppen weisen im Geschlecht und Alter keine Unterschiede auf. Ebenso sind keine signifikanten Unterschiede bezüglich der meisten Krankheitsaktivitätsmarker festzustellen, was den einheitlich positiven Effekt der Basistherapie, unabhängig von ihrer Art, belegt. Lediglich in der Blutsenkgeschwindigkeit und der Anzahl geschwollener Gelenke existieren Unterschiede zwischen den Therapiegruppen, wobei auffällt, daß nur die Basistherapie mit „Biologicals“ diese Werte im Vergleich zu nichtbasistherapierten Patienten signifikant zu senken vermag (Abb. 17).

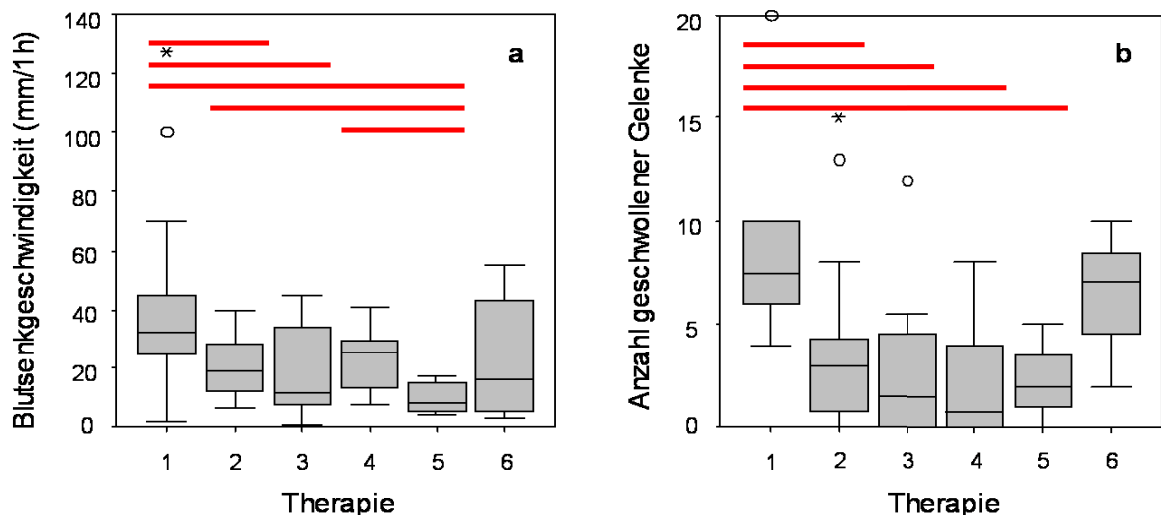


Abb. 17: Zusammenhang zwischen Therapieart und Aktivitätsmarkern der RA-Patienten. Dargestellt ist a) die Blutsenkgeschwindigkeit und b) die Anzahl geschwollener Gelenke verschiedener Therapiegruppen (1. ohne Basistherapie, 2. Basistherapie mit humanisierten anti-TNF- α -Antikörpern, 3. Basistherapie mit chimären anti-TNF- α -Antikörpern, 4. Basistherapie mit löslichen TNF- α -Rezeptoren, 5. Basistherapie mit IL-1-Rezeptorantagonisten, 6. Basistherapie ohne „Biologicals“). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind gekennzeichnet. Punkte und Sternchen illustrieren Ausreißer.

Die Patienten der einzelnen Behandlungsgruppen weisen keine signifikanten Unterschiede in Anzahl und Frequenz der B-Zellen, der naiven B-Zellen und der Plasmazellen auf (Abb. 18a,b,d,e,f,h). Bezüglich der Anzahl und Frequenz der Gedächtnis-B-Zellen bestehen jedoch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Therapiegruppen. So ist die Anzahl der Gedächtnis-B-Zellen bei den Patienten mit einer Therapie mit humanisierten anti-TNF- α -Antikörpern und mit Basistherapie ohne "Biologicals" im Vergleich zu den meisten anderen Therapiearten signifikant erhöht (Abb. 18c,g). Jedoch ist auch die Anzahl der Gedächtnis-B-Zellen bei diesen derart therapierten Patienten ebenfalls niedriger als bei gesunden Personen (jeweils $p < 0,001$). Außerdem ist die Frequenz der Gedächtnis-B-Zellen bei den Patienten mit einer Therapie mit humanisierten anti-TNF- α -Antikörpern im Vergleich zu den meisten anderen Therapiearten signifikant erhöht, was bei dieser Therapiegruppe sogar zu einer signifikanten Erhöhung ($p = 0,035$) der eigentlich im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen insgesamt unveränderten Gedächtnis-B-Zell-Frequenz der RA-Patienten führt.

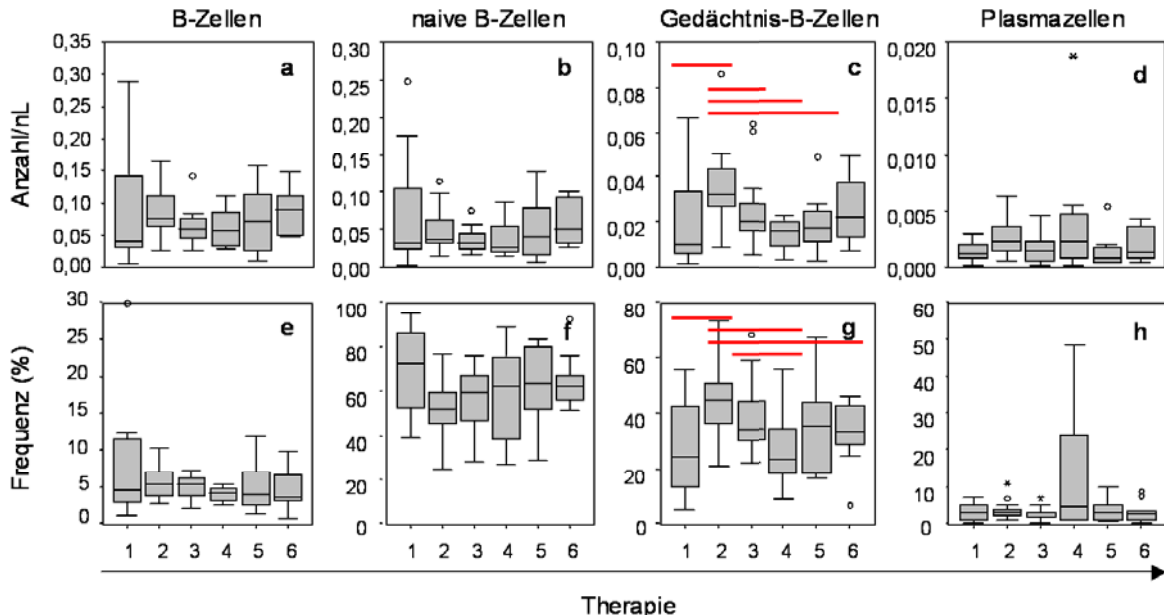


Abb. 18: Zusammenhang zwischen Therapieart und peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten. Dargestellt sind Anzahl (oben) und Frequenz (unten) der B-Zellen (a,e), naiven B-Zellen (b,f), Gedächtnis-B-Zellen (c,g) und Plasmazellen (d,h) verschiedener Therapiegruppen (1. ohne Basistherapie, 2. Basistherapie mit humanisierten anti-TNF- α -Antikörpern, 3. Basistherapie mit chimären anti-TNF- α -Antikörpern, 4. Basistherapie mit löslichen TNF- α -Rezeptoren, 5. Basistherapie mit IL-1-Rezeptorantagonisten, 6. Basistherapie ohne "Biologicals"). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind gekennzeichnet. Punkte und Sternchen illustrieren Ausreißer.

Damit ist zu schlußfolgern, daß die Anwendung einer Basistherapie an sich sowie die Art der Basistherapie nicht für die veränderte Anzahl und Frequenz der B-Zellen und der B-Zell-Subpopulationen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen verantwortlich gemacht werden kann.

3.1.7 Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten

Da die untersuchten RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen Unterschiede in der Anzahl und Frequenz der B-Zellen und deren Subpopulationen aufweisen, ergibt sich die Frage, ob diese Werte mit der Krankheitsaktivität korrelieren. Als Parameter für die Krankheitsaktivität werden hierbei Blutsenkgeschwindigkeit (BSG), C-reaktives Protein (CRP), Rheumafaktoren (RF), Anzahl schmerzhafter und geschwollener Gelenke, die Selbsteinschätzung des Patienten (PGA) sowie der Krankheitsaktivitätsindex (DAS) verwendet. Diese Parameter wurden mittels des Spearman- und Pearson-Tests auf Korrelationen untereinander, zur Krankheitsdauer sowie zur Anzahl bzw. Frequenz der B-Zellen und der B-Zell-Subpopulationen überprüft. Es existiert kein signifikanter Unterschied zwischen weiblichen und männlichen bzw. zwischen jüngeren und älteren RA-Patienten in den Aktivitätsmarkern. Keiner der Aktivitätsmarker korreliert mit der Krankheitsdauer. Zwischen sämtlichen Aktivitätsmarkern (außer den Rheumafaktoren) besteht eine geringe bis hohe Korrelation. Die Rheumafaktoren korrelieren nur gering bis mittel mit dem CRP und der BSG (Tab. 1).

	DAS	geschw.	schmerz.	PGA	CRP	BSG	RF
DAS		0,751	0,888	0,841	0,523	0,687	0,072
geschw.	0,779		0,594	0,641	0,433	0,229	0,022
schmerz.	0,890	0,685		0,753	0,352	0,382	-0,026
PGA	0,842	0,567	0,696		0,449	0,592	-0,090
CRP	0,629	0,556	0,499	0,538		0,667	0,466
BSG	0,660	0,351	0,431	0,587	0,664		0,370
RF	0,179	0,197	0,063	0,006	0,233	0,418	

Tab. 1: Korrelation zwischen Krankheitsaktivitätsparametern. Es sind die Korrelationskoeffizienten des Pearson-Tests (hellgrau) und des Spearman-Test (dunkelgrau) für Korrelationen zwischen Krankheitsaktivitätsindex (DAS), geschwollenen (geschw.) und schmerzhaften (schmerz.) Gelenken, Selbsteinschätzung der Patienten (PGA), C-reaktivem Protein (CRP), Blutsenkgeschwindigkeit (BSG) und Rheumafaktoren (RF) aufgelistet.

Zwischen den B-Zellen und deren Subpopulationen bestehen nur wenige und geringe Korrelationen zu den Aktivitätsmarkern. Die Anzahl und Frequenz der B-Zellen korreliert gering mit der Anzahl der schmerzhaften Gelenke. Die Anzahl der naiven B-Zellen korreliert gering mit dem DAS, dem CRP, der BSG und den RF. Die Frequenz der naiven B-Zellen korreliert gering mit dem DAS und den RF. Die Anzahl der Gedächtnis-B-Zellen korreliert gering negativ mit dem CRP und der BSG. Die Frequenz der Gedächtnis-B-Zellen korreliert gering negativ mit dem DAS, der Anzahl der geschwollenen Gelenke, dem PGA, dem CRP und den RF. Die Anzahl Plasmazellen korreliert mit keinem der Aktivitätsmarker, die Frequenz der Plasmazellen korreliert jedoch gering mit der BSG (Tab. 2).

		DAS	geschw.	schmerz.	PGA	CRP	BSG	RF
B-Zellen/nL	r_p	0,130	0,011	0,204	0,150	0,067	0,060	0,124
	r_s	0,065	0,046	0,032	- 0,024	- 0,005	0,016	0,189
% B-Zellen	r_p	0,131	- 0,011	0,217	0,116	0,005	- 0,079	0,164
	r_s	0,105	- 0,034	0,089	- 0,017	- 0,119	- 0,086	0,170
naive B-Zellen/nL	r_p	0,269	0,080	0,196	0,172	0,218	0,243	0,323
	r_s	0,164	0,085	0,033	0,094	0,031	0,077	0,233
% naive B-Zellen	r_p	0,225	0,196	0,064	0,188	0,159	0,092	0,229
	r_s	0,205	0,128	0,008	0,193	0,138	0,075	0,225
Gedächtnis-B-Zellen/nL	r_p	0,033	- 0,024	0,143	0,088	- 0,111	- 0,128	- 0,064
	r_s	- 0,078	- 0,031	0,016	- 0,128	- 0,244	- 0,217	- 0,103
% Gedächtnis-B-Zellen	r_p	- 0,243	- 0,214	- 0,064	- 0,191	- 0,246	- 0,140	- 0,224
	r_s	- 0,232	- 0,171	- 0,030	- 0,206	- 0,248	- 0,137	- 0,238
Plasmazellen/nL	r_p	- 0,057	- 0,105	- 0,049	- 0,075	0,002	0,032	0,051
	r_s	- 0,031	0,030	0,007	- 0,020	0,037	0,094	0,131
% Plasmazellen	r_p	0,042	0,059	0,008	- 0,009	- 0,008	0,039	- 0,066
	r_s	- 0,012	0,086	0,039	- 0,055	0,159	0,204	0,087

Tab. 2: Korrelationen zwischen Krankheitsaktivitätsparametern und peripheren B-Zellpopulationen. Es sind die Korrelationskoeffizienten des Pearson-Tests (r_p , hellgrau) und des Spearman-Test (r_s , dunkelgrau) für Korrelationen zwischen B-Zellen sowie deren Subpopulationen und Krankheitsaktivitätsindex (DAS), geschwollenen (geschw.) und schmerzhaften (schmerz.) Gelenken, Selbsteinschätzung der Patienten (PGA), C-reaktivem Protein (CRP), Blutsenkgeschwindigkeit (BSG) und Rheumafaktoren (RF) aufgelistet.

Da die Möglichkeit besteht, daß durch die statistische Auswertung der Mediane der Werte der Krankheitsaktivitätsmarker und der B-Zellen und deren Subpopulationen bestehende Korrelationen verdeckt werden, wurde letztere Analyse ebenfalls mit den Einzelwerten durchgeführt. Bei dieser Analyse ergeben sich insgesamt weniger, jedoch zusätzliche Korrelationen zwischen den Krankheitsaktivitätsmarkern und den B-Zellen und deren Subpopulationen. So korreliert die Frequenz der naiven B-Zellen gering ($r_p = 0,248$, $r_s = 0,220$) und die

Frequenz der Gedächtnis-B-Zellen gering negativ ($r_p = -0,259$, $r_s = -0,238$) mit der Blutsenkgeschwindigkeit (BSG). Die Zahl der Gedächtnis-B-Zellen korreliert gering ($r_s = -0,214$) negativ mit der Patientenselbsteinschätzung (PGA). Außerdem ist eine Korrelation zwischen der Anzahl ($r_s = 0,263$) und Frequenz ($r_s = 0,212$) der Plasmazellen und den Rheumafaktoren feststellbar. Die Einzelwerte der Frequenz der Plasmazellen wurden zwei Gruppen zugeordnet, wobei die Grenze 2,5% (die maximale Frequenz an Plasmazellen der gesunden Kontrollpersonen) gewählt wurde, und auf Unterschiede bezüglich der Aktivitätsmarker analysiert. Jedoch besteht lediglich in einem der Aktivitätsmarker ein Unterschied: Die Gruppe mit erhöhter Plasmazellfrequenz besitzt höhere Werte an Rheumafaktoren als die Gruppe mit normaler Plasmazellfrequenz ($p=0,010$). Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß bei zunehmender Krankheitsaktivität die Anzahl und die Frequenz der naiven B-Zellen und Plasmazellen steigt, die der Gedächtnis-B-Zellen jedoch sinkt.

Im folgenden werden zeitliche Verläufe der Anzahl und Frequenz der Plasmazellen im Vergleich zu den Aktivitätsmarkern der meistanalytierten RA-Patienten (in Basistherapie mit "Biologicals") vorgestellt. Es ist erkennbar, daß sich die Werte der meisten Krankheitsaktivitätsmarker im zeitlichen Verlauf gleichermaßen erhöhen und erniedrigen (Abb. 19). So weist die Anzahl der schmerzhaften Gelenke häufig einen ähnlichen Verlauf wie die Anzahl der geschwollenen Gelenke (Patient 27, 44, 56, 61), wie die Werte des C-reaktiven Proteins (Patient 27, 44) und die Blutsenkgeschwindigkeit (Patient 27, 44) auf. Die Anzahl der Plasmazellen weist zumeist einen ähnlichen Verlauf wie die Frequenz der Plasmazellen auf (Patient 10, 27, 44, 56, 61, 84, 96). Die Anzahl bzw. Frequenz der Plasmazellen weist einen ähnlichen Verlauf wie der Krankheitsaktivitätsindex (Patient 8, 27), die Anzahl der schmerzhaften und geschwollenen Gelenke (Patient 27), die Selbsteinschätzung der Patienten (Patient 61, 96), die Blutsenkgeschwindigkeit (Patient 6, 27, 44, 61), das C-reaktive Protein (Patient 27, 44, 84) und die Rheumafaktoren (Patient 84, 96) auf. Es ist somit festzustellen, daß zwar in allen Patienten eine ähnlicher Verlauf der Aktivitätsmarker, jedoch nur in einigen Patienten ein Zusammenhang zwischen Aktivitätsmarkern und Plasmazellen besteht.

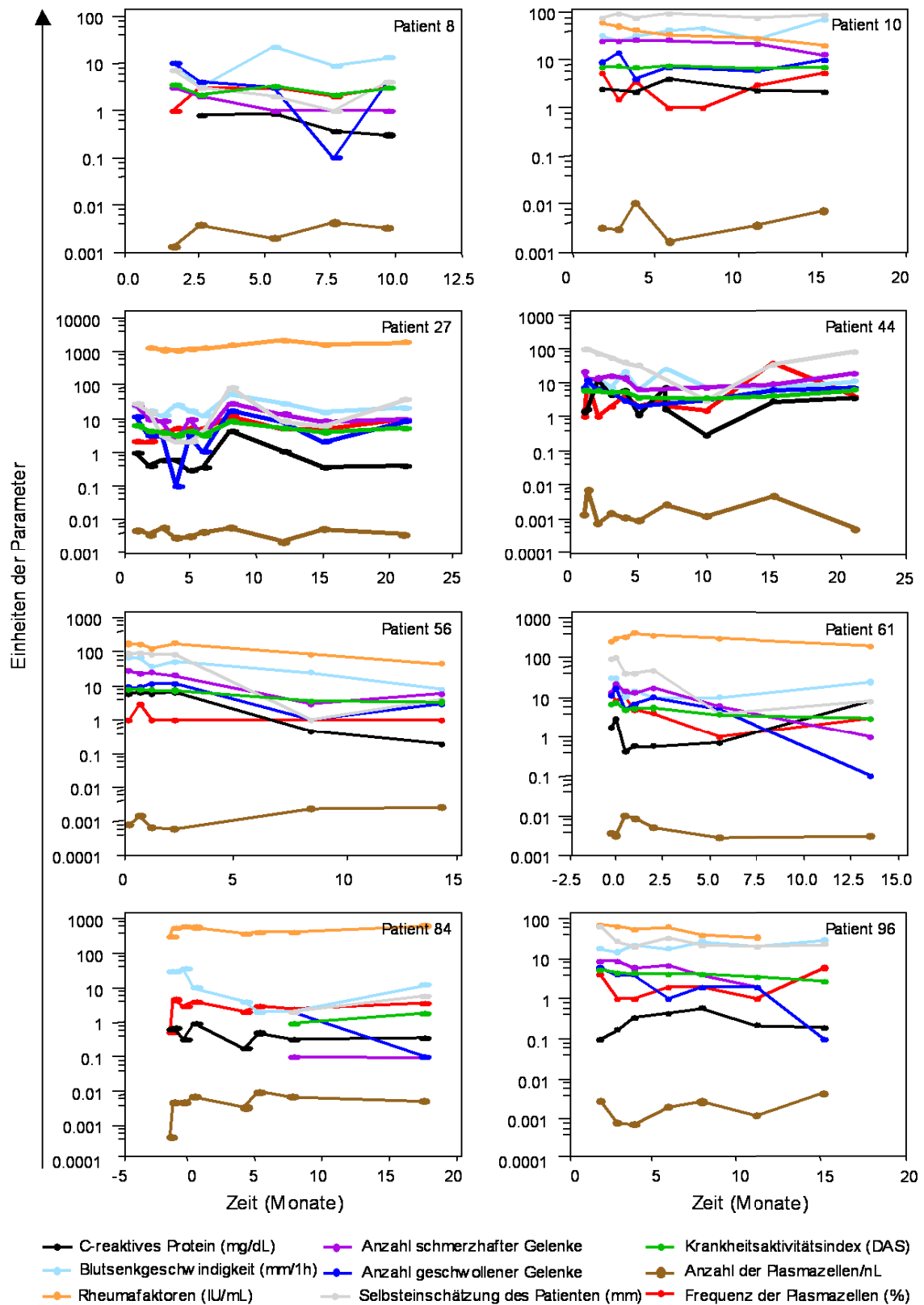


Abb. 19: Zusammenhang zwischen Krankheitsaktivitätsmarkern und Plasmazellen bei RA-Patienten im zeitlichen Verlauf. Die Werte der Anzahl schmerzhafter und geschwollener Gelenke sowie der Selbsteinschätzung der Patienten, die 0 betragen, sind aufgrund der logarithmischen Skala näherungsweise als 0,1 dargestellt.

3.2 Analyse der Immunglobuline der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten

3.2.1 Immunglobulinklassen der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten

Die Plasmazellen von 13 RA-Patienten wurden auf ihre intrazelluläre Expression von Immunglobulinen überprüft. Dazu wurden deren PBMC für CD19 und CD27 gefärbt, fixiert, die IgG-Subklassen bzw. IgA mit und ohne Saponin gefärbt und die Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Eine Färbung ohne Saponin entspricht einer Färbung von membranständigem Ig, nur bei Permeabilisierung der Zellmembran durch Saponin ist es möglich, daß Antikörper in die Zelle eindringen und intrazelluläres zytoplasmatisches Ig färben. Bei einer intrazellulären Färbung von Ig mit Saponin erscheinen daher Ig-sezernierende B-Zellen in der FACS-Analyse stärker Ig positiv als Ig ausschließlich membranständig tragende Zellen. Bei der Färbung für IgA ohne Saponin sind die naiven B-Zellen (CD27⁻) IgA negativ, jedoch ist ein Teil der Gedächtnis-B-Zellen (CD27⁺) und ein Teil der Plasmazellen (CD27⁺⁺) IgA positiv, sie tragen somit membranständiges IgA (bzw. B-Zell-Rezeptoren der Klasse IgA, Abb. 20a). Die Ergebnisse der IgA-Färbung mit Saponin der naiven und die Gedächtnis-B-Zellen sind ähnlich: die naiven B-Zellen sind IgA negativ und ein Teil der Gedächtnis-B-Zellen IgA positiv. Ein deutlicher Unterschied erscheint jedoch bei den Plasmazellen. Die Population der IgA positiven Plasmazellen weist bei der Färbung mit Saponin eine etwa eine Dekade höhere Fluoreszenzintensität als bei der Färbung ohne Saponin auf (IgA⁺⁺, Abb. 20b).

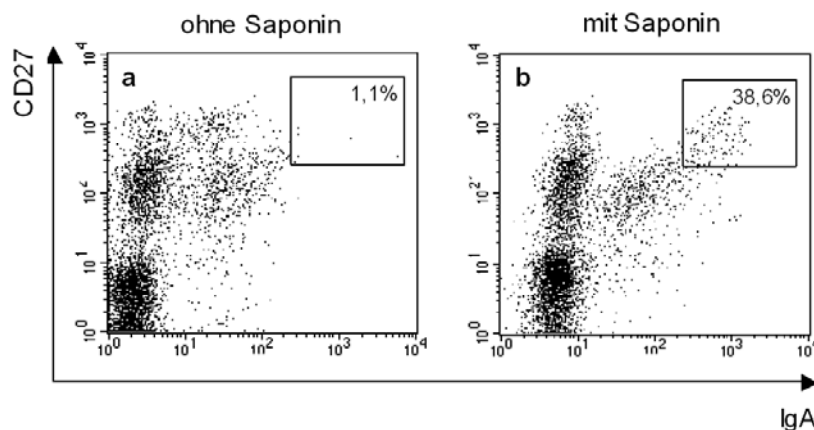


Abb. 20: Repräsentative FACS-Analyse der Färbung von intrazellulärem IgA in Plasmazellen eines RA-Patienten. Es ist eine IgA-Färbung a) ohne und b) mit Saponin dargestellt. Die Population der IgA⁺⁺ Plasmazellen ist jeweils markiert und ihre Frequenz an Plasmazellen vermerkt.

Die Verteilung der Zellpopulationen bei der IgG₁₋₄-Färbung mit und ohne Saponin war vergleichbar zur IgA-Färbung. Dies bedeutet, daß die CD27⁺⁺ B-Zellen große Mengen an IgG bzw. IgA in ihrem Zytoplasma beinhalten. Dies stellt im Kontext zur durchflußzytometrischen CD-Expressions- sowie der molekularbiologischen Analyse (3.1.1) einen weiteren Nachweis dar, daß es sich bei den CD27⁺⁺ B-Zellen um Antikörper sezernierende B-Zellen und damit um Plasmazellen handelt. Die Färbung zeigt, daß im Mittelwert 27% der Plasmazellen IgA⁺⁺ und 40% IgG⁺⁺ sind, wobei der Mann-Whitney-Test signifikant niedrigere IgA- als IgG-Frequenzen anzeigt (p=0,021, Abb. 21a).

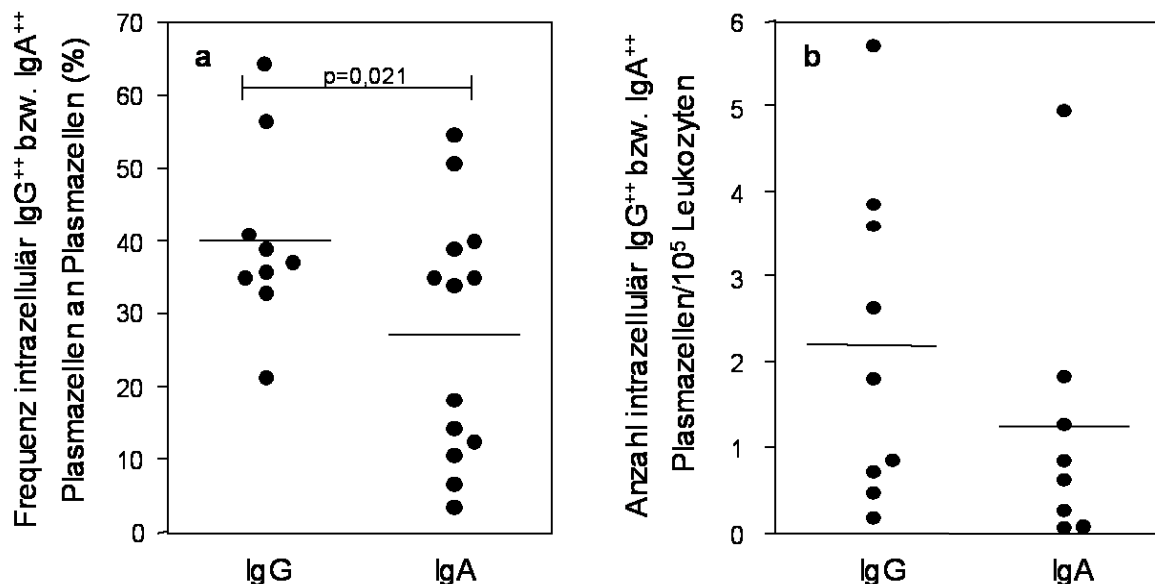


Abb. 21: Intrazellulär nachgewiesene Immunglobulinklassen der Plasmazellen der RA-Patienten. Es sind die IgG⁺⁺ (IgG) bzw. IgA⁺⁺ (IgA) Plasmazellen a) in ihrer Frequenz an Plasmazellen und b) in ihrer Anzahl pro 10⁵ Leukozyten dargestellt. Die horizontale Linie repräsentiert jeweils den Mittelwert.

Die RA-Patienten weisen im Mittelwert 1,23 IgA⁺⁺ Plasmazellen pro 10⁵ Leukozyten und 2,18 IgG⁺⁺ Plasmazellen pro 10⁵ Leukozyten und somit ein Verhältnis IgA- zu IgG-sezernierender Plasmazellen von etwa 0,6 bis 0,7.auf (Abb. 21b). Gesunde Personen weisen neben wesentlich höheren Zahlen IgA- und IgG-sezernierender Zellen im Blut außerdem eine etwa 3 bis 4-fach höhere Anzahl IgA sezernierender Zellen als IgG sezernierender Zellen auf [149] [150]. Bei den RA-Patienten ist somit eine enorme Verschiebung der von Plasmazellen exprimierten

Immunglobulinklassen festzustellen. Innerhalb der IgG-exprimierenden Plasmazellen wurden größtenteils IgG₁- (28,11%) und IgG₂- (7,78%) exprimierende Plasmazellen gefunden, was der Verteilung der IgG-Subklassen im Serum gesunder Personen entspricht [14].

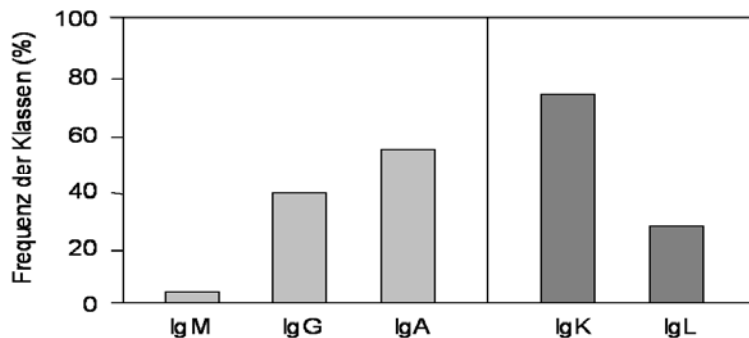


Abb. 22: Immunglobulin-Klassen der Antikörper peripherer Plasmazellen der RA-Patienten. Es sind die Frequenzen der durch cDNA-Sequenzierung ermittelten Klassen der schweren Ig-Ketten sowie der leichten Ig-Ketten dargestellt.

Die von den Plasmazellen exprimierten Immunglobulinklassen wurden außerdem mittels molekularbiologischer Methoden ermittelt. Dazu wurde die Immunglobulin-mRNA FACS sortierter Plasmazellen von 5 RA-Patienten in cDNA umgeschrieben und diese sequenziert. Die Klassen der schweren Ig-Ketten wurden durch Vergleich der C_H1-Region letzterer mit Keimbahngenen ermittelt [122]. Die Ig-Klasse der leichten Ketten wurde durch Vergleich mit Keimbahngenen ermittelt [2]. Von den schweren Ig-Ketten sind 2,8% IgM, 41,7% IgG und 50% IgA. Von den leichten Ig-Ketten sind 55,5% Ig_κ und 26% Ig_λ (Abb. 22). Das Verhältnis von IgA- zu IgG-mRNA exprimierenden Plasmazellen entspricht somit 1,2 und bestätigt damit die durch die intrazelluläre Färbung ermittelte Erniedrigung des Verhältnisses der IgA- zu IgG-sezernierenden peripheren Plasmazellen bei RA-Patienten.

3.2.2 Selektiertes V-(D-)J-Repertoire der Immunglobulingene der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten

Die V-(D-)J-Rearrangierungen der sequenzierten Ig-Ketten der Plasmazellen von RA-Patienten wurden durch den Vergleich der Sequenzen mit Keimbahngenen ermittelt [2]. Die Verwendung der V-, (D-), J-Segmente der sequenzierten Immunglobulin-cDNA der Plasmazellen der RA-Patienten wurde mit der Frequenz der funktionellen bekannten V-, D- und J-Gene [2] sowie mit den Frequenzen der

verwendeten V- und J-Familien von naiven B-Zellen des peripheren Blutes gesunder Personen verglichen [151] [152] [153]. Gene der V_H1 -, V_H2 - V_H5 - und der V_H6 -Genfamilien werden nur wenig verwendet. Am häufigsten werden Gene der V_H3 - und V_H4 -Genfamilie verwendet, wobei am häufigsten die V_H -Gene, 3-09, 3-15, 3-21, 3-23, 3-30/3-30.5, 4-61 und 4-34 auftreten. Im Vergleich zur Frequenz der V_H -Keimbahngene besteht häufigere Nutzung der V_H3 - und V_H4 -Familie, während die V_H1 - und V_H2 -Familie weniger genutzt werden. Im Vergleich zum V_H -Repertoire naiver B-Zellen gesunder Personen ist eine verminderte Nutzung der V_H1 - und eine vermehrte Nutzung der V_H4 -Familie erkennbar (Abb. 24a). Während in naiven B-Zellen gesunder Personen häufig das 3-07- und das 4-59-Gen verwendet wird, wurde es nur bei wenigen Immunglobulin-Sequenzen der Plasmazellen der hier untersuchten RA-Patienten gefunden. Das 3-15- und das 4-61-Gen wurde bei letzteren jedoch vermehrt gefunden.

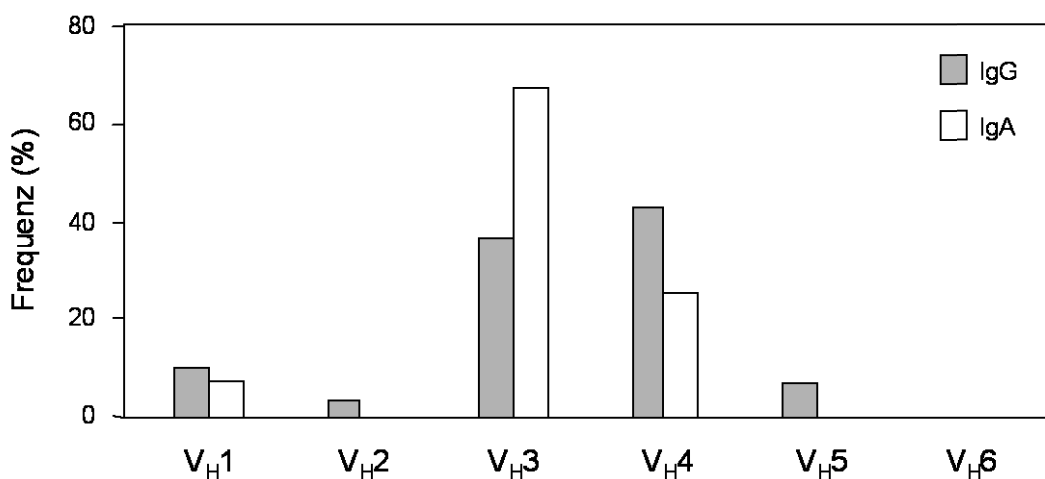


Abb. 23: V_H -Genfamilien-Repertoire peripherer Plasmazellen der RA-Patienten. Dargestellt sind die Frequenzen des V_H -Genfamilien-Repertoires der Immunglobuline der IgG- (grau) und der IgA-Klasse (weiß).

Werden die Sequenzen nach ihrer Immunglobulinklasse unterteilt, ergibt sich folgendes Bild: Die V_H3 -Familie ist häufiger bei IgA als bei IgG zu finden. Die V_H4 -Familie hingegen wird weniger von IgA als IgG verwendet. (Abb. 23). Für die insgesamt vermehrte Nutzung der V_H4 -Familie tragen somit besonders IgG bei.

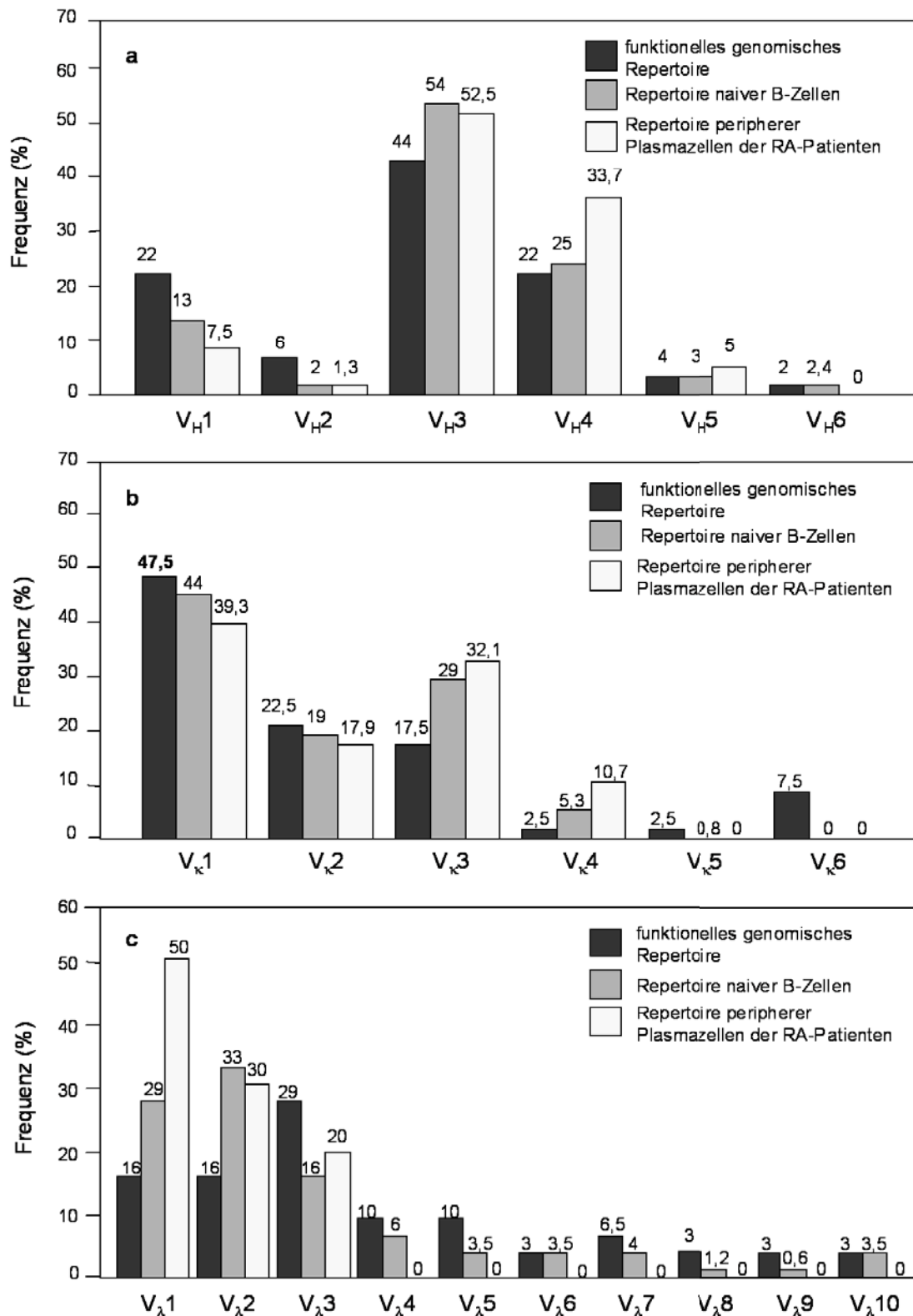


Abb. 24: V-Genfamilien-Repertoire peripherer Plasmazellen der RA-Patienten. Dargestellt ist das a) V_H-Genfamilien-Repertoire, b) das V_K-Genfamilien-Repertoire und c) das V_λ-Genfamilien-Repertoire der Plasmazellen der RA-Patienten (weiß) im Vergleich zur Frequenz der humanen funktionellen genomischen V-Genfamilien (schwarz, [2]) und der V-Genfamilien peripherer naiver B-Zellen gesunder Personen (grau, [151] [152] [153]).

Gene der $V_{\kappa}4$ -, $V_{\kappa}5$ - und der $V_{\kappa}6$ -Genfamilien werden nur von einem geringen Prozentsatz der sequenzierten leichten Ig_{κ} -Ketten der RA-Patienten verwendet. Am häufigsten werden Gene der $V_{\kappa}1$ -, $V_{\kappa}2$ - und der $V_{\kappa}3$ -Genfamilien verwendet. Die $V_{\kappa}3$ - und $V_{\kappa}4$ -Familie werden im Vergleich zur Frequenz der V_{κ} -Keimbahngene häufiger, die $V_{\kappa}1$ - und $V_{\kappa}6$ -Familie jedoch geringer genutzt. Im Vergleich zum V_{κ} -Repertoire naiver B-Zellen gesunder Personen ist eine vermehrte Verwendung der $V_{\kappa}4$ -Familie erkennbar (Abb. 26b). Gene der $V_{\lambda}4$ - bis $V_{\lambda}10$ -Familie werden von keiner der sequenzierten leichten Ig -Ketten der RA-Patienten verwendet. Am häufigsten werden Gene der $V_{\lambda}1$ -, $V_{\lambda}2$ - und der $V_{\lambda}3$ -Genfamilien verwendet. Die $V_{\lambda}1$ - und $V_{\lambda}2$ -Familie werden im Vergleich zur Frequenz der V_{λ} -Keimbahngene häufiger, die $V_{\lambda}3$ -Familie jedoch geringer genutzt. Im Vergleich zum V_{λ} -Repertoire naiver B-Zellen gesunder Personen ist eine vermehrte Nutzung der $V_{\lambda}1$ - und eine verminderte Nutzung der $V_{\lambda}3$ -Familie erkennbar (Abb. 24c).

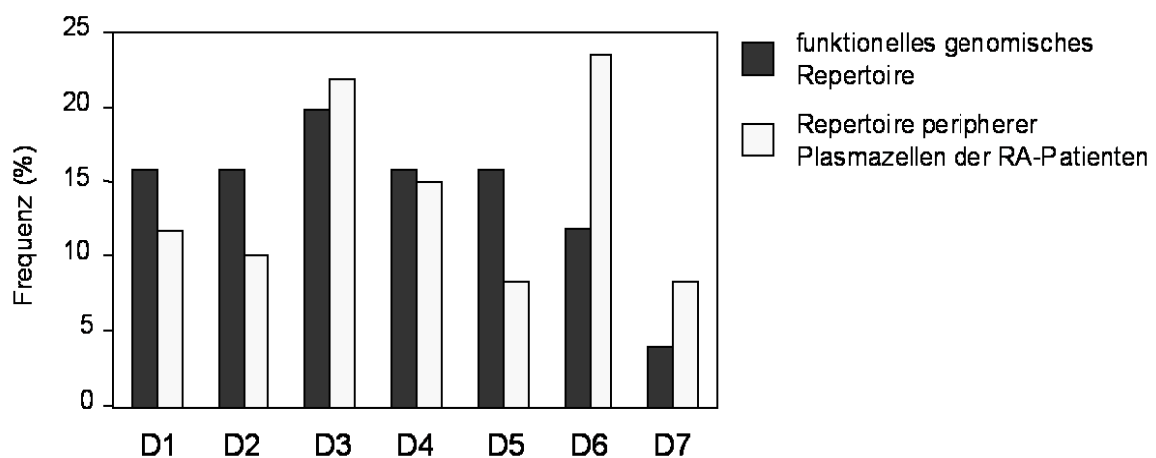


Abb. 25: D-Genfamilien-Repertoire peripherer Plasmazellen der RA-Patienten. Dargestellt ist die Frequenz der humanen funktionellen genomischen D-Genfamilien (schwarz, [2]) und die Frequenz der verwendeten D-Genfamilien Plasmazellen der RA-Patienten (weiß).

Am häufigsten werden Gene der D3- und D6-Familie verwendet. Im Vergleich zur Frequenz der genomisch funktionellen D-Familien besteht eine geringere Verwendung der D1-, D2- und D5- Genfamilien, aber eine häufigere Verwendung der D6- und D7-Genfamilien (Abb. 25). Gene der J_H1 -, J_H2 - J_H3 -, J_H5 und J_H6 -Familie werden nur von einem geringen Teil der Sequenzen verwendet.

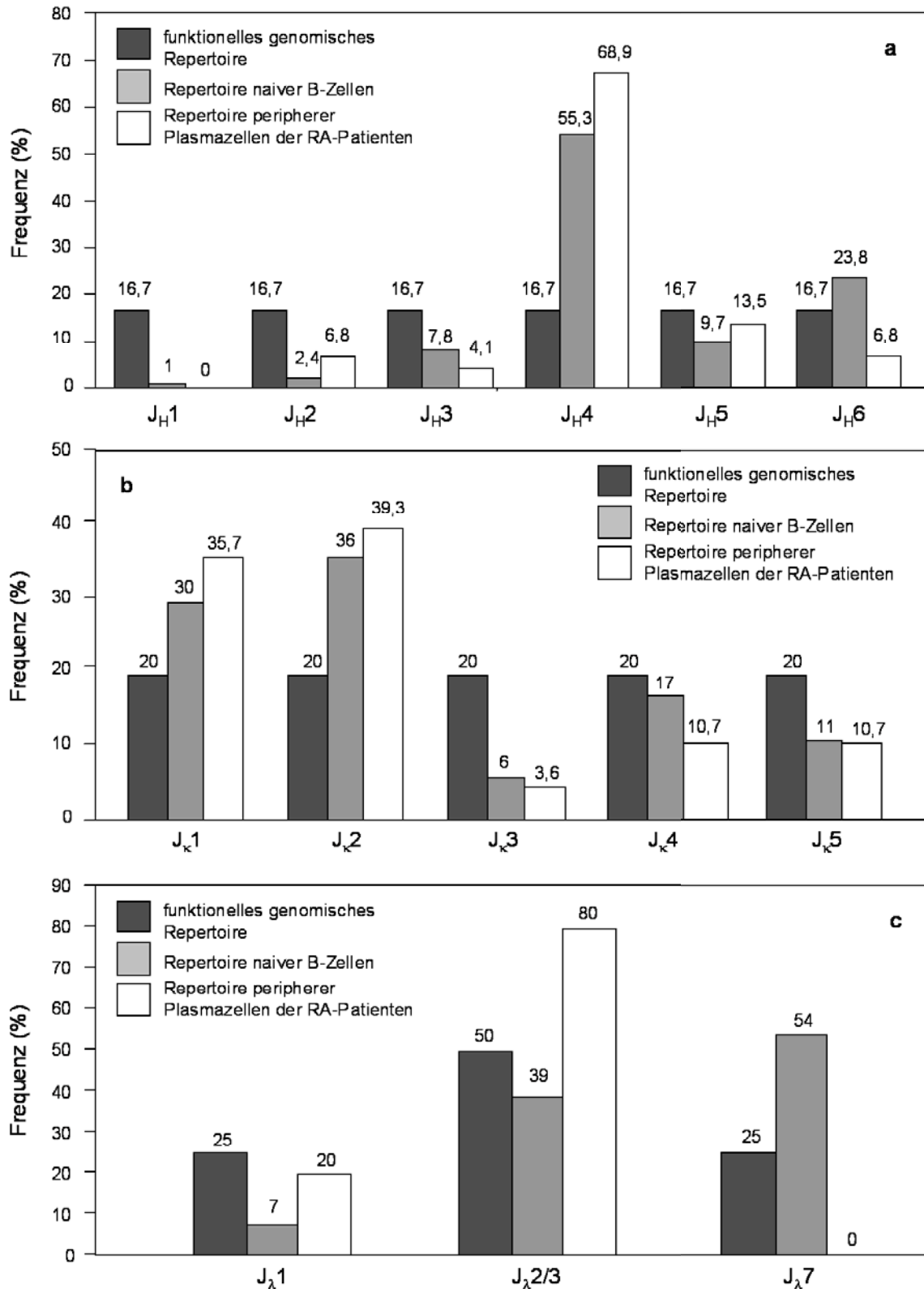


Abb. 26: J-Genfamilien-Repertoire peripherer Plasmazellen der RA-Patienten. Dargestellt ist das a) J_H-Genfamilien-Repertoire, b) das J_K-Genfamilien-Repertoire und c) das J_λ-Genfamilien-Repertoire der Plasmazellen der RA-Patienten (weiß) im Vergleich zur Frequenz der humanen funktionellen genomischen J-Genfamilien (schwarz, [2]) und der J-Genfamilien peripherer naiver B-Zellen gesunder Personen (grau, [151] [152] [153]).

Im Vergleich zur Verteilung bekannter genomischer funktionellen J_H -Gene wird die J_H1 -, J_H2 - J_H3 - und J_H6 -Familie vermindert, jedoch die J_H4 -Familie vermehrt genutzt. Im Vergleich zum J_H -Repertoire naiver B-Zellen gesunder Personen ist eine vermehrte Nutzung der J_H4 - und eine verminderte Nutzung der J_H6 -Familie erkennbar (Abb. 26a). Die J_K3 -, J_K4 - und J_K5 -Familie werden nur von einem geringen Prozentsatz der sequenzierten leichten Ig-Ketten der RA-Patienten verwendet. Am häufigsten wird die J_K1 - und J_K2 -Familie verwendet. Im Vergleich zur Frequenz der bekannten funktionellen genomischen J_K -Genfamilien wird die J_K3 -, J_K4 - und der J_K5 -Familie vermindert, jedoch die J_K1 - und J_K2 -Familie vermehrt verwendet. Im Vergleich zum J_K -Repertoire naiver B-Zellen gesunder Personen ist eine vermehrte Nutzung der J_K1 - und eine verminderte Nutzung der J_K4 -Familie erkennbar (Abb. 26b). Die $J_\lambda7$ -Familie wird nur von keiner der Sequenzen verwendet. Am häufigsten wird die $J_\lambda2/3$ -Genfamilie verwendet. Im Vergleich zur Frequenz der bekannten funktionellen genomischen J_λ -Genfamilien werden die $J_\lambda2/3$ -Familie vermehrt, jedoch die $J_\lambda7$ -Familie vermindert verwendet. Im Vergleich zur Frequenz der Verwendung der J_λ -Genfamilien in naiven B-Zellen gesunder Personen wird die $J_\lambda1$ - und $J_\lambda2/3$ -Familie vermehrt, jedoch die $J_\lambda7$ -Familie vermindert verwendet (Abb. 26c). Insgesamt ist somit im Vergleich zum genomischen Repertoire sowie zum Repertoire naiver B-Zellen gesunder Personen eine veränderte Nutzungshäufigkeit der V- und J-Genfamilien und damit eine selektiertes Genrepertoire in den schweren und leichten Immunglobulinketten sichtbar, was auf eine erfolgte Affinitätsreifung der Plasmazellen hindeutet.

3.2.3 Vermehrte somatische Hypermutationen der V-Gene der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten

Durch Vergleich mit Keimbahngenen [2] wurden die Punktmutationen der variablen Region der sequenzierten Immunglobulin-cDNA der Plasmazellen der RA-Patienten ermittelt. Die Anzahl und Frequenz der Mutationen der V-Region und ihrer komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR) und Gerüstregionen (FR) wurde für die schweren und leichten Immunglobulinketten in Anlehnung an die Kabat-Nomenklatur [122] bestimmt.

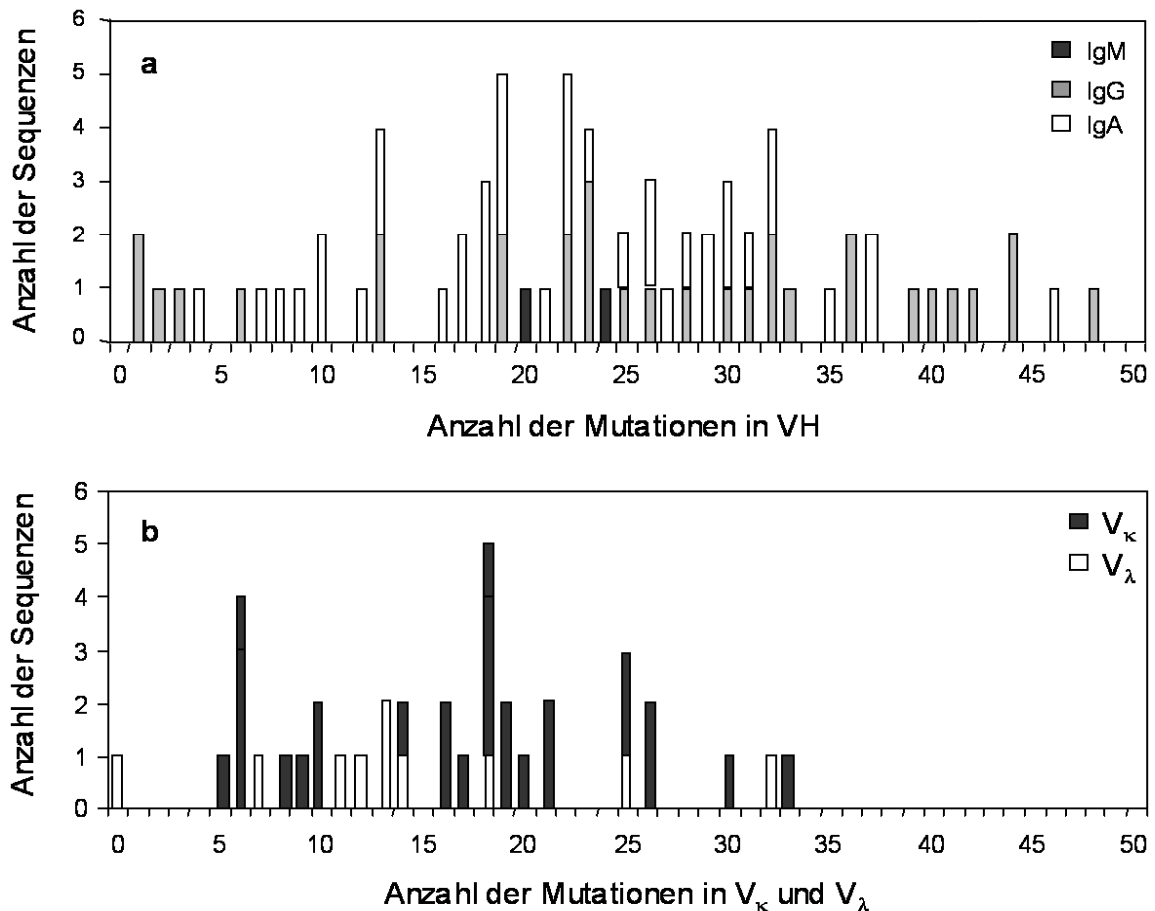


Abb. 27: Anzahl der Mutationen in den V-Genen der Plasmazellen der RA-Patienten. Jeder Balken repräsentiert die Summe der Anzahl der Sequenzen mit einer bestimmten Anzahl an Mutationen. a) Anzahl der Mutationen in V_H in IgM (schwarz), IgG (grau) und IgA (weiß). b) Anzahl der Mutationen in V_κ (schwarz) und V_λ (weiß).

Die Anzahl an Mutationen in V_H variierte von 1 bis 48 Stück pro Sequenz und beträgt im Mittelwert 23,01 (in den FR 13,59 und in den CDR 9,67, Abb. 27a). Die Anzahl an Mutationen in V_κ variierte von 5 bis 33 Stück pro Sequenz und beträgt im Mittelwert 16,64 (in den FR 8,79 und in den CDR 7,8, Abb. 27b). Die Anzahl an Mutationen in V_λ variierte von 0 bis 32 Stück pro Sequenz und beträgt im Mittelwert 14,50 (in den FR 7,20 und in den CDR 7,30, Abb. 27c). Die Frequenz der Mutationen beträgt in V_H im Mittelwert 8,11% (in den FR 6,21% und in den CDR 14,73%, Abb. 28a,d). Die Frequenz der Mutationen in V_κ beträgt im Mittelwert 6,17% (in den FR 4,33% und in den CDR 9,25%, Abb. 28b,d). Die Frequenz der Mutationen in V_λ beträgt im Mittelwert 4,80% (in den FR 3,43% und in den CDR 7,95%, Abb. 28c,d).

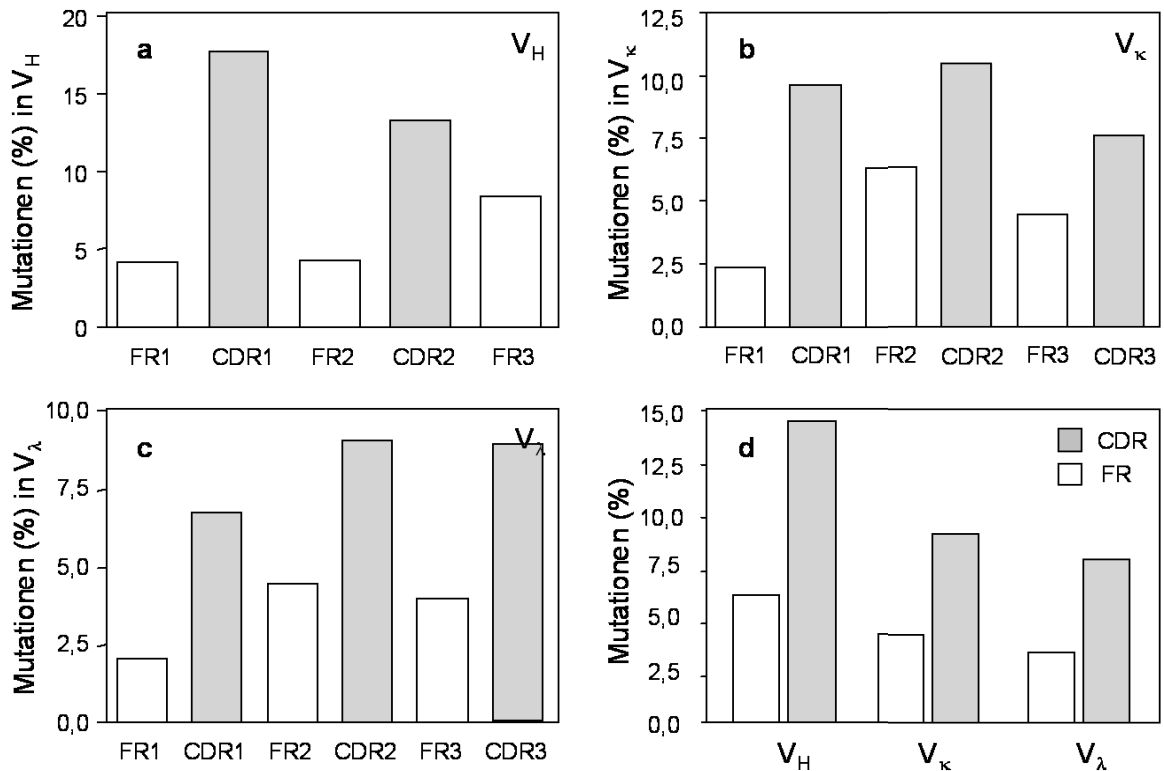


Abb. 28: Frequenz der Mutationen in den V-Genen der Plasmazellen der RA-Patienten. Es ist die Frequenz der Mutationen in den einzelnen FR und CDR in a) V_H , b) V_κ , c) V_λ sowie d) in den Gesamt-FR (weiß) und -CDR (grau) in V_H , V_κ und V_λ dargestellt.

Zwischen IgG und IgA besteht in Anzahl und Frequenz der Mutationen weder in den FR noch in den CDR ein signifikanter Unterschied (Abb. 29). Diese in den variablen Regionen, besonders in den CDR der schweren und leichten sequenzierten Immunglobulin-cDNA der Plasmazellen der RA-Patienten auftretende hohe Anzahl und Frequenz somatischer Mutationen weist daher auf eine erfolgte Affinitätsreifung dieser Zellen hin.

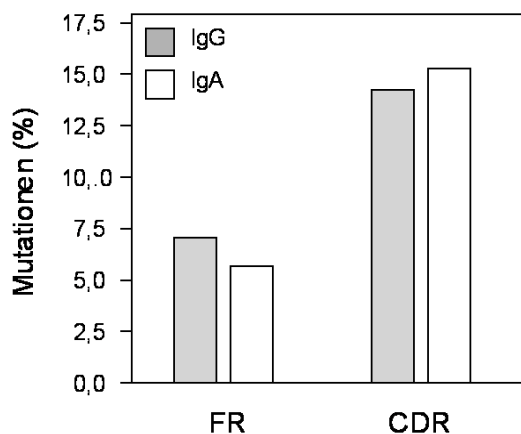


Abb. 29: Frequenz der Mutationen in den V_H -Genen der Plasmazellen der RA-Patienten. Es ist die Frequenz an Mutationen in den FR und CDR der IgG (grau) und IgA (weiß) dargestellt.

3.2.4 R- und S- Mutationen der V-Gene der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten

Es wurden die (aminosäureersetzenden) R-Mutationen und (stillen) S-Mutationen der variablen Region der sequenzierten cDNA der schweren und leichten Immunglobulinketten sowie deren Frequenz bezüglich der Länge (Gesamtanzahl der Nukleotide) der V-Region sowie der CDR und FR der Plasmazellen von RA-Patienten bestimmt. Mehrere in einem Codon auftretende Mutationen wurden als eine R- bzw. S-Mutation gewertet.

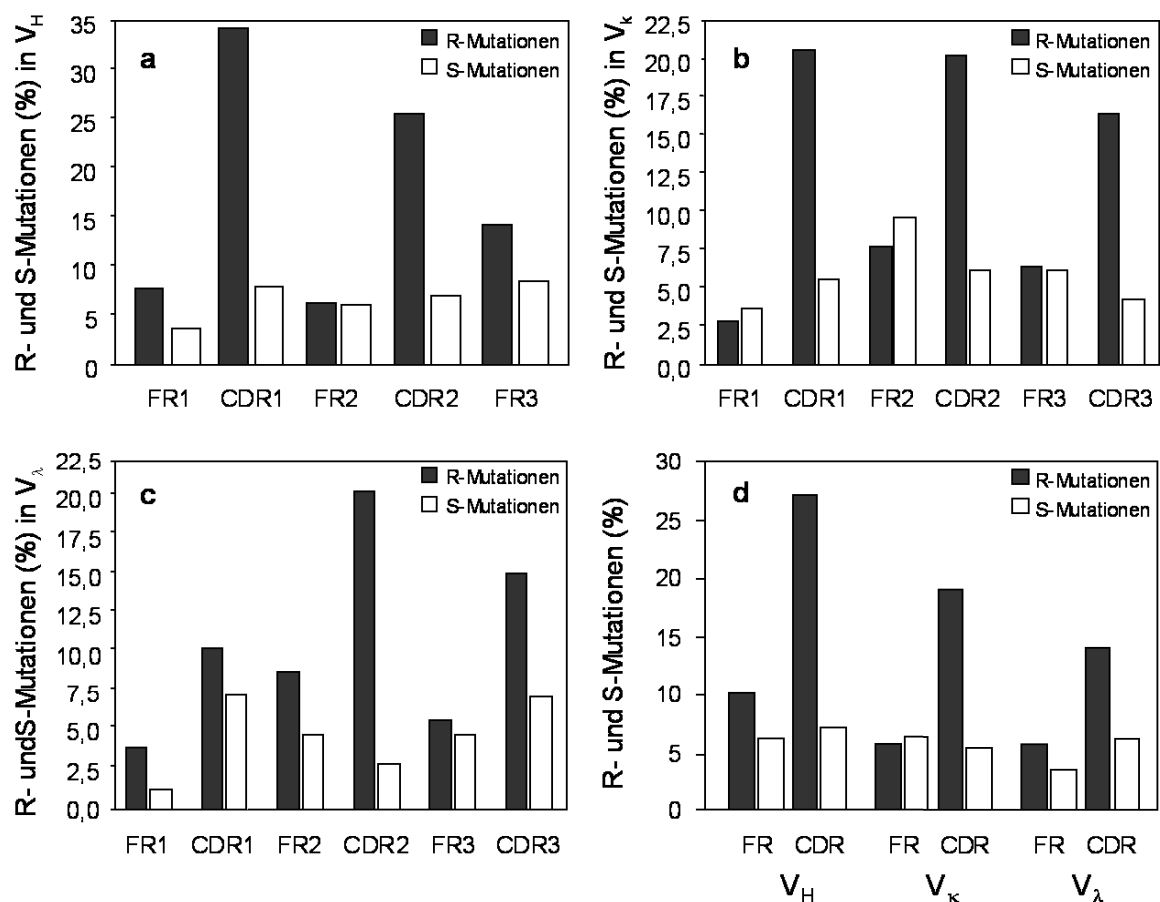


Abb. 30: Frequenz der R- und S-Mutationen in den V-Genen der Plasmazellen der RA-Patienten. Es ist die Frequenz der R- (schwarz) und S- (weiß) Mutationen in den einzelnen FR und CDR in a) V_H , b) V_k und c) V_λ sowie d) in den Gesamt-FR und -CDR in V_H , V_k und V_λ dargestellt.

Die Frequenz der R-Mutationen in V_H beträgt in den FR 10,08% und in den CDR 27,17%. Die Frequenz der S-Mutationen in V_H beträgt in den FR 6,06% und in den CDR 7,00% (Abb. 30a,d). Die Frequenz der R-Mutationen in V_k beträgt in den FR 5,61% und in den CDR 18,93%. Die Frequenz der S-Mutationen in V_k beträgt in

den FR 6,27% und in den CDR 5,28% (Abb. 30b,d). Die Frequenz der R-Mutationen in V_λ beträgt in den FR 5,71% und in den CDR 13,97%. Die Frequenz der S-Mutationen in V_λ beträgt in den FR 3,57% und in den CDR 6,17% (Abb. 30c,d).

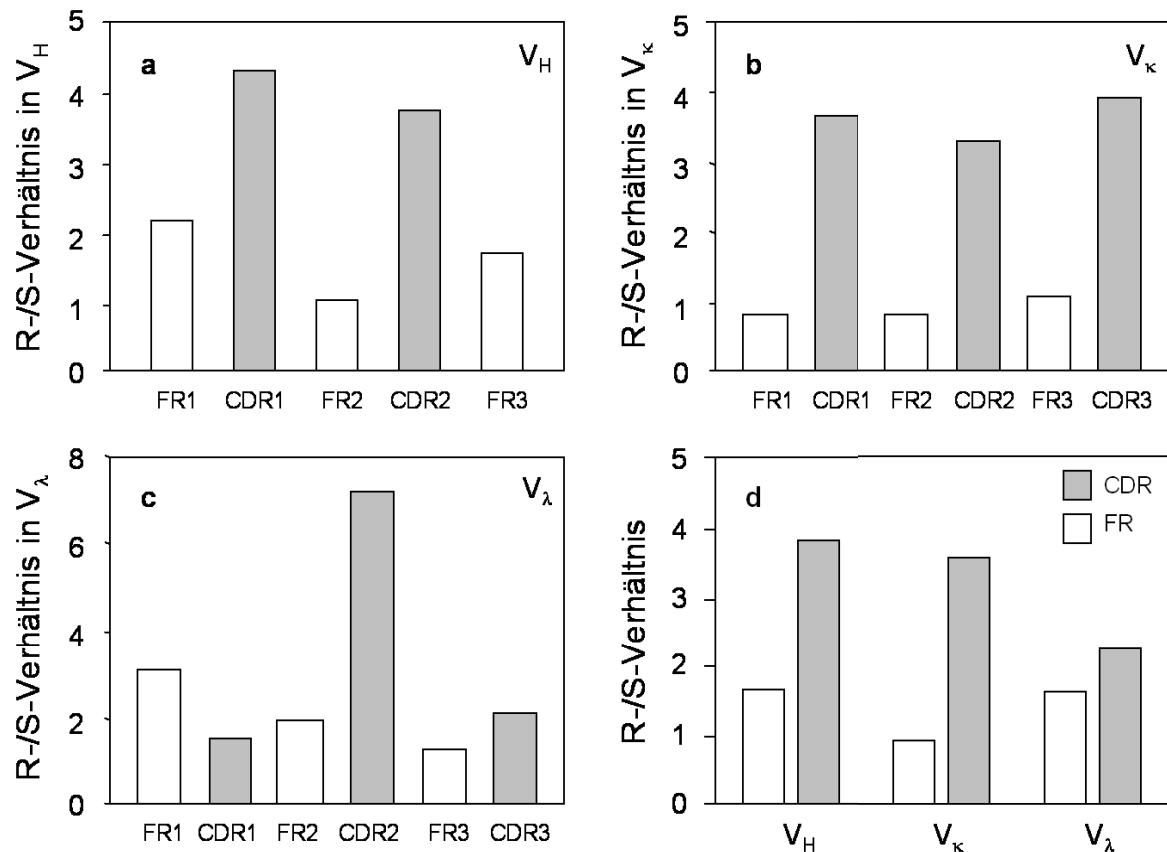


Abb. 31: Verhältnis der R- zu S-Mutationen in den V-Genen der Plasmazellen von RA-Patienten. Es ist das R/S-Verhältnis in den einzelnen FR und CDR in a) V_H , b) V_κ und c) V_λ sowie d) in den Gesamt-FR (weiß) und -CDR (grau) in V_H , V_κ und V_λ dargestellt.

Das Verhältnis der R- zu S-Mutationen in V_H beträgt in den FR 1,64 und in den CDR 3,82 (Abb. 31a,d), wobei das R/S-Verhältnis in den CDR der Immunglobuline der IgA-Klasse (4,43) höher als in den CDR der Immunglobuline der IgG-Klasse (2,54) ist (Abb. 32). Das Verhältnis der R- zu S-Mutationen in V_κ beträgt in den FR 0,91 und in den CDR 3,55 (Abb. 31b,d). Das Verhältnis der R- zu S-Mutationen in V_λ beträgt in den FR 1,60 und in den CDR 2,26 (Abb. 31c,d). In funktionellen V_H -Genen peripherer B-Zellen gesunder Personen liegt das R/S-Verhältnis in den FR bei etwa 1,8 und in den CDR etwas höher bei etwa 4 [154] [155] [156]. Somit weisen die FR und CDR der IgH-Ketten der Plasmazellen von RA-Patienten keine

Unterschiede im Verhältnis der R/S-Mutationen gegenüber gesunden Personen auf. Das höhere R/S-Verhältnis in den CDR gegenüber den FR bedeutet, daß die Plasmazellen in den Gerüstregionen im Vergleich zur keimbahnkodierten Aminosäuresequenz relativ unverändert, in den antigenbindende Bereichen jedoch verändert sind und damit einer (oder mehreren) Affinitätsreifung(en) unterlagen.

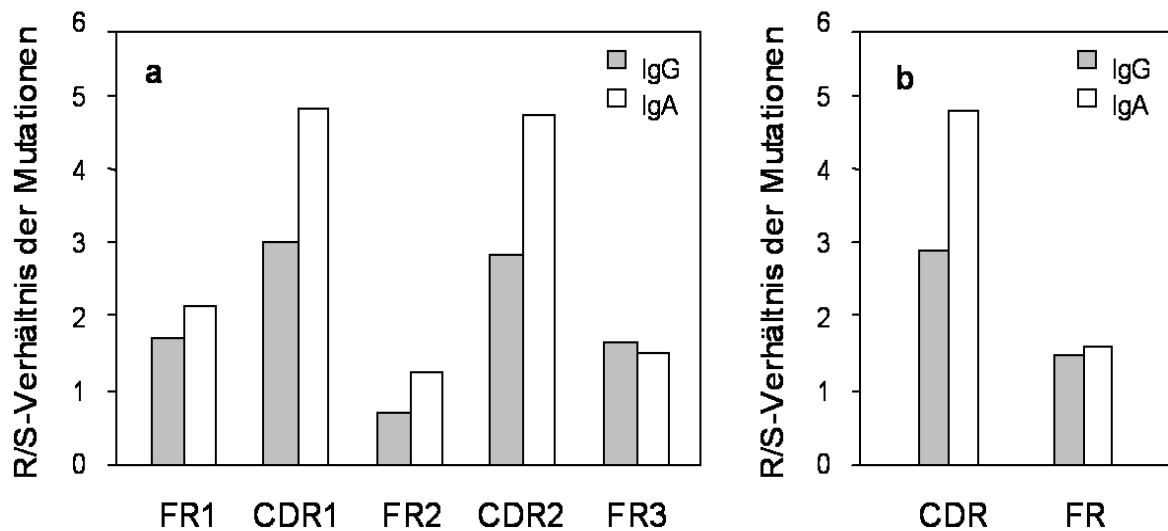


Abb. 32: Verhältnis der R- zu S-Mutationen in den V_H -Genen unterschiedlicher Ig-Klassen der Plasmazellen von RA-Patienten. Es ist das R/S-Verhältnis in a) den einzelnen FR und CDR sowie b) in den Gesamt-FR und -CDR von IgG- (grau) und IgA- (weiß) exprimierenden Plasmazellen dargestellt.

3.2.5 CDR3-Länge der Immunglobulingene der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten

Von den Sequenzen der schweren und leichten Ig-Kettengene der Plasmazellen von RA-Patienten wurde unter Beachtung der Kabat-Nomenklatur [122] die Länge der CDR3 (Anzahl der Nukleotide) bestimmt. Die CDR3-Länge variiert in den V_H von 9 bis 69 Nukleotiden mit einem Mittelwert bei 35,75 (Abb. 33a) und ist damit im Vergleich zur CDR3-Länge (39,5 Nukleotide) der V_H naiver B-Zellen gesunder Personen erniedrigt, jedoch vergleichbar zur CDR3-Länge mutierter Antikörper gesunder Personen, die prinzipiell etwas kürzer ist [151]. Die CDR3-Länge variiert in den V_K von 24 bis 33 Nukleotiden (Abb. 33b) und in den V_λ von 30 bis 39 Nukleotiden (Abb. 33c).

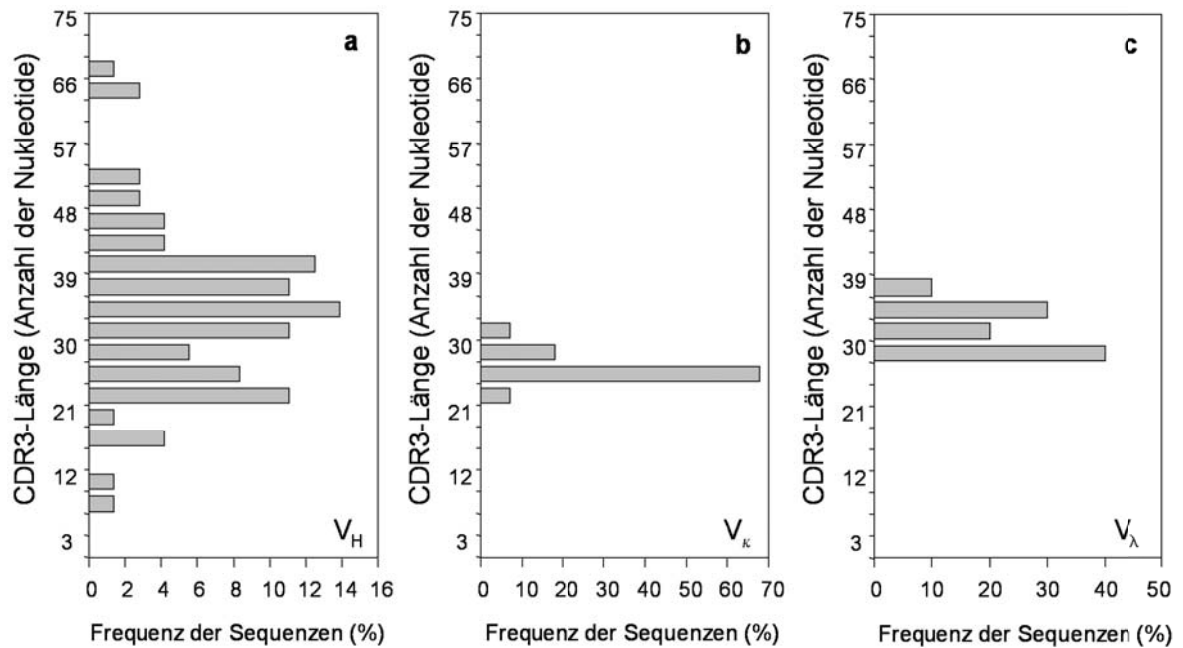


Abb. 33: CDR3-Länge der Immunglobulingene der Plasmazellen von RA-Patienten. Es ist die Frequenz der a) V_H-, b) V_K- und c) V_L-Sequenzen in Bezug auf ihre CDR3-Länge (Anzahl der Nucleotide) dargestellt.

In den IgG variiert die CDR3-Länge zwischen 12 und 69 Nucleotiden (Abb. 34a) und in den IgA zwischen 9 und 66 Nucleotiden (Abb. 34b). Es besteht zwischen IgG und IgA kein signifikanter Unterschied in ihrer CDR3-Länge.

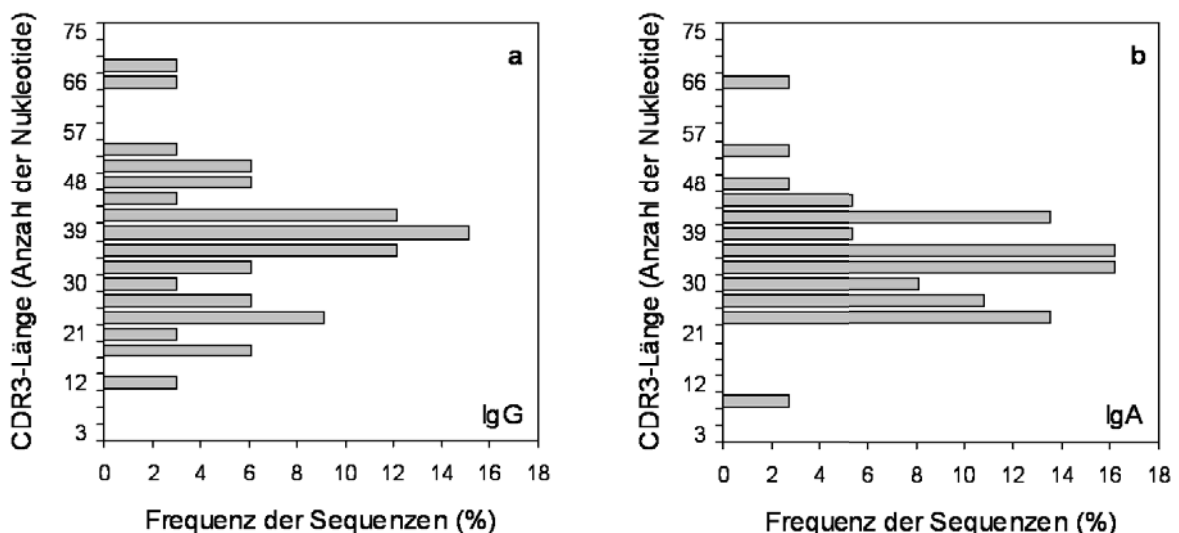


Abb. 34: CDR3-Länge der Immunglobulingene der Plasmazellen von RA-Patienten. Dargestellt ist die Frequenz der Sequenzen zu ihrer CDR3-Länge (Anzahl an Nucleotiden). a) CDR3-Länge der IgG. b) CDR3-Länge der IgA.

4. Diskussion

4.1 Analyse der peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten

4.1.1 Charakterisierung der peripheren B-Zellpopulationen

Die B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen des peripheren Blutes von RA-Patienten und gesunden Kontrollpersonen wurden durchflußzytometrisch durch Nachweis ihrer CD-(Differenzierungscluster-) Oberflächenmoleküle charakterisiert. Die B-Zellen wurden aufgrund ihrer CD19-Expression bestimmt [127] [126] [128] [129] [130]. CD27, CD20- und CD38 wurden als Differenzierungsmarker für die B-Zell-Subpopulationen verwendet: naive B-Zellen ($CD20^+CD38^-CD27^-$), Gedächtnis-B-Zellen ($CD20^+CD38^-CD27^{++}$) und Plasmazellen ($CD20^-CD38^+CD27^{++}$). Die Charakterisierung der naiven und Gedächtnis-B-Zellen ist aufgrund ihrer differentiellen CD20- [130] [141] [142] [143] [144] [145], CD38- [130] [145] [56] [146] [147] sowie CD27-Expression [131] [132] [133] [134] [135] [136] [137] [138] [140] [139] als relativ sicher anzunehmen. Das CD-Expressionsmuster der in dieser Arbeit als Plasmazellen bezeichneten B-Zell-Subpopulation gleicht ebenfalls dem in der Literatur beschriebenen peripheren, Knochenmarks- und *in vitro* erzeugten Plasmazellen, wobei diesen auch morphologische und funktionelle Plasmazelleigenschaften nachgewiesen wurden [130] [157] [146] [158]. Es wurde jedoch aufgrund der HLA-Expression dieser peripheren $CD27^{++}$ B-Zell-Subpopulation suggeriert, daß es sich hierbei wahrscheinlich nicht um terminal differenzierte, sondern frühe Plasmazellen bzw. Plasmablasten handelt [49]. Aufgrund der Vergleichbarkeit zur Literatur wurde in dieser Arbeit jedoch der im Zusammenhang ihrer CD-Expression bekannte Begriff Plasmazellen verwendet, denn auch die intrazelluläre Immunglobulinfärbung und molekularbiologische Untersuchung dieser Zellen in dieser Arbeit zeigt, daß sie eines der wichtigsten Merkmale von Plasmazellen – die Antikörperproduktion – aufweisen. Dazu wurde bei Plasmazellen mittels einer RT-PCR für sezernierte und membranständige Immunglobuline gezeigt, daß sie - im Gegensatz zu Gedächtnis-B-Zellen - mRNA für sezernierte Immunglobuline besitzen. Desweiteren erwies die Sequenzanalyse

der variablen Region der Immunglobulin-cDNA der peripheren Plasmazellen, daß die Aminosäure-kodierenden Triplets der variablen Regionen der Mehrheit der sequenzierten Immunglobuline im Leseraster lagen und damit für funktionelle Antikörper kodieren. Daß diese Immunglobulin-mRNA dieser peripheren Plasmazellen auch in Proteine (Antikörper) translatiert wird, wurde durch eine Färbung intrazellulärer Immunglobuline nachgewiesen. Im Kontext mit der durchflußzytometrischen Analyse der CD-Oberflächenmarker ist somit davon auszugehen, daß die Population der peripheren $CD20^-CD38^+CD27^{++}$ B-Zellen funktionelle Antikörper produzierende B-Zellen und damit zumindest frühe Plasmazellen darstellt.

4.1.2 Veränderte Anzahl und Frequenz der peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten

Die Anzahl und Frequenz der peripheren B-Zellen sowie deren Subpopulationen von RA-Patienten wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt und mit den Werten gesunder Kontrollpersonen verglichen. Die RA-Patienten weisen eine erniedrigte Zahl der peripheren B-Zellen und deren Subpopulationen auf. Da zumeist Gedächtnis- und Plasmazellen sowie große Mengen lokaler Immunglobuline [89], jedoch nur in einem geringen Anteil aller Fälle keimzentrumsähnliche Strukturen [159] sowie unmutierte erst kürzlich aktivierte B-Zellen [160] in den entzündeten Synovien nachgewiesen wurden, ist anzunehmen, daß Gedächtnis- und Plasmazellen, aber auch naive B-Zellen in diese Gelenke einwandern und dort akkumulieren. Vermutlich beruht daher die Verringerung der Zahl der peripheren B-Zellpopulationen in den hier untersuchten RA-Patienten auf deren Akkumulation in den betroffenen Gelenken. Für diese Annahme spricht außerdem, daß auf peripheren B-Zellen von RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen eine veränderte Expression von Chemokinrezeptoren, welche die Wanderung von Lymphozyten in sekundäre lymphatische Gewebe vermitteln, nachgewiesen wurde [161]. Auch die Frequenz der B-Zellen der untersuchten RA-Patienten ist im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen gering, dennoch signifikant erniedrigt. Daher ist anzunehmen, daß in diesen Patienten die Frequenz anderer Lymphozyten-Subpopulationen gering erhöht ist. So ist z.B. bekannt, daß die Frequenz an peripheren T-Zellen bei RA erhöht ist [162] [163]. In der Frequenz

der naiven und der Gedächtnis-B-Zellen besteht zwischen den RA-Patienten und den gesunden Kontrollpersonen kein signifikanter Unterschied. Die Frequenz an Antikörper sezernierenden B-Zellen jedoch ist bei RA-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht. Da ihre Anzahl jedoch erniedrigt ist, scheint die Erhöhung ihrer Frequenz auf der verhältnismäßig stärkeren Erniedrigung der anderen B-Zell-Subpopulationen zu beruhen. Fraglich ist, ob prinzipiell eine alleinige Erhöhung der Frequenz der Plasmazellen ohne Erhöhung ihrer Anzahl pathologische Konsequenzen hat. Daß B-Zellen eine essentielle Rolle als APC im rheumatischen Gelenk zukommt, wurde bereits nachgewiesen [164]. Da periphere Plasmazellen MHC-II exprimieren [49], könnte es somit sein, daß sie ebenfalls als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) fungieren und damit durch ihr häufigeres Auftreten ein anderes Repertoire von T-Zellen aktivieren, als wenn letztere bevorzugt auf Gedächtnis-B-Zellen getroffen wären.

4.1.3 Ausschluß eines Einflusses des Geschlechts auf die veränderten peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten

Die Inzidenz für Rheumatoide Arthritis ist bei Frauen dreifach höher als bei Männern [148], und es ist bekannt, daß sich der Krankheitsverlauf jedoch bei einer Schwangerschaft verbessern kann [165] [166]. Dabei verändert sich der Hormonhaushalt einer Frau derart, daß weniger weibliche und mehr männliche Geschlechtshormone produziert werden. Da die chemische Struktur von Kortikosteroiden und Testosteron ähnlich ist, wurden erstere auf einen Therapieeffekt bei Autoimmunerkrankungen wie RA überprüft und werden heute erfolgreich zur Linderung entzündlicher Vorgänge eingesetzt [166] [167]. Neuere Daten weisen jedoch auch auf andere Faktoren, die im Zusammenhang mit einer Schwangerschaft entzündungshemmend wirken können, hin. So führen während einer Schwangerschaft Änderungen im Fettsäurehaushalt dazu, daß Neutrophile weniger entzündungsfördernde Substanzen wie Arachidonsäure, Leukotrien B₄ u.a. sezernieren, was möglicherweise eine Veränderung der T-Helferzell-Immunantwort (TH1-TH2-Shift) und damit die Toleranz des Fetus verursacht [168] [169] [170] [171]. Eine erhöhte Inzidenz für RA wiederum ist besonders bei Frauen zu Beginn der Menopause festzustellen [172]. Es ist daher nicht auszuschließen,

daß das Geschlecht der RA-Patienten einen Einfluß auf die Art der T-Zell-Hilfe und damit auf die B-Zellen besitzt. Die in dieser Arbeit untersuchten RA-Patienten weisen einen hohen Anteil an Frauen auf, deshalb mußte sichergestellt werden, daß die durchflußzytometrisch ermittelten Veränderungen der peripheren B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen der RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nicht allein auf geschlechtsspezifische Differenzen zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurden die männlichen mit den weiblichen RA-Patienten bezüglich der veränderten B-Zellen und deren Subpopulationen verglichen, jedoch ist zwischen männlichen und weiblichen RA-Patienten in keiner dieser Variablen ein signifikanter Unterschied festzustellen. Der hohe Anteil an Frauen bzw. ein geschlechtsspezifischer Einfluß kann somit als Ursache für die veränderten Werte der B-Zellen und deren Subpopulationen der untersuchten RA-Patienten ausgeschlossen werden.

4.1.4 Ausschluß eines Einflusses des Alters auf die veränderten peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten

Es wurde gezeigt, daß mit zunehmendem Alter das Potential zur Neubildung reifer naiver B-Zellen im Knochenmark, die Fähigkeit zur Entwicklung von Keimzentren und die Generierung neuer Gedächtnis-B-Zellen und IgG-sezernierender Plasmazellen entscheidend abnimmt [173] [174] [175] [176]. Daß die Anzahl der B-Zellen dennoch mit zunehmendem Alter konstant bleibt, liegt wohl an der im Alter zunehmenden längeren Lebensdauer der B-Zell-Subpopulationen [177] [178] [179]. Die in dieser Arbeit untersuchten RA-Patienten weisen im Median ein höheres Alter als die gesunden Kontrollpersonen auf. Es mußte daher ausgeschlossen werden, daß die durchflußzytometrisch ermittelten Veränderungen der peripheren B-Zellen und deren Subpopulationen der Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nicht allein in altersbedingten Ursachen zu suchen sind. Deshalb wurden die jüngeren mit den älteren RA-Patienten auf signifikante Unterschiede bezüglich dieser veränderten B-Zellen und deren Subpopulationen verglichen. Es wurde zwar ein geringer negativer Zusammenhang zwischen dem Alter und der Größe dieser Zellpopulationen gefunden, jedoch konnte ausgeschlossen werden, daß dieser Zusammenhang die

allgemeinen Veränderungen der B-Zellen und deren Subpopulationen der untersuchten RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen hervorrief.

4.1.5 Ausschluß eines Einflusses der Krankheitsdauer auf die veränderten peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten

Es könnte vermutet werden, daß mit zunehmender Krankheitsdauer aufgrund der pathologischen Vorgänge eine zunehmende Veränderung der peripheren B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen eintritt. Andererseits bestünde die Möglichkeit, daß die adäquate Medikation während des Krankheitsverlaufs eine Normalisierung dieser Zellpopulationen bewirkt. Die statistischen Test erwiesen jedoch für die hier untersuchten RA-Patienten, daß deren Krankheitsdauer nicht mit ihrer Anzahl und Frequenz der B-Zellen sowie der Anzahl der naiven und der Gedächtnis-B-Zellen korreliert und somit nicht für deren Unterschiede im Vergleich zu gesunden Kontrollen verantwortlich gemacht werden kann. Jedoch ist mit zunehmender Krankheitsdauer eine Erhöhung der Anzahl der Plasmazellen festzustellen. Somit steht die Krankheitsdauer der Patienten offensichtlich nicht in direktem Zusammenhang zu der Verringerung der Plasmazellzahl gegenüber gesunden Personen. Da außerdem festgestellt wurde, daß das Alter der Patienten gering negativ mit der Plasmazellzahl, aber nicht mit der Krankheitsdauer korreliert, ist auszuschließen, daß der Zusammenhang zwischen Plasmazellzahl und Krankheitsdauer indirekt durch das Alter vermittelt wird. Desweiteren ist mit zunehmender Krankheitsdauer eine geringe Erhöhung der Frequenz der Plasmazellen festzustellen. Da auch die Frequenz der Plasmazellen insgesamt bei den RA-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erhöht ist, scheint die Krankheitsdauer in direktem Zusammenhang zu diesen Veränderungen zu stehen. Es ist daher zu vermuten, daß trotz der erniedrigten Anzahl mit zunehmender Krankheitsdauer entweder eine vermehrte Bildung oder Akkumulation peripherer Plasmazellen geschieht.

4.1.6 Ausschluß eines Einflusses der Therapie auf die veränderten peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten

Desweiteren wurde der Einfluß der Therapie auf die peripheren B-Zellen und B-Zellsubpopulationen der RA-Patienten analysiert. Die basistherapierten weisen

gegenüber den nichtbasistherapierten RA-Patienten signifikant erniedrigte Werte der Krankheitsaktivitätsmarker wie der Blutsenkgeschwindigkeit, des C-reaktiven Proteins sowie der Anzahl schmerzhafter und geschwollener Gelenke auf, was den positiven therapeutischen Effekt der Behandlung widerspiegelt. Die zwischen den RA-Patienten und gesunden Kontrollpersonen bestehenden Veränderungen der B-Zellen und deren Subpopulationen weisen die unbehandelten wie auch die behandelten RA-Patienten gleichermaßen auf. Auch jene Parameter, die bei den RA-Patienten zu den Kontrollpersonen unverändert sind, bleiben bei unbehandelten und behandelten Patienten gleichermaßen zu Kontrollwerten unverändert. Die Einteilung der Patienten nach der Art ihrer Basistherapie zeigte, daß nur eine Basistherapie mit „Biologicals“ in der Lage ist, einige der Krankheitsaktivitätsmarker signifikant zu senken. Neben geringen Effekten auf einzelne B-Zellpopulationen muß jedoch festgestellt werden, daß weder eine Basistherapie an sich noch die Art der Basistherapie für die veränderte Anzahl und Frequenz der B-Zellen und der B-Zell-Subpopulationen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen verantwortlich gemacht werden kann bzw. eine Normalisierung derselben bewirkt.

4.1.7 Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und peripheren B-Zellpopulationen der RA-Patienten

Eines der Ziele dieser Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob Veränderungen der Größe der B-Zellpopulationen im Blut von RA-Patienten als zusätzlicher Indikator für die Krankheitsaktivität benutzt werden können, so, wie es für z.B. Systemischen Lupus Erythematosus (SLE) suggeriert wurde [180]. Es wurde daher untersucht, ob die Anzahl und Frequenz der peripheren B-Zellen sowie deren Subpopulationen mit Krankheitsaktivitätsparametern wie der Blutsenkgeschwindigkeit, Rheumafaktoren, C-reaktivem Protein, der Anzahl schmerzhafter und geschwollener Gelenke, der Selbsteinschätzung des Patienten sowie dem Krankheitsaktivitätsindex korrelieren. Zwischen sämtlichen Aktivitätsmarkern (außer den Rheumafaktoren) besteht eine geringe bis hohe Korrelation. Die Ursache für die fehlende Korrelation der Rheumafaktorwerte zu den meisten der Aktivitätsmarker liegt wahrscheinlich darin, daß bei den untersuchten Patienten ausschließlich Rheumafaktoren der IgM-Klasse ermittelt

wurden, denn Studien zeigen, daß besonders Rheumafaktoren der IgA-Klasse mit der Aktivität der Krankheit korrelieren [98] [99] [100]. Die B-Zellen und Plasmazellen korrelieren nur gering mit einem der Aktivitätsmarker, lediglich die naiven weisen geringe positive Korrelationen, die Gedächtnis-B-Zellen geringe negative Korrelationen zu mehreren Krankheitsaktivitätsmarkern auf. Bei dieser Analyse muß in Betracht gezogen werden, daß durch Zusammenfassung aller ermittelten Werte eines RA-Patienten zu verschiedenen Meßdaten krankheitsaktive und -inaktive Phasen die evtl. zwischen aktiven und inaktiven Phasen bestehenden Unterschiede in den B-Zellpopulationen verschwimmen. Das Herausnehmen einzelner Werte eines bestimmten Meßdatums eines jeden RA-Patienten ist andererseits nicht möglich, da dies einer subjektiven Auswahl unterläge. Deshalb wurden außerdem alle Einzelwerte der Patienten auf Korrelationen zwischen B-Zellpopulationen und Aktivitätsmarkern überprüft, obwohl dabei zu beachten ist, daß einige RA-Patienten mehrfach analysiert wurden und somit in der Statistik überrepräsentiert sind. Hierbei ergeben sich zusätzliche Korrelationen zwischen der Blutsenkgeschwindigkeit und der Frequenz naiver B-Zellen sowie zwischen der Anzahl und Frequenz der Plasmazellen zu den Rheumafaktoren. Damit steht fest, daß sich die Krankheitsaktivität eines Patienten auch in der Größe der peripheren B-Zell-Subpopulationen ausdrückt und somit die Bestimmung letzterer als Marker für Veränderungen der Krankheitsaktivität herangezogen werden könnten. Es besteht nun die Frage, ob eine einmalige FACS-Analyse der peripheren B-Zellpopulationen eines RA-Patienten dem Arzt eine Beurteilungsgrundlage über die Krankheitsaktivität dieses Patienten bringen kann. Dazu müßte eine konkrete Grenze der Normalwerte der B-Zellpopulationen definiert werden, um aus den entsprechenden Veränderungen Aussagen über die Krankheitsaktivität ableiten zu können. Die Zahl der B-Zellen und deren Subpopulationen ist bei fast allen RA-Patienten gegenüber gesunden Kontrollpersonen massiv erniedrigt, die Frequenz der B-Zellen streut bei den Patienten und gesunden Personen vergleichbar, und die Frequenz der naiven und Gedächtnis-B-Zellen jedoch ist bei Patienten und Gesunden gleich. Damit ist diese Möglichkeit der konkreten Grenzziehung mittels dieser Parameter nicht möglich. Jedoch ist die Plasmazellzahl vieler, aber nicht aller Patienten zu den Maximalwerten gesunder Personen erhöht, wobei die

Patienten sehr mit ihren Werten streuen, die gesunden Personen jedoch unter der Grenze von 2,5% bleiben. Jedoch auch ein Überschreiten der Grenze von 2,5% Plasmazellen bietet keine Möglichkeit der Ermittlung einer erhöhten Krankheitsaktivität, da die Patienten mit erhöhter Plasmazellfrequenz lediglich höhere Rheumafaktorwerte als jene mit normalen Frequenzen besitzen, jedoch in allen anderen Aktivitätsmarkern keine Unterschiede aufweisen. Somit scheint die einmalige Analyse der Anzahl bzw. Frequenz der B-Zellen und ihrer Subpopulationen keine Grundlage zur Beurteilung der Krankheitsaktivität eines RA-Patienten zu bieten. Desweiteren wurde das Verhalten der Plasmazellen im Vergleich zu Krankheitsaktivitätsmarkern einzelner Patienten während längerer Zeiträume analysiert. Die Anzahl und Frequenz der Plasmazellen zeigt im zeitlichen Verlauf ein ähnliches Muster des Anstiegs und Abfalls wie die Krankheitsaktivitätsmarker. Es ist dabei festzustellen, daß 1. nur in einigen Patienten ein Zusammenhang zwischen Aktivitätsmarkern und Plasmazellen besteht, daß 2. bei diesen nicht alle Aktivitätsmarker mit den Plasmazellen korrelieren und 3. daß teilweise nur die Frequenz oder die Anzahl der Plasmazellen einen ähnlichen Verlauf wie die Aktivitätsmarker zeigen. Daher ist es denkbar, daß nur im Kontext zu anderen Aktivitätsmarkern bzw. den anderen B-Zellpopulationen der Nachweis einer im Vergleich zu vorangegangenen Messungen erhöhten Plasmazellzahl- oder Frequenz dem Arzt Sicherheit über die Verbesserung oder Verschlechterung des Krankheitszustandes eines bereits seit längerer Zeit betreuten Patienten bringen kann. Ebenso wäre es denkbar, eine Ermittlung der Anzahl und Frequenz der naiven und Gedächtnis-B-Zellen aufgrund der nachgewiesenen positiven bzw. negativen Korrelationen zu einigen Aktivitätsmarkern ebenso in die zeitliche Beobachtung eines Patienten zur Beurteilung seiner Krankheitsaktivität einzubeziehen. Natürlich bedeutet die FACS-Analyse im Vergleich zu anderen labordiagnostischen Maßnahmen eine relativ kostenintensive und erfahrungsbedürftige Methode. Daher muß in weiteren Arbeiten der Zusammenhang zwischen B-Zellen und der Krankheitsaktivität bei RA eingehender analysiert werden.

Ein interessantes Ergebnis beider Analysen der Mediane wie auch der Einzelwerte ist, daß die naiven B-Zellen und die Plasmazellen positiv, die Gedächtnis-B-Zellen jedoch negativ mit einigen Aktivitätsmarkern korrelieren. Dies bedeutet, daß die

Zahl und Frequenz der naiven B-Zellen und Plasmazellen mit zunehmender Krankheitsaktivität steigt, die Zahl und Frequenz der Gedächtnis-B-Zellen jedoch sinkt. Es ist folgende Erklärung dafür denkbar: Bei Krankheitsaktivität wandern antigenaktivierte Gedächtnis-B-Zellen aus dem peripheren B-Zell-Pool in sekundäre lymphatische Gewebe (oder ektopische Keimzentren in betroffenen Gelenken), um dort Keimzentrumsreaktionen zu unterliegen. Somit sinkt ihre Zahl bzw. Frequenz im Blut. Andererseits akkumulieren vermehrt aus dem Knochenmark kommende reife naive B-Zellen im Blut, um den peripheren B-Zell-Pool zu erhalten. Damit steigt ihre periphere Anzahl und Frequenz. Daß solch ein Ausgleich auch in aktiven Phasen erfolgt, zeigt, daß die Anzahl der Gesamt-B-Zellen nur gering mit der Anzahl der schmerzhaften Gelenke und sonst keinem der Aktivitätsmarker korreliert. Dies bedeutet, daß sich die Größe des B-Zell-Pools in den RA-Patienten nicht aktivitätsabhängig ändert, sondern relativ konstant bleibt.

4.2 Analyse der Immunglobuline der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten

4.2.1 Immunglobulinklassen der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten

Eine intrazelluläre Färbung sowie die molekularbiologische Untersuchung der Immunglobuline von Plasmazellen des peripheren Blutes der RA-Patienten erwies im Vergleich zu gesunden Personen eine Verringerung des Verhältnisses IgA- zu IgG-sezernierender Plasmazellen. Aufgrund der allgemeinen Erniedrigung der Anzahl der Plasmazellen sowie der wesentlich stärkeren Erniedrigung der Zahl der IgA- als der IgG-sezernierenden Plasmazellen der RA-Patienten im Vergleich zu Werten gesunder Personen [149] [150] ist davon auszugehen, daß diese Verringerung des IgA/IgG-Verhältnisses weniger auf einer Erhöhung des Anteils IgG-sezernierender, sondern auf einer Verringerung des Anteils IgA-sezernierender Plasmazellen beruht. Bei Patienten mit selektiver IgA-Defizienz wurde gezeigt, daß sie vermehrt unter Autoimmunerkrankungen wie RA und Systemischen Lupus Erythematodes (SLE) leiden [181], jedoch ist umgekehrt eine derartige Veränderung des Verhältnisses IgA- zu IgG-sezernierender

Plasmazellen nicht beim SLE zu finden [49]. Langzeitstudien an gesunden Menschen mit IgA-Defizienz bzw. -Erniedrigung zeigen keine erhöhte Prävalenz für RA [182], daher ist zu vermuten, daß die Verschiebung des IgA/IgG-Verhältnisses weniger ursächlich, sondern eher eine Folge von RA ist. Analysen ergaben, daß im Synovium von RA-Patienten IgG sezernierende B-Zellen dominieren [183]. Somit kann diese Verringerung des Anteils peripherer IgA sezernierender Plasmazellen nicht auf deren Einwanderung in die Gelenke beruhen. Es wird vermutet, daß in ektopen Keimzentren rheumatischer Synovien bevorzugt ein Klassenwechsel von IgM- zu IgA-, aber nicht zu IgG-Rheumafaktoren geschieht [184], was ein vermehrtes Einwandern von vorwiegend IgG sezernierenden peripheren Plasmazellen in die betroffenen Gelenke suggeriert. Damit müssen andere Mechanismen statt der Akkumulation IgA sezernierender Plasmazellen in den Gelenken für die Erniedrigung des Anteils IgA sezernierender Plasmazellen im Blut von RA-Patienten in Betracht gezogen werden. Denkbar wäre, daß in RA T-Helferzellen regulierend bzw. repressiv auf den Klassenwechsel zu IgA während der Keimzentrumsreaktionen in nichtsynovialen Keimzentren wirken und somit die Bildung peripherer IgA sezernierender Plasmazellen vermindern und andererseits die in synovialen ektopen Keimzentren gebildeten IgA sezernierenden Plasmazellen die fehlende Zahl nicht auszugleichen vermag. Im weiteren Verlauf dieser Diskussion wird im Zusammenhang zu anderen hier nachgewiesenen Eigenschaften der Immunglobuline IgA sezernierender Plasmazellen der RA-Patienten auf weitere denkbare Gründe für diese Verschiebung eingegangen.

Die Summe der Frequenz IgG und IgA sezernierender Plasmazellen beträgt bei den hier untersuchten Patienten etwa 70%, es erhebt sich damit die Frage, welche anderen Klassen außer IgG und IgA sezerniert werden. Es könnte vermutet werden, daß es sich bei dem restlichen Anteil um IgM sezernierende B-Zellen handelt, da nachgewiesen wurde, daß IgM-Zellen zu 90% Rheumafaktoren (RF) produzieren und bei einigen RA-Patienten bis zu 50% der Immunglobuline Rheumafaktoren [183] und außerdem die in dieser Arbeit mittels FACS bezüglich der intrazellulären Ig-Klassen untersuchten Patienten größtenteils seropositiv für IgM-RF sind. Die molekularbiologischen Analysen dieser Arbeit zeigen jedoch, daß nur 2 von 80 Plasmazell-Ig-Sequenzen IgM-mRNA besitzen. Jedoch sind die Patienten, von denen Immunglobulin-cDNA sequenziert wurde, im Gegensatz zu

den FACS-analysierten zu mindestens 80% (prinzipiell bzw. zum Zeitpunkt der Analyse, bei einem Patienten unbekannt) IgM-RF-seronegativ. Dies könnte die geringe Anzahl ermittelter IgM-Sequenzen erklären. Dies läßt vermuten, daß ein hoher Anteil der FACS-analysierten Plasmazellen der seropositiven Patienten nicht nur IgM, sondern speziell IgM-RF sezerniert.

Von den sequenzierten Immunglobulin-cDNA der Antikörper sezernierenden B-Zellen sind 55,5% Ig κ und 26% Ig λ (68,0% Ig κ und 31,9% Ig λ bezogen auf alle leichten Ketten) was einem κ/λ -Quotienten von 2,13 entspricht. Gesunde Personen weisen im Serum 57,4–127,6mg/L κ - und 26,9-63,8mg/L λ -Ketten mit einem κ/λ -Quotienten von 1,1-2,7 auf (nach verschiedenen dts. Laborstandards und [185]), auch andere molekularbiologische Analysen der Immunglobuline von gesunden Personen weisen eine "Ausbeute" von 67,8% Ig κ und 32,2% Ig λ auf [153]. Es existiert demnach bezüglich der κ/λ -Nutzung kein Unterschied zwischen den untersuchten RA-Patienten und gesunden Personen. Während der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark werden zuerst die Ig κ - und bei Fehlschlag die Ig λ -Ketten umgeordnet [17] [18]. Das Ergebnis kann somit so gedeutet werden, daß auch bei RA-Patienten ein im normalen Rahmen üblicher Rearrangierungserfolg der Ig κ -Gene der B-Zellen besteht.

4.2.2 Selektiertes V-(D-)J-Repertoire der Immunglobulingene der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten

Die Immunglobuline der Plasmazellen der hier untersuchten RA-Patienten weisen ein stark verändertes V- und J-Genfamilienrepertoire im Vergleich zum Keimbahnrepertoire [2] auf. Es ist bekannt, daß das Immunglobulin-Repertoire von peripheren B-Zellen nicht eine zufällige Repräsentierung des Keimbahn-Immunglobulingen-Repertoires darstellt. B-Zellen gesunder Personen weisen ein Immunglobulinrepertoire mit verringerter oder vermehrter Nutzung bestimmter Ig-Gene bzw. -Familien auf, als allein durch die Zahl der entsprechenden funktionellen Keimbahngene erklärbar wäre [186]. Jedoch auch im Vergleich zur Frequenz der verwendeten Genen und Genfamilien naiver B-Zellen gesunder Personen [151] werden von den analysierten Sequenzen bestimmte Genfamilien häufiger (V_H4, J_H4, J_κ1) bzw. vermindert (V_H1, J_H6, J_κ4) genutzt. Auch einzelne

Mitglieder dieser Genfamilien werden vermindert (3-07, 4-59) bzw. vermehrt (3-15, 4-61) genutzt. Die vermehrte V_{H4} -Familien-Nutzung gleicht den Ergebnissen von Plasmazellen aus dem Synovium von RA-Patienten [160]. Es wird angenommen, daß die negative Selektion autoreaktiver bzw. die positive Selektion hochaffiner B-Zellen nach dem somatischen Hypermutationsprozeß derartige Verschiebungen hervorruft [35] [38] [39] [40]. Auffällig war weiterhin die unterschiedliche Nutzung der V_{H3} - und V_{H4} -Genfamilien innerhalb der IgG und IgA, wobei das Genfamilien-Reperoire der IgA-Sequenzen eher dem von naiven B-Zellen gesunder Personen ähnelt als das der IgG-Sequenzen, und somit besonders die IgG zur erhöhten V_{H4} -Nutzung innerhalb aller Sequenzen der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten im Vergleich zu naiven B-Zellen gesunder Personen beitragen. Wie bereits unter 4.2.1 erwähnt wurde, wurde gezeigt, daß in ektopen Keimzentren rheumatischer Synovien bevorzugt ein Klassenwechsel von IgM- zu IgA-, aber nicht zu IgG-Rheumafaktoren geschieht [184]. Es könnte somit vermutet werden, daß auch die in dieser Arbeit untersuchten peripheren Plasmazellen in verschiedenen Keimzentren (Synovien vs. „normale“ lymphatische Gewebe) mit unterschiedlichem „Milieu“ (lokale [Auto]Antigene, T-Zellhilfe etc.) gebildet und somit unterschiedlich auf ihr V-Genfamilien-Repertoire selektiert wurden. Ob die festgestellten V_H -Repertoire-Unterschiede zwischen IgG und IgA auch bei nichtrheumatischen akuten Immunreaktionen bestehen, ist zu eruieren.

Die Unterschiede im V-J-Repertoire der Ig_{λ} -Ketten zum genomischen V_{λ} -Repertoire sowie dem V_{λ} -Repertoire naiver B-Zellen gesunder Personen sind nur unter Vorbehalt als solche zu erklären, da die Anzahl aus den RT-PCR erhaltenen Ig_{λ} -Sequenzen sehr gering ist. Auch über Veränderungen der Nutzung der D-Genfamilien läßt sich keine sichere Aussage treffen, da die Datenbanksoftware [2] zum Vergleich der Sequenzen mit Keimbahngenen einerseits oft keine D-Gene erkannte und diese auch manuell nicht bestimmbar waren, andererseits oft mehrere D-Gene mit vergleichbarer Keimbahnhomologie erkannt wurden und somit keine eindeutige Zuordnung möglich war. Es ist zusammenfassend festzustellen, daß die Immunglobuline der Plasmazellen der RA-Patienten ein selektiertes Repertoire an V-Genfamilien aufweisen, was auf eine erfolgte Affinitätsreifung der peripheren Plasmazellen in den RA-Patienten hindeutet.

4.2.3 Vermehrte somatische Hypermutationen der V-Gene der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten

Naive B-Zellen weisen nur die geringe Frequenz von 0,3% an Mutationen in der für die Antigenbindung entscheidenden variablen Region auf [187], wohingegen die Mutationsfrequenz der mit einem Antigen in Kontakt stehenden oder gestandenen klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen 4% (ca. 12 Mutationen) beträgt [188]. Die während der Keimzentrumsreaktion in die V-Gene antigenaktivierter B-Zellen eingeführten Punktmutationen (somatische Hypermutation) dienen der Erhöhung der Affinität des B-Zell-Rezeptor- bzw. Antikörperrepertoires für diese Antigene [41] [34] [36]. Die Mutationsrate pro Basenpaar und Zellzyklus während der Keimzentrumsreaktion wird mit 10^{-3} angegeben [189] [190]. Bei einer Generationszeit von ca. 8h entspricht dies somit einer Mutation in einem V_H -Gen von 300bp Länge pro Tag. In den in dieser Arbeit sequenzierten variablen Regionen der schweren Immunglobulinketten der Plasmazellen der RA-Patienten wurden bis zu 48 Stück bzw. 16% somatische Hypermutationen gefunden, wobei die Fehlerrate der Polymerase vernachlässigbar war ($2,5 \times 10^{-3}$, Diplomarbeit N. Wittenbrink). Dies deutet darauf hin, daß die Plasmazellvorläufer mehrere Keimzentrumsreaktionen durchliefen und somit diese hohe Anzahl bzw. Frequenz somatischer Mutationen in ihren IgV-Genen akkumulierte. Es wurde nachgewiesen, daß in ektopen Keimzentren bzw. entzündetem Synovialgewebe unterschiedlicher Körperregionen eines RA-Patienten klonal verwandte Plasmazellen zu finden sind [191]. Daher ist nicht auszuschließen, daß die in dieser Arbeit untersuchten peripheren Plasmazellen nicht nur Keimzentrumsreaktionen der „normalen“ sekundären Lymphorgane, sondern auch synovialen ektopen Keimzentren entstammen und deren Vorläufer zwischen den offensichtlich mehrfach stattgefundenen antigenabhängigen Aktivierungen und Keimzentrumsreaktionen durch das Blut zirkulierten, um an anderer (oder gleicher) Körperregion bzw. Gelenk erneut Keimzentrumsreaktionen zu unterliegen, und schließlich eine derart hohe Anzahl und Frequenz somatischer Hypermutationen akkumulierten.

4.2.4 R- und S- Mutationen der V-Gene der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten

Die während der Keimzentrumsreaktion in die V-Gene eingefügten somatischen Hypermutationen führen dazu, daß die Codons (Aminosäure kodierende Basentriplets) entweder die ursprüngliche (stille Mutationen, S-Mutationen) oder eine veränderte Aminosäuresequenz (Aminosäure ersetzende [replacement] Mutationen, R-Mutationen) kodieren. In den FR funktioneller V-Gene peripherer B-Zellen gesunder Personen B-Zellen beträgt das R/S-Verhältnis etwa 2 [154] [155] [156]. Die Ursache dafür liegt vermutlich darin, daß zu sehr in den Gerüstregionen mutierte B-Zellen negativ selektiert werden, da deren der Antikörperstabilität bzw. -struktur nicht gewährleistet wäre. Das Verhältnis von R- zu S-Mutationen in den FR der in dieser Arbeit untersuchten schweren Ig-Ketten peripherer Plasmazellen von RA-Patienten liegt ebenfalls in diesem Bereich, was auch hier die Notwendigkeit des Erhalts der Struktur des Antikörpers durch die FR widerspiegelt. In den CDR funktioneller V-Gene peripherer B-Zellen gesunder Personen liegt das R/S-Verhältnis bei etwa 4 [154] [156] und damit höher als in den FR, was bedeutet, daß bei Keimzentrumsreaktionen vermehrt Aminosäureaustausche in den antigenbindenden Regionen stattfinden und zur Erhöhung der Antigenaffinität des Immunglobulins beitragen. Das R/S-Verhältnis in den CDR der V-Gene peripherer Plasmazellen der RA-Patienten bewegt sich somit im normalen Rahmen. Das höhere R/S-Verhältnis in den CDR der Ig-Sequenzen gegenüber den FR in V-Genen der Plasmazellen der RA-Patienten kann somit so gedeutet werden, daß es sich hierbei um affinitätsgereifte Plasmazellen handelt. Im Kontext zur hohen Frequenz der Plasmazellen, ihrer hohen Anzahl und Frequenz somatischer Mutationen in den V-Genen sowie ihres selektierten V-Genrepertoire ist zu vermuten, daß sie das Ergebnis einer krankhaften, chronischen Aktivierung des B-Zellsystems in RA darstellen.

Die IgG-Sequenzen der Plasmazellen der Patienten weisen in den CDR ein niedrigeres Verhältnis von R- zu S-Mutationen als die IgA-Sequenzen auf. Im Vergleich zum R/S-Verhältnis funktioneller V-Gene peripherer B-Zellen gesunder Personen weisen die IgA ein normales, die IgG jedoch ein erniedrigtes R/S-Verhältnis auf. Dieses Ergebnis kann unterschiedlich gedeutet werden: Einerseits kann das niedrigere R/S-Verhältnis in den IgG eine verminderte Veränderung der

Aminosäuresequenz in den antigenbindenden Bereichen und damit eine niedrigere Antigenaffinität der IgG im Vergleich zu den IgA bedeuten. Andererseits kann auch bei einem niedrigerem R/S-Verhältnis in den IgG eine zu den IgA vergleichbare Antigenaffinität nicht ausgeschlossen werden, da die Affinität der initial aktivierten, zu IgG klassengewechselten B-Zellen bereits bei unmutierten CDR relativ hoch gewesen sein kann. Es wurde gezeigt, daß die häufig im Blut von RA-Patienten anzutreffenden Rheumafaktoren der IgA-Klasse schneller und sicherer mit der Krankheitsaktivität als Rheumafaktoren der IgM-Klasse korrelieren [98] [100] [99]. Damit ist die erstere der beiden Möglichkeiten - eine höhere Antigenaffinität der IgA als der IgG sezernierenden Plasmazellen - in Betracht zu ziehen. Da die Anzahl bzw. Frequenz der somatischen Hypermutationen in den IgA und den IgG gleich ist, könnte vermutet werden, daß während Keimzentrumsreaktionen auf B-Zellen, die zu IgA wechselten, ein stärkerer Selektionsdruck als auf B-Zellen, die zu IgG wechselten, lastete, und somit bevorzugt jene Zellen, die vermehrte R-Mutationen und damit eine stärkere Antigenaffinität aufwiesen, positiv selektiert wurden. Analysen zeigen, daß in ektopen Keimzentren rheumatischer Synovien ein Klassenwechsel von IgM-Rheumafaktoren nur zu IgA, nicht jedoch zu IgG geschieht [184]. Eine Analyse der IgV_H-Gene von Plasmazellen aus verschiedenen betroffenen Gewebe von RA-Patienten zeigte, daß das R/S-Verhältnis in den CDR mit der lokalen Krankheitsdauer zunimmt [191] [192]. Da zu anzunehmen ist, daß es sich bei den in dieser Arbeit analysierten peripheren Plasmazellen u.a. auch um Autoantikörper- bzw. Rheumafaktoren-sezernierende Zellen handelt, könnte dieser Selektionsdruck durch lokale synoviale (Auto)Antigene bzw. die adäquate T-Zellhilfe für zu IgA klassenwechselnden B-Zellen vermittelt werden, die ihrerseits wiederum IgA-Antikörper mit hoher Autoantigenaffinität sezernieren und mit deren Effektormechanismen zur Krankheitsaktivität beitragen. Im Kontext dieser Ergebnisse könnte die unter 4.2.1 diskutierte Verringerung des Anteils IgA-gegenüber IgG produzierender B-Zellen damit erklärt werden, daß ein hoher Anteil zu IgA klassengewechselter Keimzentrums-B-Zellen höheraffin für Autoantigene als die IgG klassengewechselten B-Zellen ist, somit vermehrt negativen Selektionsmechanismen unterliegt und deshalb in geringerer Anzahl in die Peripherie entkommt.

4.2.5 CDR3-Länge der Immunglobulingene der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten

Die antigenbindenden Bereiche von Antikörpern werden durch die CDR gebildet. Da die V-(D-)J-Gensegmente der Ig-Ketten während der somatischen Rekombination ungenau miteinander verknüpft werden, sind die CDR3 von Immunglobulinen unterschiedlich lang. Die CDR3-Längen der schweren Ig-Ketten der Plasmazellen der RA-Patienten sind im Mittelwert etwas kürzer als die CDR3-Länge von V_H -Genen naiver B-Zellen gesunder Personen [151]. Es ist bekannt, daß mutierte Antikörper eine um ca. 3 Aminosäuren kürzere CDR3 als unmutierte Antikörper besitzen. Es wird vermutet, daß bei Keimzentrumsreaktionen eher Plasmazellen mit Ig mit kürzerer CDR3 selektiert werden, da eine kürzere CDR3 mehr Platz für das Antigen bietet, dieses somit auch an CDR1 und CDR2 bindet, und somit alle CDR und deren während der Hypermutation eingefügten Mutationen zur besseren Antigenbindung beitragen können [193]. Damit scheint die CDR3-Länge der Ig der Plasmazellen der RA-Patienten im normalen Bereich zu liegen. Bei gesunden Personen sind selten B-Zellen mit CDR3 über 10As in V_K zu finden. Jedoch sind die Ig_K -Ketten in einigen Patienten mit RA angereichert mit längeren CDR3, welche für 11 Aminosäuren codieren [138] [194]. Auch unter den in dieser Arbeit untersuchten Ig_K peripherer Plasmazellen von RA-Patienten konnten 2 Sequenzen mit einer CDR3-Länge von 11 Aminosäuren nachgewiesen werden. Die hier untersuchten Ig_λ -Sequenzen weisen am häufigsten eine CDR3-Länge von 30 bzw. 36bp auf und scheinen somit länger als die von Ig_λ -Sequenzen peripherer B-Zellen gesunder Personen, die am häufigsten eine Länge von 33bp und 30bp aufweisen [153]. Jedoch ist die Anzahl der sequenzierten Ig_λ zu gering, um dieses Ergebnis wirklich als eine Veränderung der CDR3-Länge in Ig_λ der Plasmazellen der untersuchten RA-Patienten deuten zu können.

4.3 Ausblick

Die initialen Prozesse, die zur Entstehung von Rheumatoider Arthritis bzw. zur Entzündung und Zerstörung der Gelenke führen, sind nach wie vor unbekannt. Offensichtlich ist, wie in dieser Arbeit gezeigt, das B-Zell-System bei RA chronisch aktiviert, was sich in Veränderungen der peripheren B-Zell-Populationen, in deren Korrelation mit der Krankheitsaktivität und im Auftreten mehrfach affinitätsgereifter antigenselektierter Plasmazellen zeigt. Bis jetzt wurden keine Antikörper, die eine Spezifität für ein ausschließlich synoviales Autoantigen besitzen und somit zur Initiierung der entzündlichen Mechanismen beitragen könnten, nachgewiesen. Deshalb liegt ein wichtiger Schlüssel zur Klärung dieser Prozesse in der Erforschung der Antigenpezifitäten von Plasmazellen in RA-Patienten. Die in dieser Arbeit etablierte Einzelzell-RT-PCR bietet prinzipiell die Möglichkeit, die Antikörper von einzelnen Plasmazellen in ihrer ursprünglichen Kombination der schweren und leichten Immunglobulinketten zu analysieren. Dieser Vorteil könnte genutzt werden, um die Antigenpezifität von B-Zellen, die sie natürlicherweise besitzen, zu bestimmen. Dazu können die cDNA der schweren und leichten Immunglobulinketten einzelner FACS-sortierter Plasmazellen in Expressionsvektoren kloniert, rekombinante (Fab)²-Fragmente dieser Antikörper hergestellt und diese auf Spezifität für Autoantigene in der Synovialflüssigkeit oder -membran von RA-Patienten mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) oder SEREX (serological analysis of recombinant cDNA expression libraries) getestet werden. Dies könnte einen weiteren Aufschluß über die Spezifität von Plasmazellen in RA-Patienten und somit über Mechanismen der Pathogenese von Rheumatoider Arthritis geben.

5. Zusammenfassung

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische Autoimmunkrankheit, die sich vorwiegend in der Entzündung und Zerstörung der Gelenke äußert. In betroffenen Gelenken wurden tertiäre lymphatische Gewebe nachgewiesen, die eine lokale antigenabhängige Differenzierung von B-Zellen zu Gedächtnis- und Plasmazellen zu unterstützen scheinen. Im Blut von RA-Patienten werden häufig Autoantikörper nachgewiesen, wobei besonders Rheumafaktoren mit der Krankheitsaktivität korrelieren. Bei der chronischen Autoimmunerkrankung SLE wurde gezeigt, daß sich mit zunehmender Krankheitsaktivität die Population peripherer Plasmazellen vergrößert. Daher bestand ein Ziel dieser Arbeit darin, zu untersuchen, ob auch Veränderungen der peripheren B-Zellen und deren Subpopulationen bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis feststellbar sind und deren Größe mit der Krankheitsaktivität korrelierbar ist, um damit möglicherweise neue Parameter für die klinische Diagnostik der RA bzw. die Einschätzung der Krankheitsaktivität von RA-Patienten zu schaffen. Außerdem sollten untersucht werden, ob die Immunglobuline der peripheren Plasmazellen veränderte Eigenschaften aufweisen, um daraus Rückschlüsse auf den Aktivierungsstatus und die Antigenaffinität dieser Plasmazellen ziehen zu können.

Es wurde mittels Durchflußzytometrie die Größe der B-Zellpopulationen des peripheren Blutes von RA-Patienten ermittelt und mit gesunden Personen verglichen. Desweiteren wurden die B-Zellpopulationen auf Korrelationen zu Krankheitsaktivitätsparametern untersucht. Mittels Sequenzierung der cDNA von Immunglobulinen peripherer Plasmazellen wurden deren Ig-Klasse, V-(D-)J-Repertoire, somatische Hypermutationen sowie CDR3-Länge bestimmt. Es zeigte sich, daß RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen stark veränderte periphere B-Zellpopulationen aufweisen. Sämtliche B-Zell-Subpopulationen sind in ihrer Anzahl verringert, jedoch ist die Frequenz der Plasmazellen massiv erhöht. Daß diese Unterschiede durch das Geschlecht, das Alter, die Krankheitsdauer oder die Therapie der Patienten hervorgerufen wurde, konnte weitgehend ausgeschlossen werden. Die B-Zell-Subpopulationen sind in Anzahl und Frequenz mit mehreren der Krankheitsaktivitätsparameter der Patienten korrelierbar. Damit

eröffnet sich zusätzlich zu bisher genutzten klinischen Parametern die Möglichkeit, durch regelmäßige Bestimmung der peripheren B-Zellen von RA-Patienten Veränderungen der Krankheitsaktivität während des Krankheitsverlaufs festzustellen. Die Antikörper der peripheren Plasmazellen der RA-Patienten weisen ein selektiertes V-Genrepertoire sowie eine hohe Anzahl und Frequenz somatischer Hypermutationen bevorzugt in ihren antigenbindenden Bereichen auf. Diese Ergebnisse lassen auf ein antigenselektiertes affinitätsgereiftes peripheres Plasmazellrepertoire und dessen mehrmalige Keimzentrumsdurchgänge schließen. Damit scheint daß das B-Zell-System bei RA chronisch aktiviert zu sein und ist somit wahrscheinlich entscheidend an der Aufrechterhaltung oder gar Entstehung von RA beteiligt.

Summary

Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease, which predominantly manifests in inflammation and destruction of the joints. Tertiary lymphoid tissues in afflicted joints seem to support local antigen-dependent differentiation of B cells to memory and plasma cells. In the blood of RA patients often autoantibodies, preferentially rheumatoid factors correlating to disease activity, are found. In the chronic autoimmune disease SLE an enlarged peripheral plasma cell population while increasing disease activity was shown. Therefore, one aim of this work was to investigate, if patients with Rheumatoid Arthritis have changed peripheral B cells and B cell subsets and if their size correlate to disease activity for creating new possible parameters for the clinical diagnosis of RA and the assessment of RA patients' disease activity. Furthermore, for estimating the activation state and antigen affinity of peripheral plasma cells it was analysed, if their immunoglobulins show changed molecular features.

With flow cytometry the size of B cell subsets of peripheral blood of RA patients were defined and compared to healthy subjects. In addition, the B cell subsets were correlated to disease activity markers. By sequencing the cDNA of immunoglobulins of peripheral plasma cells their Ig-class, V-(D-)J-repertoire, somatic hypermutations and CDR3-length were defined. It turned out, that the RA patients show massive changes in their peripheral B cell populations. All peripheral B cell subsets were decreased in numbers, but the frequency of plasma

cells was strongly increased. These changes are largely not due to gender, age, disease duration and therapy of the patients. In numbers and frequency the B cell subsets correlate with different disease activity parameters of the patients. Therefore, additionally to other established clinical markers, the opportunity arises, to assess changes in disease activity while the course of disease by periodical observation of the peripheral B cells subsets' size in RA patients. The antibodies of peripheral plasma cells of RA patients show a selected V-gene repertoire and a high number and frequency of somatic hypermutations predominantly in their antigen binding regions. This results suggest an antigen selected, affinity matured peripheral plasma cell repertoire and the repeated involvement of their precursors in germinal center cycle reactions. Therefore, the B cell system in RA seems to be chronically activated and consequently crucially participating in maintenance or even in the rise of RA.

6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. Wu, T.T. and E.A. Kabat, An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med*, 1970. 132(2): p. 211-50.
2. Lefranc, M.P., et al., IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res*, 1999. 27(1): p. 209-12.
3. Nossal, G.J., The double helix and immunology. *Nature*, 2003. 421(6921): p. 440-4.
4. Janeway, C.A., et al., *Immunobiology: The Immune System in Health & Disease*. Garland Publishing, 2001. 5th ed.
5. Ehrlich, P., The Croonian Lecture. On immunity with special reference to cell life. *Proc. R. Soc. Lond.*, 1900. B 66: p. 424-48.
6. Landsteiner, K., *The Specificity of Serological Reactions*. Harvard Univ. Press, Boston, 1945.
7. Jerne, N.K., The natural selection theory of antibody formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1955. 41: p. 849-57.
8. Nossal, G.J. and J. Lederberg, Antibody production by single cells. *Nature*, 1958. 181(4620): p. 1419-20.
9. Vladutiu, A.O., Immunoglobulin D: properties, measurement, and clinical relevance. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2000. 7(2): p. 131-40.
10. Schatz, D.G., M.A. Oettinger, and D. Baltimore, The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell*, 1989. 59(6): p. 1035-48.
11. Oettinger, M.A., et al., RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*, 1990. 248(4962): p. 1517-23.
12. Tonegawa, S., Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 1983. 302(5909): p. 575-81.
13. Alt, F.W., et al., VDJ recombination. *Immunol Today*, 1992. 13(8): p. 306-

- 14.
14. Janeway, C.A. and P. Travers, Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, 1997.
15. Manz, J., et al., Feedback inhibition of immunoglobulin gene rearrangement by membrane mu, but not by secreted mu heavy chains. *J Exp Med*, 1988. 168(4): p. 1363-81.
16. Storb, U., et al., Expression of immunoglobulin genes in transgenic mice and transfected cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1988. 546: p. 51-6.
17. Hieter, P.A., et al., Human immunoglobulin kappa light-chain genes are deleted or rearranged in lambda-producing B cells. *Nature*, 1981. 290(5805): p. 368-72.
18. Korsmeyer, S.J., et al., Normal human B cells display ordered light chain gene rearrangements and deletions. *J Exp Med*, 1982. 156(4): p. 975-85.
19. Rolink, A., et al., Immature surface Ig⁺ B cells can continue to rearrange kappa and lambda L chain gene loci. *J Exp Med*, 1993. 178(4): p. 1263-70.
20. Radic, M.Z., et al., B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J Exp Med*, 1993. 177(4): p. 1165-73.
21. Gay, D., et al., Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med*, 1993. 177(4): p. 999-1008.
22. Tiegs, S.L., D.M. Russell, and D. Nemazee, Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med*, 1993. 177(4): p. 1009-20.
23. Hertz, M. and D. Nemazee, BCR ligation induces receptor editing in IgM+IgD- bone marrow B cells in vitro. *Immunity*, 1997. 6(4): p. 429-36.
24. Yuan, D., A.C. Gilliam, and P.W. Tucker, Regulation of expression of immunoglobulins M and D in murine B cells. *Fed Proc*, 1985. 44(10): p. 2652-9.
25. McHeyzer-Williams, M.G., Immune response decisions at the single cell level. *Semin Immunol*, 1997. 9(4): p. 219-27.
26. Ho, F., et al., Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *Eur J Immunol*, 1986. 16(10): p. 1297-301.
27. Jacob, J., R. Kassir, and G. Kelsoe, In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J Exp Med*, 1991. 173(5): p. 1165-

- 75.
28. Smith, K.G., et al., The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur J Immunol*, 1996. 26(2): p. 444-8.
 29. MacLennan, I.C., Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, 1994. 12: p. 117-39.
 30. Liu, Y.J., et al., Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses. *Immunol Today*, 1992. 13(1): p. 17-21.
 31. MacLennan, I.C., Y.J. Liu, and G.D. Johnson, Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses. *Immunol Rev*, 1992. 126: p. 143-61.
 32. Berek, C., A. Berger, and M. Apel, Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*, 1991. 67(6): p. 1121-9.
 33. Jacob, J., et al., Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature*, 1991. 354(6352): p. 389-92.
 34. Ziegner, M., G. Steinhauser, and C. Berek, Development of antibody diversity in single germinal centers: selective expansion of high-affinity variants. *Eur J Immunol*, 1994. 24(10): p. 2393-400.
 35. Putterman, C., et al., The double edged sword of the immune response: mutational analysis of a murine anti-pneumococcal, anti-DNA antibody. *J Clin Invest*, 1996. 97(10): p. 2251-9.
 36. Hentges, F., B lymphocyte ontogeny and immunoglobulin production. *Clin Exp Immunol*, 1994. 97 Suppl 1: p. 3-9.
 37. Liu, Y.J., et al., Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. *Eur J Immunol*, 1991. 21(8): p. 1905-10.
 38. Ray, S.K., C. Putterman, and B. Diamond, Pathogenic autoantibodies are routinely generated during the response to foreign antigen: a paradigm for autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(5): p. 2019-24.
 39. Borretzen, M., et al., Differences in mutational patterns between rheumatoid factors in health and disease are related to variable heavy chain family and germ-line gene usage. *Eur J Immunol*, 1997. 27(3): p. 735-41.
 40. Isenberg, D., et al., Anti-DNA antibodies: from gene usage to crystal structures. *Immunol Today*, 1997. 18(4): p. 149-53.

41. Huchet, R. and M. Feldmann, Studies on antibody affinity in mice. *Eur J Immunol*, 1973. 3(1): p. 49-55.
42. Shimizu, A. and T. Honjo, Immunoglobulin class switching. *Cell*, 1984. 36(4): p. 801-3.
43. Esser, C. and A. Radbruch, Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. *Annu Rev Immunol*, 1990. 8: p. 717-35.
44. Liu, Y.J., et al., Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation. *Immunity*, 1996. 4(3): p. 241-50.
45. Briere, F., et al., IL-10 and IL-13 as B cell growth and differentiation factors. *Nouv Rev Fr Hematol*, 1993. 35(3): p. 233-5.
46. Banchereau, J., et al., Role of cytokines in human B lymphocyte growth and differentiation. *Nouv Rev Fr Hematol*, 1993. 35(1): p. 61-6.
47. Banchereau, J., et al., The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol*, 1994. 12: p. 881-922.
48. Brugnoli, D., et al., Ineffective expression of CD40 ligand on cord blood T cells may contribute to poor immunoglobulin production in the newborn. *Eur J Immunol*, 1994. 24(8): p. 1919-24.
49. Odendahl, M., Veränderte B-Lymphozyten-Homöostase beim systemischen Lupus erythematoses. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin., 2002.
50. McHeyzer-Williams, M.G., et al., Antigen-driven B cell differentiation in vivo. *J Exp Med*, 1993. 178(1): p. 295-307.
51. Liu, A.H., P.K. Jena, and L.J. Wysocki, Tracing the development of single memory-lineage B cells in a highly defined immune response. *J Exp Med*, 1996. 183(5): p. 2053-63.
52. Liu, Y.J., S. Oldfield, and I.C. MacLennan, Memory B cells in T cell-dependent antibody responses colonize the splenic marginal zones. *Eur J Immunol*, 1988. 18(3): p. 355-62.
53. Benner, R., W. Hijmans, and J.J. Haaijman, The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. *Clin Exp Immunol*, 1981. 46(1): p. 1-8.
54. Cassese, G., et al., Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for

- the homeostasis of plasma cells. *Eur J Immunol*, 2001. 31(9): p. 2726-32.
55. Kunkel, E.J. and E.C. Butcher, Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(10): p. 822-9.
 56. Kawano, M.M., et al., Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal cells requires interleukin-6 for escaping from apoptosis. *Blood*, 1995. 85(2): p. 487-94.
 57. Merville, P., et al., Bcl-2+ tonsillar plasma cells are rescued from apoptosis by bone marrow fibroblasts. *J Exp Med*, 1996. 183(1): p. 227-36.
 58. Manz, R.A., A. Thiel, and A. Radbruch, Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature*, 1997. 388(6638): p. 133-4.
 59. Slifka, M.K., M. Matloubian, and R. Ahmed, Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. *J Virol*, 1995. 69(3): p. 1895-902.
 60. Slifka, M.K. and R. Ahmed, Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr Opin Immunol*, 1998. 10(3): p. 252-8.
 61. Manz, R.A., et al., Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *Int Immunol*, 1998. 10(11): p. 1703-11.
 62. Hauser, A.E., et al., Long-lived plasma cells in immunity and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. 987: p. 266-9.
 63. Zinkernagel, R.M., et al., T and B cell tolerance and responses to viral antigens in transgenic mice: implications for the pathogenesis of autoimmune versus immunopathological disease. *Immunol Rev*, 1991. 122: p. 133-71.
 64. Cohn, M., The a priori principles which govern immune responsiveness. *Cellular basis of immune modulation*. Liss, New York, 1989: p. 11-14.
 65. Mitchinson, N.A., A walk around the edges of tolerance. *Ann Rheum Dis*, 1993. 52(Suppl. 1): p. S3-S5.
 66. Janeway, C.A., Jr., The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*, 1992. 13(1): p. 11-6.
 67. Janeway, C.A., Jr., C.C. Goodnow, and R. Medzhitov, Danger - pathogen on the premises! Immunological tolerance. *Curr Biol*, 1996. 6(5): p. 519-22.
 68. Janeway, C.A.j., Approaching the asymptote? Evolution and revolution in

- immunology. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. 54: p. 1-13.
69. Matzinger, P., An innate sense of danger. *Semin Immunol*, 1998. 10(5): p. 399-415.
 70. Matzinger, P., Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*, 1994. 12: p. 991-1045.
 71. Anderson, M.S., et al., Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*, 2002. 298(5597): p. 1395-401.
 72. Symmons, D.P., et al., The incidence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: results from the Norfolk Arthritis Register. *Br J Rheumatol*, 1994. 33(8): p. 735-9.
 73. Maki-Ikola, O., et al., IgM, IgG and IgA class enterobacterial antibodies in serum and synovial fluid in patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*, 1997. 36(10): p. 1051-3.
 74. Zhang, X., et al., What determines arthritogenicity of bacterial cell wall? A study on *Eubacterium* cell wall-induced arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2000. 39(3): p. 274-82.
 75. Nieto, A., et al., Involvement of Fcγ receptor IIIA genotypes in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2000. 43(4): p. 735-9.
 76. Albani, S., D.A. Carson, and J. Roudier, Genetic and environmental factors in the immune pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 1992. 18(4): p. 729-40.
 77. Stastny, P., HLA-D and Ia antigens in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 1978. 21(5 Suppl): p. S139-43.
 78. Olsen, N.J., et al., Associations of HLA-DR4 with rheumatoid factor and radiographic severity in rheumatoid arthritis. *Am J Med*, 1988. 84(2): p. 257-64.
 79. Stastny, P., et al., HLA-DR4 and other genetic markers in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*, 1988. 27 Suppl 2: p. 132-8.
 80. Calin, A., The epidemiology of rheumatoid disease: past and present. *Dis Markers*, 1986. 4(1-2): p. 1-6.
 81. Fox, D.A., Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In Koopman, W.J., *Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology*. Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore. Md, 2001. 14th ed: p. 1085-1102.

82. Wolfe, F., et al., The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1994. 37(4): p. 481-94.
83. Erhardt, C.C., et al., Factors predicting a poor life prognosis in rheumatoid arthritis: an eight year prospective study. *Ann Rheum Dis*, 1989. 48(1): p. 7-13.
84. Pincus, T. and L.F. Callahan, The 'side effects' of rheumatoid arthritis: joint destruction, disability and early mortality. *Br J Rheumatol*, 1993. 32 Suppl 1: p. 28-37.
85. Berek, C. and H.J. Kim, B-cell activation and development within chronically inflamed synovium in rheumatoid and reactive arthritis. *Semin Immunol*, 1997. 9(4): p. 261-8.
86. Schroder, A.E., et al., Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(1): p. 221-5.
87. Kim, H.J., et al., Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J Immunol*, 1999. 162(5): p. 3053-62.
88. de Boer, B.A., et al., Affinity maturation in ectopic germinal centers. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2000. 251: p. 191-5.
89. Wernick, R.M., et al., IgG and IgM rheumatoid factor synthesis in rheumatoid synovial membrane cell cultures. *Arthritis Rheum*, 1985. 28(7): p. 742-52.
90. Randen, I., et al., Clonally related IgM rheumatoid factors undergo affinity maturation in the rheumatoid synovial tissue. *J Immunol*, 1992. 148(10): p. 3296-301.
91. Feldmann, M., et al., Cytokine production in the rheumatoid joint: implications for treatment. *Ann Rheum Dis*, 1990. 49(1): p. 480-6.
92. Muller-Ladner, U. and S. Gay, MMPs and rheumatoid synovial fibroblasts: Siamese twins in joint destruction? *Ann Rheum Dis*, 2002. 61(11): p. 957-9.
93. Yamanishi, Y. and G.S. Firestein, Pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of synoviocytes. *Rheum Dis Clin North Am*, 2001. 27(2): p. 355-71.
94. Cunnane, G., et al., Mechanism of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 1998. 46(1): p. 1-7.

95. Torrigiani, G. and I.M. Roitt, Antiglobulin factors in sera from patients with rheumatoid arthritis and normal subjects. Quantitative estimation in different immunoglobulin classes. *Ann Rheum Dis*, 1967. 26(4): p. 334-40.
96. Smolen, J.S., Autoantibodies in rheumatoid arthritis. In *Manual of Biological Markers of Disease*. Edited by van Venrooij WJ & Maini RN. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996(section C1.1): p. 1-18.
97. Mageed, R.A., The RF antigen. In *Manual of Biological Markers of Disease*. Edited by van Venrooij WJ & Maini RN. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996(section B1.1): p. 1-27.
98. Pai, S., L. Pai, and R. Birkenfeldt, Correlation of serum IgA rheumatoid factor levels with disease severity in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, 1998. 27(4): p. 252-6.
99. Houssien, D.A., et al., Clinical significance of IgA rheumatoid factor subclasses in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 1997. 24(11): p. 2119-22.
100. Teitsson, I., et al., Prospective study of early rheumatoid arthritis. I. Prognostic value of IgA rheumatoid factor. *Ann Rheum Dis*, 1984. 43(5): p. 673-8.
101. Teitsson, I., IgA rheumatoid factor as predictor of disease activity. *Scand J Rheumatol Suppl*, 1988. 75: p. 233-7.
102. Vencovsky, J., et al., Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2003. 62(5): p. 427-30.
103. Steiner, G., et al., Purification and partial sequencing of the nuclear autoantigen RA33 shows that it is indistinguishable from the A2 protein of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex. *J Clin Invest*, 1992. 90(3): p. 1061-6.
104. Hassfeld, W., et al., Autoantibody to the nuclear antigen RA33: a marker for early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*, 1993. 32(3): p. 199-203.
105. Hassfeld, W., et al., Demonstration of a new antinuclear antibody (anti-RA33) that is highly specific for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1989. 32(12): p. 1515-20.
106. Tuaille, N., et al., Antibodies from patients with rheumatoid arthritis and juvenile chronic arthritis analyzed with core histone synthetic peptides. *Int*

- Arch Allergy Appl Immunol, 1990. 91(3): p. 297-305.
107. Hayem, G., et al., Anti-Sa antibody is an accurate diagnostic and prognostic marker in adult rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 1999. 26(1): p. 7-13.
 108. Terato, K., et al., Specificity of antibodies to type II collagen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1990. 33(10): p. 1493-500.
 109. Klareskog, L. and T. Olsson, Autoimmunity to collagen II and myelin basic protein: comparative studies in humans and rodents. *Immunol Rev*, 1990. 118: p. 285-310.
 110. Mimori, T., et al., Autoantibodies to calpastatin (an endogenous inhibitor for calcium-dependent neutral protease, calpain) in systemic rheumatic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(16): p. 7267-71.
 111. Despres, N., et al., Detection and expression of a cDNA clone that encodes a polypeptide containing two inhibitory domains of human calpastatin and its recognition by rheumatoid arthritis sera. *J Clin Invest*, 1995. 95(4): p. 1891-6.
 112. Corrigall, V.M., et al., The human endoplasmic reticulum molecular chaperone BiP is an autoantigen for rheumatoid arthritis and prevents the induction of experimental arthritis. *J Immunol*, 2001. 166(3): p. 1492-8.
 113. van der Heijde, D.M., et al., Validity of single variables and composite indices for measuring disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 1992. 51(2): p. 177-81.
 114. van der Heijde, D.M., et al., Development of a disease activity score based on judgment in clinical practice by rheumatologists. *J Rheumatol*, 1993. 20(3): p. 579-81.
 115. Prevoo, M.L., et al., Validity and reproducibility of self-administered joint counts. A prospective longitudinal followup study in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 1996. 23(5): p. 841-5.
 116. Arnett, F.C., et al., The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1988. 31(3): p. 315-24.
 117. Goldenberg, M.M., Etanercept, a novel drug for the treatment of patients with severe, active rheumatoid arthritis. *Clin Ther*, 1999. 21(1): p. 75-87; discussion 1-2.

118. Cohen, S., et al., Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*, 2002. 46(3): p. 614-24.
119. Emery, P., Infliximab: a new treatment for rheumatoid arthritis. *Hosp Med*, 2001. 62(3): p. 150-2.
120. Weinblatt, M.E., et al., Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(1): p. 35-45.
121. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*, 1992. 24: p. 104-8.
122. Kabat, E.A., et al., Sequences of proteins of immunological interest. National Institute of Health publication. 5th ed., vols 1-3, U.S. Department of health and human services., 1991.
123. Rogers, J., et al., Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin mu chain. *Cell*, 1980. 20(2): p. 303-12.
124. Early, P., et al., Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin mu gene by alternative RNA processing pathways. *Cell*, 1980. 20(2): p. 313-9.
125. Bühl, A. and P. Zöfel, SPSS Version 10: Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows. Addison Wesley Verlag, München, 2000.
126. Tedder, T.F. and C.M. Isaacs, Isolation of cDNAs encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes. A new member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol*, 1989. 143(2): p. 712-7.
127. Fujimoto, M., et al., CD19 regulates B lymphocyte responses to transmembrane signals. *Semin Immunol*, 1998. 10(4): p. 267-77.
128. Tedder, T.F., et al., CD19 and CD22 regulate a B lymphocyte signal transduction pathway that contributes to autoimmunity. *Keio J Med*, 2000. 49(1): p. 1-13.
129. Stamenkovic, I. and B. Seed, CD19, the earliest differentiation antigen of

- the B cell lineage, bears three extracellular immunoglobulin-like domains and an Epstein-Barr virus-related cytoplasmic tail. *J Exp Med*, 1988. 168(3): p. 1205-10.
130. Harada, H., et al., Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood*, 1993. 81(10): p. 2658-63.
 131. Kobata, T., et al., CD27-CD70 interactions regulate B-cell activation by T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(24): p. 11249-53.
 132. Jacquot, S., et al., CD154/CD40 and CD70/CD27 interactions have different and sequential functions in T cell-dependent B cell responses: enhancement of plasma cell differentiation by CD27 signaling. *J Immunol*, 1997. 159(6): p. 2652-7.
 133. Agematsu, K., et al., B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur J Immunol*, 1997. 27(8): p. 2073-9.
 134. Nagumo, H., et al., CD27/CD70 interaction augments IgE secretion by promoting the differentiation of memory B cells into plasma cells. *J Immunol*, 1998. 161(12): p. 6496-502.
 135. Agematsu, K., et al., Generation of plasma cells from peripheral blood memory B cells: synergistic effect of interleukin-10 and CD27/CD70 interaction. *Blood*, 1998. 91(1): p. 173-80.
 136. Maurer, D., et al., IgM and IgG but not cytokine secretion is restricted to the CD27+ B lymphocyte subset. *J Immunol*, 1992. 148(12): p. 3700-5.
 137. Maurer, D., et al., CD27 expression by a distinct subpopulation of human B lymphocytes. *Eur J Immunol*, 1990. 20(12): p. 2679-84.
 138. Klein, U., K. Rajewsky, and R. Kuppers, Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med*, 1998. 188(9): p. 1679-89.
 139. Tangye, S.G., et al., Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J Exp Med*, 1998. 188(9): p. 1691-703.
 140. Jung, J., et al., Regulation of CD27 expression in the course of germinal

- center B cell differentiation: the pivotal role of IL-10. *Eur J Immunol*, 2000. 30(8): p. 2437-43.
141. Stashenko, P., et al., Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol*, 1980. 125(4): p. 1678-85.
 142. Riley, J.K. and M.X. Sliwowski, CD20: a gene in search of a function. *Semin Oncol*, 2000. 27(6 Suppl 12): p. 17-24.
 143. Rosenthal, P., et al., Ontogeny of human hematopoietic cells: analysis utilizing monoclonal antibodies. *J Immunol*, 1983. 131(1): p. 232-7.
 144. Einfeld, D.A., et al., Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. *Embo J*, 1988. 7(3): p. 711-7.
 145. Brieva, J.A., et al., Human in vivo-induced spontaneous IgG-secreting cells from tonsil, blood and bone marrow exhibit different phenotype and functional level of maturation. *Immunology*, 1991. 72(4): p. 580-3.
 146. Medina, F., et al., The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood*, 2002. 99(6): p. 2154-61.
 147. Mehta, K., U. Shahid, and F. Malavasi, Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *Faseb J*, 1996. 10(12): p. 1408-17.
 148. Krishnan, E., T. Sokka, and P. Hannonen, Smoking-gender interaction and risk for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2003. 5(3): p. R158-62.
 149. Lu, F.X., et al., Effects of ovarian steroids on immunoglobulin-secreting cell function in healthy women. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003. 10(5): p. 944-9.
 150. Gudmundsson, K.O., et al., Immunoglobulin-secreting cells in cord blood: effects of Epstein-Barr virus and interleukin-4. *Scand J Immunol*, 1999. 50(1): p. 21-4.
 151. Brezinschek, H.P., et al., Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *J Clin Invest*, 1997. 99(10): p. 2488-501.
 152. Dorner, T., et al., Immunoglobulin kappa chain receptor editing in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, 1998. 102(4): p. 688-94.

153. Farner, N.L., T. Dorner, and P.E. Lipsky, Molecular mechanisms and selection influence the generation of the human V lambda J lambda repertoire. *J Immunol*, 1999. 162(4): p. 2137-45.
154. Dorner, T., et al., Analysis of the frequency and pattern of somatic mutations within nonproductively rearranged human variable heavy chain genes. *J Immunol*, 1997. 158(6): p. 2779-89.
155. Klein, U., et al., Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev*, 1998. 162: p. 261-80.
156. Dorner, T., et al., Delineation of selective influences shaping the mutated expressed human Ig heavy chain repertoire. *J Immunol*, 1998. 160(6): p. 2831-41.
157. Dechanet, J., et al., The ability of synoviocytes to support terminal differentiation of activated B cells may explain plasma cell accumulation in rheumatoid synovium. *J Clin Invest*, 1995. 95(2): p. 456-63.
158. Arce, S., et al., CD38 low IgG-secreting cells are precursors of various CD38 high-expressing plasma cell populations. *J Leukoc Biol*, 2004. 75(6): p. 1022-8.
159. Takemura, S., et al., Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol*, 2001. 167(2): p. 1072-80.
160. Kim, H.J. and C. Berek, B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 2000. 2(2): p. 126-31.
161. Henneken, M., Untersuchung der B-Zell-Akkumulation im entzündeten Synovialgewebe bei rheumatoider Arthritis. Dissertation. Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin, 2003.
162. Pawlik, A., et al., The expansion of CD4+CD28- T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2003. 5(4): p. R210-3.
163. Kohem, C.L., et al., Enrichment of differentiated CD45RBdim,CD27-memory T cells in the peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1996. 39(5): p. 844-54.
164. Takemura, S., et al., T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol*, 2001. 167(8): p. 4710-8.
165. Spector, T.D. and J.A. Da Silva, Pregnancy and rheumatoid arthritis: an overview. *Am J Reprod Immunol*, 1992. 28(3-4): p. 222-5.

166. Hench, P., et al., The effects of a hormone of the adrenal cortex and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. Proc Staff Meet Mayo Clinic, 1949. 24: p. 181-97.
167. Reichenstein, T. and C.W. Shoppee, In: Harris RS, Thimann KV, ed. New York: Academic Press, 1943.
168. Raghupathy, R., Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. Immunol Today, 1997. 18(10): p. 478-82.
169. Edwards, S.W. and M.B. Hallett, Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. Immunol Today, 1997. 18(7): p. 320-4.
170. Jimenez, D.M., et al., Longitudinal study of plasma lipids and lipoprotein cholesterol in normal pregnancy and puerperium. Gynecol Obstet Invest, 1988. 25(3): p. 158-64.
171. Crocker, I., et al., Significance of fatty acids in pregnancy-induced immunosuppression. Clin Diagn Lab Immunol, 1999. 6(4): p. 587-93.
172. Goemaere, S., et al., Onset of symptoms of rheumatoid arthritis in relation to age, sex and menopausal transition. J Rheumatol, 1990. 17(12): p. 1620-2.
173. Ben-Yehuda, A., et al., Bone marrow declines as a site of B-cell precursor differentiation with age: relationship to thymus involution. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(25): p. 11988-92.
174. Biro, J., Age-related change of the absolute number of IgG-, and IgM-bearing B-lymphocytes and T-lymphocytes in human peripheral blood following influenza vaccination. Aktuelle Gerontol. Feb;8(2):81-3., 1978.
175. Burns, E.A., et al., Specific humoral immunity in the elderly: in vivo and in vitro response to vaccination. J Gerontol, 1993. 48(6): p. B231-6.
176. Burns, E.A., et al., Decreased specific antibody synthesis in old adults: decreased potency of antigen-specific B cells with aging. Mech Ageing Dev, 1990. 53(3): p. 229-41.
177. Pillai, S., The chosen few? Positive selection and the generation of naive B lymphocytes. Immunity, 1999. 10(5): p. 493-502.
178. Kline, G.H., T.A. Hayden, and N.R. Klinman, B cell maintenance in aged mice reflects both increased B cell longevity and decreased B cell

- generation. *J Immunol*, 1999. 162(6): p. 3342-9.
179. Sprent, J., et al., Mature murine B and T cells transferred to SCID mice can survive indefinitely and many maintain a virgin phenotype. *J Exp Med*, 1991. 174(3): p. 717-28.
180. Jacobi, A.M., et al., Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(5): p. 1332-42.
181. Mietens, C., [Selective IgA deficiency]. *Klin Padiatr*, 1983. 195(6): p. 385-7.
182. Koskinen, S., Long-term follow-up of health in blood donors with primary selective IgA deficiency. *J Clin Immunol*, 1996. 16(3): p. 165-70.
183. Youinou, P.Y., et al., Specificity of plasma cells in the rheumatoid synovium. I. Immunoglobulin class of antiglobulin-producing cells. *Scand J Immunol*, 1984. 20(4): p. 307-15.
184. Williams, D.G., S.P. Moyes, and R.A. Mageed, Rheumatoid factor isotype switch and somatic mutation variants within rheumatoid arthritis synovium. *Immunology*, 1999. 98(1): p. 123-36.
185. Fu, S.M., N. Chiorazzi, and H.G. Kunkel, Differentiation capacity and other properties of the leukemic cells of chronic lymphocytic leukemia. *Immunol Rev*, 1979. 48: p. 23-44.
186. Brezinschek, H.P., R.I. Brezinschek, and P.E. Lipsky, Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *J Immunol*, 1995. 155(1): p. 190-202.
187. Klein, U., R. Kuppers, and K. Rajewsky, Human IgM⁺IgD⁺ B cells, the major B cell subset in the peripheral blood, express V kappa genes with no or little somatic mutation throughout life. *Eur J Immunol*, 1993. 23(12): p. 3272-7.
188. Klein, U., R. Kuppers, and K. Rajewsky, Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood*, 1997. 89(4): p. 1288-98.
189. McKean, D., et al., Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(10): p. 3180-4.
190. Kuppers, R., et al., Tracing B cell development in human germinal centres

- by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *Embo J*, 1993. 12(13): p. 4955-67.
191. Souto-Carneiro, M.M., et al., IgVH genes from different anatomical regions, with different histopathological patterns, of a rheumatoid arthritis patient suggest cyclic re-entry of mature synovial B-cells in the hypermutation process. *Arthritis Res*, 2000. 2(4): p. 303-14.
 192. Souto-Carneiro, M.M., et al., [Mutational pattern of Ig-VH genes of synovial B-lymphocytes from different anatomical locations in a rheumatoid arthritis patient]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 1999. 83: p. 260-9.
 193. Rosner, K., et al., Third complementarity-determining region of mutated VH immunoglobulin genes contains shorter V, D, J, P, and N components than non-mutated genes. *Immunology*, 2001. 103(2): p. 179-87.
 194. Bridges, S.L., Jr., et al., Somatic mutation and CDR3 lengths of immunoglobulin kappa light chains expressed in patients with rheumatoid arthritis and in normal individuals. *J Clin Invest*, 1995. 96(2): p. 831-41.

6.2 Verwendete Abkürzungen

A	Adenin
ACR	American College of Rheumatology
APC	antigen presenting cell
BCR	B cell receptor
bp	base pair
BSA	bovine serum albumine
BSG	Blutsinkgeschwindigkeit
C	Cytosin oder constant region
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CDR	complementary detemining region
CMC	carpometacarpal
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
Cy5	Cyanin 5
D	diversity
DAS	disease activity score
ddH ₂ O	doppelt destilliertes H ₂ O
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMARD	disease modifying anti-rheumatic drugs
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendintrilotetraacetic acid
ELISA	enzyme linked immonosorbent assay
Fab	fragment antigen binding
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fc	fragment crystallizable
FcR	Fc-Rezeptor
FDC	follicular dendritic cell
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat

FR	framework region
G	Guanin
H	heavy
HLA	humanes Leucozytenantigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IU	international units
J	joining
L	light
MCP	metacarpophalangeal
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger RNA
MTX	Methotrexat
NHS	normal healthy subject
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drugs
NSAR	non-steroidal anti-rheumatics
PBMC	peripher blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PGA	patients global assessment
RA	Rheumatoide Arthritis
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PIP	proximalen interphalangeal
R	replacement oder Rezeptor
RAG	recombination activating genes
RF	Rheumafaktor
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
RT	reverse Transkription

S	silent
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEREX	serological analysis of recombinant cDNA expression libraries
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
T	Thymin
TDT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tris-Cl	Trishydroxymethylaminomethanhydrochlorid
TSR	Template Suppression Reagent
UV	ultraviolett
V	variable
X-Gal	5-Bromo-4-Chlorindoxyl- β -D-Galaktosidase

6.3 Berechnung des Krankheitsaktivitätsindex

BSG		schmerzhafte Gelenke		geschwollene Gelenke		PGA	
0		1	0,56	1	0,28	0	0,00
2	0,49	2	0,79	2	0,40	2	0,03
4	0,97	3	0,97	3	0,48	4	0,06
6	1,25	4	1,12	4	0,56	6	0,08
8	1,46	5	1,25	5	0,63	8	0,11
10	1,61	6	1,37	6	0,69	10	0,14
12	1,74	7	1,48	7	0,74	12	0,17
14	1,85	8	1,58	8	0,79	14	0,20
16	1,94	9	1,68	9	0,84	16	0,22
18	2,04	10	1,77	10	0,89	18	0,25
20	2,10	11	1,86	11	0,93	20	0,28
22	2,16	12	1,94	12	0,97	22	0,31
24	2,22	13	2,02	13	1,01	24	0,34
26	2,28	14	2,10	14	1,05	26	0,36
28	2,33	15	2,17	15	1,08	28	0,39
30	2,38	16	2,24	16	1,12	30	0,42
32	2,43	17	2,31	17	1,15	32	0,45
34	2,47	18	2,38	18	1,19	34	0,48
36	2,51	19	2,44	19	1,22	36	0,50
38	2,55	20	2,50	20	1,25	38	0,53
40	2,58	21	2,57	21	1,28	40	0,56
42	2,62	22	2,63	22	1,31	42	0,59
44	2,65	23	2,69	23	1,34	44	0,62
46	2,68	24	2,74	24	1,37	46	0,64
48	2,71	25	2,80	25	1,40	48	0,67
50	2,74	26	2,86	26	1,43	50	0,70
52	2,77	27	2,91	27	1,45	52	0,73
54	2,79	28	2,96	28	1,48	54	0,76
56	2,82					56	0,78
58	2,84					58	0,81
60	2,87					60	0,84
62	2,89					62	0,87
64	2,91					64	0,90
66	2,93					66	0,92
68	2,95					68	0,95
70	2,97					70	0,98
72	2,99					72	1,01
74	3,01					74	1,04
76	3,03					76	1,06
78	3,05					78	1,09
80	3,07					80	1,12
82	3,08					82	1,15
84	3,10					84	1,18
86	3,12					86	1,20
88	3,13					88	1,23
90	3,15					90	1,26
92	3,17					92	1,29
94	3,18					94	1,32
96	3,20					96	1,34
98	3,21					98	1,37
100	3,22					100	1,40

Tab. 3: Berechnung des Krankheitsaktivitätsindex (DAS). Jeweils links (weiße Spalten) sind die mögliche Blutsenkgeschwindigkeit (BSG, mm/1h), Anzahl schmerzhafter und geschwollener Gelenke (28-joint-count) sowie die Selbsteinschätzung des Patienten (PGA, mm) aufgelistet. Jeweils rechts (graue Spalten) sind die dazugehörigen Gewichtungswerte aufgelistet, welche zum Krankheitsaktivitätsindex (DAS) addiert werden (Berufsverband Deutscher Rheumatologen e.V.).

6.4 Schwere Immunglobulinketten peripherer Plasmazellen der RA-Patienten

Sequenz	V-Familie	V	D	J	V-Mutationen	CDR		FR		CDR3-Länge	Klasse
						R	S	R	S		
B1e1H1	4	4-61	6-25	4b	9	3	1	4	1	nd	nd
B1e1H2	3	3-30/3-30.5	3-10	5a/5b	46	8	2	17	10	66	IgA
B1e2H	3	3-23	1-26	6b	6	3	1	1	0	42	IgG
B1e4H	3	3-33	7-27	5b/4b	44	9	1	14	13	27	IgG
B1e5H	1	1-69	6-13	6b	30	8	1	10	6	51	IgG
B1e6H	3	3-09	3-03	4b	24	5	2	7	5	39	IgA
B1e7H	1	1-08	4-17	4b	3	1	0	2	0	30	IgG
B1e8H	3	3-64	6-13	5b	37	9	3	9	9	39	IgA
B2e1H	3	3-23	nd	4b	40	9	5	13	5	33	IgG
B2e2H	4	4-34	nd	4b	13	2	0	4	4	27	IgG
B2e3H	3	3-15	nd	4b	18	6	3	4	4	24	IgA
B2e4H	4	4-39	3-16	4b	18	7	1	5	3	30	IgA
B2e5H	3	3-15	5-12	4b	8	4	0	3	1	30	IgA
B2e6H	3	3-30/3-30.5	3-03	4b	22	4	3	6	6	39	IgA
B2e7H	4	-	6-25/4-17	4b	13	nd	nd	6	3	45	IgA
B2e8H	4	4-39	nd	nd	17	5	2	6	2	nd	nd
Ce2H	4	4-30,1/4-31	4-23	4b	10	3	0	2	3	27	IgA
Ce5H	4	4-61	4-17	4b	7	4	1	1	1	36	IgA
Cz7H	3	3-07	6-25	4b	19	4	1	10	2	36	IgG
Cz8H1	4	4-61	nd	4b	28	7	2	7	9	33	IgG
Cz8H2	1	1-02	2-02	4b	27	7	2	9	5	39	IgA
Ke1H	1	1-69	7-27	4b	31	8	1	11	5	30	IgA
Ke2H	4	4-39	6-19	4b	32	6	3	10	10	42	IgG
Ke3H	1	1-02	4-11/4-04	5b/4b	35	7	2	13	5	39	IgA
Ke5H	3	-	nd	4b	9	6	0	0	3	27	IgA
Ke6H	3	3-15	4-17	2	41	8	3	16	9	36	IgA
Ke7H	3	3-15	3-16	4b	26	7	1	10	5	54	IgG
Ke8H	3	3-11	nd	4b	28	11	1	3	6	24	IgA
N0e1H	3	3-21	3-09	4b	24	7	3	4	5	39	IgM
N0e2H1	4	4-34	nd	3a	22	4	0	9	5	42	IgG
N0e2H2	4	4-30.4	7-27	4b	1	0	0	1	0	24	IgG
N0e2H3	3	3-30/3-30.5	nd	nd	2	1	1	0	0	nd	nd
N0e3H	3	3-09	nd	4b	48	8	4	15	10	18	IgG
N0e5H	4	4-34	2-02	6b	33	4	4	13	7	48	IgG
N0e7H	3	3-23	3-22	4b	25	8	1	6	6	66	IgG
N1e6H	4	4-34	5-24	6 a, 6b, 6c	8	nd	nd	6	1	nd	nd
N1e7H	4	4-30,1/4-31	5-05/5-18	3b	23	5	0	8	5	39	IgG
N2z1H	4	4-61	4-17	4b	23	8	1	7	6	36	IgG
N3e1H	3	3-30/3-30.5	3-10	4b	23	4	4	9	3	42	IgG
N3e3H	4	4-61	3-22	2	31	4	6	11	8	51	IgG
N3e4H	3	3-09	nd	4b	30	9	0	9	4	27	IgA
N3e6H	3	3-23	nd	5b	18	6	0	5	6	42	IgA
N3e7H	3	3-21	6-19	4b	10	5	0	1	1	24	IgA
N3e8H	3	3-23	nd	5a	19	5	2	4	4	33	IgA
N4e2H	4	4-30.4	5-12	4b/4d	32	9	0	11	4	33	IgA
N4e4H	3	3-30/3-30.5	3-22	6b	16	4	1	4	5	42	IgA
N4e6H	4	4-59	6-13/6-19	4b	36	7	2	15	7	48	IgG
N4e8H	3	3-21	1-26	4b	24	8	1	6	5	33	IgA
N5e2H	4	4-59	1-01	5b	44	7	1	14	15	36	IgG
N5e8H	4	4-04	2-08	4b	1	0	0	1	1	12	IgG
N6z1H1	3	3-30/3-30.3	6-25	4b	37	9	1	14	3	36	IgA
N6z1H2	5	5-a	nd	3b	2	0	0	0	2	24	IgG
N6z1H3	3	3-15	5-12	4b	22	6	1	7	4	36	IgA
N6z2H1	5	5-51	6-13	2	19	4	1	9	3	69	IgG
N6z2H2	3	3-30.3	nd	4b	19	5	1	5	5	24	IgA
N6z2H3	3	3-30.3	6-19	4b	23	8	1	9	0	36	IgA
N6z2H4	3	3-21	nd	5b	20	6	0	7	2	18	IgM
N6z3H1	3	3-21	4-17	4b	39	11	2	10	8	21	IgG
N6z3H2	2	2-05	7-27	4b	32	9	5	5	10	24	IgG
N6z4H1	4	4-30.4	6-06	4b	32	8	4	9	8	24	IgA
N6z4H2	3	3-48	1-26	5b	17	6	2	2	6	33	IgA
N6z5H1	4	4-61	4-17	5b	29	8	1	12	4	42	IgA
N6z5H2	1	1-02	4-17	4b	22	8	0	6	5	39	IgG
N6z5H3	3	3-15	nd	4b	29	6	2	11	5	9	IgA
N6z6H1	3	3-09	7-27	4b	30	9	0	9	4	27	IgA
N6z6H2	4	4-04	3-22	4b	42	7	3	15	7	45	IgG
N6z6H3	3	3-23	nd	4b	25	7	4	9	1	48	IgA
N6z7H1	3	3-30	3-03	4b	19	5	2	5	4	42	IgA
N6z7H2	3	3-30/3-30.5	6-19	5a	21	6	2	6	1	42	IgA
W1e1H	3	3-74	6-13	4b	17	7	0	3	5	36	IgA
W1e2H	3	3-66	nd	2	36	6	5	13	3	18	IgG
W1e3H	3	3-72	2-21	2	13	4	2	2	3	36	IgG
W1e4H	4	4-34	nd	4b	22	3	1	8	3	45	IgA
W1e5H	4	4-30,1/4-31	2-21	4b/5a/5b	12	6	0	2	2	33	IgA
W1e6H	3	3-09	1-26	4b	4	2	0	1	0	33	IgA
W2e2H	5	5-51	1-01	nd	39	8	3	17	5	nd	nd
W2e3H	3	3-33	1-26	nd	18	7	1	8	0	nd	nd
W2e5H	5	5-51	2-15/2-2	nd	15	5	2	6	1	nd	nd
W2e6H	4	4-61	3-22	4b	13	6	2	4	1	54	IgA
W2e7H	4	4-39	nd	nd	39	10	1	11	9	nd	nd

Tab. 4: Sequenzierte cDNA schwerer Immunglobulinketten peripherer Plasmazellen der RA-Patienten.

6.5 Leichte Immunglobulinketten peripherer Plasmazellen der RA-Patienten

Sequenz	V-Familie	V	J	V-Mutationen	CDR		FR		CDR3-Länge
					R	S	R	S	
<i>kappa</i>									
Ce2K	4	B3	1	6	0	0	2	3	27
Ce4K	1	L12	1	19	7	0	3	7	27
Ce5K	1	L8	2	6	3	0	2	1	27
Ce6K	1	O12/O2	2	21	3	1	6	10	27
Cz7K1	1	O12/O2	2	26	6	0	10	5	33
Cz7K2	3	L2	1	21	5	3	6	4	33
Cz7K3	2	A17	2	18	6	1	4	5	27
Cz8K1	4	B3	1	18	7	3	3	1	27
Cz8K2	2	A19/A3	1	5	3	1	0	1	27
Ke3K	1	O12/O2	2	30	10	3	11	5	27
Ke7K	3	A27	1	6	4	1	0	1	27
N1e5K1	3	A27	4	10	6	0	0	2	24
N1e5K2	3	A27	3	6	3	1	0	2	24
N3e1K	1	O12/O2	4	25	8	2	6	8	27
N3e3K	1	L8	5	16	6	2	3	4	27
N3e4K	2	A1	2	18	7	2	4	3	27
N4e1K	3	L16	2	18	8	2	4	2	30
N4e4K	1	O12/O2	2	19	8	1	4	5	30
N4e6K	4	B3	5	14	3	2	3	4	27
N4e7K	1	L12	4	26	4	2	7	9	27
N4e8K	3	L2	2	9	2	2	3	1	30
N5e1K	1	L12	1	16	2	3	3	7	27
N5e2K	1	O12/O2	2	33	10	2	6	8	27
N5e5K	2	A17	2	20	7	1	2	7	27
N5e6K	3	L2	1	10	6	0	3	0	30
N5e7K	2	A17	5	17	3	4	4	6	27
N5e8K	3	L2	1	8	3	1	2	2	27
W1e3K	3	L2	1	25	9	2	6	5	30
<i>lambda</i>									
B1e2L	2	2e	1	7	2	2	2	1	30
B1e7L	1	1b	3b	0	0	0	0	0	36
Cz8L	3	3h	2/3a	32	7	3	7	9	30
Ke8L	2	2c	2/3a	14	7	0	4	2	30
N2z1L1	1	1e	2/3a	13	4	2	6	1	39
N2z1L2	2	2a2	1	12	6	0	2	2	30
N3e8L	1	1b	2/3a	11	3	2	4	1	33
N4e2L	1	1g	2/3a	25	7	4	9	3	36
N5e8L	3	3l	2/3a	18	4	1	3	4	36
W1e1L	1	1g	2/3a	13	3	3	3	2	33

Tab. 5: Sequenzierte cDNA leichter Immunglobulinketten peripherer Plasmazellen der RA-Patienten.

Aus dieser Dissertation hervorgegangene Vorveröffentlichungen

Lindenau, S., Scholze, S., Odendahl, M., Dorner, T., Radbruch, A., Burmester, G. R., Berek, C., Abberant activation of B cells in patients with rheumatoid arthritis. Ann N Y Acad Sci, 2003. 987: p 246-8.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

