

Aus der Medizinischen Poliklinik
am Campus Charité Mitte (CCM)
Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Scholze
Charité - Universitätsmedizin Berlin

HABILITATIONSSCHRIFT

**STÖRUNGEN DER B-ZELL-HOMÖOSTASE
BEI SJÖGREN-SYNDROM**

zur Erlangung der Lehrfähigkeit

für das Fach

INNERE MEDIZIN

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dr. med. Arne Hansen

geboren am 28.12.1963 in Güstrow

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Hans-Peter Tony
2. Prof. Dr. med. Hans-Peter Brezinschek

Datum der Disputation: 18.07.06

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | Einführung und Zielstellung | 4 |
| 1.1 | Sjögren-Syndrom..... | 4 |
| 1.2 | Neue Konzepte in der Pathogenese des Sjögren-Syndroms: mehr Fragen als Antworten [Übersicht]..... | 6 |
| 1.3 | Stellenwert der B-Zellen in der Pathogenese des Sjögren-Syndroms..... | 15 |
| 1.4 | Verminderung peripherer CD27 ⁺ B-Zellen bei Sjögren-Patienten..... | 17 |
| 1.5 | Rolle von Chemokin-Chemokinrezeptor-Wechselwirkungen in der Pathogenese des Sjögren-Syndroms..... | 20 |
| 1.6 | Zielstellung der Arbeit..... | 22 |
| 2. | Charakteristika der untersuchten Patienten und Normalpersonen | 23 |
| 2.1 | Aktuelle Europäische Klassifikationskriterien des Sjögren-Syndroms..... | 24 |
| 3. | Angewandte Methoden der B-Zell-Charakterisierung | 25 |
| 3.1 | 4-Farb-Durchflußzytometrie..... | 25 |
| 3.2 | Immunglobulingenanalyse mittels genomischer Einzelzell-PCR..... | 26 |
| 3.2.1 | Analyse von Immunglobulingen-Rearrangements von Normalpersonen und Patienten mit systemischem Lupus erythematodes [Übersicht]..... | 27 |
| 3.3 | Einzelzell-Reverse Transkriptase-PCR..... | 38 |
| 3.3.1 | Analyse von Immunglobulin-mRNA-Transkripten..... | 39 |
| 3.3.2 | Analyse von Chemokinrezeptor-mRNA-Transkripten..... | 39 |
| 3.4 | Migrationsassays..... | 40 |

| | | |
|------------|---|-----|
| 4. | Ergebnisse | 41 |
| 4.1 | Verminderung der CD27 ⁺ IgD ⁺ IgM ⁺ B-Zell-Subpopulation im peripheren Blut von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom..... | 41 |
| 4.2 | Akkumulation von polyklonalen Gedächtnis-B-Zellen im Parotisinfiltrat einer Patientin mit primärem Sjögren-Syndrom..... | 55 |
| 4.3 | Analyse postrekombinatorischer Ereignisse auf IgV _H -mRNA-Ebene..... | 66 |
| 4.3.1 | Erprobung einer Einzelzell-RT-PCR zur Analyse verschiedener spezifischer mRNA-Transkripte individueller humaner B-Zellen..... | 66 |
| 4.3.2 | Analyse der IgV _H -mRNA-Transkripte individueller CD27 ⁻ naiver und CD27 ⁺ Gedächtnis-B-Zellen von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom..... | 81 |
| 4.4 | Störungen der B-zellulären Chemokinrezeptor-Expression und -Funktion bei Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom..... | 95 |
| 5. | Diskussion | 109 |
| 5.1 | Immunpathogenese des primären Sjögren-Syndroms: Schlußfolgerungen für das Krankheitsmanagement und die Therapie [Übersicht]..... | 111 |
| 6. | Zusammenfassung | 120 |
| 7. | Literatur | 123 |
| 8. | Abkürzungsverzeichnis | 133 |
| 9. | Danksagung | 134 |
| 10. | Erklärung | 135 |

6. Zusammenfassung

Das primäre Sjögren-Syndrom (SS) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des rheumatischen Formenkreises, die sowohl Kennzeichen einer organspezifischen als auch einer systemischen Erkrankung aufweist. Ihr Charakteristikum ist die lymphozytäre Infiltration, Schädigung und Zerstörung exokriner Drüsen, insbesondere der Tränen- und Speicheldrüsen, die sich klinisch als Sicca-Syndrom manifestiert. Schwerste Komplikation der Erkrankung stellt das Auftreten eines malignen B-Zell-Lymphoms dar, das sich bei etwa 4% Prozent der Patienten im Krankheitsverlauf entwickelt.

Trotz einer Vielzahl von Einzelbefunden ist die Pathogenese der Erkrankung derzeit weitestgehend unklar. Eine adäquate / kausale Therapie existiert dementsprechend bislang nicht. Es wird aber allgemein angenommen, daß es sich beim SS um eine Erkrankung mit einem multifaktoriellen Entstehungsprozeß handelt, bei dem ein bislang nicht identifizierter (z.B. viraler) Auslöser auf dem Boden einer entsprechenden genetischen und hormonellen Prädisposition zu einer wechselseitigen chronischen Aktivierung von Drüsenepithelien, T-Lymphozyten (T-Zellen) und B-Lymphozyten (B-Zellen) führt, dem Bild der systemischen „autoimmunen Epithelitis“.

Ziel vorliegender Arbeit war eine genauere Charakterisierung der in diesen Prozeß involvierten B-Zellen, da eine Vielzahl von Vorbefunden darauf hinwies, daß diesen Zellen eine besondere Rolle im Rahmen der Erkrankung und ihrer Komplikationen zukommt. Die B-Zellen stellen damit ein potentiell Target einer differenzierten Therapie des SS dar. Die genauere Charakterisierung dieser lymphozytären Zellpopulation könnte aber auch helfen, Krankheitsstadien und Patientensubgruppen, z.B. Patienten mit bestimmtem Risikoprofil, besser zu identifizieren.

Die diesbezüglichen Analysen der B-Zellen von Patienten mit primärem SS und Kontrollpersonen erfolgten hierbei mit Methoden der: 1.) Immunphänotypisierung (4-Farb-Durchflußzytometrie, Immunhistologie); 2.) Einzelzellsortierung mit anschließender a) Analyse der variablen Abschnitte der rekombinierten Immunglobulin-Schwerketten (IgV_H)-Gene (auf DNA und mRNA-Ebene), b) der mRNA-Transkripte für Chemokinrezeptoren (CXCR3, CXCR4, und CXCR5) und den intrazellulären inhibitorischen Regulator RGS13; sowie 3.) Transmigrationsassays.

Ausgangspunkt vorliegender Analysen war eine detaillierte durchflußzytometrische Immunphänotypisierung B-zellulärer Subpopulationen des peripheren Blutes von Patienten mit SS und gesunden Kontrollpersonen. Hierbei konnte gezeigt werden, daß Patienten mit SS eine charakteristische Verminderung des absoluten und relativen Anteils von peripheren

CD19⁺CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen aufweisen, die insbesondere durch eine Verminderung der CD19⁺CD27⁺IgM⁺IgD⁺ (cB2) B-Zell-Subpopulation bedingt ist.

Hingegen zeigten erste Untersuchungen von Patienten mit SS und sekundärem B-Zell-Lymphom eine markante Vermehrung der peripheren CD19⁺CD27⁺ B-Zell-Fraktion gegenüber gesunden Kontrollen und, ausgeprägter, gegenüber Patienten mit SS ohne Lymphom. Ob einer Verlaufskontrolle peripherer CD19⁺CD27⁺ B-Zellen bei Sjögren-Patienten mit erhöhtem Lymphomrisiko eine diagnostische Bedeutung zukommen könnte, bleibt weiter zu klären.

Im Gegensatz zur Verminderung der peripheren CD27⁺Gedächtnis-B-Zellen, wiesen immunhistologische Untersuchungen auf eine Akkumulation dieser Zellen im Gewebefiltrat der Patienten mit SS hin. Eine vergleichende Analyse der IgV_H-Rearrangements individueller B-Zellen des Blutes und des Drüseninfiltrates zeigte auch auf DNA-Ebene, daß es sich bei den infiltrierenden B-Zellen überwiegend um (polyklonale) Gedächtnis-B-Zellen mit (z.T. hoch)mutierten IgV_H-Rearrangements handelt.

Damit lag die Vermutung nahe, daß eine Abwanderung von Gedächtnis-B-Zellen in das entzündete Gewebe zu einer Verminderung dieser B-Zell-Population im peripheren Blut der Patienten mit SS führt. Durch die Detektion klonal verwandter individueller B-Zellen in Blut und Parotisinfiltrat einer Patientin mit SS gelang der direkte Nachweis einer Beziehung der beiden B-Zell-Kompartimente (Blut / Drüseninfiltrat).

Chemokin-Chemokinrezeptor-Wechselwirkungen beeinflussen das lymphozytäre Wanderungsverhalten unter physiologischen wie auch unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. in Entzündungsprozessen, entscheidend. Um zu prüfen, ob sich die oben genannte Verschiebung B-zellulärer Subpopulationen von Patienten mit SS in einem differentiellen Muster ihrer Chemokinrezeptorexpression oder einem veränderten Migrationsverhalten der B-Zellen widerspiegelt, wurden weiterführende durchflußzytometrische, molekulare und funktionelle Analysen durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, daß Patienten mit SS gegenüber gesunden Kontrollen ein differentielles Expressionsmuster B-zellulärer Chemokinrezeptoren und des Regulators der Chemokinrezeptor-vermittelten intrazellulären Signalgebung, RGS13, aufweisen. Insbesondere fanden sich Hinweise, daß beim SS die CXCR4/CXCR5-koexprimierenden CD19⁺CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen, nicht aber die CXCR4/CXCR5-koexprimierenden CD19⁺CD27⁻ naiven B-Zellen, im peripheren Blut reduziert sind und im Drüseninfiltrat akkumulieren. Spiegelbildlich wiesen die im peripheren Blut der Patienten verbliebenen, zirkulierenden CD19⁺CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen in *in-vitro*-Transmigrationsassays eine

verminderte migratorische Kapazität gegenüber den korrespondierenden Liganden der Rezeptoren CXCR4 und CXCR5, CXCL12 und CXCL13, auf.

Weitere Hinweise auf Störungen der im peripheren Blut der Patienten mit SS verbliebenen bzw. (re-)zirkulierenden Gedächtnis-B-Zell-Fraktion ließen sich durch eine detaillierte Analyse der IgV_H-Rearrangements individueller B-Zellen auf mRNA-Ebene nachweisen. Hierfür wurden periphere CD19⁺CD27⁻ und CD19⁺CD27⁺ Einzel-B-Zellen von gesunden Normalpersonen und Patienten mit SS durchflußzytometrisch sortiert und anschließend auf die Expression der IgV_H-mRNA-Transkripte der Isotypen IgM (cμ), IgG (cγ) und IgA (cα) untersucht.

Gegenüber den gesunden Kontrollpersonen fanden sich hierbei für Patienten mit SS: 1) ein vom Ig-Isotyp unabhängiges Mutationsverhalten mit untypisch hoch mutierten cμ-Transkripten der IgV_H-Rearrangements CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen 2.) eine Population CD27⁻ „Gedächtnis-B-Zell-ähnlicher“ B-Zellen mit mutierten cμ-Transkripten, und 3.) periphere (*ex-vivo*-sortierte) individuelle Gedächtnis-B-Zellen, die gleichzeitig IgV_H-mRNA-Transkripte aller drei der untersuchten Isotypen (IgM, IgG, IgA) enthielten.

Zusammenfassend können die Befunde vorliegender Arbeit damit insbesondere im Sinne einer **Störung der B-Zell-Homöostase im Rahmen des SS** gewertet werden. Als diesbezüglich wesentliche Befunde sind zu nennen: • die präferentielle polyklonale Abwanderung von (CXCR4⁺CXCR5⁺)CD19⁺CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen in das entzündete Gewebe, • die (Re-)Zirkulation von B-Zellen, die Hinweise für Reifungsstörungen zeigen, wie CD19⁺CD27⁻ „Gedächtnis-B-Zell-ähnliche“ Zellen und B-Zellen mit Retention von Ig-mRNA verschiedener Schwereketten-Isotypen, sowie • die resultierende charakteristische Dominanz CD27⁻ und Reduktion CD27⁺ B-Zellen im peripheren Blut der Patienten.

Mit den CD19⁺CD27⁺IgM⁺IgD⁺ Gedächtnis-B-Zellen und den CD19⁺CD27⁻(IgM⁺) „Gedächtnis-B-Zell-ähnlichen“ Zellen wurden zwei Subpopulationen identifiziert, die insbesondere in diese Störung involviert zu sein scheinen. Es bleibt zu klären, ob und, wenn ja, welche Beziehung diese Zellen z.B. zu den CD19⁺CD27⁺IgM⁺⁺IgD^{+/-} Marginalzonen-B-Zellen der ektopen lymphatischen Strukturen besitzen, die mehrheitlich den Ausgangspunkt des malignen B-Zell-Lymphoms der Patienten mit SS bilden. Die weitere Charakterisierung der B-zellulären Subpopulationen könnte damit möglicherweise helfen, Ansatzpunkte für differenziertere B-Zell-gerichtete Therapien für Patienten mit SS zu entwickeln.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------------|--|
| ANA | antinukleäre Antikörper |
| BAFF | B-Zell aktivierender Faktor |
| B-CLL | B-chronic lymphocytic leukemia |
| CCL | Chemokin (Ligand) mit einem CC-Motiv |
| CCR | Rezeptor für ein Chemokin mit einem CC-Motiv |
| CD | cluster of differentiation |
| CXCL | Chemokin (Ligand) mit einem CXC-Motiv |
| CXCR | Rezeptor für ein Chemokin mit einem CXC-Motiv |
| DNA | desoxyribonucleic acid |
| FACS | fluorescence-activated cell sorting |
| FSC | forward scatter |
| _H CDR3 | heavy chain complementarity determining region 3 |
| Ig | Immunglobulin |
| IgH | immunoglobulin heavy chain |
| IgV _H | variable region of immunoglobulin heavy chain |
| IgV _L | variable region of immunoglobulin light chain |
| kDa | kiloDalton |
| LESA | lymphoepitheliale Sialadenitis |
| MALT | mucosa-associated lymphoid tissue |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| PCR | polymerase chain reaction |
| RA | Rheumatoide Arthritis |
| RGS | regulator of G-protein signaling |
| RT-PCR | reverse transcriptase-polymerase chain reaction |
| SLE | Systemischer Lupus Erythematoses |
| SS | Sjögren-Syndrom |
| SS-A | Sjögren-Syndrom Antigen A |
| SS-B | Sjögren-Syndrom Antigen B |
| SSC | side scatter |

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Scholze danke ich für die Koordination und Wegbereitung meiner medizinischen wie wissenschaftlichen Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Dörner für die innovative und produktive Zusammenarbeit an diesem Thema. Seine Erfahrung und wissenschaftliche Arbeitsweise waren mir Hilfe und Motivation zugleich.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Karin Reiter für die konstruktive Zusammenarbeit und die exzellente technische Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Axel Pruß danke ich für langjährige Zusammenarbeit, Hilfestellung an vielen „Klippen“ und seine Vorbildwirkung in effizientem, zeitnahe Arbeiten.

Herrn Prof Dr. Peter Lipsky danke ich für seine analytisch-konstruktive Unterstützung, die diese Arbeit stets begleitete.

Bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger von Baehr und Herrn PD Dr. med. Sigbert Jahn möchte ich mich für das Wecken eines ersten immunologischen Interesses, speziell an „B-zellulären“ Fragestellungen, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Gerd-Rüdiger Burmester und Herrn Prof. Dr. Falk Hiepe danke ich für die Einführung in die klinische Rheumatologie; Herrn Dr. Eugen Feist für seine kompetente Unterstützung in wissenschaftlichen wie klinischen Fragen.

Dank gilt auch „meinen“ Doktoranden, Herrn Marko Lehmann und Herrn Mirko Gosemann, die neue Motivation in die Arbeit eingebracht haben.

Frau Katharina Raba und Herrn Thoralf Kaiser danke ich für die Einzelzell-Sortierungen.

Es bleibt einer Vielzahl von Kollegen und Wissenschaftlern zu danken, die mich als Co-Autoren bzw. durch ihre tägliche Arbeit dieses Projekt unterstützt oder durch ihre Diskussion bereichert haben.

Besonders hervorheben möchte ich zudem die langjährige freundliche Unterstützung durch die Mitarbeiter der Gewebekbank, Herrn Sven Schurig und Herrn Frank Schweiger.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern, Brigitte und Karl Hansen, sowie meiner Frau Katrin für ihre allzeitige Fürsorge und Unterstützung.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

26.07.05

.....
Datum

Dr. A. Hansen

.....
Unterschrift