

**Untersuchung der B-Zell-Akkumulation im
entzündeten Synovialgewebe bei rheumatoider
Arthritis**

Inauguraldissertation

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Maren Henneken

geboren am 31. Mai 1973 in Berlin

angefertigt im Deutschen Rheuma Forschungszentrum Berlin

Arbeitsgruppe Frau PD Dr. Berek

Die Doktorarbeit wurde in der Zeit vom 1. Januar 2000 bis zum 27. Mai 2003 angefertigt.
Disputation am 7. November 2003

1. Gutachterin PD Dr. C. Berek
2. Gutachter Prof. Dr. V. A. Erdmann

In Erinnerung an die Zuversicht meiner „großen“ Oma.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Immunsystem	1
1.2	Chemotaxis	2
1.2.1	Chemokine	3
1.2.2	Chemokinrezeptoren	5
1.3	Entwicklung und Funktion von B-Zellen	6
1.3.1	Antigen-unabhängige Entwicklung von B-Zellen	7
1.3.2	Antigen-abhängige Differenzierung von B-Zellen	9
1.4	Autoimmunerkrankungen	10
1.5	Rheumatoide Arthritis	11
1.5.1	Gelenkaufbau	11
1.5.2	Krankheitsverlauf	12
1.5.3	Therapie der rheumatoiden Arthritis	13
1.5.4	B-Zellen in der rheumatoiden Arthritis	14
1.5.5	Chemokine in der rheumatoiden Arthritis	15
2	Fragestellung	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Computer-Programme und Datenbank	17
3.2	Lösungen	17
3.3	Primer	18
3.4	Verbrauchsmaterial	19
3.5	Gewebe und Blut	19
3.6	Präparation von Gewebe	21
3.6.1	Einzelzell-Suspension aus Gewebe	21
3.6.2	Dichtegradientenzentrifugation	21
3.7	Immunhistochemische Methoden	21

3.7.1	Beschichten von Objektträgern	21
3.7.2	Gefrierschnitte	22
3.7.3	Immunohistochemische Färbung	22
3.7.4	Verstärkung von immunohistochemischen Färbungen	23
3.8	Durchflusszytometrische-Methoden	24
3.8.1	FACS-Messung	24
3.8.2	FACS-Zellsortierung	24
3.9	Migrations-Test	25
3.10	Molekularbiologische Methoden	26
3.10.1	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion	26
3.10.2	Klonierung	28
3.10.3	Sequenzierung	29
3.11	V-Gen-Sequenz-Analyse	30
3.12	Statistische Analyse	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Lokalisation der B-Zellen im Synovialgewebe	31
4.2	V-Gen Repertoire von B-Zellen aus verschiedenen Kompartimenten	34
4.3	Bestimmung des B-Zell-Anteils	36
4.3.1	Anteil der B-Zellen und Subpopulationen im peripheren Blut	37
4.3.2	Einfluss der Behandlung auf den Anteil der B-Zellen	38
4.3.3	B-Zell-Anteile aus Synovialflüssigkeit	40
4.3.4	B-Zell-Anteile aus Synovialgewebe	41
4.3.5	Übersicht der B-Zell-Anteile verschiedener Kompartimenten	41
4.4	Nachweis von Chemokinen und deren Rezeptoren	42
4.4.1	Chemokinrezeptoren und Chemokine im Synovialgewebe	43
4.4.2	Nachweis von Chemokinrezeptor-mRNA in B-Zellen	45
4.4.3	Expression von Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche von B-Zellen	46
4.4.4	Zwei CXCR3-positive B-Zell-Fraktionen	47
4.5	Anteil Chemokinrezeptor-tragender B-Zellen	48
4.5.1	Anstieg des Anteils CXCR3 „hoch“ exprimierender B-Zellen	48
4.5.2	Verschiebung des Anteils CXCR4-tragender B-Zellen bei Patienten	50
4.5.3	Reduktion des Anteils CXCR5-positiver B-Zellen bei Patienten	52
4.5.4	Reduktion des Anteils CCR6-tragender B-Zellen bei Patienten	54
4.5.5	Keine Änderung im Anteil der B-Zellen, die positiv sind für CCR5, CCR7 und CCR9	55
4.5.6	Einfluss der Therapie auf den Anteil Chemokinrezeptor-tragender B-Zellen	56

4.5.7	Darstellung der veränderten Anteile Chemokinrezeptor-positiver B-Zellen bei Patienten	57
4.5.8	Abhängigkeiten der Expression verschiedener Chemokinrezeptoren untereinander	59
4.6	Einfluss der Chemokinrezeptor Expression auf die Wanderung von B-Zellen . . .	60
5	Diskussion	63
5.1	Synovialgewebe und Synovialflüssigkeit	63
5.2	V-Gen-Analyse	66
5.3	B-Zellen in peripherem Blut	67
5.4	Chemokinrezeptoren auf peripheren B-Zellen	68
5.5	Einfluss der Therapie auf die B-Zellen	73
5.6	Ausblick	74
6	Zusammenfassung	76
7	Summary	78
	Literatur	80
	Anhang	94
	Abkürzungsverzeichnis	97
	Herstellernachweis	99

Abbildungsverzeichnis

1.1	Darstellung zentraler und peripherer Lymphorgane	2
1.2	Schematische Darstellung der vier Chemokin-Subfamilien	3
1.3	B-Zell Entwicklung	7
1.4	Schema der V-Gen Rearrangierung einer H-Kette	8
1.5	Anatomie des Gelenks	11
1.6	Veränderungen am Gelenk bei rheumatoider Arthritis	13
3.1	Lage der Primer für die RT-PCR der H-Kette	26
4.1	B-Zell-Verteilung im Synovialgewebe	32
4.2	Histologisches Bild von Synovialgewebe	33
4.3	OA-Synovialgewebe und Synovialmembran einer Kontrolle	34
4.4	Beschreibung der B-Zellen in der FACS-Analyse	36
4.5	Veränderte B-Zell-Anteile bei Patienten	37
4.6	Einfluss der Behandlung auf die B-Zell-Anteile	39
4.7	FACS-Analyse einer Synovialflüssigkeit	40
4.8	FACS-Analyse von Synovialgewebe	41
4.9	Anteil der B-Zellen in den Kompartimenten bei Patienten mit RA	42
4.10	Chemokine und Rezeptoren im Synovialgewebe	43
4.11	Zellen im Synovialgewebe, Histologisches Bild	44
4.12	Nachweis von Chemokinrezeptor-RNA aus B-Zellen mittels RT-PCR	45
4.13	Expression von Chemokinrezeptoren auf peripheren B-Zellen	46
4.14	Bestimmung der Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen in Subpopulationen	47
4.15	Drei Fraktionen in der CXCR3-Expression auf Lymphozyten	48
4.16	Zunahme der CXCR3 „hoch“ Expression bei RA	49
4.17	Unterschiedliche Anteile CXCR3 „hoch“ exprimierender B-Zellen	50
4.18	Anteil der CXCR4-positiven B-Zellen	51
4.19	Anteil der CXCR5-positiven B-Zellen	53

4.20 Anteil der CCR6-positiven B-Zellen	55
4.21 Kein Unterschied der Chemokinrezeptor Expression auf B-Zellen	56
4.22 Einfluss der Therapie auf Chemokinrezeptor-tragende B-Zellen	57
4.23 Vergleich der Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen von Patienten	58
4.24 Verteilung der doppelt positiven Zellen in den Subpopulationen	59
4.25 Vergleich der CXC-Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen von RA-Patienten . . .	60
4.26 Korrelation der CXC-Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen von RA-Patienten .	61
4.27 Konzentrationsabhängige Wanderung der B-Zellen auf Chemokine	61
4.28 Verteilung CXCR4-positiver B-Zellen vor und nach Migration	62
4.29 Verteilung CXCR3-positiver B-Zellen vor und nach Migration	62
A.1 Ausschnitt einer H-Ketten-Sequenz eines Antikörpers	96

Tabellenverzeichnis

1.1	Ausgewählte Chemokine der Subfamilien und ihre Funktion	4
1.2	Chemokinrezeptoren der Subfamilien und ihre Liganden	6
3.1	Charakteristika der untersuchten Patientengruppen	20
3.2	Antikörper für immunohistochemische Färbungen	23
3.3	Antikörper für durchflußzytometrische Messungen	25
4.1	Charakterisierung des Synovialgewebes von Patienten mit RA	32
4.2	Ergebnisse der V-Genanalyse der H-Kette der Antikörper	35
4.3	Mutationsanalyse der VH-Sequenzen H-Kette der Antikörper	35
4.4	Statistik der B-Zell- und Subpopulations-Anteile	38
4.5	Statistik der B-Zell- und Subpopulations-Anteile bei therapierten Patienten	40
4.6	Statistik der CXCR3 „hoch“ expremierenden B-Zell-Anteile	49
4.7	Statistik der CXCR4-positiven B-Zell-Anteile	52
4.8	Statistik der CXCR5-positiven B-Zell-Anteile	54
4.9	Statistik der CCR6-positiven B-Zell-Anteile	54
A.1	Klinische Daten der Patienten	95
A.2	Herstellerverzeichnis	99