

# 1 Einleitung

## 1.1 Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen hat die Aufgabe, den Organismus vor körperfremden Stoffen zu schützen. Wenn Krankheitserreger wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten die äußeren Barrieren wie die Haut durchbrechen und in den Körper gelangen, werden sie vom Immunsystem überprüft. Werden sie als „fremd“ erkannt, greift die unspezifische (angeborene) Abwehr an. Reicht diese nicht aus, wird sie durch die spezifische (erworbene) Immunantwort unterstützt [1]. Sind beide Systeme zu langsam oder nicht ausreichend, kommt es zum Ausbruch von Krankheiten, die im weiteren Verlauf durch das Immunsystem kontrolliert werden. Das spezifische Immunsystem erwirbt nach dem ersten Kontakt mit einem Antigen eine Art „Gedächtnis“, so dass nachfolgende Reaktionen mit demselben Antigen schneller und auch verstärkt ablaufen. Immunreaktionen unterliegen einer Kontrolle, damit sie sich nur gegen „fremde“ und nicht gegen körpereigene Strukturen richten. Die Wahrung einer Toleranz gegen den eigenen Körper ist ein weiteres entscheidendes Merkmal.

Im Immunsystem wirken unterschiedliche Organe, Zelltypen und lösliche Proteine zusammen, um den Schutz für den Organismus zu gewährleisten. Zu den primären oder zentralen Lymphorganen gehören das Knochenmark und der Thymus, in denen Zellen des Immunsystems gebildet werden und reifen. Zu den sekundären oder peripheren Lymphorganen gehören Lymphknoten, Milz, Tonsillen, Appendix sowie die Peyerschen Plaques am Dünndarm, in denen die Zellen interagieren und aktiviert werden. Bei der unspezifischen Abwehr besteht die humorale Seite aus Zytokinen, Enzymen, Akute-Phase-Proteinen und dem Komplementsystem. Zellulär wird die angeborene Immunantwort durch Granulozyten vermittelt, die ohne vorherigen Kontakt an „fremde“ Stoffe binden, diese aufnehmen und lysieren können. Alle Zellen, die bei der angeborenen Immunität eine Rolle spielen, sind auch an der spezifischen Immunantwort beteiligt. Die spezifische oder adaptive Immunität wird durch Lymphozyten vermittelt. Zu den Lymphozyten gehören die T- und B-Zellen. Die Antikörper-produzierenden B-Zellen stellen das Gedächtnis des adaptiven Immunsystems dar. Die Vorläufer der Lymphozyten stammen aus dem Dottersack des heranwachsenden Embryos, sie teilen sich und wandern in die fötale Leber. Von dort wandern einige Zellen ins Knochenmark (B-Zelllinie) und andere in den Thymus (T-Zelllinie). Der Mensch besitzt mehr

T- als B-Lymphozyten; im Blut beträgt das Verhältnis etwa 5:1. Im adulten Körper entstehen Lymphozyten aus hämatopoetischen Stammzellen und differenzieren in den zentralen lymphatischen Organen. Von dort wandern sie durch das Blut in die peripheren sekundären lymphatischen Gewebe, in denen die Aktivierung der Lymphozyten durch die Antigene erfolgt. Aus den Lymphknoten werden die aktivierten Lymphozyten mit der extrazellulären Flüssigkeit (Lymphe) über die Lymphgefäße und den *Ductus thoracicus* in die linke *Vena subclavia* und so in den Blutstrom zurück geleitet. Im Blut zirkulierende Lymphozyten wandern durch den Körper, bis sie erneut auf ihr Antigen treffen (siehe Abb. 1.1).

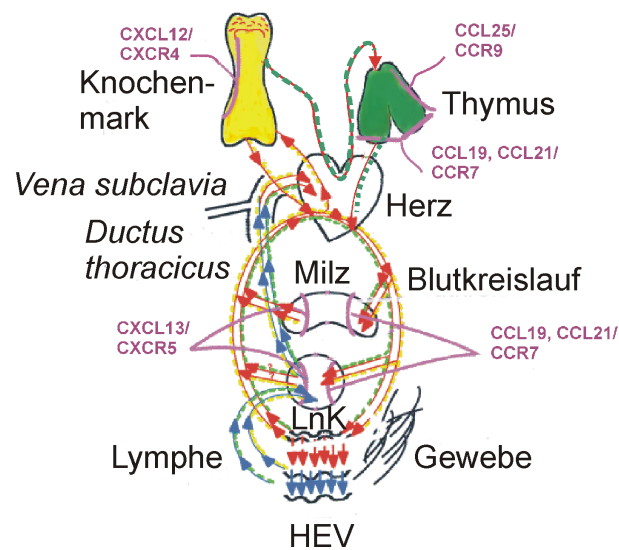


Abbildung 1.1: **Darstellung zentraler und peripherer Lymphorgane.** Der Weg der B-Zellen ist in gelb, der der T-Zellen in grün dargestellt. Die für die Wanderung wichtigen Chemokine und Chemokinrezeptoren sind in lila markiert. Lymphknoten (LnK), aktiviertes Endothel (engl.: high endothelial venules, HEV). Abbildung von Melchers et al. [2], abgeändert.

## 1.2 Chemotaxis

Chemokine wirken auf Zellen, die Chemokinrezeptoren tragen und vermitteln eine Wanderung (Migration) der Zellen in Richtung der Chemokine. Diese Wanderung der Zellen wird als Chemotaxis bezeichnet. Es sind nicht alle Aufgaben des Signalsystems der Chemokine und Chemokinrezeptoren geklärt, da es viele Überschneidungen aufweist [2]. Ein Chemokin kann an mehrere Rezeptoren binden und ein Rezeptor kann mehr als ein Chemokin binden; ein Zelltyp kann mehr als einen Rezeptor tragen und verschiedene Chemokine produzieren.

### 1.2.1 Chemokine

Chemokine gehören zu den sekretierten Zytokinen. Sie sind kleine, über Disulfidbrücken stabilisierte Polypeptide mit einer Länge von 60-70 Aminosäuren (s. Abb. 1.2). Bis heute sind 50 Chemokine beim Menschen beschrieben [3, 4]. Chemokine wirken für verschiedene Zelltypen, wie z. B. T- und B-Zellen, natürliche Killerzellen, Basophile, Eosinophile, Neutrophile, Monozyten und Makrophagen, die Chemokinrezeptoren tragen, chemotaktisch. Sie vermitteln die Migration von Lymphozyten (s. Abb. 1.1) in den zentralen Lymphorganen, von den zentralen zu den peripheren Lymphorganen, während der humoralen Immunantwort, in und zwischen den sekundären Lymphorganen [5, 6, 7, 8]. Sie wirken aber auch bei normalen und pathophysiologischen Prozessen, wie hämatopoetische Zellentwicklung, Wundheilung, Entzündung, Infektionen, Allergie, Autoimmunerkrankungen sowie der Entwicklung von Geweben (Angiogenese), Tumorwachstum und Metastasierung [9, 10].

Chemokine haben meist vier konservierte Cysteinreste (C1-C4), die zwei intramolekulare Disulfidbrücken bilden (s. Abb. 1.2). Nach der Lage der beiden ersten Cysteinreste werden die Chemokine in Subfamilien eingeteilt [11]. Es gibt die Gruppen CXC- (oder  $\alpha$ -), CC- (oder  $\beta$ -), C- und CX3C-Chemokine.

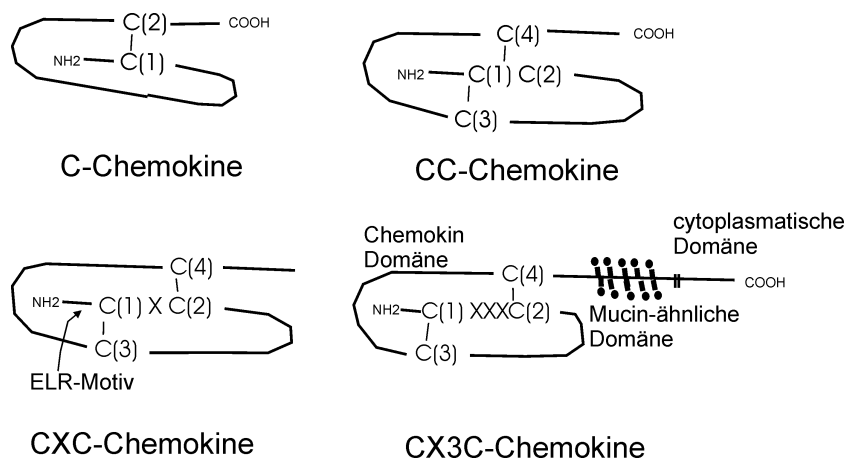


Abbildung 1.2: **Schematische Darstellung der vier Chemokin-Subfamilien.** Einteilung nach der Lage der Cysteinreste (C1-C4).

Bei der CXC-Subfamilie ist eine Aminosäure zwischen den ersten zwei Cysteinresten lokalisiert. Diese Subfamilie umfasst beim Menschen 16 verschiedene Chemokine. Sie werden weiter unterteilt durch das Auftreten des ELR (Glu-Leu-Arg) Sequenzmotivs nahe des ersten Cysteinrests (s. Abb. 1.2). Die ELR<sup>+</sup> Chemokine beeinflussen Neutrophile, während ELR<sup>-</sup> Chemokine auf Lymphozyten wirken. Sie haben aber auch Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen,

Zell-Matrix-Interaktionen, die Reorganisation des Zytoskeletts während einer Entzündungsreaktion [12]. Die meisten ELR<sup>+</sup> CXC-Chemokine unterstützen, während die ELR<sup>-</sup> Neovaskulation hemmen [13, 14]. Eine Ausnahme bildet CXCL12, das als ELR<sup>-</sup> positiv auf die Angiogenese wirkt [15]. Zur großen Gruppe der CC-Chemokine, bei der die beiden konservierten Cysteinreste durch keine weitere Aminosäure getrennt sind, gehören 25 Chemokine [11]. Ziel-Zellen der CC-Chemokine sind fast alle Leukozyten-Subpopulationen [16]. Zu der C-Subfamilie gehören beim Menschen zwei Chemokine. Beide wirken auf Lymphozyten und natürliche Killerzellen. Die CX3C-Subfamilie besteht aus nur einem Vertreter (s. Tabelle 1.1). CX3CL1 wird auf zytokinaktivierten Endothelzellen, aber von keinen peripheren Blut-Leukozyten expremiert [17].

Tabelle 1.1: **Ausgewählte Chemokine der Subfamilien und ihre Funktion**

Systematischer Name	Weitere Namen	Funktion
<i>C Chemokine</i>		
XCL1	Lymphotactin	Homing
XCL2	SCM-1 $\beta$	Homing
<i>CC Chemokine</i>		
CCL3	MIP-1 $\alpha$ /LD78 $\alpha$	Entzündung
CCL4	MIP-1 $\beta$	Entzündung
CCL5	RANTES	Entzündung
CCL19	MIP-3 $\beta$ /ELC/exodus-3	Homing
CCL20	MIP-3 $\alpha$ /LARC/exodus-1	Entzündung
CCL21	6Ckine/SLC/exodus-2	Homing
CCL25	TECK	Homing
<i>CXC Chemokine</i>		
CXCL8	IL-8	Entzündung, Angiogenese
CXCL9	MIG	Entzündung
CXCL10	IP-10	Entzündung
CXCL11	I-TAC	Entzündung
CXCL12	SDF1	Homing, Angiogenese
CXCL13	BLC/BCA-1	Homing
<i>CX3C Chemokine</i>		
CX3CL1	Fractalkin	Entzündung

Systematische Nomenklatur nach Zlotnik et al. [11]

Neben der Einteilung nach den konservierten Cysteinresten können die Chemokine nach ihrer Funktion in zwei Gruppen unterteilt werden (s. auch Tabelle 1.1), entzündliche (induzierbare)

bzw. konstitutive, lymphatische (*homing*) Chemokine [3, 18]. Unter *homing* versteht man das Einnisten von Zellen in bestimmten Gewebe, wie z. B. von B-Zellen in lymphatischen Organen. Die Chemokine, die die Wanderung von Zellen unter physiologischen Bedingungen und *homing* steuern, beeinflussen vor allem Zellen, die zum erworbenen Immunsystem gehören [19]. Diese Chemokine werden konstitutiv in bestimmten Regionen von lymphoiden und nicht-lymphoiden Geweben expremiert (s. Tabelle 1.1). Die induzierbaren Chemokine werden von vielen verschiedenen Gewebezellen und einwandernden Leukozyten nach einer Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen und Pathogenen produziert. Die Hauptaufgabe dieser Chemokine ist die Rekrutierung von Effektorzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Chemokine wie z. B. CXCL8, CCL3, CCL5 und CCL20 unterstützen die Entzündung. Chemokine wie CXCL9 und CXCL10 wirken dagegen hemmend [20].

### 1.2.2 Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren werden auf einer großen Zahl verschiedener Zelltypen expremiert. Es sind 18 Chemokinrezeptoren beim Menschen beschrieben [3, 4, 21, 22]. Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die mit sieben Transmembran- $\alpha$ -Helices die Zellmembran durchspannen und zur Rhodopsin-Superfamilie gehören. Sie haben einen außerhalb der Zelle gelegenen N-Terminus, drei extrazelluläre Domänen, drei intrazelluläre Schlaufen und einen im Zytoplasma gelegenen C-Terminus, der Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen enthält. Die Signale werden über Pertussis Toxin sensitive  $G\alpha_i$ -heterotrimere G-Proteine vermittelt, zur Bildung eines kurzlebigen intrazellulären Signals. Die Signaltransduktion führt zur Aktivierung der Protein-Kinase C und der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase. Einige Chemokinrezeptoren, wie z. B. CXCR4, können durch Aktivierung der Protein-Kinase B zur Erzeugung länger anhaltender Signale führen. Die Aktivierung der Proteinkinase hat letztlich eine auf die Chemokine gerichtete Chemotaxis der Zielzelle zur Folge. Die Chemokinrezeptoren binden ihre jeweiligen Liganden mit hoher Affinität, mit Dissoziations-Konstanten im nanomolaren Bereich. Ungewöhnlich für Mitglieder der sieben Transmembran-Rezeptor-Superfamilie ist, dass nahezu alle Chemokinrezeptoren mehrere Chemokine als Liganden mit hoher Affinität binden können. So bindet z. B. CCR5 sowohl CCL3, CCL4 als auch CCL5 (s. Tabelle 1.2), dies ermöglicht eine komplexe Regulation.

Die Chemokinrezeptoren werden in Familien eingeteilt, die nach den Chemokin-Subfamilien benannt sind, die sie binden. Zu den C-Chemokinrezeptoren gehört ein Rezeptor (XCR1), zu den CC-Chemokinrezeptoren gehören elf (CCR1-CCR10), zu den CXC-Chemokinrezeptoren sechs (CXCR1-CXCR6). Der einzige Vertreter der CX3C-Chemokinrezeptor-Familie ist CX3CR1 [23].

In der Literatur ist die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR5, CCR6, CCR7 und CCR9 auf B-Zellen beschrieben [3, 24].

Tabelle 1.2: Chemokinrezeptoren der Subfamilien und ihre Liganden

Systematischer Name	bindendes Chemokin
<i>C Rezeptoren</i>	
XCR1	XCL1, XCL2
<i>CC Rezeptoren</i>	
CCR1	CCL3, CCL5, CCL7, CCL14, CCL15, CCL16, CCL23
CCR2	CCL2, CCL7, CCL13
CCR3	CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL24, CCL26
CCR4	CCL17, CCL22
CCR5	CCL3, CCL4, CCL5
CCR6	CCL20
CCR7	CCL19, CCL21
CCR8	CCL1
CCR9	CCL25
CCR10	CCL27
<i>CXC Rezeptoren</i>	
CXCR1	CXCL1, CXCL6, CXCL8
CXCR2	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8
CXCR3	CXCL9, CXCL10, CXCL11
CXCR4	CXCL12
CXCR5	CXCL13
<i>CX3C Rezeptor</i>	
CX3CR1	CX3CL1

Nomenklatur nach Zlotnik et al. [11].

### 1.3 Entwicklung und Funktion von B-Zellen

B-Lymphozyten sind bei der spezifischen Immunantwort durch die Produktion von Antikörpern wichtig und stellen das Gedächtnis des Immunsystems dar. Der Organismus kommt mit einer Vielzahl von Pathogenen in Kontakt, gegen die spezifische Antikörper gebildet werden. Jede B-Zelle exprimiert nur Antikörper einer Spezifität. Die Entwicklung der B-Zellen kann in zwei Abschnitte eingeteilt werden, in den Antigen-unabhängigen und den Antigen-abhängigen Teil, bis die B-Zellen zur reifen Plasmazelle (Effektorzelle) ausdifferenzieren und grosse Mengen an Antikörper sezernieren (s. Abb. 1.3). Naive und Gedächtnis-B-Zellen sowie Plasmazellen lassen sich durch die Expression verschiedener Oberflächenmarker, z. B. CD19, CD20, CD27 und CD38 (engl.: cluster of differentiation, CD) unterscheiden.

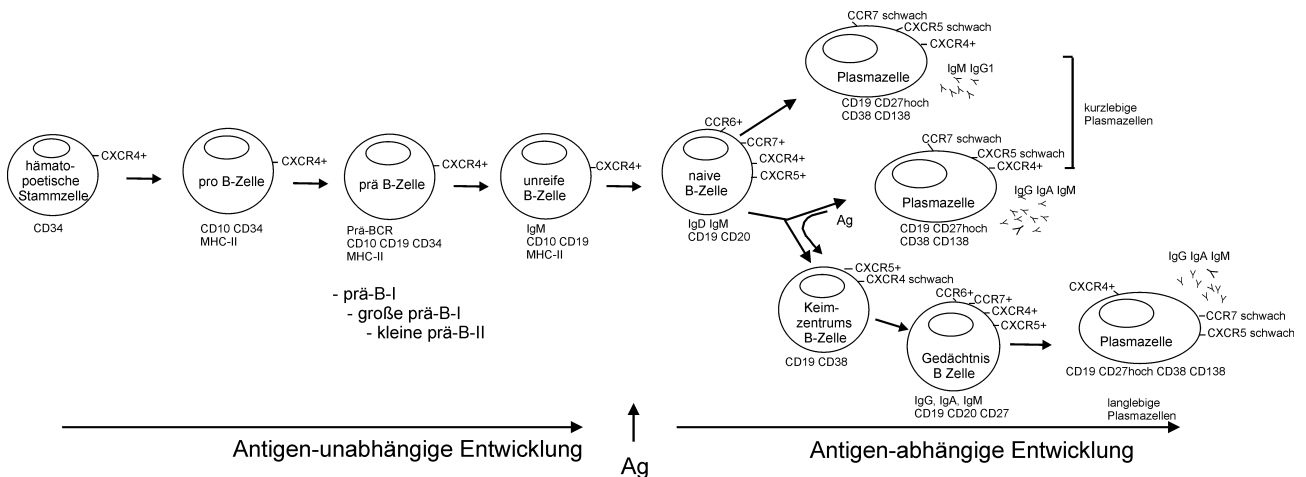


Abbildung 1.3: **B-Zell Entwicklung.** Expression der Oberflächenmarker auf den B-Zellen der verschiedenen Differenzierungs-Stadien. Krzysiek et al. [25] abgeändert. Ag, Antigen.

Der B-Zell-Rezeptor (engl.: B cell receptor, BCR) ist der wichtigste Oberflächenmarker für die Funktion der B-Zellen. Er gehört zu den Immunglobulinen (Ig) und ist die Membran-gebundene Form des Antikörpers, den die zu Plasmazellen ausdifferenzierten B-Zellen sezernieren. Der BCR ist ein Heterodimer und besteht aus zwei schweren (engl.: heavy, H) und zwei leichten (engl.: light, L) Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind (s. Abb. 1.4). Amino-terminal enthalten beide Ketten variable Aminosäuresequenzen (V-Region), die die Antigen-Bindungsstelle bilden. Carboxyterminal von H- und L-Ketten ist die konstante Region. Diese Region besitzt bei den H-Ketten Effektorfunktion wie die Komplementfixierung. Nach der konstanten Region der H-Kette werden die Antikörper in Klassen eingeteilt (IgM, IgG, IgA, IgD und IgE). Die konstante Region ist bei einem Isotyp immer gleich, unabhängig von der Spezifität des Antikörpers. Bei der L-Kette besteht diese Region entweder aus einem  $\kappa$ - oder  $\lambda$ -Isotyp.

### 1.3.1 Antigen-unabhängige Entwicklung von B-Zellen

In der Antigen-unabhängigen Entwicklung werden die in begrenzter Zahl vorhandenen Keimbahngene für den BCR kombiniert und durch Mutationen weiter variiert, um die Diversität des Antikörper Repertoires zu erhöhen. Im Knochenmark entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen frühe pro-B-Zellen (s. Abb. 1.3), sie tragen unter anderem CD19 als Oberflächenmarker [26] und den Chemokinrezeptor CXCR4 [25] (s. Abschnitt 1.2). In diesem Stadium sind die Gene für den BCR noch in der Keimbahn Konfiguration (s. Abb. 1.4, oberste Reihe). Die Gene für die variable Region der H-Kette des BCR bestehen aus drei Genabschnitten V, D, und J (von engl.: variability, diversity, joining). Von jedem der Genabschnitte gibt es mehrere Varianten, die sich in ihrer Nukleotidsequenz unterscheiden. Die Antikörper-Vielfalt wird durch die zufällige

Verknüpfung unterschiedlicher Genabschnitte erzeugt. Die zufällige Verknüpfung der Kopien der VDJ-Segmente wird als Rearrangierung bezeichnet. Die zwischen den verknüpften Gensegmenten liegenden Bereiche werden dabei deletiert (s. Abb. 1.4, zweite Reihe). Gleichzeitig wird die Rearrangierungsmaschine für die leichte Kette eingeschaltet [27].

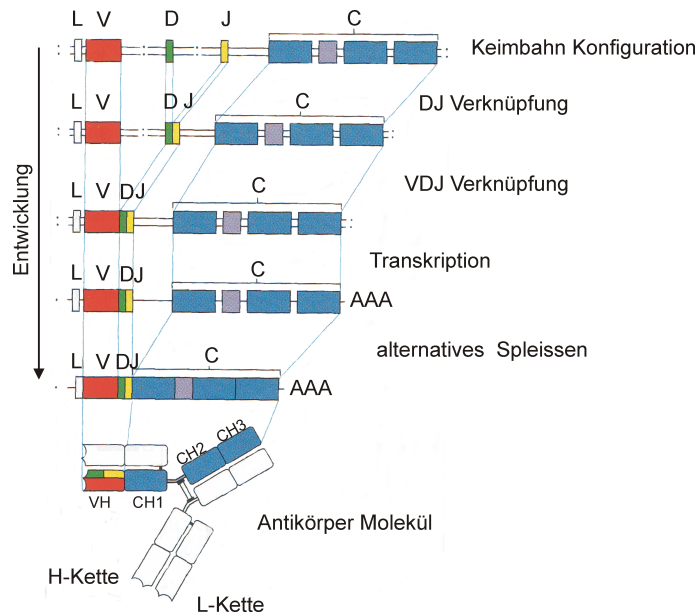


Abbildung 1.4: **Schema der V-Gen Rearrangierung und Prozessierung einer schweren Antikörper-Kette.** Die Genumordnungen für die schwere Kette sind dargestellt. Im ersten Schritt wird ein D mit einem J Gensegment verbunden, bevor ein V-Segment dazu kommt. Die dazwischen liegenden DNA Bereiche werden herausgeschnitten. Die letzte Änderung erfolgt auf Ebene der RNA. Abbildung aus Janeway [28], verändert.

Da die DNA-Rearrangierung und die Kombinationen der H- und L-Kette zufällige und ungerichtete Prozesse sind, können dabei auch autoreaktive Formen der Lymphozyten entstehen. Noch im Knochenmark werden die BCR auf Autoreaktivität überprüft und die Zellen negativ selektioniert. Bei der negativen Selektion werden B-Zell Klone mit einer Spezifität gegen ubiquitäre, multivalente Liganden durch Apoptose eliminiert oder funktionell inaktiviert. Die unreife B-Zelle kann ihren autoreaktiven Rezeptor durch einen neuen Rezeptor ersetzen, um dem Apoptose-Signal zu entkommen [29, 30].



### 1.3.2 Antigen-abhängige Differenzierung von B-Zellen

Nur ein kleiner Teil der im Knochenmark produzierten B-Zellen überlebt die Selektionierungen. Die Zellen verlassen das Knochenmark als naive B-Zellen [8]. Die naiven B-Zellen zirkulieren in der Blutbahn und der Lymphe (s. Abb.1.1 und 1.3)). Für die Wanderung in der Peripherie ist das Zusammenspiel von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen wichtig. Naive B-Zellen sind positiv für die Chemokinrezeptoren CCR6, CXCR4 [25] und CCR7, CXCR5 [31]. Alle zirkulierenden reifen B-Lymphozyten tragen CXCR5 [32, 33, 34, 35]. Werden sie durch ihr Antigen aktiviert, wird z. B. CCR7 hochreguliert [31] und sie wandern in die sekundären Lymphorgane ein. CCR7 ist wichtig, damit die B-Lymphozyten aus dem Blut, über das aktivierte Endothel (HEV) in die sekundären Lymphorgane gelangen. In den sekundären Lymphorganen sind B-Zell-Follikel und extrafollikuläre T-Zell-Regionen lokalisiert [36]. Die Positionierung der T- und B-Zellen in den Primärfollikel erfolgt durch die Chemokine CXCL13, CCL19 und CCL21, die unter anderen von Stromazellen produziert werden [8, 37, 38]. Eine wichtige Rolle spielt dabei der Chemokinrezeptor CXCR5 und dessen Ligand CXCL13 [39, 40, 41, 42].

Die Keimzentrumsreaktion beginnt, wenn naive B-Zellen durch die spezifische Bindung ihres Antigens an den BCR aktiviert werden und kostimulatorische Signale von T-Helferzellen erhalten [43, 44, 45]. Es kommt zu somatischen Hypermutationen in den V-Genen der B-Zellen. In diesem Prozess werden meist einzelne Nukleotide substituiert [46], wogegen Insertion und Deletion von Nukleotiden selten sind [47, 48]. Es kommt durchschnittlich zu  $10^{-3}$  Nukleotidaustauschvorgängen pro Basenpaar und Generation [49, 50, 51]. Somatische Mutationen finden normalerweise nicht in den Genen der konstanten Region des BCR statt [52]. Obwohl alle Nukleotide in den V-Genen mutierbar sind, werden Mutationen in den Antigenbindungsstellen (engl.: complementarity determining region, CDR) häufiger gefunden als in den umgebenen Bereichen.

Die große Fraktion der B-Zellen, die durch die Mutationen eine niedrige Bindung zum Antigen erlangt oder es nicht mehr binden kann, wird apoptotisch. B-Zellen, die durch somatische Mutationen eine höhere Affinität zum Antigen erzielen, werden positiv selektioniert [53]. Diesen Vorgang bezeichnet man als Affinitätsreifung [54]. Für das Weiterleben der B-Zellen und ihre Differenzierung ist sowohl die antigenspezifische Interaktion als auch eine kostimulatorische Interaktion zwischen Zelloberflächenmolekülen von T- und B-Zellen wichtig. Dies führt zur Differenzierung der B-Zellen zu Gedächtniszellen [55, 56, 57]. In diesem Stadium der B-Zelle kommt es zum Isotypenwechsel. Die Gedächtnis B-Zellen sind zusätzlich zu CD19 und CD20 positiv für CD27 [58, 59]. Die Chemokinrezeptoren CCR7, CXCR4, CXCR5 werden expremiert [34], CCR6 wird hoch reguliert [25] (s. Abb. 1.3). Außer den zellulären Interaktionen von T- und B-Zellen spielen auch lösliche Proteine wie CD23, Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) und IL-10, TNF- $\alpha$  oder Lymphotoxin- $\alpha$ , aber auch B-Zell-Aktivierungsfaktoren wie BAFF (engl.: B cell activating factor belonging to the TNF family) in der Ausdifferenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen eine Rol-

le [60, 61, 62, 63, 64]. Ausdifferenzierte Plasmazellen exprimieren auf der Oberfläche CD38. Der Oberflächenmarker CD27 wird hoch expremiert (s. Abb. 1.3) [65]. Der Oberflächenmarker CD20 geht verloren. Für den Chemokinrezeptor CCR6 sind sie negativ und für CXCR4-positiv [25]. Die Rezeptoren CXCR5 und CCR7 werden bei der Ausdifferenzierung zu Plasmazellen runter reguliert [66]. Langlebige, Antikörper sezernierende Plasmazellen wandern wieder ins Knochenmark [67, 68].

## 1.4 Autoimmunerkrankungen

Durch das Versagen der Mechanismen der Selbsttoleranz des Immunsystems können Autoimmunerkrankungen entstehen. Da Autoimmunerkrankungen gehäuft in Familien auftreten, ist eine genetische Prädisposition vorhanden [69]. An Mäusen konnte gezeigt werden, dass wenn es zu Mutationen in dem Transkriptionsregulator AIRE kommt, die Präsentation von Gewebe-spezifischen Antigenen im Thymus beeinträchtigt ist [70]. Im AIRE-Mausmodell wird dieser Vorgang durch die unvollständige Elimination aller autoreaktiven T-Zellen erklärt [71]. Auch beim Menschen kommt es infolge mangelnder zentraler Toleranzinduktion zu einer Reihe von Autoimmunerkrankungen [72]. Normalerweise werden im Organismus autoreaktive T-Zellen zusätzlich durch eine klonale Deletion nach Antigenerkennung [73] oder durch supprimierende Zytokine von regulatorischen T-Zellen [74, 75] und Anergie [76] kontrolliert.

Autoimmunerkrankungen könnten aber auch ihren Ursprung in Kreuzreaktion haben. Dies bedeutet, dass Antikörper oder T-Zellrezeptor, die ursprünglich pathogene Strukturen erkannt haben, körpereigene oder ähnliche Struktur-Motive erkennen und spezifische Immunreaktionen auslösen. Zu den Autoimmunerkrankungen gehören u. a. Multiple Sklerose, Diabetes mellitus Typ I, Hashimoto-Thyreoiditis, rheumatoide Arthritis und systemischer Lupus erythematodes. Beim Diabetes und Hashimoto-Thyreoiditis gibt es einen direkten Einfluss der Autoantikörper. Sie sind beim Diabetes Typ I gegen die Insulin produzierenden Inselzellen und beim Hashimoto-Thyreoiditis gegen Thyroglobulin und Schilddrüsen-Peroxidase gerichtet, wodurch die betroffenen Gewebe ihre Funktion nicht mehr erfüllen können [77]. Beim systemischen Lupus erythematodes (SLE) bilden sich reaktive Autoantikörper gegen zytoplasmatische und nukleäre Antigene. Die entstehenden Antigen-Antikörper-Komplexe lagern sich in zahlreichen Organen ab und rufen dort Entzündungsreaktionen hervor [78].

## 1.5 Rheumatoide Arthritis

Die chronische Polyarthrititis oder rheumatoide Arthritis (RA) ist mit einer Prävalenz von etwa 2 % die häufigste der entzündlichen Gelenkserkrankungen. Die Erkrankungshäufigkeit ist bei Frauen ungefähr drei bis vier mal höher als bei Männern, der Altersgipfel liegt im vierten Lebensjahrzehnt [79]. Die RA wird zu den Autoimmunerkrankungen gezählt, durch das Auftreten von Autoantikörpern [80, 81, 82]. Neben Umweltfaktoren (Nahrung, Medikamente, Toxine aber auch Infektionen) werden aufgrund des häufigeren Auftretens bei Frauen auch endokrine (hormonelle) Faktoren diskutiert.

### 1.5.1 Gelenkaufbau

Das Gelenk wird durch eine Gelenkkapsel allseitig umschlossen, die aus einer äußeren Faserschicht und einer spezialisierten Innenschicht (Synovialmembran) besteht. Die äußere Faserschicht wird an beanspruchten Stellen durch Bänder verstärkt. Die gefäßreiche Synovialmembran (s. Abb. 1.5) besteht in gesunden Gelenken aus nur ein bis drei Zellen, ihre Oberfläche ist durch Ausstülpungen in den Gelenkspalt vergrößert. Sie besteht vor allem aus Bindegewebe und wenigen Makrophagen. Die Synoviozyten produzieren Synovialflüssigkeit, die sie in den Gelenkspalt sezernieren. Diese füllt den kapillären Spalt der Gelenkhöhle aus und dient als Gleitmittel [83].

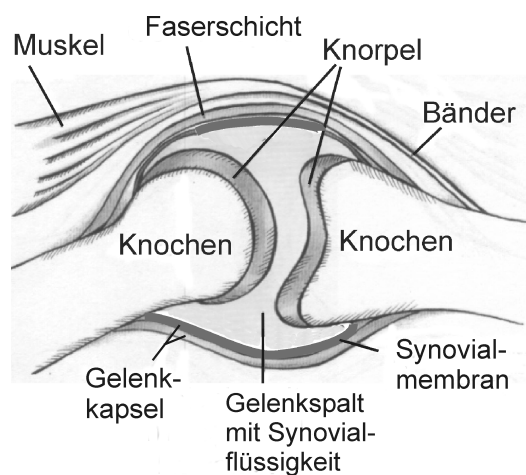


Abbildung 1.5: **Anatomie des Gelenks.** Aufbau in vereinfachter Form [78].

Es sind prinzipiell alle Gelenke von der chronischen Entzündung der RA betroffen [78, 79]. Im frühen Stadium sind typischerweise die kleinen und mittleren Gelenke, wie Fingergrund- und -mittelgelenke betroffen, später auch große Gelenke. Die Entzündungen können sich aber auch

auf gelenknahe Gewebe wie Bindegewebe, Sehnen und Muskeln und sehr selten auch auf Nerven und innere Organe wie Herz, Blutgefäße, Lunge, Lymphknoten und Augen auswirken.

Die Verteilung auf die Gelenke und der Verlauf unterscheiden sich deutlich von der Osteoarthrose (OA). OA führt zu degenerativen, primär nicht entzündlichen Veränderungen der Knorpel- und Knochenstruktur von Gelenken mit erheblichen Funktionsbehinderungen. Sie betrifft vor allem die gewichtstragenden Gelenke der unteren Extremitäten (Hüft-, Knie-, und Großzehengrundgelenk), selten die Ellenbogen-, Schulter-, Hand- und Fingergelenke [78]. Die Krankheitsursache der OA wird als altersbedingter Verschleiß verstanden.

### 1.5.2 Krankheitsverlauf

Die Krankheitsursache der RA ist weitgehend ungeklärt. Die in Schüben verlaufende RA beginnt in der Regel schleichend. Das Erscheinungsbild kann im Einzelfall stark variieren.

Im Zentrum der Pathologie der RA steht die chronisch entzündete Synovialmembran (s. Abb. 1.5). Es können drei pathophysiologische Hauptmechanismen unterschieden werden: Entzündung, modulierte Immunantwort und synoviale Hyperplasie [84]. Diese Mechanismen greifen eng ineinander und beeinflussen sich gegenseitig durch lösliche Mediatoren wie Zytokine und Chemokine, aber auch durch direkte Zell-Zell-Kontakte. In einem Erklärungsmodell [83] löst eine unbekannt Noxe (evtl. Bakterien, Viren, Kreuzreaktivität, möglicherweise eine Permeabilitätsstörung oder mechanische Zellschädigung) eine Entzündungsreaktion in der Synovialmembran aus. Durch diese Startreaktion kommt es zur Antigenfreisetzung, die das humorale und zelluläre Abwehrsystem aktiviert. Unter der Beteiligung von Komplementfaktoren bilden sich Immunkomplexe, die von Granulozyten und Zellen der Synovialmembran phagozytiert werden. Dabei kommt es zur Freisetzung von lysosomalen Enzymen und Zytokinen, wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ . Bei Patienten mit aktiver RA sind sowohl die Serums- als auch die Synovial-Konzentrationen der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 erhöht, in der Synovialflüssigkeit können sie nachgewiesen werden [85]. TNF- $\alpha$  stimuliert die Bildung von Prostaglandinen und unterhält damit den Entzündungsprozess.

Die synoviale Hyperplasie ist charakteristisch für die Erkrankung und wird für die Deformation der Gelenke mitverantwortlich gemacht [86]. Unter dem Einfluss des Entzündungsprozesses und die Einwanderung der Zellen beginnt die Synovialmembran zu wuchern. Auffällig und typisch ist die Verdickung der so genannten Deckzellschicht, der zum Gelenkspalt orientierten Schicht der Synovialmembran, auf bis zu 10 Schichten (s. Abb. 1.6). In dem chronisch entzündeten Synovialgewebe sind einerseits eingewanderte Immunzellen, wie T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen, Makrophagen, dendritische Zellen, Neutrophile, Granulozyten und Mastzellen, andererseits Gewebetypische nicht-immunologische Zellen wie synoviale Fibroblasten, Chondrozyten, Osteroblasten und Osteoklasten miteinander vergesellschaftet. Einige dieser Zellen weisen auf eine Aktivierung

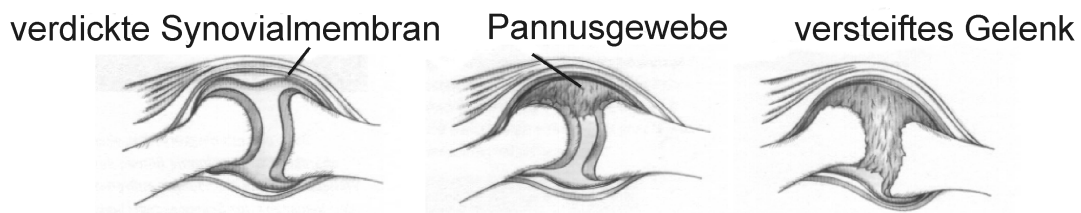


Abbildung 1.6: **Veränderungen am Gelenk bei rheumatoider Arthritis.** Durch das Einwandern von mononukleären Zellen verdickt sich die Synovialmembran. Es entsteht, Pannusgewebe das zur Zerstörung von Knorpel und Knochen führt; das Gelenk versteift [78].

hin [87, 88]. Den Großteil stellen synoviale Makrophagen dar [89, 90, 91]. Auch in den tieferen Schichten finden sich neben dem vorher lockerem Bindegewebe Infiltrate von mononukleären Zellen, in erster Linie T-Zellen, Makrophagen, B-Zellen und Plasmazellen [92]. Im weiteren Verlauf wird das Synovialgewebe ebenso wie die Knorpeloberfläche mit Fibrin überzogen. Es bildet sich ein zottenförmiges Granulationsgewebe, das man als Pannus bezeichnet (s. Abb. 1.6). Anfangs ist dieses Gewebe hauptsächlich aus mononukleären Zellen und Fibroblasten zusammengesetzt und produziert große Mengen Matrixmetalloproteinasen, vor allem durch Zellen der Deckzellschicht [93, 94]. Die lysosomalen Enzyme des Pannus zerstören die Knorpelschicht, so dass in späteren Stadien die knorpelfreien Gelenkelemente miteinander verschmelzen (s. Abb. 1.6). Es kommt zu fibrösen oder knöchernen Gelenkversteifungen. Weitere Folgen sind herdförmige Knochenzerstörung und Schrumpfung der Gelenkkapsel durch Narbenbildung.

### 1.5.3 Therapie der rheumatoiden Arthritis

Es steht bis heute keine kausale Therapie zur Behandlung der RA zur Verfügung. Es kommen drei Wirkstoffgruppen zum Einsatz, Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR), Opioide und Glucocorticoide [95]. Im Vordergrund steht die Linderung der Schmerzen durch Opioide oder NSAR, die gleichzeitig schmerzlindernd und entzündungshemmend wirken. Wie sich aus dem Krankheitsverlauf zeigt, ist der andere Ansatzpunkt in der Therapie die Unterdrückung der Entzündungsreaktion durch Glucocorticoide, um die Bindegewebszerstörung zu minimieren und die Funktion der Gelenke zu erhalten. Sogenannte Basistherapeutika wie Methotrexat (MTX) zählen zu der Gruppe der langsam wirkenden Antirheumatika und haben eine komplexe Wirkungsweise [79, 96]. Diese beinhaltet oft auch eine immunmodulierende bzw. immunsuppressive Komponente. Bei der RA werden auch Wirkstoffe eingesetzt, die unter dem Begriff „Biologicals“ zusammengefasst werden. Gemeint sind Antikörper, Rezeptorfusionsproteine oder Rezeptorantagonisten zur Blockade der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1, die in der Pathogenese der Erkrankung eine wichtige Rolle spielen [79]. Da Basistherapeutika und „Biologicals“ nicht unmittelbar schmerzlindernd

und entzündungshemmend wirken, sollten sie zumindest mit NSAR und/oder Glucocorticoiden kombiniert werden.

#### 1.5.4 B-Zellen in der rheumatoiden Arthritis

Befunde aus der entzündeten RA-Synovialis weisen auf eine Beteiligung von B-Lymphozyten hin. Bislang konnten bei 10-30 % aller Biopsien grosse lymphatische Infiltrate gezeigt werden, die in ihrer follikelähnlichen Organisationsform an Keimzentren in lymphatischen Organen erinnern [97]. Da diese Keimzentren nicht in den typischen lymphatischen Organen auftreten, werden sie als ektope Keimzentren bezeichnet. Die B-Zellen in den ektopen Keimzentren weisen auf eine klonale Expansion und Affinitätsreifung durch somatische Hypermutationen hin [98,99]. Weitere Untersuchungen zu VDJ-Rearrangierungen der B-Zellen aus follikulären Regionen zeigten eine schrittweise Akkumulation von einzelnen somatischen Mutationen während der klonalen Expansion im Synovialgewebe [100]. Dies weist auf eine Keimzentrumsreaktion hin, die sonst nur in sekundären lymphatischen Geweben zu finden ist und auf eine lokale Entwicklung von Plasmazellen [98].

Im Synovialgewebe sind viele der CD19-positiven B-Lymphozyten Plasmazellen mit Rheumafaktor (RF) Spezifität [101]. Als RF werden spezifische Autoantikörper gegen körpereigenes IgG bezeichnet [102]. B-Zellen mit einem RF spezifischen BCR können IgG-Antigen-Komplexe binden und auf diesem Wege eine Vielzahl verschiedener Antigene internalisieren [103]. Es kommt dadurch zu einer verstärkten Antigen Präsentation [104]. Prozessierung und Antigenpräsentation von Peptiden an T-Zellen könnten auf diese Weise zu T-Zell-Hilfe und weiterer Aktivierung von (auto)antigenspezifischen B-Zellen führen. B-Zellen, die positiv für RF sind, können bei RA-Patienten aus verschiedenen Kompartimenten wie Blut, Knochenmark, Synovialflüssigkeit und Synovialmembran isoliert werden [105, 106]. Nicht alle RA-Patienten sind RF-positiv, dafür können RF aber auch in geringen Mengen bei gesunden Personen gefunden werden [107].

Eine Reihe weiterer Autoantikörper mit teilweise deutlich höherer Spezifität für die RA als RF sind in den letzten Jahren charakterisiert worden: z. B. gegen Thyreoglobulin [108], HLA-DR [109], Calpastin [110], antinukleäre Antikörper und antineutrophile zytoplasmatische Antikörper [111], Calreticulin [112], Filaggrin [113] und Endoplasmatisches Retikulum-Chaperon Protein [114], um nur einige zu nennen. Durch die Produktion dieser und anderer Autoantikörper scheinen B-Zellen für die Aufrechterhaltung des Krankheitsgeschehens wichtig zu sein [115, 116]. Für diese Antigene können neben den Autoantikörpern auch eine T-Zell Reaktivität nachgewiesen werden. Da keines der Antigene eine gelenkspezifische Expression aufweist, ist ihr unmittelbarer Beitrag zur Pathogenese der Gelenksdestruktion unklar. Da diese Antigene darüber hinaus intrazellulär lokalisiert sind, bleibt die Frage offen, ob diese Antikörper *in vivo* tatsächlich zu ihren

Antigenen vordringen können und welche Konsequenzen sich daraus ergeben. Für das ubiquitäre Enzym Glucose-6-Phosphat-Isomerase [117, 118] konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass es in Form von Immunkomplexen auf der Knorpeloberfläche abgelagert wird und dort über den alternativen Aktivierungsweg der Komplementkaskade und weitere Mechanismen des angeborenen Immunsystems zur Gelenkpathologie führt [119]. Das Mausmodell ist aber nicht auf den Menschen übertragbar [120, 121].

### 1.5.5 Chemokine in der rheumatoiden Arthritis

Es gibt viele Daten zu Chemokinen und Chemokinrezeptoren im Synovialgewebe, Synovialflüssigkeit und im Blut bei RA-Patienten. Die meisten Untersuchungen beziehen sich aber auf T-Zellen oder Makrophagen und Monozyten [122, 123, 124]. Chemokine und ihre Rezeptoren haben einen Einfluss auf Zellaktivierung, interzelluläre Adhäsion, Angiogenese, Gewebeerstörung, in der Rekrutierung und Positionierung der einwandernden Zellen sowie Prozesse der Synovitis [20, 80, 125]. CXCL8, CXCL5, CXCL1, CXCL6 und CXCL12 unterstützen die Entzündungsreaktion, während CXCL4, CXCL9 und CXCL10 sie eher hemmen und der Angiogenese entgegen wirken [124, 126, 127]. In den entzündeten Gelenken sind hohe Konzentrationen verschiedener Chemokine nachweisbar [128, 129, 130]. Synoviale Fibroblasten, Makrophagen und Monozyten gehören zu den Chemokin-Produzenten in der Synovialmembran [16, 18]. Die Produktion der Fibroblasten kann durch eine Stimulation mit IL-1 und TNF- $\alpha$  noch erhöht werden [131]. Daher wird vermutet, dass diese Zytokin-Chemokin-Wechselwirkungen am Beginn und im Verlauf der Synovitis wichtig sind [20].

Für Chemokinrezeptoren konnte eine unterschiedliche Expression auf Lymphozyten in der RA gezeigt werden. Für CD4 positive Gedächtnis T-Zellen in der Synovialmembran konnten die Chemokinrezeptoren CXCR3, CXCR4, CXCR6 und CCR5 gezeigt werden [127, 132, 133]. Wobei CXCR3 und CCR5 vorherrschend auf T-Zellen in RA-Synovialgewebe und -flüssigkeit exprimiert werden [134]. Daten für B-Zellen liegen kaum vor [135].