

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Akkumulation von B-Zellen in Synovialgeweben von RA-Patienten analysiert. Die Lokalisation und Differenzierungs-Stadien der B-Zellen im Synovialgewebe und der Anteil der Chemokinrezeptor tragenden B-Zellen im peripheren Blut von RA-Patienten wurden bestimmt. Die Anteile der Chemokinrezeptor tragenden B-Zellen wurden mit denen der gesunden Kontrollen und zwei anderen Patientengruppen verglichen, um Aussagen zur Einwanderung der B-Zellen aus der Peripherie ins Gewebe, vermittelt durch Chemokine und Chemokinrezeptoren, zu treffen.

4.1 Lokalisation der B-Zellen im Synovialgewebe

Die Lokalisation der B-Zellen im chronisch entzündeten Synovialgewebe der RA-Patienten wurde untersucht, um Aussagen über die Verteilung und Proliferation der B-Zellen sowie benachbarter Zellen im Synovialgewebe zu treffen.

Die untersuchten RA-Synovialgewebe decken alle Entzündungsgrade (Einteilung nach Krenn [139]) von null bis drei ab (s. Tabelle 4.1). Drei ist der höchste Grad und ist gekennzeichnet durch eine deutlich verdickte Deckzellschicht, große lymphoide Aggregate und eine Zunahme der Stromazellschicht. Die Bestimmung der Entzündungsgrade wurde durch Dr. L. Morawietz vom Institut für Pathologie der Charité vorgenommen und die Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

In den RA-Synovialgeweben wurden mit immunohistochemischen Methoden Zellen des Immunsystems wie B-Zellen (CD20), Plasmazellen (CD38), T-Zellen (CD4) und Makrophagen (CD68), aber auch Fibroblasten und folliculäre dendritische Zellen (FDC) angefärbt. In allen RA-Synovialgeweben waren im gesamten Gewebe verteilt liegende Makrophagen nachzuweisen. T- und B-Zellen lagen in größeren Gruppen zusammen, die als Aggregate bezeichnet werden (s. Abb. 4.1 (A)) oder einzeln im Gewebe verteilt (diffus) vor (s. Abb. 4.1 (B)). Die Verteilung der B-Zellen in den Geweben ist in Tabelle 4.1 angegeben. Diffus im Gewebe verteilt liegende Plasmazellen wurden in allen Geweben angefärbt.

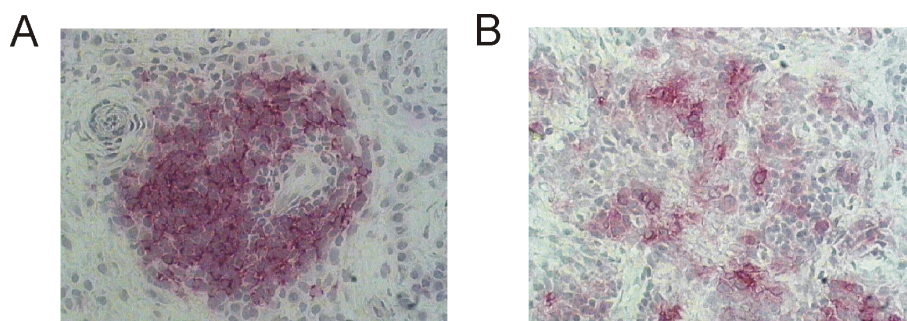


Abbildung 4.1: **B-Zell-Verteilung im Synovialgewebe.** Gefrierschnitte von RA-Synovialgewebe wurden mit einem Antikörper gegen CD20 gefärbt. CD20 positive B-Zellen in Aggregaten (A) oder diffuser Verteilung (B) im Gewebe. Positive Zellen wurden durch Neufuchsin als Substratlösung für die alkalische Phosphatase rot angefärbt (200fache Vergrößerung).

In keinem der untersuchten Gewebe wurden FDC nachgewiesen, die für den Aufbau von Keimzentren und deren Funktion bei der B-Zell-Differenzierung wichtig sind. Für einige T- und B-Zell-Aggregate konnte Zellproliferation mit dem anti-Ki67-Antikörper gezeigt werden (s. Abb. 4.2 und im Anhang Seite 44). Sechs RA-Synovialgewebe wurden mit Antikörpern gegen den B-Zell-Aktivierungsfaktor BAFF gefärbt. In zwei der Gewebe konnte BAFF nachgewiesen werden (s. Abb. 4.2).

Tabelle 4.1: **Charakterisierung des Synovialgewebes von Patienten mit RA**

Patient	Gelenk	Entzündungsgrad	Verteilung	B-Zellen [%]
JM	Bakerzyste	3	diffus	35,2
EZ	Ellenbogen	3	diffus	2,4
WK	Knie	2	Aggregate	4,3
WB	Knie	1	diffus	37,3
MO	Hüfte	1	diffus	1,7
IM	Sprunggelenk	0	diffus	2,3

Verteilung der B-Zellen im Gewebe; B-Zellen, durchflußzytometrisch bestimmter Anteil der B-Zellen an den Lymphozyten.

Die Synovialmembran der gesunden Kontrollprobe weist keine T- und B-Zellen oder Plasmazellen auf. Es waren sehr wenige einzelne Makrophagen in der Deckzellschicht nachzuweisen (s. Abb. 4.3 (A-C)). In den zwei Synovialgeweben der OA-Patienten wurden vor allem Makrophagen nachgewiesen, die in der Deckzellschicht liegen. Es waren nur sehr wenige T-, B- und Plasmazellen zu finden, die im Gewebe verteilt liegen (s. Abb. 4.3 (D-F)).

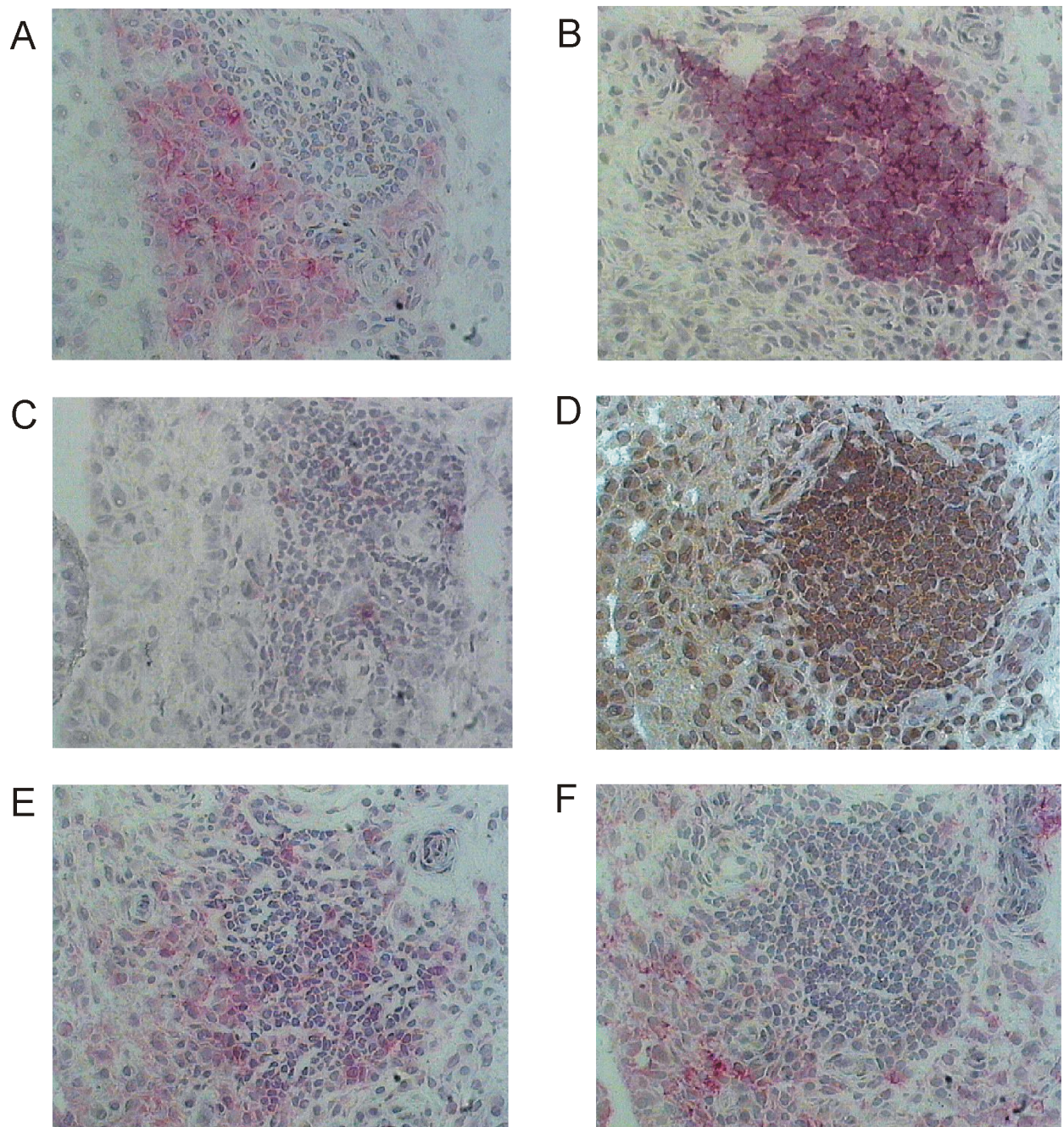


Abbildung 4.2: **Histologisches Bild von Synovialgewebe.** Das Synovialgewebe eines RA-Patienten wurde immunohistochemisch mit Antikörper gegen Plasmazellen (A), B-Zellen (B), proliferierende Zellen (C), BAFF (D), T-Zellen (E) und Makrophagen (F) angefärbt. Positive Zellen wurden durch Neufuchsin als Substratlösung für die alkalische Phosphatase rot bzw. BAFF positive Zellen über DAB und Peroxidase in braun visualisiert, 200fache Vergrößerung.

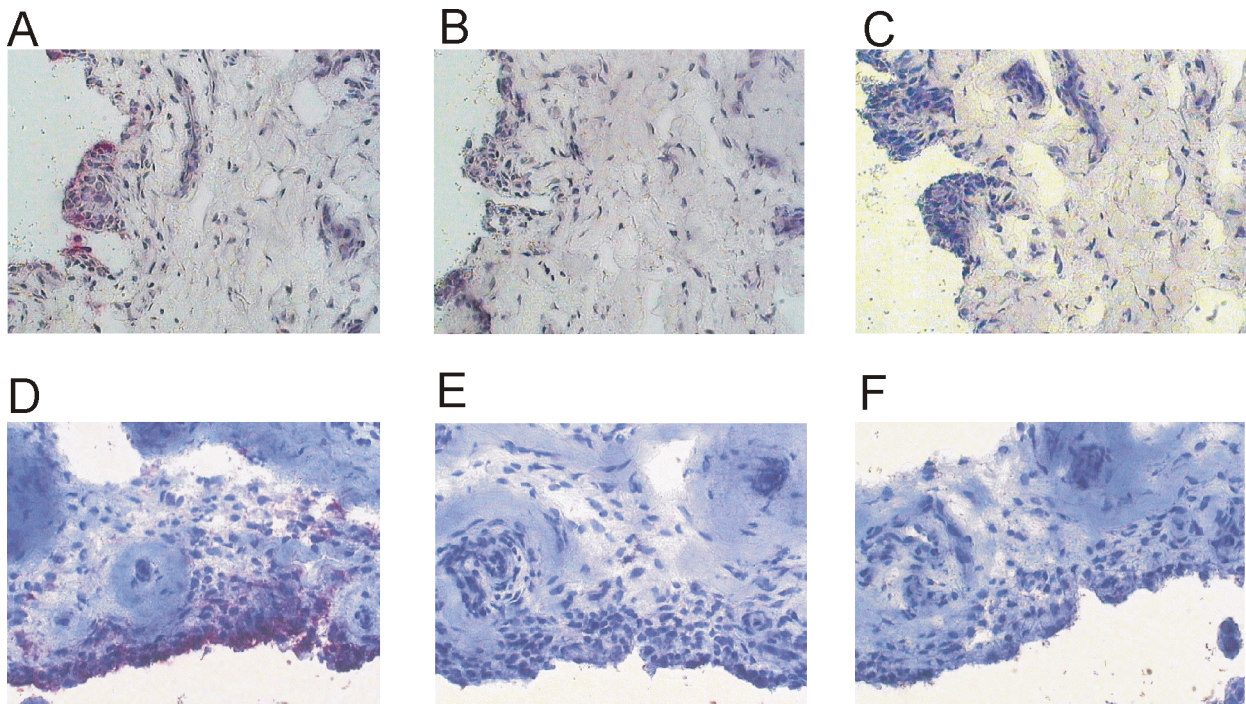


Abbildung 4.3: **OA Synovialgewebe und Synovialmembran einer Kontrolle.** Synovialgewebe eines Unfallopfers (A-C) und eines OA-Patienten (D-F) wurden mittels immunohistochemischer Methoden mit Antikörper gegen Makrophagen (A, D), B-Zellen (B, E) und T-Zellen (C, F) gefärbt. Visualisierung der positiven Zellen durch Neufuchsin als Substratlösung für die alkalische Phosphatase (rot). 200fache Vergrößerung

4.2 V-Gen Repertoire von B-Zellen aus verschiedenen Kompartimenten

Um zu untersuchen, ob die im Synovialgewebe lokalisierten Gedächtnis B-Zellen und Plasmazellen eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben und somit somatische Mutationen in den V-Genen akkumulieren, wurden die V-Gene sequenziert. Die RNA sortierter B-Zellen aus Blut, Synovialgewebe und -flüssigkeit von RA-Patienten wurde in einer RT-PCR amplifiziert und dann sequenziert (Beispiel-Sequenz auf Seite 96 im Anhang). Das Keimbahngen aus der V-BASE Datenbank mit der höchsten Homologie wurde als Referenz verwendet. Die Referenzgene sind für die V-, D-, und J-Gene in Tabelle 4.2 angegeben. Der Isotyp wurde über einen weiteren Sequenzvergleich bestimmt. Für eine Sequenz konnte der Isotyp nicht bestimmt werden, da die Sequenz zu kurz war, um gesicherte Aussagen treffen zu können.

Tabelle 4.2: **Ergebnisse der V-Genanalyse der H-Kette der Antikörper**

Sequenz	Kompartiment	Zelle	V	D	J	Isotyp
WK-7H1	SF	Plasma	3-53	2-2	5a	IgG
WK-8H4	SF	Plasma	4-30.1	4-23	4b	IgG
WK-8H8	SF	Plasma	1-03	1-07	6c	(-)
JM-H7	SG	Gedächtnis	4-61	4-17	4b	IgG
P2-5H6	SG	Gedächtnis	1-02	3-03	4b	IgG
P1-1H1	Blut	Gedächtnis	4-b	1-26	3b	IgA
81-11H4	Blut	Plasma	1-69	4-23	3b	IgG

Nach V-Base Sequenzvergleich bestimmte VH-Gene der B-Zellen aus Blut, Synovialgewebe (SG) und Synovialflüssigkeit (SF) von RA-Patienten.

In der Tabelle 4.3 ist die Anzahl der Mutationen der V-Gene der H-Kette im Vergleich zu der Referenzsequenz angegeben. Neben der Gesamtzahl von Mutationen ist die Anzahl von Basenaustauschen, die zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz führen (engl.: replacement, R) und stillen Mutationen (S) zusammengefasst. Die Werte wurden für die CDR (engl.: complementarity determining region) und FR (engl.: framework region) angegeben und das Verhältnis der R- und S-Werte für diese Regionen gebildet.

Tabelle 4.3: **Mutationsanalyse der VH-Sequenzen H-Kette der Antikörper**

Sequenz		WK		JM	P2	P1	81	
Region	Mutation	7H1	8H4	8H8	H7	5H6	1H1	11H4
FR1	R/S	2/2	2/3	10/5	2/4	-/-	3/3	8/1
FR2	R/S	-/1	-/1	2/1	1/-	-/-	2/-	3/2
FR3	R/S	2/1	4/5	6/4	6/2	1/-	7/3	12/4
CDR1	R/S	1/-	1/-	4/1	3/-	-/-	1/1	4/-
CDR2	R/S	2/2	-/-	5/3	5/2	3/-	9/3	4/2
Anzahl		13	16	41	25	4	32	40
FR	Verhältnis R/S	1	0,7	1,8	1,5	1	2	3,3
CDR	Verhältnis R/S	1,3	1	2,3	4	3	2,5	4

Anzahl der Mutationen und Angaben über stille Mutationen (S) oder Austausch (R).

Die untersuchten H-Ketten-Sequenzen der Antikörper aus allen Kompartimenten zeigen zwischen vier und 41 Mutationen. Die Akkumulation der Mutationen weist auf eine durchlaufene Affinitätsreifung hin. Das Muster der Mutationen ist typisch für selektionierte B-Zellen, da mehr Mutatio-

nen in den CDR auftreten als in den FR, bezogen auf die Anzahl der Nukleotide der Regionen. Das Verhältnis der Aminosäureaustausche zu stillen Mutationen (Verhältnis R/S) bestätigt diese Selektion.

Für die untersuchten L-Kette-Sequenzen der Antikörper wurden aus Synovialgewebe drei, aus Synovialflüssigkeit und Blut fünf κ -Ketten in Sequenzen bestimmt. Für λ waren es aus dem Synovialgewebe eine und aus dem Blut vier.

4.3 Bestimmung des B-Zell-Anteils

In der Durchflusszytometrischen-Analyse wurde der prozentuale Anteil der B-Zellen innerhalb der Lymphozyten-Fraktion bestimmt. Die erste Eingrenzung der Zellpopulationen auf Lymphozyten erfolgte über die Größe und Granularität der Zellen (s. Abb. 4.4 (A), Region 1 (R1)). Für diese Bestimmungen wurde die Lichtbrechung der Zellen ausgenutzt. Die B-Zellen werden durch die Oberflächenexpression von CD19 bestimmt, für den die Zellen positiv sind (Abb. 4.4 (B), Region 2 (R2)). Durch die Zugabe von Prodidiumjodid (PI) zu den Proben wurden tote Zellen markiert und sie liegen in der Darstellung der PI-Färbung gegen die CD19-Färbung in der Diagonale. Durch die Eingrenzung R2 wurden tote Zellen und T-Lymphozyten von weiteren Analysen ausgeschlossen (s. Abb. 4.4 (B), R2).

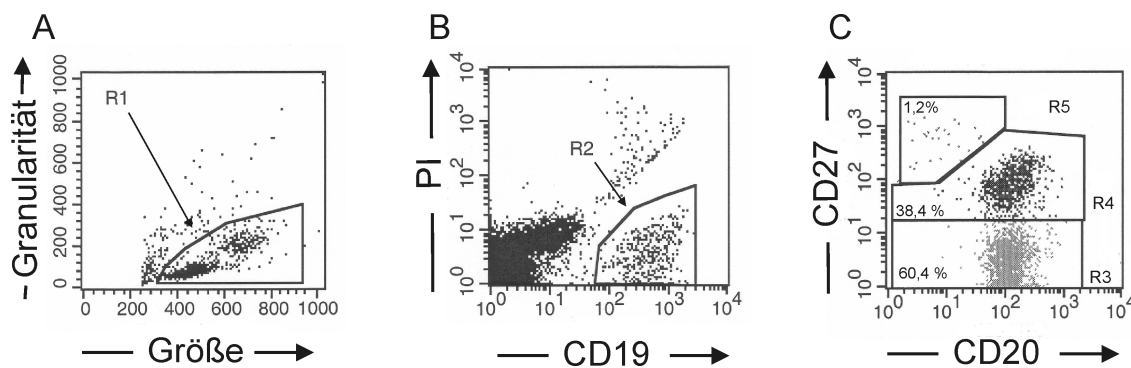


Abbildung 4.4: **Beschreibung der B-Zellen in der FACS-Analyse.** B-Zellen wurden über Größe und Granularität (A) und CD19-Expression (B) beschrieben. Die Subpopulationen der B-Zellen wurden über die Expression von CD20 und CD27 (C) aufgetrennt. Plasmazellen R5 sind um etwa eine Zehnerpotenz heller in ihrer CD27-Färbung als Gedächtnis Zellen.

Die Unterteilung der lebenden B-Zellen (Kombination der Regionen R1 und R2) in die Subpopulationen erfolgte auf Grund der Expression von CD20 und CD27 (s. Abb. 4.4 (C)). Naive B-Zellen sind negativ für CD27 aber positiv für CD20 (s. Abb. 4.4 (C), R3). Gedächtnis B-Zellen sind für

beide Marker positiv (s. Abb. 4.4 (C), R4) und Plasmazellen sind negativ für CD20 und stark positiv für CD27 (s. Abb. 4.4 (C), R5).

4.3.1 Anteil der B-Zellen und Subpopulationen im peripheren Blut

Es wurde der Anteil der B-Zellen innerhalb der Lymphozyten durch die Region R2 bei den Durchflusszytometrischen-Analyse (s. Abb. 4.4 (B)) im peripheren Blut von 26 RA-, 13 OA-, 11 SLE-Patienten und 21 gesunden Kontrollen bestimmt. In der Abbildung 4.5 sind die Anteile für jede untersuchte Person der Gruppen als Symbol dargestellt. Für die gesunden Kontrollen schwankten die Werte von 5,1 % bis 18,6 %. Der Median der Gruppe liegt bei 7,4 %. Beim Vergleich der Anteile der B-Zellen zwischen den untersuchten Gruppen ergab sich im Kruskal-Wallis-Test eine statistisch signifikante Verschiebung ($p = 0,0019^{**}$). Im Vergleich der Kontrollgruppe mit den einzelnen Patientengruppen zeigte sich eine signifikante Reduktion des B-Zell-Anteils bei allen drei Patientengruppen (s. Abb. 4.5 (A) und Tabelle 4.4). Der Anteil schwankt bei

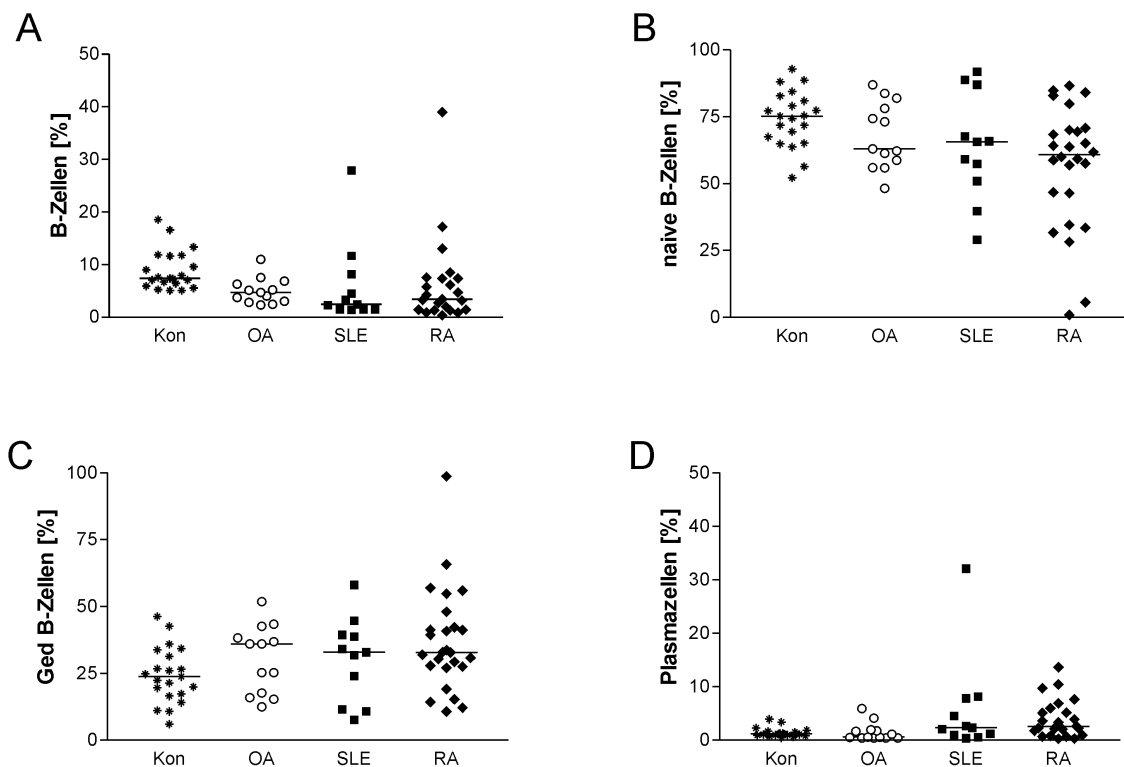


Abbildung 4.5: **Veränderte B-Zell-Anteile bei Patienten.** Es sind die Anteile der Gesamt-B-Zellen in den Lymphozyten (A) und die Anteile in den drei B-Zell-Subpopulationen für die untersuchten Patientengruppen und Kontrollen dargestellt. Naive B-Zellen (B), Gedächtnis B-Zellen (C) und Plasmazellen (D) aus peripheren Blut.

den RA-Patienten zwischen 0,4 % und 39,0 %, der Median liegt bei 3,4 %. Die Patientengruppen untereinander waren in Hinblick auf den Anteil der B-Zellen nicht signifikant verschieden. Die p-Werte der Vergleiche sind in Tabelle 4.4 angegeben.

Die in Abb. 4.4 (C) dargestellte repräsentative Blutprobe eines RA-Patienten zeigt die Verteilung der B-Zellen in die Subpopulationen: 60,4 % naive B-Zellen, 38,4 % Gedächtnis B-Zellen und 1,2 % Plasmazellen. Vergleicht man die Mediane, der Subpopulationen, ergibt sich nur für die naiven B-Zellen im Vergleich der gesunden Kontrollen zu RA-Patienten eine signifikante Reduktion. In der Population der Gedächtnis B-Zell ergaben sich keine statistisch signifikante Unterschiede, obwohl alle Patientengruppen leicht erhöhte Anteile der Gedächtnis B-Zellen aufwiesen (s. Abb. 4.5 (B)). RA- und SLE-Patienten wiesen im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikante Zunahme des Plasmazell-Anteils auf. Vergleicht man den Anteil der Plasmazellen für die OA-Patienten mit den beiden anderen Patientengruppen, ergab sich ein relevanter Unterschied, aber nicht zu dem der Kontrollen (s. Abb. 4.5 und Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: **Statistik der B-Zell- und Subpopulations-Anteile**

Gruppe	Gesamt-B-Zellen	naive B-Zellen	Gedächtnis B-Zellen	Plasmazellen
Kruskal-Wallis	0,0019**	0,0267*	0,0848 ^{ns}	0,0047**
Kon vs. RA	0,0026**	0,0031**	(-)	0,0044**
Kon vs. SLE	0,0099**	0,1422 ^{ns}	(-)	0,0809 ^{ns}
Kon vs. OA	0,0009***	0,1276 ^{ns}	(-)	0,2878 ^{ns}
RA vs. SLE	1,0000 ^{ns}	0,4547 ^{ns}	(-)	0,8032 ^{ns}
RA vs. OA	0,5101 ^{ns}	0,2276 ^{ns}	(-)	0,0054**
OA vs. SLE	0,2238 ^{ns}	0,8620 ^{ns}	(-)	0,0559 ^{ns}

p-Werte des Vergleichs der Gruppen im Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-Test. ns, statistisch nicht signifikant; *, statistisch signifikant.

4.3.2 Einfluss der Behandlung auf den Anteil der B-Zellen

Die RA-Patienten wurden auf Grund ihrer Behandlung in Gruppen eingeteilt. Es wurden sechs Patienten, die keine Therapie erhielten, sieben Patienten, die mit einer Basistherapie (nichtsteroidale Antirheumatika, NSAR) und 13 Patienten, die mit einer Kombination aus Basistherapie und TNF-Blocker behandelt wurden, im Hinblick auf den Anteil der B-Zellen und die Verteilung in die Subpopulationen verglichen. Die Gruppen zeigten keine statistisch relevanten Unterschiede in den klinischen Daten wie Leukozytenzahl, BSG- oder CRP-Wert. Sie unterschieden sich auch

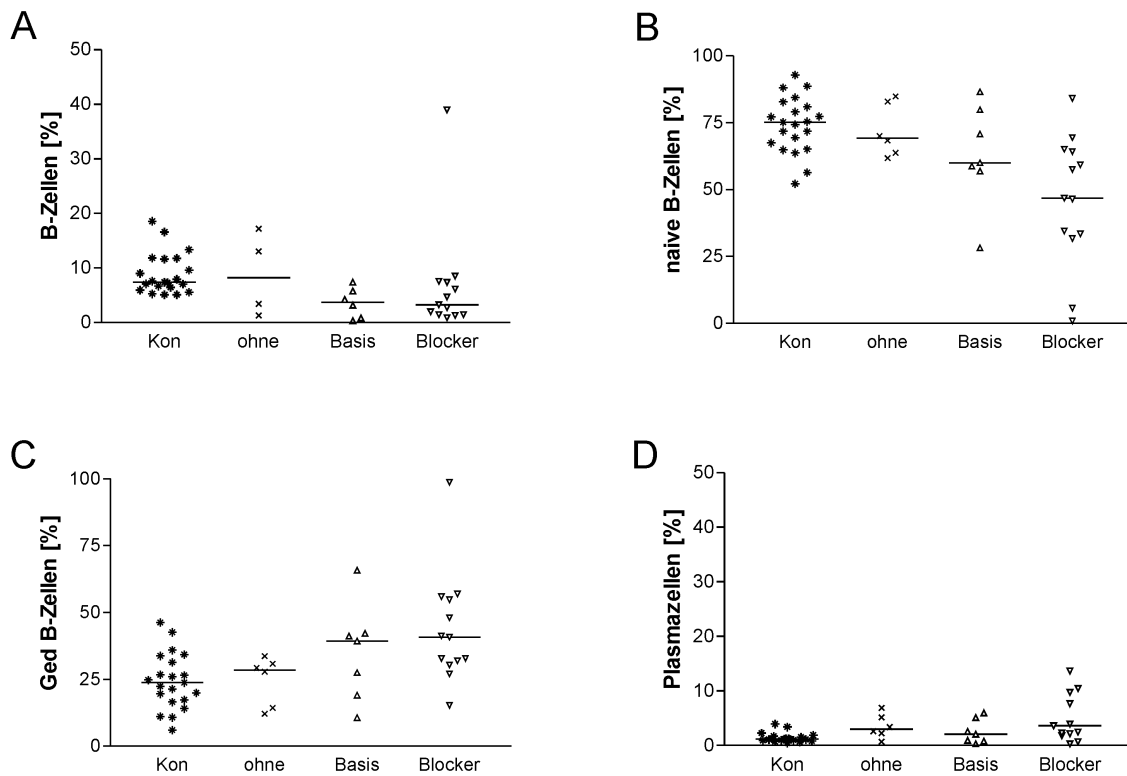


Abbildung 4.6: **Einfluss der Behandlung auf die B-Zell-Anteile.** Anteil Gesamt-B-Zellen (A), naive B-Zellen (B), Gedächtnis B-Zellen (C) und Plasmazellen (D). Kon, gesunde Kontrollen; ohne, unbehandelte RA-Patienten; Basis, Basistherapie (NSAR) und Blocker, TNF-Blocker und NSAR.

nicht im Anteil der B-Zellen (s. Abb. 4.6 (A)). Der Anteil der naiven B-Zellen ist in der Gruppe, die mit TNF-Blockern und NSAR behandelt wurde im Vergleich zu der Gruppe, die nicht behandelt wurde, signifikant reduziert (s. Abb. 4.6 (B) und Tabelle 4.5). Der Anteil der Gedächtnis B-Zellen war in der Gruppe mit der Kombinations-Therapie im Vergleich zu den unbehandelten erhöht (s. Abb. 4.6 (C)). Der Anteil der Plasmazellen war nicht unterschiedlich (s. Abb. 4.6 (D)). Die Patienten, die eine Basistherapie erhielten, lagen mit dem Anteil der Plasmazellen zwischen den beiden anderen Gruppen und wiesen keine statistisch relevanten Unterschiede zu einer der beiden Gruppen auf (s. Abb. 4.6 und Tabelle 4.5). Es sind die Anteile der Kontrollgruppe zum Vergleich angegeben. Sie sind erhöht bei den Gesamt-B-Zellen im Vergleich zu den Patientengruppen, die eine Therapie erhalten. In den drei Subpopulationen unterscheiden sich die Kontrollen von den Patienten mit der Kombinations-Therapie, im Anteil der Plasmazellen zusätzlich auch von den unbehandelten Patienten (s. Abb. 4.6).

Tabelle 4.5: Statistik der B-Zell- und Subpopulations-Anteile bei therapierten Patienten

Gruppe	Gesamt-B-Zellen	naive B-Zellen	Gedächtnis B-Zellen	Plasmazellen
Kruskal-Wallis	0,0108*	0,0025**	0,0113*	0,0163*
Kon vs. ohne	0,7953 ^{ns}	0,5796 ^{ns}	0,07930 ^{ns}	0,0333*
Kon vs. Basis	0,0056**	0,1521 ^{ns}	0,1678 ^{ns}	0,4904 ^{ns}
Kon vs. Blocker	0,0071**	0,0003***	0,0018**	0,0035**
ohne vs. Basis	0,3524 ^{ns}	0,3660 ^{ns}	0,3660 ^{ns}	0,3660 ^{ns}
ohne vs. Blocker	0,5335 ^{ns}	0,0202*	0,0254*	0,6296 ^{ns}
Basis vs. Blocker	0,5107 ^{ns}	0,1786 ^{ns}	0,4358 ^{ns}	0,2346 ^{ns}

p-Werte des Vergleichs der Gruppen im Kruskal-Wallis und Mann-Whitney-Test. ns, statistisch nicht signifikant; *, statistisch signifikant.

4.3.3 B-Zell-Anteile aus Synovialflüssigkeit

Die B-Zell-Anteile der vier Synovialflüssigkeiten wurden mittels Durchflusszytometrischer-Analyse untersucht. In Abbildung 4.7 ist das typische Bild der B-Zell-Verteilung nach der FACS-Messung der Synovialflüssigkeit eines RA-Patienten gezeigt. Der Anteil der B-Zellen beträgt 0,9 %. In den Proben variiert der Anteil der B-Zellen von 0,02 % bis 4,7 % (s. auch Abb. 4.9 (A)). Der Median der B-Zell-Anteile der RA-Synovialflüssigkeiten lag bei 1,2 % und ist deutlich niedriger als der im RA-Blut (3,4 %).

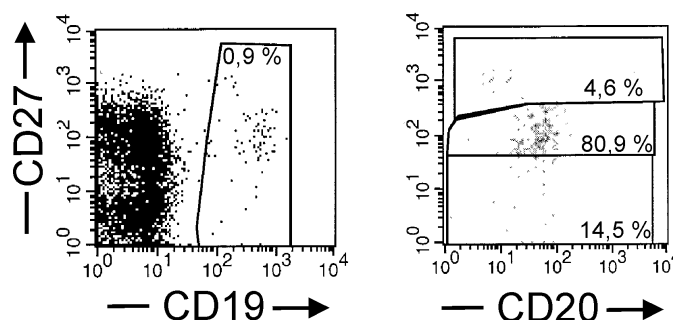


Abbildung 4.7: FACS-Analyse einer Synovialflüssigkeit. B-Zellen und Aufteilung in B-Zell-Subpopulationen einer RA-Synovialflüssigkeit.

Der Anteil der B-Zellen in den Subpopulationen schwankte von 14,5 % bis 59,2 % für naive B-Zellen in den untersuchten Synovialflüssigkeiten. Der Median für den Anteil der naiven B-Zellen aus den Synovialflüssigkeiten liegt bei 26,7 % und damit deutlich niedriger als der für RA-Blut

mit 60,9 %. Der Median der Gedächtnis B-Zellen aus der Synovialflüssigkeit liegt bei 53,1 % und damit höher als im RA-Blut 32,9 % (s. Abb. 4.9 (B-D)).

4.3.4 B-Zell-Anteile aus Synovialgewebe

Der Anteil der B-Zellen wurde aus Einzelzell-Suspensionen der sechs RA-Synovialgewebe durchflußzytometrisch analysiert. In Abbildung 4.8 ist das typische Bild der Verteilung der B-Zellen in die Subpopulationen nach der FACS-Messung gezeigt.

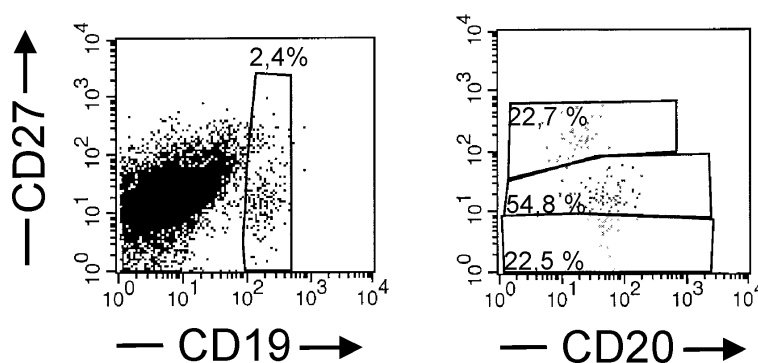


Abbildung 4.8: **FACS-Analyse von Synovialgewebe.** B-Zellen und Aufteilung in B-Zell-Subpopulationen eines RA-Synovialgewebes.

Der Anteil der B-Zellen beträgt in diesem Gewebe 2,4 %. In den untersuchten Proben variieren die Anteile der B-Zellen von 1,2 % bis 37,3 % (s. Abb. 4.9 (A) und Tabelle 4.1). In dem Beispiel-Gewebe in Abbildung 4.8 sind 22,5 % der B-Zellen naive B-Zellen, 54,8 % Gedächtnis B-Zellen und 22,7 % Plasmazellen. Die Verteilung der B-Zellen auf die drei Subpopulationen variiert sehr in den Geweben. Ein großer Anteil der B-Zellen im Gewebe gehörte zur Subpopulation der Gedächtnis B-Zellen, der Median liegt bei 57,3 %, für RA-Blut bei 32,9 %. Der Median des Anteils an Plasmazellen in den Gewebe liegt bei 4,9 %, der im RA-Blut bei 2,6 %. Der Anteil der naiven B-Zellen ist entsprechend reduziert (s. Abb. 4.9 (B-D) und Tabelle 4.1).

4.3.5 Übersicht der B-Zell-Anteile verschiedener Kompartimenten

Von einigen der untersuchten RA-Patienten konnte Blut, Synovialgewebe und -flüssigkeit untersucht werden. In Abb. 4.9 sind die B-Zell Anteile zusammengestellt.

Die Daten zeigen, dass der Anteil der Gesamt-B-Zellen im Blut reduziert ist. Es war eine Zunahme der Effektorzellen (Plasmazellen) und daraus resultierend eine Abnahme der naiven B-Zellen

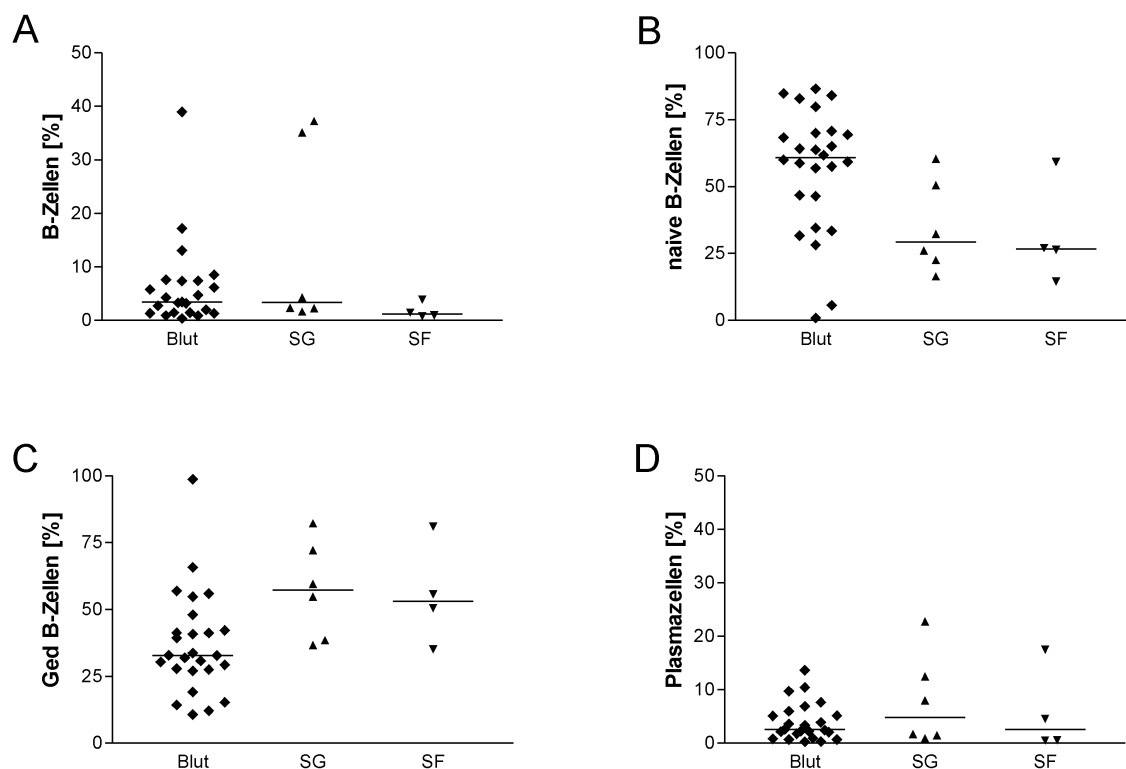


Abbildung 4.9: Anteil der B-Zellen in den Kompartimenten bei Patienten mit RA. Gesamt-B-Zellen (A), naive B-Zellen (B), Gedächtnis B-Zellen (C) und Plasmazellen (D) aus Blut, Synovialgewebe (SG) und Synovialflüssigkeit (SF) von RA-Patienten.

(s. Abb. 4.5) in den Subpopulationen nachzuweisen. Die Therapie der RA-Patienten zeigte einen deutlichen Einfluss auf diese Tendenzen. Im Synovialgewebe und der Synovialflüssigkeit akkumulieren die Gedächtnis B-Zellen.

Wie bei den RA-Patienten konnte im Blut der Patienten mit der Autoimmunkrankheit SLE eine Zunahme an Plasmazellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Dies gilt nicht bei der degenerativen Gelenkerkrankung OA.

4.4 Nachweis von Chemokinen und deren Rezeptoren

Die Gedächtnis B-Zellen und Plasmazellen im Synovialgewebe und der Synovialflüssigkeit haben Keimzentrumsreaktionen durchlaufen. Im Gewebe sind keine lokalen ektopen Keimzentren nachzuweisen, daraus ergibt sich die Frage, in welchem Differenzierungsstadium die Zellen aus der Peripherie einwandern. Bei der Rekrutierung von Zellen aus dem Blut ins Gewebe spielen Chemokine und Chemokinrezeptoren eine wichtige Rolle. Daher wurde im Folgenden die Expression

der Chemokinrezeptor auf peripheren Blut-B-Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Im Synovialgewebe wurden die Expression der Chemokine CXCL10, CXCL12 und CXCL13 untersucht, um zu analysieren, ob dieses Signalsystem einen Einfluss auf das Einwandern und Akkumulieren der B-Zellen in das Synovialgewebe hat.

4.4.1 Chemokinrezeptoren und Chemokine im Synovialgewebe

In den RA-Synovialgeweben wurden die Chemokine CXCL10, CXCL12 und CXCL13 und die dazu gehörigen Rezeptoren CXCR3, CXCR4, CXCR5 sowie CCR6 mittels immunohistochemischer Methoden nachgewiesen (s. Abb. 4.10 (A-G)). Die Färbung wurden über eine Isotypenkontrolle (s. Abb. 4.10 (H)) zu dem verwendeten Chemokinrezeptor-Antikörper überprüft. Die Isotypenkontrolle ist ein Antikörper aus dem gleichen Wirtsorganismus, gleichem Isotyp und gleicher Markierung wie der zur Untersuchung eingesetzte Antikörper. Sie ist aber nicht gegen einen Oberflächenmarker auf den zu untersuchenden Zellen gerichtet. Es wurde gezeigt, dass der Analyse-Antikörper nicht unspezifisch an den Zellen haftet, sondern eine spezifische Bindung eingeht.

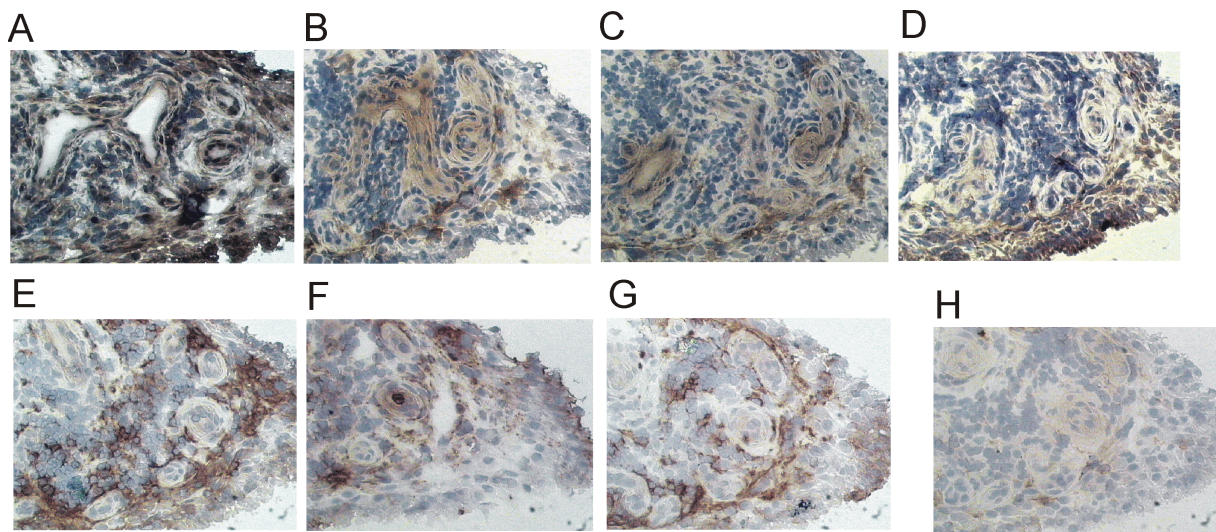


Abbildung 4.10: **Chemokine und Rezeptoren im Synovialgewebe.** In der oberen Reihe sind die immunohistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen die Chemokinrezeptoren CXCR3 (A), CXCR4 (B), CXCR5 (C) und CCR6 (D) und in der unteren Reihe für die Chemokine CXCL10 (E), CXCL12 (F) und CXCL13 (G) an konsekutiven RA-Synovialgewebe-Schnitten dargestellt. Die Isotypenkontrolle ist in (H) gezeigt. Positive Zellen sind durch DAB und Peroxidase in braun visualisiert, 200fache Vergrößerung.

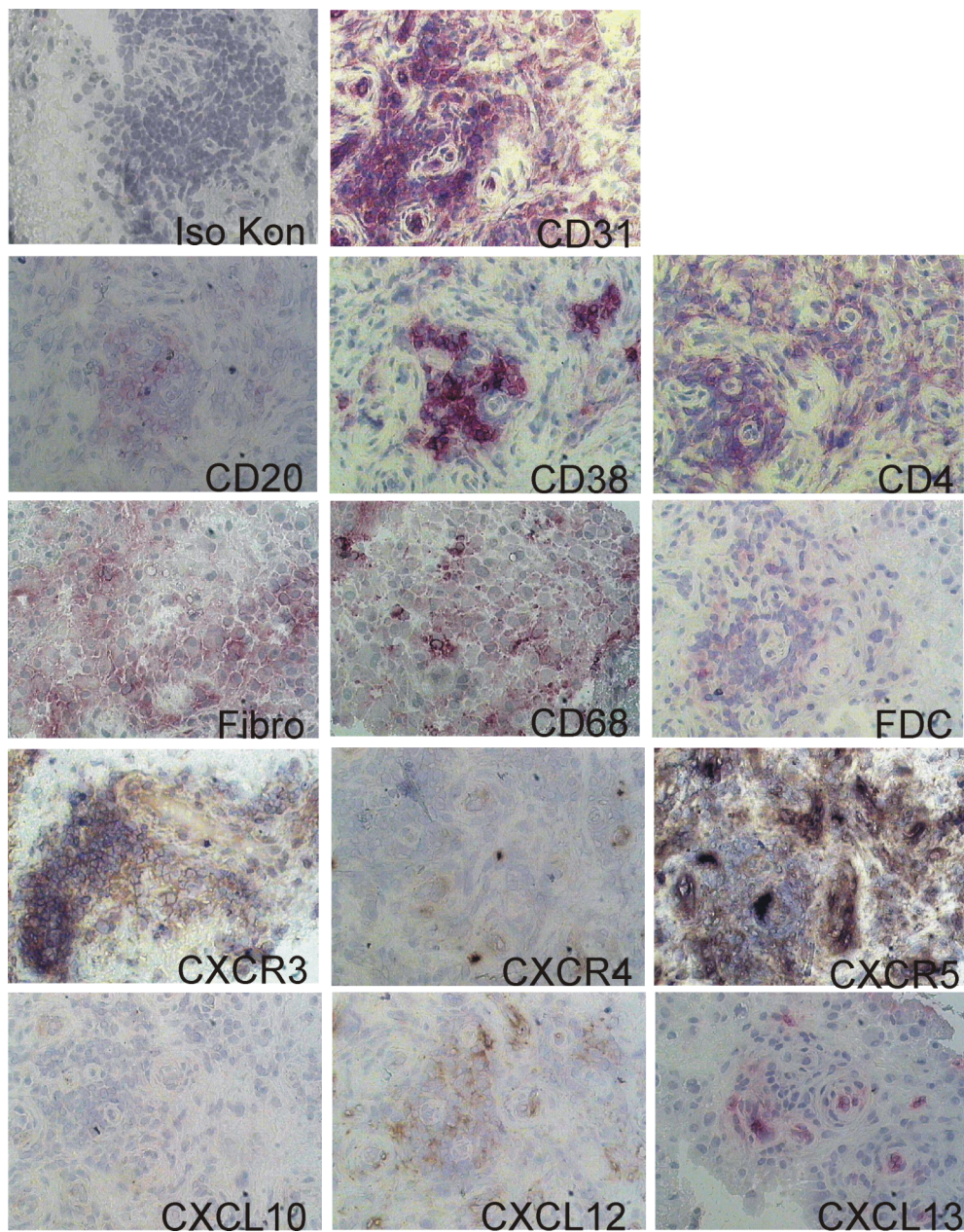


Abbildung 4.11: **Zellen im Synovialgewebe, Histologisches Bild.** Das Synovialgewebe eines RA-Patienten wurde immunohistochemisch für verschiedene Zelltypen, Chemokine und Chemokinrezeptoren angefärbt. Positive Zellen wurden durch Neufuchsin als Substratlösung für die alkalische Phosphatase rot bzw. über DAB und Peroxidase in braun visualisiert, 200fache Vergrößerung.

Die Verteilung der Chemokine variiert in den untersuchten Synovialgeweben. CXCL10, das hemmend auf Entzündungsreaktionen wirkt, wurde in allen Geweben in einer hohen Konzentration nachgewiesen. Die Konzentration ist so hoch, dass eine direkte Färbung ohne Verstärkung verwendet wurde. Die Chemokine CXCL12 und CXCL13 konnten nachgewiesen werden, aber in

geringeren Konzentrationen, als das CXCL10. Die Nachweis für CXCL12 und CXCL13 erfolgte über eine Verstärkung der Färbung. Es wurde eine weite Verteilung von CXCL10, CXCL12 und CXCL13 in den Synovialgeweben gezeigt. Die Chemokinrezeptor-tragenden Zellen wurden mittels immunohistochemischer Färbungen in den Bereichen lokalisiert, in denen auch die Chemokine exprimiert werden.

In der Abbildung 4.11 ist von dem gleichen RA-Patienten wie in den Abbildungen 4.2 und 4.10 eine weitere Region im Synovialgewebe gezeigt. Die Verteilung der Chemokine variiert zwischen den Regionen. Die B-Zellen (CD20) liegen meist diffus verteilt oder in kleinen Gruppen in der Nähe der Gefäße (CD31). Makrophagen (CD68) liegen im ganzen Gewebe verteilt vor. Das Chemokin CXCL10 ist in diesem Bereich nur schwach vertreten, CXCR3-positive Zellen liegen vor allem in einem Infiltrat aus B- und T-Zellen (CD4). CXCL12 und CXCL13 sind um die Gefäße lokalisiert. In der gesamten Region sind CXCR5-positive Zellen nachzuweisen. Die Fibroblasten (Fibro) liegen außerhalb der Infiltrate.

4.4.2 Nachweis von Chemokinrezeptor-mRNA in B-Zellen

Zum Nachweis der für B-Zellen in der Literatur beschriebenen Chemokinrezeptoren (CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR6, CCR7, CCR9) wurde RNA aus sortierten peripheren Blut-B-Zellen einer gesunden Kontrolle und eines RA-Patienten mittels RT-PCR untersucht.

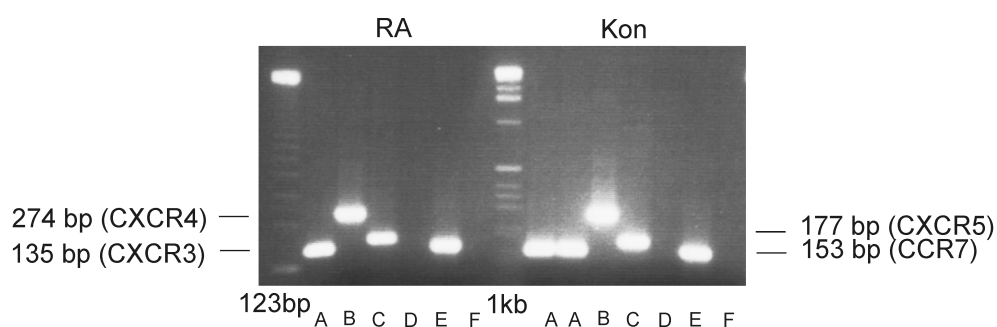


Abbildung 4.12: **Nachweis von Chemokinrezeptor-RNA aus B-Zellen mittels RT-PCR.**

Agarosegel nach RT-PCR für die Chemokinrezeptoren CXCR3 (A), CXCR4 (B), CXCR5 (C), CCR6 (D), CCR7 (E) und CCR9 (F) von RA-Patient (RA) und Kontrolle (Kon). 123bp-Marker in der ersten Spur, in Spur acht 1kb-Marker.

Es konnte mRNA für die Chemokinrezeptoren CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR7 amplifiziert werden (s. Abb. 4.12). Dagegen konnte die Chemokinrezeptor-mRNA für CCR6 und CCR9 nicht amplifiziert werden. Das Expressionsprofil der untersuchten Chemokinrezeptoren des RA-Patienten unterschied sich nicht von dem der gesunden Blutprobe.

4.4.3 Expression von Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche von B-Zellen

Für den Nachweis von Chemokinrezeptoren auf der B-Zelloberfläche wurde die durchflußzytometrische Bestimmung des B-Zell-Anteils mit einer Färbung gegen Chemokinrezeptoren kombiniert. Im peripheren Blut eines gesunden Probanden konnten B-Zellen determiniert werden, die für folgende Chemokinrezeptoren positiv waren: CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR6 und CCR7 (siehe Abb. 4.13). Die positive Oberflächenfärbung wurde über ungefärbte Zellen und eine Isotypenkontrolle nachgewiesen (s. auch Seite 43). Wenn die spezifische Färbung eine höhere Fluoreszenzintensität als die der Isotypenkontrolle aufweist, gilt die Färbung als spezifisch (s. Abb. 4.13). Die Färbung der Isotypenkontrolle ist in der Abbildung 4.13 als rote Linie dargestellt. Der Anteil der Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen variierte für die verschiedenen Rezeptoren. Der Anteil der B-Zellen, die positiv für CXCR3 sind, betrug 97,6 %, für CCR7 95,7 % für CXCR5 92,9 %, für CXCR4 92,6 % und für CCR6 88,9 %. Nur ein geringer Anteil der B-Zellen war positiv für CCR5 und CCR9. Der Anteil der CCR5-positiven B-Zell war bei 6,2 % und für CCR9 bei 0,2 %. Die meisten B-Zellen sind damit mehrfach positiv für die Chemokinrezeptoren CXCR5, CXCR4, CXCR3, CCR6 und CCR7.

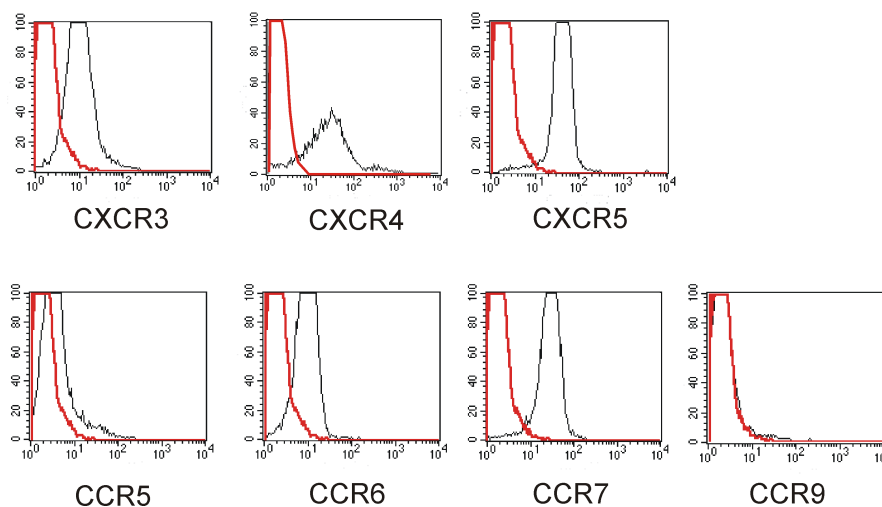


Abbildung 4.13: **Expression von Chemokinrezeptoren auf peripheren B-Zellen.** Expressionsmuster von drei CXC-Chemokinrezeptoren und vier CC-Chemokinrezeptoren auf peripheren B-Zellen einer gesunden Kontrollperson. Färbung der Isotypenkontrolle als rote Linie dargestellt. Anteile der Chemokinrezeptor tragenden B-Zellen ist im Text angegeben.

Der Anteil der Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen wurde in den Subpopulation bestimmt, indem der CD20-Antikörper durch einen Antikörper gegen ein Chemokinrezeptor ersetzt wurde. Die B-Zell-Subpopulationen lassen sich über die charakteristische Expression von CD19 und

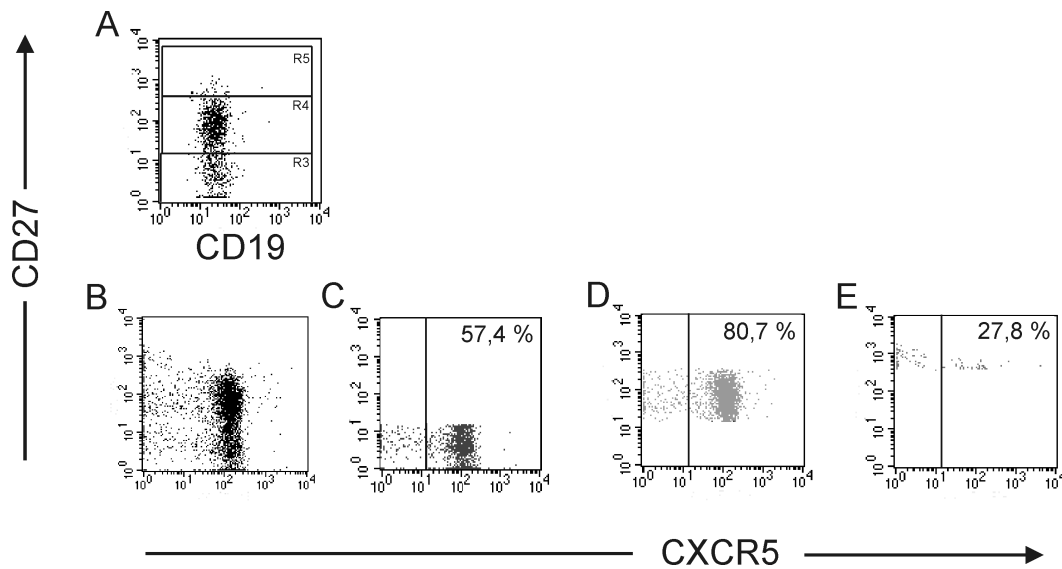


Abbildung 4.14: **Bestimmung des Anteils Chemokinrezeptor-tragender Zellen in den B-Zell-Subpopulationen.** Subpopulationen (A), CXCR5-Expression auf B-Zellen(B). CXCR5-Expression in einzelnen Subpopulation (C-E).

CD27 (s. Abschnitt 4.3 und Seite 37) bestimmen. In der Auswertung der FACS-Messung wurde eine Grenze gesetzt, die von der Lage der Isotypenkontrolle und der Färbung abhängt (s. Abb. 4.14). Davon ausgehend wurde für die B-Zell Subpopulationen bestimmt, wie viel Prozent der Zellen positiv für die Oberflächenexpression des Chemokinrezeptors sind. Die B-Zellen einer Subpopulation wurden immer als 100 % angenommen und davon ausgehend der relative prozentuale Anteil der Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen in der Subpopulation bestimmt (s. Abb. 4.14). In dem Beispiel in Abb. 4.14 sind 57,4 % der naiven B-Zellen positiv für die Oberflächenexpression von CXCR5, 80,7 % der Gedächtnis B-Zellen und 27,8 % der Plasmazellen.

4.4.4 Zwei CXCR3-positive B-Zell-Fractionen

Bei Lymphozyten aus Blut konnten mittels Oberflächenfärbung für den Chemokinrezeptor CXCR3 drei Fraktionen bestimmt werden.

Lymphozyten, die negativ für CXCR3 sind (Abb. 4.15 (A)), zusätzlich wurden zwei Fraktionen, die positiv für CXCR3 sind, unterschieden. Es gibt Zellen, die schwach CXCR3-positiv sind und die, die eine hohe Expression des Chemokinrezeptors zeigen (s. Abb. 4.15 (A)). Die Intensität der Färbung zwischen „schwach“ positiven Zellen und CXCR3 „hoch“ exprimierenden Zellen ist bis zu einer Zehnerpotenz verschoben (s. Abb. 4.15 (A)).

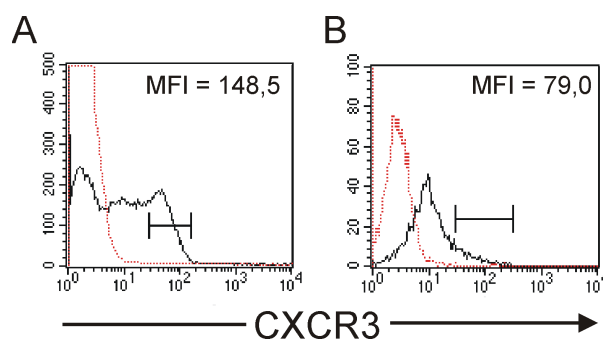


Abbildung 4.15: **Drei Fraktionen in der CXCR3-Expression auf Lymphozyten.** Es ist die Expression von CXCR3 auf allen Blut-Lymphozyten eines RA-Patienten (A) und nur auf B-Lymphozyten (B) gezeigt. Die Isotypenkontrolle ist als gepunktete rote Linie dargestellt. MFI, mittlere Fluoreszenzintensität.

Die Lage der CXCR3 „hoch“ exprimierenden Zellen, ist in Abbildung 4.15 (A) durch einen Balken markiert, der in (B) gleich bleibt und die Zellen in der B-Zell-Fraktion zeigt. Der Großteil der B-Lymphozyten zeigte eine schwache Expression von CXCR3 (etwa 95 %, s. Abb. 4.15 (B) und 4.13). Es gibt aber auch wenige CXCR3 „hoch“ exprimierenden B-Zellen (2,6 %).

4.5 Anteil Chemokinrezeptor-tragender B-Zellen

Im weiteren wurde analysiert, ob es bei Patienten mit RA zu einer Verschiebung des Expressionsmusters der Chemokinrezeptoren kommt, die das Einwandern und Akkumulieren im Synovialgewebe beeinflussen könnte. Es wurde der Anteil der Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen für die untersuchten Patientengruppen bestimmt und mit der gesunden Kontrollen verglichen.

4.5.1 Anstieg des Anteils CXCR3 „hoch“ exprimierender B-Zellen

Die B-Zell-Subpopulationen wurden im Hinblick auf den Anteil der CXCR3-tragenden Zellen untersucht. Die Expression des Chemokinrezeptor CXCR3 ist in Abbildung 4.16 auf B-Zellen einer gesunden Kontrolle im Vergleich zu einem RA-Patienten gezeigt. Für den Anteil der Gesamt-CXCR3-positiven B-Zellen konnten keine Unterschiede gezeigt werden bei den Erkrankungen. Die Werte für den Anteil schwanken von 92,0 % bis 95,3 % in den untersuchten Gruppen.

Der Anteil der CXCR3 „hoch“ exprimierenden B-Zellen schwankt bei den 16 untersuchten gesunden Kontrollen von 2,2 % bis zu 14,5 %. Der Median ist mit 6,4 % relativ gering (s. auch Abb. 4.17 (A)). Die Fraktion der peripheren B-Zellen, die den Chemokinrezeptor CXCR3 „hoch“ exprimieren, nimmt bei den RA-Patienten zu (Median 12,6 %). Die Anteile schwanken bei den 21

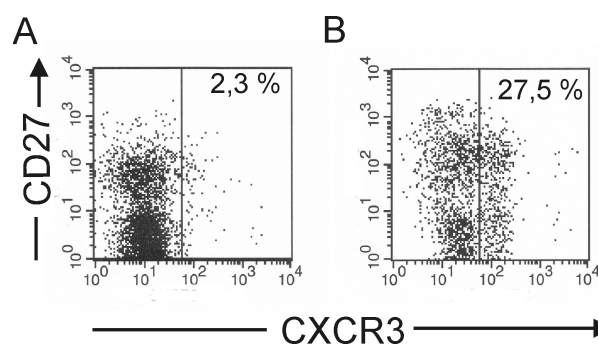


Abbildung 4.16: **Zunahme der CXCR3 „hoch“ Expression bei RA.** CXCR3-Expression einer Kontrolle (A), eines RA-Patienten (B). Die Grenze bezieht sich auf die Isotypenkontrolle, rechts davon liegt die Fraktion der CXCR3 „hoch“ exprimierenden B-Zellen.

untersuchten R-Patienten von 2,8 % bis zu 43,1 %. Die Zunahme des Anteils der CXCR3 „hoch“ exprimierenden B-Zellen bei den RA-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen, ist mit einem p-Wert von 0,0005*** statistisch hoch signifikant. Die beiden anderen Patientengruppen zeigen eine ähnliche Tendenz, aber nicht im statistisch signifikanten Bereich. Die Zunahme bei den RA-Patienten ist im Vergleich zu OA-Patienten signifikant, nicht aber zu den SLE-Patienten (s. Abb. 4.17 (A)). In der Abbildung 4.15 sind zum Vergleich die Anteile der B-Zellen aus Synovialgewebe und Synovialflüssigkeit angegeben. Sie wurden nicht in der Statistik verwendet.

Tabelle 4.6: **Statistik der CXCR3 „hoch“ exprimierenden B-Zell-Anteile**

Gruppe	Gesamt-B-Zellen	naive B-Zellen	Gedächtnis B-Zellen	Plasmazellen
Kruskal-Wallis	0,0040**	0,0005***	0,0376*	0,6021 ^{ns}
Kon vs. RA	0,0005***	0,0006***	0,0034**	(-)
Kon vs. SLE	0,1910 ^{ns}	0,5100 ^{ns}	0,2572 ^{ns}	(-)
Kon vs. OA	0,2669 ^{ns}	0,8243 ^{ns}	0,3360 ^{ns}	(-)
RA vs. SLE	0,1218 ^{ns}	0,0064**	0,2628 ^{ns}	(-)
RA vs. OA	0,0291*	0,0015**	0,1711 ^{ns}	(-)
OA vs. SLE	0,8955 ^{ns}	0,6986 ^{ns}	0,8603 ^{ns}	(-)

p-Werte des Vergleichs der Gruppen im Kruskal-Wallis und Mann-Whitney-Test. ns, statistisch nicht signifikant; *, statistisch signifikant.

In der Subpopulation der naiven B-Zellen ist der Anteil der CXCR3 „hoch“ exprimierende Zellen bei RA-Patienten im Vergleich zu allen anderen Gruppen erhöht. Für die Gedächtnis B-Zellen ist diese signifikante Zunahme nur noch im Vergleich zwischen RA-Patienten und Kontrollgruppe

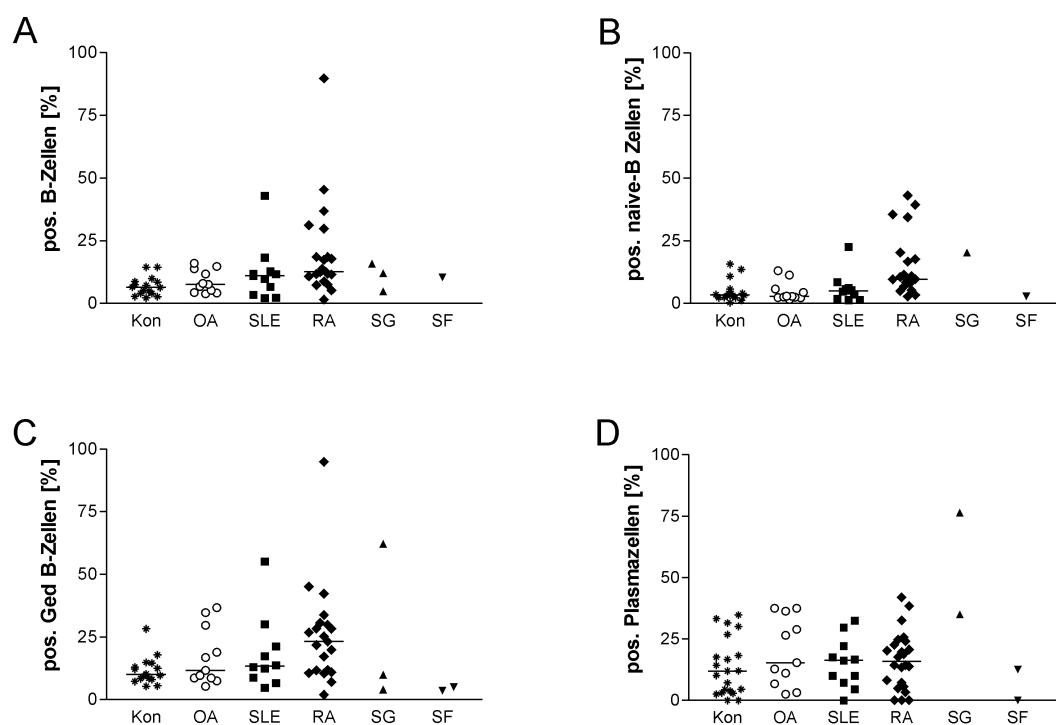


Abbildung 4.17: **Unterschiede Anteile CXCR3 „hoch“ exprimierender B-Zellen.** Gesamt-B-Zellen (A), naive B-Zellen (B), Gedächtnis B-Zellen (C) und Plasmazellen (D). Blut gesunder Kontrollen (*), OA-Blut (○), SLE-Blut (■), RA-Blut (◆), RA-Synovialgewebe (▲) und RA-Synovialflüssigkeit (▼).

zu sehen (s. Abb. 4.17 (C) und Tabelle 4.6). Die Anteile der Plasmazellen zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Für Patienten mit RA, die eine chronische Entzündung der Gelenke zeigen, ist eine Zunahme der CXCR3 „hoch“ exprimierenden Gesamt-B-Zellen, der naiven und Gedächtnis B-Zellen, aber nicht für Plasmazellen nachzuweisen. Die Anteile der CXCR3 „hoch“ exprimierende B-Zellen in Synovialgewebe und Synovialflüssigkeit schwanken sehr. Die Probenzahl ist zu gering, um eine Aussage über die Akkumulation von CXCR3 „hoch“ exprimierenden B-Zellen treffen zu können.

4.5.2 Verschiebung des Anteils CXCR4-tragender B-Zellen bei Patienten

Im Vergleich des Anteils der CXCR4 exprimierenden B-Zellen von SLE-Patienten (Median 19,0 %, n = 5) zu der Kontrollgruppe (Median 82,1 %, n = 19) zeigt sich eine signifikante Reduktion des Anteils in der Gruppe der SLE-Patienten. Im Vergleich der anderen Patientengruppen zu der Kontrollgruppe ergeben sich keine Unterschiede. Der Anteil der CXCR4-tragenden B-Zellen ist bei den RA- und SLE-Patienten im Vergleich zu den OA-Patienten reduziert, aber nicht zu der

Kontrollgruppe (s. Abb. 4.18 (A) und Tabelle 4.7). Der leicht erhöhte Anteil bei den OA-Patienten zu der Kontrollgruppe ist nicht statistisch signifikant.

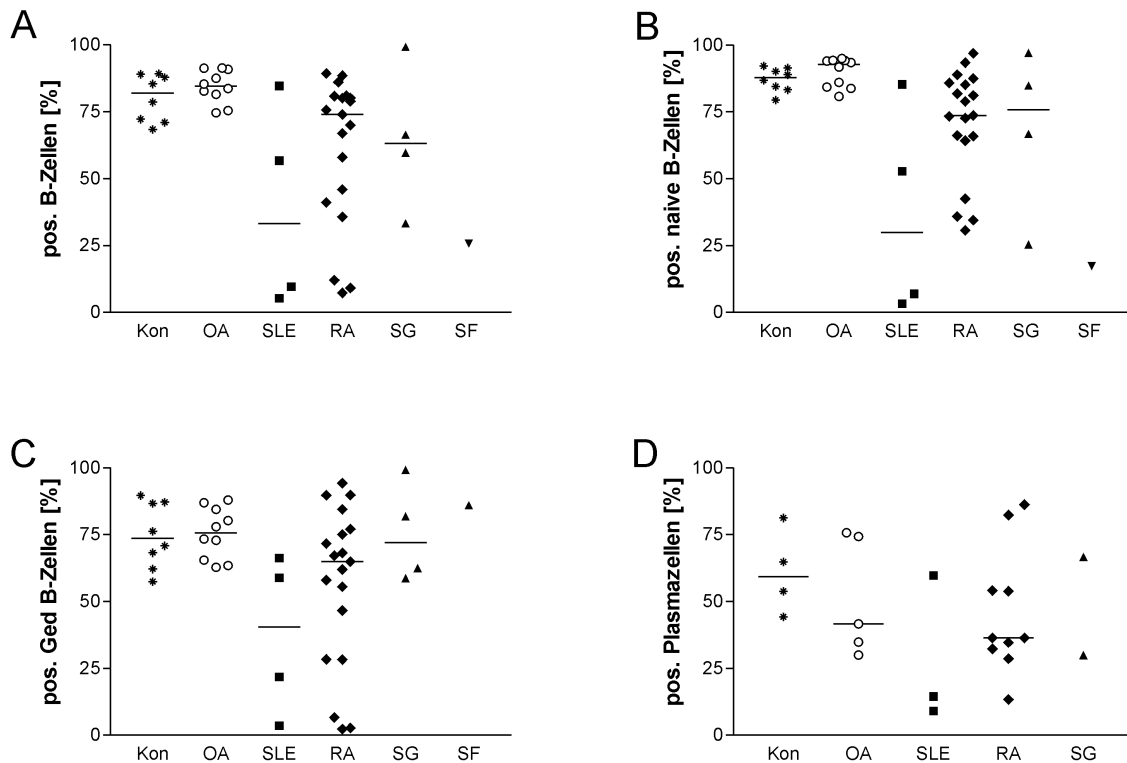


Abbildung 4.18: **Anteil der CXCR4-positiven B-Zellen.** Gesamt-B-Zellen (A), naive B-Zellen (B), Gedächtnis B-Zellen (C) und Plasmazellen (D). Blut gesunder Kontrollen (*), OA-Blut (o), SLE-Blut (■), RA-Blut (◆), RA-Synovialgewebe (▲) und RA-Synovialflüssigkeit (▼).

In der naiven B-Zell-Population kommt es zu einer Reduktion der CXCR4-positiven B-Zellen bei RA- und SLE-Patienten (s. Abb 4.18 (B) und Tabelle 4.7). Die Reduktion des Anteils CXCR4 positiver B-Zellen bei RA-Patienten ist gegenüber den anderen Gruppen signifikant. Der Anteil der CXCR4-positiven Gedächtnis B-Zellen ist bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen und OA-Patienten reduziert. Die Gruppen unterscheiden sich nicht in der Plasmazell-Population (s. Abb. 4.18 (D) und Tabelle 4.7).

Es ist eine grosse Streuung im Anteil der CXCR4-positiven Gesamt-B-Zellen der RA-Patienten (7,3 % bis 89,4 %) und SLE-Patienten (5,4 % bis 84,7 %) zu beobachten. Die Gruppen unterscheiden sich vor allem im Anteil der naiven CXCR4 positiven B-Zellen aus dem peripheren Blut. Für die Gesamt-B-Zellen aus dem Synovialgewebe ist der Median (63,1 %) des Anteils niedriger als der im RA-Blut (74,0 %). Bei naiven (75,8 %) und Gedächtnis B-Zellen (72,2 %) liegt der Median höher als im RA-Blut (73,7 % bzw. Gedächtnis 65,0 %).

Tabelle 4.7: Statistik der CXCR4-positiven B-Zell-Anteile

Gruppe	Gesamt-B-Zellen	naive B-Zellen	Gedächtnis B-Zellen	Plasmazellen
Kruskal-Wallis	0,0090**	0,0017**	0,0515*	0,3326 ^{ns}
Kon vs. RA	0,1173 ^{ns}	0,0209*	0,1758 ^{ns}	(-)
Kon vs. SLE	0,0485*	0,0283*	0,0283*	(-)
Kon vs. OA	0,3599 ^{ns}	0,2031 ^{ns}	0,8968 ^{ns}	(-)
RA vs. SLE	0,2736 ^{ns}	0,1138 ^{ns}	0,2396 ^{ns}	(-)
RA vs. OA	0,0042**	0,0036**	0,0940 ^{ns}	(-)
OA vs. SLE	0,0360*	0,0140*	0,0140*	(-)

p-Werte des Vergleichs der Gruppen im Kruskal-Wallis und Mann-Whitney-Test. ns, statistisch nicht signifikant; *, statistisch signifikant.

4.5.3 Reduktion des Anteils CXCR5-positiver B-Zellen bei Patienten

CXCR5 ist der typische Chemokinrezeptor der B-Zellen. Er ist wichtig für die Wanderung der B-Zellen in der Peripherie und die Lokalisation der Zellen in den sekundären lymphatischen Geweben.

Die RA-Patienten (Median 83,4 %, n = 26) zeigen eine Reduktion der CXCR5-positiven B-Zellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Median 93,8 %, n = 20). Die Reduktion ist auch bei SLE-Patienten (Median 82,0 %, n = 11) festzustellen. Bei OA-Patienten (96,8 %, n = 12) ist eine signifikante Zunahme der CXCR5-positiven B-Zellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe nachgewiesen worden. RA- und SLE-Patienten zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zueinander im Anteil CXCR5-tragender B-Zellen. Diese beiden Gruppen zeigen gegenüber den Patienten mit OA eine Reduktion des Anteils (s. Abb. 4.19 (A)). In der Abbildung 4.19 sind zum Vergleich die Anteile der CXCR5-positiven B-Zellen aus Synovialgewebe (Median 77,5 %, n = 6) und Synovialflüssigkeit (Median 55,6 %, n = 3) angegeben. Bei den Analysen zeigte sich eine breite Streuung (11,2 % bis zu 98,6 %) des Anteils CXCR5-tragender B-Zellen aus dem Synovialgewebe (s. Abb. 4.19).

Im Vergleich der Kontrollgruppe (Median 94,8 %, n = 20) zu RA-Patienten (Median 87,5 %, n = 26) zeigte sich eine Reduktion des Anteils der naiven CXCR5-positiven B-Zellen, bei OA-Patienten ist sie erhöht (s. Abb. 4.19 (B) und Tabelle 4.8). Die SLE-Patienten wiesen nur eine statistisch signifikante Reduktion im Vergleich zu den OA-Patienten, aber nicht zur Kontrollgruppe auf (s. Abb. 4.19 (C) und Tabelle 4.8). In der Subpopulation der Gedächtnis B-Zellen ist der Anteil CXCR5-positiver B-Zellen bei RA-Patienten (Median 80,7 %, n = 26) und SLE-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (Median 87,6 %, n = 20) reduziert. Dagegen ist der erhöhte

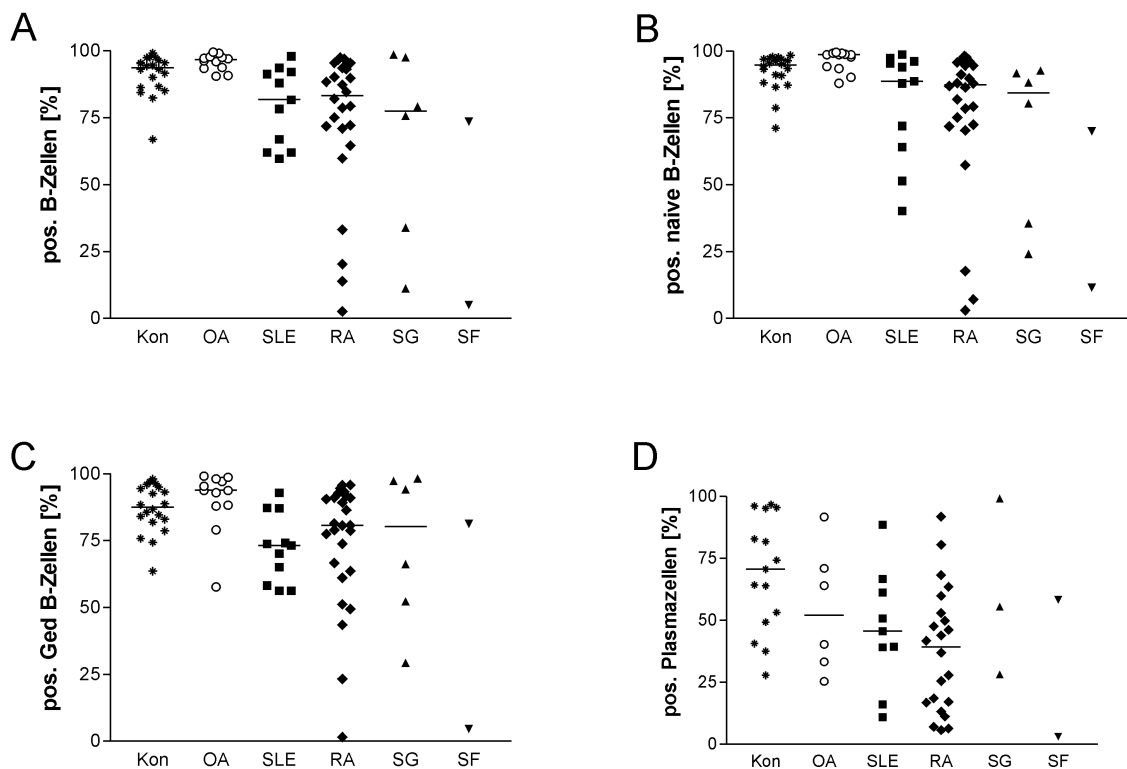


Abbildung 4.19: **Anteil der CXCR5-positiven B-Zellen.** Gesamt-B-Zellen (A), naive B-Zellen (B), Gedächtnis B-Zellen (C) und Plasmazellen (D). Blut gesunder Kontrollen (*), OA-Blut (○), SLE-Blut (■), RA-Blut (◆), RA-Synovialgewebe (▲) und RA-Synovialflüssigkeit (▼).

Anteil in dieser Subpopulation bei den OA-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen nicht mehr signifikant. In der Population der Plasmazellen bleibt der Anteil der CXCR5-positiven Zellen bei RA-Patienten (Median 39,3 %, n = 22) und SLE-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Median 70,6 %, n = 15) signifikant reduziert. Die Gruppen untereinander und im Vergleich zu den OA-Patienten sind nicht signifikant unterschiedlich (s. Abb. 4.19 (D) und Tabelle 4.8).

Der Anteil der CXCR5-positiven B-Zellen ist bei den Gesamt-B-Zellen und in allen drei Subpopulationen deutlich verändert, wenn die Patientengruppen mit der Kontrollgruppe verglichen werden. Bei allen drei Patientengruppen kommt es zu Verschiebungen beim Anteil der CXCR5-positiven B-Zellen. Vor allem RA-Patienten zeigen eine heterogene Verteilung mit einem deutlich reduzierten Median in allen Subpopulationen. Der Anteil der CXCR5-positiven B-Zellen, die aus Synovialgewebe bestimmt wurden, entspricht ungefähr dem im RA-Blut.

Tabelle 4.8: Statistik der CXCR5-positiven B-Zell-Anteile

Gruppe	Gesamt-B-Zellen	naive B-Zellen	Gedächtnis B-Zellen	Plasmazellen
Kruskal-Wallis	0,0003***	0,0009***	0,0010***	0,0086**
Kon vs. RA	0,0144*	0,0275*	0,0450*	0,0011**
Kon vs. SLE	0,0197*	0,2233 ^{ns}	0,0032**	0,0492*
Kon vs. OA	0,0472*	0,0108*	0,1242 ^{ns}	0,1990 ^{ns}
RA vs. SLE	0,9074 ^{ns}	0,8550 ^{ns}	0,2657 ^{ns}	0,4463 ^{ns}
RA vs. OA	0,0002***	0,0003***	0,0055**	0,2078 ^{ns}
OA vs. SLE	0,0028**	0,0107*	0,0015**	0,6070 ^{ns}

p-Werte des Vergleichs der Gruppen im Kruskal-Wallis und Mann-Whitney-Test. ns, statistisch nicht signifikant; *, statistisch signifikant.

4.5.4 Reduktion des Anteils CCR6-tragender B-Zellen bei Patienten

Der Chemokinrezeptor CCR6 spielt eine Rolle bei der Rekrutierung von Zellen in sekundäre lymphatische Organe. Bei den Gesamt-B-Zellen zeigte sich eine Reduktion der CCR6-positiven B-Zellen bei RA-Patienten (Median 81,6 %, n = 16) gegenüber gesunden Kontrollen (Median 93,2 %, n = 8) und OA-Patienten. Die SLE-Patienten zeigen die gleiche Tendenz, aber die Reduktion ist nicht in einem statistisch signifikanten Bereich. Für die Subpopulationen ergeben sich keine statistisch signifikanten Änderungen (s. Abb. 4.20 und für die p-Werte Tabelle 4.9).

Tabelle 4.9: Statistik der CCR6-positiven B-Zell-Anteile

Gruppe	Gesamt-B-Zellen	naive B-Zellen	Gedächtnis B-Zellen	Plasmazellen
Kruskal-Wallis	0,0221*	0,3307 ^{ns}	0,0890 ^{ns}	0,9855 ^{ns}
Kon vs. RA	0,0054**	(-)	(-)	(-)
Kon vs. SLE	0,2844 ^{ns}	(-)	(-)	(-)
Kon vs. OA	0,4828 ^{ns}	(-)	(-)	(-)
RA vs. SLE	0,9671 ^{ns}	(-)	(-)	(-)
RA vs. OA	0,0218*	(-)	(-)	(-)
OA vs. SLE	0,2573 ^{ns}	(-)	(-)	(-)

p-Werte des Vergleichs der Gruppen im Kruskal-Wallis und Mann-Whitney-Test. ns, statistisch nicht signifikant; *, statistisch signifikant.

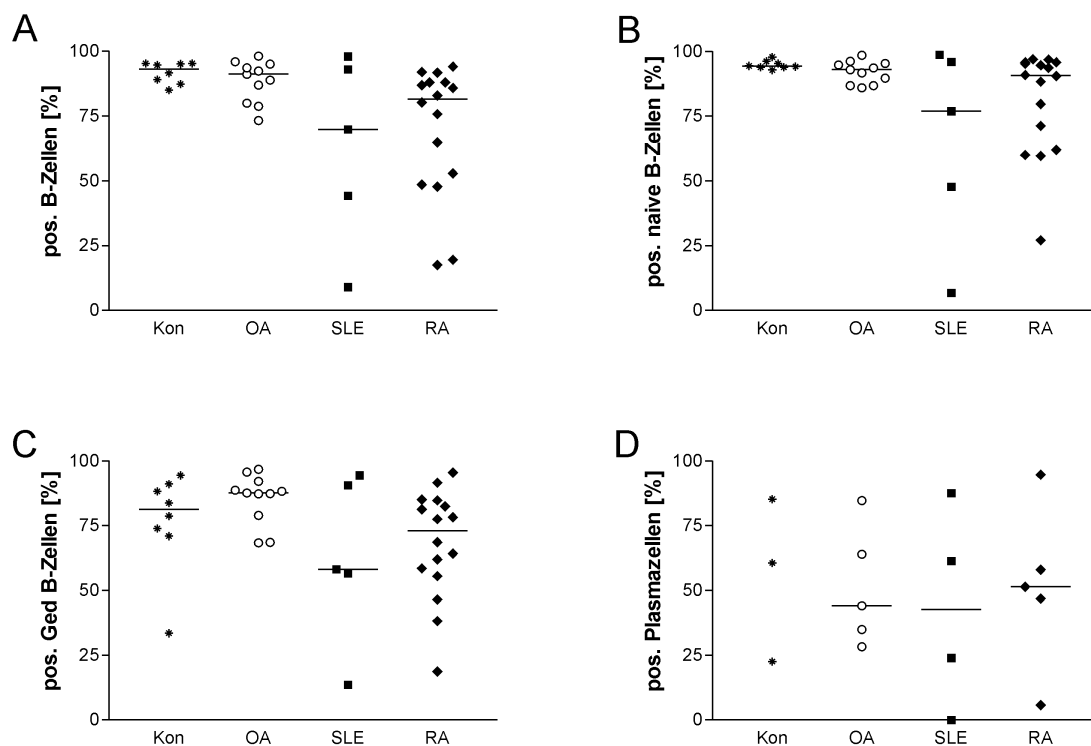


Abbildung 4.20: **Anteil der CCR6-positiven B-Zellen.** Gesamt-B-Zellen (A), naive B-Zellen (B), Gedächtnis B-Zellen (C) und Plasmazellen (D). Blut gesunder Kontrollen (*), OA-Blut (○), SLE-Blut (■), RA-Blut (◆).

4.5.5 Keine Änderung im Anteil der B-Zellen, die positiv sind für CCR5, CCR7 und CCR9

Der Anteil der CCR5-positiven B-Zellen ist in allen Gruppen sehr niedrig und schwankt zwischen sechs und zwölf Prozent. Pro Gruppe wurden nur wenige Patienten analysiert. Es ergaben sich keine Unterschiede in den Patientengruppen oder zwischen den B-Zell-Subpopulationen (s. Abb. 4.21). Für CCR9 konnten ebenfalls keine Unterschiede nachgewiesen werden. Der Anteil der CCR9-tragenden B-Zellen schwankt zwischen 1,4 % und 7,1 %.

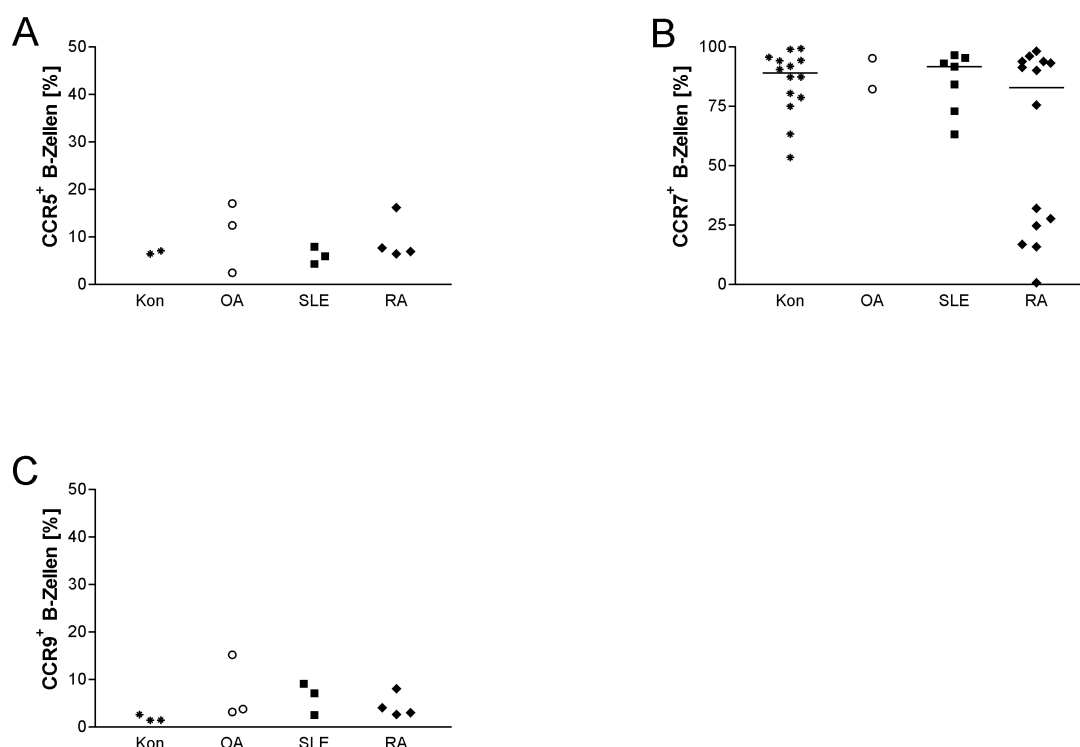


Abbildung 4.21: **Kein Unterschied der Chemokinrezeptor Expression auf B-Zellen.** CCR5 (A), CCR7 (B), CCR9 (C) positive Gesamt-B-Zellen. Blut gesunder Kontrollen (*), OA-Blut (o), SLE-Blut (■), RA-Blut (◆).

Der Anteil der CCR7-positiven B-Zellen ist hoch und variiert zwischen 82,8 % und 91,7 %. Die Anteile zeigen aber keinen Unterschied zwischen den Patientengruppen oder in den B-Zell-Subpopulationen (s. Abb. 4.21).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR9 auf den meisten B-Zellen nicht expremiert werden und der Anteil der Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen sich bei den untersuchten Krankheiten nicht verändert. Der Chemokinrezeptor CCR7 wird auf B-Zellen expremiert, aber nicht durch die Erkrankungen beeinflusst.

4.5.6 Einfluss der Therapie auf den Anteil Chemokinrezeptor-tragender B-Zellen

Wie bei der Untersuchung der B-Zell-Anteile wurde der Einfluss der Therapie der RA-Patienten auf den Anteil der Chemokinrezeptor-tragender B-Zellen analysiert. Der Vergleich der unterschiedlich behandelten Patientengruppen zeigt, dass die Therapie keinen Einfluss auf den Anteil der CXCR3 „hoch“ expremierenden und CCR6-positiven Gesamt-B-Zellen und Subpopulationen hat (s. Abb. 4.22 (A) und (D)).

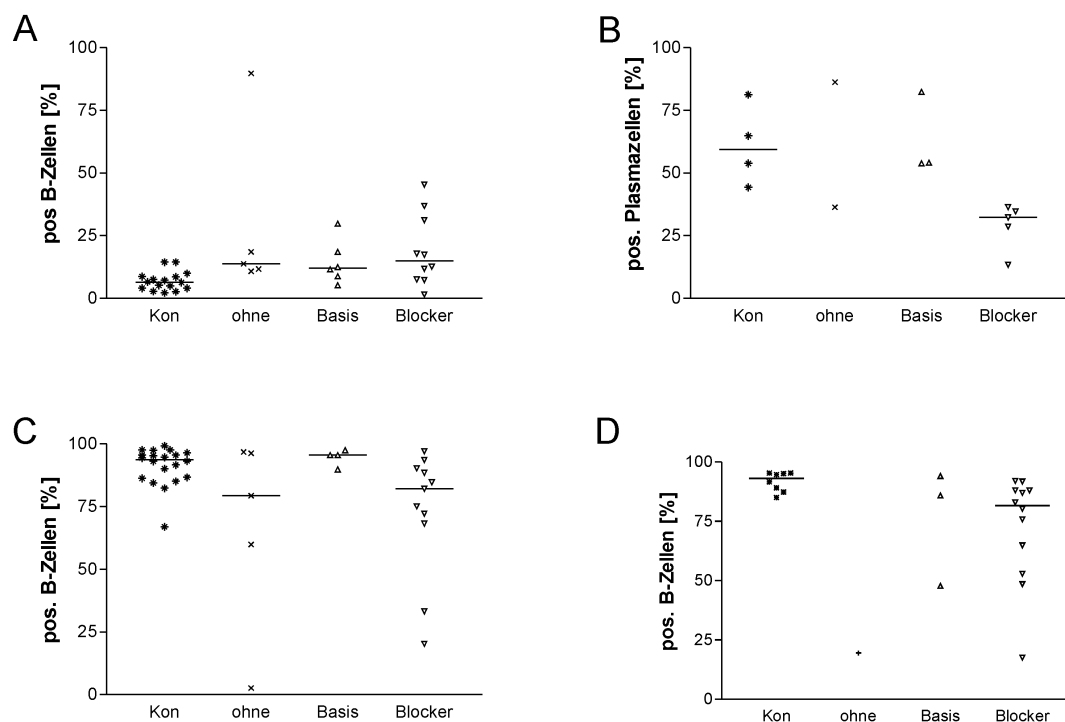


Abbildung 4.22: **Einfluss der Therapie auf Chemokinrezeptor-tragende B-Zellen.** Der Anteil CXCR3 „hoch“ exprimierender Gesamt-B-Zellen (A), CXCR4-positiver Plasmazellen (B), CXCR5-positiver Gesamt-B-Zellen (C) und CCR6 Gesamt-B-Zellen (D) ist in Abhängigkeit von der Therapie gezeigt. Kon, gesunde Kontrollen; ohne, unbehandelte RA-Patienten; Basis, Patienten, die nur Basistherapie (NSAR) und Blocker, die TNF-Blocker und NSAR erhalten.

Auf den Anteil von CXCR4- und CXCR5-positiven B-Zellen hat die Therapie einen Einfluss. Der Anteil der CXCR4-positiven Plasmazellen zeigte eine signifikante Reduktion ($p = 0,0357^*$) bei Patienten, die mit der Kombination aus TNF-Blockern und NSAR behandelt wurden, im Vergleich zu den Patienten, die eine Basistherapie erhalten (s. Abb. 4.22(B)). Der Anteil der CXCR5-positiven Gesamt-B-Zellen sinkt signifikant ($p = 0,0313^*$) bei den Patienten, die mit der Kombination behandelt wurden, im Vergleich zu den Patienten, die nur die Basistherapie erhalten (s. Abb. 4.22 (C)). Zu den Patienten ohne Behandlung sind keine Unterschiede nachweisbar.

4.5.7 Darstellung der veränderten Anteile Chemokinrezeptor-positiver B-Zellen bei Patienten

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Heterogenität der Anteile der Chemokinrezeptor-tragender B-Zellen bei RA- und SLE-Patienten höher ist, während die gesunden Kontrollen oder OA-Patienten homogener erscheinen (s. Abb. 4.23). Bei RA-Patienten wurden weniger B-Zellen nachgewiesen, die CXCR4 und CXCR5 Chemokinrezeptoren tra-

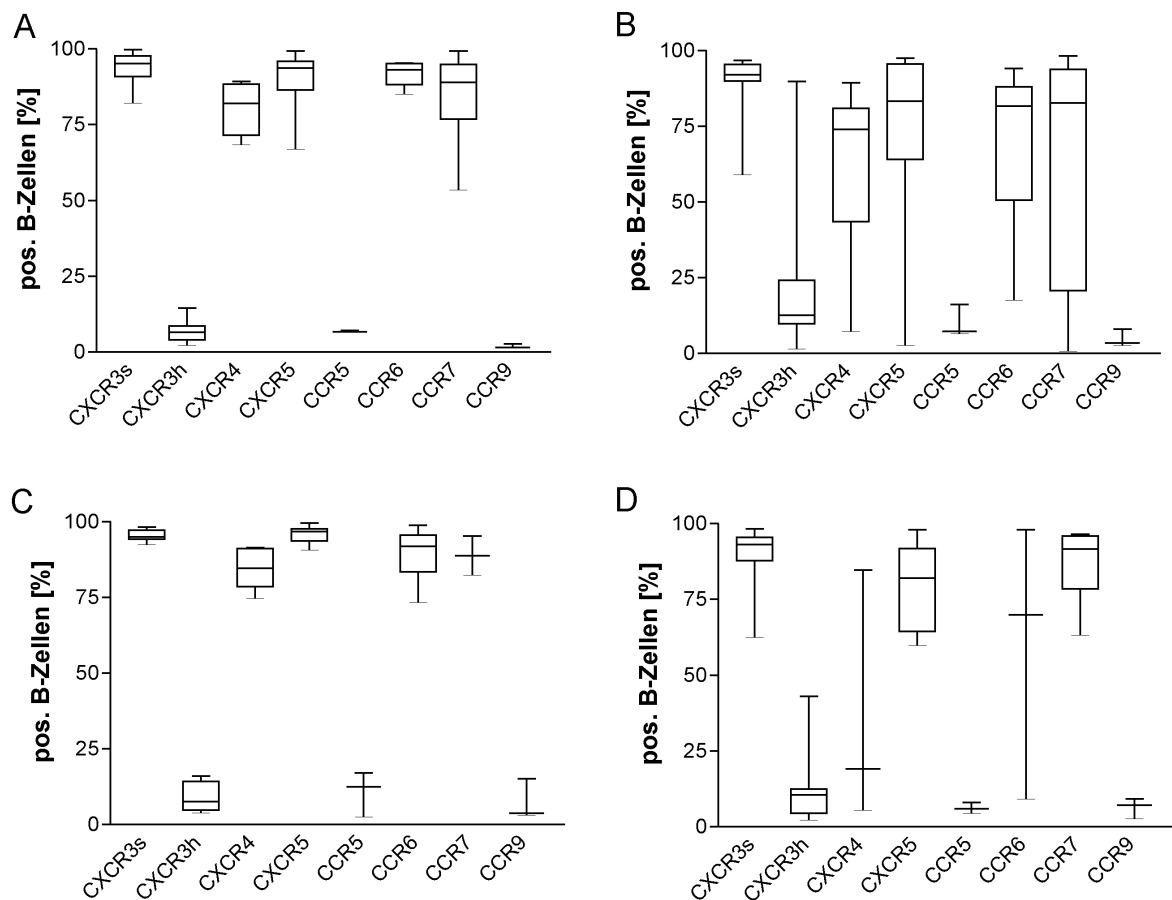


Abbildung 4.23: **Vergleich der Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen von Patienten.** Es sind die Anteile der Chemokinrezeptor-tragenden Gesamt-B-Zellen für gesunde Kontrollen (A), RA-Patienten (B), OA-Patienten (C) und SLE-Patienten (D) gezeigt. CXCR3s, „schwache“ Expression CXCR3; CXCR3h, „hohe“ Expression CXCR3.

gen, die für das Einnisten (*homing*) der Zellen in sekundären lymphatischen Organen wichtig sind. Dafür nahm der Anteil der B-Zellen, die eine „hohe“ Expression von CXCR3 haben, zu. CXCR3 „hohe“ Expression wurde bei den gesunden Kontrollen nur mit einem geringen Anteil gezeigt. CXCR3 beeinflusst die Wanderung von Zellen in entzündete Gewebe.

Bei SLE-Patienten ist der Anteil der CXCR4-positiven B-Zellen in allen Subpopulationen mit Ausnahme der Plasmazellen reduziert. Eine Reduktion bei den CXCR5-positiven B-Zellen entspricht denen der RA-Patienten. Bei den OA-Patienten kommt es zu einer Zunahme des Anteils CXCR5-positiver B-Zellen (s. Abb. 4.23).

4.5.8 Abhängigkeiten der Expression verschiedener Chemokinrezeptoren untereinander

Die Verteilung der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR5 auf B-Zellen in den Subpopulationen wurden als Doppelfärbungen in Durchflusszytometrischen-Analysen untersucht. Bei dieser Färbung wurden die B-Zellen in den Subpopulationen bestimmt, die beide Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche exprimieren. Diese Untersuchung soll Aufschluss über die Subpopulationen geben, die durch die veränderten Anteile an Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen beeinflusst werden.

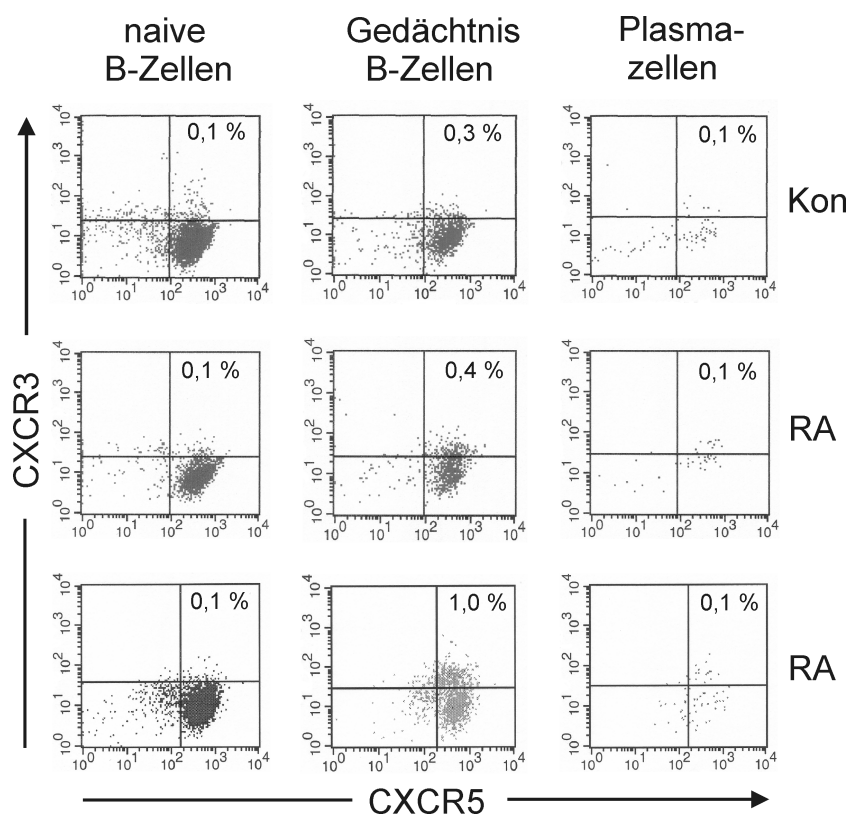


Abbildung 4.24: **Verteilung der doppelt positiven Zellen in den Subpopulationen.** Typisches Bild der Verteilung der CXCR3 und CXCR5 positiven B-Zellen in den Subpopulationen. Obere Zeile bei einer gesunden Kontrolle, untere Zeilen bei RA-Patienten.

Die Untersuchung wurde an einer kleinen Gruppe von sechs RA-Patienten und drei gesunden Kontrollen durchgeführt. Doppelt positive B-Zellen waren in der Subpopulation der Gedächtnis B-Zellen nachweisbar (s. Abb. 4.24). Die geringe Probenzahl und die Schwankungen in den Anteilen lassen keine eindeutige Aussage über eine veränderte Expression der beiden Chemokinrezeptoren in den Subpopulationen bei den RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen zu.

Um die Deregulation der Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen zu untersuchen, wurde analysiert, ob die Zunahme des Anteils der CXCR3 „hoch“ exprimierenden Zellen, mit der Reduktion der Anteile CXCR4- und CXCR5-positiven B-Zellen korreliert.

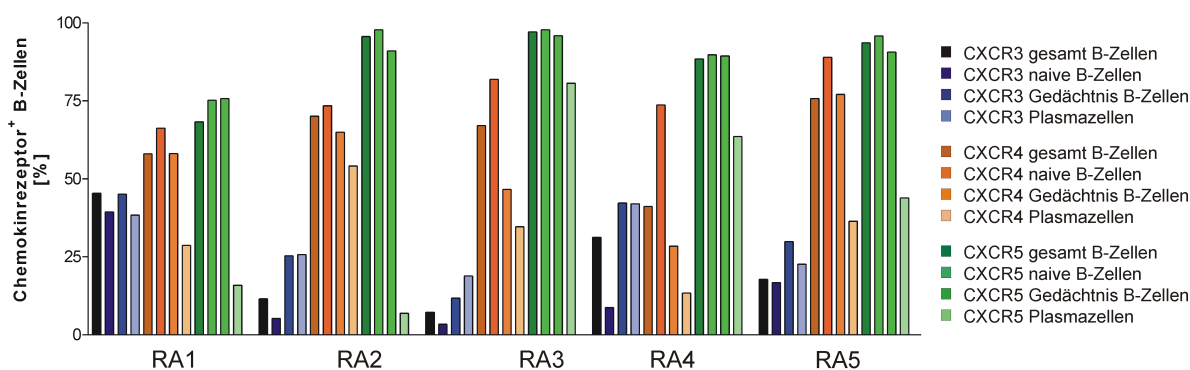


Abbildung 4.25: **Vergleich der CXC-Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen von RA-Patienten.** Es sind die Anteile der Chemokinrezeptoren CXCR3-, CXCR4- und CXCR5-tragenden Zellen in allen B-Zell-Subpopulationen bei RA-Patienten gezeigt.

Die Analyse der Korrelation wurde für 15 RA-Patienten durchgeführt. Die Reduktion des Anteils der CXCR5-exprimierenden Gesamt-B-Zellen korreliert (Korrelationskoeffizient $r = -0,5475$, $p = 0,0282^*$ nach Pearson) mit der Zunahme des Anteils CXCR3 „hoch“ exprimierenden Gesamt-B-Zellen (s. Abb. 4.25 und 4.26). Die Korrelation ist deutlich in der Subpopulation der naiven B-Zellen (Korrelationskoeffizient $r = -0,70505$, $p = 0,0023^{**}$ nach Pearson). Es konnte keine Korrelation für Gedächtnis B-Zellen und Plasmazellen nachgewiesen werden. Die Reduktion des Anteils CXCR4-exprimierenden B-Zellen korreliert nicht mit der Zunahme des Anteils CXCR3 „hoch“ exprimierenden B-Zellen (s. Abb. 4.25 und 4.26).

4.6 Einfluss der Chemokinrezeptor Expression auf die Wanderung von B-Zellen

Die Expression des Chemokinrezeptoren kann auch nicht funktionell sein, d.h. der Rezeptor ist auf der Oberfläche, aber die Zelle wandert nicht auf die Chemokin-Signale zu. Um zu überprüfen, ob der höhere Anteil der CXCR3- bzw. der reduzierte Anteil der CXCR4-tragenden B-Zellen Einfluss auf das Wanderungsverhalten der Zellen hat, wurde die Wanderung auf die entsprechenden Chemokine CXCL12 bzw. CXCL10 getestet. Es wurde eine konzentrationsabhängige Wanderung von B-Zellen auf die Chemokine CXCL10 und CXCL12 beobachtet.

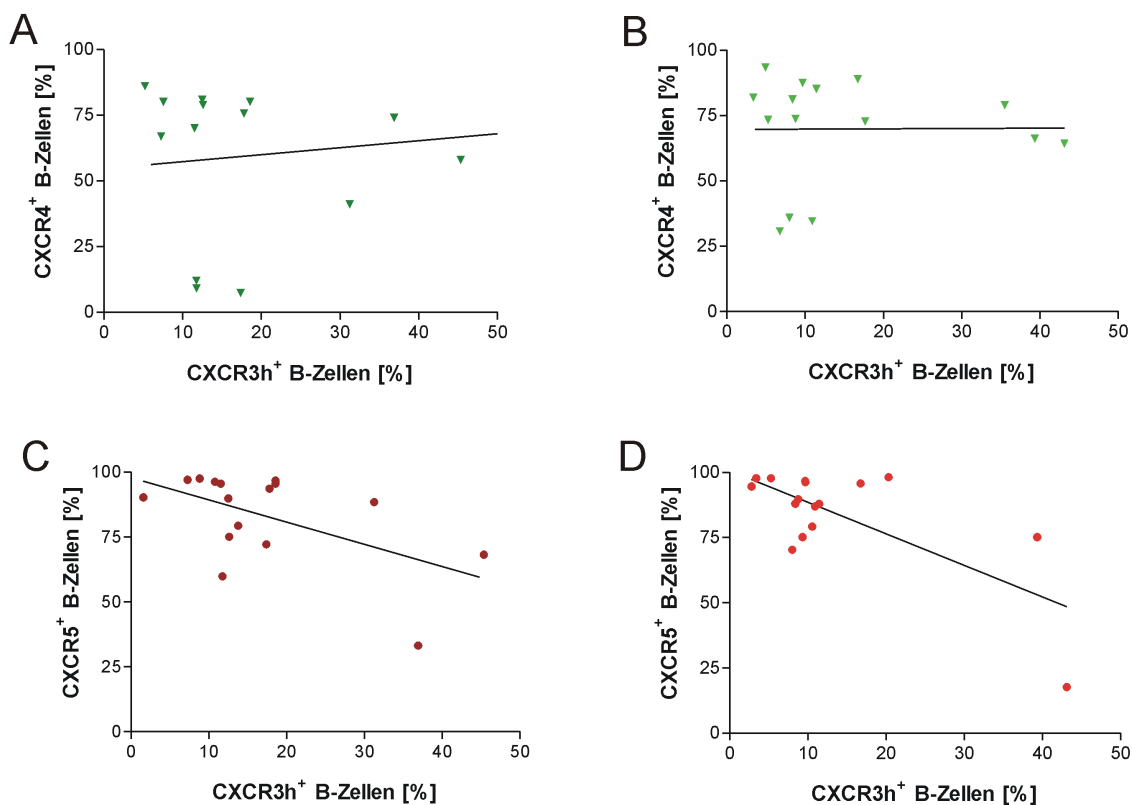


Abbildung 4.26: **Korrelation der CXC-Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen von RA-Patienten.** Es sind die Anteile der Chemokinrezeptoren CXCR3, CXCR4 (▼) in grün (A-B) und CXCR5 (●) in rot (C-D) tragenden Zellen der RA-Patienten und die Linearregression für die Werte gezeigt. Gesamt-B-Zellen (A und C) und naive B-Zellen (B und D).

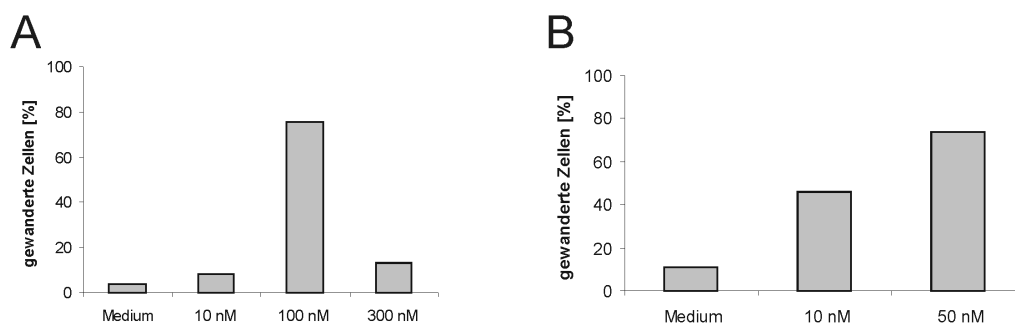


Abbildung 4.27: **Konzentrationsabhängige Wanderung der B-Zellen auf Chemokine.** Wanderungsverhalten von B-Zellen aus RA-Blut auf CXCL10 (A) und CXCL12 (B).

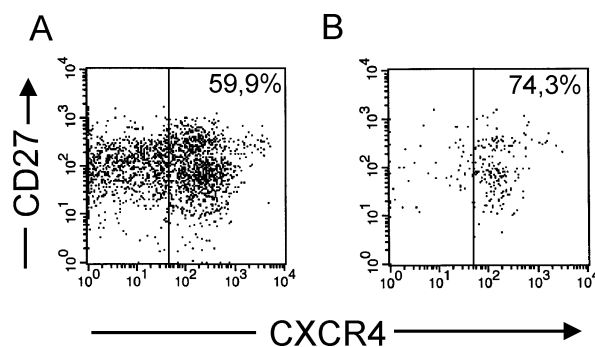


Abbildung 4.28: **Verteilung CXCR4-positiver B-Zellen vor und nach Migration.** Anteil CXCR4-positiver Gesamt-B-Zellen aus RA-Blut vor Migration (A), gewanderte B-Zellen (B).

Es wanderten vor allem die CXCR4-positiven B-Zellen; es kam zur Anreicherung dieser Fraktion in der unteren Kammer im Versuchsansatz, die das Chemokin enthielt. Daraus kann geschlossen werden, dass die Reduktion des Anteils CXCR4-positiver B-Zellen einen Einfluss auf das Wandern der Zellen hat.

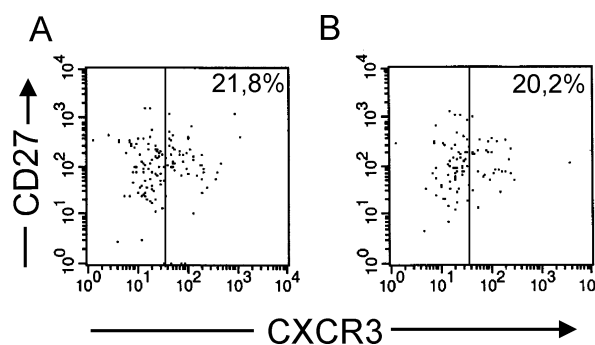


Abbildung 4.29: **Verteilung CXCR3-positiver B-Zellen vor und nach Migration.** Anteil CXCR3-positiver Gesamt-B-Zellen aus RA-Blut vor Migration (A), gewanderte B-Zellen (B).

Beide CXCR3-positiven B-Zell-Fractionen wandern im Migrations-Test. Es konnte keine Veränderung im Verhältnis der beiden Fraktionen zueinander durch das Wandern der B-Zellen gezeigt werden. In der unteren Kammer wurden die gleichen Anteile der beiden Fraktionen nachgewiesen wie in der Ausgangsprobe. Dieser Versuch zeigt, dass die Hochregulation von CXCR3 keinen Einfluss auf das Wanderungsverhalten der B-Zellen hat.