

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Akkumulation von B-Zellen im chronisch entzündeten Synovialgewebe von Patienten mit RA zu analysieren. Dazu wurde die Verteilung der B-Zellen im Synovialgewebe untersucht. In den Geweben wurden B-Zellen und Plasmazellen nachgewiesen, aber keine ektopen Keimzentren, die eine lokale Entwicklung der B-Zellen zu Plasmazellen im Gewebe ermöglichen. V-Gen-Analysen wurden durchgeführt, um zu klären, ob die B-Zellen aus dem Synovialgewebe und der -flüssigkeit eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben. Die Anzahl und Verteilung der somatischen Mutationen wurden mit der von B-Zellen aus dem Blut verglichen. Um die mögliche Einwanderung der B-Zellen aus der Peripherie in das Synovialgewebe aufgrund von Chemokin vermittelter Chemotaxis näher zu analysieren, wurde die Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR5, CCR6, CCR7 und CCR9 von peripheren Blut B-Zellen untersucht.

5.1 Synovialgewebe und Synovialflüssigkeit

Im Zentrum der Pathologie der RA steht die Einwanderung von mononuklearen Zellen ins chronisch entzündete Synovialgewebe. In der Literatur sind zwei Typen der Verteilung der eingewanderten Zellen im Gewebe beschrieben [135, 140, 141]. Der Typ der Verteilung bleibt bei RA-Patienten im Gewebe über lange Zeit stabil und stellen keine verschiedenen Stadien im Krankheitsverlauf dar [142]. Bei dem einen Typ sind die eingewanderten Zellen diffus im Gewebe verteilt, bei dem zweiten Typ wurden zelluläre Aggregate nachgewiesen [97, 143]. In einigen Fällen weisen diese Aggregate organisierte zelluläre Strukturen auf, die dem Aufbau von Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe ähneln [100, 144, 145, 146]. Etwa 20 % der RA-Patienten weisen ektopen Keimzentren im entzündeten Synovialgewebe auf [18, 140, 147]. Für diese konnte gezeigt werden, dass B-Zellen während der Proliferation schrittweise somatische Mutationen in den V-Genen akkumulieren [100, 146, 148]. B-Zellen können so lokal im chronisch entzündeten Synovialgewebe zu Plasmazellen ausdifferenzieren [98, 146].

In dieser Arbeit wurden 15 Synovialgewebe von RA-Patienten mit immunohistochemischen Methoden analysiert. B-Zellen und Plasmazellen lagen meist diffus im Gewebe verteilt vor. In keinem der Gewebe konnten FDC-Netzwerke angefärbt werden, die für den Aufbau der ektopen

Keimzentren nötig sind. Es wird vermutet, dass die Abnahme von ekto-phen Keimzentren in den Geweben, durch die veränderte Behandlung der RA-Patienten erklärt werden kann [149]. Durch die frühe Gabe von Entzündungshemmern wie anti-TNF- α kann dieser Prozess anscheinend aufgefangen werden. In den USA wird diese Therapieform nur bedingt angewendet und die in der Literatur beschriebene Verteilung an ekto-phen Keimzentren gefunden. Die Aussage, dass die ekto-phen Keimzentren für die Pathogenese der RA wichtig sind [18, 142], kann so nicht durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden.

Es konnte Zellproliferation mit einem anti-Ki67 Antikörper, der mit Zellen in allen Stadien des Zellzyklus mit Ausnahme der G₀-Phase reagiert, gezeigt werden. Der B-Zell-Aktivierungsfaktor BAFF, der die Reifung von B-Zellen unterstützt, wurde in zwei von sechs Synovialgeweben nachgewiesen. Dechanet et al. haben gezeigt, dass RA-Synoviozyten die Ausdifferenzierung von B-Zellen zu reifen Plasmazellen *in vitro* unterstützen und die Produktion von Antikörpern induzieren können [150]. Die von Shimaoka et al. beschriebenen „nurse cells“, die aus Knochenmark und Synovialgewebe isoliert werden konnten, können die Differenzierung von B-Zellen aus dem peripheren Blut zu Antikörper-produzierenden Zellen induzieren [151]. Der Nachweis von Zellproliferation und BAFF im RA-Synovialgewebe, weisen darauf hin, dass die Gedächtnis B-Zellen, die in das entzündete RA-Synovialgewebe einwandern, dort auch ohne Keimzentren zu Plasmazellen ausdifferenzieren können.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrischen-Analyse konnten die Anteile der B-Zellen an den Lymphozyten und in den B-Zell-Subpopulationen bestimmt werden. Erfahrungen mit dieser Methode am Institut haben gezeigt, dass Datensätze, bei denen das FACS-Gerät weniger als 30 Ereignisse in der Population registriert, nicht statistisch relevant sind. Diese Grenze ist bei der Bestimmung der B-Zellen im Synovialgewebe und -flüssigkeit von Bedeutung. Eine Auswertung der Durchflusszytometrischen-Analyse nach diesen Kriterien war bei sechs von 15 untersuchten Synovialgeweben und vier Synovialflüssigkeiten möglich. Es wurden nur Daten mit mehr als 30 Ereignissen zur Analyse verwendet. Bei der Untersuchung der Einzelzell-Suspensionen aus Synovialgewebe konnte gezeigt werden, dass in allen Geweben B-Zellen aus allen drei Subpopulationen (naive und Gedächtnis B-Zellen sowie Plasmazellen) nachzuweisen sind. Die Verteilung in die Subpopulation verschiebt sich im Vergleich zum peripheren Blut. Ein großer Teil der B-Zellen im Gewebe gehört zu der Subpopulation der Gedächtnis B-Zellen. Der Median (57,3 %) der Gedächtnis B-Zellen in den untersuchten Geweben ist fast doppelt so hoch wie im Blut (32,9 %) der RA-Patienten. Der Plasmazell-Anteil der Gewebe liegt bei 4,9 %, der im RA-Blut bei 2,6 %. Der Anteil der naiven B-Zellen ist reduziert. Für die Synovialflüssigkeiten ist der Median der Gedächtnis B-Zellen (53,1 %) vergleichbar dem der Synovialgewebe und der Anteil der Plasmazellen (Median 2,6 %) entspricht dem von RA-Blut. Aus den verschobenen Anteilen, im Vergleich zu Blut der RA-Patienten, kann geschlossen werden, dass in Synovialgewebe und -flüssigkeit vor allem Gedächtnis B-Zellen akkumulieren.

Die untersuchten chronisch entzündeten Synovialgewebe zeigten alle vier möglichen Entzündungsgrade bei der Einteilung nach Krenn [139]. Die Einteilung der Entzündungsgrade erfolgt an Präparaten, bei denen die Zellkerne mit Hämatoxin und das Zytoplasma mit Eosin gefärbt werden, und berücksichtigt die Dicke der Deckzellschicht, Dichte der Zellen im Stroma und die Größe der Infiltrate. Der Entzündungsgrad null sagt aus, dass keine akute Synovitis vorliegt. Dies war bei einem der untersuchten Synovialgewebe der Fall. In der Durchflusszytomtrischen-Analyse wurden in diesem Gewebe 2,3 % der Lymphozyten als B-Zellen bestimmt. Zwei der untersuchten Synovialgewebe zeigten eine leichte Entzündung (Entzündungsgrad eins), der Anteil der B-Zellen in den Lymphozyten war bei einem Gewebe 1,7 % und bei dem anderen 37,3 %. Das einzige Synovialgewebe, bei dem grosse B-Zell-Aggregate mit immunohistochemischen Methoden bestimmt wurden, hatte 4,3 % B-Zellen und eine moderate Entzündung (Entzündungsgrad zwei). Die zwei Synovialgewebe, die eine starke Entzündung (Entzündungsgrad drei) aufwiesen, zeigten deutliche Unterschiede in den Anteilen der B-Zellen mit 2,4 % und 35,2 %. Die Verteilung der B-Zellen im Gewebe entspricht bei vier der sechs untersuchten Synovialgewebe der, die man nach den Entzündungsgrad erwarten würde. Die Unterschiede zwischen den Entzündungsgraden, der gezeigten Verteilung der B-Zellen und dem durchflusszytometrisch bestimmten Anteil der B-Zellen, kann durch die nicht B-Zell spezifische Betrachtung des Synovialgewebes bei der Bestimmung des Entzündungsgrades erklärt werden. Die Unterschiede zwischen der Verteilung und den bestimmten Anteil der B-Zellen kann durch den unterschiedlichen Anteil an Lymphozyten in den Geweben entstehen. Der B-Zell-Anteil bezieht sich auf die Lymphozyten und ist keine absolute Zellzahl.

In den sechs Synovialgeweben konnte die Expression der untersuchten Chemokine CXCL10, CXCL12 und CXCL13 und deren Rezeptoren CXCR3, CXCR4 und CXCR5 sowie CCR6 mit immunohistochemischen Methoden gezeigt werden. Dies stimmt mit den Daten in der Literatur überein. Dort wurde der immunohistochemische Nachweis mit RT-PCR-Analysen und Durchflusszytometrischen-Untersuchungen bestätigt [124, 132, 135]. Patel et al. konnten zeigen, dass CXCL10 verstärkt in Synovialgewebe und -flüssigkeit vorkommt [152], aber im Serum der RA-Patienten nur wenig [153]. CXCL12 konnte im Synovialgewebe von RA-Patienten nachgewiesen werden und wird von synovialen Fibroblasten und Endothelzellen produziert [124, 127]. Takeumura et al. konnten unterschiedliche CXCL13-RNA Mengen mittels RT-PCR in RA-Gewebe nachweisen. CXCL13 ist in RA-Gewebe mit Keimzentren 15-30 mal höher exprimiert als in Gewebe mit T- und B-Zell Aggregaten oder diffus im Gewebe verteilten T- und B-Zellen [140]. Wenn Keimzentren nachgewiesen wurden, sind die FDC die CXCL13-Produzenten [135, 140]. Synoviale Fibroblasten in der Deckzellschicht und tiefere synovialen Schichten des Gewebes, aber auch Endothelzellen der kleinen Arteriolen und Kapillaren sind positiv für CXCL13, unabhängig davon ob ektope Keimzentren vorhanden sind oder nicht [140].

Bei den immunohistochemischen Analysen in dieser Arbeit zeigte sich ein heterogenes Bild in der Verteilung der Chemokine wie auch der Zell-Infiltrate zwischen den Patienten. Ein Vergleich der Färbung bei einem Patient in verschiedenen Regionen des Synovialgewebes ist aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Infiltrate kaum möglich. Chemokinrezeptor-tragende Zellen konnten in den Regionen lokalisiert werden, in denen auch die Chemokine nachgewiesen wurden.

5.2 V-Gen-Analyse

Aus Blut, Synovialgewebe und -flüssigkeit der RA-Patienten wurden Gedächtnis B-Zellen und Plasmazellen mittels FACS aussortiert. Die Akkumulation von somatischen Mutationen in den V-Genen gibt Auskunft über den Differenzierungsstatus der B-Zellen. Die V-Gene des BCR wurden in einer RT-PCR aus den sortierten Einzelzellen amplifiziert, ohne vorher die RNA aus den Zellen zu isolieren. Die Fehlerrate durch den verwendeten Enzymmix in der RT-PCR wurde in der Arbeitsgruppe mit $2,5 \cdot 10^{-3}$ ermittelt (Diplomarbeit N. Wittenbrink) und ist daher bei der Auswertung der molekularbiologischen Daten zu vernachlässigen. Die V-Gene wurden sequenziert und als Referenzsequenz das Keimbahngen aus der V-BASE Datenbank mit der höchsten Homologie zu der untersuchten Sequenz verwendet. Bei der V-Gen-Analyse der H-Kette der Antikörper wurden die verwendeten VH-Gensegmente, Isotypen, Anzahl der Mutationen und das Verhältnis von Aminosäureaustausch zu stillen Mutationen bestimmt. Diese Informationen lassen eine Aussage zu, ob die B-Zellen eine Affinitätsreifung im Keimzentrum durchlaufen haben.

In den untersuchten Sequenzen wurden die VH-Gensegmente VH4, VH1 und VH3 bestimmt. In der Literatur wurden für B-Zellen aus dem peripheren Blut Rearrangierungen mit den VH3-Genen am häufigsten gefunden, VH4- und VH1-Familien sind die am zweithäufigsten benutzten Gengruppen [154]. Diese drei Genfamilien wurden auch bei einer Untersuchung an B-Zellen aus ektopen Keimzentren in RA-Synovialgewebe bevorzugt gefunden [98]. Die V-Gene der B-Zellen aus dem Gewebe und der Synovialflüssigkeit sind mutiert und zeigen eine Ansammlung von Mutationen in den CDR. Das Verhältnis von Aminosäureaustauschen zu stillen Mutationen ist nicht so hoch wie bei den B-Zellen aus dem peripheren Blut. Es zeigt sich aber auch in diesen Sequenzen eine Anhäufung von Basenaustauschen, die zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz führen. Die Anzahl der gefunden somatischen Mutationen von 13-40 legt die Vermutung nahe, dass die Zellen aus dem Synovialgewebe und der Synovialflüssigkeit bereits Keimzentrumsreaktionen durchlaufen haben. Aus ektopen Keimzentren im RA-Synovialgewebe wurden viele unmutierte Sequenzen, aber auch Sequenzen mit bis zu 15 somatischen Mutationen isoliert [98].

In dieser Arbeit wurden für die untersuchten L-Ketten mehr κ - als λ -Sequenzen nachgewiesen. In der Literatur ist beschrieben, dass ungefähr 60 % der Antikörper im humanen Serum eine

κ -L-Kette besitzen [155]. Bis auf eine H-Kette (IgA) zeigten alle analysierten Sequenzen IgG-Isotypen. Die untersuchten B-Zellen haben alle einen Isotypenwechsel erfahren. Dafür benötigt die B-Zelle eine T-Zell-Hilfe in Form von Zytokinen, die sie in den Keimzentren erhält. Da in den untersuchten Geweben, aus dem die Zellen stammen, mit immunohistochemischen Methoden keine ektopen Keimzentren gezeigt werden konnten, kann die Keimzentrumsreaktion nicht lokal im Synovialgewebe stattgefunden haben, wie dieses schon von anderen Autoren gezeigt wurde [98].

5.3 B-Zellen in peripherem Blut

Zur Analyse der Einwanderung von B-Zellen aus der Peripherie in das chronisch entzündete Synovialgewebe wurde im ersten Schritt der prozentuale Anteil der B-Zellen an den Lymphozyten bestimmt. Die Verteilung in die B-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut wurde untersucht. Im zweiten Schritt wurde dann der Anteil der Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen analysiert, die Einfluss auf das Einwandern der B-Zellen aus der Peripherie ins Gewebe haben könnten.

Bei der Durchflusszytometrischen-Analyse der B-Zellen wurden die Zellen mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD20 und CD19 als B-Zellmarker bzw. CD38 für Plasmazellen und mit CD27 zur Unterscheidung der B-Zell-Subpopulationen markiert. Dies macht die Auftrennung der B-Zellen in die drei Subpopulationen möglich. Bei der Auswertung der FACS-Analysen ist die Grenze von 30 Ereignissen in den Population (s. auch Seite 64) von Bedeutung. Dies ist wichtig für die Bestimmung des Plasmazell-Anteils im peripheren Blut- vor allem bei gesunden Kontrollen, da diese Subpopulation den kleinsten Anteil der B-Zellen ausmacht.

Der Anteil der Gesamt-B-Zellen an den Lymphozyten wurde in dieser Arbeit mit einem Median von 7,4 % für die gesunden Kontrollen ermittelt. In der Literatur wird der Anteil der B-Zellen an den Lymphozyten mit 7 bis 10 % angegeben [59, 65, 154].

Bei den drei Patientengruppen (RA, OA, SLE) ist der Anteil der Gesamt-B-Zellen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant reduziert. Die Werte für den B-Zell-Anteil der RA-Patienten (0,4 % bis 39,0 %, Median 3,4 %) und SLE-Patienten (1,4 % bis 27,9 %, Median 2,5 %) zeigen eine größere Heterogenität als die der OA-Patienten (2,4 % bis 11,0 %, Median 4,7 %) und gesunden Kontrollen (5,1 % bis 18,6 %, Median 7,4 %). Odendahl et al. zeigten in einer Untersuchung an SLE-Patienten sowohl die Reduktion der Gesamt-B-Zellzahl, als auch des B-Zell-Anteils [65]. Die Werte für die SLE-Patienten in dieser Arbeit passen zu denen der Veröffentlichung (0,7 % bis 9,7 %, Median 3,3 %), auch wenn für einige Patienten deutlich erhöhte Werte bestimmt wurden. Die Therapie und Dauer der Erkrankung zeigen aber auch Unterschiede zu den in der Untersuchung.

Bei den gesunden Kontrollen wurden in dieser Arbeit der Anteil der naiven mit 75,2 %, der Gedächtnis B-Zellen mit 23,8 % und der Plasmazellen mit 1,2 % der B-Zellen im peripheren Blut bestimmt. In der Literatur sind die Subpopulationen mit 55 bis 75 % naive B-Zellen, 35 bis 45 % Gedächtnis B-Zellen und ungefähr 1 % Plasmazellen angegeben [59, 65, 154]. Odendahl et al. konnten für SLE-Patienten zeigen, dass es zu einer Reduktion im Anteil der naiven B-Zellen und zu einer Zunahme bei den Gedächtnis B-Zellen und Plasmazellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen kommt [65]. Diese Tendenz konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, wobei sie für SLE-Patienten (65,6 % naive B-Zellen, 33,0 % Gedächtnis B-Zellen und 2,4 % Plasmazellen) in einem statistisch nicht signifikanten Bereich liegt, aber bei den RA-Patienten signifikant ist (60,9 % naive, 32,9 % Gedächtnis B-Zellen und 2,6 % Plasmazellen). Die beiden Gruppen zueinander sind nicht statistisch signifikant verschieden. Der Unterschied kann durch die Streuung der Daten innerhalb der Gruppen erklärt werden. Untersuchungen in der Arbeitsgruppe an einer großen Gruppe von RA-Patienten (Lindenau et al., Manuskript in Vorbereitung) stimmen mit den in dieser Arbeit bestimmten B-Zell-Anteilen der RA-Patienten und gesunden Kontrollen überein.

Aus den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Bestimmung des Gesamt-B-Zell-Anteils und der Verteilung in die Subpopulationen kann auf eine chronische Aktivierung des B-Zellsystems bei den Patienten mit einer Autoimmunerkrankung geschlossen werden, mit einem hohen Anteil von Plasmazellen. Die Aktivierung des Immunsystems und andauernde Entzündungsreaktionen werden durch die klinischen Daten der Patienten in dieser Untersuchung gezeigt, die erhöhte BSG- und CRP-Werte aufweisen.

5.4 Chemokinrezeptoren auf peripheren B-Zellen

Das Einwandern von B-Zellen in lymphatische und nicht-lymphatische Gewebe ist ein Prozess, der durch eine Vielzahl von Molekülen, wie Adhäsionsmoleküle und Chemokine und die dazu gehörigen Rezeptoren, reguliert wird. Lymphozyten verändern ihre Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren, während der Differenzierung und nach ihrer Aktivierung, dies führt zu einem spezifischen Wanderungsprogramm in Abhängigkeit von den Chemokinen [23].

Um zu untersuchen, ob die Akkumulation der B-Zellen in der entzündete Synovialis durch eine Veränderung im Migrationsverhalten der Zellen erklärt werden kann, wurde der Anteil der Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen mit Durchflusszytometrischen-Analysen bei 26 RA-Patienten, 13 OA-, 11 SLE-Patienten und 21 gesunden Kontrollen bestimmt. Wie auch bei der Bestimmung des Anteils der B-Zellen wurden nur die Daten verwendet, die mehr als 30 Ereignisse in den Populationen enthalten (s. Seite 64). Es wurden B-Zellen nachgewiesen, die positiv sind für die Chemokinrezeptoren CCR6, CCR7, CXCR3, CXCR4 und CXCR5. Die Oberflächenexpression wurde durch molekularbiologische Untersuchungen bestätigt, mit Ausnahme für CCR6.

Der Chemokinrezeptor konnte auf den B-Zellen nachgewiesen werden, nicht aber die RNA in der RT-PCR Amplifikation. Die Durchflusszytometrischen-Analysen wurden an einer größeren Patientengruppe durchgeführt als die RT-PCR Amplifikation. Nakayama et al. zeigten durch eine semiquantitative RT-PCR von peripheren Gesamt-B-Zellen eine hohe Expression von CXCR4, CXCR5 und CCR7, eine niedrige Expression von CCR6, CXCR2, CXCR3 und keine RNA für CCR3 und CCR9 [156]. Damit übereinstimmend konnte für den Chemokinrezeptor CCR9 keine RNA amplifiziert und nur ein Anteil von 1,4 % CCR9-positiven B-Zellen im peripheren Blut gezeigt werden. CCR9 wurde in der Literatur im Zusammenhang mit IgA-sekretierenden Plasmazellen und Schleimhaut-assoziierten Immunprozessen vor allem im Darm diskutiert [157].

Einige Autoren zeigen eine Expression von CCR5 auf B-Zellen [132, 158], andere können den Chemokinrezeptor nicht auf B-Zellen unter physiologischen Bedingungen nachweisen, wohl aber bei malignen Lymphomen [159]. In der vorliegenden Arbeit konnte nur ein kleiner Anteil (6,7 %) CCR5-positiver B-Zellen gezeigt werden. Dieser Anteil wird nicht durch die untersuchten Erkrankungen beeinflusst. In der Literatur wird eine wichtige Rolle für CCR5 auf T-Zellen in der RA vermutet [134]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen für diesen Rezeptor auf B-Zellen keine wichtige Rolle.

Der Chemokinrezeptor CCR7 wird auf einem großen Anteil (89,0 %) der B-Zellen expremiert, aber nicht durch die Erkrankungen beeinflusst. Der Rezeptor scheint eher Einfluss auf Prozesse zu haben, die bei der B-Zell-Entwicklung unter physiologischen Bedingungen von Bedeutung sind. In der Literatur konnte nachgewiesen werden, dass bei immunisierten Mäusen CCR7 auf Plasmazellen runterreguliert wird [160, 161].

Bei den Untersuchungen der Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen in den Subpopulationen wurden die B-Zellen einer Subpopulation als 100 % angenommen. Davon ausgehend wurde der relative, prozentuale Anteil der Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen in der Subpopulation bestimmt. Die Schwankungen in den Subpopulationen in den Patientengruppen beeinflussen dadurch nicht die Analyse und ein Vergleich der Werte ist möglich. Die Anteile der B-Zellen von RA-Patienten, die Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche expremieren, wurde mit gesunden Kontrollen und Patienten der Autoimmunerkrankung SLE bzw. Patienten mit OA verglichen. Für die Chemokinrezeptoren CXCR3, CXCR4, CXCR5 und CCR6 konnten in dieser Arbeit Unterschiede in dem Anteil der positiven-B-Zellen im Vergleich von den gesunden Kontrollen zu den Patientengruppen, vor allen zu den RA-Patienten, gezeigt werden.

Der Chemokinrezeptor CCR6 wurde für naive und Gedächtnis B-Zellen in der Literatur beschrieben [25]. Er wird runterreguliert, wenn die Zelle Signale über den BCR erhält und geht bei Plasmazellen verloren. Die B-Zellen, die aus den Keimzentren als Gedächtnis B-Zellen wieder in die Peripherie wandern, regulieren den Rezeptor wieder hoch und er wird hoch reguliert bei B-Zellen, die mit Epstein-Barr Virus in Kontakt kommen, im Vergleich zu ruhenden B-Zellen im Blut [156].

Der Median CCR6-positiver Gesamt-B-Zellen beträgt bei den hier analysierten B-Zellen der gesunden Kontrollen 93,2 %. Bei RA-Patienten konnte eine Reduktion des Anteils CCR6-positiver B-Zellen (Median 82,6 %) nachgewiesen werden. Der reduzierte Anteil CCR6-tragender B-Zellen könnte darauf hinweisen, dass die B-Zellen im peripheren Blut der RA-Patienten über den BCR chronisch aktiviert sind. Diese Aussage müsste über Analysen des Aktivierungszustandes der B-Zellen näher untersucht werden.

Für die Expression von CXCR3 auf B-Zellen werden in die Literatur unterschiedliche Angaben gemacht. Einige Autoren zeigen eine Expression von CXCR3 auf B-Zellen [132, 158]. Andere konnten CXCR3 nicht auf B-Zellen zeigen [162]. Trentin et al. konnten CXCR3 nicht auf normalen B-Zellen nachweisen, zeigen aber einen Anstieg bei B-Zell Lymphomen [163]. In einer Untersuchung bei Multipler Sklerose konnte gezeigt werden, dass CXCR3 auf B-Zellen eine Rolle bei der Wanderung bei dieser Erkrankung in die entzündlichen Kompartimente spielt [164]. Patel et al. konnten einen Unterschied in den Konzentrationen von CXCL9 und CXCL10 vom Serum zum Synovialgewebe zeigen und vermuten daher eine wesentliche Rolle dieser Chemokine und des bindenden Chemokinrezeptors CXCR3 bei der Rekrutierung von Leukozyten in das RA-Synovium [152]. In dieser Arbeit werden zwei positive Fraktionen bei B-Zellen beschrieben. Es wird eine Unterscheidung zwischen CXCR3 „schwach“ positiven Zellen und CXCR3 „hoch“ exprimierenden Zellen vorgenommen, wobei sich die Intensität der Färbung zwischen den Fraktionen um bis zu einer Zehnerpotenz unterscheidet. In der Literatur wird diese Unterscheidung nicht vorgenommen. Aber in den Veröffentlichungen von Qin et al. und vor allem Sorensen et al. zeigen Durchflusszytometrischen-Analysen diese Fraktion (s. [132, 164]). Auch bei Analysen aus der Maus deuten gezeigte Abbildungen auf diese beiden Fraktionen hin [165]. Die widersprüchliche Beschreibung von CXCR3 auf B-Zellen könnte sich auch aus den beiden positiven Fraktionen erklären lassen. Ein grosser Anteil der Gesamt-B-Zellen bei den gesunden Kontrollen (95,3 %) und den Patienten (92,0 % Median der RA-Patienten) exprimieren CXCR3 „schwach“. In der Expression ergeben sich keine signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen oder in den Subpopulationen. Der Anteil der CXCR3 „hoch“ exprimierenden Gesamt-B-Zellen zeigt signifikante Unterschiede. Im Vergleich der Patientengruppen mit den gesunden Kontrollen, kann für Patienten mit RA, die durch eine chronische Entzündung der Gelenke gekennzeichnet ist, eine Zunahme des Anteils der CXCR3 „hoch“ exprimierender Gesamt-B-Zellen gezeigt werden. Diese Zunahme gilt für naive und Gedächtnis B-Zellen, aber nicht für Plasmazellen. Bei Patienten mit SLE kann keine Zunahme beim Anteil CXCR3 „hoch“ exprimierender B-Zellen nachgewiesen werden, obwohl es auch bei dieser Autoimmunerkrankung zu Entzündungen kommt.

Die Kontrollen bei der Durchflusszytometrischen-Analyse zeigen, dass beide nachgewiesenen B-Zell-Fraktionen positiv für den Chemokinrezeptor CXCR3 sind, da bei der Analyse der Leukozyten eine große Fraktion CXCR3-negativ ist, die mit der Lage der Isotypenkontrolle übereinstimmt. Darüber hinaus wandern im funktionellen Migrations-Test beide positiven Fraktionen.

Dies zeigt, dass die B-Zellen nicht nur den CXCR3 Chemokinrezeptor auf der Oberfläche exprimieren, sondern auch dass er funktionell ist. Der Anteil der B-Zellen, die CXCR3 „hoch“ exprimieren wird im Migrations-Test nicht aufgrund verstärkter Wanderung angereichert. In der vorliegenden Arbeit wurde nur ein Ligand (CXCL10) von den drei in der Literatur angegebenen Liganden (CXCL9, CXCL10, CXCL11) für den CXCR3 Chemokinrezeptor ausgetestet. Um auszuschließen, dass die beiden positiven Fraktionen sich nicht in ihrem Migrationsverhalten unterscheiden, müssten auch die beiden anderen Liganden getestet werden.

Die Anreicherung von Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen kann in dem gleichen funktionellen Test bei CXCR4-tragenden beobachtet werden.

In der Literatur wurde für unreife B-Zellen gezeigt, dass sie CXCR4 stark exprimieren, reife B-Zellen zwar noch positiv sind, aber nicht mehr so stark [159]. Andere Autoren zeigten eine hohe CXCR4-Expression auf reifen B-Zellen, aber eine Reduktion im Ansprechen auf das Chemokin [166, 167]. In der Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark und beim Einwandern in sekundäre lymphatische Gewebe spielt CXCR4 eine Rolle [25]. Auch für CXCR4 könnte eine Fraktion „hoch“ exprimierender B-Zellen vermutet werden, da die Angaben in der Literatur widersprüchlich sind und die Durchflusszytometrischen-Analysen dieser Arbeit diese Fraktion bei gesunden Kontrollen und RA-Patienten vermuten lassen. Um aber eine deutliche Aussage treffen zu können müssten weitere Patientenproben analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte ein hoher Anteil CXCR4-positiver Gesamt-B-Zellen bei den gesunden Kontrollen gezeigt werden. Diese Aussage stimmt mit denen in der Literatur überein. In der Subpopulation der Plasmazellen ist der Anteil reduziert. Dies gilt auch für die OA-Patienten. Eine Reduktion im Anteil CXCR4-positiver B-Zellen kann vor allem bei SLE-Patienten gezeigt werden. Der Anteil der Gesamt-B-Zellen, naiver und Gedächtnis B-Zellen ist signifikant reduziert bei den SLE-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Bei den RA-Patienten ist nur in der Subpopulation der naiven B-Zellen eine Reduktion im Anteil der positiven Zellen nachzuweisen. CXCR4 spielt wie CXCR5 eine Rolle beim *homing* der B-Zellen. Die Reduktion der B-Zellen, die CXCR4 auf der Oberfläche tragen, und die Daten aus dem Migrations-Test, der zeigt das wie erwartet nur die CXCR4-positiven Zellen wandern, lassen vermuten, dass die B-Zellen bei SLE-Patienten ein gestörtes Verhalten beim Einwandern in sekundär lymphatische Gewebe zeigen.

Der klassische B-Zell Chemokinrezeptor CXCR5, der das *homing* von B-Zellen in die sekundären lymphatische Organe und nicht-lymphoide Gewebe steuert, wird auf allen reifen zirkulierenden B-Zellen nachgewiesen [41, 164, 168]. Der Verlust des Rezeptors ist ausreichend für die Zerstörung der Organisation der Follikeln in der Milz und den Peyerschen Plaques [169]. Nakayama et al. zeigten, dass er bei B-Zellen, die mit Epstein-Barr Virus in Kontakt kommen, im Vergleich zu ruhenden B-Zellen im Blut herunter reguliert wird [156].

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Chemokinrezeptoren zeigt CXCR5 die deutlichste Deregulierung bei den Patienten. Der Anteil der CXCR5-positiven B-Zellen ist bei SLE- und RA-Patienten bei den Gesamt-B-Zellen, den Gedächtnis B-Zellen und den Plasmazellen signifikant reduziert. Die Heterogenität der RA-Patienten ist sehr auffallend (Anteil der CXCR5-positiven B-Zellen von 2,6 % bis 97,6 % der Gesamt-B-Zellen). Dies kann z. T. durch das sehr unterschiedliche Bild der RA erklärt werden. Die Patienten unterscheiden sich in den Autoantikörpern, Krankheitsdauer und Ansprechen auf die Therapie und in den klinischen Daten. Bei immunisierten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Expression von CXCR5 reduziert wird [160, 161]. Dies könnte bedeuten, dass auch bei den RA- und SLE-Patienten durch das chronisch aktivierte B-Zellsystem der Anteil der CXCR5-positiven B-Zellen reduziert wird.

Doppelfärbungen gegen die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR5 wurden an einer kleinen Gruppe von gesunden Kontrollen und RA-Patienten durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem die Gedächtnis B-Zellen positiv für CXCR5 und CXCR3 „hoch“ expremierend sind. Dies ist besonders interessant, da gerade diese Subpopulation im Synovialgewebe akkumuliert. Die Schwankungen, die auch schon bei den Einzelfärbungen auftraten, lassen aber keine weiteren Aussagen zu. Daher wurde überprüft ob die Reduktion des Anteils CXCR5-positiver B-Zellen mit dem Anstieg CXCR3 „hoch“ expremierender B-Zellen korreliert. Die Ergebnisse zeigen eine Korrelation der beiden Chemokinrezeptorexpressionen und lassen vermuten das es zu einem veränderten Wanderungsverhalten der B-Zellen unter diesen Bedingungen kommt.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Anteil der B-Zellen, die *homing*-Chemokinrezeptoren auf ihrer Oberfläche expremieren, bei RA-Patienten abnimmt. Dies gilt für CXCR4, aber vor allem für CXCR5. Eine statistisch signifikante Reduktion konnte für CXCR4 für naive B-Zellen gezeigt werden. CXCR5 ist vor allem bei den Effektorzellen bei RA-Patienten reduziert. Die Reduktion des Anteils CXCR5-positiver B-Zellen korreliert mit der Zunahme der CXCR3 „hoch“ expremierenden B-Zellen. B-Zellen, die doppelt positiv sind für die beiden Chemokinrezeptoren, liegen in der Subpopulation der Gedächtnis B-Zellen. Die auch die Subpopulation ist, die im Synovialgewebe akkumuliert. Der funktionelle Migrations-Test zeigte, dass die Reduktion des Anteils der CXCR4-positiven B-Zellen einen Einfluss hat, da die positiven Zellen vermehrt wandern, während die Zunahme des Anteils CXCR3 „hoch“ expremierender B-Zellen keinen Einfluss auf die Wanderung des getesteten Liganden hat, da beide Fraktionen wandern. Bei der Untersuchung von T-Zellen im Synovialgewebe wurde eine wichtige Rolle für CCR4, CCR5, CXCR3 und CX3CR1 bei der selektiven Wanderung in die entzündeten Gelenke vermutet [17]. Bei Monozyten/Makrophagen konnte im Blut von RA-Patienten eine andere Expression von Chemokinrezeptoren gezeigt werden als im Synovialgewebe oder -flüssigkeit. Die Autoren ziehen daraus den Schluss, dass einige Chemokine für die Rekrutierung der Monozyten aus der Zirkulation und andere für das Zurückhalten im Gewebe wichtig sind [122]. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen eine wichtige Rolle für CXCR3 und CXCR5 bei der Migra-

tion der B-Zellen in das Synovialgewebe vermuten. Die Daten lassen für das Zurückhalten im Gewebe ein Effekt von CXCR4 vermuten, aber das müsste an einer größeren Anzahl von Geweben bestätigt werden. Es kommt nicht nur bei der RA, sondern auch bei den beiden anderen Erkrankungen zu einer Verschiebung des Chemokin-Expressionsmusters. Bei den RA-Patienten sind CXCR3 und CXCR5 betroffen, bei SLE-Patienten CXCR4.

5.5 Einfluss der Therapie auf die B-Zellen

Bis heute steht keine kausale Therapie zur Behandlung der RA zur Verfügung. Bei der Behandlung wird eine Schmerztherapie durchgeführt und Entzündungsprozesse gehemmt. Die verwendeten Basistherapeutika wirken nicht unmittelbar schmerzlindernd und entzündungshemmend, deshalb müssen sie zumeist mit NSAR und/oder Glucocorticoiden kombiniert werden [79]. Bei vielen der Basistherapeutika (Azathioprin, Sulfasalazin, Gold, Cyclophosphamid) kann es zu Nebenwirkungen wie Anämie oder Leukopenie kommen [79]. In den letzten Jahren wurden in die Therapie der RA u. a. Antikörper, Rezeptorfusionsproteine oder Rezeptorantagonisten zur Blockade der Zytokine TNF- α und IL-1 eingeführt. Infliximab, ein chimärer Antikörper gegen TNF- α und der weiterentwickelte, rekombinat hergestellte humane Antikörper (D2E7), haben eine hohe Affinität zum TNF- α und verhindert die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle und damit die Einwanderung von Leukozyten ins entzündete Gelenk und normalisiert das C-reaktive Protein. Der klinische Erfolg belegt die wichtige Mediatorfunktion der Zytokine TNF- α und IL-1 in der Kaskade der zur Entzündung führenden Vorgänge. Aber nur etwa jeder zweite derart behandelte Patient kann mit erheblicher Besserung der Erkrankung und ein noch unbestimmter Anteil von Patienten mit einer Verzögerung oder einem Stillstand der Gelenkszerstörung rechnen [79]. Dies macht deutlich, dass die Hemmung einzelner proinflammatorischer Zytokine nicht das gesamte fehlregulierte synoviale Gewebe und damit die Gelenkszerstörung verlangsamt oder aufhält. Zum anderen zeigt es die erhebliche Heterogenität unter den RA-Patienten.

Es kann ein Einfluss der Therapie auf die naiven und Gedächtnis B-Zellen in dieser Arbeit gezeigt werden. Der Anteil der naiven B-Zellen ist bei Patienten, die eine Basistherapie und TNF-Blocker bekamen, reduziert im Vergleich zu den unbehandelten Patienten. In der Subpopulation der Gedächtnis B-Zellen, war der Anteil erhöht bei den Patienten, die eine Basistherapie und TNF-Blocker bekamen im Vergleich zu den unbehandelten Patienten. Die Patientengruppen zeigen keine statistisch relevanten Unterschiede im CRP-,BSG-Wert oder Alter. Diese überraschenden Ergebnisse können zum Teil mit der Auswahl der Patienten erklärt werden. Die RA-Patienten, die eine Kombinations-Therapie erhalten, haben an Studien teilgenommen. Voraussetzung für die Studien ist aber, dass normale Basistherapien keinen Erfolg zeigten. Es kann von einem schweren Verlauf der Erkrankung ausgegangen wurden, die sich durch die Therapie dann aber in Berei-

che begibt, die den anderen Gruppen entsprechen. Die Patienten liegen bei den CRP-, BSG-Werten und Leukozytenzahl höher, aber nicht statistisch signifikant. Bei der Analyse der Anteile Chemokin-tragender B-Zellen wurde eine Reduktion des Anteils CXCR4-positiver Plasmazellen gezeigt bei Patienten, die eine Basistherapie und TNF-Blocker bekamen im Vergleich zu unbehandelten Patienten. Der Anteil der Gesamt-B-Zellen, die positiv für CXCR5 waren, war im Vergleich der gleichen Gruppen reduziert. In der Literatur ist beschrieben, dass anti-TNF- α und anti-IL-1 Behandlungen zu einer Reduktion der Chemokinsynthese führen [20]. Infliximab reduziert die Expression von CXCL8 und CCL2 im Synovium von RA-Patienten. Es kommt zu einer reduzierten Anzahl von entzündlichen Zellen im Synovium [170]. Durch die Gabe von anti-TNF- α -Antikörpern kann die Produktion von Chemokinen im Synovialgewebe reduziert werden und CD4-, CD22- und CD68-positive Zellen wandern nicht mehr in das Gewebe [170].

Studien haben gezeigt, dass Antikörper gegen Chemokine oder ihre Rezeptoren in Zukunft zu einem direktem Ziel der Therapie werden könnten [20]. Die unterschiedlichen Expressionsmuster der Chemokine auf peripheren B-Zellen bei den Patientengruppen würden gezielt Chemokine oder Chemokinrezeptoren als Therapie-Ansatz möglich erscheinen lassen.

5.6 Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Akkumulation von B-Zellen im Synovialgewebe von RA-Patienten zu analysieren. Dazu wurde die Verteilung der B-Zellen im Synovialgewebe der RA-Patienten mittels immunhistochemischer Methoden untersucht. Es konnten in allen Geweben B-Zellen und Plasmazellen nachgewiesen werden, aber keine ektopen Keimzentren, die eine lokale Entwicklung der B-Zellen zu Plasmazellen im Gewebe ermöglichen. Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass die B-Zellen, die im Synovialgewebe akkumulieren, zu der Subpopulation der Gedächtnis B-Zellen gehören. Da die B-Zellen, nicht lokal im Gewebe differenzieren können, müssen sie aus der Peripherie nach einer Keimzentrumsreaktion eingewandert sein. Im Synovialgewebe konnten Chemokine angefärbt werden. Chemokine regulieren die Wanderung von Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen. Um die mögliche Einwanderung der B-Zellen aus der Peripherie in das Synovialgewebe auf Grund von Chemokin-vermittelter Chemotaxis näher zu analysieren, wurden die Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren auf B-Zellen im peripheren Blut untersucht.

Die Daten dieser Arbeit lassen eine wichtige Rolle der Gedächtnis B-Zellen in der Pathogenese der RA vermuten. Frühere Untersuchungen in der Arbeitsgruppe zeigten, dass naive und Gedächtnis B-Zellen in Synovialgewebe einwandern, die ektopen Keimzentren aufweisen und dann dort zu Plasmazellen ausdifferenzieren [146].

In weiteren Analysen wird zu klären sein, wie sich die B-Zellen, die Chemokinrezeptoren tragen, in ihrem Verhalten von denen, die keine tragen unterscheiden. Die B-Zellen im peripheren Blut können aktiviert aus den Lymphorganen kommen. Durchflusszytometrisch kann der Anteil der aktivierten B-Zellen über Oberflächenmarker wie CD69 und CD86 untersucht werden. Nach der Aktivierung von B-Zellen regulieren sie ihren BCR hoch, dies kann über eine Färbung gegen CD79a gezeigt werden. Um eine Aussage über die Korrelation der Chemokine mit den infiltrierenden Zellen im Synovialgewebe treffen zu können, sollten Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von den Geweben durchgeführt werden. Weitere Untersuchungen an sortierten B-Zellen aus den CXCR3 positiven Fraktionen, können zeigen, ob sich die beiden positiven Fraktionen, in Hinblick auf verwendete Isotypen der H-Ketten der Antikörper unterscheiden. Im Migrations-Test sollten die anderen Liganden für CXCR3 getestet werden, ob sie selektiv die Wanderung und den Anteil der CXCR3 „hoch“ exprimierenden B-Zellen beeinflussen. Für T-Zellen konnten Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin und P-Selektin-Ligand für die Gewebe-spezifische Wanderung von Zellen identifiziert werden [171]. Eine Untersuchung dieser Moleküle auf B-Zellen könnte zum Verständniss der Prozesse der Migration beitragen.