

## 6 Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis ist eine Autoimmunerkrankung mit unbekannter Ursache. Sie ist klinisch durch eine chronische Entzündung der Synovialmembran und Pannus-Bildung gekennzeichnet. Dies führt zu geschwollenen Gelenken und Gelenkszerstörungen. Zellen des Immunsystems wie T- und B-Zellen, Makrophagen, Mastzellen und Endothel-Zellen wandern in die Synovialmembran. In einigen Patienten entwickeln sich organisierte lymphoide Strukturen, die die Idee einer lokalen Keimzentrumsreaktion unterstützen. Die Isolierung von B-Zellen direkt aus Gefrierschnitten und die Analyse ihres V-Gen-Repertoires lassen vermuten, dass in den ektopen Keimzentren B-Zellen zu Plasmazellen ausdifferenzieren. Nur ein geringer Anteil an RA-Synovialgewebe entwickelt ektote Keimzentren. Es sind aber Plasmazellen nachzuweisen. Daraus ergibt sich die Frage, wie diese Zellen im Synovialgewebe akkumulieren.

Die Wanderung der Lymphozyten vom peripherem Blut ins Synovialgewebe ist ein mehrstufiger Prozess, an dem Adhäsionsmoleküle, wie Selektine und Integrine, und verschiedene chemotaktile Moleküle beteiligt sind. Das Ziel dieser Arbeit ist die Wanderung der B-Zellen in das chronisch entzündete Synovialgewebe zu verstehen. Chemokine und ihre Rezeptoren sind wichtig für die Steuerung der Lymphozyten-Wanderung. Die Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren auf peripheren Blut-Zellen wurden untersucht. Zusätzlich wurden Gefrierschnitte der Synovialmembran auf das Vorhandensein von Chemokinen getestet.

Mononukleare periphere Blut-Zellen von Patienten mit RA, OA und SLE, sowie gesunde Kontrollen, wurden mit B-Zell-spezifischen Antikörpern gefärbt. Die Kombination von Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD19, CD20 und CD27 machten die Unterscheidung der drei B-Zell-Subpopulationen (naive, Gedächtnis B-Zellen und Plasmazellen) möglich. Die verschiedenen B-Zell-Subpopulationen werden auf ihre Chemokinrezeptor-Expression untersucht. Periphere Blut-B-Zellen von RA-Patienten unterscheiden sich in der Expression der Chemokinrezeptoren von gesunden Kontrollen. CXCR5 ist der typische Chemokinrezeptor für B-Zellen, verantwortlich für die Wanderung in die sekundären lymphatischen Organe. Wie erwartet exprimieren nahezu alle naiven und Gedächtnis B-Zellen der gesunden Kontrollen diesen Rezeptor. Bei vielen RA-Patienten war der Anteil der CXCR5-positiven B-Zellen reduziert, dies sowohl bei naiven als auch bei Gedächtnis B-Zellen. Für die Lenkung von Lymphozyten in entzündete Gewebe ist der Chemokinrezeptor CXCR3 beschrieben worden. Die Expression von CXCR3 auf peripheren

Blut-Zellen wurde analysiert. In dieser Arbeit konnten zwei CXCR3-positive B-Zell-Fraktionen gezeigt werden. Obwohl der Anteil der CXCR3-positiven B-Zellen, gleich bleibt, nimmt der Anteil der CXCR3 „hoch“ exprimierenden B-Zellen signifikant bei RA-Patienten zu. Die Reduktion des Anteils CXCR5-positiver B-Zellen korreliert mit der Zunahme CXCR3 „hoch“ exprimierender B-Zellen bei RA-Patienten.

Die Analyse der Anteile Chemokinrezeptor-tragenden B-Zellen, zeigte deutliche Unterschiede zwischen RA-Patienten und gesunden Kontrollen, in Hinblick auf drei der sieben untersuchten Chemokinrezeptoren. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass bei RA-Patienten die Expression der Chemokinrezeptoren gestört ist. Dies führt zur Annahme, dass die Chemokinrezeptor Expression auf B-Zellen, durch die chronische Entzündung verändert wird. Dadurch könnte die Wanderung der B-Zellen, besonders die der Gedächtnis B-Zellen, ins das Synovialgewebe beeinflusst werden.

## 7 Summary

Rheumatoid Arthritis is a complex autoimmune disease of unknown cause. It is clinically marked by a chronic inflammation of the synovial membrane and pannus formation, which leads to swollen joints and at last to joint destruction. Inflammatory cells like T and B cells, macrophages, mast cells and endothelial cells infiltrate the synovial membrane. In some patients organized lymphoid structures are developed which supports the idea of a possible local germinal center reaction. Dissection of B cells directly from frozen tissue sections and analysis of their V-gene repertoire suggested that in ectopic germinal centers, B cells differentiate into plasma cells. However, although only a few RA synovial tissues develop ectopic germinal centers, multiple plasma cells are still seen. The question arises, how these cells accumulate in the synovial tissue.

Migration of lymphocytes from the blood to the synovial tissue is a multistep process in which interactions of adhesion molecules, as selectins and integrins, with their ligands and a large variety of chemoattractant molecules are involved. The aim of the thesis is to understand B cell migration into the chronically inflamed synovial tissue. As chemokines and their receptors are important in the control of lymphocyte trafficking, the expression patterns of chemokine receptors on peripheral blood B cells were analyzed. In addition, synovial tissue sections were tested for the presence of chemokines.

Peripheral blood mononuclear cells from RA, OA, SLE patients and normal controls were stained with antibodies specific for B cells. The combination of antibodies against surface markers like CD19, CD20 and CD27 gave the possibility to distinguish between the three B cell subpopulations, such as naïve, memory and plasma cells. The diverse B cell subpopulations were analyzed for their expression of chemokine receptors. Peripheral blood B cells from RA patients differ in their expression of chemokine receptors from those of healthy controls. CXCR5 is the main chemokine receptor responsible for the migration of B cells into secondary lymphoid organs. As expected, in healthy individuals this receptor is expressed on practically all naïve and memory B cells. However, in many RA patients, CXCR5 was down regulated on both peripheral blood naïve and memory B cells. The chemokine receptor CXCR3 has been described as a receptor directing lymphocytes into inflamed tissue. The expression of CXCR3 on peripheral blood B cell subsets was analyzed. In this thesis two fractions of CXCR3 positive B cells were shown. Although the total number of CXCR3 positive B cells was the same as in controls, the fraction of CXCR3 high

expressing B cells was significantly increased in RA patients. In comparison to healthy individuals, naïve and memory B cells from RA patients showed an elevated expression of CXCR3 high. The increased expression is correlated with the decreased expression of CXCR5 in RA patients.

The analysis of seven chemokine receptors already showed differences for three receptors between the RA patients and healthy controls. The results suggested that in RA patients the expression of chemokine receptors is deregulated. These findings may lead to the assumption that the expression of chemokine receptors on B cells is changed under chronic inflammation. It may influence the migration of B cells, especially of memory B cells into the synovial tissue.