

## 4. Ergebnisse

Die vorliegende Habilitationsschrift beschreibt immunophänotypische, molekular-genetische und funktionelle Untersuchungen der B-Lymphozyten von Patienten mit primärem SS im Vergleich zu denen gesunder Kontrollpersonen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden in Fachzeitschriften mit *peer-review*-Verfahren publiziert. Den einzelnen Publikationen bzw. Teilanalysen wurde jeweils eine kurze inhaltliche Zusammenfassung vorangestellt, die deren Ergebnisse sowie ihren Stellenwert im Rahmen des Gesamtprojektes wiedergibt.

### 4.1 Verminderung der CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> B-Zell-Subpopulation im peripheren Blut von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom. Publikation: Hansen A, Odendahl M, Reiter K, Jacobi AM, Feist E, Scholze J, Burmester GR, Lipsky PE, Dörner T. *Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2002; 46: 2160-71.*

Zusammenfassung: Ziel der Arbeit war zunächst eine immunophänotypische Analyse der B-Zell-Subpopulationen des peripheren Blutes von Patienten mit primärem SS und gesunden Kontrollpersonen, die weitere Rückschlüsse auf die B-zellulären Störungen der Erkrankung erlauben sollte. Unter Berücksichtigung der Befunde unserer Arbeitsgruppe zur differentiellen CD27-Expression von Patienten mit SLE [Odendahl et al. 2000] sowie aktueller Literaturdaten, die erste Hinweise auf eine Verminderung der Gedächtnis-B-Zellpopulation im Blut von Patienten mit SS gegenüber gesunden Normalpersonen beschrieben hatten [Bohnhorst et al. 2001], fokussierten vorliegende Untersuchungen insbesondere auf eine detailliertere Analyse der CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> naiven B-Zellen und der CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen.

B-Zellen aus dem peripheren Blut von Sjögren-Patienten und Kontrollpersonen wurden mittels 4-Farb-Durchflußzytometrie hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression von CD19, CD27, CD5 sowie der Immunglobulinisotypen IgM, IgD, IgG und IgA analysiert. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Bohnhorst et al. [2001, 2002], fanden sich bei Patienten mit SS, im Vergleich zu den gesunden Kontrollen, normale Zahlen der CD19<sup>+</sup> Gesamt-B-Zellen bei signifikant erniedrigtem Anteil der CD27<sup>+</sup> B-Zellen und signifikant erhöhtem Anteil der CD27<sup>-</sup> B-Zellen. Weiter konnte gezeigt werden, daß die Erniedrigung der

CD27<sup>+</sup> B-Zell-Fraktion der Patienten überwiegend durch eine Verminderung von IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> Zellen bedingt war, während die Zunahme der CD27<sup>-</sup> B-Zellen mit einer Erhöhung des Anteils der CD5<sup>-</sup> B-Zellen einher ging. Es fanden sich keine Unterschiede in der Verteilung IgM-, IgG- oder IgA-positiver CD27<sup>-</sup> naiver B-Zellen bzw. IgG- oder IgA-positiver CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen zwischen Sjögren-Patienten und Normalpersonen.

Erste Untersuchungen von Patienten mit SS und sekundärem non-Hodgkin-Lymphom (NHL) zeigten eine markante Vermehrung der CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zell-Fraktion des peripheren Blutes gegenüber gesunden Kontrollen und, ausgeprägter, gegenüber Sjögren-Patienten ohne Lymphom. Da für nahezu alle SS-assoziierten B-Zell-Lymphome, unabhängig von ihrem Differenzierungsstadium, eine CD27-Expression nachgewiesen werden konnte [van Oers et al. 1993, Dong et al. 2002], erscheint prospektiv interessant, ob einer Verlaufskontrolle peripherer CD27<sup>+</sup> B-Zellen bei Patienten mit SS und erhöhtem Lymphomrisiko [Ioannidis et al. 2002] eine diagnostische Bedeutung zukommen könnte [Hansen et al. 2002, 2005b].

Die Ursache der markanten Verminderung der peripheren CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen bei SS (ohne Lymphom) ist bislang unklar. Neben einer gestörten Bildung, Differenzierung oder einem Abwerfen (*shedding*) des CD27-Oberflächenmoleküls, könnte dieser Befund auch eine Abwanderung dieser Zellen in das entzündete Gewebe reflektieren. Eine Unterstützung letzterer Hypothese fand sich durch die ergänzende immunhistologische Untersuchung der lymphoepithelialen Sialadenitis (LESA) der *Glandula parotis* einer Patientin mit SS, die, bei typischer Verminderung der peripheren CD27-Population, eine deutliche Vermehrung von CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zellen sowie von CD27<sup>hoch</sup>-positiven Plasmazellen im Gewebeinfiltrat zeigte. Übereinstimmend mit dem immunhistologischen Bild ergab die Untersuchung der variablen Abschnitte der IgV<sub>H</sub>-Rearrangements individueller CD19<sup>+</sup> B-Zellen des Blutes und der LESA eine Akkumulation von B-Zellen mit mutierten IgV<sub>H</sub>-Rearrangements im Gewebeinfiltrat. Eine ergänzende genomische Analyse der IgV<sub>H</sub>-Rearrangements individueller CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> und CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zellen zweier weiterer Patienten mit SS zeigte, daß die Oberflächenexpression von CD27, vergleichbar mit den Befunden gesunder Normalpersonen [Agematsu et al. 1997, Klein et al. 1998], auch im Rahmen des SS, Gedächtnis-B-Zellen charakterisiert. Zusätzlich konnte allerdings bei Patienten mit SS eine Subpopulation CD27-negativer, „Gedächtnis-B-Zell-ähnlicher“ Zellen mit mutierten IgV<sub>H</sub> Rearrangements identifiziert werden, die Ausdruck einer gestörten Reifung bzw. Differenzierung sein könnte.

**Publikation:**

Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. Hansen A, Odendahl M, Reiter K, Jacobi AM, Feist E, Scholze J, Burmester GR, Lipsky PE, Dörner T.  
Arthritis Rheum 2002; 46: 2160-71.

**auf den Seiten 43 – 54  
der Original-Druckversion**

**4.2 Akkumulation von polyklonalen Gedächtnis-B-Zellen im Parotisinfiltrat einer Patientin mit primärem Sjögren-Syndrom.** *Publikation: Hansen A, Jacobi A, Pruss A, Kaufman O, Scholze J, Lipsky PE, Dörner T. Comparison of immunoglobulin heavy chain rearrangements between peripheral and glandular B cells in a patient with primary Sjögren's syndrome. Scand J Immunol 2003; 57: 470-9.*

Zusammenfassung: Die lymphoepitheliale Sialadenitis (LESA, früher: myoepitheliale Sialadenitis [MESA]) der großen Speicheldrüsen stellt eine charakteristische Manifestation des primären SS dar. Nachdem immunhistologische und molekulargenetische Untersuchungen erste Hinweise auf eine Akkumulation von Gedächtnis-B-Zellen in den glandulären Infiltraten von Patienten mit SS ergeben hatten (Abschnitt 4.1), sollte eine weiterführende vergleichende Analyse der genomischen IgV<sub>H</sub>-Rearrangements individueller CD19<sup>+</sup> B-Zellen aus dem peripheren Blut und der LESA einer Patientin mit SS weitere Aufschlüsse über die Beziehung dieser beiden B-Zell-Kompartimente geben. Hierfür wurden aus einzeln-sortierten B-Zellen nichtproduktive und produktive genomische Ig-Schwerketten-Rearrangements amplifiziert, sequenziert und bezüglich ihrer Nutzung der IgV<sub>H</sub>-Genfamilien, individuellen IgV<sub>H</sub>- und J<sub>H</sub>-Gensegmente, der Länge der <sub>H</sub>CDR3 Region sowie des Mutationsverhaltens analysiert.

Diese Untersuchung identifizierte, neben kleineren klonalen B-Zell-Expansionen, ein überwiegend polyklonales B-zelluläres Drüseninfiltrat, welches in IgV<sub>H</sub>-Gennutzung und Mutationsmuster der rekombinierten IgV<sub>H</sub>-Gene weitestgehend den korrespondierenden B-Zellen des peripheren Blutes entsprach. Dabei zeigten die B-Zellen des Drüseninfiltrates gegenüber denen des Blutes folgende signifikante Unterschiede: 1.) einen erhöhten Anteil von Zellen mit mutierten IgV<sub>H</sub> Rearrangements, 2.) stark erhöhte Mutationsfrequenzen der rekombinierten IgV<sub>H</sub>-Gensegmente, 3.) kürzere Schwerketten-CDR3-Abschnitte und 4.) eine seltenere Nutzung von J<sub>H6</sub>-Gensegmenten in den produktiven Schwerketten-Rearrangements.

Insgesamt stärkten diese Daten somit die Hypothese einer polyklonalen B-zellulären Infiltration, bevorzugt der von Gedächtnis-B-Zellen, in das betroffene Drüsengewebe. Diese könnte, neben einer lokalen Genese in ektopen Keimzentren [Stott et al. 1999], wesentlich zur Akkumulation von Gedächtnis-B-Zellen im entzündeten Gewebe von Sjögren-Patienten beitragen. Weiterhin konnten klonal verwandte B-Zellen in Blut und LESA der Patientin identifiziert werden, die auf eine Beziehung dieser beiden B-Zell-Kompartimente hinwies.

**Publikation:**

Comparison of immunoglobulin heavy chain rearrangements between peripheral and glandular B cells in a patient with primary Sjögren's syndrome. Hansen A, Jacobi A, Pruss A, Kaufman O, Scholze J, Lipsky PE, Dörner T.  
Scand J Immunol 2003; 57: 470-9.

**auf den Seiten 56 – 65  
der Original-Druckversion**

### 4.3 Analyse postrekombinatorischer Ereignisse auf IgV<sub>H</sub> mRNA-Ebene

- 4.3.1 Erprobung einer Einzelzell-RT-PCR zur Analyse spezifischer mRNA-Transkripte individueller humaner B-Zellen.** *1. Publikation:* Ruzickova S, Pruss A, Odendahl M, Wolbart K, Burmester GR, Scholze J, Dörner T, Hansen A. *Chronic lymphocytic leukemia preceded by cold agglutinin disease: intracлонаl immunoglobulin-light chain diversity in VH4-34 expressing single leukemic B cells. Blood 2002; 100: 3419-22.*  
*2. Publikation:* Hansen A, Reiter K, Dörner T, Pruss A. *Cryopreserved human B cells as an alternative source for single cell mRNA analysis. Cell Tissue Bank 2005, in press.*

Zusammenfassung: In Modifikation einer durch Wang und Stollar beschriebenen Methode [1999, 2000] wurde in unserer Arbeitsgruppe eine RT-PCR etabliert, die die Analyse mehrerer spezifischer mRNA-Transkripte aus individuellen humanen B-Zellen erlaubt. In einer ersten Untersuchung erfolgte mit Hilfe dieser Technik die Analyse peripherer B-Zellen eines Patienten mit Kälteagglutinin-Erkrankung - einer chronisch-proliferativen B-Zell-Erkrankung, der im weiteren Krankheitsverlauf eine chronische B-Zell-Leukämie (B-CLL) entwickelt hatte. Die detaillierte Analyse der Transkripte der IgV<sub>H</sub> - IgV<sub>L</sub> Paarungen individueller B-Zellen zum Zeitpunkt der prä-leukämischen Autoimmunerkrankung und zum Zeitpunkt der manifesten B-CLL wiesen auf den Ursprung des malignen Zellklons in der Population autoreaktiver B-Zellen der Kälteagglutinerkrankung hin. Dies konnte durch die Analyse eines weiteren spezifischen Transkriptes, der mRNA für das bcl-2/J<sub>H</sub> Fusionsprotein, in individuellen, klonal verwandten B-Zellen beider Untersuchungszeitpunkte erhärtet werden. Interessanterweise zeigten die IgV<sub>L</sub> und IgV<sub>H</sub> Rearrangements zum Zeitpunkt der B-CLL ein differentielles Mutationsverhalten, d.h. die der Leichtketten zeigten fortschreitende Mutationen, nicht aber die der Schwereketten. Als Ursache dieses Befundes wurden eine unterschiedliche Zugänglichkeit der beiden Genloci für die Mutationsmaschinerie bzw. eine Selektion über die für die Autoantigenbindung essentielle Ig-Schwerkette diskutiert. Insgesamt konnte gezeigt werden, daß die Einzelzell-RT-PCR eine Bereicherung in der Analyse lymphoproliferativer Erkrankungen darstellt.

Da hämatoonkologische Verlaufsuntersuchungen häufig auch retrospektive Analysen erforderlich machen, erfolgte weiter eine Untersuchung zur Anwendbarkeit der Einzelzell-RT-PCR an Langzeit-kryokonservierten humanen B-Zellen, die auch für diese Fragestellung eine Praktikabilität der Methode unter Beachtung bestimmter Voraussetzungen bestätigte.

**Publikation:**

Chronic lymphocytic leukemia preceded by cold agglutinin disease: intraclonal immunoglobulin-light chain diversity in VH4-34 expressing single leukemic B cells. Ruzickova S, Pruss A, Odendahl M, Wolbart K, Burmester GR, Scholze J, Dörner T, Hansen A.  
Blood 2002; 100: 3419-22.

**auf den Seiten 67 – 70  
der Original-Druckversion**

**Publikation:**

Cryopreserved human B cells as an alternative source for single cell mRNA analysis.

Hansen A, Reiter K, Dörner T, Pruss A.

Cell Tissue Bank 2005; 6: 299-308.

**auf den Seiten 71 – 80  
der Original-Druckversion**

**4.3.2 Analyse der IgV<sub>H</sub>-mRNA-Transkripte individueller CD27<sup>-</sup> naiver und CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom. *Publikation:* Hansen A, Gosemann M, Pruss A, Reiter K, Ruzickova S, Lipsky PE, Dörner T. *Abnormalities in peripheral B cell memory of patients with primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2004; 50: 1897-1908.***

Zusammenfassung: Mit Hilfe der Einzelzell-RT-PCR wurden IgV<sub>H</sub>-mRNA-Transkripte der Isotypen IgM, IgG und IgA aus individuellen CD27<sup>-</sup> und CD27<sup>+</sup> B-Zellen von Patienten mit SS und gesunden Kontrollpersonen amplifiziert, nachfolgend sequenziert und analysiert. Im Vergleich zu den Kontrollpersonen ließen sich bei Patienten mit SS, als möglicher Ausdruck einer gesteigerten B-zellulären Aktivität, in einem signifikant höherem Anteil der Zellen produktive IgV<sub>H</sub>-mRNA-Transkripte der drei getesteten Ig-Isotypen nachweisen. Hingegen fanden sich, als interne Kontrolle, in beiden Gruppen vergleichbare Frequenzen von Zellen mit detektierbaren GAPDH-spezifischen mRNA-Transkripten.

Markante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bestanden im Mutationsverhalten der IgV<sub>H</sub>-Transkripte. Während sich in der CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zell-Fraktion der Kontrollen isotypabhängige Mutationsfrequenzen der mRNA-Transkripte ( $c_{\mu} < c_{\gamma} < c_{\alpha}$ ) zeigten, fand sich bei Patienten mit SS, bei insgesamt signifikant höheren Mutationsfrequenzen, diese Ordnung aufgehoben. Insbesondere waren die  $c_{\mu}$ -Transkripte der Gedächtnis-B-Zellen der Patienten mit SS im Vergleich zu denen der Kontrollpersonen signifikant stärker mutiert. Im Kontext der Daten der immunphänotypischen Analysen (Abschnitt 4.1) bestand damit für Patienten mit SS, im Gegensatz zu gesunden Kontrollpersonen, das Bild einer verminderten zirkulierenden CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zell-Population, die jedoch sowohl Zeichen einer transkriptionellen Überaktivität als auch eines verstärkten Mutationsprozesses aufwies.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterhin erstmalig individuelle periphere (*ex-vivo*) B-Zellen beschrieben, die gleichzeitig Transkripte mehrerer IgH-Isotypen enthielten. Patienten mit SS wiesen signifikant mehr dieser „mehrfach-positiven“ B-Zellen auf. Und ausschließlich bei ihnen, insbesondere in ihrer CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zell-Fraktion, fanden sich Zellen mit Transkripten aller drei der untersuchten Isotypen. Weiterführende Untersuchungen wiesen darauf hin, daß dieser Befund vermutlich überwiegend durch mRNA-Transkripte bedingt ist, die nach vollzogenem Isotypenwechsel (*class-switch*) noch in den Zellen nachweisbar sind,

aber nicht als Oberflächenprotein exprimiert werden. Ursächlich könnte, neben oben genannter transkriptioneller Überaktivität bzw. einer intrazellulären Abbaustörung der *pre-switch* mRNA, auch eine vorzeitige Rezirkulation dieser B-Zellen nach einer Keimzentrumsreaktion diskutiert werden. Ob diesbezüglich eine inkomplette Reifung in den ektopen Keimzentren-ähnlichen Formationen des infiltrierten (Drüsen)Gewebes bei SS eine Rolle spielen könnte, läßt sich nur vermuten. In diesem Zusammenhang erscheint auch der erneute Nachweis der CD27-negativen „Gedächtnis-B-Zell-ähnlichen“ Subpopulation mit mutierten IgV<sub>H</sub>-Rearrangements (Abschnitt 4.1) interessant, die im Rahmen dieses Teils der Untersuchungen nunmehr auch auf mRNA-Ebene identifiziert werden konnte.

Vor dem Hintergrund aktueller Literatur wurden die bisherigen Daten der vorliegenden Arbeit 1.) als Beleg einer B-zellulären Überaktivität mit erhöhter transkriptioneller Aktivität und gesteigertem Hypermutationsmechanismus im Bereich des IgH-Genlocus sowie 2.) als Hinweis auf eine gestörte B-Zell-Homöostase bei SS gewertet. Bezüglich letzterer Hypothese wies die Datenlage dabei insbesondere auf folgende Veränderungen im Rahmen der Erkrankung hin, die eine präferentielle Abwanderung von B-zellulären Subpopulationen in das Gewebeinfiltrat sowie eine zelluläre Rezirkulation aus diesem vermuten ließen:

- Dominanz CD27<sup>-</sup> naiver und Reduktion CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen, insbesondere ihrer CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> Subpopulation, im Blut [Bohnhorst et al. 2002](Abschnitt 4.1);
- (polyklonale) Akkumulation von CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen / von CD5<sup>+</sup> B-Zellen im Gewebeinfiltrat (Abschnitte 4.1, 4.2)[Gellrich et al. 1999; Zeher et al 1999];
- Überexpression des „B-Zell-Chemokines“ CXCL13 im Drüseninfiltrat mit konsekutiver Ansammlung von CXCR5<sup>+</sup> B-Zellen [Amft et al. 2001; Salomonsson et al. 2002, 2003];
- periphere Zirkulation von B-Zellen mit Hinweisen auf mögliche Reifungsstörungen, insbesondere von „Gedächtnis-B-Zell-ähnlichen“ Zellen und Zellen mit intrazellulärer Retention von „pre-switch“ IgV<sub>H</sub>-mRNA (Abschnitte 4.1. bis 4.3).
- klonale Beziehung von B-Zellen des Blutes und des Drüseninfiltrates (Abschnitt 4.2)

Nachfolgende Untersuchungen bezüglich des Expressionsmusters B-zellulärer Chemokinrezeptoren (Abschnitt 4.4) sollten daher zeigen, ob sich der Verdacht auf Störungen der B-Zell-Homöostase im Rahmen des primären SS weiter erhärten ließ.

**Publikation:**

Abnormalities in peripheral B cell memory of patients with primary Sjögren´s syndrome.

Hansen A, Gosemann M, Pruss A, Reiter K, Ruzickova S, Lipsky PE, Dörner T.

Arthritis Rheum 2004; 50: 1897-1908.

**auf den Seiten 83 – 94  
der Original-Druckversion**

**4.4 Störungen der B-zellulären Chemokinrezeptor-Expression und -Funktion bei Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom.** *Publikation: Hansen A, Reiter K, Ziprian T, Jacobi AM, Hoffmann A, Gosemann M, Scholze J, Lipsky PE, Dörner T. Dysregulation of chemokine receptor expression and function by B cells of patients with primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2005; 52: 2109-19.*

Zusammenfassung: Die bereits in Abschnitt 4.1 sowie durch Bohnhorst und Mitarbeiter [2001, 2002] beschriebene Dominanz  $CD19^+CD27^-$  und Verminderung  $CD19^+CD27^+$  B-Zellen im Blut von Patienten mit SS gegenüber dem gesunder Kontrollpersonen bestätigten sich ebenfalls innerhalb der hier vorgestellten Untersuchungen. Daher erfolgte die weiterführende Analyse der Chemokinrezeptorexpression getrennt für beide Subpopulationen. Insbesondere wurde bei diesen Untersuchungen von der Vorstellung ausgegangen, daß sich im Expressionsmuster bestimmter für die B-zelluläre Migration bzw. für das B-zelluläre *Homing*-Verhalten wichtiger Chemokinrezeptoren (CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR6, CCR7, CCR9) auf peripheren B-Zellen, indirekt Störungen der B-Zell-Homöostase widerspiegeln könnten.

Die diesbezüglich durchgeführten durchflußzytometrischen Untersuchungen zeigten eine differentielle Oberflächen-Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 and CXCR5, nicht aber der Chemokinrezeptoren CXCR3, CCR6, CCR7 und CCR9, auf peripheren B-Zellen von Patienten mit SS und denen gesunder Kontrollpersonen. So war, zum einen, CXCR4, der Rezeptor des *Homing*-Chemokins CXCL12, auf den B-Zellen der Sjögren-Patienten signifikant stärker exprimiert, insbesondere in der  $CD19^+CD27^-$  Subpopulation. Übereinstimmend mit diesem immunophänotypischen Bild ergab die Untersuchung CXCR4-spezifischer mRNA-Transkripte mittels Einzelzell-RT-PCR eine signifikant höhere Frequenz individueller „CXCR4-mRNA-positiver“ B-Zellen der Patienten mit SS im Vergleich zu den Kontrollen. Wiederum war dieser Unterschied in der  $CD19^+CD27^-$  B-Zell-Population besonders deutlich ausgeprägt. Zum anderen, fand sich in der durchflußzytometrischen Analyse eine signifikant verminderte Expression des Chemokinrezeptors CXCR5, des Rezeptors für das Chemokin CXCL13, auf den  $CD19^+CD27^+$  Gedächtnis-B-Zellen der Patienten.

Um die funktionelle Relevanz dieser differentiellen Chemokinrezeptorexpression auf das B-zelluläre Migrationsverhalten zu prüfen, wurden angereicherte  $CD19^+$  Blut-B-Zellen von Patienten und Normalpersonen in *in-vitro* Transmigrationsassays mit den jeweiligen Liganden

der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR5, CXCL12 und CXCL13, untersucht. Sowohl für die peripheren B-Zellen der Patienten mit SS als auch für die der Kontrollpersonen zeigte sich hierbei eine signifikant stärkere intrinsische migratorische Kapazität der CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen im Vergleich zur korrespondierenden Population CD27<sup>-</sup> naiver B-Zellen – d.h., die CD27<sup>+</sup> Fraktion wanderte vermehrt, obwohl sie eine vergleichsweise geringere Oberflächenexpression der betreffenden Chemokinrezeptoren, CXCR4 und CXCR5, aufwies. Unabhängig hiervon konnten zwischen Patienten mit SS und den Kontrollpersonen keine Unterschiede im Migrationsverhalten unstimulierter B-Zellen festgestellt werden. Es fand sich aber sowohl eine signifikant verminderte migratorische Kapazität aktivierter peripherer CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen der Patienten mit SS auf CXCL12 als auch auf CXCL13.

Somit konnte zunächst zusammenfassend festgehalten werden, daß die peripheren B-Zellen von Patienten mit SS, zum einen, eine Überexpression von CXCR4 zeigten, die sich nicht entsprechend in einer erhöhten migratorischen Kapazität gegen den Liganden, CXCL12, niederschlug, zum anderen, eine verminderte CXCR5-Expression der CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zell-Fraktion aufwiesen, die mit einer reduzierten migratorischen Reserve dieser Zellen für den entsprechenden Liganden, CXCL13, sowie für ein weiteres Chemokin, CXCL12, einherging.

Als mögliche Ursache der Diskrepanz zwischen CXCR4-Expression und migratorischer Kapazität wurde eine inhibitorische intrazelluläre Regulation des CXCR4-vermittelten Signals diskutiert. Hiermit übereinstimmend fand sich in den CD27<sup>-</sup> B-Zellen der Patienten eine verstärkte mRNA-Expression eines potentiellen Kandidaten einer solchen intrazellulären Inhibition: für das Regulatorprotein einer G-Protein-gekoppelten Signalgebung, RGS13 [Shi et al. 2002]. Die Überexpression von CXCR4, insbesondere der CD27<sup>-</sup> B-Zellen konnte damit eher als Ausdruck einer B-zellulären Überaktivierung im Rahmen des SS denn als Ausdruck eines veränderten Migrationsverhaltens gewertet werden.

Weitere Analysen bezogen die B-Zellen der Drüseninfiltrate der Patienten mit SS mit in die Untersuchungen ein. Insbesondere aufgrund der oben genannten Befundkonstellation zur Chemokinrezeptorexpression und migratorischen Kapazität der CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen der Sjögren-Patienten, erfolgte eine erste Analyse CXCR4/CXCR5-doppelt-positiver B-Zellen. So konnte gezeigt werden, daß es auch in den lymphozytären Infiltraten der Lippenhäutchen der Patienten zu einer Akkumulation von CD27<sup>+</sup> B-Zellen kommt, die in ihrer großen Mehrheit CXCR4 und CXCR5 koexprimieren. Im Gegensatz dazu fand sich im peripheren Blut dieser

Patienten der Anteil der CXCR4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen gegenüber gesunden Kontrollpersonen deutlich vermindert, nicht aber der der CXCR4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> naiven B-Zellen. Dies könnte ein weiterer Beleg einer präferentiellen Akkumulation von CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen in die Gewebeeinfiltrate sein, die aufgrund der in diesen entzündlichen Infiltraten überexprimierten Liganden für CXCR4 und CXCR5, CXCL12 und CXCL13 [Amft et al. 2001; Salomonsson et al. 2002, 2003], in das Drüsengewebe abwandern. Die reduzierte migratorischen Kapazität der im Blut der Patienten verbleibenden CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen könnte daher die Abwanderung der CXCR4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen mit hoher migratorischer Kapazität für die im Drüsengewebe exprimierten Chemokine, CXCL12 und CXCL13, widerspiegeln. In diesem Zusammenhang erscheint interessant, daß insbesondere die CXCL13-CXCR5 Wechselwirkung als essentiell für die Bildung sekundärer lymphatischer Strukturen angesehen wird [Ansel et al. 2000; Ansel & Cyster 2001], und die lymphozytären Gewebeeinfiltrate beim SS ein spezifisches Expressionsmuster von Chemokinen, einschließlich einer Überexpression von CXCL13, besitzen. Insgesamt wurden im Rahmen vorliegender Untersuchungen Störungen der B-zellulären Chemokinrezeptorexpression und -funktion bei Patienten mit primärem SS aufgezeigt, die, einerseits, als Hinweis auf eine abnorme B-zelluläre Aktivierung und, andererseits, als Hinweis auf eine Störungen der B-Zell-Homöostase gewertet werden können.

**Publikation:**

Dysregulation of chemokine receptor expression and function by B cells of patients with primary Sjögren´s syndrome. Hansen A, Reiter K, Ziprian T, Jacobi AM, Hoffmann A, Gosemann M, Scholze J, Lipsky PE, Dörner T. Arthritis Rheum 2005; 52: 2109-19.

**auf den Seiten 98 – 108  
der Original-Druckversion**