Aus dem Deutschen Rheuma-Forschungszentrum
Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

BAFF- und APRIL-Expression im Synovialgewebe von Patienten mit Rheumatoider Arthritis

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Richter

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. C. Berek

2. Prof. Dr. med. T. Kamradt

3. Prof. Dr. med. G. Riemekasten

Datum der Promotion: 30.05.2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 3
Abkürzungsverzeichnis 6
1 Einleitung 9
1.1 Definition des Krankheitsbildes und der Epidemiologie der RA 9
1.2 Aufbau eines Gelenks 10
1.3 Ätiologie der RA 11
1.4 Pathomechanismus der RA 13
1.5 Das Immunsystem 14
1.5.1 Das angeborene, antigen-unspezifische Immunsystem 15
1.5.2 Das erworbene, antigen-spezifische Immunsystem 15
1.5.3 Die Entwicklung von Lymphozyten 16
1.5.3.1 T-Lymphozyten 16
1.5.3.2 B-Lymphozyten 17
1.5.4 Antikörper 21
1.5.5 Autoantikörper bei RA-Patienten 22
1.6 Therapie der RA 23
1.7 Zytokine der TNF-Familie und ihre Rezeptoren 25
1.7.1 TNF-Liganden 26
1.7.2 BAFF und APRIL 27
1.7.2.1 BAFF 28
1.7.2.2 APRIL 30
1.7.3 TNF-Rezeptoren 31
1.7.4 BAFF- und APRIL-Rezeptoren 32
1.7.4.1 Expression von BAFF-R, BCMA und TACI 32
1.7.4.2 Interaktion der BAFF- und APRIL-Rezeptoren mit BAFF und APRIL 33
1.7.4.3 Funktion 34
1.8 Zielsetzung und Fragestellungen der Arbeit 35
2 Material und Methoden 37
2.1 Materialien 37

2.1.1 Geräte 37
2.1.2 Verbrauchsmaterial 37
2.1.3 Lösungen 37
2.1.4 Monoklonale Antikörper 38
2.1.5 Fluoreszenzfarbstoffe 39
2.1.6 Materialherkunft und Gewebeverarbeitung 40
2.2 Methode 40
2.2.1 Präparation von Gewebe 40
2.2.2 Herstellung von Gefrierschnitten 40
2.2.3 Immunhistochemie 41
2.2.3.1 Etablierung der Antikörper 41
2.2.3.2 Fixieren der Gewebeschnitte 41
2.2.3.3 Blocken der fixierten Gewebeschnitte 41
2.2.3.4 Färbung mit Primärantikörpern 42
2.2.3.5 Nachweis spezifischer Färbung mit Sekundärantikörpern 43
2.2.3.6 Kernfärbung mit DAPI 43
2.2.3.7 Eindeckeln der Schnitte 43
2.2.4 Fluorozenzmikroskopie 44
2.2.5 Erstellen von Übersichtsbildern der Gewebeschnitte 44
2.2.6 Zellzählung 44
2.2.7 Statistik 46
2.2.8 Software 46
3 Ergebnisse 47
3.1 Charakterisierung der RA-Patienten und ihrer untersuchten Synovialgewebe 47
3.2 Histologische Charakterisierung der Synovialgewebe 50
3.2.1 Einleitung 50
3.2.2 Das entzündete Synovialgewebe 50
3.2.3 Verteilung der B- und Plasmazellen 53
3.2.4 Zusammenfassung 58
3.3 BAFF- und APRIL-Expression im entzündeten Synovialgewebe 59
3.3.1 Einleitung 59

3.3.2 BAFF- und APRIL-Expression in der Deckzellschicht 59
3.3.3 BAFF- und APRIL-Expression in Gefäßumgebung 62
3.3.4 BAFF- und APRIL-Expression in Keimzentren (FDCs) 64
3.3.5 BAFF- und APRIL-Expression im Gewebe 68
3.3.6 BAFF und APRIL in B- und Plasmazellen 69
3.4 Zusammenhang zwischen Entzündungsparametern, B Zellen, Plasmazellen, Krankheitsdauer, BAFF- und APRIL-Expression, Histologische Daten.....73
4 Diskussion 75
4.1 B- und Plasmazellverteilung im Synovialgewebe 75
4.2 APRIL- und BAFF-Expression im Synovialgewebe.....77
4.3 Autokrine BAFF-Expression in Plasmazellen 80
5 Zusammenfassung 83
Literaturverzeichnis 85
Danksagung 93
Lebenslauf 94
Eidesstattliche Erklärung 95

Abkürzungsverzeichnis

ACPA	Antikörper für citrullinierte Peptidantigene
ACR	*American College of Rheumatology*
AID	Aktivierungsinduzierten Cytidindeaminase
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APRIL	*a proliferation-inducing ligand*
BAFF	B-Zell-aktivierender Faktor der TNF-Familie
BAFF-R	B Zell-aktivierender Faktor-Rezeptor
bcl-2	*B cell lymphoma-protein 2*
BCMA	*B cell maturation antigen*
BCR	B-Zell-Rezeptor
bcl-xL	*B cell lymphoma-protein xL*
Blimp-1	*B lymphocyte-induced maturation protein 1*
BlyS	*B lymphocyte stimulator protein*
BSA	bovines Serum-Albumin, Rinderserumalbumin
CDR	*complementary determining region (*komplementaritätsbestimmende Region)
CRP	C-reaktives-Protein
CD	Cluster of Differentiation, Oberflächenmarker
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DAS-28	*Disease Activity Score* (Krankheits-Aktivitäts-Maß bezogen auf 28 definierte Gelenke)
DC	Dendritische Zelle
DIP	distale Interphalangealgelenke
DMARD	*disease modifying antirheumatic drugs* (langwirksame Antirheumatika)
EULAR	European League against Rheumatism
Fab	*fragment antigen binding*
Fc	*fragment crystallizable*
FDC	follikulär dendritische Zellen
HLA	menschliches Leukozyten-Antigen
HSC	hämatopoetische Stammzelle
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN-γ	Interferon-γ

Ki-67	karyoplasmatisches Antigen
MCP	Metacarpophalangealgenke
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex
MTP	Metatarsophalangealgenke
MTX	Methotrexat
μl	Mikroliter
NF-κB	Nukleäre Faktor kappa B (*nuclear factor kappa B)*
NK	Natürliche Killerzellen
NSAR	nichtsteriodale Antirheumatika
OA	Osteoarthritis
PAMPs	pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (*phosphate buffered saline*)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PRR	Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*)
PIP	proximale Interphalangealgelenke
RA	Rheumatoide Arthritis
RANKL	*receptor activator of nuclear factor kappaB ligand*
RF	Rheumafaktor
SA	Streptavidin
SLE	systemischer Lupus erythematodes
TACI	*transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand (CAML) interactor*
TALL-1	*TNF- and ApoL related leukocyte-expressed ligand 1*
TALL-2	*TNF- and ApoL related leukocyte-expressed ligand 2*
TAPA-1	*target of antiproliferative antibodies-1*
TCR	T-Zell-Rezeptor
Tc-Zelle	Zytotoxische T-Zelle
TDRL-1	*TNF-related death ligand-1*
TGF	Tumor Wachstumsfaktor (*Tumor Growth Factor*)
THANK	*TNF homolog that activates apoptosis, nuclear factor-κB and c-Jun NH2-terminal kinase*
Th-Zellen	T-Helferzellen
Treg-Zellen	regulatorische T-Zelle
TNF	Tumornekrose-Faktor
TNFα	Tumornekrose-Faktor-α
TNFSF13A	TNF-Superfamilie Mitglied 13A

TNFSF13B	TNF-Superfamilie Mitglied 13B
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziierter Faktor
TWEAK	TNF-like weak inducer of apoptosis
Vgl.	Vergleich
zTNF4	

In der Arbeit verwendete englische Bezeichnungen sind kursiv dargestellt.

1 Einleitung

1.1 Definition des Krankheitsbildes und der Epidemiologie der RA

Der Sammelbegriff „Rheuma“ steht für eine Vielzahl von Erkrankungen, die mit Schmerzen am Bewegungs- und Stützapparat einhergehen. Die Bezeichnung „Rheuma“ kommt aus dem Griechischen, bedeutet ziehender Schmerz und umfasst vier Hauptgruppen, zu diesen gehören:

1. degenerative, nicht-entzündliche Gelenk- und Wirbelsäulenerkrankungen wie die Arthrosen,
2. Weichteilrheumatismus, der ausschließlich gelenksferne Strukturen betrifft wie die Fibromyalgie oder die Bursitis,
3. Stoffwechselerkrankungen mit rheumatischen Beschwerden, deren wichtigster Vertreter die Gicht ist sowie
4. entzündlich-rheumatische Systemerkrankungen wie die Kollagenosen[1], Vaskulitiden[2] und Arthritiden wie die rheumatoide Arthritis (RA) (Renz-Polster und Krautzig, 2004).

Die RA wurde erstmals 1859 von Alfred Garrod beschrieben und 1941 von der „American Rheumatism Association“ als eigenständige Krankheit anerkannt. Sie ist die am weitesten verbreitete Form der entzündlichen Arthritiden. Rund ein Prozent der Weltbevölkerung leidet an RA, bei den über 50-Jährigen sind es sogar doppelt so viele. Allein in Deutschland leben zurzeit 800.000 bis eine Million an RA erkrankte Menschen, wobei Frauen dreimal häufiger betroffen sind als Männer (Renz-Polster und Krautzig, 2004; Lipsky, 1999). Generell kann die RA in jedem Lebensalter auftreten, macht sich jedoch meist im Alter zwischen 30 und 50 Jahren bemerkbar. Die RA ist eine chronische Erkrankung und zählt zu den am häufigsten vorkommenden chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen des Menschen.

Charakteristisch für die RA sind ein schleichender Beginn sowie ein schubweiser Verlauf. Dabei zeigt sich eine chronische Entzündung der Gelenkinnenschicht, die als Synovitis bezeichnet wird. Grundsätzlich kann die RA alle Gelenke betreffen, sie manifes-

---

[1] Dazu zählen: Systemischer Lupus erythematodes, Sklerodermie, Sjörgren-Syndrom und Polymyositis.
[2] Dazu zählen: Panarteriitis nodosa, Wegenersche Granulomatose und Polymyalgia rheumatica.

tiert sich aber in erster Linie an den Hand- und Fußgelenken. Typisch ist, dass die RA praktisch nie die Endgelenke[3] der Finger und Zehen befällt, sondern ausschließlich an den Grund[4]- und Mittelgelenken[5] von Finger und Zehen beginnt (Hettenkofer, 2003). Zu den typischen Symptomen der RA zählen Schwellungen, Schmerzen, Überwärmung sowie eine eingeschränkte Beweglichkeit der betroffenen Gelenke. Auffallend häufig ist hierbei ein symmetrisches Befallsmuster festzustellen. Häufig weisen die Patienten einen Querdruckschmerz der MCP-Gelenke auf, was als positives Gaenslen-Zeichen bezeichnet wird. Als weiteres diagnostisches Kriterium der RA ist die Morgensteifigkeit von mindestens 30 Minuten der betroffenen Gelenke zu nennen. Kennzeichnend ist hier im Gegensatz zu den degenerativen Erkrankungen (Arthrosen), dass die Gelenkbeschwerden im Laufe des Tages durch Bewegung abnehmen, während sich die Beschwerden bei den degenerativen Erkrankungen durch Bewegung verschlimmern. Spätfolgen der RA sind oft Fehlstellungen, Funktionsverlust bis hin zur totalen Versteifung (Ankylose) der betroffenen Gelenke, die allerdings durch eine Frühdiagnose mit anschließend adäquater Therapie verhindert werden können. Neben dem Befall der Gelenke sind bei der RA insbesondere bei schweren Verläufen auch Organmanifestationen zu beobachten, z.B. in Form einer Skleritis, Perikarditis, Pleuritis und Vaskulitis. Die RA kann, wenn sie wichtige Organsysteme beeinträchtigt, die Lebenserwartung deutlich verkürzen. Grundsätzlich bleibt festzuhalten, dass sowohl der Verlauf als auch die Symptome der RA von Patient zu Patient sehr stark variieren können.

1.2 Aufbau eines Gelenks

Ein gesundes Gelenk besitzt einen Gelenkkopf und eine dazu passende Gelenkpfanne, dazwischen sitzt eine Gelenkfläche, die mit hyalinem Knorpel überzogen und von einer Gelenkkapsel umschlossen ist. Die Außenseite der Kapsel wird von einer Kollagenfaserschicht gebildet, während die Kapselinnenseite von der Synovialmembran ausgekleidet wird. Die relativ zellarme, aber gut vaskularisierte Synovialmembran besteht wiederum aus einer äußeren Deckzellschicht (synoviale Schicht, lining layer), welche ein bis maximal drei Zelllagen umfasst (Kim und Berek, 2000) sowie einer darunter liegenden inneren Schicht (subsynoviale Schicht, sublining layer). Die letztere der beiden Schichten wird im Wesentlichen von Bindegewebe, Blutgefäßen und einigen wenigen

---

[3] Distalen Interphalangealgelenke (DIP) der Finger und Zehen
[4] Metacarpophalangealgenken (MCP) der Finger sowie Metatarsophalangealgelenken (MTP) der Zehen
[5] Proximalen Interphalangealgelenken (PIP) der Finger und Zehen

Immunzellen gebildet. Die Deckzellschicht dagegen setzt sich aus Synoviozyten zusammen. Dabei werden die Typ A-Synoviozyten, welche von den Monozyten abstammen und makrophagenähnliche Funktionen übernehmen, von den Typ B-Synoviozyten[6], welche den Fibroblasten des Bindegewebes gleichen, unterschieden. Die synovialen Fibroblasten, die im gesunden Gelenk überwiegen, sind unverzichtbar für die Synthese der Gelenkschmiere, da sie das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure sezernieren. Die Glykosaminoglykane sind hauptverantwortlich dafür, dass die Synovialflüssigkeit ein dünnflüssiger Schleim ist. Dieser Synovialschleim füllt den Gelenkspalt aus und dient zugleich der Ernährung des gefäßlosen Gelenkknorpels sowie dem Abtransport von Abbauprodukten, was durch das Fehlen einer Basalmembran erleichtert wird. Die Hauptaufgabe des Knorpels ist die Druckverteilung der auf das Gelenk einwirkenden Kräfte. Unterstützt werden die stoßdämpfenden Funktionen des nur etwa drei Millimeter dicken Knorpels von der hyaluronhaltigen Synovialflüssigkeit, indem diese den Reibungswiderstand zwischen den Gelenkflächen herabsetzt und somit den Gelenkknorpel vor zu starker Abnutzung schützt.

1.3 Ätiologie der RA

Es existiert kein monokausales Erklärungsmodell für die RA. Die RA beginnt mit einer Synovitis, welche chronifiziert und als unkontrollierte Immunreaktion auf bisher unbekannte Reize verstanden wird. Dabei scheint nicht ein einziger Auslöser für eine derartige Immunantwort verantwortlich zu sein, sondern wesentlich wahrscheinlicher ist ein komplexes Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren. Insbesondere die Kombination von genetischen Dispositionen, Umweltfaktoren, Infekten sowie immunpathologischen Prozessen werden bei der Krankheitsentstehung der RA diskutiert. Dabei bildet die erbliche Veranlagung offensichtlich die Grundlage dafür, dass es durch einen noch nicht identifizierten arthritogenen Erreger zu einem Infekt und damit zum Ausbruch der RA kommen kann. Durch die genetische Prädisposition scheint sich aber nicht nur das relative Erkrankungsrisiko zu erhöhen, sondern auch der Schweregrad der RA wird dadurch negativ beeinflusst. So ist eine familiäre Häufung vor allem schwerer, destruierender Verläufe zu beobachten. Viele rheumatische Erkrankungen sind mit bestimmten HLA-Typen assoziiert, so beispielsweise Morbus Bechterew mit HLA-B27 oder der systemischer Lupus erythematodes (SLE) mit HLA-B8, -DR2 und -DR3. Die HLA-Moleküle,

[6] Typ B-Synoviozyten werden auch als RASFs (rheumatoid arthritis synovial fibroblasts) bezeichnet.

synonym verwendet mit MHC[7]-Molekülen, markieren Zellen als körpereigen. Alle Zellen, die kein körpereigenes HLA tragen, können so als körperfremd demaskiert werden. Die HLA-Typen werden in drei Klassen unterteilt. Dabei sind die HLA I- und II-Moleküle für die Antigenpräsentation und dadurch Aktivierung der T-Zellen entscheidend. HLA-III-Moleküle sind Plasmaproteine, die an der Immunabwehr beteiligt sind (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: HLA-Typisierung[8]

	HLA-I	***HLA-II***	***HLA-III***
Genorte	HLA-A HLA-B HLA-C	HLA-DR (DRA/DRB) HLA-DQ (DQA/DQB) HLA-DP (DPA/DPB)	
kodiert für:	Glykoproteine	Glykoproteine	Plasmaproteine
Expression auf:	alle kernhaltigen Zellen	APC	
Präsentation an:	CD8-T-Zellen	CD4-T-Zellen	
Mit RA assoziiert:		HLA-DR 4 (DRB1*04, DRB1*01)	

Die HLA-Klasse I Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und sind auf drei Genorten verteilt, welche als HLA-A, -B und –C bezeichnet werden. Sie präsentiert den CD8-T-Zellen auf ihrer Oberfläche Antigene. Die Klasse-II HLA-Moleküle werden als HLA-D zusammengefasst, befinden sich aber ebenfalls auf drei Genorten, welche als HLA-DR, -DQ sowie –DP bezeichnet werden. Sie werden vor allem auf antigenpräsentierenden Zellen (APCs: B-Lymphozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen.) exprimiert und präsentieren den CD4-T-Zellen extrazelluläre Antigene.

Stastny beschrieb 1978 erstmals die Assoziation der RA mit den HLA Klasse II Genen. Etwa 70 Prozent der RA-Erkrankten sind Träger einer Variante des Gens HLA-DRB1, insbesondere dem Locus DR4. Alle HLA-Moleküle der Klasse II bestehen aus zwei Ketten, einer α- und einer β-Untereinheit, dabei kodiert das HLA-DRB1-Gen die β-Kette. Der DR4-Locus wird wiederum von mehr als 20 unterschiedlichen DRB1-Allelen codiert und vor allem die Allele DRB1*0401, *0404, *0405 und *0408 sind mit einem erhöhten Risiko, an RA zu erkranken, assoziiert (Reveille, 1998) (siehe Tabelle 2). Dabei stimmen die RA-relevanten Allele in den Aminosäuren 70 bis 74 der β-Kette fast bzw. komplett überein, weshalb dieser Abschnitt als „Rheumatoides Epitope" oder „Shared Epitope" bezeichnet wird (Reveille, 1998; Gonzalez-Gay et al., 2002). Darüber hinaus scheinen einige Nicht-DR4 Allele mit der RA assoziiert zu sein, so z.B. DRB1-0101, -0102 und -1001 (Reveille, 1998).

---

[7] MHC: Mayor Histocompatibility Complexes, MHC I entspricht beim Menschen HLA A, B und C, MHC II entspricht beim Menschen HLA DP, DQ, DR.

[8] Im Genlocus HLA-DR (DRA / DRB) steht „A“ für die α und „B“ für die β Kette.

Tabelle 2: „Shared epitope“

HLA-DR4-B1-Allele	*Aminosäuresequenz*[9]
0401	QKRAA
0404	QRRAA
0405	QRRAA
0408	QRRAA
Nicht-HLA-DR4-Allele	
0101	
0102	
1001	

Alle HLA-DR4-B1-Allele, welche mit der RA assoziiert sind, stimmen in einer Aminosäuresequenz (QKRAA, QRRAA) an Position 70-74 überein, die als Shared Epitop bezeichnet wird. Aminosäurecode: Q: Glutamin, K: Lysin, R: Argenin, A: Alanin.

1.4 Pathomechanismus der RA

Im Rahmen der RA kommt es zur Hyperplasie der Deckzellschicht, so dass aus einer einschichtigen eine vielschichtige synoviale Deckzellschicht entsteht. Dabei proliferieren vor allem die synovialen Fibroblasten, während der Anteil der synovialen Makrophagen annähernd gleich bleibt. Nach etwa vier Wochen bildet sich ein Pannusgewebe, welches bis zu zehn Zelllagen dick sein kann (siehe Abbildung 1). Dadurch wird der Knorpel verdrängt und zerstört, so dass erhöhte Reibungskräfte auf das betroffene Gelenk einwirken. Infolgedessen treten Knochenerosionen auf, die zu bleibenden Gelenkveränderungen bis hin zur Invalidität führen können. Dabei zeigen sich unter anderem Veränderungen wie Schwanenhals- und Knopflochdeformitäten, Zickzack-Daumen sowie Ulnardeviation[10], die irreversibel sind. Verstärkt wird die Knorpelverdrängung durch die sekundäre Aktivierung der Osteoklasten und Chondrozyten, die ebenfalls zum Knochen- und Knorpelabbau beitragen. Die Chondrozyten hemmen die Kollagen- und Glykosaminoglykansynthese und sind nicht mitosefähig, so dass einmal entstandene Schäden nicht mehr durch Regeneration ausgeglichen werden können. Dadurch verbleiben Knorpeldefekte lebenslang.

[9] Q=Glutamin, K=Lysin, R=Argenin, A=Alanin
[10] Ulnardeviation: Abweichung der Finger zur Seite der Ulna durch Entzündung der Grundgelenke

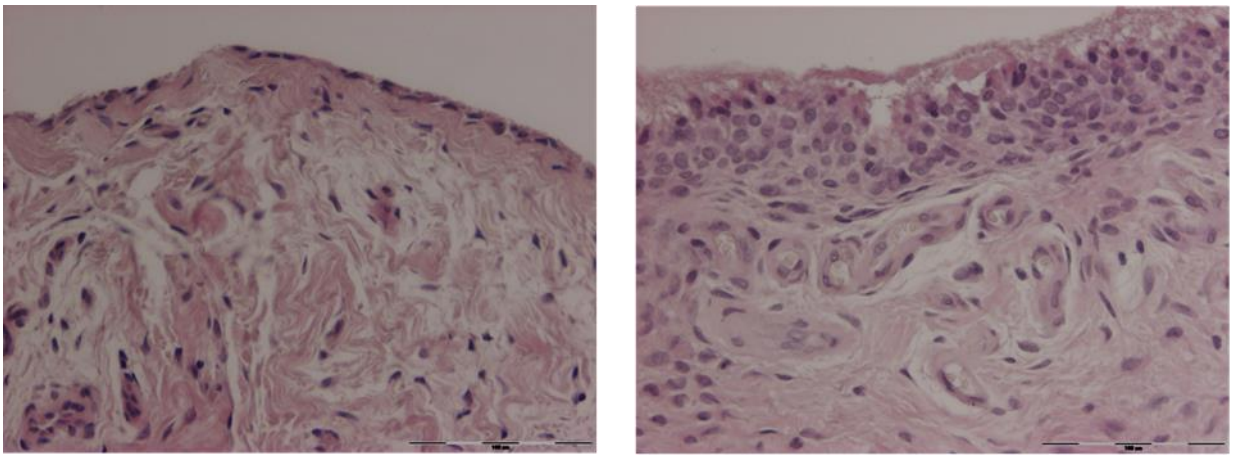


Abbildung 1: Vergleich von gesundem und rheumatisch verändertem Synovialgewebe

Das linke Bild zeigt gesundes Synovialgewebe mit einschichtiger Deckzellschicht, das rechte Bild zeigt rheumatisch verändertes Synovialgewebe mit mehrschichtiger Deckzellschicht. HE-Färbung.

Die synovialen Fibroblasten können ein betroffenes Gelenk durch den zerstörten Knorpel verlassen. Sie treten ins Blut über und begeben sich zielgerichtet in gesunde Gelenke, wo sie ebenfalls eine Entzündungsreaktion auslösen (Lefèvre et al., 2009). Dies ist die momentane Vorstellung zur Ausbreitung der RA von einem Gelenk auf das nächste.

Parallel zur Aktivierung der Fibroblasten und Makrophagen kommt es zu Akkumulation von Lymphozyten und Phagozyten, die normalerweise nicht im Synovialgewebe gefunden werden. In Folge der RA-Erkrankung kommt es zur erhöhten Durchlässigkeit der Gefäße sowie einer starken Neoangiogenese, welche die Infiltration der Synovialmembran mit Entzündungszellen aus dem Blut fördert (Paleolog, 1996 und Paleolog, 2002). Diese Immunzellen verstärken das Entzündungsgeschehen durch die Ausschüttung von Zytokinen. Im gesunden Gewebe liegt normalerweise eine Homöostase von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen vor. Bei der RA überwiegen allerdings die proinflammatorischen Zytokine, vor allem der TNF-Familie.

1.5 Das Immunsystem

Funktionell lässt sich das körpereigene Immunsystem in die angeborene Immunität mit der antigen-unspezifischen Abwehr durch vor allem Phagozyten und die erworbene Immunität mit der antigen-spezifischen Abwehr durch Lymphozyten einteilen. Eine adäquate Immunreaktion beruht letztlich auf einer engen Kooperation beider Systeme mit deren jeweiligen zellulären sowie humoralen Komponenten.

1.5.1 Das angeborene, antigen-unspezifische Immunsystem

Das antigen-unspezifische Immunsystem ist angeboren und somit von Geburt an voll funktionsfähig. Es reagiert innerhalb kürzester Zeit und ist essentiell für die Abwehr von Antigenen, mit denen das Immunsystem zum ersten Mal kontaktiert wird. Die Protagonisten der angeborenen Abwehr sind zum einen die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die Antigene durch Freisetzung chemischer Stoffe eliminieren, zum anderen die Phagozyten, welche Antigene über ihre Oberflächenrezeptoren aufspüren und mit Hilfe von Phagosomen in sich aufnehmen. Das unspezifische Abwehrsystem reagiert stets mit der gleichen Intensität sowie Schnelligkeit und ist nicht lernfähig. So führt ein wiederholter Antigenkontakt zu keiner wirksameren Immunreaktion. Die meisten Phagozyten, vor allem die Monozyten bzw. Makrophagen sowie die Dendritischen Zellen, fungieren zusätzlich als Antigenpräsentierende Zellen (APC), womit sie eine wichtige Verbindung zum spezifischen Immunsystem herstellen.

1.5.2 Das erworbene, antigen-spezifische Immunsystem

Die erworbene Immunität passt sich spezifisch an die jeweiligen Fremdkörper an und wird durch die B- und T-Lymphozyten vermittelt. Der erstmalige Antigenkontakt, welcher zur Primärantwort führt, läuft deutlich langsamer ab als bei der unspezifischen Abwehr. Dafür führt der Antigen-Erstkontakt zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses in Form von langlebigen B-Gedächtniszellen, welche bei einem wiederholten Antigenkontakt aktiviert werden und eine deutlich schnellere sowie effizientere Sekundärantwort hervorrufen. Während die Primärantwort fast 2 Wochen braucht, um die Immunreaktion aufzubauen, ereignet sich die Sekundärantwort bereits nach etwa 4 Tagen. Parallel zur Aktivierung der B-Gedächtniszellen vollzieht sich in den peripher lymphatischen Organen auch die Selektion von B-Zellen, welche Antikörper mit der höchsten Affinität bilden (Affinitätsreifung). Diese hochaffinen Antikörperproduzierenden B-Zellen erhalten Signale zur Vermehrung durch klonale Expansion, wodurch sich die Anzahl der B-Zellen mit der entsprechenden Spezifität erheblich vergrößert. Die Zahl der Lymphozyten bleibt bei gesunden Erwachsenen mit 10^{12} konstant, dafür verschieben sich die Relationen verschiedener Klone untereinander erheblich (Kreutzig, 2006).

1.5.3 Die Entwicklung von Lymphozyten

Alle Blutzellen stammen von einer einzigen Zelle, der sog. hämatopoetischen Stammzelle (Urzelle) ab, welche pluripotent ist. Durch Wachstumsfaktoren und Zytokine differenziert die Stammzelle entweder zu einer lymphoiden oder einer myeloiden Vorläuferzelle (Kreutzig, 2006). Die Vorläuferzellen können sich nicht mehr selbst erneuern und sind bereits auf eine bestimmte Zelllinie festgelegt. Die lymphoide Vorläuferzelle produziert B- und T-Lymphozyten sowie NK-Zellen.[11]

1.5.3.1 T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten entstehen im Knochenmark und wandern zur Reifung in den Thymus. Nach der Involution des Thymus findet die T-Lymphopoese im Mark der flachen Knochen statt. T-Zellen tragen an ihrer Oberfläche den T-Zell-Rezeptor (TCR), mit welchem jede T-Zelle ein spezifisches Antigen erkennen kann. Im Gegensatz zu den B-Lymphozyten, die auch freie Antigene erkennen, erfassen T-Zellen nur Antigene, die im Komplex mit HLA-Molekülen auf den Oberflächen von APCs angeboten werden. Die Fähigkeit der T-Zellen, auf ein Antigen zu reagieren, hängt davon ab, an welches HLA-Molekül es gebunden ist. T-Zellen sind somit HLA-restringiert.

Die verschiedenen Subpopulationen der T-Zellen werden anhand ihrer Oberflächenantigene (CDs) und den damit verbundenen Funktionen in T-Helferzellen (Th-Zellen), regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) und zytotoxische T-Zellen (Tc-Zelle) eingeteilt (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Unterteilung der T-Lymphozyten und deren Zytokine

Subpopulationen	***Oberflächenantigene bzw. Zytokine***
Tc-Zellen	CD8
Treg-Zellen	CD4
Th-Zellen:	CD4
- Th1-Zellen	Proinflammatorische Zytokine: IL-2, INF-γ, TNFα + β => zelluläre Abwehr
- Th2-Zellen	Antiinflammatorische Zytokine: IL-4, IL-5, IL-10 => humorale Abwehr
- Th17-Zellen	Proinflammatorisches Zytokin: IL-17

[11] Aus der myeloiden Vorläuferzelle können Erythrozyten, Thrombozyten, Dendritische Zellen, Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen entstehen.

Im Gegensatz zu den Th- und Treg-Zellen, welche CD4 auf ihrer Oberfläche exprimieren, tragen die Tc-Zellen das CD8-Protein auf ihrer Oberfläche.

Aktivierte Th-Zellen können Antigene in Kooperation mit HLA Klasse II-Molekülen auf APCs erkennen. Sie stimulieren und koordinieren die Immunantwort durch Zytokinausschüttung. Anhand dieser Zytokinfreisetzung lassen sich die Th-Zellen weiter in Th1-, Th2- und die neu identifizierten Th17-Zellen unterscheiden. Mit ihrer Hilfe differenzieren B-Zellen zu Plasmazellen, ebenso wie T-Zellen zu Tc-Zellen. Die Th1-Zellen sezernieren proinflammatorische Zytokine, wodurch Makrophagen sowie Tc-Zellen aktiviert werden. Somit sind die Th1-Zellen primär für die zellvermittelte Immunantwort zuständig. Die Th2-Zellen dagegen synthetisieren vorzugsweise antiinflammatorische Zytokine, wodurch sie die B-Zellen zur Antikörperproduktion stimulieren und primär für die humorale Immunantwort verantwortlich sind. Die Th17-Zellen exprimieren u.a. das entzündungsfördernde Zytokin IL-17, welches sechs verschiedene Mitglieder (IL17 A-F) umfasst (Lubberts, 2008). Bei RA-Patienten wird eine deutlich erhöhte IL-17-Konzentration in der Synovialflüssigkeit beobachtet (Chabaud et al., 1999). Dabei scheint die IL-17-Produktion insbesondere bei der frühen RA von Bedeutung zu sein (Leipe et al., 2009).

Die Treg-Zellen sorgen für eine Begrenzung der Immunantwort und verhindern die Endlos-Stimulation des Immunsystems. Infizierte Zellen werden von Tc-Zellen erkannt, indem sie den Tc-Zellen die intrazellulären Antigene in Verbindung mit HLA Klasse I-Molekülen auf ihrer Oberfläche präsentieren.

1.5.3.2 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten sind die einzigen Zellen, welche im ausdifferenzierten Zustand zur Bildung von Antikörpern fähig sind. Sie sind somit die Vermittler der humoralen Immunität. Darüber hinaus sind B-Zellen im Gegensatz zu T-Zellen in der Lage, native Antigene zu erkennen, diese anschließend zu prozessieren und über HLA-Moleküle zu präsentieren. Somit fungieren B-Zellen auch als APCs. Um zu Antikörperproduzierenden Zellen zu reifen, durchlaufen B-Zellen zwei örtlich getrennte Entwicklungsprozesse (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Entwicklung der B-Lymphozyten

Lokal-isation	***Funktion***	***Zellstadium***	***Oberflächen-antigen***	***Antikörper-bildung***
Knochen-mark	Bildung des Antigen-rezeptors (BCR)	Vorläuferzelle	CD34	
		Pro-B-Zelle	CD19	VH-Domäne
		frühe Prä-B-Zelle	CD19, CD20	surrogate L-Kette
		späte Prä-B-Zelle	CD19, CD20	Prä-BCR
		unreife Zelle	CD19, CD20, CD21, CD81	BCR (mIgM, mIgD)
		transitionale B-Zelle	CD19, CD20, CD21, CD81	
Peripherie	Antikörper-bildung	reife (naive) B-Zelle	CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD27	BCR (mIgM, mIgD)
		Plasmablast		
		Plasmazelle	CD27, CD38	sIg (IgG>IgA>IgD)
		B-Gedächtniszelle	CD20, CD21, CD27	mIgG, mIgM

Während der erste in der fetalen Leber bzw. nach Geburt im Knochenmark stattfindet, vollzieht sich der zweite Entwicklungsschritt in den sekundär lymphatischen Organen. Wie bei der T-Zell-Differenzierung entsteht aus der hämatopoetischen Stammzelle die lymphoide Vorläuferzelle, welche über das Stadium der Pro-B-Zelle, der frühen sowie späten Prä-B-Zelle zur unreifen B-Zelle differenziert. Während dieser Schritte werden die V- (variable), D- (diversity) und J- (joining) Gene der schweren Ketten zu einem funktionellen VDJ-Segment in Form der µ-Kette (IgM Antikörper) rearrangiert, so dass ein vorläufiger Prä-B-Zell-Rezeptor (Prä-BCR) entsteht, welcher das Stadium der frühen Prä-B-Zelle kennzeichnet. Der Prä-BCR stellt ein entscheidendes Überlebenssignal dar, da alle Zellen, die den Prä-BCR nicht exprimieren durch Apoptose eliminiert werden. Aus dem Prä-BCR resultiert letztlich nach Bildung der leichten Kette der fertige B-Zell-Rezeptor (BCR) in Form von IgM, welcher das Stadium der unreifen B-Zellen markiert. Alle unreifen B-Zellen, die während ihrer Entwicklung nicht in der Lage sind, den BCR auf ihrer Oberfläche zu exprimieren, werden ebenfalls apoptotisch aussortiert. Die unreifen, BCR-tragenden B-Zellen verlassen das Knochenmark und begeben sich in die Peripherie, wo sie zu reifen B-Zellen differenzieren. Nur mit dem BCR sind die reifen B-Zellen im Stande, Antigene zu erkennen und durch die Bildung von entsprechenden

Antikörpern zu bekämpfen. B-Zellen, die bisher noch keinen Antigenkontakt hatten, werden als naive B-Zellen bezeichnet.

Beim Verlassen des Knochenmarks gelangen die unreifen B-Zellen über das Blut in die Milz, wo sie Follikel bilden und auf dem Weg zur reifen B-Zelle zwei weitere Zwischenstadien (T1, T2) durchlaufen (Lodera et al., 1999; Mackay und Browning, 2002). T1-B-Zellen entwickeln sich entweder zu T2-B-Zellen oder direkt zu reifen B-Zellen (Lodera et al., 1999). Lediglich 1 bis 3 Prozent der T1 und T2 B-Zellen gelangen in den Pool der reifen B-Zellen (Lodera et al., 1999).

Die sich nach Antigenbindung anschließende Differenzierung kann nun auf zwei Wegen stattfinden, entweder durch thymusabhängige Antigene, welche die Hilfe von aktivierten Th-Zellen mit sich bringt, oder allein durch thymusunabhängige Antigene. Die B-Zellen, die ein thymusunabhängiges Antigen binden, bilden i.d.R. ausnahmslos IgM-Antikörper, die nicht hochspezifisch sind (Primärantwort). In den extrafollikulären Arealen vollziehen die B-Zellen eine klonale Expansion und differenzieren zu kurzlebigen (2-3 Tage) Antikörper-produzierenden Plasmazellen.

Bekommt die B-Zelle Hilfe von Th Zellen kann dies eine Keimzentrumsreaktion auslösen. Im Keimzentrum differenzieren reife B-Zellen zu Gedächtniszellen oder Plasmazellen, deren hochaffine Antigenrezeptoren dem Organismus Langzeitschutz gewähren (Berek, 1992).

In einem Keimzentrum lassen sich eine helle von einer dunklen Zone abgrenzen (siehe Abbildung 2). In der dunklen Zone vollzieht sich die starke Proliferation, aus einer B-Zelle werden viele. Durch starke Proliferation werden die ruhenden naiven B-Zellen an den Rand gedrängt, wodurch der Follikelmantel entsteht. In der dunklen Zone ereignet sich auch der Antikörper-Klassenwechsel, so dass IgG, IgA oder IgE gebildet werden können. Im Anschluss daran wird eine Reaktion in Gang gesetzt, welche zur weiteren Optimierung der Antikörper führt und als somatische Hypermutation bezeichnet wird. Ob die neuen Antikörper tatsächlich eine höhere Affinität zum Antigen aufweisen, wird in der hellen Zone des Keimzentrums überprüft. Dafür präsentieren die Follikulär Dendritischen Zellen (FDCs) den Zentroblasten Antigene. Im Gegensatz zu den dendritischen Zellen können FDCs kein Antigen prozessieren. Sie binden über Fc Rezeptoren Antigen-Antikörper-Komplexe auf ihrer Oberfläche und präsentieren somit ein intaktes Antigen, dass vom B-Zellrezeptor erkannt wird. Nur diejenigen, deren Antikörper eine

hohe Affinität zum Antigen aufweisen, exprimieren das antiapoptotische Protein bcl-2, wodurch sie überleben und sich vermehren. B-Zellen mit geringer Affinität zum Antigen bekommen keine T-Zellhilfe und erliegen der Apoptose. Im weiteren Verlauf der Keimzentrumsreaktion differenzieren die Zentroblasten in Zentrozyten, die sich in der Nähe des Follikelmantels sammeln. Aus den positiv selektionierten B-Zellen, welche das Keimzentrum verlassen, entstehen über das Stadium der Plasmablasten entweder langlebige Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen. Die Gedächtniszellen siedeln sich in der Marginalzone des Keimzentrums an, Plasmazellen hingegen verlassen das Keimzentrum. Die B-Gedächtniszellen können nach erneuter Erkennung des entsprechenden Antigens schnell und zugleich effektiv zu Plasmazellen reaktiviert werden. B-Zellen können aber auch in nicht-lymphatischen Geweben wie z.B. dem Synovialgewebe von RA-Patienten in sogenannten ektopischen Keimzentren zu Plasmazellen differenzieren (Kim et al., 2001; Schroder et al., 1996).

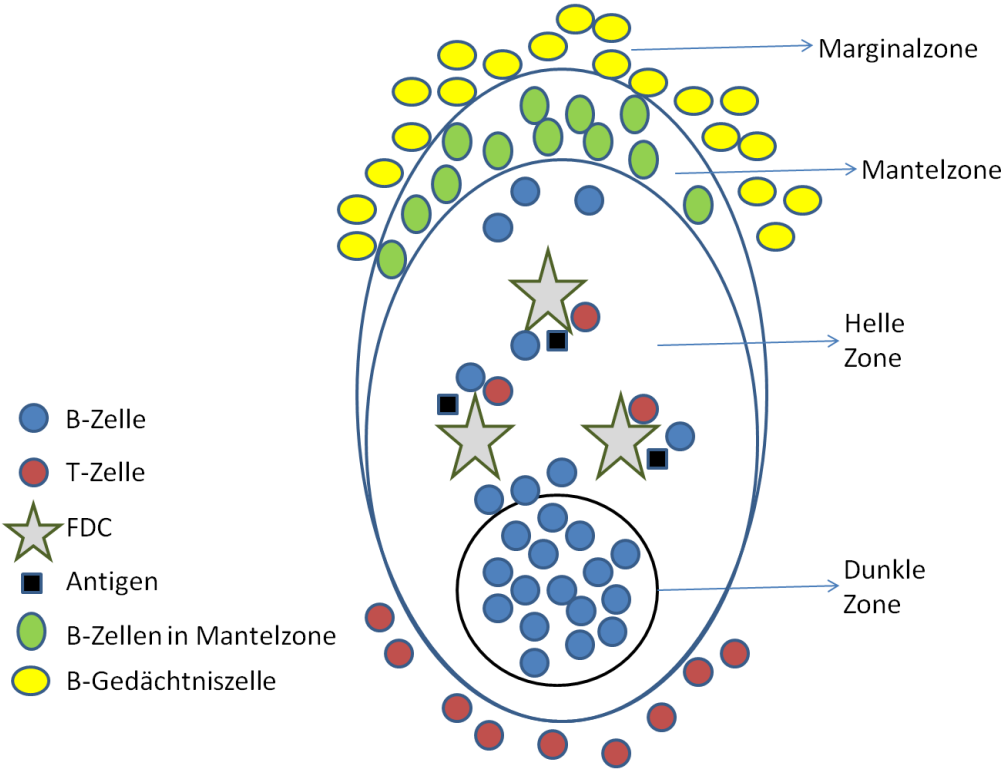


Abbildung 2: Schematische Darstellung der B-Zell-Differenzierung im Keimzentrum

Dargestellt ist die im Text beschriebene Differenzierung der B-Zellen über Zentrozyten zu B-Gedächtniszellen bzw. Plasmazellen im Keimzentrum.

Ettinger et al. (2007) konnten zeigen, dass sich B-Gedächtniszellen in der Milz allein durch IL-21-Exposition schnell in Plasmazellen differenzieren lassen. Aber auch IL-6 wird eine wichtig Rolle bei der Differenzierung von B-Gedächtniszellen in Plasmazellen

zugeschrieben. Neben IL-6 und IL-21 spielen auch die beiden TNF-Zytokine BAFF und APRIL für die Differenzierung und das Überleben von B- und Plasmazellen eine entscheidende Rolle. Ebenso wird Eosinophilen Zellen eine wichtige Rolle beim Überleben der Plasmazellen im Knochenmark zugeschrieben (Chu et al., 2011).

1.5.4 Antikörper

Antikörper können sowohl in membranständiger Form als auch in löslicher Form vorliegen und sind „Y“-förmige Moleküle. Sie lassen sich mit Hilfe der Protease Papain in zwei identische Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment spalten. Die Fab-Fragmente enthalten die Antigenbindungsstelle. Das Fc-Fragment dient der Anheftung an Zellen. Die beiden Fab-Fragmente bilden die Arme des „Y“, welche über ein bewegliches Gelenk („hinge“-Region) mit dem Fuß des „Y“, dem Fc-Fragment, verbunden sind (siehe Abbildung 3).

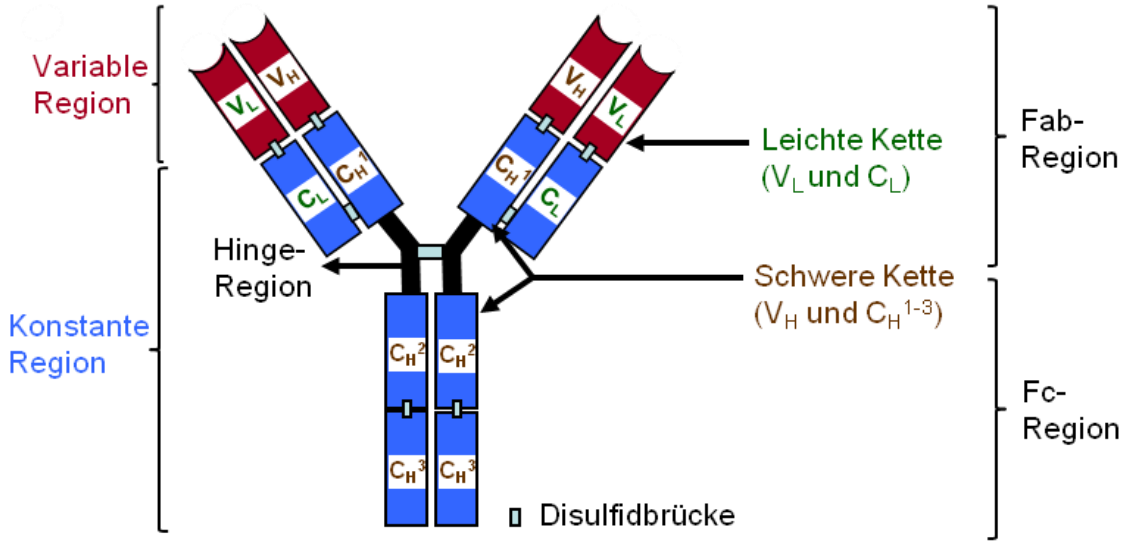


Abbildung 3: Aufbau eines Antikörpers

Schematische Darstellung eines Antikörpers. Die variablen Domänen einer leichten (VL) und einer schweren Kette (VH) bilden die Antigenbindungsstelle. Die konstante Domäne CH^3 ist die Fc-Rezeptor-Bindungsstelle.

Antikörper setzen sich aus je zwei identischen schweren Ketten, den H-Ketten, und je zwei identischen leichten Ketten, den L-Ketten zusammen. Diese sind über Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Die beiden L-Ketten gehören entweder dem kappa (κ)- oder dem lambda (λ)-Typ an und sind kürzer als die H-Ketten. Von den H-Ketten existieren fünf verschiedene Typen (μ, δ, γ, α und ε), die wiederum die Zugehörigkeit zu einer der fünf Antikörper-Klassen (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) definieren und die funktionellen Eigenschaften eines Antikörpers bestimmen. Jede dieser Ketten besteht aus einer vari-

ablen Region, die das Antigen bindet, und einer konstanten Region, die an Fc-Rezeptoren bindet und für die funktionellen Eigenschaften verantwortlich ist.

Dadurch, dass sowohl für die L-Kette als auch für die H-Kette mehrere Varianten für jedes Gensegment der variablen Domäne existieren, welche frei miteinander kombinierbar sind, entstehen 2 x 10^6 unterschiedliche Antikörper (siehe Tabelle 5). Die tatsächliche Anzahl wird allerdings auf mindestens 10^{10} verschiedene Antikörpermoleküle geschätzt (Berek und Milstein, 1988), welche sich in eben diesen variablen Regionen voneinander unterscheiden.

Tabelle 5: Anzahl der Gensegmente der variablen Domäne der L-und H-Kette

	leichte Kette		**schwere Kette**
	κ	**λ**	
Variables Segment	40	29	51
Diversitäts-Segment	0	0	27
Verbindungs (joining)-Segment	5	4	6
Gesamt	200	116	8262
L- und H-Kette gesamt	316 x 8262 = 2 x 10^6		
Tatsächliche Anzahl	10^{10}		

Diese zusätzliche Vielfalt der Antikörper entsteht während der B-Zellentwicklung, so verknüpft sich das vorher zusammengefügte Gen der variablen Region mit einem Gen der fünf konstanten Region-Typen (Janeway et al., 2006). Darüber hinaus erhöhen die junktionale Vielfalt und die somatische Hypermutation die enorme Anzahl an unterschiedlichen Antikörpermolekülen.

1.5.5 Autoantikörper bei RA-Patienten

Kennzeichnend für viele Autoimmunerkrankungen ist das Auftreten von Auto-Antikörpern. Der klassische Antikörper bei der RA ist der Rheumafaktor, ein Antikörper, der sich gegen den Fc-Rezeptor eines Immunglobulins vom IgG-Typ richtet und bis vor kurzem der einzige anerkannte Marker nach ACR-Kriterien von 1987 war (Skogh, 2005). In den neuen Klassifikationskriterien von 2010 sind nun Antikörper für citrullinierte Peptidantigene (ACPA) als weiterer Parameter hinzugekommen (Aletaha et al., 2010). Die ACPA lassen sich bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome beobachten, wodurch ihnen vor allem in der Früherkennung der RA eine wichtige Rolle zukommt (Skogh, 2005; van der Helm-van Mil et al., 2005). Darüber hinaus haben ACPA einen hohen prognostischen Wert. So entwickeln ACPA-positive RA-Patienten nachweislich

mehr Gelenkschädigungen als ACPA-negative RA-Patienten. Sie haben eine schlechtere Prognose und ein höheres Risiko für einen ungünstigeren Krankheitsverlauf als Patienten ohne ACPA.

Der Nachweis von ACPA besitzt im frühen Stadium der RA eine vergleichbare Sensitivität wie der Rheumafaktor (RF), weist aber mit 98 Prozent eine etwas höhere Spezifität auf als der RF mit 95 Prozent (Rantapää-Dahlqvist et al., 2003). Durch die Kombination des Nachweises von ACPA und RF vor dem Auftreten von RA-Symptomen erhöht sich die Spezifität auf fast 100 Prozent (Rantapää-Dahlqvist et al., 2003).

Die Bedeutung des Nachweises von ACPA und RF für die Diagnose der RA verdeutlicht, dass B- und Plasmazellen in der Pathogenese der RA eine wichtige Rolle spielen.

1.6 Therapie der RA

Zwar ist die Pathogenese der RA nach wie vor nicht vollständig verstanden und damit auch keine kausale Therapie möglich, jedoch ist eine medikamentöse Behandlung unumgänglich. Je früher mit einer Behandlung begonnen wird, desto günstiger wirkt sich dies auf die Prognose aus. Bleibt die RA dagegen unbehandelt, kann sie aufgrund von irreparablen Gelenkschäden bis zur Immobilität der Patienten führen. Das Ziel der RA-Therapie ist es, die Symptome zu lindern und die Spätfolgen zu vermeiden. Dafür kommen häufig Kombinationstherapien zur Anwendung, da Monotherapien i.d.R. nicht ausreichend sind. Einen Überblick zu den RA-Therapiemöglichkeiten gibt Tabelle 6.

Tabelle 6: Übersicht über mögliche Therapeutika bei der RA

Gruppe	***Beispiele***	***Wichtigsten Nebenwirkungen***
NSAR	Ibuprofen (Imbun) Diclofenac (Voltaren)	Geschwüre im Magen-Darm-Trakt
Cox-2-Hemmer	Celecoxib (Celebrex)	Erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen
Glukokortikoide	Prednisolon	Osteoporose
Basistherapeutika/ DMARD	Methotrexat (MTX) Leflunomid, (LEF) Hydroxychloroquin (HCQ) Sulfasalzin	Wirkungseintritt erst nach Wochen bis Monaten
Biologika	Rituximab (MabThera) Etanercept (Enbrel) Anakinra (Kineret)	

Im Vordergrund der symptomatischen Therapie stehen die Linderung von Gelenkschmerzen und -schwellungen sowie die Entzündungshemmung. Dafür kommen die Akuttherapeutika zur Anwendung, zu denen die Nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR), die selektiven Cyclooxygenase-2-Hemmer (COX-2-Hemmer, Coxibe) und die Glukokortikoide gehören, wobei die Glukokortikoide teilweise auch immunsuppressiv wirksam sind. Der Vorteil dieser drei Medikamente besteht in einem schnellen Wirkungseintritt. Als häufigste Nebenwirkung ist bei den NSAR das erhöhte Risiko für die Entstehung von Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren zu nennen, weswegen die hochselektiven COX-2-Hemmer als Alternative entwickelt wurden. Diese haben ein geringeres gastrales Risiko, können allerdings mit kardiovaskulären Erkrankungen einher gehen. Die schwerwiegendste Nebenwirkung der Glukokortikoide ist die Osteoporose.

Zur Prävention vor Gelenkschäden sowie Verlangsamung der Progression der RA dienen die Basistherapeutika, die auch als krankheitsmodifizierende Antirheumatika (DMARD) bezeichnet werden. Charakteristisch für alle Basistherapeutika ist der verzögerte Wirkungseintritt nach Wochen oder Monaten.

Dank des immer weiter wachsenden Verständnisses über die Immunpathologie im Entzündungsgeschehen der RA gibt es seit 1999[12] eine weitere Alternative in der RA-Therapie, nämlich die Biologika (siehe Tabelle 7). Die Biologika, die ursprünglich zur Therapie der Sepsis entwickelt wurden, stellen biotechnologisch hergestellte humanisierte, chimäre oder vollhumane monoklonale Antikörper dar (siehe Abbildung 4).

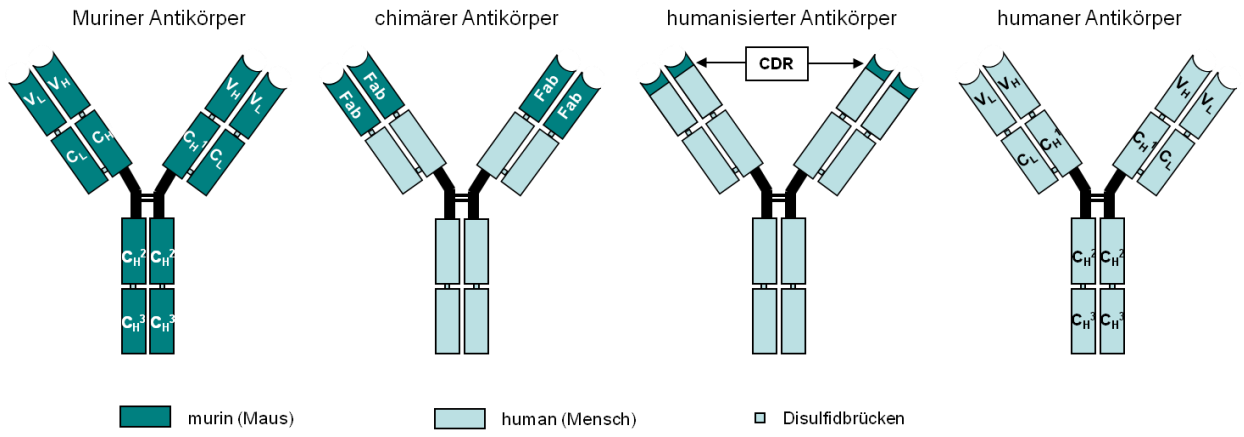


Abbildung 4: Verschiedene Antikörpertypen zur RA-Therapie

Die chimären Antikörper besitzen eine murine Fab-Region. Bei humanisierten Antikörpern sind nur die Antigenbindungstellen aus Mausprotein.

[12] Die erste Behandlung mit einem TNFα-Blocker erfolgte bereits 1992.

Biologika kommen zum Einsatz, wenn mit Basistherapeutika alleine kein ausreichender Therapieerfolg mehr erzielt wird. Sie hemmen nur einzelne Botenstoffe des rheumatischen Entzündungsprozesses, wodurch die physiologische Abwehr nicht beeinträchtigen wird. Vorteilhaft ist ferner, dass ihre Wirkung meistens innerhalb der ersten Therapietage einsetzt. Wie in Tabelle 7 zusammengefasst, gehören zu den Biologika antagonistisch wirkende Medikamente gegen TNFα, IL-1 und IL-6 sowie Hemmer der T-Zell- oder B-Zell-Aktivität. Rituximab beispielsweise ist ein in der EU seit 2006 für die RA-Behandlung zugelassener chimärer monoklonaler Antikörper, welcher an das B-Zell-spezifische Oberflächenantigen CD20 bindet. Dadurch wird eine vorübergehende B-Zelldepletion[13] und Remission der RA erreicht. Hier wird erneut deutlich, dass B-Zellen an der Pathogenese der RA entscheidend beteiligt sind.

Tabelle 7: Übersicht bereits zugelassener sowie erfolgversprechender Biologika zur Behandlung der RA

Substanz	***Handelsname***	***Aufbau***	***Wirkprinzip***
Abatacept	Orencia	Fusionsprotein CTLA-4 und Fc-Teil von Ig1	bremst T-Zell-Aktivierung durch Unterbrechung des costimulatorischen Signals, CD 28 : CD 80/86 Interaktion
Anakinra	Kineret	humaner monoklonaler Antikörper gegen IL-1	Antagonist gegen IL-1
Adalimumab	Humira	humaner monoklonaler Antikörper gegen TNFα	Blockierung von TNFα und -β
Etanercept	Enbrel	chimärer monoklonaler Antikörper gegen TNFα	Blockierung von TNFα und Lymphotoxin
Infliximab	Remicade	chimärer monoklonaler Antikörper gegen TNFα	Blockierung von TNFα
Rituximab	MabThera (EU), Rituxan (USA)	chimärer monoklonaler Antikörper gegen CD20	Depletion von CD20-B-Zellen
Tocilizumab	Actemra	humaner monoklonaler Antikörper gegen IL-6	Antagonist gegen IL-6

CD: cluster of differentiation, CTAL-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, Fc: fragment crystallizable, IL: Interleukin

1.7 Zytokine der TNF-Familie und ihre Rezeptoren

Die TNF-Familie setzt sich aus TNF-Liganden und TNF-Rezeptoren zusammen. Alle Mitglieder der TNF-Familie weisen eine mindestens 15- bis 25-prozentige Aminosäu-

[13] Plasmazellen und Pro-B-Zellen werden durch Rituximab nicht eliminiert.

resequenz-Homologie miteinander auf (Gaur und Aggarwal, 2003). Bisher sind 19 TNF-Liganden und 29 TNF-Rezeptoren identifiziert (Jin et al., 2007). Einige der TNF-Liganden docken an mehrere TNF-Rezeptoren an und einige TNF-Rezeptoren interagieren mit mehreren TNF-Liganden (Hehlgans und Pfeffer, 2005). Durch die Bindung der TNF-Liganden an ihre spezifischen Rezeptoren kommt es zur Aktivierung von Signalwegen, welche wichtige biologische Reaktionen wie Proliferation, Differenzierung, Überleben und Apoptose induzieren (López-Fraga et al., 2001; Gaur und Aggarwal, 2003, Pradet-Balade et al., 2002).

1.7.1 TNF-Liganden

Bei den TNF-Liganden handelt es sich um transmembranständige Proteine vom Typ II, mit Ausnahme von APRIL (Lopez-Fraga et al., 2001) und LTα[14] (Armitage, 1994). Die TNF-Liganden sind Zytokine, die durch Rezeptorbindungen die Kommunikation zwischen Zellen ermöglichen. Dabei können sie endokrin, parakrin oder autokrin wirken (Schneider et al., 1999).

TNF-Liganden haben eine homotrimere Struktur und sind an der Oberfläche von Zellen lokalisiert (Mackay et al. 2003; Ingold et al., 2005). Sie weisen eine carboxyterminale extrazelluläre sowie eine aminoterminale intrazelluläre Domäne auf, die beide durch eine Transmembran-Domäne miteinander verbunden sind. Dabei weisen sie in einem etwa 150 Aminosäuren umfassenden Bereich ihrer extrazellulären Domäne strukturelle Ähnlichkeiten von etwa 20 bis 30 Prozent auf (Bodmer et al., 2002; Treml et al., 2009). Dieser homologe Bereich der TNF-Liganden wird als TNF-Homologie-Domäne (THD) bezeichnet und ist für die Rezeptorbindung verantwortlich (Bodmer et al., 2002). Des Weiteren ist die THD für die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur der TNF-Zytokine entscheidend (Bodmer et al., 2002). Zwischen der THD und der Transmembrandomäne finden sich „stalk“-Regionen, welche Erkennungssequenzen für verschiedene Proteasen (z.B. Furin) enthalten, die zur Freisetzung von löslichen Liganden aus den membranständigen Vorläufermolekülen führen können. Dadurch existieren die meisten Mitglieder der TNF-Familie nicht nur in membrangebundener sondern nach proteolytischer Spaltung oder alternativem Spleißen ebenso in löslicher Form (Bodmer et al., 2002). Während die membranständigen TNF-Liganden alle aktiv sind, können die

[14] APRIL und LTα existieren nur in löslicher Form und sind somit nicht membranassoziiert. LTα bildet aber auch membranassoziierte Heterotrimere mit LTβ.

löslichen TNF-Liganden auch inaktiv sein, jedoch sind bei den meisten TNF-Liganden beide Formen aktiv (Hehlgans und Pfeffer, 2005; Treml et al., 2009). Die Mehrzahl der TNF-Liganden bindet zwischen einem bis drei Rezeptoren, einige wenige Mitglieder können mit bis zu fünf TNF-Rezeptoren interagieren (Bossen et al., 2006; Treml et al., 2009).

1.7.2 BAFF und APRIL

In der TNF-Liganden-Familie weisen BAFF und APRIL mit 50 Prozent die höchsten Sequenzähnlichkeiten miteinander auf (Mackay et al., 2003). BAFF und APRIL wurden erstmals 1998 von verschiedenen Gruppen beschrieben und mit unterschiedlichen Namen versehen, weshalb für beide Zytokine mehrere Bezeichnungen existieren (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Akronyme für BAFF und APRIL

Akronyme	*Vollständige Bezeichnung*	*Quelle*
BAFF	**B-Zell-aktivierender Faktor der TNF-Familie**	Schneider et al. 1999
CD257	cluster of differentiation 257	
TNFSF13B	TNF-Superfamily Member 13B	
TNFSF20	TNF-Superfamily Member 20	
BLyS	B lymphocyte Stimulator	Moore et al., 1999
TALL-1	TNF- and ApoL related leukocyte-expressed ligand 1	Shu et al., 1999
Thank	TNF Homolog that activates apoptosis, nuclear factor-κB and c-Jun NH2-terminal kinase	Mukhopadhyay et al., 1999
zTNF4		Gross et al., 2000
APRIL	**a proliferation-inducing ligand**	Hahne et al., 1998
CD256	cluster of differentiation 256	
TNFSF13A	TNF-Superfamily Member 13A	
TRDL-1α	TNF-related death ligand-1α	Kelly et al., 2000
TALL-2	TNF- and ApoL related leukocyte-expressed ligand 2	Shu et al., 1999

BAFF und APRIL sind an vielen immunologischen Geschehnissen wie dem Überleben von B- und Plasmazellen, dem T-Zell-unabhängigen Antikörper-Klassenwechsel oder der Induktion autoreaktiver B-Zellen beteiligt (Schneider, 2005). Eine Dysregulation im

BAFF- und APRIL-System spielt bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten eine entscheidende Rolle.

In der Regel liegen BAFF und APRIL als Homotrimere vor, sie sind aber auch im Stande heterotrimere Moleküle zu bilden, wenn sie koexprimiert werden. Diese BAFF/APRIL-Heterotrimere sind vor allem in den Seren von Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie RA, SLE oder Sjögren's Syndrom nachweisbar und interagieren ausschließlich mit dem TACI-Rezeptor (Roschke et al., 2002).

Während BAFF vor allem das Überleben von peripheren unreifen B-Zellen sicherstellt, garantiert APRIL hauptsächlich die Plasmazell-Aktivität und somit die humorale Immunantwort sowie den Antikörperklassenwechsel. Das Überleben sowie die Funktion der B-Gedächtniszellen scheint dagegen BAFF- und APRIL-unabhängig zu sein (Benson et al., 2008).

1.7.2.1 BAFF

BAFF, dessen Gen sich auf dem humanen Chromosom 13 befindet (Moore et al., 1999; Schneider et al., 1999), ist in seiner physiologischen Funktion ein essentieller Überlebensfaktor für B-Zellen. BAFF ist unerlässlich für die Homöostase von B-Zellen, so dass eine Dysregulation von BAFF erhebliche Veränderungen im B-Zell-Pool verursacht. Ein Überschuss an BAFF führt zu einer Überproduktion von Antikörpern (Hypergammaglobulinämie). Ein Mangel an BAFF führt hingegen zum Fehlen von Antikörpern (Hypogammaglobulinämie) (Gavin et al., 2003). Eine verstärkte BAFF-Expression lässt sich bei vielen Autoimmunerkrankungen wie Sjögren's Syndrom, SLE, Multiple Sklerose und RA nachweisen (Groom et al., 2002; Krumbholz et al., 2005a; Mackay et al., 2005, Roschke et al., 2002; Seyler et al., 2005).

BAFF wird hauptsächlich von myeloiden Zellen exprimiert (siehe Tabelle 9). Nach der anfänglichen Annahme, dass B-Zellen selbst nicht in der Lage sind, BAFF zu exprimieren (Moore et al., 1999; Shu et al., 1999), konnte mittlerweile gezeigt werden, dass auch aktivierte B- und Plasmazellen bei SLE-Patienten (Chu et al., 2009) sowie B-Zellen nach maligner Transformation (Novak et al., 2002) dazu in der Lage sein können.

BAFF selbst scheint die Expression der antiapoptotischen Faktoren Bcl-2, A1 und Bcl-XL zu induzieren und das proapoptotische Protein Bak zu hemmen (Hsu et al., 2002; Batten et al., 2000). So werden B-Zellen vor Apoptose geschützt. Eine Überexpression

von Bcl-2 führt allerdings zu eine B-Zell-Hyperplasie und Symptomen von Autoimmunerkrankungen (Mackay und Browning, 2002).

Tabelle 9: Darstellung der BAFF- und APRIL-Expression

	BAFF	***APRIL***
Expression von:	Monozyten/Makrophagen	Monozyten/Makrophagen
	Dendritische Zellen	Dendritische Zellen
	Neutrophile	Neutrophile
	aktivierte T-Zellen	aktivierte T-Zellen (fraglich)
	Osteoklasten	Osteoklasten
	Mastzellen	Mastzellen
	Astrozyten	Tumorzellen
	Stromazellen	Eosinophile
	Aktivierte B-Zellen	Aktivierte B- und Plasmazellen
	Synoviale Fibroblasten	
Interaktion mit:	BAFF-R, TACI, BCMA	TACI, BCMA, Proteoglykane
Expression durch Zytokine:	IL-10, IFN-γ und CD40L	IFN-γ, IFN-α, LPS und CD40L

Die Darstellung basiert auf folgenden Quellen: Schneider et al. (1999), Shu et al. (1999), Mackay und Browning (2002), Litinskiy et al. (2002), Nardelli et al. (2001), Craxton et al. (2003), Gavin et al. (2003), Scapini et al. (2003), Mackay et al. (2007), Gorelik et al. (2003), Moreaux et al. (2005), Krumbholz et al. (2005b), Ohata et al. (2005).

Ein Mangel an BAFF führt in Mäusen zum vollständigen Stillstand der peripheren B-Zellen im Stadium T1, da der Übergang von T1- zu T2-B-Zellen blockiert ist (Gross et al, 2001). Die Anzahl der unreifen B-Zellen ist normal, aber die Anzahl an Marginalzonen-B-Zellen und peripheren B-Zellen ist stark vermindert. Der Phänotyp ähnelt dem eines BAFF-R-Mangels (Thompson et al., 2001; Yan et al., 2001).

Eine Überexpression von BAFF führt in Mäusen zu einem Anstieg reifer B-Zellen, einer Splenomegalie sowie einer vermehrten Produktion von Autoantikörpern, was sehr an das Krankheitsbild des SLE erinnert (Gross et al., 2000; Marsters et al., 2000; Xia et al., 2000). Zudem weisen transgene BAFF-Mäuse (Überexpression von BAFF) hohe Bcl-2-Konzentrationen auf, weshalb T2-B-Zellen und Marginalzonen-B-Zellen bei transgenen Mäusen stark vergrößert sind (Batten et al., 2000).

BAFF kommt sowohl in einer membranständigen als auch in einer löslichen Form vor (Schneider et al., 1999; Mackay et al., 2003; Moore et al., 1999; Gavin et al., 2003). Die lösliche BAFF-Variante wird an der Zellmembran durch eine Furin-Protease in die lösliche Form überführt wird (Lopez-Fraga et al., 2001; Bossen et al., 2008). Membranstän-

diges und lösliches BAFF scheinen gleich aktiv zu sein (Schneider et al., 1999). Während membrangebundenes BAFF nur als Trimer vorliegt, ist lösliches BAFF ab pH-Werten von 7,4 in der Lage Virus-ähnliche Cluster mit bis zu 60 BAFF-Monomeren (20-Trimere) zu bilden (Liu et al., 2002; Bossen et al, 2008). Darüber hinaus existiert eine alternative Spleißform von BAFF, die erstmals 2003 von Gavin et al. beschrieben und Delta-BAFF genannte wurde. Des Weiteren ist BAFF auch in der Lage Heterotrimere oder gar Heteromultimere mit APRIL zu bilden, die v.a. bei Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen hochreguliert sind (Roschke et al., 2002).

1.7.2.2 APRIL

Der engste Familienangehörige von BAFF ist APRIL, dessen Gen sich beim Menschen auf Chromosom 17 befindet (Schneider et al., 1999). Primär wurde APRIL in Tumorgewebe entdeckt, in welchem es das Tumorzell-Wachstum beschleunigt, weshalb es nach eben dieser Funktion als Proliferationsinduzierender Faktor benannt wurde (Hahne et al., 1998). APRIL wird im Wesentlichen von den gleichen Zellen exprimiert wie BAFF (siehe Tabelle 9). Zusätzlich wird APRIL von verschiedenen Tumorzelltypen exprimiert (Seyler et al., 2005). Darüber, ob APRIL auch von T-Zellen exprimiert wird, herrscht Uneinigkeit. So beschreiben beispielsweise Stein et al. (2002) eine APRIL-Expression in T-Zellen, während Ng et al. (2004) kein APRIL in T-Zellen nachweisen konnten. Aber auch B- und Plasmazellen von SLE-Patienten können APRIL exprimieren (Chu et al., 2009). Des Weiteren fanden Chu et al. (2011), dass APRIL im Knochenmark von Mäusen nicht nur von Makrophagen sondern auch von Eosinophilen exprimiert wird.

Die biologische Rolle von APRIL scheint vielfältig zu sein. So weist APRIL eine Wachstumsstimulierende Aktivität in Tumorzellen auf (Hahne et al., 1998), eine pro-apoptotische Wirkung (Kelly et al., 2000) sowie eine schützende Wirkung gegen den Liganden-induzierten Zelltod (Roth et al., 2001). APRIL ist überaus wichtig für das Überleben der Plasmazellen und scheint vor allem für die Thymus-unabhängige B-Zell-Immunantwort ausschlaggebend zu sein (Hardenberg et al., 2008).

Der Phänotyp von APRIL-defizienten Mäusen ist milder als der von BAFF- oder BAFF-R-defizienten Mäusen. Dies deutet daraufhin, dass BAFF einige APRIL-Funktionen ersetzen kann (Ingold et al, 2005). APRIL kann hingegen in BAFF-defizienten Mäusen den Verlust von BAFF nicht kompensieren (Gross et al., 2001; Schneider, 2005; Bossen

et al., 2006). APRIL-überexprimierte Mäuse weisen keine Akkumulation von B-Zellen auf (Stein et al., 2002).

Da APRIL bereits intrazellulär im Golgi-Apparat von einer Furin-Protease gespalten wird, liegt es ausschließlich in löslicher Form vor (Lopez-Fraga et al., 2001). Es existiert aber auch eine Zellmembran-verankerte Variante, die durch alternatives Spleißen entsteht (Pradet-Balade et al., 2002). Dieses Fusionsprotein, genannt TWE-PRIL (TNFSF12-TNFSF13), setzt sich aus der kompletten extrazellulären Domäne vom APRIL und der zytoplasmatischen Domäne sowie einem Teil der extrazellulären Domäne vom benachbarten TWEAK zusammen (Pradet-Balade et al., 2002). Da die extrazelluläre Domäne dieses Fusionsproteins die gesamte THD von APRIL beinhaltet, wird vermutet, dass TWE-PRIL dieselbe Rezeptor-Spezifität wie APRIL aufweist und dieselben Rezeptoren bindet (Pradet-Balade et al., 2002). Somit ermöglicht TWE-PRIL die Membran-Verankerung der APRIL-Rezeptorbindenden Domäne (Pradet-Balade et al., 2002).

1.7.3 TNF-Rezeptoren

Bei der TNF-Rezeptorfamilie handelt es sich zum überwiegenden Teil um Typ I Transmembranproteine (Bodmer et al., 2002), die eine extrazelluläre aminoterminale Domäne und eine intrazelluläre carboxyterminale Domäne aufweisen.

Das gemeinsame Merkmal alle TNF-Rezeptor-Mitglieder ist die Wiederholung eines cysteinreichen Motivs in der extrazellulären Domänen (Bodmer et al., 2002), welches normalerweise 6 bis 8 Cysteine beinhaltet (Mackay und Browning, 2002) und wesentlich zur Ligandenbindung beiträgt. Innerhalb der TNF-Rezeptoren werden zwei Arten von Rezeptoren unterschieden: die Apoptose-induzierenden Rezeptoren (Todesrezeptoren), die über eine sogenannte Todesdomäne verfügen und deren Aktivierung zum programmierten Zelltod führt sowie die antiapoptotisch-wirkenden Rezeptoren (Nicht-Todesrezeptoren), die über Rekrutierung sogenannter TNF-Rezeptor-assoziierter Faktoren (TRAFs) immunregulatorische Effekte und Entzündungsreaktionen vermitteln. Zur Gruppe der Nicht-Todesrezeptoren zählen u.a. TNFRSF 13B (TACI) (Xia et al., 2000), TNFRSF 13C (BAFF-R) (Thompson et al., 2001) und TNFRSF 17 (BCMA) (Hatzoglou et al., 2000).

1.7.4 BAFF- und APRIL-Rezeptoren

BAFF und APRIL interagieren mit den beiden TNF-Rezeptoren TACI und BCMA, (Marsters et al., 2000; Khare und Hsu, 2001). Zusätzlich kommuniziert BAFF mit dem BAFF-R, welcher ausschließlich BAFF bindet (Mackay und Browning, 2002). Bei Mäusen ist allerdings die kürzere der beiden APRIL-Varianten ebenfalls in der Lage mit dem murinen BAFF-R zu interagieren (Bossen et al., 2006). Als dritter APRIL-Rezeptor wurden Glykosaminoglykan-Ketten (GAG) von Proteoglykanen auf Nicht-Hämatopoetischen Zellen (Tumor-, B- und T-Zellen) identifiziert (Ingold et al., 2005).

Im Gegensatz zu den meisten TNF-Rezeptoren, welche Typ I Transmembranproteine sind, zählen BCMA, TACI und BAFF-R zu den Typ-III-Transmembranproteinen, denn sie enthalten nicht die typische aminoterminale Signalsequenz (Marsters et al., 2000).

Während die anderen TNF-Rezeptor-Mitglieder über mindestens drei oder vier cysteinreiche Domänen (CRDs) in ihren extrazellulären Domänen verfügen, weisen BCMA, TACI und BAFF-R eine reduzierte Anzahl an CRDs auf. So verfügt BAFF-R lediglich über eine partielle CRD, BCMA über eine und TACI über zwei, wobei nur die CDR 2 für die BAFF- sowie APRIL-Bindung relevant ist (Hatzoglou et al., 2000; Hymowitz et al., 2005; Mackay und Browning, 2002; Thompson et al., 2001;).

Tabelle 10: BAFF- und APRIL-Rezeptoren

CD	*Synonym*	*Expression auf:*	*Funktion:*
CD267	TACI, TNFRSF13B	B-Zellen, Plasmazellen (gering), aktivierte T-Zellen	bindet APRIL und BAFF gleich stark, bindet APRIL/BAFF-Heterotrimere
CD268	BAFF-R, TNFRSF13C	CD19-pos. B-Zelle, T-Gedächtniszellen	hochselektiv für BAFF
CD269	BCMA, TNFRSF17	Plasmazellen, reife B-Zellen im Keimzentrum	bindet APRIL stärker als BAFF
	HSPG		bindet APRIL und TACI

1.7.4.1 Expression von BAFF-R, BCMA und TACI

Die Expression von BCMA und BAFF-R ist hauptsächlich auf B-Zellen beschränkt (Thompson et al., 2001; Gras et al., 1995), TACI wird auch teilweise von aktivierten T-Zellen exprimiert (Gross et al., 2001; Gavin et al., 2003). Der BAFF-R wird im Laufe der

B-Zell-Differenzierung als erster der drei BAFF-Rezeptoren exprimiert, findet sich fast ausschließlich auf unreifen CD-19-positiven B-Zellen (Novak et al., 2004) und ist auf Plasmazellen runter reguliert (Avery et al., 2003). Die Expression von BCMA steigt hingegen mit zunehmender Differenzierung der B-Zellen, so dass Plasmazellen die höchste Anzahl von BCMA aufweisen (Mackay und Browning, 2000; Avery et al., 2003; O'Connor et al., 2004). Ebenso wie der BAFF-R wird auch TACI mit zunehmender Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen runter reguliert (Zhang et al., 2005). Der BAFF-R ist somit der dominante Rezeptor auf naiven B-Zellen (Zhang et al., 2005), während BCMA der dominante Rezeptor auf Plasmazellen ist (siehe Abbildung 5).

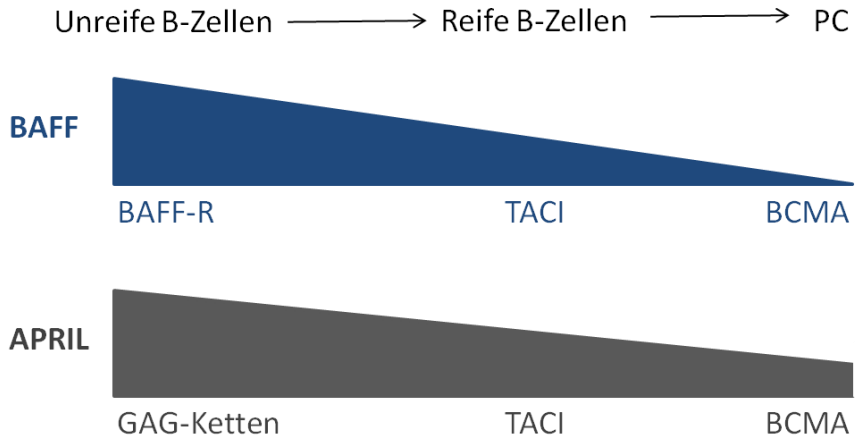


Abbildung 5: Expression der BAFF- und APRIL-Rezeptoren

Die Abbildung zeigt die Expression der BAFF- und APRIL-Rezeptoren im Verlaufe der B-Zell-Reifung. Der BAFF-R wird als erster der drei Rezeptoren bei der B-Zell-Reifung exprimiert und findet sich somit hauptsächlich auf unreifen B-Zellen. Der TACI-Rezeptor wird v.a. auf reifen B-Zellen exprimiert. BCMA ist in erster Linie auf Plasmazellen zu finden. Der BAFF-R bindet ausschließlich BAFF, die GAG-Ketten von Proteoglykanen binden ausschließlich APRIL.

1.7.4.2 Interaktion der BAFF- und APRIL-Rezeptoren mit BAFF und APRIL

Wie in Abbildung 6 dargestellt, bindet BAFF den BAFF-R mit der höchsten Affinität und BCMA mit der geringsten Affinität (Mackay und Browning, 2002). APRIL interagiert mit den GAG-Ketten von Proteoglykanen und bindet BCMA mit höherer Affinität als TACI (Marsters et al., 2000; Ingold et al, 2005). BCMA weist eine 1000-fach höhere Affinität für APRIL als für BAFF auf (Patel et al., 2004; Ingold et al., 2005). Für TACI ist beschrieben, dass es BAFF und APRIL in etwa gleich gut bindet (Bossen und Schneider 2006).

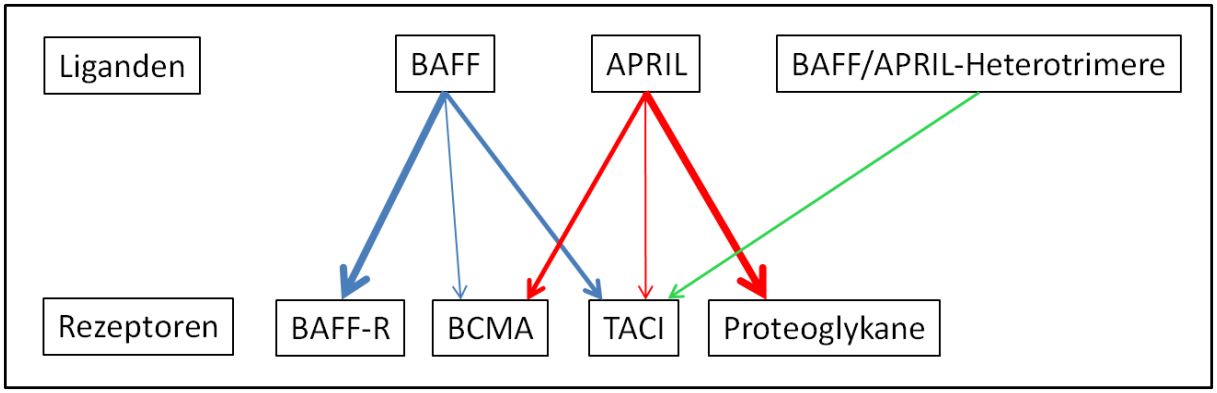


Abbildung 6: Affinitätsverhalten der BAFF- und APRIL-Rezeptoren

Der BAFF-R bindet BAFF mit der höchsten Affinität der drei BAFF-Rezeptoren. Die GAG-Ketten von Proteoglykanen sind spezifisch für APRIL und binden APRIL mit der höchsten Affinität. Sowohl TACI als auch BCMA binden BAFF und APRIL, dabei bindet BCMA APRIL mit höherer Affinität als BAFF. BAFF und APRIL bilden auch Heterotrimere, die ausschließlich an den TACI-Rezeptor andocken. Für BAFF gilt: BAFF-R > TACI > BCMA. Für APRIL gilt: HSPG < BCMA < TACI.

Der BAFF-R ist in der Lage mit allen BAFF-Formen zu interagieren. TACI ist der einzige Rezeptor, der auch heterotrimere Komplexe aus BAFF und APRIL zu binden vermag (Roschke et al., 2002). Zusätzlich ist TACI, ebenso wie APRIL, in der Lage mit Proteoglykanen zu interagieren (Ingold et al., 2005; Bischof et al., 2006; Kimberley et al., 2009). So identifizierten Bischof et al. (2006) das Heparansulfat-Proteoglykan Syndecan-2 als Bindungspartner für TACI.

Die intrazelluläre Domäne von BAFF-R interagiert mit dem TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor (TRAF) 3, der über die NF-kappaB-Induktion-Kinase (NIK) zur Hochregulierung von Bcl-2-Familienmitgliedern führt und den programmierten Zelltod hemmt (Treml et al., 2009). Die intrazelluläre Domäne von BCMA interagiert mit TRAF 1, 2 sowie 3 und die intrazelluläre Domäne von TACI mit TRAF 2, 5 und 6 (Treml et al., 2009).

1.7.4.3 Funktion

Für BAFF ist in erster Linie die Interaktion mit dem BAFF-R entscheidend, wodurch das periphere B-Zell-Überleben reguliert wird (Ng et al., 2004). APRIL konzentriert sich vor allem auf die Interaktion mit BCMA. TACI überwacht die B-Zell-Homöostase, indem es die B-Zell-Proliferation kontrolliert.

Da APRIL nicht an den BAFF-R andockt, galt APRIL lange als entbehrlich für die B-Zell-Reifung (Liu et al., 2003). Jedoch leitet APRIL über BCMA wichtige Überlebenssignale an Plasmazellen (Avery et al., 2003; O'Connor et al., 2004), somit ist das Plasmazell-Überleben abhängig von BCMA.

Mäuse, denen der BAFF-R fehlt, gleichen phänotypisch BAFF-knock-out Mäusen und zeigen einen kompletten Verlust reifer B-Zellen aufgrund eines Blocks der B-Zell-Entwicklung im T1-Stadium (Thompson et al., 2001; Yan et al., 2001; Mackay und Browning, 2002). Die BAFF/BAFF-R Interaktion ist somit verantwortlich für das periphere B-Zell-Überleben und die B-Zell-Entwicklung (Avery et al., 2003).

Mäuse, denen BCMA fehlt, zeigen eine normale B-Zell-Reifung (Mackay et al., 2003; Schneider et al., 2001; Xu und Lam, 2001). Somit scheint BCMA entbehrlich für die frühe B-Zell-Differenzierung zu sein (Liu et al., 2003). Möglicherweise kann BAFF über Bindung an den BAFF-R auf Plasmazellen und B-Zellen den Verlust von BCMA kompensieren (Ng et al., 2004).

Bei Mäusen führt das Fehlen von TACI zu einer unkontrolliert starken B-Zell-Proliferation, sichtbar an vergrößerter Milz, Lymphknoten sowie der Entwicklung von B-Zell-Lymphomen bei 15 Prozent der Mäuse und einer Prädisposition zur Autoimmunität (von Bülow et al., 2001; Yan et al., 2001; Seshasayee et al., 2003; Hymowitz et al., 2005). Beim Menschen hingegen manifestiert sich der TACI-Mangel in erster Linie als ein Antikörper-Mangel-Syndrom mit normaler oder leicht reduzierter B-Zell-Zahl (Castigli et al., 2005; Salzer et al., 2007).

Durch die Interaktion zwischen APRIL und den GAG-Ketten von Proteoglykanen auf Tumorzellen scheint vor allem das Überleben von Tumorzellen vermittelt zu werden (Ingold et al., 2005). Die Bindung zwischen APRIL und GAG-Ketten könnte auch dazu dienen, APRIL um definierte anatomische Regionen zu konzentrieren.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Interaktion zwischen BAFF und dem BAFF-R das Überleben der B-Zellen, die Interaktion über BCMA vor allem mit APRIL das Überleben der Plasmazellen sichert und die Interaktion über TACI die B-Zell-Aktivierung unterdrückt.

1.8 Zielsetzung und Fragestellungen der Arbeit

Bei der RA handelt es sich um eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung, die mit einer Dysregulation des Immunsystems einhergeht und an deren Pathogenese zweifelsohne B- und Plasmazellen eine bedeutende Rolle spielen. Auch die Wirksamkeit der B-Zell-gerichteten Therapien bei RA-Patienten durch beispielsweise Rituximab verdeutlichen, dass B-Zellen bei der Pathogenese der RA eine ebenso bedeutende Rol-

le einnehmen wie Plasmazellen, die die Produzenten der Auto-Antikörper sind. Für das Überleben, die Reifung und Differenzierung der B- und Plasmazellen nehmen die beiden eng verwandten Zytokine BAFF und APRIL sowie ihre drei TNF-Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA eine wichtige Schlüsselfunktion ein. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Zellen zu identifizieren, die für die Produktion von BAFF und APRIL im entzündeten Synovialgewebe bei RA-Patienten verantwortlich sind. Dafür werden Gewebeproben von rheumatisch entzündetem Gewebe präpariert und die BAFF- und APRIL-Expression mittels Immunfluoreszenzfärbungen untersucht.

In der vorliegenden Arbeit soll folgenden Fragestellungen nachgegangen werden:

1. In welchen Bereichen im rheumatisch veränderten Synovialgewebe werden BAFF und APRIL exprimiert?
2. Welche Zellen produzieren BAFF und APRIL?
3. Gibt es eine autokrine BAFF- und APRIL-Expression durch B- oder Plasmazellen?
4. Findet sich eine vermehrte BAFF und/oder APRIL-Expression in Geweben mit B-Lymphozyten- bzw. Plasmazellinfiltraten?
5. Korreliert die BAFF- und/oder APRIL-Expression mit dem Grad der Entzündung oder mit DAS?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Im Folgenden werden die häufig gebrauchten Geräte, Lösungen und Materialien sowie die verwendeten Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe aufgeführt.

2.1.1 Geräte

Fluoreszenzmikroskop:	Axioplan HBO 100 W/2, Zeiss
Gefriermikrotom (Cryocuts):	Microm HM 500 OM
Feuchtkammer:	DRFZ
Laser Capture Microdissection:	Veritas
Zentrifugen:	Heraeus Biofuge pico, Janke & Kunkel VF2

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Laborfilm:	Parafilm (American National Can)
Fettstift:	Dako Pen, Dako
Handschuhe:	Kimberly-Clark
Messer für Mikrotom:	Microedge (Microm)
Objektträger Perma-Frost:	Menzel-Gläser
Pipettenspitzen (steril, gefiltert):	Greiner, Biozym
Reaktionsgefäße 0,5; 1,0; 2,0ml:	Eppendorf
Einbettmedium OCT[15]:	Tissue Tec
Gewebeschälchen (10x10x5mm):	Tissue Tec

2.1.3 Lösungen

PBS-Puffer:	130 mM NaCl, 10 mM NaPhosphat-Puffer
3% PBS/BSA:	3% bovines Serum-Albumin (Rinderserumalbumin) in PBS gelöst
Aceton:	Merck, Darmstadt

[15] Organische Kationentransporter

2.1.4 Monoklonale Antikörper

Für die immunhistologische Darstellung kommen die in Tabelle 11 zusammengestellten Primärantikörper zum Einsatz. Die Primärantikörper binden dort, wo sich das passende Antigen befindet und sind so in der Lage, Oberflächenantigene zu identifizieren. Um diese Bindung nachzuweisen, müssen die Primärantikörper sichtbar gemacht werden. Hierfür werden fluoreszierende Sekundärantikörper verwendet, welche gegen das Fc-Fragment der Tierart gerichtet sind, aus dem der Primärantikörper gewonnen wurde.

Zur Erkennung von B-Zellen und Plasmazellen eignet sich vor allem der monoklonale Antikörper CD20, welcher mit dem Epitop des CD20-Antigens reagiert sowie der Wue-1-Antikörper, der das Zytoplasma von Plasmazellen anfärbt. Wue-1 wird exprimiert, wenn B-Zell-Marker verloren gehen und die sekretorische Aktivität der Plasmazellen erscheint (Greiner et al., 2000). Zur Darstellung der synovialen Gefäße wird der Antikörper CD31 und zur Darstellung der synovialen Fibroblasten der Antikörper CD55 genutzt.

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper

Primärantikörper	***Zelltyp/ Struktur***	***Epitop***	***Klon***	***Firma***
mCD4	T-Helferzellen	CD4	MT310	Dako, Denmark
mCD8	T-Killerzellen	CD8	DK25	Dako, Denmark
mCD14	Monozyten	CD14	TÜK4	Dako, Denmark
mCD20	B-Zellen	CD20	L26	Dako, Denmark
mCD27	B-Gedächtniszellen und Plasmazellen	CD27		Holland
mCD31	Gefäßendothel	CD31		
mCD55	Deckzellschicht	CD55	MCA1614	Serotec
mCD68	Makrophagen	CD68	EBM11	Dako, Denmark
mWue-1-A488*	Plasmazellen	unbekannt	monoklonal	DRFZ, Deutschland
mWue-2	FDC	unbekannt	monoklonal	DRFZ, Deutschland
rab APRIL		CD256	polyklonal	StressGen
rab BAFF		CD257	polyklonal	Sigma
rab Ki-67	Proliferierende Zellen	Ki-67	polyklonal	Dako, Denmark
rat AID	Keimzentrums-B-Zellen	AID	EK2 5G9	Niedobitek, Pathologie Erlangen

M: murine, rab: rabbit, rat: rat, *: direkt markierter Antikörper

2.1.5 Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoffe absorbieren Lichtenergie in einen für sie charakteristischen Wellenlängenbereich, heben dabei Elektronen in ein höheres Energieniveau und mit dem Zurückfallen zum Grundniveau, dem ursprünglichen Zustand niedrigerer Energie, emittiert das Elektron ein Photon. Dabei setzen sie die aufgenommene Energie wieder frei und es kommt zur spontanen Emission von Licht, die als Fluoreszenz bezeichnet wird. Bei der Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge (Anregungslicht) ist bei Fluoreszenzfarbstoffen eine gleichzeitige Emission von Licht mit größerer Wellenlänge zu beobachtbar. Dieses Verhalten (Absorption von kurzwelligem Licht, Emission von längerwelligem Licht = Stokes-Regel) wird als Fluoreszenz bezeichnet. Das von Fluorochromen absorbierte Licht muss eine kleinere Wellenlänge besitzen als das emittierte Licht, was mit der Stokeschen Regel zusammengefasst ist.

Das Licht bestimmter Wellenlänge, über welches Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden können, wird als Absorptionsspektrum bezeichnet. Da beim Absorptionsübergang immer mehr Energie aufgenommen wird, als beim Fluoreszenzübergang emittiert wird, ist das abgestrahlte Licht langwelliger als das Anregungslicht und bildet das Emissionsspektrum. Bei der Fluoreszenz finden Absorption und Emission beinahe gleichzeitig statt.

Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen können einerseits die Subpopulationen der B-Zellen sowie andererseits zelluläre Strukturen wie Zellkerne in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

	Fluorochrom	***Absorptions-maximum***	***Emissions-maximum***	***Firma***
Anti-mouse	A-488	494nm	517nm	Invitrogen
Anti-mouse	A-546	554nm	570nm	Invitrogen
Anti-rat	A-647	649nm	666nm	Invitrogen
Anti-rabbit	A-546	554nm	570nm	Invitrogen
	DAPI	360nm	460nm	Molecular Probes

Als Fluoreszenzfarbstoffe werden die Farbstoffe der Alexa-Serie (A-488, A-546 und A647) eingesetzt (Firma Invitrogen, Leiden Niederlande). Alexa Fluor 488 ist ein an das Phalloidin, einem Gift des Fliegenpilzes, gekoppelter Farbstoff, welcher grün fluoresziert, wenn er von blauem Licht (488 nm) angeregt wird. Alexa 546 fluoresziert rotes

Licht, wenn er mit grünem Licht angeregt wird, während Alexa 647 ein blau fluoreszierender Farbstoff ist.

Zur Darstellung aller kernhaltigen Zellen wurde DAPI verwendet. Bei der DAPI-Lösung handelt es sich um den Fluoreszenzfarbstoff 4',6'-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid, der an die DNA der Zellkerne bindet und im UV-Kanal sichtbar ist.

2.1.6 Materialherkunft und Gewebeverarbeitung

Die klinische Untersuchung der RA-Patienten sowie die Gewebeentnahmen erfolgen in der Abteilung für Rheumatologie und Orthopädie der Charité, Humboldt Universität Berlin, dem Helios-Klinikum Berlin-Buch sowie dem Asklepios-Klinikum Uckermark in Schwedt. Von den entnommenen synovialen Gewebeproben werden Gefrierschnitte angefertigt.

2.2 Methode

2.2.1 Präparation von Gewebe

Alle Gewebeproben werden nach der Synovektomie in sterile Kochsalzlösung überführt. Nachdem das Fettgewebe vom Synovialgewebe mittels Pinzette und Schere getrennt wird, wird das Synovialgewebe in kleine Gewebeschälchen überführt. Dabei wird der Boden der Schälchen mit dem Einbettungsmedium bedeckt, das Gewebestück eingelegt und luftblasenfrei mit dem Einbettungsmedium überschichtet. Anschließend wird das Gewebe mit Kalziumchlorid bis zur weiteren Aufbereitung bei -70°C gelagert.

2.2.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Der Gewebeblock wird aus dem Einbettungsschälchen gelöst und am Mikrotom HM 500 OM werden bei einer Boxtemperatur von -21°C sowie einer Objekttemperatur von -14°C in 6 bis 8 Mikrometer dünne Schnitte hergestellt. Jeweils drei Schnitte werden auf einen SuperfrostPlus Objektträger aufgebracht, wobei auf eine gleichmäßige Ausrichtung der Gewebeproben zur besseren Vergleichbarkeit der Schnitte geachtet wird. Nach Herstellung der Gefrierschnitte werden die Präparate bis zur weiteren immunhistochemischen Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

2.2.3 Immunhistochemie

2.2.3.1 Etablierung der Antikörper

Vor den eigentlichen Färbungen der Gewebeschnitte erfolgt die Etablierung der Antikörper mit Positivkontrollen. Als Positivkontrolle dient murines Milz- sowie humanes Tonsillengewebe.

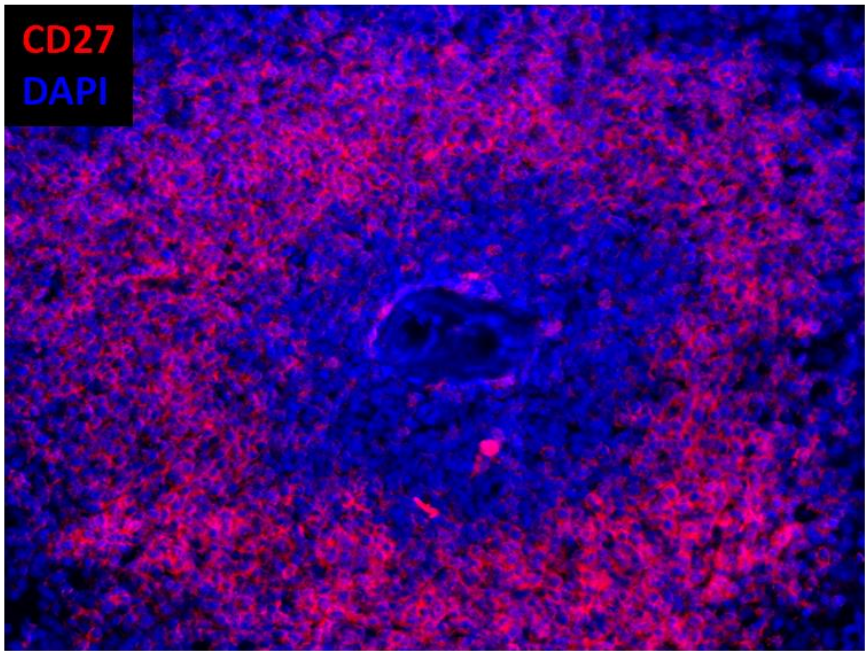


Abbildung 7: Etablierung des Antikörpers CD27

CD27-positive B-Gedächtniszellen ordnen sich um die Zentralateriole im murinen Milzgewebe an. Verdünnung des CD27-Antikörpers ist 1:100. 200-fache Vergrößerung.

2.2.3.2 Fixieren der Gewebeschnitte

Die Schnitte werden für fünf Minuten bei 50°C auf der Heizplatte getrocknet und für weitere fünf bis zehn Minuten zur Wasserverdrängung in -20°C kaltem Aceton fixiert und bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.3.3 Blocken der fixierten Gewebeschnitte

Um weniger Antikörperlösung zu verbrauchen und eine Vermischung zu verhindern, werden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet. Anschließend werden die Schnitte mit PBS / 3% BSA für 15 Minuten inkubiert, um unspezifische Bindungen durch Blockierung freier Proteinbindungsstellen zu verhindern. PBS / 3% BSA wird vom Objektträger abgekippt und vorsichtig abgetupft. Um die Austrocknung der Schnitte zu verhindern, müssen alle folgenden Inkubationsschritte in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Alle Waschvorgänge zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden mit PBS/BSA durchgeführt, dafür wird zwei Mal mit der Pipette gespült und beim dritten Mal wird PBS/BSA nach fünf Minuten Inkubation wieder abgekippt. Die Gebrauchsverdünnungen der Antikörper wurden hergestellt durch den Einsatz von PBS/BSA. Die Inkubationszeit für die Primärantikörper betrug eine Stunde, die für die Sekundärantikörper 30 Minuten.

2.2.3.4 Färbung mit Primärantikörpern

Für die Etablierung der Antikörperverdünnungen wird gesundes humanes Milz- und Tonsillengewebe genutzt. Hierbei werden sowohl für die Primär- als auch für die Sekundärantikörper mehrere/serielle Verdünnungsreihen angelegt, um die optimale Konzentration des jeweiligen Agenz (Primär- und Sekundärantikörper) zu ermitteln.

Für die Primärantikörper werden die folgenden Verdünnungen getestet: 1:20, 1:50, 1:100 und 1:200. Für die Sekundärantikörper kommen die nachfolgend angegebenen Verdünnungen in Betracht: 1:200, 1:300, 1:400, 1:600 und 1:800. Letztendlich wird die Verdünnung mit dem geringsten Verbrauch an Antikörpern aber noch gutem Färbeergebnis ausgewählt. Die in dieser Arbeit ermittelten optimalen Konzentrationen der einzelnen Antikörper sind in der Tabelle zusammengefasst.

Je 100 Mikroliter der verdünnten Antikörper werden pro Schnitt aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Anschließend drei Mal mit PBS / BSA waschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen.

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Primärantikörper sowie deren Verdünnungen

Primärantikörper	*Klon*	*Firma*	*Verdünnung*
mCD4	MT310	Dako, Dänemark	1:50
mCD8	DK25	Dako, Dänemark	1:50
mCD14	TÜK4	Dako, Dänemark	1:100
mCD20	L26	Dako, Dänemark	1:100
mCD31			1:100
mCD55 mCD65	MCA1614	Serotec	1:50
mCD68	EBM11	Dako, Dänemark	1:100
mWue-1-A488		DRFZ, Deutschland	1:100
rab APRIL	polyklonal	StressGen	1:50
rab BAFF	polyklonal	Sigma	1:100
rab Ki-67	polyklonal	Dako, Dänemark	1:50
rat AID	EK2 5G9	G. Niedobitek, Mol. Pathologie Erlangen	1:20

2.2.3.5 Nachweis spezifischer Färbung mit Sekundärantikörpern

Die Antikörper werden mit PBS-Puffer zu einer geeigneten Konzentration verdünnt. Alle Marker wurden von Invitrogen Inc. Eugene, Oregon/USA bezogen.

Die Mehrzahl der Sekundärantikörper wird 1:400 in PBS / BSA verdünnt und je 100 Mikroliter werden pro Schnitt aufgetragen. Die Inkubationszeit beträgt hier 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Anschließend werden die Schnitte erneut drei Mal mit PBS / BSA gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen.

Tabelle 14: Verdünnungen für sekundären Anti-human-Antikörper in der Histologie

Sekundärantikörper	*Firma*	*Verdünnung*
Antimouse A-488	Invitrogen, Oregon/USA	1:400
Antimouse A-546	Invitrogen, Oregon/USA	1:400
Antirabbit A-546	Invitrogen, Oregon/USA	1:400
Antirabbit A-647	Invitrogen, Oregon/USA	1:400

2.2.3.6 Kernfärbung mit DAPI

Nachdem die Gewebeschnitte die zuvor beschriebenen Färbeschritte durchlaufen haben, werden alle kernhaltigen Zellen mit DAPI angefärbt. Die Inkubation der Gewebeschnitt mit der DAPI-Lösung erfolgt für weitere fünf Minuten in der Feuchtkammer. Nachfolgend werden die Schnitte wie gehabt mit PBS / BSA gespült. Unter dem Fluoreszenzmikroskop ist eine kräftig blaue Fluoreszenz zu beobachten.

2.2.3.7 Eindeckeln der Schnitte

Die gefärbten und gewaschenen Schnitte werden vorsichtig mit Kimwipes trocken getupft. Ein Tropfen Gelantine wird auf den Schnitt pipettiert und sofort mit einem Deckgläschen möglichst luftblasenfrei bedeckt. Der Schnitt ist nach etwa 5 Minuten getrocknet und zur Begutachtung unter dem Mikroskop einsatzbereit. Zur vollständigen Aushärtung der Gelantine werden die Schnitte 24 Stunden waagerecht und dunkel bei Raumtemperatur gelagert.

Die Präparate wurden mit flüssiger Gelantine (Kaiser’s Glyceringelantine) betropft und mit Deckgläsern (24x50 mm, Menzel) eingedeckt.

2.2.4 Fluorozenzmikroskopie

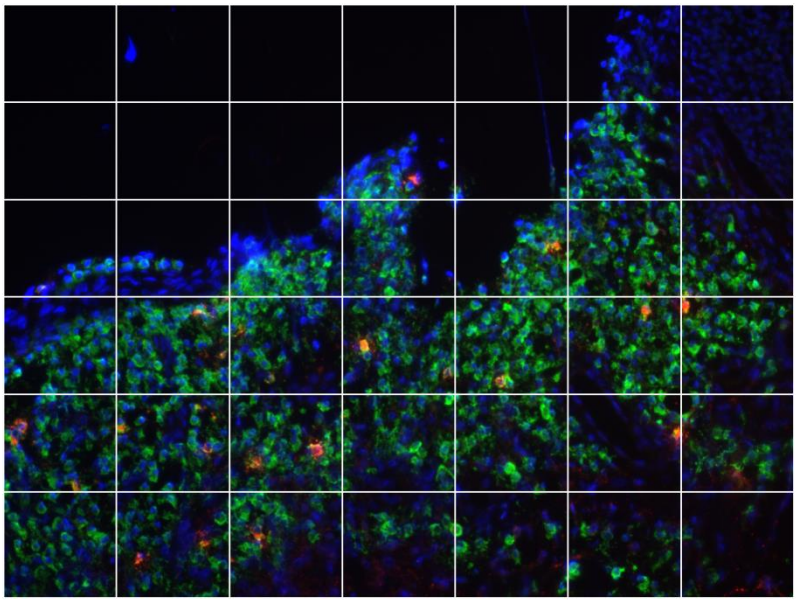
Für die Fluoreszenzmikroskopie wird ein Zeiss Axioplan-Mikroskop mit einer Zeiss Auflicht-Fluoreszenzlampe verwendet. Für das Betrachten und Fotografieren der DAPI-Fluoreszenz und anderer Fluorochrome im blauen Spektralbereich, wird mit UV-Licht angeregt (Filtersatz 1: Anregungsart Ultraviolett H 365, Erregerfilter BP 365/11, Farbteiler FT 395, Sperrfilter LP 397). Um grüne Fluoreszenz wie Alexa 488 sichtbar zu machen, wird mit blauem Licht angeregt (Filtersatz 2: Anregungsart Blau 450-490, Erregerfilter BP 450-490, Farbteiler FT 510, Sperrfilter LP 520). Für das Betrachten der roten Fluoreszenz wie Alexa 546 ist grünes Anregungslicht erforderlich (Filtersatz 3: Anregungsart Grün H 546, Erregerfilter BP 546/12, Farbteiler FT 580, Sperrfilter LP 590).

2.2.5 Erstellen von Übersichtsbildern der Gewebeschnitte

Zur Erstellung von Übersichtsbildern histologischer Gewebeschnitte wurde ein Mikrodissektions-Mikroskop (LCM, Laser Capture Microdissection) genutzt, welches von einem vorher auf dem Objektträger markierten Gewebeausschnitt mit Hilfe der digitalen Videokamera viele kleine Bilder erstellt, die anschließend an den Computer übertragen und zu einem Gesamtfoto zusammengefügt werden.

2.2.6 Zellzählung

Die Synovialschnitte werden mit den monoklonalen Antikörpern Wue-1 für Plasmazellen und anti-Baff für BAFF gefärbt. Anschließend werden die Präparate lichtmikroskopisch bei einer Vergrößerung von 100 begutachtet. Je nach Qualität der Präparate werden drei bis fünf nebeneinander liegende Gesichtsfelder auf das Vorliegen von angefärbten Strukturen geprüft und anschließend ausgezählt. Wie in Abbildung 8 zu sehen, wird in Microsoft PowerPoint das entsprechende Bild in gleichgroße Quadrate geteilt, sogenannte Zählkammern werden angelegt. Anschließend werden sämtliche Plasmazellen in einem Quadrat gezählt. Dabei werden alle Zellen, welche die obere und die rechte Seite des Quadrats berühren, mitgezählt, während die Zellen, welche die untere und die linke Seite berühren, nicht mitgezählt werden und zur jeweils angrenzenden Zählkammer gerechnet werden. Danach werden von jedem Gewebeschnitt die absoluten Zellzahlen ermittelt, aus denen ein Mittelwert errechnet wird. Letztendlich wird der Anteil an Plasmazellen ermittelt, welche BAFF exprimieren.



0	0	0	0	0	5	0
0	0	0	9	1	24	1
5	4	20	24	30+1	33	15
21	33+2	15+2	24+2	31+1	34+1	22+1
25+2	23+3	31+2	14	12	10+1	13+1
29	22+2	13+1	8	6	10	3

Abbildung 8: Beispiel für die Zellzählung

Die schwarzen Zahlen stehen für die Anzahl der Plasmazellen, die roten Zahlen dahinter für die BAFF-positiven Plasmazellen. 200-fache Vergrößerung.

2.2.7 Statistik

Für die Ermittlung des Zusammenhangs zwischen den verschiedenen Variablen wird Spearman Rangkorrelationstest durchgeführt. Voraussetzungen für den Spearman-Test sind lediglich, dass die Variablen ordinal skaliert sind und dass der untersuchte Zusammenhang monoton ist.

2.2.8 Software

Für die Datenbank- und Literaturrecherche wird das National Center of Biotechnology Information http://www.ncbi.nlm.nih.gov und die Proteindatenbank http://www.rcsb.org verwendet. Folgende Computersoftware wurde verwendet: Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint), Windows Fotogalerie, Meta View Soft und ACD Systems (ACD-See).

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der RA-Patienten und ihrer untersuchten Synovialgewebe

Das Patientenkollektiv umfasst zehn Patienten mit der Diagnose RA, wovon drei männlichen und sieben weiblichen Geschlechts sind. Eine genaue Charakteristik der Patienten ist in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Tabellarische Patientenübersicht von 10 Patienten mit RA-Diagnose

	Patient									
	B0029	B0032	B0002	B0111	B0112	B0113	B0114	B0116	B0117	B0121
Alter (Jahre)	73	62	69	76	54	67	70	67	51	48
Geschlecht	m	w	w	m	m	w	w	w	w	w
RA-Dauer (Jahre)	6	4	8	7	17	12	23	7	13	23
CRP mg/dl	1,54	2,5	3,62	3	0,26	3,67	10,42	0,13	0,28	0,11
BSG mm/h	10/18	10/24	6/70	62/90	24/32	20/48	44/71	17/34		24/40
ACPA		pos.				pos.	pos.			neg.
RF	neg.	pos.				pos.	pos.	pos.		pos.
Gewebeentnahme				Knie re	HG li	Knie re	EB li	HG li	Sehne*	HG li
DAS-28	4,5	5,3	5,2		5,6	5,6	6,5	4,1	4,9	
Prednisolon mg/d	5	0	5	5	0	11	5	7,5	10	5
NSAR	Ibu			Diclo	Ibu		Eto		Diclo	Indo
DMARD	MTX	MTX	MTX**	HCQ	LEF		LEF	MTX	HCQ	
Biologica						Humira		Enbrel		

w: weiblichen Geschlechts, m: männlichen Geschlechts, CRP: C-reaktives Protein, ACPA: Antikörper für citrullinierte Peptidantigene, BSG: Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit: Wert nach 1 Stunde/Wert nach 2 Stunden, RF: Rheumafaktor, EB: Ellenbogen, HG: Handgelenk, li: links, re: rechts, *: Tibialis posterior Sehne links, pos.: positiv, neg.: negativ, DAS-28: Disease Activity Score in 28 Gelenken (Range 0-10), NSAR: Nichtsteroidale Antirheumatika, Ibu: Ibuprofen, Diclo: Diclofenac, Indo: Indometacin, Eto: Etoricoxib, DMARD: disease-modifying antirheumatic drug, MTX: Methotrexat, LEF: Leflunomid, HCQ: Hydroxychloroquin, ** außer MTX auch LEF, HCQ, SASP (Sulfasalazin) und Gold.

Bei fünf Patienten ließ sich der Rheumafaktor (RF) nachweisen, ein Patient ist negativ für den RF und für die übrigen vier Patienten liegen keine Daten vor. ACPA, der spezifischere Antikörper zum Nachweis der RA, ließ sich bei drei der zehn Patienten nachweisen. Ein Patient zeigt ein negatives Testergebnis und für die restlichen sechs Patienten liegen keine Daten vor.

Die Gewinnung des RA-Gewebes dieser Patienten erfolgte im Zeitraum von 2006 bis 2008. Bei drei der zehn RA-Patienten gibt es keine Information darüber, wo das Gewebe entnommen wurde. Bei weiteren drei Patienten stammt das Synovialgewebe aus

dem Handgelenk, bei zweien aus dem Knie, bei einem aus dem Ellenbogen und bei einem aus der Tibialis posterior Sehne am Fuß.

Wie der Tabelle 15 zu entnehmen ist, nehmen acht der zehn Patienten Prednisolon in unterschiedlicher Dosierung ein, sechs Patienten werden mit NSAR therapiert, acht Patienten mit Basistherapeutika und zwei Patienten erhalten Biologika. Vier Patienten nehmen sowohl Prednisolon als auch NSAR und Basistherapeutika ein.

Tabelle 16 zeigt die deskriptiven Statistiken für die untersuchten RA-Patienten. Das Alter beträgt im Mittel 63,7 Jahre (Median: 67 Jahre). Die durchschnittliche Krankheitsdauer beträgt 12 Jahre (Median: 10 Jahre). Im Durchschnitt waren die Patienten bei Erstmanifestation der RA 51,7 Jahre alt (Median: 56,5 Jahre). Wie die Tabelle 17 zeigt sind nur drei der untersuchten Patienten zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme jünger als 60 Jahre. Die RA kann in jedem Lebensalter auftreten, bemerkbar macht sie sich jedoch meist im Alter zwischen 30 und 50 Jahren. Die Tabelle 18 zeigt, dass vier der zehn Patienten bei Erstdiagnose zwischen 30 und 50 Jahren alt sind, ein Patient ist jünger als 30 Jahre und fünf Patienten sind älter als 50 Jahre.

Tabelle 16: Deskriptive Statistiken

	Mittelwert	Median	Standardabw.	Minimum	Maximum
Alter (Jahre)	63,7	67	9,6	48	76
RA-Dauer (Jahre)	12,0	10	6,9	4	23
Erstmanifestation (Jahre)	51,7	56,5	14,4	25	69
CRP (mg/dl)	2,55	2,02	3,12	0,11	10,42

Tabelle 17: Altersverteilung der Patienten bei Gewebeentnahme

Alter in Jahre	*40 bis 49*	*50 bis 59*	*60 bis 69*	*70 bis 79*
Anzahl der Patienten	1	2	4	3

Tabelle 18: Altersverteilung der Patienten bei Erstdiagnose

Jünger als 30 Jahre	*Zwischen 30-50 Jahre*	*Älter als 50 Jahre*
B0121 (25 J)	B0112 (37 J)	B0111 (69 J)
	B0113 (46 J)	B0116 (61 J)
	B0114 (47 J)	B0029 (67 J)
	B0117 (38J)	B0002 (61 J)
		B0032 (58 J)

Als Entzündungsparameter bietet sich das c-reaktives Protein (CRP) an, welches in der Leber synthetisiert wird und zu den Akute-Phase-Proteinen zählt. Das CRP reagiert rasch auf entzündliche Veränderungen, weshalb die Konzentration des CRP in guter Korrelation zur entzündlichen Aktivität steht und sich sehr gut für Verlaufsbeobachtungen von entzündlichen Erkrankungen eignet. Allerdings kann ein erhöhter CRP-Wert auch ein Hinweis auf eine andere Erkrankung sein, denn bei sieben der zehn untersuchten RA-Patienten sind außer der RA noch weitere Erkrankungen bekannt. Wie der Tabelle 16 zu entnehmen ist, beträgt der CRP-Wert der untersuchten RA-Patienten im Mittel 2,55 mg/dl (Median: 2,02 mg/dl). Auch bei gesunden Erwachsenen ist CRP im Blut nachweisbar und CRP-Werte bis zu 1 mg/dl gelten als normal, ab Werten über 5 mg/dl spricht man von einer schweren Entzündung. Bei sechs von zehn Patienten liegt somit eine akute Entzündung vor, von denen ein Patient (Patient B0114) besonders starke Entzündungszeichen aufweist (siehe Tabelle 19). Neben dem CRP-Wert kann auch die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) als Entzündungsparameter dienen.

Tabelle 19: Übersicht über Entzündungsaktivität (CRP-Wert) der RA-Patienten

CRP bis 1 mg/dl	*CPR 1 bis 5 mg/dl*	*CPR ab 5 mg/dl*
B0112 (0,26)	B0029 (1,54)	B0114 (10,42)
B0116 (0,13)	B0032 (2,5)	
B0117 (0,28)	B0002 (3,62)	
B0121 (0,11)	B0111 (3)	
	B0113 (3,6)	

CRP-Werte bis zu 1 mg/dl gelten als normal, CRP-Werte zwischen 1 bis 5 mg/dl gelten als akute Entzündung, ab CRP-Werten über 5 mg/dl spricht man von einer schweren Entzündung.

Zur objektiven Beurteilung des Krankheitsverlaufes der RA ist der DAS-28-Index (Krankheits-Aktivitäts-Index) eingeführt worden. Die "28" bezieht sich auf die Anzahl der untersuchten Gelenke. Folgende für die RA relevanten Aktivitätsparametern werden dabei berücksichtigt: die Anzahl der geschwollenen sowie die Anzahl der druckschmerzhaften Gelenke, die BSG und die Einschätzung des Patienten zur aktuellen Krankheitsaktivität auf einer visuellen Analogskala von eins bis zehn. Mit Hilfe eines Punktesystems lässt sich ein Aktivitätsindex zwischen null und zehn ermitteln. Ein Wert zwischen null und 3,2 (grüner Bereich) entspricht einer fehlenden bis geringen Krank-

heitsaktivität, ein Wert zwischen 3,2 und 5,1 (gelber Bereich) entspricht einer mittleren Krankheitsaktivität und ein Wert oberhalb von 5,1 (roter Bereich) entspricht einer hohen Krankheitsaktivität. Bei acht Patienten sind die DAS-28-Werte bekannt, wovon drei Patienten (B0029, B0116, B0117) einen Wert im gelben Bereich und fünf Patienten (B0032, B0002, B0112, B0113, B0114) einen Wert im roten Bereich aufweisen (siehe Tabelle 15).

3.2 Histologische Charakterisierung der Synovialgewebe

3.2.1 Einleitung

Synovialgewebe lässt sich in die drei Kompartimente Deckzellschicht, synoviales Stroma mit den residenten Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und entzündliche Infiltrate durch eingewanderte Zelle wie Lymphozyten und Plasmazellen unterteilen (Krenn et al., 2006). Im Rahmen der RA kommt es zur Hyperplasie der Deckzellschicht, zu Gefäßneubildungen sowie zur Bildung lymphoplasmazellulärer Infiltrate. Aufgrund der Entzündung und der damit einhergehenden Vaskularisierung kommt es zur Infiltration und Akkumulation mit Entzündungszellen, wodurch sich zellulär entzündliche Infiltrate bilden können. Anhand der Anzahl, Größe und der Struktur der Infiltrate lässt sich der Grad der Entzündung bestimmen (Krenn et al., 2006). Die untersuchten Synovialgewebe der zehn RA-Patienten werden histologisch charakterisiert und die Zusammensetzung der Entzündungsinfiltrate analysiert, wobei besonderes Augenmerk auf die B- und Plasmazell-Verteilung gelegt wird.

3.2.2 Das entzündete Synovialgewebe

Die entzündlichen Infiltrate sind bei der Mehrzahl der untersuchten Patienten eher schwach ausgeprägt. Anhand der Deckzellschicht sowie der Neovaskularisierung ist das entzündliche Geschehen aber deutlich zu sehen.

Alle Patienten zeigen eine verdickte Deckzellschicht, wenn auch bei manchen Patienten nur stellenweise wie es beispielsweise in Abbildung 9 bei den Patienten B0117 und B0029 zu sehen ist. Als Marker für die Deckzellschicht werden die synovialen Fibroblasten verwendet, die mit CD55 angefärbt werden (Hamann et al., 1999).

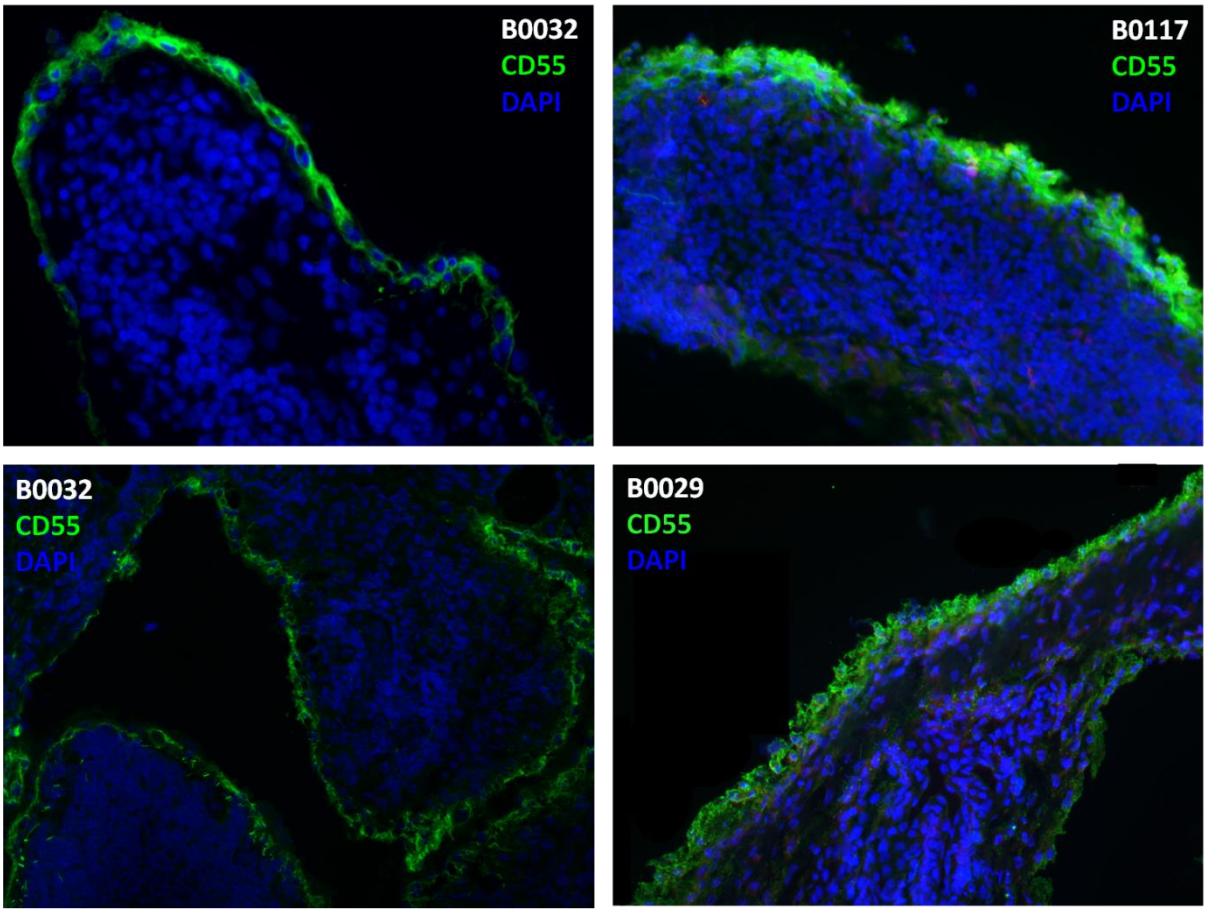


Abbildung 9: Hyperplasie der Deckzellschicht

Diese Abbildung zeigt die Hyperplasie der Deckzellschicht bei 3 Patienten (B0029, B0117, B0032). Die 6 µm dicken Gefrierschnitte der 3 Patienten wurden mit anti-CD55 sowie DAPI angefärbt. Die Abbildung von Patient B0032 (oben links) ist ein weiteres Mal in Abbildung 18 zu sehen.

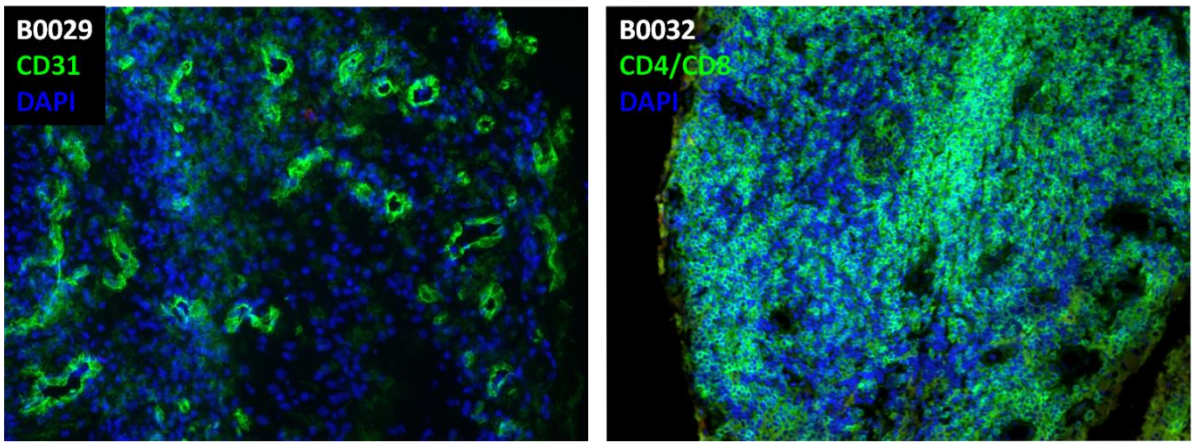


Abbildung 10: Gefäß- und T-Zelldarstellung

Links: Gefrierschnitt von Patient B0029 mit Gefäßfärbung (grün) und Kernfärbung (blau). 200-fache Vergrößerung. Rechts: Gefrierschnitt von Patient B0032 mit T-Zellfärbung (grün) und Kernfärbung (blau). 200-fache Vergrößerung.

Die Gefäße, dargestellt in Abbildung 10, werden mit anti-CD31-Antikörpern sichtbar gemacht, T-Zellen mit CD4- und CD8-Antikörpern. Lediglich bei zwei von zehn Patienten (B0029 und B0032) findet sich eine stärkere entzündliche Infiltration. In den Infiltra-

ten lassen sich neben T-Zellen auch B-, Plasma- und B-Gedächtniszellen nachweisen wie in Abbildung 11 dargestellt. Diese entzündlichen Infiltrate weisen meist eine perivaskuläre Verteilung auf, wobei T- und Plasmazellen häufiger in gefäßnahen Regionen gefunden werden als B-Zellen. Auch Monozyten und Makrophagen wandern ins Gewebe ein und verteilen sich ubiquitär im Synovialgewebe wie in Abbildung 11 zu sehen.

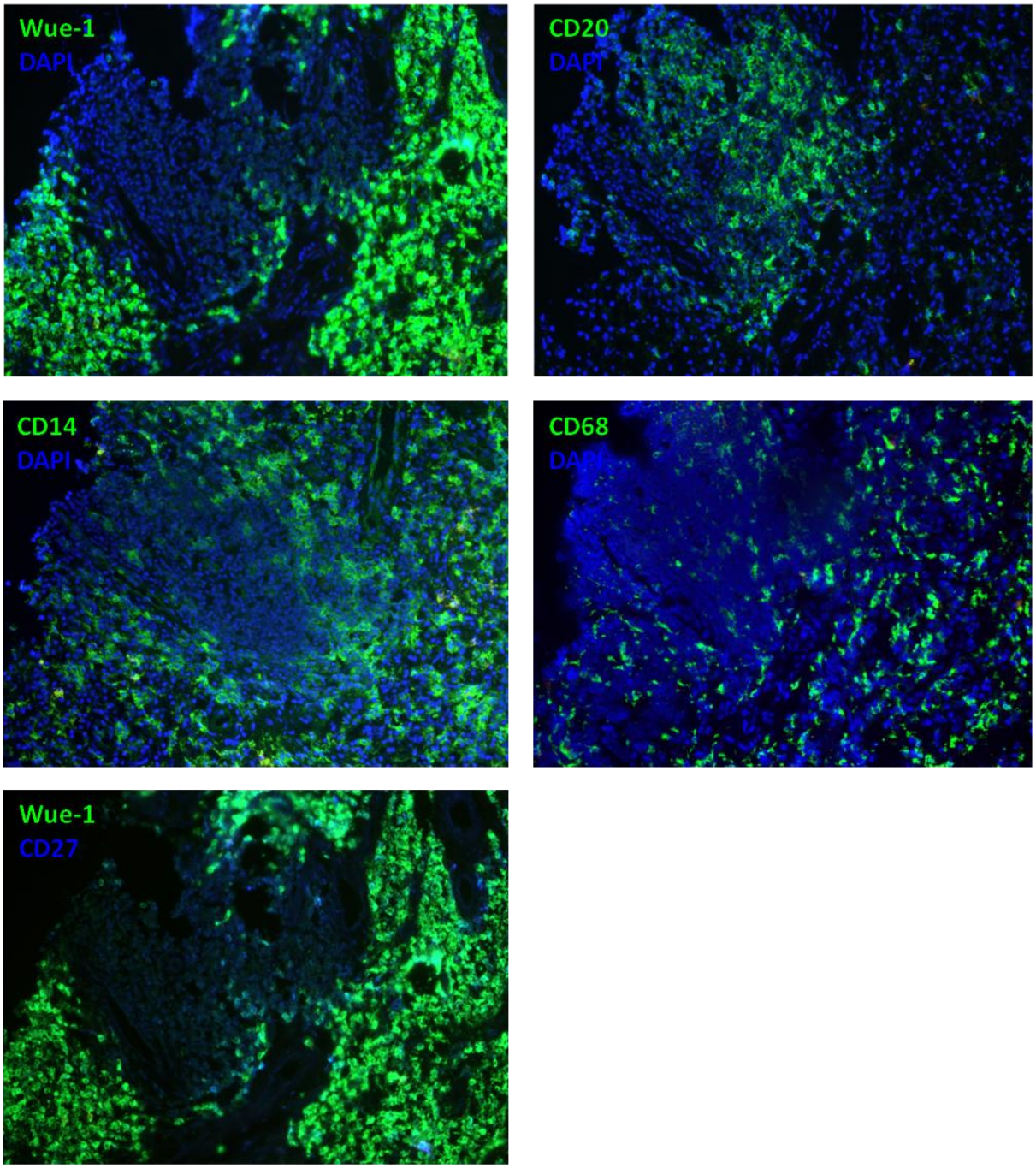


Abbildung 11: Plasmazell-, B-Zell-, Monozyten-, Makrophagen- und B-Gedächtniszell-Färbung

Konsekutive Schnitte des Patienten B0029. Oben links: Darstellung Plasmazellen (grün) mit Kernfärbung (blau), oben rechts: Darstellung B-Zellen (grün) mit Kernfärbung (blau), Mitte links: Darstellung Monozyten (grün) mit Kernfärbung (blau), Mitte rechts Darstellung Makrophagen (grün) mit Kernfärbung (blau), unten links: Darstellung B-Gedächtniszellen (blau) und der Plasmazellen (grün). 200-fache Vergrößerung.

Als besonders hochgradig entzündliche Gewebe gelten Gewebe mit Keimzentren (Krenn et al, 2006). Lediglich bei einem Patienten (B0032) ist ein kleines Netzwerk von FDCs darstellbar wie in Abbildung 12 zu sehen. Im Synovialgewebe sind FDCs nur in Keimzentren zu finden.

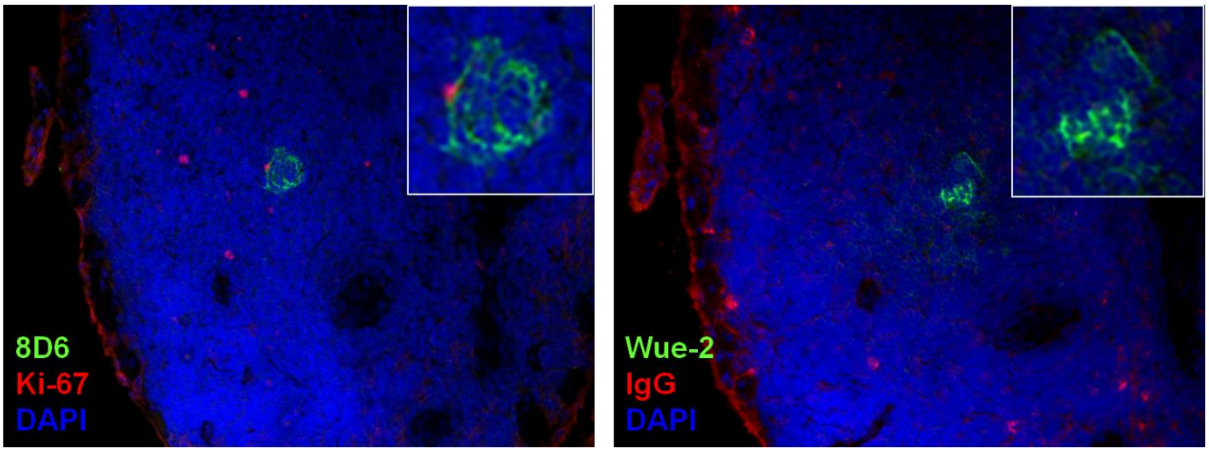


Abbildung 12: Keimzentrumsdarstellung

Konsekutive Schnitte von Patient B0032: links: FDC-Färbung (8D6, grün) und Ki-67-Färbung (rot) mit Kernfärbung (blau), rechts: FDC-Färbung (grün) und IgG-Färbung (rot) mit Kernfärbung (blau), 200-fache Vergrößerung.

3.2.3 Verteilung der B- und Plasmazellen

B-Zellen, die nach Antigenkontakt zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen im Keimzentrum differenzieren, unterscheiden sich morphologisch in Größe und Zellform voneinander. Die B-Zellen sind kleine und runde Zellen mit einem großen Zellkern und wenig Zytoplasma, Plasmazellen sind größer und eher länglich-oval mit exzentrischem Zellkern. Des Weiteren lassen sich die verschiedenen Stadien der B-Zellentwicklung mit Hilfe spezifischer Antikörper nachweisen. Das Oberflächenantigen CD20 wird auf frühen, naiven sowie B-Gedächtniszellen exprimiert. Mit zunehmender Differenzierung geht CD20 verloren und ist somit auf Plasmazellen nicht mehr nachweisbar. Auf Plasmazellen wird stattdessen Wue-1 exprimiert (Greiner et al., 2000). Die B-Gedächtniszellen können von der ruhenden B-Zelle durch das Anfärben des Oberflächenantigens CD27 unterschieden werden.

Im lymphatischen Gewebe bilden B-Zellen meist lymphozytäre Aggregate. Plasmazellen sammeln sich i.d.R. ringförmig um diese lymphozytären Infiltrate als Infiltrat-assoziierte Plasmazellen. Außerdem häufen sich Plasmazellen entlang von Gefäßen als vaskuläre Plasmazellen oder sie liegen einfach diffus im Gewebe vor.

Bei den untersuchten Synovialgeweben variiert die Präsenz der B- sowie Plasmazellen von Patient zu Patient relativ stark. Die Zellen liegen diffus verteilt vor, bilden lockere Aggregate oder follikelähnliche Strukturen, welche Keimzentren beinhalten können. In den meisten Fällen findet sich eine diffuse Verteilung der B- und Plasmazellen ohne nennenswerte Ansammlungen im Synovialgewebe. Bei drei Patienten zeigen sich lockere B- bzw. Plasmazell-Aggregate. Eine follikelähnliche B-Zellansammlung zeigen die Synovialgewebe von den Patienten B0029 und B0032.

Die Abbildung 13 zeigt einen Gefrierschnitt des gesamten Synovialgewebes von Patient B0029 sowie eine Ausschnittsvergrößerung. Hier ist zu sehen, dass die Plasmazellen eher diffus und zum Teil als lockere Aggregate zusammen liegen, während die B-Zellen durchaus follikelähnliche Zellansammlungen bilden. Die B-Zellzusammenballungen entsprechen in etwa der Größe eines Lymphfollikels, weisen allerdings keine FDCs auf, welche im Synovialgewebe ein Merkmal für Keimzentren sind. Ein Keimzentrumsähnliches Infiltrat finden sich nur bei Patient B0032 und ist in Abbildung 12 zu sehen. Färbung mit Ki-67 spezifischen Antikörpern, die ein Antigen erkennen, dass nur im Kern von proliferierenden Zellen exprimiert wird, zeigt, dass sich in diesem kleinen Keimzentrum keine teilenden B-Zellen nachweisen lassen (siehe Abbildung 12).

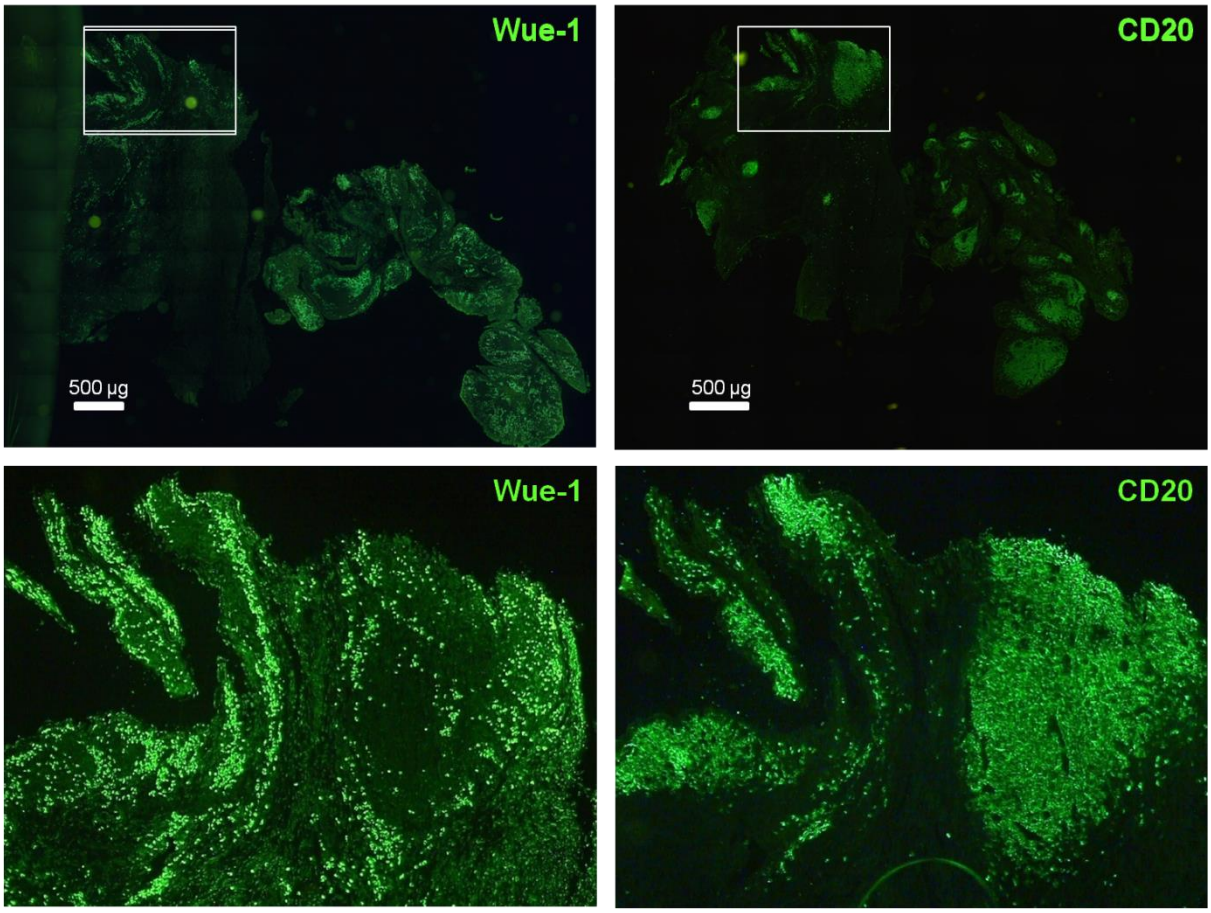


Abbildung 13: Übersichtsbilder der B- und Plasmazellverteilung des Patienten B0029

Oben: Übersichtsbilder (konsekutive Schnitte) des gesamten Synovialgewebes von Patient B0029. Links: Plasmazellfärbung (grün), rechts: B-Zellfärbung (grün), unten links: vergrößerter Ausschnitt der Plasmazellfärbung (grün) des Synovialgewebes von Patienten B0029, unten rechts: vergrößerter Ausschnitt der B-Zellfärbung (grün). 200-fache Vergrößerung.

Bei den Patienten mit stärkerer Infiltration und somit lymphoplasmazellulären Ansammlungen, zeigt sich die typische Anordnung der Entzündungszellen mit zentral gelegenen B-Zellen und peripher liegenden Plasmazellen, wobei die Plasmazellen deutlich überwiegen wie in Abbildung 14 zu sehen. Wie auch früher beschrieben, findet im Follikel also keine Vermischung von B- und Plasmazellen statt, sondern die Plasmazellen lagern sich um die B-Zellen herum. Bei der Mehrheit der Patienten, bei denen sich im Synovialgewebe keine zusammenhängenden Zellverbände bilden, zeigt sich in der Regel eine eher zufällige Verteilung von B- und Plasmazellen.

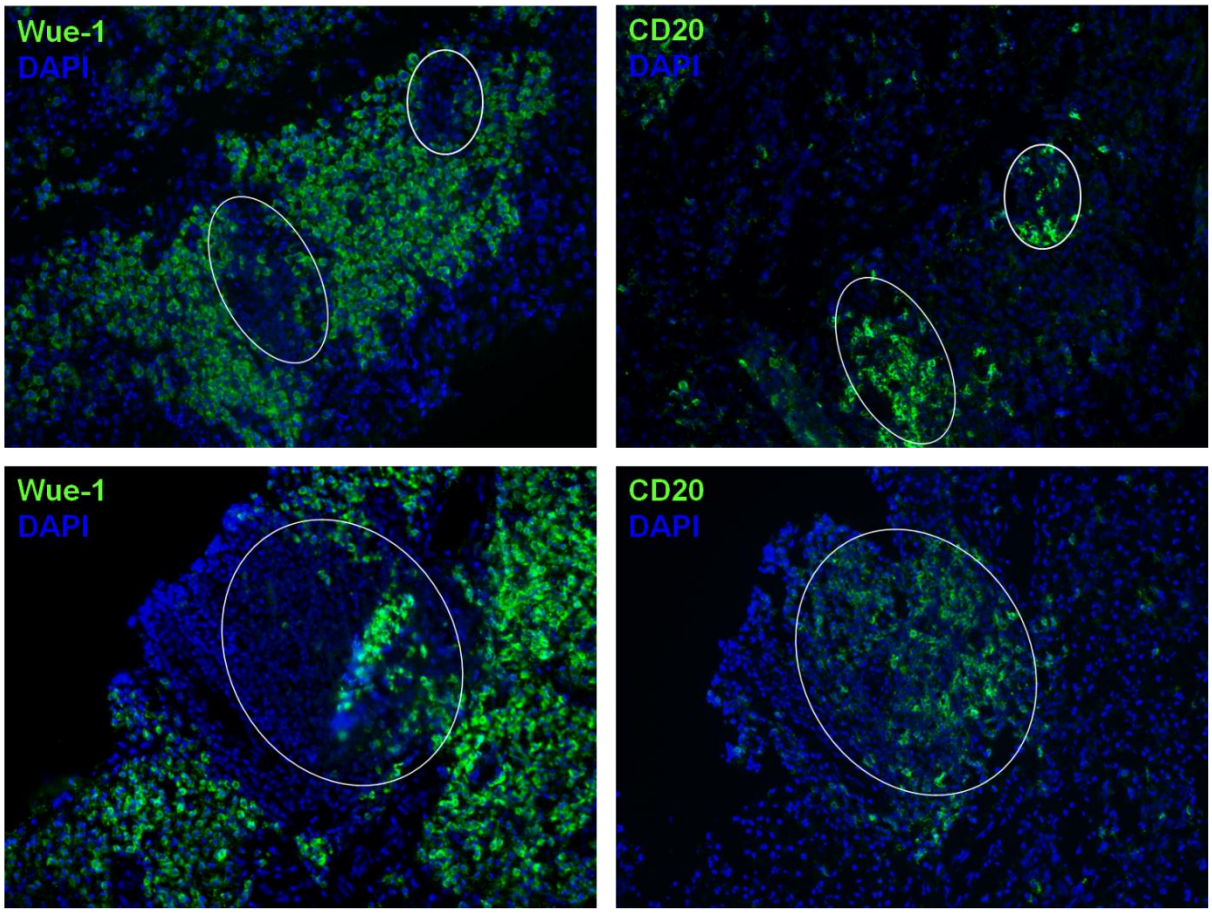


Abbildung 14: Vergleich zwischen Plasmazell- und B-Zell-Verteilung bei Patient B0029

Oben konsekutive Schnitte des Synovialgewebes von Patient B0029: links Plasmazellfärbung (grün) und Zellkernfärbung (blau), rechts: B-Zellfärbung (grün) und Zellkernfärbung (blau). Unten ebenfalls konsekutive Schnitte desselben Patienten: links Plasmazellzellfärbung (grün) und Zellkernfärbung (blau), rechts B-Zellfärbung (grün)und Zellkernfärbung (blau). 200-fache Vergrößerung.

Das histopathologische Bild der untersuchten Patienten stellt sich hinsichtlich der Verteilung der B-Zellpopulationen im Synovialgewebe sehr heterogen dar. Deshalb erscheint es sinnvoll, die Patienten nach der Anzahl der B- bzw. Plasmazellen im Synovialgewebe aufzuteilen (siehe Tabelle 20 und Abbildung 15). Dabei steht 1 für bis zu 100 B- bzw. Plasmazellen, 2 für 101 bis maximal 500 B- bzw. Plasmazellen und 3 für mehr als 500 Zellen.

Tabelle 20: Überblick über die Verteilung von B- und Plasmazellen bei allen 10 Patienten

Patient	PC	B-Zellen
B0029	3	2
B0032	2	3
B0002	2	1
B0111	1	1
B0112	1	1
B0113	1	1
B0114	1	1
B0116	1	1
B0117	2	2
B0121	1	2

Diese Tabelle gibt einen Überblick über die B- und Plasmazell-Verteilung in den untersuchten Synovialgeweben. 1 = 1 bis 100 B- oder PC-Zellen, 2 = 101 bis 500 B- oder PC-Zellen, 3 = mehr als 500 B- oder PC-Zellen.

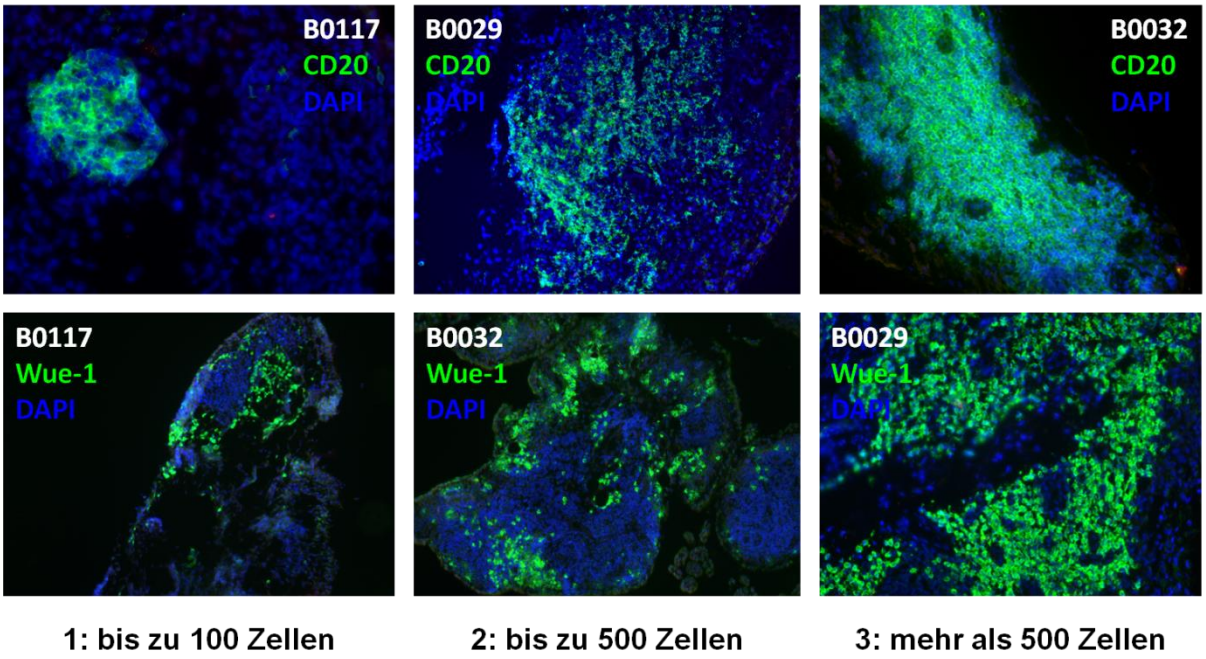


Abbildung 15: Phänotyp der Synovialgewebe verschiedener RA-Patienten

Die Gefrierschnitte der Synovialgewebe der Patienten B0117, B0029 und B0032 zeigen wie unterschiedlich die Zelldichte der entzündlichen Infiltrate ist. Dafür sind sie mit spezifischen Antikörpern gegen B-Zellen (anti-CD20) bzw. Plasmazellen (Wue-1) und mit DAPI angefärbt. Die obere Reihe zeigt die B-Zell-Verteilung (grün) und die untere Reihe die Plasmazellverteilung (grün). 200-fache Vergrößerung.

Alle Patienten weisen sowohl B- als auch Plasmazellen in ihrem Synovialgewebe auf. Bei sechs der Patienten sind bis zu 100 B- bzw. Plasmazellen nachweisbar. Bei drei

Patienten sind bis zu 500 B- bzw. Plasmazellen darstellbar und ein Patient weist mehr als 500 B- bzw. Plasmazellen auf (siehe Abbildung 16).

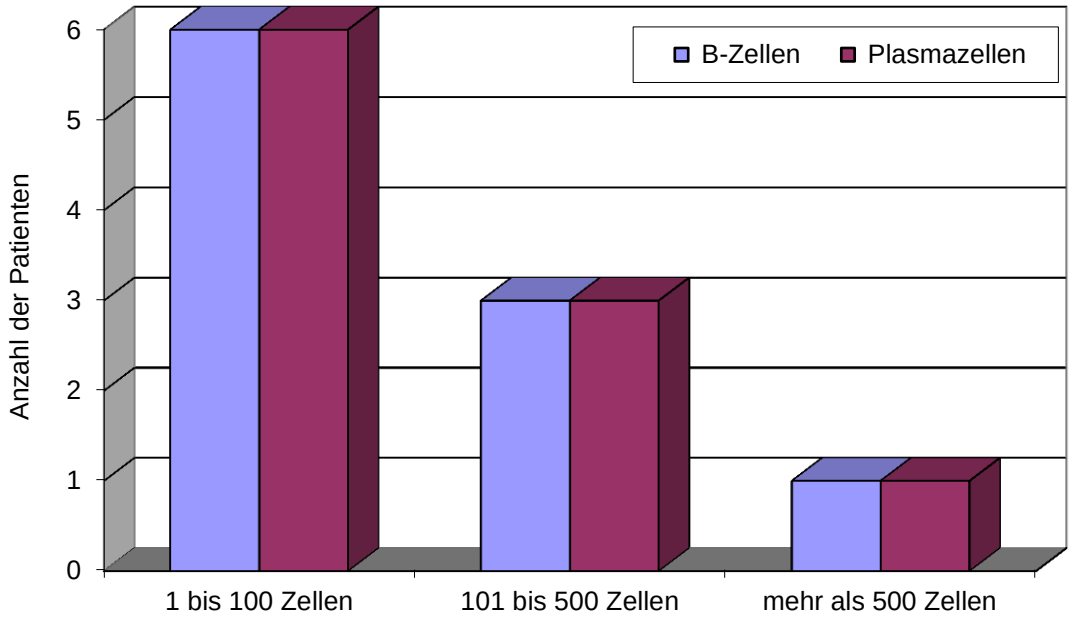


Abbildung 16: Schematische Darstellung zur B-Zell- und Plasmazell-Verteilung

Diese Abbildung zeigt, dass bis zu 100 B- bzw. Plasmazellen bei 6 Patienten, bis zu 500 B- bzw. Plasmazellen bei 3 Patienten und mehr als 500 B- bzw. Plasmazellen bei 1 Patient nachweisbar sind.

3.2.4 Zusammenfassung

Das histopathologische Bild der untersuchten Synovialgewebe zeigt die typische mehrschichtige Deckzellschicht und zahlreiche Gefäßneubildungen, jedoch nur einige lymphoplasmazelluläre Ansammlungen. Bei genauerer Betrachtung der Infiltrate zeigt die B- und Plasmazell-Verteilung ein heterogenes Bild. Die Mehrzahl der analysierten Synovialgewebe zeigen keine Anzeichen von lymphozytären Aggregaten, sondern lediglich eine diffuse Verteilung ohne Zellanhäufungen. Lediglich vier Patienten weisen Ansammlungen von B- bzw. Plasmazellen in unterschiedlichen Ausprägungen auf.

3.3 BAFF- und APRIL-Expression im entzündeten Synovialgewebe

3.3.1 Einleitung

Für das Überleben, die Reifung und Differenzierung der B- und Plasmazellen nehmen die beiden eng verwandten TNF-Zytokine BAFF und APRIL eine wichtige Schlüsselfunktion ein. Wichtig ist hierbei in erster Linie deren Balance. So sind erhöhte BAFF- und APRIL-Konzentrationen meist mit Autoimmunerkrankungen assoziiert, während zu niedrige BAFF- und APRIL-Konzentrationen zum Verlust von B- und Plasmazellen und somit zu Immundefekten führen können.

Bei SLE-Patienten konnte bereits gezeigt werden, dass Plasmazellen sowohl BAFF als auch APRIL selbst exprimieren können (Chu et al., 2009). Gegenstand dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob die Anzahl der B und Plasmazellen im Synovialgewebe mit einer erhöhten BAFF- und APRIL-Expression einhergeht und ob synoviale B- bzw. Plasmazellen zur autokrinen BAFF- und APRIL-Expression in der Lage sind. Dafür werden Synovialgewebe von RA-Patienten mit unterschiedlichen Entzündungsstadien hinsichtlich der BAFF- und APRIL-Expression mittels Immunfluoreszenzfärbungen analysiert.

3.3.2 BAFF- und APRIL-Expression in der Deckzellschicht

Wie bereits erwähnt und in Abbildung 9 zu sehen weist die synoviale Deckzellschicht der analysierten RA-Patienten teils erhebliche Verbreiterungen und zottige Auftreibungen auf. Sowohl BAFF als auch APRIL werden bei allen untersuchten RA-Patienten vermehrt in der gesamten synovialen Deckzellschicht exprimiert, wie der Abbildung 17 zu entnehmen ist. Aktivierte synoviale Fibroblasten sind in der Regel große, aber sehr dünne, platte Zellen mit großem Zellkern und mehreren Nukleoli. Makrophagen hingegen sind meist polymorphkernig. Beim Vergleich der BAFF- und APRIL-Expression in der Deckzellschicht des gleichen Synovialgewebes, aber auf konsekutiven Schnitten, zeigt sich, dass die gleichen Zellen sowohl BAFF als auch APRIL exprimieren (siehe Abbildung 17). Die CD55-Antikörper färben in erster Linie die synovialen Fibroblasten der Deckzellschicht an (Hamann et al., 2010), welche dadurch als die Hauptproduzenten von BAFF und APRIL identifiziert werden können.

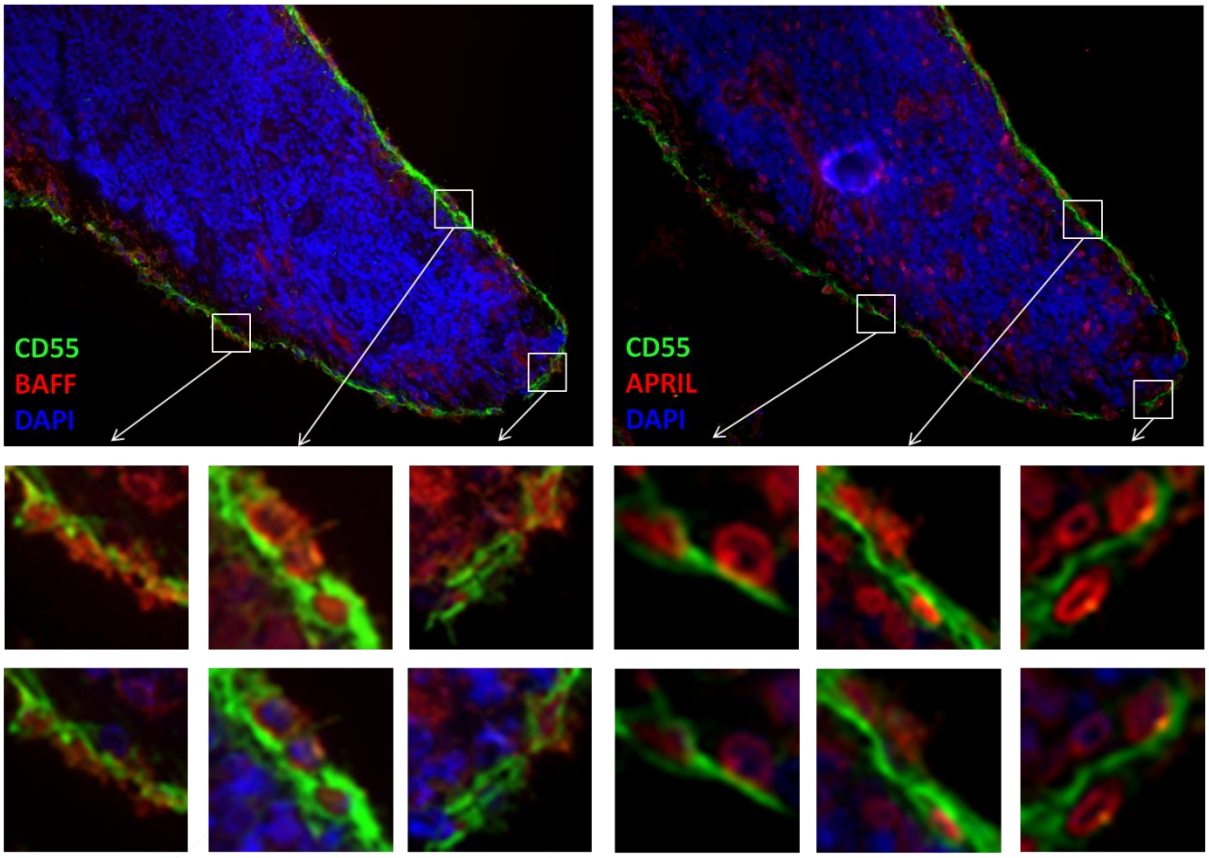


Abbildung 17: BAFF- und APRIL-exprimierende Zellen in der Deckzellschicht

Die Abbildung zeigt zwei konsekutive Schnitte des Synovialgewebes von Patient B0032. Oben links: Zellen der Deckzellschicht (grün), BAFF (rot) und Zellkernfärbung (blau). Oben rechts: Zellen der Deckzellschicht (grün), APRIL (rot) und Zellkernfärbung (blau). Mitte links: 3 vergrößerte Ausschnitte jeweils mit CD55- und BAFF- Färbung, Mitte rechts: 3 vergrößerte Ausschnitte jeweils mit Zellen der Deckzellschicht (grün) und APRIL (rot). Unten links: 3 vergrößerte Ausschnitte mit CD55 (grün), BAFF (rot) und Zellkernfärbung (blau), unten rechts: Cd55 (grün) APRIL (rot) und Zellkernfärbung (blau). 200-fache Vergrößerung.

In Abbildung 18 ist die Expression von APRIL in der Deckzellschicht dargestellt und Abbildung 19 zeigt die BAFF-Expression in der Deckzellschicht. In beiden Abbildungen ist deutlich die Expression durch synoviale Fibroblasten zu erkennen.

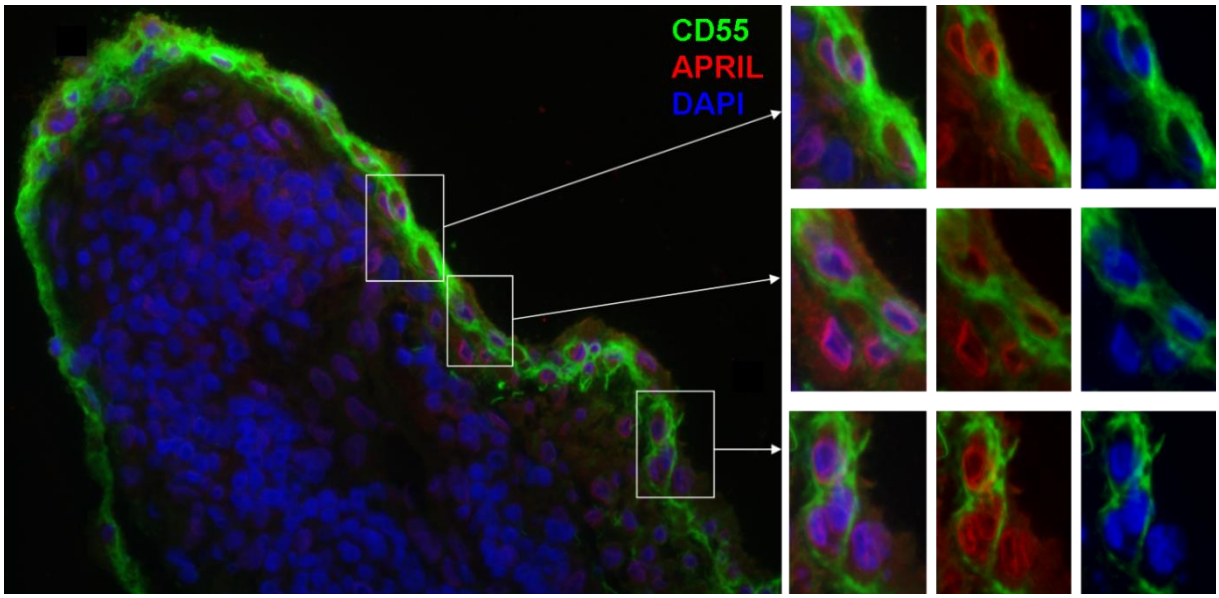


Abbildung 18: APRIL-Expression in der Deckzellschicht

Das linke Bild zeigt einen Ausschnitt aus dem Synovialgewebe des Patient B0032 mit einer 3-fach Färbung für die Deckzellschicht (CD55), für APRIL und für DAPI. Rechts sind jeweils drei Vergrößerungen zu sehen: zum einen die 3-fach Färbung, in der Mitte die Färbung für APRIL und CD55 und ganz rechts die Färbung für CD55 und DAPI. 400-fache Vergrößerung. Diese Abbildung ist ohne APRIL-Färbung bereits in Abbildung 9 zu sehen.

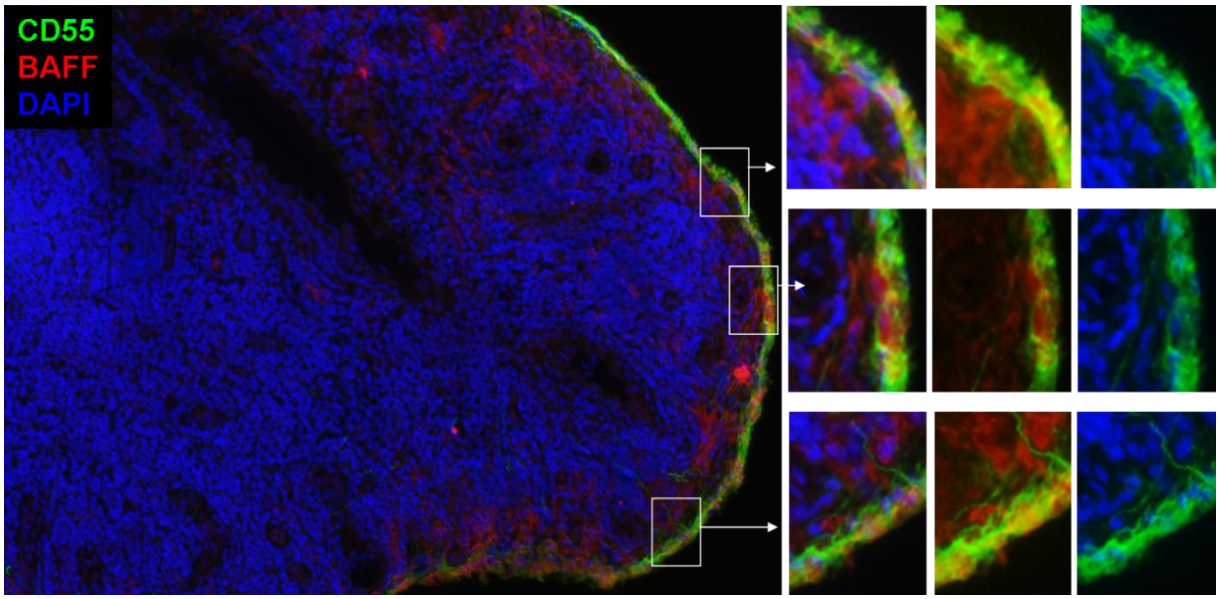


Abbildung 19: BAFF-Expression in der Deckzellschicht

Diese Abbildung zeigt einen Synovialschnitt des Patienten B0029. Auf dem linken Bild ist eine 3-fach Färbung mit einem Antikörper für die Deckzellschicht (CD55), einem Antikörper für BAFF sowie einer DAPI-Färbung zu sehen. Auf den vergrößerten Bildausschnitten sieht man zuerst die 3-fach Färbung, danach deine Doppelfärbung mit einem BAFF-Antikörper und einem für die Deckzellschicht (CD55) und anschließend eine CD55- sowie DAPI-Färbung.

3.3.3 BAFF- und APRIL-Expression in Gefäßumgebung

Unter der Deckzellschicht liegt die Subintima, ein bei Gesunden eher gefäßarmes Bindegewebe, welches bei RA-Patienten allerdings stark vaskularisiert ist. Um zu untersuchen, ob BAFF und APRIL in der Nähe von synovialen Gefäßen oder gar von Endothelzellen selbst exprimiert werden, werden die Synovialgewebe mit den entsprechenden Antikörpern immunhistologisch analysiert. Anhand der Abbildung **20** und Abbildung 22 zeigt sich, dass sich APRIL stets perivaskuläre anreichert. BAFF ist hingegen nicht in näherer Umgebung von synovialen Gefäßen konzentriert, wie in Abbildung 21 und Abbildung 22 zu sehen.

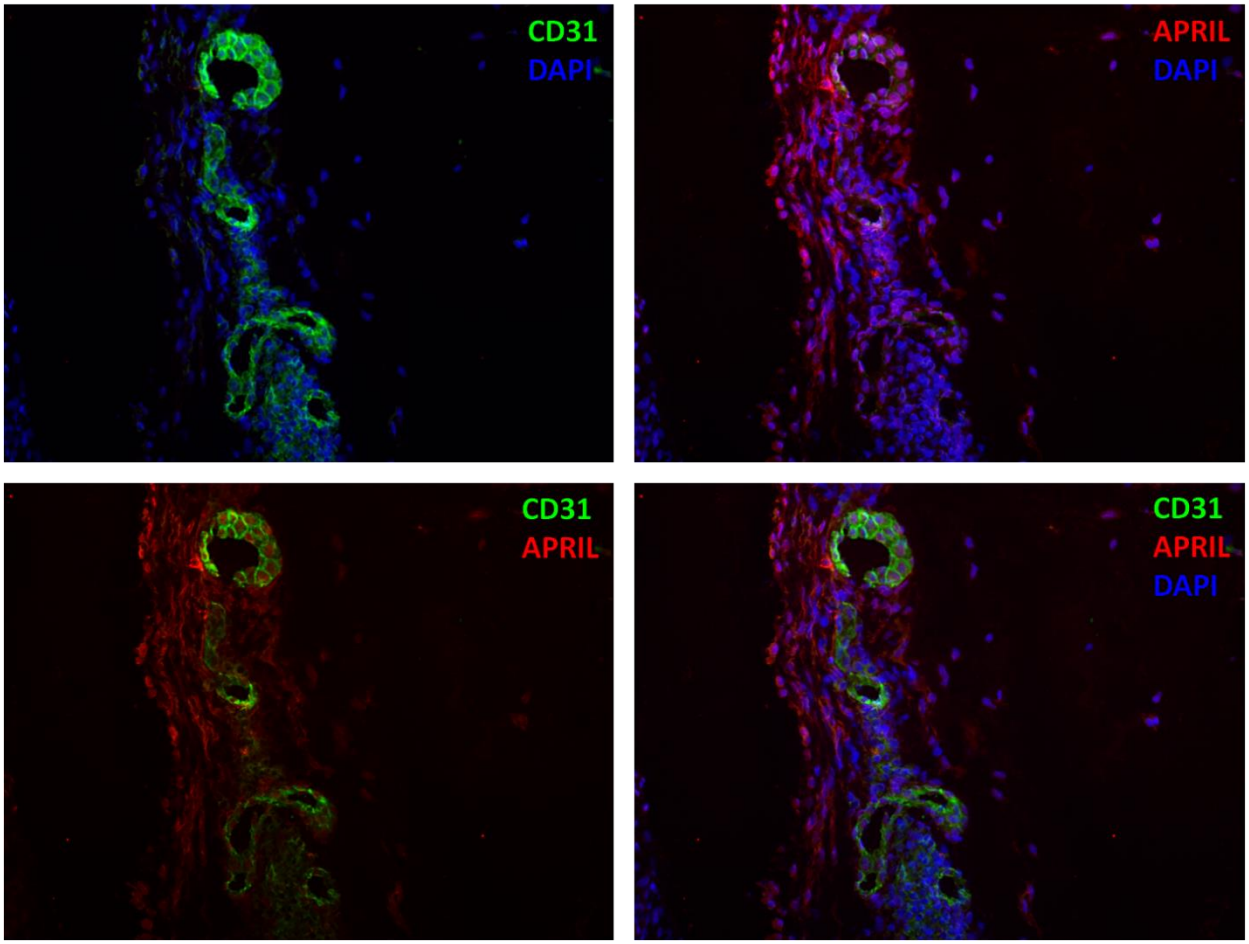


Abbildung 20: APRIL-Expression im Gefäßendothel

Die vier Abbildungen zeigen ein und denselben Gewebeausschnitt von Patient B0029. Oben links: Färbung mit anti-CD31-Antikörpern für synoviale Gefäße (grün) sowie Zellkernfärbung (blau). Oben rechts: Färbung mit einem Antikörper für APRIL (rot) und Zellkernfärbung (blau). Unten links: Färbung mit anti-CD31-Antikörper (grün) und APRIL-Antikörper (rot). Unten rechts: 3-fach Färbung mit anti-CD31-Antikörper (grün), APRIL-Antikörper (rot) und Zellkernfärbung (blau). 400-fache Vergrößerung.

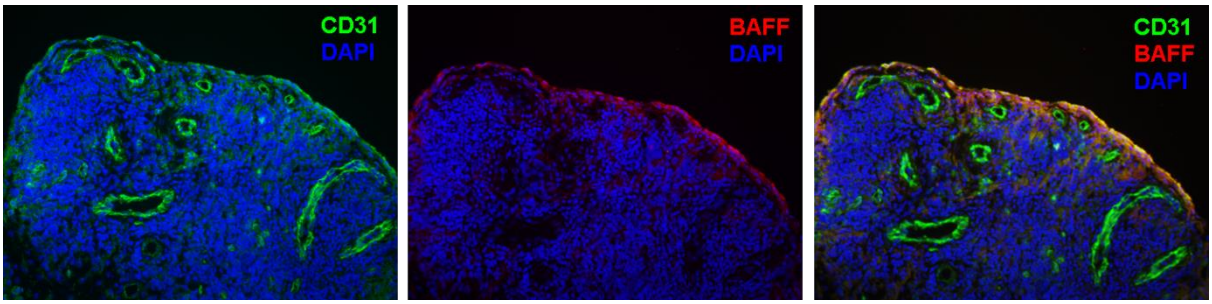


Abbildung 21: BAFF-Expression im Gefäßendothel

Die drei Abbildungen zeigen ein und denselben Gewebeausschnitt von Patient B0032. Links: Färbung mit anti-CD31-Antikörpern für synoviale Gefäße (grün) sowie Zellkernfärbung (blau). Mitte: Färbung mit einem Antikörper für BAFF (rot) und Zellkernfärbung (blau). Rechts: 3-fach Färbung mit CD31-Antikörper (grün), BAFF-Antikörper (rot) und Zellkernfärbung (blau). 200-fache Vergrößerung.

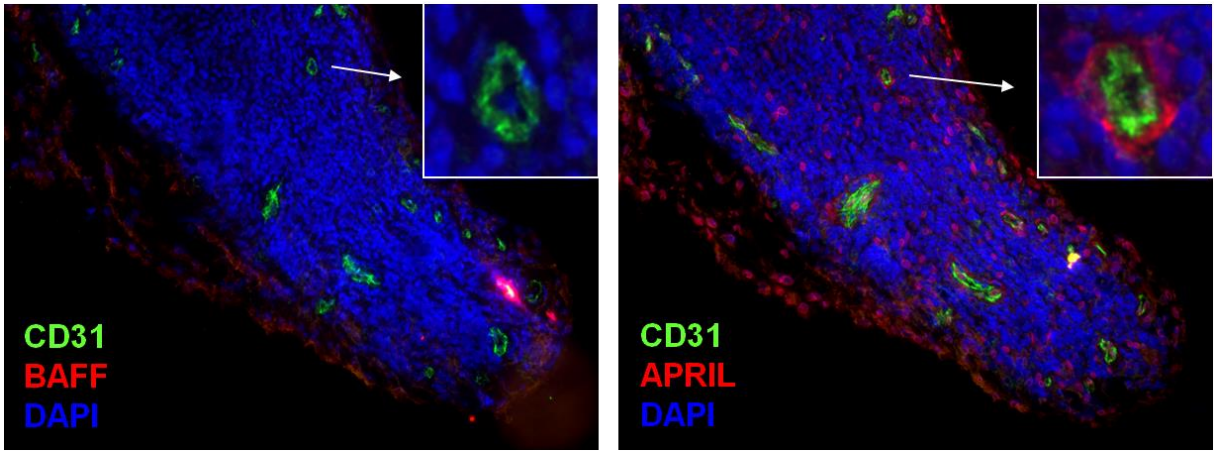


Abbildung 22: Vergleich der BAFF- und APRIL-Expression in synovialen Gefäßen

Diese Abbildung zeigt konsekutive Gewebeschnitte des Synovialgewebes von Patient B0032. Links: 3-fach Färbung mit anti-CD31-Antikörpern für synoviale Gefäße (grün), BAFF (rot) sowie Zellkernfärbung (blau). Rechts: 3-fach Färbung mit anti-CD31-Antikörpern für synoviale Gefäße (grün), APRIL (rot) sowie Zellkernfärbung (blau).

Hierbei stellt sich die Frage, ob die APRIL-Expression von den Endothelzellen ausgeht oder ob es sich möglicherweise um Glykan-gebundenes APRIL handelt.

Anhand von Abbildung 20 zeigt sich eine verstärkte Expression von APRIL in synovialen Endothelzellen. Hierbei zeigen sich sowohl APRIL-positive Endothelzellen als auch APRIL-positive Zellen im Perivaskulärraum (siehe Abbildung 22 sowie Abbildung 23 B und C). Als mögliche APRIL-Produzenten kommen somit auch die Endothelzellen in Frage. Desweitern ist in Abbildung 23 zu sehen, dass sich auch sekretiertes APRIL um Endothelzellen ansammelt, welches sich möglicherweise an Glykan-Rezeptoren angelagert hat.

Zusammenfassend zeigt sich hier, intrazelluläres APRIL in Endothelzellen und sekretiertes APRIL um Endothelzellen.

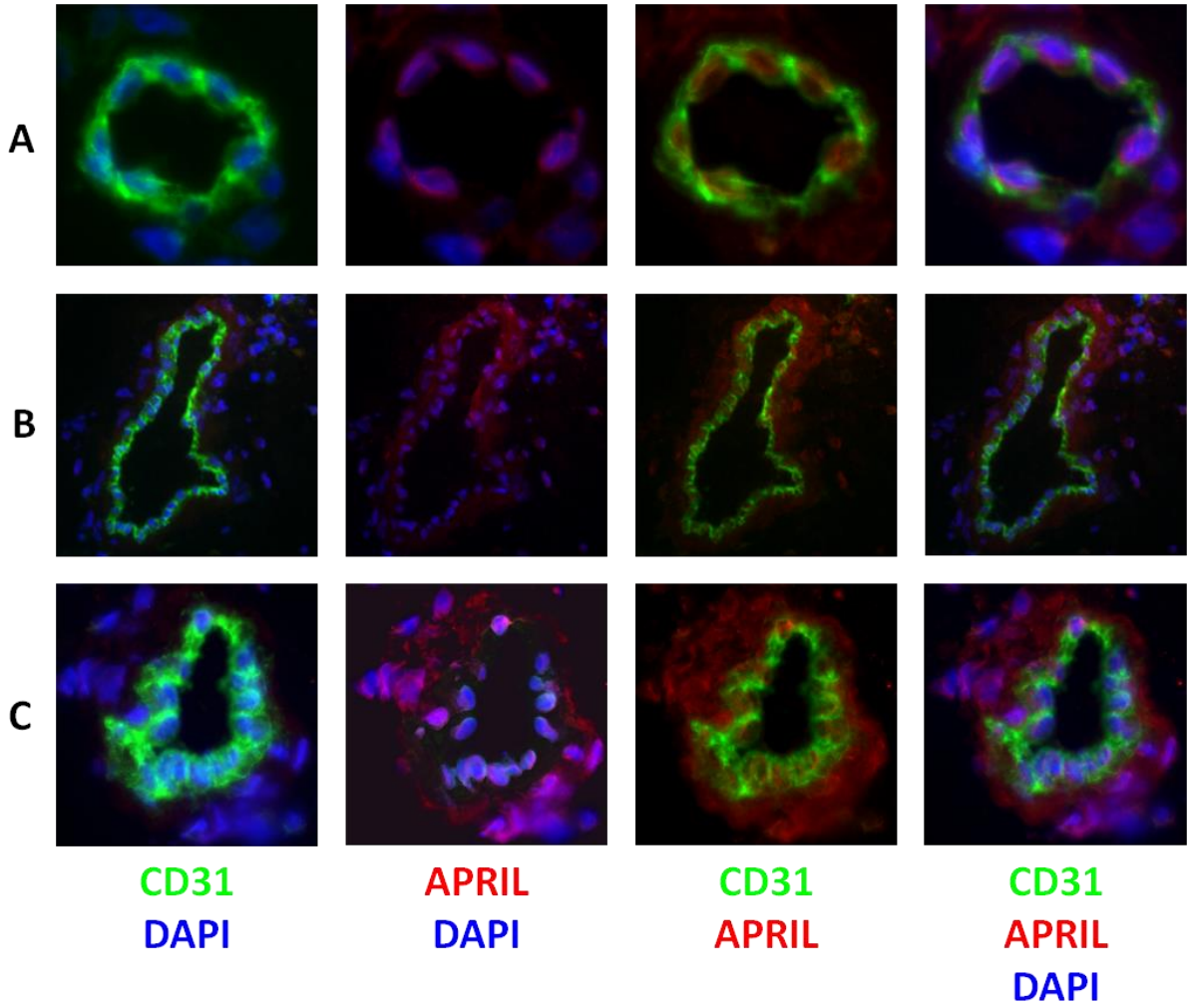


Abbildung 23: Vergrößerte Ausschnitte der APRIL-Expression in synovialen Gefäßen

Die Abbildungen zeigen drei verschiedene synoviale Gefäße. Die entsprechenden Färbungen stehen unter den Abbildungen. A,B und C: Links: Endothelzellen (grün) und Zellkernfärbung (blau), Mitte: erst APRIL-Färbung (rot) und Zellkernfärbung (blau), dann Endothelzellen (grün) und APRIL-Färbung (rot), rechts: Endothelzellen (grün), APRIL-Färbung (rot) und Zellkernfärbung (blau). Vergrößerung: A und C: 400x, B 200x.

3.3.4 BAFF- und APRIL-Expression in Keimzentren (FDCs)

Im normalen Lymphgewebe, aber auch im Synovialgewebe, differenzieren B-Zellen im Keimzentrum durch die Interaktion mit T-Zellen und FDCs zu B-Gedächtnis- oder in Plasmazellen (Kim et al, 2001). Da in allen untersuchten Synovialgeweben sowohl B- als auch Plasmazellen nachzuweisen sind, liegt die Vermutung nahe, dass auch ektope Keimzentren im Synovialgewebe nachweisbar sein sollten.

Von zehn immunohistochemisch analysierten RA-Synovialgeweben lassen sich lediglich bei einem Patienten (B0032) kleine ektope Keimzentren nachweisen. Nur bei diesem Patienten sind FDC-Netzwerke nachweisbar, die essentiell für den Aufbau der ektopen Keimzentren im Synovialgewebe sind (siehe Abbildung 12), indem sie eine kontrollierende Funktion einnehmen. Abbildung 24 zeigt auf konsekutiven Schnitten Färbungen mit verschiedenen Antikörpern. Man sieht ein großes Lymphozyteninfiltrat in dem sich ein B-Zell-reicher (Färbungen mit anti-CD20) und ein T-Zell-reicher (Färbungen mit anti-CD4 und anti-CD8) Bereich voneinander unterscheiden lassen. Wie man es auch in Lymphorganen sieht, hat sich im Grenzbereich der T- und der B-Zellzone eine Keimzentrumsstruktur gebildet, in der sich B-Zellen teilen (Färbung mit Ki-67-spezifischen Antikörpern). Der aktivierte Zustand der B-Zellen zeigt sich in der erhöhten Expression von CD86, einem Protein, dass für die B-T-Zell-Kostimulation wichtig ist. Außerhalb der Keimzentrumsstruktur lassen sich praktisch keine CD86 positive B-Zellen nachweisen.

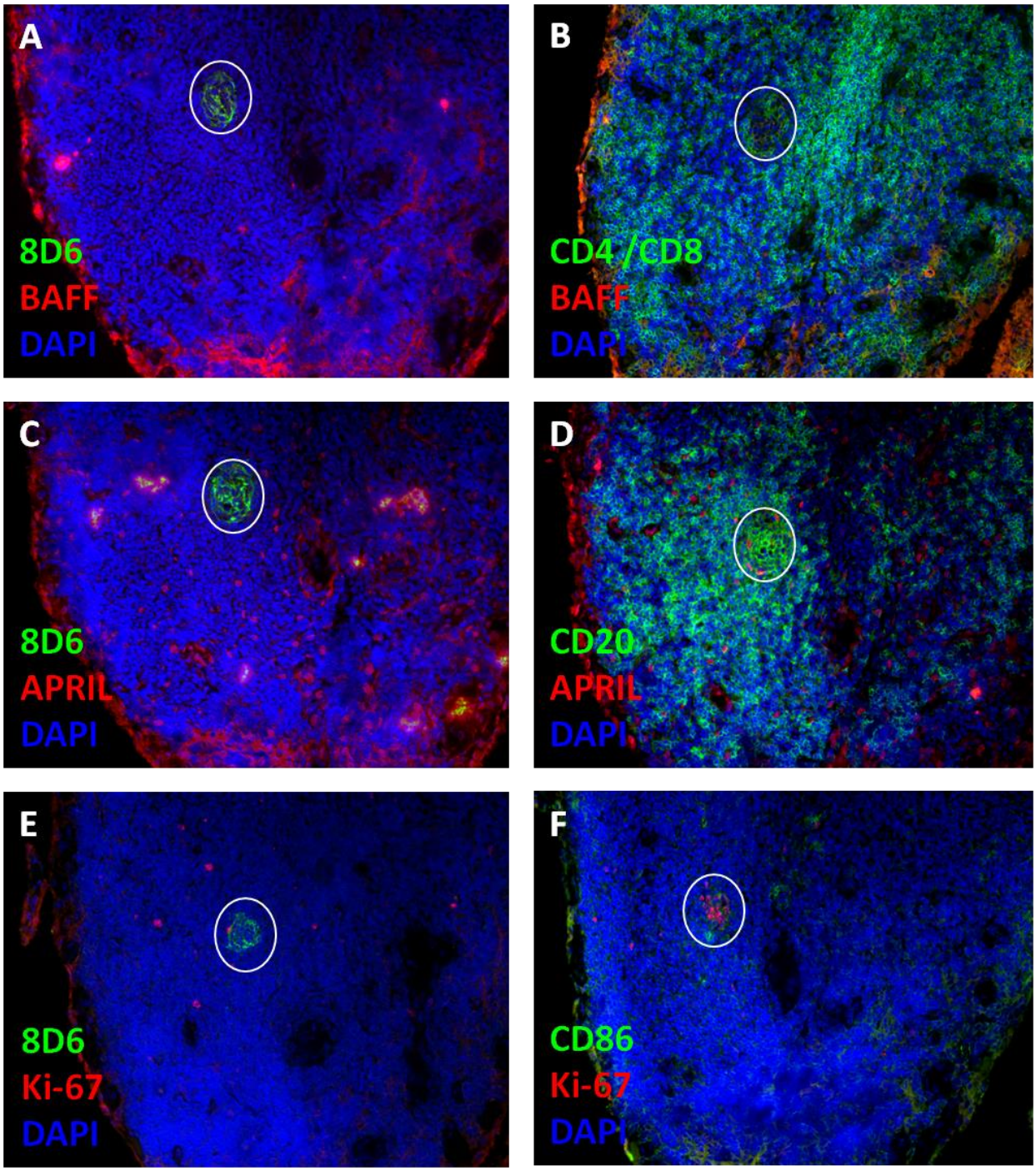


Abbildung 24: Keimzentrumsstrukturen im Synovialgewebe des Patienten B0032

Konsekutive Schnitte des Patienten B0032. Bild A: FDC-Färbung (grün), BAFF-Färbung (rot) und Zellkernfärbung (blau). Bild B: T-Zell-Färbung (grün), BAFF-Färbung (rot) und Zellkernfärbung (blau). Bild C: FDC-Färbung (grün), APRIL-Färbung (rot) und Zellkernfärbung (blau). Bild D: B-Zell-Färbung (grün), APRIL-Färbung (rot) und Zellkernfärbung (blau). Bild E: FDC-Färbung (grün), Ki-67-Färbung (rot) und Zellkernfärbung (blau). Bild F: aktivierte B-Zellen (grün), Ki-67-Färbung (rot) und Zellkernfärbung (blau). 200-fache Vergrößerung.

Gleichzeitige Färbung mit FDC und BAFF- bzw. APRIL-spezifischen Antikörpern zeigen deutlich, dass die netzwerkartigen FDC nur BAFF exprimieren. In der Doppelfärbung

mit APRIL stellt sich das FDC-Netzwerk grün dar. Bei der Doppelfärbung mit BAFF kommt es durch die Überlagerung der beiden Farbstoffe zu einer gelb-braunen Färbung. Es ist davon auszugehen, dass die B-Zellaktivierung durch BAFF weiter verstärkt wird. In anderen Bereichen des Synovialgewebes des Patienten B0032 lassen sich mit dem FDC-spezifischen Antikörper 8D6, weitere Keimzentrumsstrukturen nachweisen. Auch hier produzieren FDCs BAFF, während eine signifikante Expression von APRIL nicht gefunden wird. B-Zellproliferation kann nur in einer der gefundenen FDC-Struktur nachgewiesen werden.

Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass B-Zellen und Plasmazellen weitestgehend unabhängig voneinander in das entzündete Synovialgewebe einwandern.

In Abbildung 24 ist ein in seiner Ausdehnung eher kleines FDC-Netzwerk zu sehen mit dem typischen Aufbau eines Keimzentrums. So liegen innen, in der dunklen Zone, die B-Zellen. Um die B-Zellen lagern sich in der hellen Zone die T-Zellen und FDCs.

Die Abbildung 25 zeigt die vergrößerten Ausschnitte der Keimzentrumsformationen. Hier ist in Bild D und E sehr schön zu sehen, dass die T-Zellen einen Ringwall um die zentral versammelten B-Zellen bilden wie in einem Keimzentrum typisch. Zu erkennen ist auch, dass T-Zellen vereinzelt BAFF exprimieren, B-Zellen hingegen weder BAFF noch APRIL exprimieren. Des Weiteren exprimieren FDCs BAFF, aber kein APRIL. Auffällig sind die in Bild E länglich erscheinenden Zellen, welche kreisförmig um die B-Zellen gelagert sind und APRIL exprimieren. Hierbei könnte es sich um Eosinophile Zellen handeln.

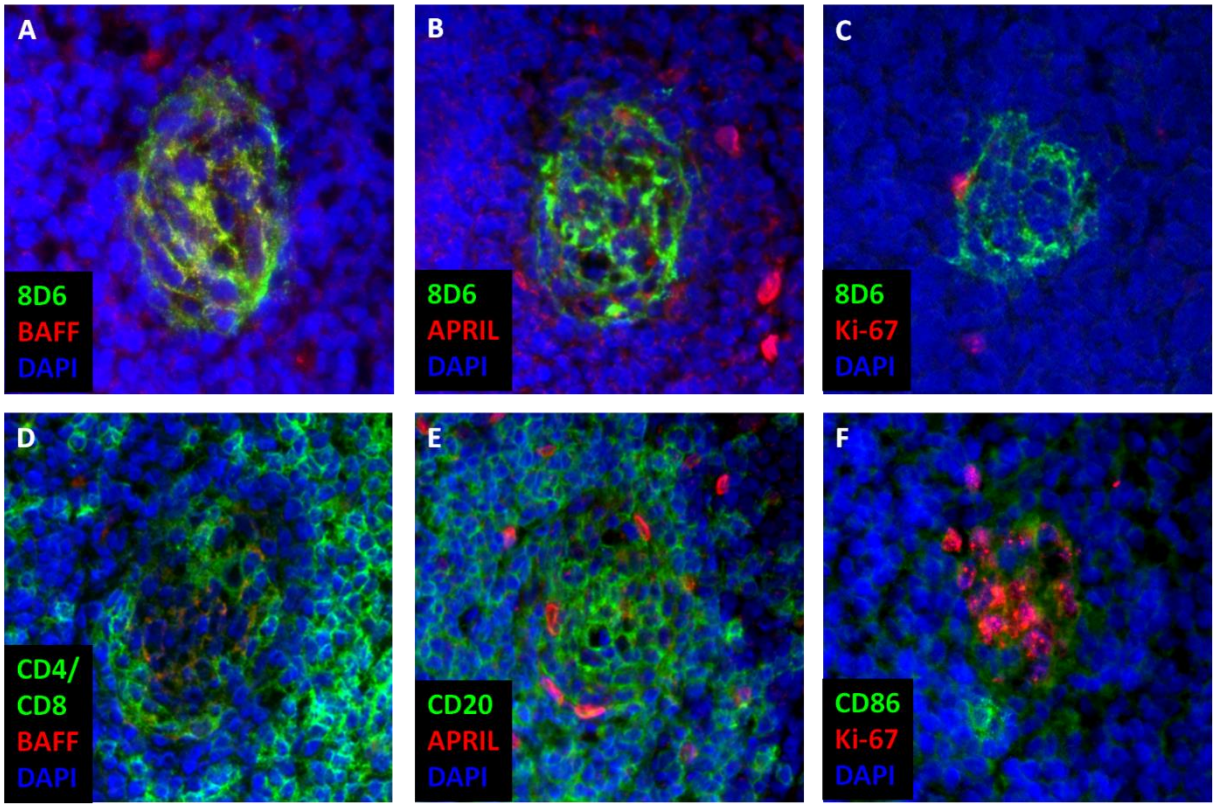


Abbildung 25: Vergrößerte Ausschnitte der Keimzentrumsstrukturen des Patienten B0032

Bild A: Follikelfärbung (grün), BAFF-Färbung (rot), Zellkernfärbung (blau); Bild B: Follikelfärbung (grün), APRIL-Färbung (rot), Zellkernfärbung (blau); Bild C; Follikelfärbung (grün), Ki-67-Färbung (rot), Zellkernfärbung (blau);

Bild D: T-Zell-Färbung (grün), BAFF-Färbung (rot), Zellkernfärbung (blau); Bild E: B-Zell-Färbung (grün), APRIL-Färbung (rot), Zellkernfärbung (blau); Bild F: aktivierte B-Zell-Färbung (grün), Ki-67-Färbung (rot), Zellkernfärbung (blau); 400-fache Vergrößerung.

3.3.5 BAFF- und APRIL-Expression im Gewebe

Während BAFF und APRIL i.d.R. entweder in Gefäßnähe, der Deckzellschicht oder in der Umgebung von B- bzw. Plasmazellen nachweisbar sind, ist bei einem von zehn Patienten (B0032) auch eine ausgeprägte diffuse APRIL-Verteilung ubiquitär im Synovialgewebe nachweisbar (siehe Abbildung 26). Bei diesen Zellen handelt es sich weder um B- noch um Plasmazellen, da die Doppelfärbungen für APRIL und B-Zellen bzw. APRIL und Plasmazellen negativ sind. Aufgrund der polymorphkernig erscheinenden Zellen lässt sich vermuten, dass es sich bei den APRIL-exprimierenden Zellen um Neutrophile Granulozyten handelt. Dies bestätigt sich nicht, denn weder mit Hilfe der HE-Färbung noch durch die immunhistochemische Färbung mit CD65 lassen sich Neutrophile darstellen. Bei genauerer Betrachtung der Zellmorpholgie könnte es sich bei den APRIL-exprimierenden Zellen auch um unterschiedliche Zelltypen handeln, so beispielsweise

um elongierte Mastzellen oder Eosinophile. Während Mastzellen einen ovalen meist exzentrisch gelegenen Zellkern aufweisen, haben Eosinophile einen zweilappigen Zellkern (Brillenform).

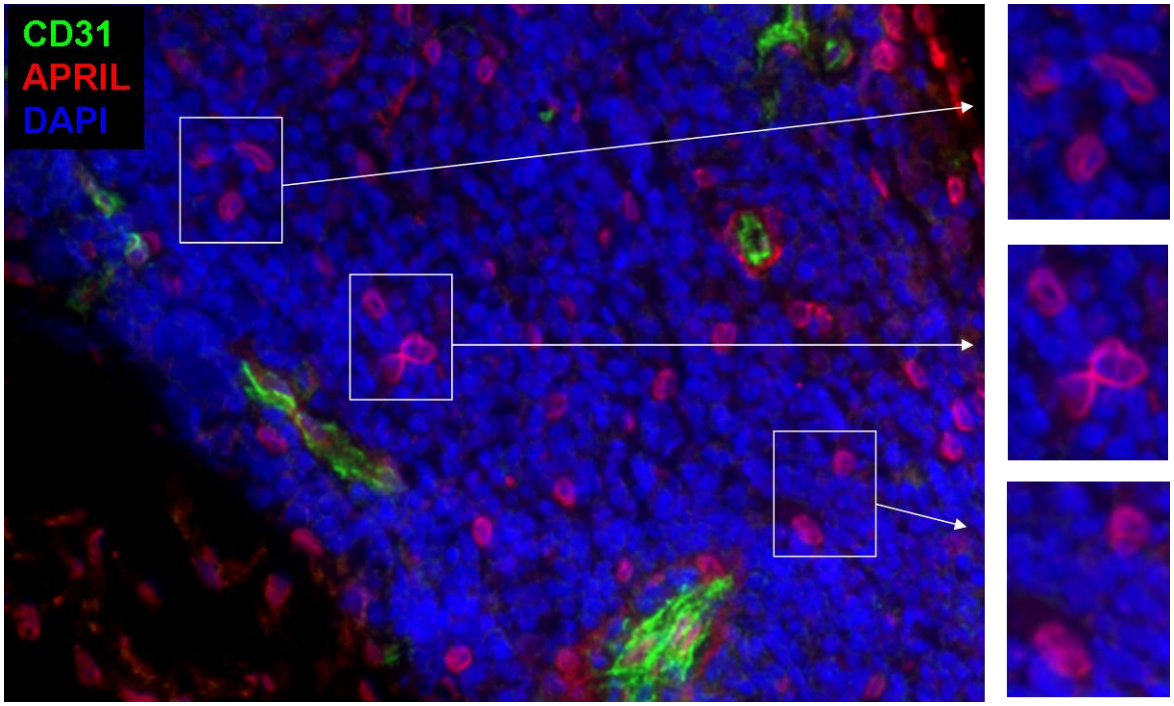


Abbildung 26: APRIL-Expression im Synovialgewebe von Patient B0032

Auf dieser Abbildung ist die diffuse Verteilung von APRIL im Synovialgewebe des Patienten B0032 dargestellt sowie drei vergrößerte Ausschnitte von APRIL-positiven Zellen.

3.3.6 BAFF- und APRIL-Expression in B- und Plasmazellen

Bisher ist nicht hinreichend geklärt, welche Rolle BAFF und APRIL in der Pathogenese der RA spielen. Insbesondere sind nicht alle Zellen identifiziert, die die beiden Zytokine exprimieren. Gesichert ist, dass BAFF und APRIL hauptsächlich von myeloiden Zellen exprimiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass B- und Plasmazellen vermehrt im rheumatisch veränderten Synovialgewebe vorhanden sind, stellt sich die Frage, ob sie im Sinne einer autokrinen Sekretion die für ihre eigene Differenzierung notwendigen Zytokine BAFF und APRIL selbst sezernieren.

Anhand der Synovialgewebe der Patienten B0029 und B0032, die beide sehr viele Plasmazellen aufweisen, wird dieser Fragestellung nachgegangen. Für Patient B0029 wird in einer sorgfältigen Analyse, in der insgesamt 6 Schnitte mit insgesamt 2203 Plasmazellen ausgewertet werden, der Anteil der BAFF- und APRIL-produzierenden Plasmazellen ermittelt (siehe Tabelle 21). Es zeigt sich, dass im Durchschnitt jede 44.

Plasmazelle positiv für BAFF ist, es aber überhaupt keine APRIL-produzierenden Plasmazellen gibt. Der Prozentsatz der BAFF-produzierenden Plasmazellen schwankt zwischen 1 und fast 4 Prozent auf den verschiedenen Synovialschnitten (siehe Abbildung 27). Ein ähnliches Ergebnis wird für die Synovialschnitte des Patienten 0032 gefunden (siehe Abbildung 28). Auch hier sieht man, dass nur einzelne Plasmazellen BAFF produzieren. Manchmal sieht man BAFF-positive Plasmazellen in direkter Nachbarschaft. Insgesamt ist aber eine gleichmäßige Verteilung über den Gewebeschnitt zu beobachten. APRIL-produzierende Plasmazellen können auch auf den Synovialschnitten des Patienten B0032 nicht gefunden werden. Ebenso zeigt sich bei keinem der untersuchten Patienten eine BAFF- oder APRIL-Expression in B-Zellen.

Tabelle 21: Tabellarische Übersicht der BAFF-exprimierenden Plasmazellen bei Patient B0029

Bilder	Alle PC	BAFF-pos. Zellen	Prozent der BAFF-pos. PC	Jede x-te Zelle
1.	223	6	2,69%	37
2.	210	3	1,43%	70
3.	528	11	2,08%	48
4.	570	22	3,86%	26
5.	432	5	1,16%	86
6.	240	3	1,25%	80
Gesamt	2203	50	2,27%	44
Mittelwert	367,17	8,33	2,08%	57,83
Std-Abw	163,01	7,31	1,05%	24,40

Tabellarische Zusammenfassung über das Verhältnis zwischen Plasmazellen und BAFF-positive Plasmazellen auf Synovialschnitten des Patienten B0029, Standardabweichung (Std-Abw).

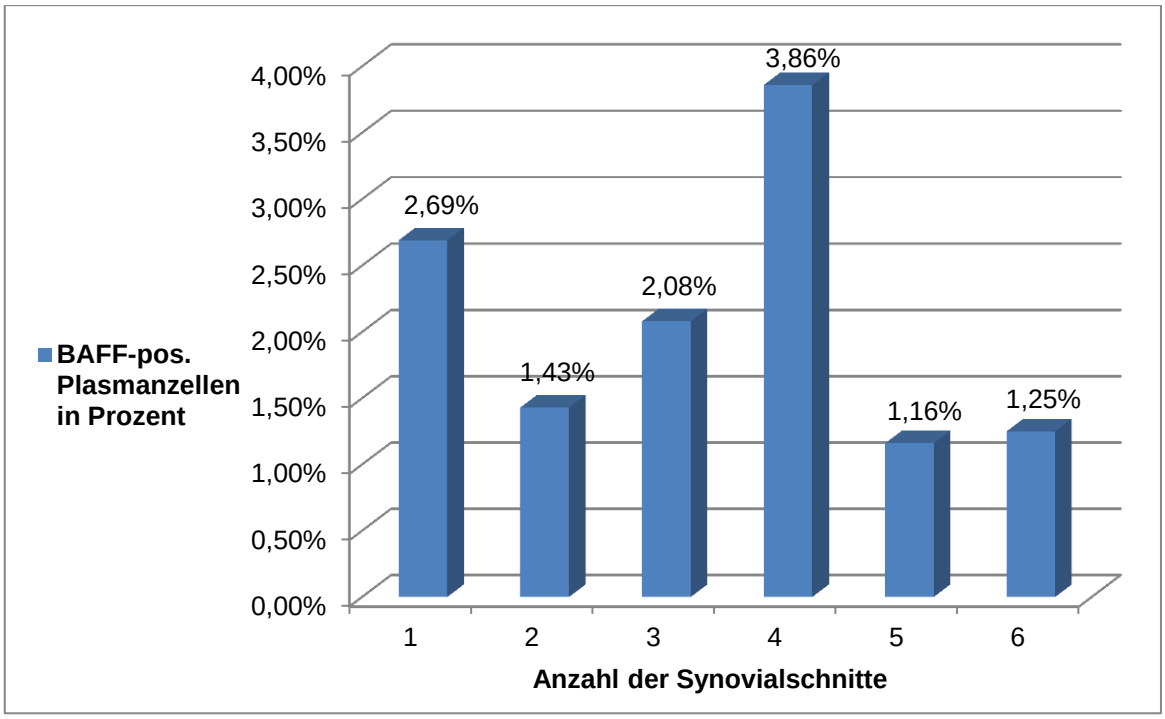


Abbildung 27: Grafische Darstellung der BAFF-exprimierenden Plasmazellen bei Patient B0029

Schematische Darstellung zur Verteilung der BAFF-positiven Plasmazellen in den einzelnen Synovialschnitten des Patienten B0029.

Bild A: Patient B0032

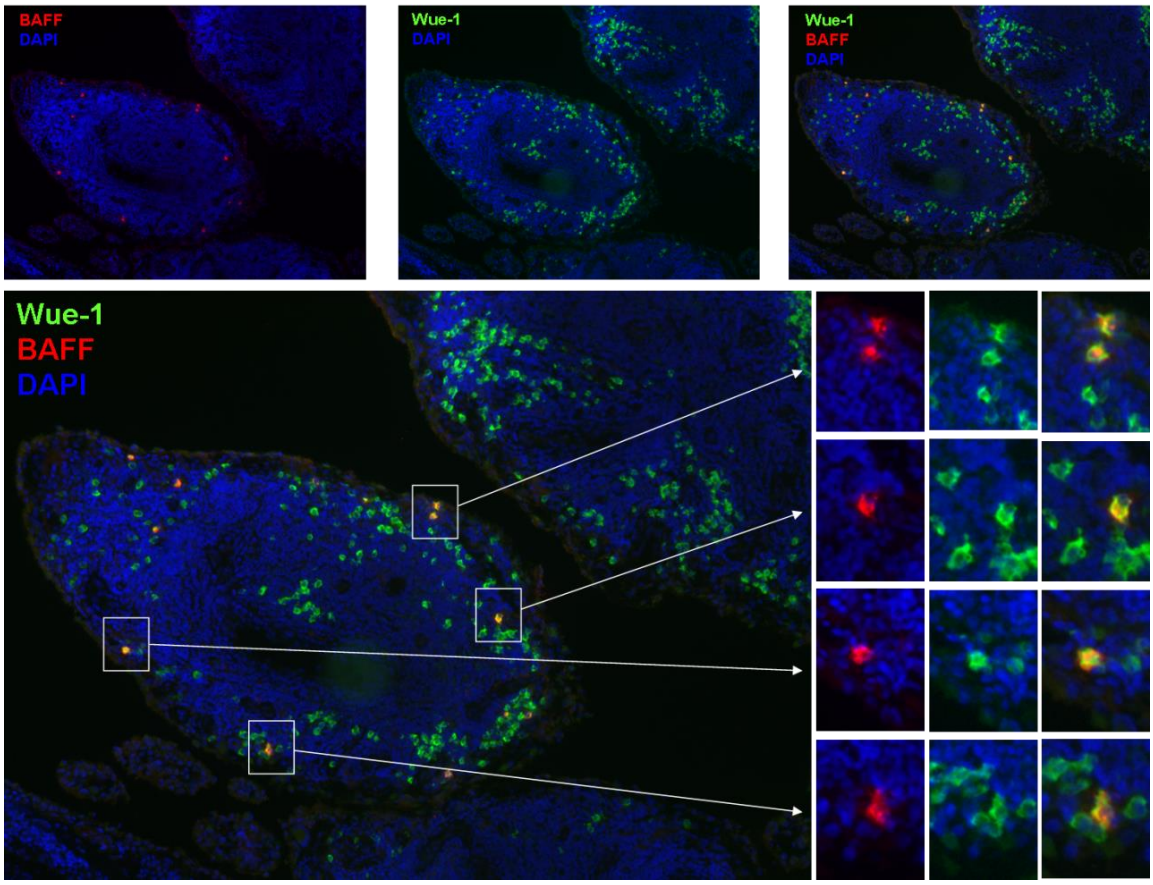


Bild B: Patient B0029

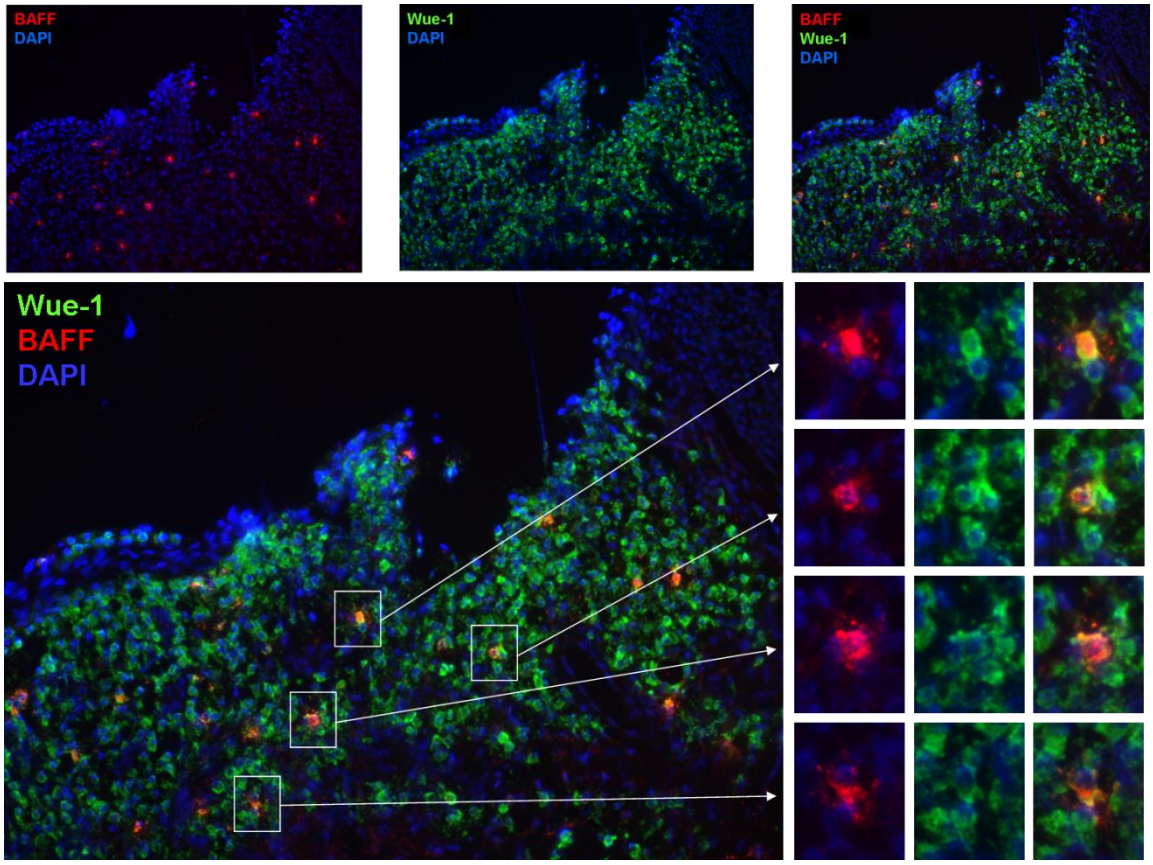


Abbildung 28: Autokrine Expression von BAFF in synovialen Plasmazellen

Die Bilder A zeigt das Synovialgewebe des Patienten B0032, Bild B zeigt das Synovialgewebe des Patienten B0029. Die Schnitte wurden mit einem Antikörper für BAFF, einem Antikörper spezifisch für Plasmazellen (Wue-1) und im dritten Schritt eine Doppelfärbung mit dem Plasmazell-spezifischen Antikörper (Wue-1) und dem Antikörper für BAFF gefärbt. Die Vergrößerungen zeigen einzelne Plasmazellen (Wue-1+) die gleichzeitig auch für BAFF positiv sind (gelbe Färbung durch Überlagerung von rot und grün). Bild A zeigt dabei einen Bereich des Synovialgewebes mit einzelnen Plasmazellen, während Bild B einen Bereich mit Plasmazellaggregaten zeigt. 200-fache Vergrößerung.

Zusammenfassend zeigt dieser Befund zum ersten Mal, dass es im entzündeten Synovialgewebe von RA-Patienten Plasmazellen gibt, die BAFF exprimieren. Dabei handelt es sich um einen sehr geringen Teil der Plasmazellen, nämlich etwa 2 Prozent. Für APRIL kann im Gegensatz dazu gar keine Expression durch Plasmazellen nachgewiesen werden.

3.4 Zusammenhang zwischen Entzündungsparametern, B Zellen, Plasmazellen, Krankheitsdauer, BAFF- und APRIL-Expression, Histologische Daten

Um den Zusammenhang zwischen den verschiedenen Variablen: B-Zellen, Plasmazellen, Krankheitsdauer und CRP-Wert zu untersuchen, wird der Spearman Rangkorrelationstest durchgeführt (siehe Tabelle 22). Im Gegensatz zum Korrelationstest nach Pearson wird bei Spearmans Version kein linearer Zusammenhang angenommen. Die Voraussetzungen für den Spearman-Test sind lediglich, dass die Variablen ordinal skaliert sind und dass der untersuchte Zusammenhang monoton ist. Um zu prüfen, ob der aufgezeigte Zusammenhang rein zufällig ist, wird mit Hilfe eines t-Tests das Signifikanzniveau der Korrelationskoeffizienten bestimmt.

Tabelle 22: Korrelationstabelle

	PC	***B-Zellen***	***CRP***	**Krankheitsdauer**	**Alter**	**DAS-Wert**
PC	1					
B-Zellen	0,6151 *p=0,058*	1				
CRP	0,0485 *p=0,894*	-0,3606 *p=0,306*	1			
Krankheitsdauer	-0,5373 *p=0,109*	-0,2826 *p=0,429*	-0,0549 *p=0,880*	1		
Alter	0,0974 *p=0,789*	-0,4174 *p=0,230*	0,6201 *p=0,056*	-0,4251 *p= 0,221*	1	
DAS-Wert	-0,4985 *p= 0,209*	*-0,3181* *p= 0,443*	0,6587 *p= 0,076*	0,6228 *p=0,099*	-0,0301 *p=0,944*	1

Diese Tabelle zeigt die Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten für folgende sechs Variablen: Plasmazellen (PC), B-Zellen, CRP (in mg/dl), Krankheitsdauer (in Jahren), Alter (in Jahren) und DAS-Wert. Jeweils unter den Korrelationskoeffizienten ist kursiv der p-Wert angeben.

Es wird eine signifikant positive Korrelation zwischen B- und Plasmazellen beobachtet (Spearman-Korrelation: 0,62, p-Wert= 5,8%). Außerdem zeigt sich eine negative Korrelation zwischen der Krankheitsdauer und der Anzahl der Plasmazellen (Spearman-Korrelation: -0,54; p-Wert= 10,9%). Die Korrelation zwischen Krankheitsdauer und B-Zellen ist ebenfalls negativ jedoch nicht signifikant. Der DAS-Wert ist signifikant positiv korreliert mit dem CRP-Wert und der Krankheitsdauer (Spearman-Korrelation: 0.66; p-Wert= 7,6% bzw. Spearman-Korrelation: 0.62; p-Wert= 9,9%). Das Alter der Patienten

und ihr CRP-Wert sind signifikant positiv miteinander korreliert. Es besteht keine signifikante Korrelation zwischen dem CRP-Wert (Alter) und den B-Zellen, den Plasmazellen sowie der Krankheitsdauer.

Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Patienten, die Ergebnisse der statistischen Analyse nur mit Vorsicht interpretiert werden können.

4 Diskussion

Dieser Teil der Arbeit setzt sich mit den Resultaten und deren Bedeutung für die Pathogenese der RA auseinander. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die BAFF- und APRIL-Expression im Synovialgewebe von RA-Patienten gelegt.

Während BAFF vor allem im frühen Stadium der peripheren B-Zell-Entwicklung eine entscheidende Rolle spielt, scheint APRIL eine herausragende Rolle im Endstadium der B-Zellentwicklung, dem Stadium der Plasmazellen, einzunehmen. Des Weiteren deuten auch die Therapieerfolge bei RA-Patienten mit Biologika, die zur B-Zelldepletion oder Antagonisierung von BAFF und APRIL führen, auf deren Bedeutung in der RA-Pathogenese hin.

4.1 B- und Plasmazellverteilung im Synovialgewebe

Im gesunden nicht entzündeten Synovialgewebe ist der Nachweis von B- und Plasmazellen eine Seltenheit. Im Verlauf der RA verlassen eben genau diese Zellen die Blutbahnen und reichern sich im Gewebe an.

Bei den untersuchten Patienten schwankt die Anzahl der B-und Plasmazellen im Synovialgewebe relativ stark. Eine mögliche Erklärung für die heterogene Verteilung der B- und Plasmazellen könnte das Entzündungsstadium zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme sein. So beschreiben beispielsweise Jacobi et al. (2003), dass die Häufigkeit der Plasmazellen bei SLE-Patienten signifikant mit der Krankheitsaktivität korreliert. Das bedeutet, dass in der akuten Krankheitsphase mehr B- und Plasmazellen zu erwarten wären als in der Remissionsphase. Zur Beurteilung der Krankheitsaktivität wird i.d.R. der DAS-28-Index herangezogen. Da dieser leider nicht für alle zehn Patienten vorliegt, wird zur Überprüfung der Hypothese zusätzlich der CRP-Wert als Entzündungsmarker verwendet. Die hohe Korrelation vom CRP-Wert und dem DAS-Wert (Korrelation: 0,66, p-Wert: 7,6%) bestätigt die Einschätzung, dass auch der CRP-Wert ein geeignetes Maß für die Einschätzung der Krankheitsaktivität darstellt. Die Vermutung, dass Patienten mit einem hohen CRP-Wert (DAS-Wert) mehr B- bzw. Plasmazellen aufweisen als Patienten mit einem niedrigen CRP-Wert (DAS-Wert), bestätigte sich nicht. Es lässt sich keine signifikante Korrelation zwischen dem CRP-Wert und B-Zellen (Korrelation: -0,36, p-Wert: 30,6%) sowie dem CRP-Wert und Plasmazellen (Korrelation: 0,05, p-Wert: 89,4%) feststellen. Ein vergleichbares Ergebnis findet sich für die Korrelationen zwi-

schen dem DAS-Wert und den B-Zellen (Korrelation: -0,32, p-Wert: 44,3%) sowie dem DAS-Wert und den Plasmazellen (Korrelation: -0,50, p-Wert: 20,9%), zwar ist die Korrelation hier deutlich stärker, aber sie ist ebenfalls nicht signifikant. Überraschend ist die Tatsache, dass die Korrelation in allen Fällen negativ ist. Eine mögliche Erklärung für dieses Resultat ist, dass im Rahmen einer entzündungshemmenden Therapie, beispielsweise mit Glukokortikoiden, ein deutlicher Rückgang des CRP-Wertes erreicht wird, ohne jedoch die Anzahl von B- und Plasmazellen im Synovialgewebe im gleichen Maße zu reduzieren. Dieses Argument erscheint vor dem Hintergrund, dass die untersuchten Gewebeproben aus Operationsmaterial stammen als nicht unwahrscheinlich, da vor einem Eingriff in die Gelenke zumeist eine Verringerung der Entzündungsparameter angestrebt wird.

Eine weitere Ursache für die unterschiedliche Verteilung der B- und Plasmazellen könnte in der unterschiedlichen Krankheitsdauer der Patienten liegen. So sind in der frühen Krankheitsphase nur sehr selten Plasmazellen nachweisbar und erst mit zunehmender Chronifizierung der RA nimmt der Anteil an lymphoiden Zellen im Gewebe zu. Dichte lymphozytäre Infiltrate oder Lymphfollikel mit Keimzentren finden sich i.d.R. erst nach längerer Krankheitsdauer und sind ein wichtiges Kennzeichen für eine hochgradige bzw. chronische Synovialitis (Krenn et al., 2006). Andererseits korrelieren die histologischen Befunde oft nicht mit den klinischen Angaben, was sich auch bei der Korrelationsanalyse zeigt. Hier ist ein negativer Zusammenhang zwischen der Krankheitsdauer und der Anzahl der Plasmazellen (Korrelation: -0,54, p-Wert: 10,9%) sowie der Krankheitsdauer und der Anzahl der B-Zellen (Korrelation: -0,28, p-Wert: 42,9%) zu sehen. Dieser ist jedoch nur im ersten Fall marginal signifikant. Empirisch findet sich also genau das Gegenteil des erwarteten Verhältnisses, je länger ein Patient an RA erkrankt ist, desto weniger B- oder Plasmazellen sind nachweisbar. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Patienten mit langer Krankheitsdauer bereits umfangreich und zum Teil auch mit Biologika therapiert wurden. So werden zwei Patienten mit Antikörpern gegen TNFα behandelt: Patienten B0113 mit Humira (Adalimumab) und Patient B0116 mit Enbrel (Etanercept). Zur genauen Überprüfung dieser Hypothese sind die notwendigen Daten leider nur lückenhaft verfügbar.

Schließlich ist es auch denkbar, dass es sich bei den untersuchten Patienten um eine heterogene Gruppe handelt, bei denen verschiedene Subtypen der RA vorliegen. In der aktuellen Literatur wird zunehmend angezweifelt, dass es sich bei der RA um ein ho-

mogenes Krankheitsbild handelt. Vorstellbar wäre auch, dass eigentlich verschiedene Krankheitsbilder mit ähnlichen Symptomen, aber möglicherweise unterschiedlicher Pathogenese bisher fälschlich als RA zusammengefasst wurden (Frey, 2011 und Miehle et al., 2000). Für diese Sichtweise spricht, dass der Nachweis von Antikörpern, der Verlauf sowie die Wirksamkeit einer Therapie von Patient zu Patient stark variieren können. So sind beispielsweise die neuen Biologika lediglich bei der Hälfte der RA-Patienten wirksam (Burmester et al., 2005).

4.2 APRIL- und BAFF-Expression im Synovialgewebe

BAFF und APRIL finden sich normalerweise in peripheren lymphatischen Organen wie Milz, Lymphknoten und Knochenmark. Auch entzündetes Gewebe bietet Überlebensnischen für Plasmazellen (Cassese et al., 2001). Bekannt ist, dass BAFF essentiell für den Reifungsprozess und die Differenzierung unreifer B-Zellen zu reifen B-Zellen ist, während APRIL eine große Bedeutung für das Überleben von Plasmazellen hat. Vollständig verstanden sind die Funktionen von BAFF und APRIL aber bisher nicht.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten ist eine vermehrte Expression von BAFF und APRIL in der Deckzellschicht zu finden. Als BAFF- und APRIL-Produzenten in der Deckzellschicht können die synovialen Fibroblasten identifiziert werden. Sie exprimieren möglicherweise BAFF und APRIL, um B-Zellen und Plasmazellen im Blut zu sichern. Bereits Ohata et al. (2005) sowie Nakajima et al. (2007) beschreiben eine BAFF-Anreicherung in der Deckzellschicht und identifizierten ebenfalls die synovialen Fibroblasten als BAFF-Produzenten. Nagatani et al. (2007) sowie Gabay et al. (2009) beschreiben eine APRIL-Anreicherung in der Deckzellschicht. Nagatani et al. (2007) sehen in den synovialen Fibroblasten ebenfalls Produzenten von APRIL und gehen davon aus, dass APRIL seine eigene Produktion stimuliert. Nagatani et al. (2007) zeigen auch, dass die synovialen Fibroblasten den BCMA-Rezeptor exprimieren und somit APRIL binden können. Gabay et al. (2009) hingegen behaupten, dass APRIL zwar in der Deckzellschicht nachweisbar ist, aber nicht von den dort ansässigen Zellen gebildet wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig eine intrazelluläre Ansammlung von APRIL (siehe Abbildung 18), was eine Produktion durch synoviale Fibroblasten nahelegt.

Neben der Expression von BAFF und APRIL in der Deckzellschicht zeigt sich eine vermehrte APRIL-Expression in nahezu allen CD31-positiven Gefäßstrukturen. Zudem la-

gert sich von Proteoglykanen gebundenes APRIL um synoviale Gefäße an. BAFF lässt sich hingegen weder in noch um Gefäßstrukturen nachweisen. Möglicherweise spielt APRIL eine wichtige Rolle im Prozess der synovialen Neoangiogenese, welche durch Einsprossung von zusätzlichen Blutgefäßen die weitere Infiltration des Synovialgewebes mit Entzündungszellen fördert. Auch Gabay et al. (2009) zeigen, dass große Mengen von APRIL um Blutgefäße herum konzentriert sind. Anders als diese Arbeit identifizierten Gabay et al. (2009) als APRIL-sezernierende Zellen nicht die Endothelzellen, sondern Blut-Neutrophile. Sie vermuten, dass APRIL über fenestrierte Blutkapillaren ins Synovialgewebe diffundiert. Zur Darstellung der APRIL-Expression verwendeten sie den Stalk-1-Antikörper, welcher zur Identifizierung von APRIL-produzierenden Zellen und damit intrazellulärem APRIL entwickelt wurde. Fraglich ist jedoch, wie spezifisch Stalk-1 für APRIL wirklich ist, da durch Stalk-1 auch Elastasefasern der Neutrophilen Zellen angefärbt werden können. Es ist auch ungeklärt, weshalb Neutrophile Zellen APRIL produzieren, dieses dann aber nicht sezernieren und APRIL somit ausschließlich intrazellulär vorliegt.

Im Gewebe eines Patienten (B0032) lässt sich eine diffuse APRIL-Verteilung nachweisen (siehe Abbildung 26). Bei diesen APRIL-exprimierenden Zellen könnte es sich um Eosinophile handeln, welche als Überlebenszellen für Plasmazellen im Knochenmark von Mäusen neu entdeckt wurden. Chu et al. (2011) konnten für Mäuse zeigen, dass Eosinophile im Knochenmark mindestens zwei wichtige Faktoren für die Plasmazellen bereitstellen, nämlich die Zytokine APRIL und IL-6. Dadurch sichern Eosinophile das Überleben von Plasmazellen im Knochenmark. Zu prüfen bleibt, ob dies auch für das Synovialgewebe von RA-Patienten gilt. Meine Befunde sprechen dafür, dass auch im Synovialgewebe von RA-Patienten Eosinophile Zellen APRIL exprimieren (siehe Abbildung 25, Bild E).

In den untersuchten Synovialgeweben treten B-Zellen und Plasmazellen gemeinsam auf, was durch die hohe und signifikant positive Korrelation zwischen der Anzahl von B- und Plasmazellen (Korrelation: 0,62, p-Wert: 5,8%) verdeutlicht wird. Da die CD20-positiven B-Zellen die Vorläufer der autoantikörpersezernierenden Plasmazellen sind, könnte das gemeinsame Auftreten von B- und Plasmazellen ein Hinweis dafür sein, dass die Differenzierung der B-Zellen in Plasmazellen tatsächlich erst im entzündeten Synovialgewebe stattfindet. Entgegen anderer Studien, die die typischen Keimzentrumsformationen im Synovialgewebe bei RA-Patienten beschreiben (Seyler et al., 2005;

Kim und Berek, 2000), gelingt es in dieser Arbeit nur bei einem Patienten (B0032), Keimzentren nachzuweisen. Bei diesem Patienten zeigt sich im Keimzentrum eine BAFF-Expression in follikulären dendritischen Zellen, aber keine APRIL-Expression. Dies könnte bedeuten, dass die Bildung von Keimzentren ohne die Anwesenheit von APRIL erfolgen kann. He et al. (2004), Ohata et al. (2005) und Seyler et al. (2005) beschreiben, dass in der Regel sowohl BAFF als auch APRIL zur Bildung von Keimzentren im rheumatisch veränderten Synovialgewebe beitragen. Die besondere Bedeutung von BAFF bei der Entwicklung von Keimzenten beschreiben sowohl Ng et al. (2004), Ramanujam und Davidson (2004) sowie Wilke (2008). So findet Wilke (2008) bei Mäusen, die eine Defizienz für BAFF haben, zwar eine normale frühe Phase der Keimzentrumsreaktion, jedoch zerfallen die Keimzentren vorzeitig.

Eine mögliche Erklärung für das Fehlen von ektopen Keimzentren in den anderen untersuchten Synovialgeweben könnte in bereits erfolgten Therapieversuchen liegen. So kann eine frühe Behandlung mit Entzündungshemmern wie z.B. TNF-Blockern die Formation von synovialen Follikeln und dadurch Keimzentren verhindern. In Ländern, in denen die Gabe von Biologika nur bedingt angewandt wird, wie beispielsweise in den USA, sind in der Literatur ektope Keimzentren beschrieben. So zeigen u.a. Weyand und Goronzy (2003), dass sich in 24 Prozent der Gewebe Keimzentren nachweisen lassen. Ebenso denkbar wäre auch eine Plasmazell-Differenzierung im Synovialgewebe ohne Keimzentrum oder die Einwanderung von bereits im Knochenmark ausdifferenzierten Plasmazellen aus dem Blut ins rheumatisch veränderte Synovialgewebe wie es in der Arbeit von Scheel (2009) diskutiert wird. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es zur Einwanderung von B-Gedächtniszellen ins Synovialgewebe kommt, die u.a. durch IL-21 zu Plasmazellen differenzieren können, wofür kein Keimzentrum notwendig ist (Ettinger et al., 2007).[16] Bei dem untersuchten Patientenkollektiv ließen sich allerdings keine bis lediglich vereinzelt CD27-positive B-Gedächtniszellen nachweisen. Insgesamt scheint es somit eher wahrscheinlich, dass der überwiegende Anteil der B-Zellen entweder keine Keimzentrums-Reifung benötigt oder, dass der Reifungsprozess bereits an anderer Stelle durchlaufen wird.

---

[16] Avery et al. (2003) finden bei SLE-Patienten ebenfalls eine Transformation von B-Gedächtniszellen zu Plasmablasten.

4.3 Autokrine BAFF-Expression in Plasmazellen

Wie bereits beschrieben, werden BAFF und APRIL von vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert werden. Im Gegensatz zur bisherigen Literatur, die B- und Plasmazellen nur eine untergeordnete bzw. keine Bedeutung als BAFF- und APRIL-Produzenten bei RA-Patienten zuschreibt (Moore et al., 1999; Mukhopadhyay et al., 1999; Nardelli et al., 2001; Shu et al., 1999), findet diese Arbeit, dass auch Plasmazellen BAFF exprimieren. Bei SLE-Patienten ist bereits eine autokrine BAFF- und APRIL-Expression von sowohl B- als auch Plasmazellen beschrieben (Chu et al., 2009). Auch bei Non Hodgkin-Lymphomen zeigen He et al. (2004), eine autokrine und parakrine BAFF- und APRIL-Expression.

Beim SLE zeigen nur Patienten mit aktivem SLE auch eine autokrine BAFF- und APRIL-Expression in B- und Plasmazellen. Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten, die eine autokrine BAFF-Expression in Plasmazellen zeigen, sind Patienten, deren Synovialgewebe reich an Plasmazellen sind. Wie bereits oben beschrieben, zeigen diese Patienten jedoch keine Anzeichen einer erhöhten Krankheitsaktivität. Die Korrelation zwischen CRP-Wert und Plasmazellen ist praktisch null und statistisch insignifikant (Korrelation: 0,05, p-Wert: 89,4 %). Die Korrelation zwischen dem DAS-Wert und den Plasmazellen ist sogar negativ, jedoch insignifikant (Korrelation: -0,50, p-Wert: 20,9%).

Das Plasmazellen zur autokrinen BAFF-Expression in der Lage sind, wird auch durch die Tatsache gestützt, dass sich nach Rituximab-Therapie eine deutliche und signifikante Erhöhungen der BAFF-Serumkonzentration bei SLE- und RA-Patienten zeigt (Seror et al., 2007; Vallerskog et al., 2006). Die erhöhte BAFF-Produktion wäre eine mögliche Reaktion der Plasmazellen auf die Therapie, um möglicherweise ihr eigenes Fortbestehen zu sichern. Andererseits könnte die BAFF-Konzentration auch erhöht sein, weil die BAFF-bindenden Rezeptoren durch die B-Zelldepletion ebenfalls verloren gehen. Die APRIL-Konzentration im Serum der Patienten bleibt von der Rituximab-Behandlung völlig unbeeinflusst.

BAFF könnte von entscheidender Bedeutung für die Erhaltung der Plasmazellen sein, indem BAFF für die Erhaltung des B-Zell-Repertoires sorgt. Dabei scheint in erster Linie die Interaktion zwischen BAFF und BAFF-R von besonderer Bedeutung zu sein, denn Untersuchungen an BAFF- oder BAFF-R-defizienten Mäusen zeigen einen starken Rückgang von reifen B-Zellen (Mackay und Browning, 2002). Somit könnte BAFF über

die Bindung an BAFF-R den B-Zell-Bestand aufrecht erhalten. Außerdem scheint BAFF auch gezielt die Erzeugung von Plasmazellen aus aktivierten B-Gedächtniszellen zu fördern. So können erhöhte BAFF-Konzentrationen einerseits durch unkontrollierte B-Zell-Entwicklung und andererseits durch die Verbesserung des Plasmazell-Überlebens mit Hilfe von BCMA zur Entwicklung von RA beitragen (Avery et al., 2003).

Eine mögliche Erklärung, warum sich bei manchen Patienten kaum BAFF nachweisen lässt, könnte in den unterschiedlichen Therapien liegen. So beschreiben Stohl et al. (2003), dass die Behandlung von Patienten mit erhöhten BAFF-Konzentrationen durch hohe Dosen von Kortikosteroiden vorübergehend gesenkt werden konnten. Jedoch kam es zum sofortigen Wiederanstieg, sobald die Kortison-Dosierung verringert wurde.

Bei Patienten mit aktivem SLE exprimieren Plasmazellen mehrheitlich sowohl BAFF als auch APRIL (Chu et al., 2009). Chu et al. (2009) finden für ihre Untersuchungsgruppe, dass 70 Prozent der Plasmazellen BAFF-m-RNA und 80 Prozent der Plasmazellen APRIL-m-RNA exprimieren. Diese starke Expression von BAFF und APRIL in Plasmazellen geht mit einer hohen Krankheitsaktivität des SLE einher. Dabei tragen möglicherweise die starke Aktivierung des Immunsystems bei SLE-Patienten mit aktiver Erkrankung und die kontinuierliche Erzeugung von Plasmazellen zur erhöhten BAFF- und APRIL-Expression bei. Bei RA-Patienten produziert nur ein geringer Prozentsatz der Plasmazellen BAFF. APRIL wird bei RA-Patienten gar nicht von Plasmazellen exprimiert. Dies spricht für eine unterschiedliche B-Zellaktivierung bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen.

Sowohl die B-Zellen, als Vorläufer der antikörperproduzierenden Plasmazellen, als auch die beiden TNF-Zytokine BAFF und APRIL selbst stellen vielversprechende therapeutische Ansatzpunkte bei der Behandlung von RA dar.

So zeigt sich bei Patienten, die mit Rituximab behandelt werden, eine signifikante und ausgeprägte B-Zelldepletion bei gleichzeitiger Induktion von BAFF. Auf APRIL hat die Rituximab-Therapie allerdings keinen Einfluss.

Ebenso verdeutlicht das Biologikum Atacicept (TACI-Ig), ein Fusionsprotein bestehend aus einem Teil des TACI-Rezeptors und der konstanten Region des humanen IgG, welchen Einfluss B- und Plasmazellen sowie ihre Zytokine BAFF und APRIL für die Pathogenese der RA haben. So werden durch TACI-Ig BAFF und APRIL gebunden und stehen dadurch den B- bzw. Plasmazellen nicht mehr zur Verfügung, wodurch das Überle-

ben von B- und Plasmazellen gehemmt wird. O'Connor et al. (2004) konnten zeigen, dass eine Blockierung von BAFF und APRIL durch TACI-Ig zu einer Verminderung von Knochenmarks-Plasmazellen um etwa zwei Drittel führt.

Da bei zahlreichen Autoimmunerkrankungen eine erhöhten BAFF- bzw. APRIL-Serumkonzentrationen festzustellen ist, folgt die Entwicklung zahlreicher BAFF- bzw. APRIL-Antagonisten wie beispielsweise Belimumab (Lymphostat-B). Belimumab ist seit Juli 2011 europaweit für die Therapie von SLE zugelassen und führt zu einer signifikanten Abnahme von naiven und aktivierten B-Zellen sowie Plasmazellen, indem es durch Blockierung von löslichem BAFF zur Unterbindung der B-Zell-Differenzierung kommt ().

Trotz aller Fortschritte ist die RA auch heute noch nur unzureichend zu behandeln. Je besser die Entzündungsprozesse im Synovialgewebe von RA-Patienten verstanden sind, desto gezielter können Medikamenten eingreifen.

Bei der RA wie auch bei anderen Autoimmunerkrankungen stellen Plasmazellen, die gegen körpereigene Strukturen gerichtete Antikörper bilden, das Problem dar. Bekannt ist bereits, dass im Knochenmark Überlebensnischen für langlebige Plasmazellen existieren, welche resistent gegen Therapien sind und somit kontinuierlich Antikörper bilden können (Radbruch et al., 2006). Am Überleben der Plasmazellen in diesen Nischen sind zumindest bei Mäusen die Eosinophilen Zellen entscheidend beteiligt, indem sie u.a. den für Plasmazellen überlebenswichtigen Faktor APRIL bereitstellen (Chu et al., 2011). Zu klären bleibt, in wie fern Eosinophile Zellen auch bei der RA eine entscheidende Rolle spielen. Würden Eosinophile nun das Überleben der Plasmazellen begünstigen, würde sich eine neue Therapiemöglichkeit durch die Bekämpfung der Eosinophilen ergeben.

5 Zusammenfassung

B-Zellen entwickeln sich über mehrere Zwischenstadien zu reifen Plasmazellen, welche für die Bildung von spezifischen Antikörpern verantwortlich sind. Bei diesem Entwicklungsprozess spielen vor allem zwei Zytokine aus der TNF-Familie, nämlich BAFF und APRIL, eine zentrale Rolle. BAFF und APRIL sind aber nicht nur für das Differenzieren der B-Zellen zu Plasmazellen, sondern auch für deren Aktivierung und Überleben von entscheidender Bedeutung.

Diese Arbeit beschäftigt sich in erster Linie mit der detaillierten Untersuchung der BAFF- und APRIL-Produktion im entzündeten Synovialgewebe von RA-Patienten. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Zellen im Synovialgewebe zu bestimmen, die zur Expression dieser beiden für B- und Plasmazellen wichtigen Zytokine beitragen. Dazu werden die Synovialgewebe mit Antikörpern gegen BAFF und APRIL sowie gegen Immunzellen, Zellen der synovialen Gefäße und Zellen der Deckzellschicht gefärbt.

Es werden Daten für entzündete Synovialgewebe von insgesamt sieben Frauen und drei Männern, mit einem Durchschnittsalter von 63,7 Jahren (Bereich 48 bis 76 Jahre) und einer durchschnittlichen RA-Krankheitsdauer von 12 Jahren (Bereich 4 bis 23 Jahre) erhoben. Alle in dieser Arbeit analysierten RA-Synovialgewebe zeigen eine fokale oder diffuse Infiltration von Lymphozyten. Einige bilden diskrete lymphoide Aggregationen, einer von ihnen zeigt eine ektopische Keimzentrumsbildung.

Mit Hilfe der Immunhistologie konnte nachgewiesen werden, dass hauptsächlich in der Deckzellschicht liegende Fibroblasten zur Koexpression der beiden Zytokine BAFF und APRIL in der Lage sind. Außerdem zeigt sich in allen Synovialgeweben eine ausgeprägte endotheliale APRIL-Anreicherung. Dies verdeutlicht, dass sowohl Endothelzellen selbst als auch subendotheliale Zellen APRIL exprimieren können.

In den Bereichen der B-Zellinfiltrate und den Ansammlungen von Plasmazellen zeigen sich nur selten BAFF- und APRIL-produzierende Zellen wie zum Beispiel FDCs in den beobachteten Keimzentrumsstrukturen. Zum ersten Mal wird gezeigt, dass Plasmazellen im Synovialgewebe in der Lage sind, BAFF zu bilden, auch wenn dies nur auf etwa 2 Prozent aller Plasmazellen zutrifft. Im Gegensatz zu Befunden bei aktivem SLE wird APRIL nicht von Plasmazellen exprimiert.

Die Expression von BAFF und APRIL auf synovialen Fibroblasten könnte dem Schutz der B- und Plasmazellen vor Apoptose dienen. Die Tatsache, dass Endothelzellen und

subendotheliale Zellen in der Lage sind APRIL zu exprimieren, könnte zu erhöhten Zytokinspiegeln beitragen und damit die B-Zellentwicklung beeinflussen, was eine vermehrte Bildung von autoreaktiven B Zellen zur Folge hätte. Die statistische Auswertung zeigt jedoch, dass es keinen direkten Zusammenhang zwischen der Anzahl der B- bzw. Plasmazellen und der Krankheitsaktivität (gemessen durch CRP- bzw. DAS-Wert) oder der Krankheitsdauer der Patienten gibt.

Literaturverzeichnis

1 **Aletaha D.**, Neogi T., Silman AJ., Funovits J., Felson DT., Bingham CO., Birnbaum NS., Burmester GR. (2010). 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria. Arthritis & Rheumatism; 62: 2569–2581.

2 **Armitage RJ.** (1994). Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. Current Opinion Immunology; 6: 407-413.

3 **Avery DT.**, Kalled SL., Ellyard JI., Ambrose C., Bixler SA., Thien M., Brink R. et al. (2003). BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. Journal Clinical Investigation; 112(2): 286-97.

4 **Batten M**., Groom J., Cachero TG., Qian F., Schneider P., Tschopp J., Browning J.L. and Mackay, F. (2000). BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. J Exp Med, 192, 1453-1466.

5 **Benson MJ.**, Dillon SR., Castigli E., Geha RS., Xu S., Lam KP. and Noelle RJ. (2008).Cutting Edge: The Dependence of Plasma Cells and Independence of Memory B Cells on BAFF and APRIL. The Journal of Immunology;180: 3655-3659.

6 **Berek C.** (2005). B-Lymphozyten – sind sie wichtig für die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis? Zeitung für Rheumatologie; 6 (34): 383-88.

7 **Berek C.** (1992). The development of B cells and the B-cell repertoire in the microenvironment of the germinal center. Immunological Reviews; 126: 5-19.

8 **Berek C. und Milstein C.** (1988). The dynamic nature of the antibody repertoire. Immunological Reviews; 105: 5-26.

9 **Bischof D.**, Elsawa SF., Mantchev G., Yoon J., Michels GE., Nilson A., Sutor S. et al. (2006). Selective activation of TACI by syndecan-2. Blood; 107: 3235-42.

10 **Bodmer JL.**, Schneider P. and Tschopp J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. Trends in biochemical sciences; 27(1): 19-26.

11 **Bossen C.**, Cachero TG., Tardivel A. Ingold K., Willen L., Dobles M., Scott ML. et al. (2008). TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. Blood; 111(3): 1004-1012.

12 **Bossen C. and Schneider P.** (2006). BAFF, APRIL and their receptors: Structure, function and signalling. Seminars in Immunology; 18: 263-275.

13 **Bossen C.**, Ingold K., Tardivel A., Bodmer JL., Gaide O., Hertig S., Ambrose C., Tschopp J. and Schneider, P. (2006). Interactions of TNF and TNF receptor family members in the mouse and human. The Journal of Biological Chemistry; 281: 13964-13971.

14 **Burmester G-R.**, Grün JR., Häupl T., Radbruch A. (2005). Genomik in der Rheumatologie. Humboldt Spektrum; 1: 34-40.

15 **von Bülow GU.**, van Deursen JM. and Bram RJ. (2001). Regulation of the T–independent humoral response by TACI. Immunity; 14: 573-582.

16 **Cassese G.**, Lindenau S., de Boer B., Arce S., Hauser A., Riemekasten G., Berek C. et al. (2001). Inflamed kidneys of NZB/W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. European Journal of Immunology; 31: 2726–2732.

17 **Castigli E.**, Wilson SA., Scott S., Dedeoglu F., Xu S., Lam KP., Bram RJ. et al. (2005). TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. Journal of Experimental Medicine; 201: 35–39.

18 **Chabaud M.**, Durand JM., Buchs N., Fossiez F., Page G., Frappart L. and Miossec P. (1999) Human interleukin-17. A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. Arthritis and Rheumatism; 42: 963-70.

19 **Chu VT.,** Fröhlich A., Steinhauser G., Scheel T., Roch T., Fillatreau S., Lee JJ., Löhning M., Berek C. (2011). Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. Nature Immunology; 12: 151–159.

20 **Chu VT.,** Enghard P., Schürer S., Steinhauer G., Berek C. (2009). Systemic activation of the immune system induces aberrant BAFF and APRIL expression in B cells in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis and Rheumatism; 60(7): 2083-93.

21 **Craxton A.**, Magaletti D., Ryan EJ., Clark EA. (2003). Macrophage- and dendritic cell-dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF. Blood; 101: 4464–71.

22 **Ettinger R.**, Sims GP., Robbins R., Withers D., Fischer RT., Grammer AC., Kuchen S. and Lipsky PE. (2007). IL-21 and BAFF/BLyS synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells. The Journal of Immunology; 178: 2872-2882.

23 **Frey O.** (2011). Grundlagenforschung: neue Pathogenese- und Therapiekonzepte bei der Rheumatoiden Arthritis. Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Jena. http://dgrh.de/1760.html.

24 **Gabay C.**, Krenn V., Bosshard C., Seemayer CA, Chizzolini C., Huard, B. (2009). Synovial tissues concentrate secreted APRIL. Arthritis Research & Therapy; 11(5):R144. Epub 2009 Sep 29.

25 **Gaur U. and Aggarwal BB.** (2003). Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. Biochemical Pharmacology; 66: 1403-1408.

26 **Gavin AL.**, Ait-Azzouzene D., Ware CF. and Nemazee D. (2003). DeltaBAFF, an alternate splice isoform that regulates receptor binding and biopresentation of the B cell survival cytokine, BAFF. The Journal of biological chemistry; 278: 38220-38228.

27 **Gonzalez-Gay MA.**, Garcia-Porrua C. and Hajeer AH. (2002). Influence of human leukocyte antigen-DRB1 on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis. Seminars in Arthritis and Rheumatism.; 31: 355-60.

28 **Gorelik L.**, Gilbride K., Dobles M., Kalled SL., Zandman D., Scott ML. (2003). Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation–resistant cells. J Exp Med;198: 937-945.

29 **Gras MP.**, Laâbi Y., Linares-Cruz G., Blondel MO., Rigaut JP., Brouet JC., Leca G. et al. (1995) BCMAp: an integral membrane protein in the Golgi apparatus of human mature B lymphocytes. International Immunology; 7: p. 1093-1106.

30 **Greiner A.**, Neumann M., Stingl S., Wassink S., Marx A., Riechert F., Müller-Hermelink HK. (2000). Characterization of Wue-1, a novel monoclonal antibody that stimulates the growth of plasmacytoma cell lines. Virchows Archiv; 437: 372-379.

31 **Groom J.**, Kalled S.L., Cutler A.H., Olson C., Woodcock S.A., Schneider P., Tschopp J. et al. (2002). Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. The Journal of Clinical Investigation; 109: 59-68.

32 **Gross JA.**, Johnston J., Mudri S., Enselman R., Dillon SR., Madden K., Xu W. et al. (2000). TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. Nature; 404: 995-999.

33 **Gross JA.**, Dillon SR., Mudri S., Johnston J., Littau A., Roque R., Rixon M. et al (2001). TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease impaired B cell maturation in mice lacking BLyS. Immunity; 15: 289–302.
34 **Hahne M.**, Kataoka T., Schröter M., Hofmann K., Irmler M., Bodmer JL., Schneider P. et al. (1998). APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. Journal of experimental medicine; 188 (6): 1185-1190.
35 **Hamann J.**, Wishaupt JO., Van Lier RAW., Smeets TJM., Breedveld FC. and Tak PP. (1999). Expression of the activation antigen CD97 and its ligand CD55 in rheumatoid synovial tissue. Arthritis & Rheumatism; 42: 650–658.
36 **Hardenberg G.**, van Bostelen L., Hahne M. and Medema JP. (2008). Thymus-independent class switch recombination is affected by APRIL. Immunology and Cell Biology; 86: 530-534.
37 **Hatzoglou A.**, Roussel, J., Bourgeade, MF., Rogier E., Madry C., Inoue J., Devergne O. et al. (2000). TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase. The Journal of Immunologists; 165: 1322-1330.
38 **He B.**, Chadburn A., Jou E., Schattner EJ., Knowles DM., Cerutti A. (2004). Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF familymembers BAFF/BLyS and APRIL. Journal of Immunology; 172: 3268–79.
39 **Hehlgans T. and Pfeffer K.** (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games.Immunology; 115: 1–20.
40 **van der Helm-van Mil AHM.**, Verpoort KN., Breedveld FC., Toes REM., Huizinga TWJ. (2005). Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. Arthritis Research & Therapy; 7: R949-R958.
41 **Hettenkofer HJ.** (2003). Rheumatologie: Diagnostik-Klinik-Therapie. Thieme; 5. Auflage.
42 **Hsu BL.**, Harless SM., Lindsley RC., Hilbert DM and Cancro MP. (2002). Cutting edge: BLyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators. The Journal of Immunology; 168: 5993–5996.
43 **Hymowitz SG.**, Patel R., Wallweber HJA., Runyon S., Yan M., Yin J., Shriver SK. et al. (2005). Structures of APRIL-Receptor Complexes. The Journal of Biological Chemistry; 280, 7218-7227.
44 **Ingold K.**, Zumsteg A., Tardivel A., Huard B., Steiner QG., Cachero TG., Qiang F. et al. (2005). Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. Journal of experimental medicine; 200: 1375-1383.
45 **Jacobi AM.**, Odendahl M., Reiter K., Bruns A., Burmester GR., Radbruch A., Valet G., Lipsky PE., Dörner T. (2003). Correlation between circulating CD27high plasma cells and disease activity in patients. Arthritis and Rheumatism; 48(5): 1332-42.
46 **Janeway** CA., Travers P., Walport M. (2006). Immunology, 6th Edition, Garland Science.
47 **Jin T.**, Guo F., Kim S., Howard A. and Yu-Zhu Zhang YZ. (2007). X-ray crystal structure of TNF ligand family member TL1A at 2.1 Å. Biochemical and Biophysical Research Communications; 364: 1-6.

48 **Kelly K.**, Manos E., Jensen G., Nadauld L. and Jones DA. (2000). APRIL/TRDL-1, a Tumor Necrosis Factor-like Ligand, Stimulates Cell Death. Cancer Research; 60: 1021-27.
49 **Khare SD. and Hsu H.** (2001). The role of TALL-1 and APRIL in immune regulation. Trends in Immunology; 22: 61-63.
50 **Kim CH.**, Rott LS., Clark-Lewis I., Campbell DJ., Wud L. and Butcher EC. (2001). Subspecialization of Cxcr5+ T Cells B Helper Activity Is Focused in a Germinal Center–Localized Subset of Cxcr5+ T Cells. The Journal of Experimental Medicine; 193: 1373-1381.
51 **Kim HJ. and Berek C.** (2000). B cells in rheumatoid arthritis. Arthritis Research; 2: 126-131.
52 **Kimberley FC.**, van Bostelen L., Cameron K., Hardenberg G, Marquart JA., Hahne M. and Medema JP. (2009). The proteoglycan (heparan sulfate proteoglycan) binding domain of APRIL serves as a platform for ligand multimerization and cross-linking. The FASEB Journal; 23: 1584-1595.
53 **Krenn V.**, Morawietz L., Burmester GR., Kinne RW., Mueller-Ladner U., Muller B., Haupl T. (2006). Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. Histopathology; 49: 358-64.
54 **Kreutzig T.** (2006). Kurzlehrbuch Biochemie. Elsevier; 12. Auflage: 233.
55 **Krumbholz M.**, Specks U., Wick M., Kalled S.L., Jenne D. and Meinl E. (2005a). BAFF is elevated in serum of patients with Wegener's granulomatosis. Journal of Autoimmunity; 25: 298-302.
56 **Krumbholz M.,** Theil D., Derfuss T., Rosenwald A., Schrader F., Monoranu CM., Kalled SL. et al. (2005b). BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions andprimary central nervous system lymphoma. Journal of experimental medicine; 201: 195-200.
57 **Lefèvre S.**, Knedla A., Tennie C., Kampmann A., Wunrau C., Dinser R., Korb A. et al. (2009). Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. Nature Medicine; 15: 1414 – 1420.
58 **Leipe J.**, Skapenko, A. and Schulze-Koops H. (2009). Th17-Zellen – eine neue proinflammatorische T-Zell-Population und ihre Bedeutung für rheumatologische Autoimmunerkrankungen. Zeitschrift für Rheumatologie; 68: 405–408.
59 **Litinskiy MB.**, Nardelli B., Hilbert DM., He B., Schaffer A., Casali P. and Cerutti A. (2002). DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL. Nature Immunology; 3(9): 822-829.
60 **Lipsky PE.** (1999). Rheumatoide Arthritis. Harrison – Innere Medizin 1999; 2211-2221.
61 **Liu Y.**, Xu L., Opalka N., Kappler J., Shu HB., Zhang G. (2002). Crystal structure of sTALL-1 reveals a virus-like assembly of TNF ligands. Cell; 108: 383–394.
62 **Liu Y.**, Hong X., Kappler J., Jiang L., Zhang R., Xu L., Pan CH., et al. (2003). Ligand–receptor binding revealed by the TNF family member TALL-1. Nature; 423: 49-56.
63 **Lodera F.**, Mutschlera B., Rayc R J., Paigec C J., Siderasd P., Torrese R., Lamersb M C. and Carsetti R. (1999). B Cell Development in the Spleen Takes Place in Discrete Steps and Is Determined by the Quality of B Cell Receptor–Derived Signals. Journal of Experimental Medicine; 190: 75-90.
64 **López-Fraga M.**, Fernández R., Albar JP. and Hahne M. (2001). Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. EMBO Reports; 2(10): 945-951.

65 **Lubberts E.** (2008). IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? Cytokine; 41(2): 84-91.
66 **Mackay F. and Browning J. L.** (2002). "BAFF: a fundamental survival factor for B cells." Nature Reviews Immunology; 2: 465-75.
67 **Mackay F.**, Schneider P., Rennert P., Browning J. (2003). "BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival." Annual Review Immunology; 21: 231-64.
68 **Mackay F.**, Sierro F., Grey ST. and Gordon TP. (2005). The BAFF/APRIL system: an important player in systemic rheumatic diseases. Current directions in Autoimmunity; 8: 243-265.
69 **Mackay F.**, Silveira PA., Brink R. (2007). B cells and the BAFF/APRIL axis: fast-forward on autoimmunity and signaling. Current Opinion in Immunology; 19: 327-336.
70 **Marsters SA.**, Yan M., Pitti R. M., Haas P. E., Dixit V. M. and Ashkenazi A. (2000). Interaction of the TNF homologues BLyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI. Current Biology; 10(13): 785-788.
71 **Miehle W.**, Fehr K., Schattenkirchner M., Tillmann K. (2000). Rheumatologie in Praxis und Klinik. Thieme; 2. Auflage.
72 **Moore PA.**, Belvedere O., Orr A., Pieri K., LaFleur DW., Feng P., Soppet D. et al. (1999). BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. Science; 285(5425): 260-3.
73 **Moreaux J.**, Cremer FW., Reme T., Raab M., Mahtouk K., Kaukel P., Pantesco V. et al. (2005). The level of TACI gene expression in myeloma cells is associated with a signature of microenvironment dependence versus a plasmablastic signature. Blood; 106: 1021-1030.
74 **Mukhopadhyay A.**, Ni J., Zhai Y., Yu GL., Aggarwal BB. (1999). Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase. The Journal of Biological Chemistry.; 274: 15978-81.
75 **Nagatani K.**, Itoh K., Nakajima K., Kuroki H., Katsuragawa Y., Mochizuki M., Aotsuka S. et al. et al. (2007). Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes Express BCMA and Are Stimulated by APRIL. Arthritis AND Rheumatism; 56(11): 3554–3563.
76 **Nakajima K.**, Itoh K., Nagatani K., Okawa-Takatsuji M., Fujii T., Kuroki H., Katsuragawa Y. et al. (2007). Expression of BAFF and BAFF-R in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol; 36: 365–372.
77 **Nardelli B.**, Belvedere O., Roschke V., Moore P.A., Olsen H.S., Migone T.S., Sosnovtseva S. et al. (2001). Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. Blood; 97: 198-204.
78 **Ng LG.**, Sutherland APR., Newton R., Qian F., Cachero TG., Scott ML., Thompson JS. et al. (2004). B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. Journal of Immunologie; 173: 807-817.
79 **Novak AJ.**, Bram RJ., Kay NE. and Jelinek DF. (2002). Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. Blood; 100: 2973-2979.
80 **Novak AJ.**, Darce JR., Arendt BK., Harder B., Henderson K., Kindsvogel W., Gross JA. et al. (2004) Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. Blood; 103: 689-694.

81 **O'Connor BP.**, Raman VS., Erickson LD., Cook WJ., Weaver LK., Ahonen C., Lin LL. et al. (2004). BCMA Is Essential for the Survival of Long-lived Bone Marrow Plasma Cells. The Journal of Experimental Medicine; 199(1): 91-8.

82 **Ohata J.**, Zvaifler N.J., Nishio M., Boyle D.L., Kalled S.L., Carson D.A. und Kipps T.J. (2005). Fibroblast-like Synoviocytes of Mesenchymal Origin Express Functional B Cell-Activating Factor of the TNF Family in Response to Proinflammatory Cytokines. Journal of Immunology, 174: 864-870.

83 **Paleolog EM.** (1996). Angiogenesis: a critical process in the pathogenesis of RA - a role for VEGF? British Journal of Rheumatology; 35:917-920.

84 **Paleolog EM.** (2002). Angiogenesis in rheumatoid arthritis. Arthritis Research; 3:S81-90.

85 **Patel DR.**, Wallweber HJA., Yin JP., Shriver SS., Marsters SA., Gordon NC., Starovasnik MA. et al. (2004). Engineering an APRIL-specific B Cell Maturation Antigen. The Journal of biological chemistry; 279(16): 16727-16735.

86 **Pradet-Balade B.**, Medema JP., López-Fraga M., Lozano JC., Kolfschoten GM., Picard A., Martínez-A. C., Garcia-Sanz JA., Hahne M. (2002). An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK–APRIL fusion protein. The EMBO Journal; 21: 5711 – 5720.

87 **Radbruch A.**, Muehlinghaus G., Luger EO., Inamine A., Smith KG., Dorner T., Hiepe F. (2006). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. Nature Reviews Immunology; 6: 741-750.

88 **Ramanujam M. and Davidson A.** The current status of targeting BAFF/BLyS for autoimmune diseases (2004). Arthritis Research & Therapy. 2004; 6(5): 197–202.

89 **Rantapää-Dahlqvist S.**, de Jong BAW., Berglin E., Hallmans G., Wadell G., Stenlund H., Sundin U. and van Venrooij WJ. (2003). Antibodies Against Cyclic Citrullinated Peptide and IgA Rheumatoid Factor Predict the Development of Rheumatoid Arthritis. Arthritis & Rheumatism; 48: 2741–2749.

90 **Renz-Polster H.** und Krautzig S. (2004). Basislehrbuch Innere Medizin - Studienausgabe: kompakt-greifbar-verständlich. Urban & Fischer Verlag.

91 **Reveille JD**. (1998). The Genetic Contribution to the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. Current Opinion in Rheumatology; 10: 187-200.

92 **Roschke V.**, Sosnovtseva S., Ward CD, Hong JS., Smith R., Albert V., Stohl W. et al. (2002). BlyS and APRIL Form Biolodically Active Heterotrmers That Are Expressed in Patients with Systemic Immune-Based Rheumatic Diseases. The Journal of Immunology; 169: 4314-4321.

93 **Roth W.**, Wagenknecht B., Klumpp A., Naumann U., Hahne M., Tschopp J. and Weller M. (2001). APRIL, a new member of the tumor necrosis factor family, modulates death ligand-induced apoptosis. Cell Death & Differentiation; 8: 403–410.

94 **Salzer U.**, Birmelin J., Bacchelli C., Witte T., Buchegger-Podbielski U., Buckridge S., Rzepka R. et al. (2007). Sequence Analysis of TNFRSF13b, Encoding TACI, in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. Journal of Clinical Immunology; 27: 372-377.

95 **Scapini P.**, Nardelli B., Nadali G., Calzetti F., Pizzolo G., Montecucco C. and Casstella M.A. (2003). G-CSF-stimulated Neutrophils Are a Prominent Source of Functional BLyS. The Journal of Experimental Medicine; 197: 297-302.

96 **Scheel T.** (2009). Die B-Zell-Antwort im Synovialgewebe von Patienten mit Rheumatoider Arthritis. Deutsches Rheuma-Forschungszentrum, Humboldt Universität zu Berlin.

97 **Schneider P.** (2005). The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. Current Opinion in Immunology; 17: 282-289.
98 **Schneider P.**, Takatsuka H., Wilson A., Mackay F., Tardivel A., Lens S., Cachero TG. et al. (2001). Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen. Journal of Experimental Medicine; 194: 1691–1697.
99 **Schneider P.**, Mackay F., Steiner V., Hofmann K., Bodmer JL., Holler N., Ambrose C. et al. (1999). BAFF, a Novel Ligand of the Tumor Necrosis Factor Family, Stimulates B Cell Growth. Journal of experimental medicine; 189(11): 1747-1756.
100 **Schroder AE.**, Greiner A., Seyfert C. and Berek C. (1996). Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 93: 221–225.
101 **Seror R.**, Sordet C., Guillevin L., Hachulla E., Masson C., Ittah M., Candon S. et al. (2007). Tolerance and efficacy of rituximab and changes in serum B cell biomarkers in patients with systemic complications of primary Sjogren's syndrome. Annals of the Rheumatic Diseases; 66: 351–357.
102 **Seshasayee D.**, Valdez P., Yan M., Dixit VM., Tumas D., Grewal IS. (2003). Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor. Immunity; 18(2): 279-88.
103 **Seyler TM.**, Park YW., Takemura S., Bram R. J., Kurtin P. J., Goronzy JJ. and Weyand MW. (2005). BLyS and APRIL in rheumatoid arthritis. The Journal of Clinical Investigation; 115(11): 3083-3092.
104 **Shu HB.**, Hu WH. and Johnson H. (1999). TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. Journal of leukocyte biology; 65: 680-3.
105 **Skogh T.** (2005). Does a positive anti-CCP test identify a distinct arthritis entity? Arthritis Research & Therapy; 7(6): 230–232.
106 **Stastny P.** (1978). Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. New England journal of medicine; 298: 869-71.
107 **Stein JV.**, Lopez-Fraga M., Elustondo FA., Carvalho-Pinto CE., Rodriguez D., Gomez-Caro R., De Jong J. et al. (2002) APRIL modulates B and T cell immunity. The Journal of Clinical Investigation; 109: 1587-1598.
108 **Stohl W.**, Hiepe F., Latinis KM., Thomas M., Scheinberg MA., Clarke A., Aranow C. et al. (2011). Belimumab reduces autoantibodies, normalizes low complement, and reduces select B-cell populations in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis & Rheumatism
109 **Stohl W.**, Metyas S., Tan SM., Cheema GS., Oamar B., Xu D., Roschke V. et al. (2003). B Lymphocyte Stimulator Overexpression in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis & Rheumatism; 48: 3475–3486.
110 **Thompson JS.**, Bixler SA., Qian F., Vora K., Scott M L., Cachero TG., Hession C. et al. (2001). BAFF-R, a Newly Identified TNF Receptor That Specifically Interacts with BAFF. Science; 293: 2108-11.
111 **Treml JF.**, Hao Y., Stadanlick JE and Cancro MP. (2009). The BLyS Family: Toward a Molecular Understanding of B Cell Homeostasis. Cell Biochemistry Biophysics; 53: 1–16.
112 **Vallerskog T.**, Heimburger M., Gunnarsson I., Zhou W., Wahren-Herlenius M., Trollmo C. and Malmströmet V. (2006). Differential effects on BAFF and APRIL

levels in rituximab-treated patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Arthritis Research & Therapy; 8: R167.

113 **Weyand CM. and Goronzy JJ.** (2003). Ectopic germinal center formation in rheumatoid synovitis. Annals of the New York Academy of Sciences; 987:140-9.

114 **Wilke G.** (2008). Genexpression Follikulärer Dendritischer Zellen und Analyse ihrer ontogenetischen Entwicklung. Deutsches Rheuma-Forschungszentrum, Freien Universität Berlin.

115 **Xia XZ.**, Treanor J., Senaldi G., Khare SD., Boone T., Kelley M., Theill LE. et al. (2000). TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation. Journal of experimental medicine; 192: 137-143.

116 **Xu S.** and Lam KP. (2001). B-Cell Maturation Protein, Which Binds the Tumor Necrosis Factor Family Members BAFF and APRIL, Is Dispensable for Humoral Immune Responses. Molecular and Cellular Biology; 21: 4067–4074.

117 **Yan M.**, Brady JR., Chan B., Lee WP., Hsu B., Harless S., Cancro M. et al. (2001) Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. Current biology; 11(19): 1547-52.

118 **Zhang X.**, Park CS., Yoon SO., Li L., Hsu YM., Ambrose C., Choi YS. et al. (2005). BAFF supports human B cell differentiation in the lymphoid follicles through distinct receptors. International Immunology; 17: 779–88.

Danksagung

Mein Dank gilt Frau PD Dr. Claudia Berek für die Möglichkeit, diese Arbeit am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum anzufertigen. Besonders möchte ich Frau PD Dr. Claudia Berek für ihre kompetente Betreuung und für ihre stetige Unterstützung danken. Dies betrifft vor allem auch die Zeit nach Beendigung des experimentellen Abschnittes, in der ich vor allem durch meine Verpflichtungen als Mama zunehmend zeitlich anderweitig gebunden war. Vielen Dank für die großartige Unterstützung.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Berek, namentlich erwähnt seien vor allem Stefanie Schürer, Gudrun Steinhauser und Dr. Tobias Scheel, die mir als biologischen Laien vor allem in der Anfangsphase der Arbeit wertvolle Hilfen bei der praktischen Durchführung waren. Danke Tobias für die stets tatkräftige Unterstützung und dafür, dass du mir bei Problemen immer mit Rat und Tat zur Seite standest. Auch den anderen Kollegen der Arbeitsgruppe „B-Zell-Immunologie“ danke ich für die freundliche und lustige Atmosphäre, in der es immer Spaß gemacht hat, zu arbeiten.

Zudem ein großes Dankeschön auch an meine Familie und meine Freunde, die mich immer wieder motiviert und bestärkt haben.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version der Arbeit nicht veröffentlicht.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Katharina Richter, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: BAFF- und APRIL-Expression im Synovialgewebe von Patienten mit Rheumatoider Arthritis selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Mannheim, den

_____

Katharina Richter