

Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. C. P. Speer

**Die Expression der Rekombination Aktivierenden Gene (RAG)
in Gedächtnis B Zellen von Kindern mit ANA-positiver
Juveniler Idiopathischer Arthritis**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Claudius Faber
aus Wiesbaden

Würzburg, November 2006

Inhaltsverzeichnis

Referent: Prof. Dr. Hermann Girschick

Koreferent: Prof. Dr. Thomas Hünig

Dekan: Prof. Dr. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2007

Der Promovend ist Arzt.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	- 1 -
1.1. Das Immunsystem des Menschen.....	- 1 -
1.1.1. Bestandteile des menschlichen Immunsystems	- 1 -
1.1.2. Der B-Lymphozyt	- 2 -
1.1.3. Antikörper: Struktur und Funktion	- 4 -
1.1.4. Entwicklung der B Zelle im Knochenmark	- 6 -
1.1.5. Die Keimzentrumsreaktion	- 6 -
1.1.6. Entstehung des Immunglobulin-Repertoires	- 7 -
1.1.7. Ablauf der V(D)J-Rekombination	- 8 -
1.1.8. Recombination Activating Genes (RAG)	- 9 -
1.1.9. Somatische Hypermutation (SHM)	- 10 -
1.1.10. Selektionsmechanismen in der B Zell Entwicklung	- 11 -
1.2. Autoimmunität: Defekte Toleranz für körpereigene Strukturen	- 12 -
1.2.1. Sekundäre Rearrangements: Receptor Editing	- 12 -
1.2.2. Sekundäre Rearrangements: Receptor Revision	- 13 -
1.2.3. Sekundäre Rearrangements: Rolle bei Autoimmunkrankheiten	- 14 -
1.3. Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA)	- 17 -
1.3.1. Gelenkentzündungen im Kindes- und Jugendalter	- 17 -
1.3.2. Klassifikation	- 17 -
1.3.3. Epidemiologie	- 19 -
1.3.4. Klinisches Erscheinungsbild	- 20 -
1.3.5. Oligoarthritis (o-JIA)	- 20 -
1.3.6. JIA mit systemischem Beginn (s-JIA)	- 22 -
1.3.7. Ätiologie der Juvenilen Idiopathischen Arthritis	- 23 -
1.3.8. Genetische Faktoren im HLA-Locus	- 23 -
1.3.9. Polymorphismen von Genen außerhalb des HLA-Locus	- 24 -
1.3.10. Infektiöse Trigger der JIA	- 25 -
1.3.11. Autoantikörper	- 27 -
1.4. Fragestellung dieser Arbeit.....	- 29 -
2. MATERIAL UND METHODEN	- 31 -
2.1. Patienten und gesunde Kontrollen.....	- 31 -
2.2. Materialsammlung und PBMC-Anreicherung.....	- 33 -
2.3. B-Lymphozytenpräparation aus der Tonsille	- 33 -

2.4. Färbung der Zellen mit spezifischen konjugierten Antikörpern gegen humane CD-Antigene.....	- 33 -
2.5. Einzelzellsortierung der verschiedenen CD5-Populationen von Gedächtnis-B Zellen mit dem Durchflusszytometer.....	- 34 -
2.6. Einzelzell Reverse Transkriptase-PCR.....	- 35 -
2.7. Externe und nested Einzelzell-PCR der cDNA von β -Actin, RAG 1, RAG 2A und 2B, IgG und AID	- 37 -
2.8. Übertragung der PCR-Produkte auf Membranen durch Vakuum Dot-Blot.....	- 39 -
2.9. Prinzip des spezifischen Nachweises der PCR-Produkte	- 39 -
2.10. Tailing spezifischer Oligonukleotide mit DIG-dUTP	- 40 -
2.11. Hybridisierung und Detektion der Amplifikate.....	- 40 -
2.12. Film Entwicklung	- 41 -
2.13. Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel für das Gen AID	- 42 -
2.14. Extraktion der PCR-Produkte zur Sequenzierung	- 42 -
2.15. Sequenzierung von PCR-Produkten	- 43 -
2.16. Statistische Auswertung	- 43 -
3. ERGEBNISSE	- 44 -
3.1. Vorversuche.....	- 44 -
3.1.1. Austestung von B Zelle Antikörpern: CD19 vs. CD79b	- 44 -
3.1.2. Austestung eines anti-IgG Antikörpers	- 45 -
3.2. Expressionsanalyse der peripheren CD27 ⁺ B Zellpopulationen auf RAG1, RAG2A, RAG2B, IgG und AID	- 46 -
3.3. Analyse der CD27 ⁺ CD5 ⁺ B Zellpopulation.....	- 47 -
3.3.1. Vergleich der RAG1 Expression	- 47 -
3.3.2. Vergleich der RAG2 Expression	- 48 -
3.3.3. Unkoordinierte und koordinierte RAG Expression	- 48 -
3.3.4. Ko-Expression von IgG und RAG	- 50 -
3.4. Analyse der CD27 ⁺ CD5 ⁻ B Zellpopulation.....	- 52 -
3.4.1. Vergleich der RAG1 Expression	- 52 -
3.4.2. Vergleich der RAG2 Expression	- 53 -
3.4.3. Unkoordinierte und koordinierte RAG Expression	- 54 -

3.4.4.	Ko-Expression von IgG und RAG	- 55 -
3.5.	Vergleich der CD5 ⁺ und CD5 ⁻ Populationen	- 57 -
3.5.1.	Unterschiede zwischen den CD5 Fraktionen bei o-JIA Patienten	- 58 -
3.5.2.	Unterschiede zwischen den CD5 Fraktionen bei Gesunden	- 58 -
3.6.	Expression des Enzyms Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID).....	- 59 -
3.6.1.	AID Expression in Tonsillen B Zellen eines gesunden Kindes	- 59 -
3.6.2.	AID Expression in peripheren B Zellen des o-JIA Patienten # 2	- 60 -
4.	DISKUSSION	- 61 -
4.1.	Was für eine Relevanz hat der hohe Anteil unkoordinierter RAG Transkripte? – RAG Expression in peripheren Gedächtnis B Zellen.....	- 62 -
4.2.	Wie ist die wesentlich geringere Frequenz RAG2 positiver Zellen bei o-JIA Patienten im Vergleich zu Gesunden zu bewerten, welche sowohl im CD5 ⁺ als auch im CD5 ⁻ Kompartiment auftritt?.....	- 66 -
4.3.	Weshalb sind bei der koordinierten Expression so unterschiedliche Resultate zwischen den CD5 Subpopulationen der o-JIA Patienten festzustellen? – Einfluss des Oberflächenmoleküls CD5 auf die RAG Expression.....	- 68 -
4.4.	Welche Bedeutung hat das Fehlen von RAG1+RAG2 exprimierenden CD27 ⁺ CD5 ⁻ B-Lymphozyten, welches sich insbesondere in der IgG positiven Subpopulation zeigt, in der Pathogenese der JIA und welche Parallelen existieren zwischen der o-JIA und der s-JIA?	- 70 -
5.	ZUSAMMENFASSUNG	- 72 -
6.	ABKÜRZUNGEN	- 74 -
7.	VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN	- 76 -
8.	LITERATUR	- 78 -

1. EINLEITUNG

1.1. Das Immunsystem des Menschen

Die Entdeckung des menschlichen Immunsystems und der Beginn der Immunologie als eigenständiges Fach gehen zurück auf zwei Personen: Edward Jenner erkannte 1796, dass durch die Verabreichung des Kuhpockenvirus (Vaccinia) an gesunde Menschen die menschlichen Pocken verhindert werden können. So war das Prinzip der Vakzinierung geboren. Ein knappes Jahrhundert später war es Robert Koch, der anhand des Milzbrandes und der Milzbrandsporen erstmals überhaupt den kausalen Zusammenhang zwischen einem speziellen Erreger und einer dazugehörigen Krankheit erkannte. Die Untersuchung der Reaktionen des menschlichen Organismus auf diese Mikroorganismen bildete den Grundstein der Immunologie.

Neben der eigentlichen Abwehrfunktion gegenüber pathogenen Mikroorganismen ist es zunächst die Hauptaufgabe des Immunsystems eines mehrzelligen Organismus, zwischen „selbst“ und „fremd“ zu differenzieren. Die theoretische Möglichkeit, dass körpereigene Strukturen zum Ziel werden könnten, erkannte um 1900 schon Paul Ehrlich und beschrieb dies anschaulich als „Horror autotoxicus“ [1]. Im 20. Jahrhundert brachte dann die Entdeckung der V(D)J-Rekombination grundlegende Erkenntnisse über die Entstehung der Vielfalt lymphozytärer Antigen-Rezeptoren und brach gleichzeitig das Dogma der „Unantastbarkeit“ genomischer DNA [2].

1.1.1. Bestandteile des menschlichen Immunsystems

Das Immunsystem kann von zwei Perspektiven aus unterteilt werden. Einerseits grenzt man aus funktioneller Sicht einen phylogenetisch sehr alten, schnell reagierenden, angeborenen Zweig (first line defense) gegen den weit später in der Evolution entstandenen adaptiven Zweig der Immunität ab. Diese zwei Systeme stehen in engem Kontakt miteinander und ergänzen sich in vielen Punkten. Dennoch ist der adaptiven Immunität eine Spezifität zu eigen, die es ihr bei einer zweiten Infektion mit demselben Erreger ermöglicht, weitaus stärker und effektiver zu reagieren – sie ist in der

Ontogenese eines Individuums also lernfähig. Dies ist bei der sehr langen Generationenzeit des Menschen in der Evolution von entscheidendem Vorteil.

Die zweite, mehr strukturelle Betrachtung grenzt zelluläre von humoralen Bestandteilen des Immunsystems ab (zu lat. humor = (Körper-)Flüssigkeiten). Den zellulären Anteil macht im Wesentlichen die Leukozytenpopulation aus, welche sich in Lymphozyten, Granulozyten und das Makrophagen-Monozytensystem aufgliedern lässt, wobei diese ihren gemeinsamen Ursprung in einer pluripotenten Stammzelle im Knochenmark haben. Hinzu kommen Mastzellen, Dendritische Zellen und Natural Killer (NK)-Zellen. Lymphozyten stellen mit B- und T- Zellen den Anteil der adaptiven, zellulären Immunität dar. Die humorale Komponente bilden das Komplementsystem (angeboren) und die von B Zellen produzierten Antikörper (im Wesentlichen adaptiv). Lösliche Antikörper (AK) besetzen ihr spezifisches Antigen (AG) und stellen so einen Adapter oder „Zwischenkörper“ (P. Ehrlich) dar, der es dem angeborenen Immunsystem ermöglicht, an der spezifischen Immunantwort teilzunehmen.

1.1.2. Der B-Lymphozyt

B-Lymphozyten stellen die Produzenten von Antikörpern dar. Neben den chronologisch aufeinander folgenden Entwicklungsstufen der konventionellen B Zelle (Abbildung 1) unterscheidet man weiterhin eine CD5⁺ Subpopulation, die spezielle Charakteristika aufweist. Diese werden auch als B1a-Zellen bezeichnet und so gegen die konventionellen B2-Zellen abgegrenzt.

B1-Zellen sind eine kleine Untergruppe, welche im Nabelschnurblut 60-80 % aller B-Lymphozyten darstellt [3], während sie im peripheren Blut von Erwachsenen nur noch einen Anteil von 10-25 % ausmacht [4-6]. Besonders große Mengen finden sich in der Peritonealhöhle. Ihre Herkunft und Funktion ist noch nicht geklärt. Transferexperimente an Mäusen geben Hinweise auf eine eigenständige, selbsterneuernde Linie [7, 8]. Andererseits zeigen Studien mit humanen B-Lymphozyten eine Induzierbarkeit des CD5-Moleküls nach aktivierenden Stimuli, was gegen die Zwei-Linien-Hypothese spricht [9, 10]. Funktionell wird ihnen eine besondere Rolle in der angeborenen Immunität zugeschrieben. Sie produzieren polyreaktive „natürliche“ Antikörper der IgM-Klasse mit einem beschränkten V-Region Repertoire und haben von daher das

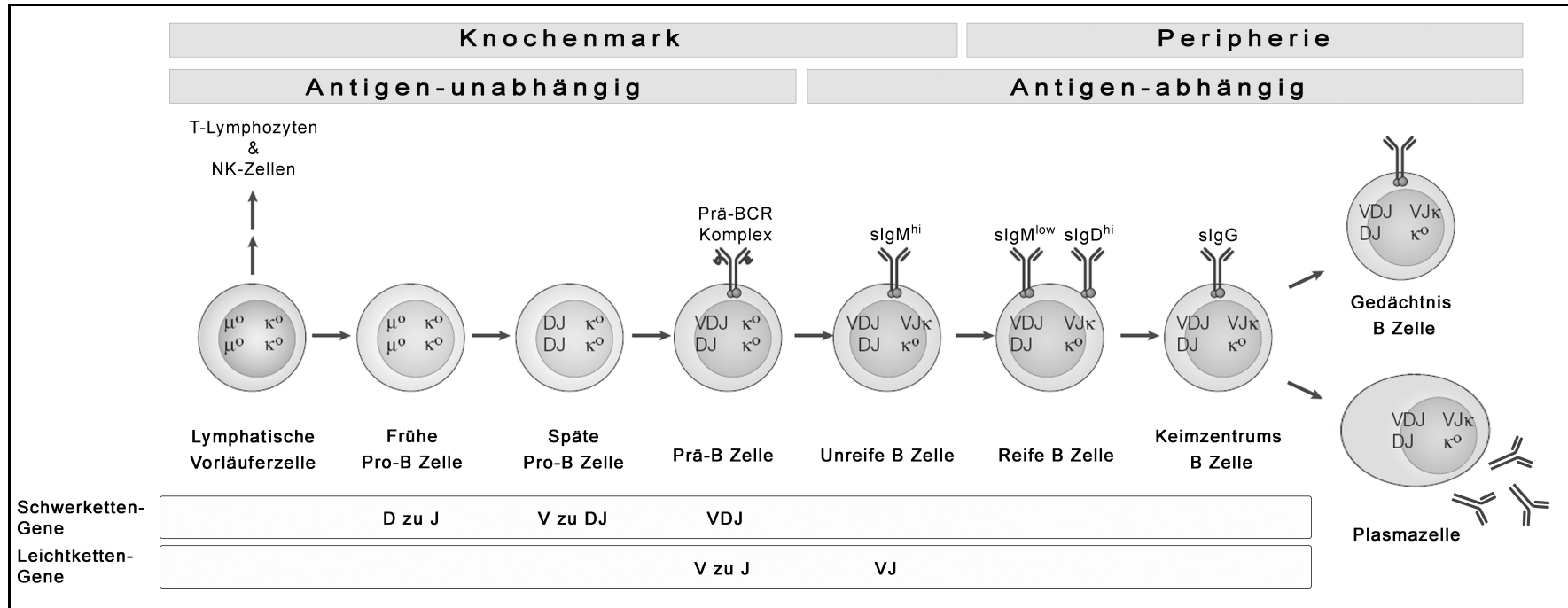


Abbildung 1. Vereinfachte Darstellung wichtiger Stufen der B-Zellentwicklung. Die Abbildung zeigt die Reifung des B-Lymphozyten vom Beginn im Knochenmark bis zur terminalen Differenzierung in der Peripherie. Zusätzlich dargestellt ist die primäre V(D)J-Rekombination für die schwere und leichte Kette des Immunglobulinlocus [modifiziert nach 43, 159].

Potential, auch körpereigene Strukturen zu erkennen [11]. Diese Hypothese wird gestützt durch eine erhöhte Anzahl von B1a-Zellen bei verschiedenen systemischen Autoimmunerkrankungen [12], darunter auch die Juvenile Idiopathische Arthritis [13, 14]. Außerdem sind CD5⁺ B Zellen häufig bei malignen hämatologischen Erkrankungen involviert. So exprimieren 95 % aller chronisch lymphatischen Leukämien der B-Zell Reihe (B-CLL) das CD5 Molekül [4]. Der Marker für diese B1a-Zellen – das Oberflächenmolekül CD5 – ist strukturell ein monomeres Klasse I Glykoprotein von 67 kDa Masse, welches funktionell das Aktivierungssignal über den BCR inhibiert [15, 16].

1.1.3. Antikörper: Struktur und Funktion

Als Teil der adaptiven Immunität ist es primäre Aufgabe der B Zelle, fremde Antigene spezifisch zu erkennen. Dafür spezialisierte Moleküle sind die Immunglobuline (Ig), welche einerseits in der membrangebundenen Form zusammen mit CD79 α/β als B-Zell-Rezeptor (BCR) fungieren [17] und andererseits, nach alternativem Splicing und daraus resultierendem Verlust hydrophober Aminosäuren am C-Terminus, in ihrer löslichen Form in Körperflüssigkeiten als Antikörper vorliegen. Antikörper sind Proteine, die hochspezifisch an ein bestimmtes Epitop eines Moleküls binden. Aus der Beobachtung, dass Antikörper erst nach stattgehabtem Kontakt mit eben diesem Molekül gebildet werden, leitete man den Begriff Antigen ab (*antibody generating*) [18]. Genau diese Antigen-Antikörper-Reaktion macht jeden AK einzigartig, da nur dieser spezifisch an „sein“ Antigen zu binden vermag. Zusätzlich kann jede B Zelle zu einem gegebenen Zeitpunkt nur eine einzige Art von Antikörperspezifität produzieren.

Strukturell bestehen Antikörper aus zwei schweren (heavy) und zwei leichten (light) Polypeptidketten, welche jeweils eine variable (V_H und V_L) und eine konstante Region (C_H und C_L) besitzen (Abbildung 2). Diese sind miteinander durch Disulfidbrücken verbunden. Die beiden variablen Regionen (V_H und V_L) bilden gemeinsam die für diesen Antikörper einzigartige Erkennungsstelle für das Antigen. Antikörper unterscheiden sich also zum einen in ihrer Fähigkeit ein spezielles antigenes Epitop zu erkennen (Idiotyp), zum anderen in ihrer Ig-Klasse (Isotyp). Es gibt fünf verschiedene Hauptklassen: IgA (2 Subklassen), IgG (4 Subklassen), IgD, IgE und IgM, welche

durch die schweren Ketten festgelegt werden und die Effektorfunktionen determinieren. Bei den leichten Ketten existieren lediglich die zwei Klassen κ und λ , welche auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind.

Wie bereits angesprochen, erfüllen membrangebundene Immunglobuline die Rolle des BCR, mit dem die B Zelle ihr spezifisches Antigen erkennt und auf diese Weise Signale erhält. Lösliche Immunglobuline dagegen stammen von Plasmazellen, einer terminalen Differenzierungsstufe der B-Zell-Reihe, die im Knochenmark angesiedelt ist und große Ig-Mengen sezerniert. Diese Antikörper erfüllen Effektorfunktionen: Zum einen neutralisieren sie ihre Antigene wie z.B. bakterielle Exotoxine und Viren. Ein zweiter Effekt besteht in der Opsonisierung, der spezifischen Markierung von Fremdanigen. In der Folge können die Fc-Teile des Antikörpers durch phagozytierende Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt und daraufhin zerstört werden. Dies wird als AK-abhängige zelluläre Zytotoxizität bezeichnet (ADCC). Zudem vermitteln Antikörper mittels ihres konstanten Fc-Teils auch die nicht-zelluläre, vom Komplementsystem getragene direkte Lyse von Mikroorganismen durch Porenbildung.

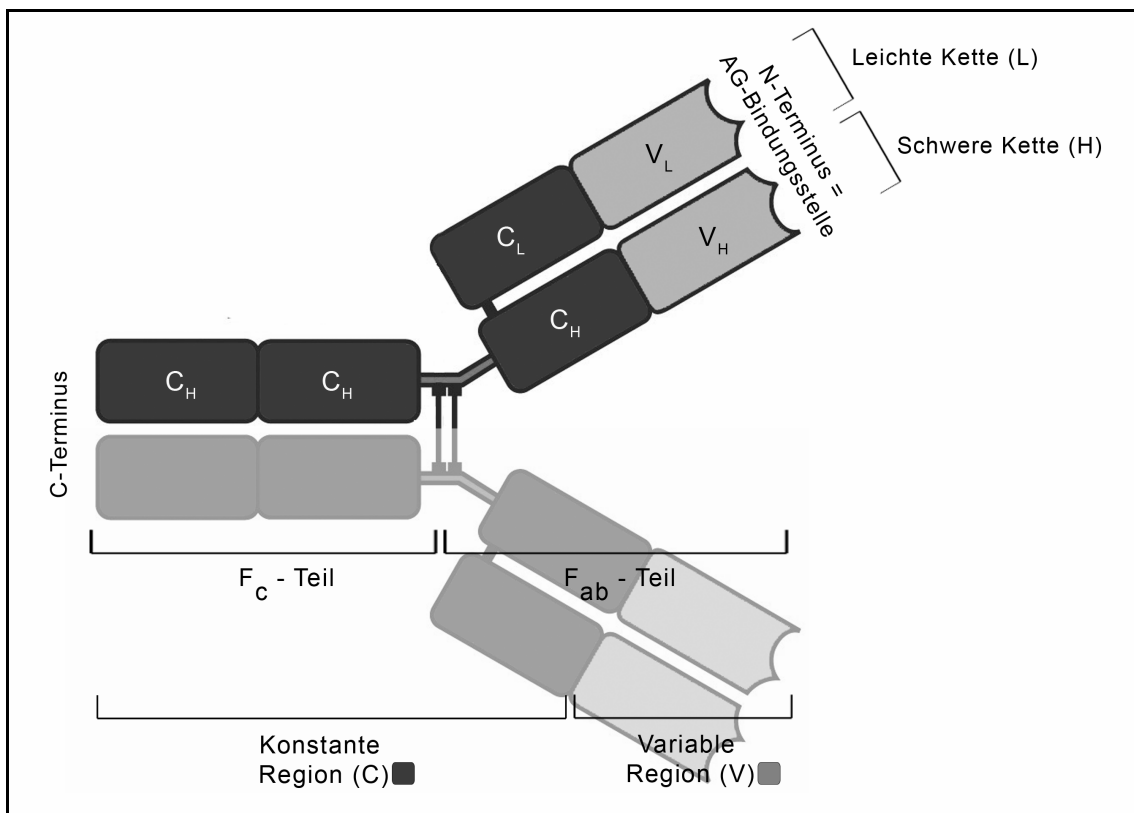


Abbildung 2. Struktur eines Immunglobulins [modifiziert nach 18]

1.1.4. Entwicklung der B Zelle im Knochenmark

B-Lymphozyten entwickeln sich wie die anderen Blutzellen aus einer gemeinsamen hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark (Abbildung 1). Der Buchstabe B stammt von der „Bursa fabricii“, einem lymphoretikulären Organ bei Vögeln, das beim Menschen nicht existiert. Durch den Einfluss des speziellen Mikromilieus im Knochenmark entsteht aus der pluripotenten Vorläuferzelle nach mehreren Differenzierungsschritten – definiert durch die Expression ihrer Ig-Ketten – schließlich der unreife B-Lymphozyt. Zunächst entsteht hierbei aus einer lymphatischen Vorläuferzelle die pro-B Zelle, indem sie beginnt, die Gene für die schweren Ketten auf Chromosom 14 zu rearrangieren. Nach erfolgreicher Rekombination wird diese als IgM-Klasse gemeinsam mit einer Ersatzleichtkette präsentiert (prä-BCR) und so zur prä-B Zelle. Diese rearrangiert nun den Leichtketten-Locus auf Chromosom 2 (κ) oder 22 (λ) und wird nach erfolgreicher Expression eines kompletten IgM-Moleküls zur unreifen B Zelle, die aus dem Knochenmark emigriert.

1.1.5. Die Keimzentrumsreaktion

Nach Verlassen des Knochenmarks trifft der naive B-Lymphozyt in den peripheren lymphatischen Organen auf sein Antigen. Für eine ausreichende Aktivierung muss die B Zelle neben der Bindung des AG via BCR noch ein zweites Signal erhalten. Dieses wird bei Thymus-unabhängigen (TI) AG von einer massiven Quervernetzung der BCR durch multivalente Epitope oder aber durch Toll-like Rezeptoren (TLR) vermittelt [19]. Bei Thymus-abhängigen (TD) AG muss ein T-Helfer-Lymphozyt angetroffen werden, der mittels seines T-Zellrezeptors das von der B Zelle via MHC-II präsentierte Peptid ebenfalls erkennt. Daraufhin erhält die B Zelle über CD40-Ligand und Interleukin-4 (IL-4) ein zweites Signal, woraufhin sie in den Zellzyklus eintritt und proliferiert. Dies geschieht an der Grenze zwischen B- und T-Zellzone innerhalb der Lymphfollikel. Anschließend tritt sie als proliferierender Centroblast (CB) in das Keimzentrum ein, wo durch Somatische Hypermutation und Affinitätsreifung eine Selektion nach AG-Affinität des BCR stattfindet. Weiterhin kann es zum Klassenwechsel kommen, woraufhin sich diese hochaffinen B Zellen entweder zu Plasmazellen oder

Gedächtniszellen ausdifferenzieren. Gedächtniszellen sind somatisch stark mutiert und exprimieren das Oberflächenantigen CD27 aus der Gruppe der TNF-Rezeptorsuperfamilie [20, 21]. Sie machen beim Erwachsenen ungefähr 40 % aller B-Zellen des peripheren Bluts aus und lassen sich nach dem exprimierten Isotyp ihres Immunglobulins weiter differenzieren (Abbildung 3) [22].

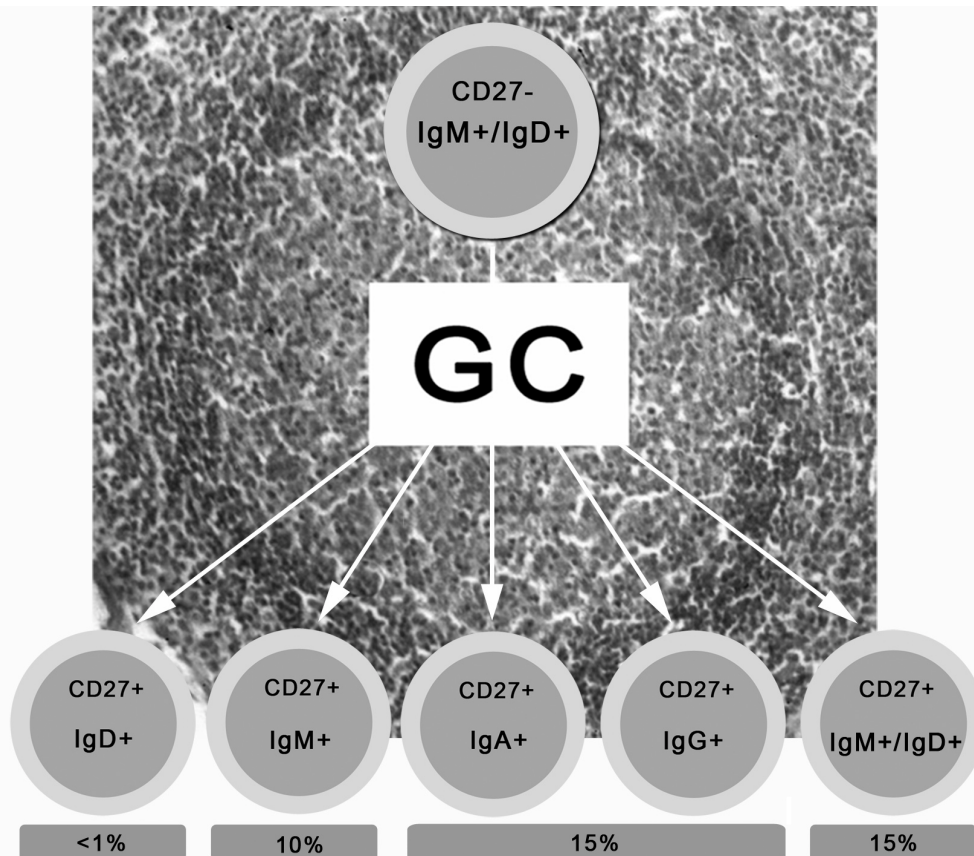


Abbildung 3. In der Keimzentrumsreaktion erfahren naive $CD27^- IgM^+/IgD^+$ B-Lymphozyten nach Antigenkontakt den Prozess der Somatischen Hypermutation und zum Teil auch einen Klassenwechsel. Diese $CD27^+$ Gedächtnis B Zellen machen zusammen etwa 40 % aller peripheren B Zellen des Erwachsenen aus (GC = Germinal Center) [modifiziert nach 22].

1.1.6. Entstehung des Immunglobulin-Repertoires

Das Immunsystem des menschlichen Organismus stellt die intimste Kontaktstelle zu anderen Spezies dar. Eine riesige Anzahl von Mikroorganismen sowie deren ständige Veränderung im Laufe der Evolution verlangt in der Antigenerkennung primär eine große Vielfalt sowie maximale Flexibilität. Um dies zu erreichen, wird auf die Veränderung genomischer DNA zurückgegriffen – ein prinzipiell riskanter

Mechanismus, da eine unkontrollierte DNA-Modifikation zur Auslöschung oder malignen Transformation der Zelle führen kann [23]. Zu der Diversifikation durch somatische Rekombination (kombinatorische Diversifikation) kommt die junktionale Diversifikation, welche auf der variablen Hinzufügung oder Entfernung einzelner Nukleotide im Bereich der DNA-Schnittstellen beruht (P- und N-Nukleotide). Nach einer derartigen – statistisch zufälligen – Veränderung der Basenabfolgen sind im Mittel 2/3 der Sequenzen durch Verschiebung des Leserasters unproduktive Rearrangements. Gelingt es einer Zelle, durch produktives Rearrangement der schweren und leichten Kette einen BCR zu exprimieren, wird dessen Spezifität gegen Fremd- und Selbstantigene getestet und die Zelle der klonalen Selektion unterworfen. Im Anschluss sorgt der Prozess der Somatischen Hypermutation (SHM) für eine noch weitere Diversifikation des Ig-Repertoires ebenfalls auf DNA-Ebene (Affinitätsreifung).

1.1.7. Ablauf der V(D)J-Rekombination

Der Immunglobulin-Genlocus besteht aus verschiedenen Gensegmenten: Für die schwere Kette sind dies jeweils mehrere V(ariable), D(iversity) und J(oining)-Segmente sowie die konstanten Exone (C) für die Ig-Klasse. Auf den Leichtkettenloci κ und λ befinden sich lediglich mehrere V- und J-Segmente sowie die konstanten (C) Anteile. Angrenzend an die einzelnen V(D)J-Segmente findet sich die nicht-kodierende Recombination Signal Sequence (RSS), bestehend aus einer Heptamer-Spacer (12/23)-Nonamer Sequenz (Abbildung 4, oben). Diese erlaubt das Auffinden durch die Rekombinationsenzyme und verhindert falsche Rearrangements (12/23-Regel).

Die Rekombination beginnt mit der Bindung des Enzymkomplexes (RAG 1, RAG 2, HMG-Proteine) an der RSS, woraufhin ein Einzelstrangbruch am kodierenden Strang eingeführt wird (Abbildung 4, unten - a). Nun werden die zu vereinigenden Elemente zusammengebracht (b), woraufhin die nun freie 3-OH Gruppe mit dem gegenläufigen Strang eine Haarnadelformation bildet (c). Die Öffnung dieser Haarnadelformation geschieht zufällig und wird durch die Aktivität der Enzyme TdT (Terminale Deoxynucleotidyl Transferase) und Exonuklease weiter diversifiziert (P- und N-Nukleotide). Schließlich werden mit Hilfe von Ligase IV und XRCC4 beide Brüche nach dem Prinzip des Non-Homologous End Joining (NHEJ) wieder verbunden (d)

[24]. Durch dieses Rearrangement entsteht ein immenses Repertoire an BCR-Spezifitäten, welches durch Affinitätsreifung (SHM, Klassenwechsel) noch weiter diversifiziert werden kann.

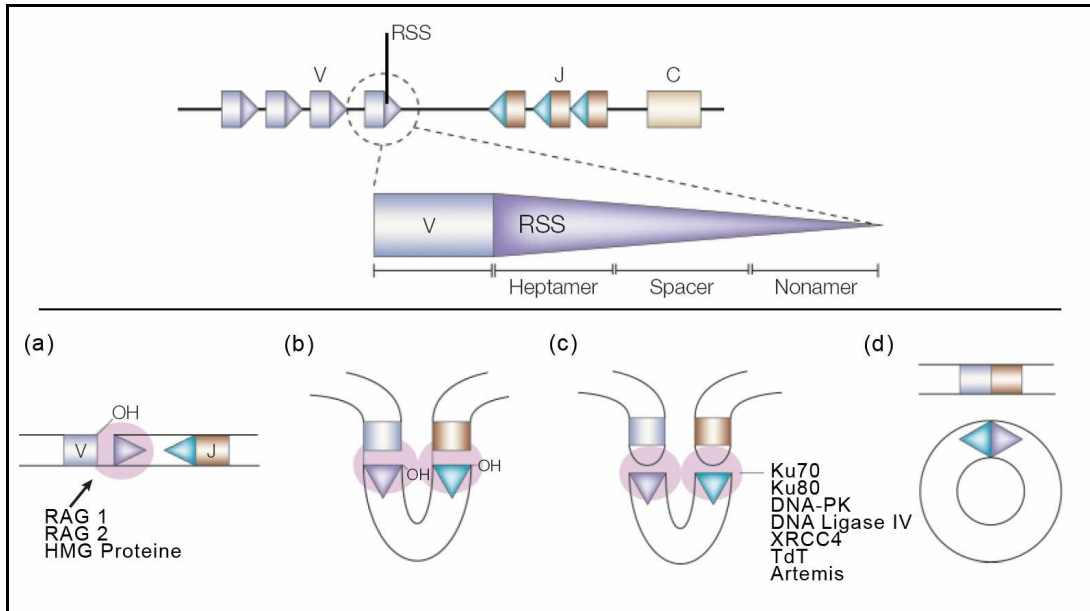


Abbildung 4. Schematische Darstellung der V(D)J-Rekombination am Beispiel eines Leichtkettenlocus. Oben: Struktur der Recombination Signal Sequence (RSS). Unten: Ablauf der Rekombination. Erläuterung und Abkürzungen siehe Text. (HMG=high mobility group; XRCC4=X-ray repair cross complementing protein 4; DNA-PK=DNA dependent protein kinase) [modifiziert nach 24].

1.1.8. Recombination Activating Genes (RAG)

Als Kernkomponente der V(D)J-Rekombinase stellt das synchrone Vorhandensein beider RAG-Enzyme – einem Komplex aus RAG1 und RAG2 – die Grundvoraussetzung für den Rekombinationsprozess dar. So können Mäuse, denen eines der beiden RAG Gene fehlt, keine reifen Lymphozyten hervorbringen [25, 26]. Beim Menschen führen verschiedene Mutationen zum Krankheitsbild der Severe Combined Immunodeficiency (SCID) und zum Omenn-Syndrom [27, 28]. Beim Menschen ist die Aktivität beider Gene streng auf Lymphozyten limitiert, wobei sie sich interessanterweise auch im murinen zentralen Nervensystem [29] sowie beim Zebrafisch in olfaktorischen Neuronen nachweisen lässt [30]. Ihre Expression erfolgt regulär in zwei Wellen der frühen B Zellentwicklung: zunächst im pro-B-Zell Stadium und daraufhin in der Phase der prä-B Zelle. Die beiden Gene liegen in enger

Nachbarschaft auf Chromosom 11, werden allerdings in entgegengesetzter Richtung transkribiert. Aufgrund ihrer genetischen Ähnlichkeit zu Transposons – d.h. genetischen Elementen, die innerhalb des Genoms ihre Position ändern können – und des tatsächlichen *in vitro* Nachweises von Transposon-Aktivität, haben sich die Vorgänger der RAG Gene vermutlich selbst aus Transposons entwickelt [31].

Die Regulation der RAG-Expression ist bisher noch unzureichend untersucht. Es ist allerdings bekannt, dass *in vitro* identische Stimuli in unterschiedlichen Entwicklungsstadien entgegengesetzte Wirkungen haben, was durch stark differierende Signaltransduktions-Kaskaden erklärbar ist [32]. So wird in unreifen B Zellen durch BCR-Aktivierung die RAG Expression induziert [33]; andererseits führt derselbe Mechanismus in reifen B-Lymphozyten zur Hemmung der Expression beider Gene [34]. Weiterhin kann RAG in diesen Zellen durch eine Kombination von CD40-Ligand und IL-4 reinduziert werden, was im Prinzip die Hilfssignale der T-Zelle imitiert [35].

1.1.9. Somatische Hypermutation (SHM)

In den Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe werden unter T-Zell Hilfe Punktmutationen in bereits rearrangierte V_H - und V_L -Segmente eingeführt, die dann ggf. zu Veränderungen der Polypeptidsequenz des Ig und seiner Bindungsaffinität führen. Eine nachfolgende positive Selektion hochaffiner BCR führt schließlich zu einem verbesserten Ig-Repertoire für ein gegebenes AG (Affinitätsreifung). Der genaue Mechanismus dieser Somatischen Hypermutation (SHM) ist nicht endgültig geklärt. Die Deaminierung eines Cytosins durch das Enzym Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID = AICDA) führt initial zur Entstehung eines Uracil, woraus dann entweder durch direkte Replikation C/G zu T/A-Transitionen entstehen oder durch fehlerhafte Reparatur dieser Läsion undefinierte Mutationen eingefügt werden [36].

AID wird ausschließlich in Keimzentrum-B Zellen exprimiert und stellt nicht nur für die SHM, sondern auch für den Isotypenwechsel (CSR) sowie die Genkonversion (nicht beim Menschen) eine essentielle Komponente dar [37, 38]. Ein Mangel an AID verursacht beim Menschen eine Variante des Hyper-IgM-Syndroms [39].

1.1.10. Selektionsmechanismen in der B Zell Entwicklung

Bis zu diesem Zeitpunkt ist die Zusammensetzung des Immunglobulins scheinbar zufällig verlaufen. Um einerseits eine suffiziente Reaktion gegen Pathogene zu entwickeln und andererseits die Erkennung von körpereigenen Strukturen zu verhindern, muss eine Selektion stattfinden. Da jeder B-Lymphozyt zu einem gegebenen Zeitpunkt nur Antikörper mit einer einzigen Spezifität produzieren kann, hat die Evolution dessen Überleben an diesen AK gekoppelt. Die klonale Selektionstheorie [40] geht von einem bei Geburt bereits fertigen Immunglobulinrepertoire aus, das prinzipiell in der Lage ist, sämtliche Antigene zu erkennen. Wird dieses Antigen durch einen Lymphozyten angetroffen, proliferiert dieser und bildet einen Klon vieler Tochterzellen (klonale Expansion), welche in der Folge sowohl die effektive Bekämpfung als auch die Gedächtnisfunktion sicherstellen. Andererseits wird die Entwicklung autoreaktiver Lymphozyten durch negative Signale verhindert: Diese Zellen fallen dann der Apoptose anheim, gehen in den Zustand der Anergie über oder rekombinieren ihre Leichtketten-Immunglobulingene neu (Sekundäres Rearrangement). In neueren Untersuchungen finden sich allerdings Hinweise, welche die Ein-Lymphozyt-Ein-Rezeptor-Theorie in Frage stellen [41, 42].

1.2. Autoimmunität: Defekte Toleranz für körpereigene Strukturen

Bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten wendet sich das Immunsystem gegen das Selbst. Da für diese Diskriminierung zwischen Selbst und Nicht-Selbst die erworbene Immunität in Form der Lymphozyten verantwortlich ist, konzentrieren sich Untersuchungen bei diesen Krankheiten auf Pathologien bei der Toleranzentstehung von B- und T-Zellen. Die Produktion autoreaktiver Antikörper ist gemeinsames Kennzeichen mehrerer systemischer Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis (RA), dem Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) und der Juvenilen Idiopathischen Arthritis (JIA). Dies ist Ausdruck defekter Toleranzmechanismen in der B Zellentwicklung, deren Ursache nicht abschließend geklärt ist.

Die grundlegendste Umstrukturierung des Ig-Locus und damit der Antikörper-Spezifität bringt der Prozess der V(D)J-Rekombination mit sich. Dieser Mechanismus läuft allerdings nicht nur zur primären, initialen Umordnung der Ig-Gene im pro- und prä-B Zell-Stadium ab, sondern tritt auch in späteren Entwicklungsstadien „sekundär“ auf. Diese sekundären V(D)J-Rearrangements (Receptor Editing und Receptor Revision) stellen von daher kritische, weil vulnerable Kontrollpunkte dar, in denen durch Dysregulation autoreaktive Rezeptoren entstehen können.

1.2.1. Sekundäre Rearrangements: Receptor Editing

Der erste wesentliche Kontrollpunkt bezüglich Autoreaktivität findet im Knochenmark statt. Nachdem die unreife B Zelle hier ein komplettes IgM-Molekül auf der Oberfläche exprimiert hat, wird dieses auf Reaktivität mit körpereigenen Strukturen getestet. Für die Signaltransduktion dieser Information ist der BCR selbst entscheidend. Man geht derzeit davon aus, dass die Stärke des BCR-Signals das Überleben der Zelle determiniert [18], auch wenn bekannt ist, dass weitere Moleküle im Sinne eines „receptor crosstalk“ für die Modulation der Aktivierung entscheidend sind. Bei einem extrem starken Signal wird demnach eine körpereigene Struktur erkannt und die B Zelle entweder inaktiviert (anerg), apoptotisch oder sie durchläuft einen sekundären Rekombinationsprozess, um ihre Antigen-spezifität zu verändern. Letzteres wird als Receptor Editing bezeichnet [43]. Diese „dritte“ Welle der RAG Expression wurde

zunächst für unreife B Zellen im Knochenmark beschrieben. Ihre Funktion scheint hierbei insbesondere in der Entfernung autoimmuner Rezeptoren aus dem Repertoire zu bestehen, welche bei unreifen B Zellen initial 55-75 % ausmachen [44].

1.2.2. Sekundäre Rearrangements: Receptor Revision

Mittlerweile ist bekannt, dass auch reife B Zellen außerhalb des Knochenmarks RAG Aktivität zeigen und so ebenfalls ihren Ig-Locus wesentlich modifizieren, was auch als „vierte Welle“ der RAG Expression bezeichnet wird [45]. Dies konnte zunächst auf Protein- und DNA-Ebene durch Stimulation mit IL-4 und LPS oder CD40-Ligand *in vitro* [35] [46] sowie nach Immunisierung *in vivo* [47, 48] gezeigt werden. In humanen Tonsillenzellen ließen sich ebenfalls mRNA-Transkripte beider RAG-Gene nachweisen [49]. Schließlich konnten stattgehabte sekundäre Rearrangements auch in peripheren – bereits somatisch mutierten B Zellen – anhand von Analysen der Ig-Loci demonstriert werden [50, 51]. Nach der Beschreibung von Leichtketten-Rearrangements, gelang mehreren Gruppen auch der Nachweis sekundärer Rearrangements auf der schweren Kette des Ig [52]. Eine starke Assoziation der Receptor Revision mit dem CD5 Molekül in Tonsillen B Zellen wurde erst kürzlich beschrieben [53].

In Frage gestellt wurden diese Ergebnisse durch verschiedene Untersuchungen mit GFP (Green Fluorescent Protein) knock-in Mäusen in verschiedene Loci im Bereich des RAG Gens. Hier ließen sich weder reife RAG exprimierende B Zellen nachweisen, noch konnte RAG durch verschieden Stimuli (LPS, Immunisierung) induziert werden. Nach diesen Studien handelt es sich demnach nicht um eine re-induzierte RAG Expression reifer B Zellen, sondern vielmehr um die anhaltende RAG Expression unreifer B Zellen. Diese Argumente stützen sich insbesondere auf den unreifen Phänotyp dieser Zellen [54-59]. Dennoch gelang es kürzlich, ebenfalls mit einem GFP-Konstrukt, in immunisierten Mäusen RAG Aktivität in AG-aktivierten B Zellen zu demonstrieren [60].

Trotz eines ähnlichen Mechanismus, unterscheidet sich die Receptor Revision entscheidend vom Receptor Editing. Dies wird insbesondere durch die

unterschiedlichen RAG induzierenden Signale bei unreifen und reifen B Zellen belegt: Bei unreifen B Zellen kommt es *in vitro* nach starker BCR Stimulation zur Reinduktion von RAG [33, 61], was *in vivo* bei Antreffen eines Autoantigens der Fall wäre. Andererseits ist in reifen B Zellen die RAG-Expression durch eine Kombination von LPS und IL-4 oder CD40-Ligand und IL-4 bzw. IL-7 reinduzierbar. Diese Stimuli imitieren eher Signale von T-Helfer Zellen. Eine BCR Aktivierung führt in dieser Konstellation sogar zur Terminierung der RAG Expression [34, 62-64].

Aufgrund dieser Daten wird der Receptor Revision unter physiologischen Umständen eher eine diversifizierende als toleranz-induzierende Funktion zugesprochen. Diese Trennung gilt allerdings nicht unter pathologischen Bedingungen: Durch Defekte in der Regulation beider Vorgänge können jeweils autoreaktive Antikörper entstehen [65].

1.2.3. Sekundäre Rearrangements: Rolle bei Autoimmunkrankheiten

Eine Reihe von Untersuchungen hat sich mit der Rolle der sekundären Rearrangements bei Autoimmunerkrankungen beschäftigt. Diese stützen sich zumeist auf die Untersuchung humaner B Zellen aus dem peripheren Blut oder aus Keimzentren, wobei einerseits die Expression der RAG Gene, andererseits die Sequenz des Immunglobulin-Locus analysiert wurde. Weiterhin kamen verschiedene Maus-Modelle zum Einsatz. Zwei Hypothesen werden diskutiert (Abbildung 5):

- Einerseits eine verminderte Aktivität sekundärer Rearrangements, wodurch autoreaktive BCR im Repertoire verbleiben.
- Andererseits das unkontrolliert häufige Auftreten sekundärer Rearrangements, die dazu führen, dass initial nicht-autoreaktive Rezeptoren unselektiv verändert werden, so dass in einigen Fällen schließlich Autoimmunität durch eine pathologische sekundäre Rekombination erst entsteht.

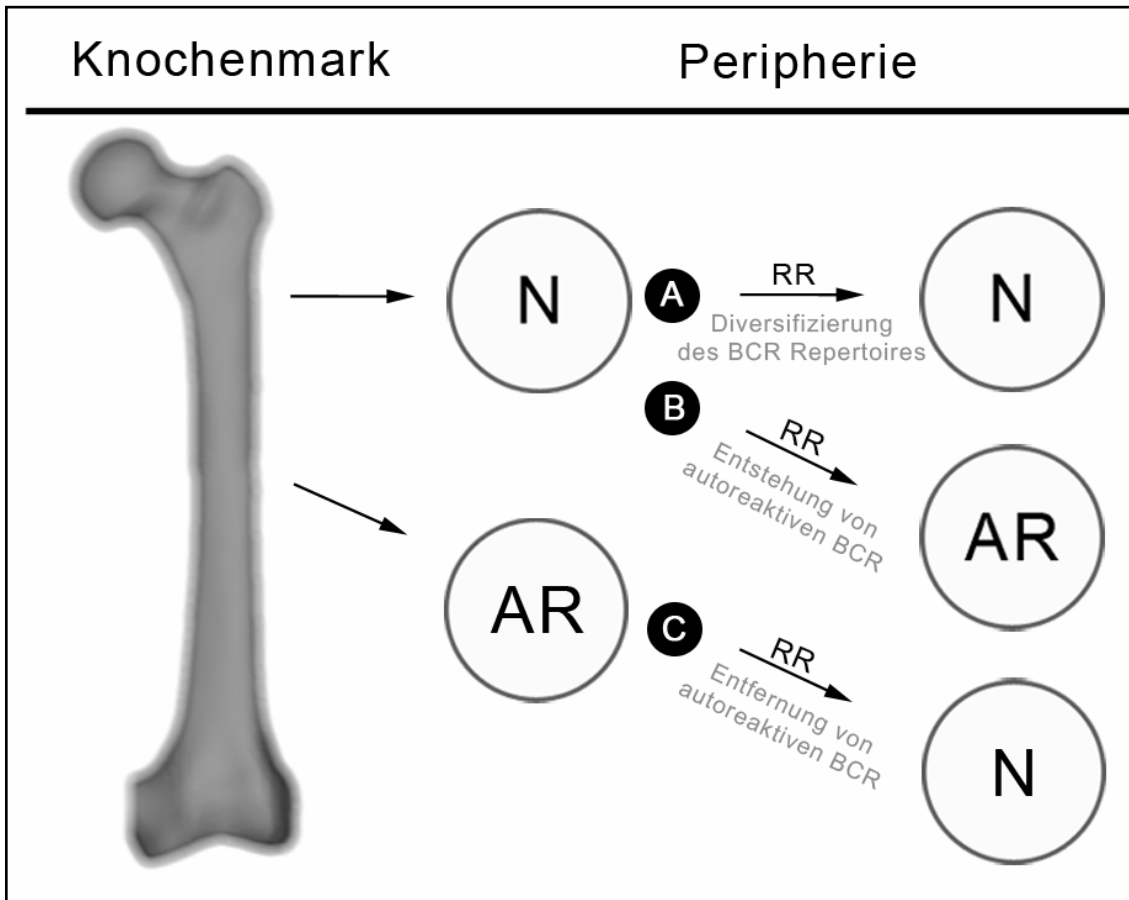


Abbildung 5. Die Abbildung illustriert alternative Funktionen der Rezeptor Revision. Neben einer diversifizierenden Funktion (A), könnte die Rezeptor Revision gemäß ihres Mechanismus unter pathologischen Umständen sowohl zur Entstehung (B) als auch zur Entfernung (C) autoreaktiver B Zellen in der Peripherie beitragen. (AR=autoreaktiv, N=non-AR, RR=Rezeptor Revision; modifiziert nach [66])

Nach der Beschreibung des Receptor Editing als physiologischer Mechanismus der B Zellentwicklung [43], fanden sich zunächst indirekte Hinweise auf Defekte beim Systemischen Lupus Erythematoses (SLE). Dazu wurden in SLE BCR-Repertoires überproportional viele V κ -Segmente gefunden, die sehr proximal zu J κ lagen, was auf eine geringere Häufigkeit sekundärer Rearrangements hinweist [67]. Weiterhin wurde eine vermehrte Verwendung kationischer V κ Segmente im SLE-Repertoire beschrieben, die gut mit der Entwicklung von Krankheitsmerkmalen korrelierte. Die seltene Verwendung dieses Abschnittes bei Gesunden, deutet ebenfalls auf defekte Revisionsmechanismen [44, 68, 69]. In Studien mit einem Mausmodell für das Lupus Suszeptibilitäts-Gen Sle1^z zeigten sich Defekte in den Toleranzmechanismen Anergie, Deletion und Receptor Revision. Zusätzlich konnte die periphere Lokalisation der

Receptor Revision demonstriert werden [70]. Für die Rheumatoide Arthritis (RA) konnte durch Klonierung und *in vitro* Expression von Antikörpern nicht nur eine erhöhte Anzahl polyreaktiver AK gegenüber Gesunden gezeigt werden, sondern zusätzlich auch deren mangelhafte periphere Elimination [71].

Dennoch fanden sich in anderen Untersuchungen auch J κ -distalere V κ Segmente in den Ig-Genen von SLE-Patienten [72, 73], was wiederum auf eine ausreichende Aktivität sekundärer Rearrangements hinweist. Zusätzlich waren periphere B Zellen von erwachsenen SLE-Patienten 3-fach häufiger positiv für RAG 1 und RAG 2 mRNA als bei Gesunden, was ebenfalls eine verstärkte periphere V(D)J-Rekombination unterstützt [74]. Bei pädiatrischen SLE-Patienten ließ sich eine vermehrte RAG Expression insbesondere in der IgD⁺CD5⁺ B-Zellpopulation nachweisen [75]. Studien an einem Lupus-Maus-Modell konnten direkt das Potential von sekundären Rearrangements demonstrieren, autoreaktive Antikörper hervorzubringen [51]. Bei der Rheumatoiden Arthritis fanden sich innerhalb entzündeter Synovialis – direkt am Focus der Entzündung – sowohl eine deutliche Expression beider RAG Gene als auch Hinweise auf sekundäre Leichtkettenrearrangements in den Ig-Loci [76, 77]. Auch für die Multiple Sklerose [78] sowie autoimmune Schilddrüsenleiden [79] liegen Daten zu pathologischen sekundären Rearrangements vor.

Für die Juvenile Idiopathische Arthritis gibt es bislang keine Untersuchungen.

Da sich für beide Hypothesen Hinweise finden, ist aufgrund der derzeitigen Datenlage eine abschließende Beurteilung nicht möglich.

1.3. Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA)

1.3.1. Gelenkentzündungen im Kindes- und Jugendalter

Die schmerzhafte Schwellung, Überwärmung und/oder Rötung als klinische Symptomatik einer Gelenkentzündung stellt im Kindesalter eine häufige Beschwerde dar. Muskuloskeletale Schmerzen bei Kindern werden in der Literatur mit einer Inzidenz von 4-30 % angegeben [80]. Eine Vielfalt an Ursachen erfordert deshalb eine genaue Diagnosestellung. Da die Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA) auch zu großen Teilen eine Ausschlussdiagnose darstellt, ist das differentialdiagnostische Spektrum hier kurz dargestellt (Tabelle 1).

Infektiös	Borreliose, Septische Arthritis, Osteomyelitis, Tuberkulose
Reaktiv	Coxitis fugax, Rheumatisches Fieber, Lyme-Disease, Reiter-Syndrom
Nicht-infektiös	JIA, SLE, Psoriasis, Dermatomyositis, Sklerodermie, CRMO
Neoplastisch	Leukämien, Lymphome, Knochentumoren, Neuroblastom
Genetisch	familiäres Mittelmeerfieber, Hämophilien
Vaskulär	Purpura Schönlein-Henoch, Kawasaki-Syndrom, M. Behcet
Orthopädisch	Trauma, M. Perthes, aseptische Knochennekrosen, M. Scheuermann

Tabelle 1. Differentialdiagnosen der Arthritis bei Kindern

1.3.2. Klassifikation

Die Juvenile Idiopathische Arthritis stellt eine heterogene Gruppe chronischer und entzündlicher Gelenkerkrankungen des Kindesalters dar, welche in ihrer Ätiologie noch weitestgehend ungeklärt ist. Gemeinsames obligates Kennzeichen für die Diagnosestellung einer jeden Subentität der JIA ist die Arthritis (Schwellung oder Bewegungseinschränkung und Schmerz mindestens eines Gelenks) mit (i) Beginn vor dem 16. Lebensjahr, (ii) einer Dauer von > 6 Wochen sowie der (iii) Ausschluss anderer definierter Erkrankungen (vollständige Liste in [81]). In der Einteilung ihrer Subgruppen werden besonders die Anzahl der befallenen Gelenke zu Beginn der Erkrankung sowie in deren Verlauf, das Vorhandensein gewisser Serum-Marker (Rheumafaktor), spezielle HLA-Assoziationen und das Alter zu Beginn der Erkrankung berücksichtigt (Tabelle 2).

Seit Erstbeschreibung erwies sich die Klassifikation als schwierig und infolgedessen besonders im internationalen Kontext uneinheitlich, woraus sich immense Probleme bezüglich standardisierter Therapien und prognostischer Aussagen ergaben. Die in Europa vorherrschende, von der European League Against Rheumatism (EULAR) herausgegebene Einteilung der Juvenilen Chronischen Arthritis (JCA) stand dabei in Konkurrenz zur amerikanischen Klassifikation der Juvenilen Rheumatoiden Arthritis (JRA) des American College of Rheumatology (ACR). Seit der Konferenz von Santiago 1994 [82] bzw. ihrer ersten und zweiten Revision in Durban 1997 [83] und Edmonton 2001 [84], hat man sich im Rahmen der „International League of Associations for Rheumatology“ (ILAR) auf eine gemeinsame Klassifikation unter dem neuen Überbegriff Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA) geeinigt, wobei man sich bewusst vom Begriff des „Rheumatoiden“ distanzierte, um die Eigenständigkeit dieses Krankheitsbildes gegenüber der rheumatoiden Arthritis (RA) des Erwachsenen hervorzuheben [85].

ACR	EULAR	ILAR
JRA	JCA	JIA
(Juv. Rheumatoide Arthritis)	(Juv. Chronische Arthritis)	(Juv. Idiopathische Arthritis)
systemische Form	systemische Form	systemische Form
Polyarthritis	Polyarthritis	Polyarthritis, RF-negativ
	juvenile rheumatoide Arthritis	Polyarthritis, RF-positiv
Oligoarthritis	Oligoarthritis, Frühform (EOPA)	Oligoarthritis, persistierend
	Oligoarthritis, Spätform (LOPA)	Oligoarthritis, extendierend
	juvenile Psoriasis-Arthritis	Psoriasis-Arthritis
	juvenile ankylosierende Arthritis	Enthesitis-assoz. Arthritis
		andere Arthritiden

Tabelle 2. Gegenüberstellung verschiedener Klassifikationen der juvenilen Arthritiden.

(RF = Rheumafaktor, EOPA/LOPA=Early/Late Onset Pauciarticular Arthritis)

Die Grundproblematik einer sinnvollen Klassifikation ist die beschränkte Kenntnis der Krankheits-Ätiologie, wobei das Dilemma besteht, dass Ätiologie und Klassifikation für sich gegenseitig eine wertvolle Grundvoraussetzung darstellen, um einerseits Daten klinischer Studien von möglichst homogenen Kohorten miteinander vergleichen zu können und andererseits differenzierte Therapien aufgrund einer ätiologisch begründeten Klassifikation anzuwenden. Bis zu diesem Punkt bleiben alle

Klassifikationen primär deskriptiv und werden auch weiterhin Revisionen durchlaufen. Dennoch kann man sich von einem internationalen Konsens, den die ILAR Klassifikation liefern soll, einen Vorteil für das Verständnis der Krankheit erwarten. Noch ist das Ziel, weltweit eine einheitliche Klassifikation zu verwenden jedoch nicht erreicht und es werden weiterhin sowohl die JRA als auch die JCA Klassifikation verwendet. Den Hauptkritikpunkt an der ILAR Klassifikation stellt die große Gruppe der nicht klassifizierbaren Arthritiden dar, welche zwangsläufig aus einer engeren Eingrenzung der Hauptgruppen resultierte. Des Weiteren wird die phänomenologisch gut charakterisierte frühkindliche Oligoarthritis (EOPA) nicht mehr herausgestellt. Eine Übersicht über die drei Klassifikationen bietet Tabelle 2.

1.3.3. Epidemiologie

Epidemiologische Daten aus verschiedenen Studien variieren stark. Dies kann einerseits auf unterschiedliche genetische Prädispositionen bzw. exogene Faktoren in verschiedenen Populationen zurückzuführen sein, andererseits aber auch die stark variierende Anwendung der verschiedenen Klassifikations-Systeme reflektieren. Für die Inzidenz finden sich weltweit Zahlen von 1-22 / 100.000 / y, während die Prävalenz zwischen 8 bis 150 pro 100.000 schwankt [86-88]. Bezüglich Geschlechtspräferenzen treten sowohl poly- als auch oligoartikuläre Formen bei Mädchen häufiger auf, während sich die systemische Form eher bei Jungen findet. Ethnische Vergleiche haben weiter gezeigt, dass die oligoartikuläre JIA unter Kaukasiern zwar den häufigsten Subtyp repräsentiert, dieser bei nicht-kaukasischen Rassen jedoch kaum zu finden ist [89]. Einigen Studien ist es gelungen, ein zyklisches Auftreten der Krankheit darzustellen, was als Hinweis auf eine externe Krankheitsursache interpretiert werden kann [90, 91]. Für Deutschland fand sich in einer prospektiven Studie aus dem Jahre 1995 eine Inzidenz von 6,6 / 100.000 / y mit einer Prävalenz von 14,8 / 100.000 / y bei Kindern unter 16 Jahren [92]. Während die Prävalenz mit 1:1,5 eine Mädchenwendigkeit zeigte, waren die Geschlechter bezüglich der Inzidenz gleich verteilt. Den mit Abstand größten Subtyp der JIA stellte auch hier die Oligoarthritis dar. Eine 1998 publizierte Studie aus Ost-Berlin untersuchte retrospektiv alle Kinder mit rheumatischen Beschwerden aus den Jahren 1980-1988. Aufgrund der besonderen

politischen Rahmenbedingungen in der ehemaligen Deutschen Demokratischen Republik (DDR), mussten alle Kinder mit rheumatischen Beschwerden in einem genau definierten Einzugsgebiet an eine Klinik in Berlin-Buch zugewiesen werden. Hier fand sich eine Inzidenz von lediglich 3,5 / 100.000 / y, allerdings mit einer Prävalenz von 20 / 100.000 / y [93].

1.3.4. Klinisches Erscheinungsbild

Die klinische Präsentation der verschiedenen JIA-Formen zeigt deutliche Unterschiede. Dennoch stellt die Arthritis – mit Ausnahme der systemischen Form, bei welcher die Gelenkmanifestation häufig erst im Verlauf auftritt – in der Regel das Leitsymptom und auch die Hauptklage dar, weshalb der Patient den Arzt aufsucht. Klassische klinische Symptome der häufigeren JIA-Subtypen sind in Tabelle 3 dargestellt. Die zwei in dieser Studie untersuchten Formen Oligoarthritis (o-JIA) und Arthritis mit systemischem Beginn (systemic-onset JIA = s-JIA) werden im folgenden beschrieben.

1.3.5. Oligoarthritis (o-JIA)

Die Oligoarthritis ist definiert durch die Entzündung von 1 bis 4 Gelenken zu Beginn der Symptomatik sowie der oben genannten gemeinsamen JIA Kriterien. Eine weitere Unterteilung erfolgt nach dem Gelenkstatus 6 Monate nach Krankheitsbeginn. Sind zu diesem Zeitpunkt mehr als vier Gelenke betroffen, spricht man von „extendierter“, anderenfalls von „persistierender“ Oligoarthritis. Weitere spezifische Zustände müssen zur Diagnosestellung ausgeschlossen werden: Dies betrifft eine positive Familienanamnese der Psoriasis oder einer HLA-B27 assoziierten Erkrankung bei einem erstgradig Verwandten, einen positiven IgM-Rheumafaktor (RF) oder das Vorliegen von HLA-B27 bei Jungen über sechs Jahren. Außerdem muss eine systemische Verlaufsform nach den ILAR-Kriterien ausgeschlossen sein [82-84].

Die o-JIA stellt mit knapp 50 % die häufigste Form der verschiedenen JIA Typen in kaukasischen Populationen dar und tritt überwiegend bei Mädchen im Kleinkindalter mit einem Maximum um das 3. Lebensjahr auf [89]. Die Krankheit bleibt in der Regel lokalisiert und verursacht keine systemischen Beschwerden. Besonders häufig sind

	Systemisch	Polyartikulär		Oligoartikulär		Enthesitis- assoziiert	Psoriasis- Arthritis
		RF-negativ	RF-positiv	persistierend	extendierend		
<u>Alter zu Beginn</u>	4	2		2		10	
<u>Gelenkbefall</u> - zu Beginn	symmetrisch grosse	> 4 Gelenke symmetrisch grosse und kleine		1 - 4 Gelenke asymmetrisch grosse		asymmetrisch große	asymmetrisch große und kleine
- nach 6 Monaten				≤ 4 Gelenke	> 4 Gelenke		
<u>Symptome</u>	intermitt. Fieber > 2 w Exanthem Lymphadenopathie Hepatosplenomegalie Serositis	subfebrile Temperaturen Müdigkeit Gewichtsverlust Tendosynovitis		Uveitis häufig Gonarthrit		Enthesiopathie HLA-B27 assoz.	Daktylitis Tüpfelnägel Onycholyse
<u>Komplikationen</u>	Makrophagenaktivierung Herzinsuffizienz Amyloidose Wachstumsverzögerung	Amyloidose Quadriplegie		Erblindung			Uveitis

Tabelle 3. Klinische Manifestationen häufiger JIA Entitäten

Knie- oder Sprunggelenke betroffen, wobei eine Monarthritis keine Ausnahme darstellt. Die Prognose der extendierten Form scheint nach einer deutschen Studie mit einer Komplettremissionsrate von 12 % deutlich schlechter zu sein als die der persistierenden mit 75 % kompletter Remission [94]. Risikofaktoren für die Entwicklung einer extendierenden Form sind Befall von Hand, Handgelenk und Fußgelenk, symmetrische Arthritis, Befall von 2-4 Gelenken sowie eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und der Nachweis eines erhöhten ANA-Titers [95]. Die häufigste Langzeitkomplikation bei o-JIA Patienten stellt die Uveitis dar, welche besonders häufig bei ANA-positiven Mädchen diagnostiziert wird und in ca. 10 % bleibende Augenschäden hinterlässt.

1.3.6. JIA mit systemischem Beginn (s-JIA)

Die s-JIA definiert sich über einen charakteristisch intermittierenden Fieberverlauf, welcher eine Mindestdauer von zwei Wochen aufweisen muss und innerhalb dieser Spanne mindestens für drei Tage einmal täglich auftritt. Zusätzlich muss mindestens eines der folgenden Symptome vorliegen: flüchtiges, lachsfarbenes Exanthem besonders am Stamm; generalisierte Lymphadenopathie; Hepatosplenomegalie; Serositis (häufig als Pleuritis oder Perikarditis). Ausschlusskriterien sind eine positive Familienanamnese der Psoriasis oder einer HLA-B27 assoziierten Erkrankung bei einem erstgradig Verwandten, ein positiver IgM-Rheumafaktor (RF) oder das Vorliegen von HLA-B27 bei Jungen über sechs Jahren [82-84].

Die nach ihrem Erstbeschreiber, dem Londoner Pädiater Sir George Frederick Still (1896), auch als Still-(Chauffard-)Syndrom bezeichnete Krankheit, tritt bevorzugt bei Jungen im Vorschulalter auf und macht in besonderen Kohorten bis zu 10 % aller JIA Diagnosen aus. Der sich häufig erst im Verlauf manifestierende Gelenkbefall ist zumeist von oligo- oder polyartikulärem Muster. Systemische Symptome dominieren das Erscheinungsbild und beinhalten besonders das intermittierende Fieber, das klassische Exanthem und die viszerale Beteiligung. Diese Faktoren führen in der Regel zu einem beträchtlich verschlechterten Allgemeinzustand, welcher sich auch durch pathologische Laborwerte objektivieren lässt. Häufig finden sich Anämie, Leukozytose, Thrombozytose, erhöhte Leberenzyme und akute Phase-Proteine sowie eine

beschleunigte Blutsenkung. Positive ANA-Titer sind eher die Ausnahme. Die wichtigsten Komplikationen stellen die Amyloidose, das Makrophagenaktivierungssyndrom (oder hämophagocytische Lymphohistiocytose = HLH), eine Herzinsuffizienz sowie die Gefahr der Entwicklung einer chronischen, destruktiven Polyarthritiden dar. Hinzu kommen die Nebenwirkungen von häufig in hoher Dosis notwendigen Glukokortikoiden und weiteren Immunsuppressiva.

1.3.7. Ätiologie der Juvenilen Idiopathischen Arthritis

Die Ätiologie der JIA ist trotz langer Kenntnis des Krankheitsbildes (Erstbeschreibung bereits im Jahr 1483 durch Botticelli [96]) und intensiver Forschung bei weitem noch nicht geklärt. Verschiedene Studien haben in der Vergangenheit Hinweise sowohl für genetische als auch für Umweltfaktoren erbringen können, so dass heute weitestgehend von einer kombinierten Theorie ausgegangen werden kann, in welcher eine genetische Prädisposition zusammen mit einem externen Trigger zum Beginn der Erkrankung führt. In vielen Untersuchungen haben sich zusätzlich signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen JIA Formen gezeigt, was eine differenzierte Klassifikation dieses Krankheitsbildes unterstützt. Wichtige Erkenntnisse zu endogenen und exogenen Ursachen werden im folgenden näher dargestellt.

1.3.8. Genetische Faktoren im HLA-Locus

Die Relevanz genetischer Faktoren in der Ätiologie der JIA wurde anhand von Geschwister- und Zwillingsstudien belegt. Das relative Risiko ebenfalls an JIA zu erkranken wird für Geschwisterkinder eines JIA-Patienten mit 15-20 [97, 98], für eineiige Zwillinge sogar mit ~ 250 angegeben [99].

Phänotypische Studien der Synovialflüssigkeit von Kindern mit JIA zeigten eine klare Prädominanz der T-Zellfraktion innerhalb der mononukleären Zellpopulation [100]. In Kenntnis dessen sowie einer strikt HLA-bezogenen Antigenerkennung der T-Zellen, der zentralen Rolle der HLA-Proteine bei Antigen-Prozessierung und -Präsentation sowie Vorkenntnissen über starke HLA-Polymorphismen bei anderen Autoimmun-Erkrankungen, konzentrierte sich die Suche nach Polymorphismen zu Beginn besonders

auf diesen Genlocus. Bei Patienten mit oligoartikulärer JIA betreffen die klarsten Assoziationen der HLA Klasse I-Allele HLA-A*0201, in der HLA Klasse II besonders die Allele HLA-DRB1*08 und *11, DPB1*0201 sowie DQA1*04 und *05 [101]. Frühe Untersuchungen zeigten unter oligoartikulären Patienten nach der JRA Klassifikation zusätzlich eine starke HLA-B27 Assoziation, welche allerdings durch die neuen Kriterien der ILAR-Einteilung in die Gruppe der Enthesitis-assoziierten Arthritis einzuordnen ist [102].

Interessanterweise gab eine nordamerikanische Studie Hinweise darauf, dass das Allel HLA-DR4, welches sich bei der rheumatoiden Arthritis des Erwachsenen sowie bei polyartikulären JIA-Formen gehäuft findet, bei o-JIA Patienten sogar einen protektiven Effekt haben könnte [103].

Die s-JIA scheint hingegen keine klaren HLA-Assoziationen aufzuweisen [104, 105]. Eine britische Studie konnte einen Zusammenhang zu HLA-DRB1*11 zeigen [106], dieser war allerdings nicht für die systemische Form spezifisch.

1.3.9. Polymorphismen von Genen außerhalb des HLA-Locus

In der letzten Zeit werden zunehmend auch nicht-HLA Gene und ihre Polymorphismen gezielt auf Assoziationen mit der JIA und ihren Subtypen untersucht. Besonders im Mittelpunkt stehen hier Gene für verschiedene Zytokine und ihre Rezeptoren, von welchen in der Regel bereits hinweisende Informationen aus phänotypischen Untersuchungen von peripherem Blut und Synovialflüssigkeit vorliegen. Teilweise aufgrund des sehr starken Polymorphismus dieser Genloci, welche häufig Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) darstellen, sind die bis jetzt vorliegenden Informationen häufig noch widersprüchlich und lassen noch keine eindeutigen Rückschlüsse zu. Kandidatengene sind hier besonders Interferon γ (IFN- γ), der Tumor Necrosis Factor (TNF) α/β sowie sein TNF-Rezeptor (TNFR), die Interleukine (IL)-1, IL-6 und IL-10 und der Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) [98, 107].

1.3.10. Infektiöse Trigger der JIA

Neben der genetischen Assoziation geben verschiedene Studien auch Hinweise auf eine infektiöse Ursache oder zumindest einen infektiösen Trigger in der Ätiologie der JIA. Virusinfektionen in der frühen Kindheit oder sogar in utero wurden hiermit in Zusammenhang gebracht.

Pritchard et al. beschrieben im Zusammenhang mit einer Influenza A H2N2-Epidemie des Jahres 1963 ein gehäuftes Auftreten von Juveniler Chronischer Arthritis bei Kindern, die in diesem Jahr geboren wurden. Gleichzeitig fanden sie erhöhte Antikörpertiter für diesen spezifischen Stamm bei den betroffenen Patienten und wiesen eine Wirkung der antiviralen Substanz Amantadin auf die Symptomatik nach [108, 109].

Andere Gruppen beschrieben, wie auch für die RA des Erwachsenen [110], sechs Fälle serologisch dokumentierter Parvovirus B19 Infektionen, welche anschließend in eine chronische Arthritis übergingen und formell die Kriterien der JRA erfüllten [111]. Einige serologische Untersuchungen zeigen außerdem, mit allerdings sehr kleinen Fallzahlen, erhöhte Seroprävalenzen spezifischer IgG-Antikörper gegen Parvovirus B19 bei Patienten mit polyartikulärer JRA gegenüber Gesunden [112]. Untersuchungen synovialer Gewebe mittels PCR konnten jedoch kein erhöhtes Vorkommen von Parvovirus B19-DNA im Gelenk nachweisen [113]. Paradoxerweise gibt es auch Berichte über die komplette Remission rheumatischer Symptome nach akuter Parvovirus B19 Infektion bei einer JRA Patientin [114] sowie Daten über eine im Vergleich zu gesunden Kindern gleichen Alters seltenere Seropositivität, dies speziell für die oligoartikuläre Form [115].

In den 80er Jahren bereits vermutete man ebenfalls aufgrund serologischer Daten eine Rolle des Rubella-Virus aus der Gruppe der Togaviren als ätiologisches Agens der JIA [116]. In späteren Untersuchungen ließ sich in über einem Drittel der untersuchten JIA Patienten das Virus auch aus lymphoretikulären Zellen nachweisen [117], was sich allerdings in einer nachfolgenden Untersuchung nicht reproduzieren ließ [118].

Eine weitere Theorie versucht einen Zusammenhang zwischen dem Epstein-Barr-Virus (EBV), dem Erreger der infektiösen Mononukleose, und der JIA herzustellen. Hierzu liegen allerdings ebenfalls sehr widersprüchliche Daten vor [119, 120].

Teilweise sehr hohe Durchseuchungsraten in der Normalpopulation, nicht standardisierte serologische Nachweisverfahren, geringe Fallzahlen und die Tatsache, dass die meisten dieser Viren selbst zu einer akuten Arthritis führen können, schränken die Aussagekraft dieser inhomogenen Daten deutlich ein und erschweren eine klare Interpretation.

Auch bakterielle Infektionen stehen im Verdacht. Eine kanadische Untersuchung zeigte eine – mit einem zyklischen Auftreten der JIA vergesellschaftete – Infektionshäufung mit *Mycoplasma pneumoniae*, einem zellwandlosen Bakterium, welches üblicherweise für Infektionen des Respirationstraktes verantwortlich gemacht wird [90]. Auch diese Daten konnten jedoch bisher nicht klar bestätigt werden.

Einen molekularen Hinweis auf bakterielle Trigger liefern außerdem Untersuchungen mit Hitzeschock-Proteinen (HSP's). Dies sind evolutionär hochkonservierte Proteine, die sowohl von Pro- als auch Eukaryoten speziell in Stresssituationen, wie zum Beispiel bei erhöhten Temperaturen im Rahmen einer Infektion exprimiert werden. Ihre physiologische Aufgabe besteht in der Hilfe der korrekten Faltung einer Polypeptidkette innerhalb der Zelle in ihre Sekundär- bzw. Tertiärstruktur.

Im Sinne der Theorie des molekularen Mimikry, stehen besonders solche hoch konservierten Proteine lange im Verdacht ein Zielprotein autoreaktiver Lymphozyten bei autoimmunen Krankheiten zu sein. Diese Annahme wurde für die Pathogenese der JIA erhärtet, indem niederländische Forscher *in vitro* eine signifikant verstärkte proliferative Antwort mononukleärer Zellen auf gereinigtes humanes HSP60 sowohl aus peripherem Blut als auch aus Synovialflüssigkeit von JIA Patienten zeigten, nicht jedoch von Gesunden und erwachsenen rA-Patienten. Diese Zellen reagierten ebenfalls auf mykobakterielles HSP65, wodurch die Theorie des molekularen Mimikry unterstützt wird [121]. Zusätzlich fanden sich erhöhte Antikörpertiter gegen humane und bakterielle HSP's bei JIA Patienten [122, 123]. Diese waren jedoch nicht spezifisch für die JIA, sondern traten ebenfalls bei Patienten mit Systemischem Lupus Erythematoses (SLE) und Mukoviszidose auf. Aus der Beobachtung heraus, dass HLA-B27-negative o-JIA Patienten, deren T-Zellen eine Proliferationsantwort auf das humane HSP60 zeigen, eher in Remission gehen als Patienten ohne Immunantwort auf dieses Protein [124, 125], leitete man die Idee ab, einen Impfstoff gegen HSP's im Sinne einer Immuntherapie zu entwickeln – eine Hypothese, die bei der adulten RA und im

Tiermodell bereits erfolgversprechend getestet wurde [126-128]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass verschiedene – von humanen HSP60-Epitopen abgeleitete – Peptide zu einer deutlich veränderten Immunantwort *in vitro* bei peripheren mononukleären Zellen führen. Hierbei zeigte sich nur bei JIA Patienten eine erhöhte Sekretion des anti-inflammatorischen IL-10, welches von regulatorischen T-Zellen sezerniert wird. Diese Beobachtungen waren unabhängig vom MHC Genotyp der Patienten und erfüllen daher eine wichtige Voraussetzung für die klinische Anwendung [129].

1.3.11. Autoantikörper

Immunglobuline, welche gegen Antigene des eigenen Organismus gerichtet sind, werden als Autoantikörper bezeichnet und als Ausdruck einer unzureichenden Toleranzentwicklung interpretiert. Diese finden sich besonders häufig in verschiedenen, teils spezifischen Verteilungsmustern bei Autoimmunkrankheiten. Dennoch kommen gewisse Autoantikörper – allerdings seltener und in geringerer Konzentration [130] – auch bei Gesunden vor.

Bei der o-JIA treten sog. Antinukleäre Antikörper (ANA) mit 75-80 % sehr häufig auf und geben damit einen Hinweis auf eine gestörte Selbsttoleranz in der B-Lymphozyten Population. Weiterhin stellen sie einen prognostischen Risikofaktor für die Entwicklung einer Uveitis dar. Bei der polyartikulären Form der JIA sind ANA's in 40-50 %, bei der systemischen Form in lediglich 10 % der Fälle nachweisbar [131]. Ein ANA-Titer wird in der Regel ab $\geq 1:160$ als positiv interpretiert. Aufgrund der Homogenität der ANA-positiven JIA Patienten in Bezug auf Alter, Geschlechtswendigkeit, symmetrischen Gelenksbefall und Iridozyklitis wird von einigen Autoren die Einführung eines positiven ANA-Titers als eigenständiges Kriterium in der ILAR Klassifikation vorgeschlagen [132]. Weitere Autoantikörper gegen die Histon-Komponenten H1 und H3 sowie gegen andere körpereigene Strukturen kommen ebenfalls bei der JIA vor, allerdings weitaus seltener als ANA's. Antikörper gegen cyclic citrullinated peptides (CCP), die sich bei der Rheumatoiden Arthritis des Erwachsenen mit einer hohen Spezifität finden, treten über alle JIA Subtypen hinweg mit 2-4 % lediglich vereinzelt auf. Eine höhere Prävalenz findet sich bei Patienten mit polyartikulärem Beginn sowie

ebenfalls positivem Rheumafaktor [133, 134]. Die pathogenetische Relevanz dieser autoreaktiven Antikörper bei systemischen Autoimmunopathien ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht endgültig geklärt.

Im diametralen Gegensatz zu dem Konzept der entzündungsfördernden Rolle von Autoantikörpern, gibt es auch Hinweise auf eine protektive Rolle bei Erkrankungen aus der Gruppe der systemischen Autoimmunopathien [135]. Neuere Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass für diskrepante Effektorfunktionen verschiedene Glykosylierungs-Zustände am Fc-Teil des Immunglobulins verantwortlich sein könnten [136].

1.4. Fragestellung dieser Arbeit

Das Vorhandensein Antinukleärer Antikörper (ANA) bei der o-JIA stellt ein Charakteristikum dieser Subgruppe dar, was eine ätio-pathogenetische Relevanz vermuten lässt. Hinweise für Defekte in sekundären Rekombinationsprozessen für andere systemische Autoimmunopathien mit Autoantikörpern (SLE, RA) liegen vor, während dies für die JIA bislang noch nicht untersucht wurde. Um diese Hypothese zu testen, wurde die Expression der RAG-Gene als Parameter verwendet. Da sowohl RAG1 als auch RAG2 für die V(D)J-Rekombination essentiell sind [25, 26] und sie gleichzeitig die einzigen Lymphozyten-spezifischen Faktoren dabei darstellen [137], eignen sie sich besonders für die Untersuchung dieser Fragestellung. Die Analyse von Einzelzellen birgt dabei den Vorteil, dass auch weniger starke Unterschiede in der Genexpression der Analyse zugänglich sind. Dies ist insbesondere bei extrem heterogenen „Gewebe“ wie Lymphozytenpopulationen von entscheidendem Wert.

Eine verstärkte oder verminderte RAG Expression bei peripheren B Zellen warf in der Vergangenheit immer wieder die Frage auf, ob es sich dabei nicht um unreife B Zellen handele, die erst kürzlich aus dem Knochenmark ausgeschwemmt wurden. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden lediglich CD27⁺ B Zellen als Marker für somatisch mutierte Gedächtnis B Zellen verwendet [22] und zusätzlich IgG als Indikator eines stattgefundenen Klassenwechsels bestimmt. Um sicherzustellen, dass es sich bei den untersuchten B-Lymphozyten aus dem peripheren Blut nicht vereinzelt um Keimzentrums-B Zellen handelt, wurde die Expression des Enzyms Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID) als Keimzentrums-Marker analysiert.

Eine Unterteilung der Gedächtnis B Zellen anhand des CD5 Antigens erlaubt eine separate Analyse der CD5⁺ Subpopulation.

Neben dem Vergleich von o-JIA und gesunden B Zellen sollte weiterhin getestet werden, ob auffällige Unterschiede eher Ausdruck einer allgemeinen Entzündungsreaktion sind oder ein krankheits-spezifisches Phänomen der o-JIA darstellen. Hierzu wurden die Zellen eines Kindes mit Pneumonie sowie eines Kindes mit der systemischen Form der JIA untersucht, welche beide klinisch und laborchemisch eine starke Entzündungsaktivität zeigten.

Zusammengefasst sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- I. Weisen Gedächtnis B Zellen von Kindern mit ANA⁺ o-JIA ein auffälliges Muster in ihrer RAG Expression auf?
- II. Spielt die zusätzliche Expression von CD5 eine Rolle in der RAG Expression?
- III. Sind ggf. charakteristische RAG Expressionsmuster spezifisch für die ANA⁺ o-JIA?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Patienten und gesunde Kontrollen

In die vorliegende Studie wurden 3 Patienten mit o-JIA sowie 3 gesunde Kinder in vergleichbarem Alter als Kontrollen eingeschlossen (Mittelwert 4,6 vs. 4,7 Jahre). Weiterhin wurden zur Abgrenzung der o-JIA gegen andere entzündliche Zustände ein Patient mit der Erstdiagnose einer systemischen JIA (s-JIA) und ein Patient mit einer ambulant erworbenen Pneumonie untersucht. Zur Diagnose der JIA wurden die aktuellen Kriterien der ILAR herangezogen [84]. Die Diagnose der Pneumonie wurde aufgrund der klinischen Befunde sowie systemischer Entzündungsparameter gestellt, die gut auf eine antibiotische Therapie ansprachen. Weitere Details u.a. zu Alter, Geschlecht, Klinik, aktueller Medikation und Laborwerten der einzelnen Patienten sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengefasst.

Die drei Kontrollpatienten wiesen zum Untersuchungszeitpunkt keine Zeichen einer Infektion auf und zeigten allesamt keinen Hinweis auf das Vorliegen eines immunologischen oder autoimmunen Leidens. Das Alter betrug 3 (m), 8 (w) und 2 (m) Jahre.

Eine schriftliche Einverständniserklärung der Eltern lag vor. Die Studie wurde gemäß der modifizierten Erklärung von Helsinki durchgeführt und war von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt.

Material und Methoden

	o-JIA #1	o-JIA #2	o-JIA #3	s-JIA	Pneumonie	
Geschlecht	w	m	w	m	m	
Alter (Jahre)	5	3	4	2	4	
Monate seit Erstdiagnose	37 Monate	4 Monate	35 Monate	0 Monate	0 Monate	
Gelenkstatus (Arthritis)	letzter Termin	Remission seit 2 Jahren	Monarthritis rechtes Knie	Knie OSG, USG	-	-
	Aktuell	Remission	Monarthritis rechtes Knie	OSG	floride Polyarthritis	-
	nächster Termin	Remission	Remission	OSG	morgensteif 39°C	-
Medikation	letzter Termin	keine	Naproxen	Naproxen Methotrexat Diclofenac	-	-
	Aktuell	keine	intraartikulär Steroide	Naproxen Methotrexat Mydriatika	(div)	Ampicillin
	nächster Termin	keine	keine	Naproxen Methotrexat	(div)	-
Iridozyklitis	o.p.B.	o.p.B.	+	o.p.B.	n.a.	

Tabelle 4. Klinische Patientendetails zum Zeitpunkt der Blutentnahme (n.u. = nicht untersucht; n.a. = nicht anwendbar; o.p.B. = ohne pathologischen Befund)

	o-JIA #1	o-JIA #2	o-JIA #3	s-JIA	Pneumonie
Leukozyten / µl	6.250	6.100	10.880	13.950	23.300
Neutro/Lympho [%]	38 / 51	43 / 39	64 / 28	71 / 18	79 / 10
Thrombozyten / µl	306.000	349.000	421.000	558.000	353.000
Hb [g/dl]	12,5	11,8	12,8	10,3	11,3
BSG [mm/h]	7	14	20	118	45
CRP [mg/dl]	0	n.u.	0	25,6	1,2
ANA	1:640	1:640	1:2.560	negativ	n.u.
Rheumafaktor	negativ	n.u.	n.u.	IgM neg, IgA pos	n.u.

Tabelle 5. Laborchemische Patientendetails (n.u. = nicht untersucht)

2.2. Materialsammlung und PBMC-Anreicherung

Die venöse Vollblutentnahme erfolgte in der Poliklinik der Kinderklinik der Universität Würzburg. Zur Anreicherung von mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) wurde die heparinisierte Blutprobe zunächst mit NaCl 0,9 % im Verhältnis 1:1 vermischt und anschließend auf einen Ficoll-Hypaque Dichtegradienten (FicoLiteH, Linaris, Wertheim-Bettingen) geschichtet und bei 1.500 x g für 25 min (ohne Bremse) zentrifugiert. Nach Abnehmen der trüben weißlichen Interphase, welche die mononukleären Zellen enthält, wurde diese in 50 ml NaCl 0,9 % aufgenommen und ein weiteres Mal für 10 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml NaCl 0,9 % resuspendiert, auf Eis gelagert und ein Aliquot der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

2.3. B-Lymphozytenpräparation aus der Tonsille

Zur Gewinnung von aktivierten B Zellen aus der Tonsille als Positiv-Kontrolle für die mRNA-Expression des Enzyms Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID) wurde die Tonsille eines gesunden Kindes nach elektiver Tonsillektomie verwendet. Die Indikation hierzu war bei Zustand nach rezidivierenden Tonsillitiden gestellt worden. Die Operation selbst wurde im krankheitsfreien Intervall durchgeführt. Durch Kollagenase Verdauung (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ/USA) des Gewebes für 30 min wurde eine Suspension mononukleärer Zellen erzeugt, welche anschließend durch Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation angereichert und wie oben beschrieben weiterverarbeitet und ausgezählt wurde.

2.4. Färbung der Zellen mit spezifischen konjugierten Antikörpern gegen humane CD-Antigene

Zur Einzelzellsortierung wurden die Zellen direkt nach der Auszählung in FACS-Puffer (RPMI Medium+ 10% FCS) aufgenommen und auf Aliquots von je 50 µl pro Färbe-Ansatz aufgeteilt. Die Zellen wurden mit je 3 µl des spezifischen Antikörpers pro 1×10^6 Zellen für 25 min auf Eis und unter Lichtschutz inkubiert. Im Anschluss folgten zwei

Waschschritte um nicht spezifisch gebundene Antikörpermoleküle zu entfernen. Danach wurden die Zellen in 800 µl FACS Puffer zur Verwendung in der Durchflusszytometrie aufgenommen.

Folgende spezifische Antikörper gegen humane CD-Antigene wurden verwendet: anti-CD19 (Tri-Color konjugiert, Caltag, Burlingame, CA/USA), anti-CD27 (Fluorescein-Isothiocyanat konjugiert, BD Pharmingen, San Diego, CA/USA), anti-CD5 (Phycoerythrin konjugiert, Caltag). Für die Färbung der Tonsillenpopulationen wurde anti-IgD (Fluorescein-Isothiocyanat konjugiert, Caltag) und anti-CD38 (Phycoerythrin konjugiert, BD Pharmingen) angewendet, für die Vorversuche ein anti-CD79b AK (R-Phycoerythrin konjugiert, Caltag), ein anti-CD64 AK (Fluorescein-Isothiocyanat konjugiert, Caltag) sowie ein Biotin gekoppelter anti-IgG AK, an den in einem zweiten Schritt ein PerCP gekoppelter anti-Biotin AK bindet (beide BD Pharmingen). Isotypen mit dem selben Fluoreszenz-Farbstoff dienten als Kontrolle. Die Zellbehältnisse wurden während sämtlicher Arbeitsschritte auf Eis gelagert.

2.5. Einzelzellsortierung der verschiedenen CD5-Populationen von Gedächtnis-B Zellen mit dem Durchflusszytometer

Die Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting, FACS) ermöglicht die quantitative Analyse einzelner Zellen gemäß ihrer spezifischen Oberflächenantigene, welche die jeweilige Zelllinie und Entwicklungsstufe definieren. Das Prinzip beruht auf einer spezifischen Bindung des Antikörpers an das entsprechende Molekül (CD-Antigen) auf der Zelloberfläche. Diese Antikörper sind meist direkt mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt, welcher sich durch einen Laser anregen lässt und anschließend Licht einer gewissen Wellenlänge emittiert (400-700 nm). Die Intensität dieser Fluoreszenz ist somit proportional zur Anzahl der Oberflächenmoleküle auf der untersuchten Zelle. Weiterhin wird für jede Zelle die Größe und Granularität mittels Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC/SSC) ermittelt, wodurch sich die Differenzierbarkeit noch verbessert. Moderne FACS-Geräte vermessen ca. 4000 Zellen pro Sekunde auf bis zu sechs verschiedene Emissionsspektren. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt meist in einem Koordinatensystem, wobei auf jeder Achse eine Wellenlänge aufgetragen ist. Eine Erweiterung dieser Technik besteht in der

Möglichkeit, die Zellen nicht nur zu vermessen, sondern sie anschließend auch nach Gruppen sortiert auszuwerfen und weiter zu untersuchen.

Zur Sortierung der verschiedenen CD5 Subpopulationen peripherer Gedächtnis-B Zellen wurden diese mit einer Dreifachfärbung gegen CD19, CD27 und CD5 wie oben beschrieben angefärbt. Unter Verwendung eines BD FACS Vantage SE[®] Flow Cytometers (Becton Dickinson/USA), welches mit einer BD FACSDiVa[®] Software und einem Einzelzell-Auswurf ausgestattet ist, wurden die zwei Populationen unter Verwendung eines Lymphozytenfensters nach ihrem Verhalten im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC/SSC) sowie aufgrund ihrer spezifischen Oberflächenantigene identifiziert. Anschließend wurden diese als CD19⁺CD27⁺CD5⁺ bzw. CD19⁺CD27⁺CD5⁻ Einzelzellen in jeweils einzelne Vertiefungen einer 96-Loch-PCR Platte sortiert. Die einzelnen Vertiefungen der PCR-Platte waren zuvor mit jeweils 10 µl Lyse-Lösung bestückt worden (Tabelle 6).

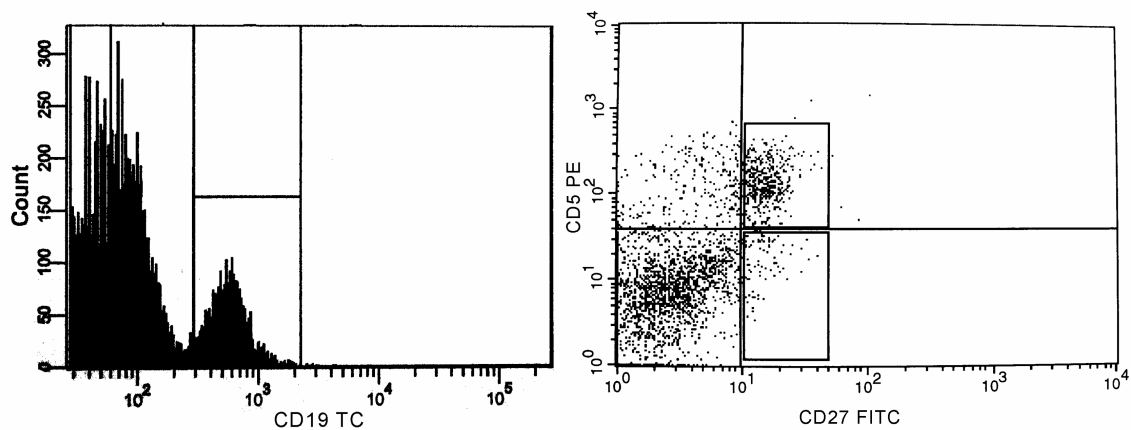


Abbildung 6. Exemplarische Darstellung der FACS Analyse der Oberflächenantigene CD19, CD27 und CD5 zur Identifikation der im Text genannten Subgruppen vor der Einzelzell-Sortierung.

2.6. Einzelzell Reverse Transkriptase-PCR

Um die mRNA Transkripte der Amplifikation durch die konventionelle PCR (Polymerase Kettenreaktion) zugänglich zu machen, erfolgte nun eine Umschreibung in cDNA (complementary/copy DNA) mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT). Hierzu wurden die PCR-Platten mit den sortierten Zellen und der Lyse-Lösung zunächst zentrifugiert und dann für 1 min bei 65°C und 2 min bei 20°C inkubiert. Im nächsten

Schritt wurden je 3 µl des RT-Ansatzes (s. Tabelle 6) hinzugegeben, dieser mit 25 µl Mineralöl überschichtet und die PCR-Platte anschließend nach Zentrifugation für 50 min bei 42°C und 10 min bei 65°C inkubiert, um die reverse Transkription zu ermöglichen. Im letzten Schritt erfolgte die enzymatische Zersetzung der mRNA mittels je 2 µl des Ribonuklease-Ansatzes (Tabelle 6) in einer 20-minütigen Inkubation von 37°C gefolgt von 10 min bei 65°C und anschließender Lagerung bei -72°C bis zur weiteren Verarbeitung.

Auf diese Weise stand nun eine cDNA Bibliothek einzelner, phänotypisch genau definierter B-Lymphozyten zur Verfügung, welche jetzt auf die Expression verschiedener Gene untersucht werden konnte.

Lyse-Lösung	
Molecular Grade Water	4,9 µl
5x First Strand Puffer	2,0 µl
Igepal CA-630	1,0 µl
RNasin RNase Inhibitor 40U/µl	0,3 µl
Deoxynukleotid Mix (dNTPs) 10mM	0,8 µl
Oligo-(dT) ¹²⁻¹⁸	0,1 µl
DTT 0,1M	1,0 µl
Reverse Transkriptase (RT) Ansatz	
Molecular Grade Water	2,0 µl
5x First Strand Puffer	0,6 µl
DTT 0,1M	0,3 µl
RNasin RNase Inhibitor 40U/ µl	0,1 µl
Superscript II RNaseH RT	0,1 µl
Ribonuklease Ansatz	
Molecular Grade Water	1,38 µl
5X First Strand Buffer	0,40 µl
DTT 0,1M	0,20 µl
Ribonuclease H 1000 U/µl	0,02 µl

Tabelle 6. Zusammensetzung der Ansätze zur RT-PCR

2.7. Externe und nested Einzelzell-PCR der cDNA von β -Actin, RAG 1, RAG 2A und 2B, IgG und AID

Die 1983 in die Molekularbiologie eingeführte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) schuf die Möglichkeit, Nukleinsäuren unter Kenntnis ihrer Basensequenz hochspezifisch zu amplifizieren und damit der Detektion zugänglich zu machen. Die nested PCR stellt einen zweiten Schritt dar, welcher nach dem selben Prinzip wie die konventionelle PCR funktioniert. Sie führt zu einer weiteren Vervielfältigung des Reaktionsproduktes aus der konventionellen PCR und sichert zusätzlich die Spezifität der Reaktion durch ein zweites spezifisches Primer-Paar ab. Mit Hilfe der vorangegangenen, auf einem ähnlichen Prinzip fußenden RT-PCR, kann man so für verschiedene Gewebe spezifische mRNA-Expressionsmuster selbst in einer einzelnen Zelle analysieren.

Zur Amplifikation der einzelnen Gene wurden jeweils 1,5 μ l der cDNA für die externe PCR, bzw. 5 μ l der externen PCR für die nested PCR, in eine neue 96-Loch-PCR-Platte überführt und dazu 25 μ l des PCR-Reaktionsansatzes (Tabelle 7) pipettiert. Als Positivkontrolle wurde cDNA aus Tonsillenextrakt mitgeführt. Als Negativkontrollen dienten der PCR-Reaktionsansatz ohne cDNA einerseits und Molecular Grade Water andererseits. Zuletzt wurde jeder Ansatz mit 25 μ l Mineralöl überschichtet und die Platte mit einer Klebefolie abgedeckt, um einen Verlust von Reaktionsansatz zu verhindern. Während der Verarbeitung wurden die Platten kontinuierlich auf Kühlelementen aufbewahrt.

PCR-Reaktionsansatz	
Molecular Grade Water	19,875 μ l
Thermophilic DNA Poly 10x Buffer	2,5 μ l
MgCl ₂ 25mM	1,5 μ l
Deoxynukleotid Mix (dNTPs) 10mM	0,5 μ l
5' Sense Primer 50 mM	0,25 μ l
3' Antisense Primer 50 mM	0,25 μ l
Taq DNA Polymerase in Storage Buffer A 5 U/ μ l	0,125 μ l

Tabelle 7. Ansatz für die externe und nested PCR

Die externe und nested PCR für die Amplifikation von β -Actin, RAG1, RAG2A, RAG2B und IgG begann jeweils mit einem initialen Denaturierungsschritt von 95°C für

1 min, gefolgt von 40 Zyklen von je 1 min bei 94°C, 1 min bei 60°C und 3 min bei 72°C, beendet durch eine finale Elongation bei 72°C für 3 min. Die Amplifikations-Bedingungen für AID waren wie folgt: initial 3 min bei 95°C, 35 Zyklen von je 30 sec bei 94°C, 60 sec bei 60°C (bzw. 58° bei nested PCR), 90 sec bei 72°C, zum Ende dann wiederum 3 min bei 72°C.

Neben jeweils einem spezifischen Primerpaar (sense/antisense) für die externe und nested PCR wurden speziell für die RAG2 Amplifikation zwei verschiedene externe sense-Primer gewählt, um unterschiedliche Splicing-Varianten zu erfassen. Die Basenfolgen der verwendeten sequenzspezifischen Primer sind in Tabelle 8 aufgeführt. Zur Detektion der PCR-Produkte wurde die Blotting-Methode nach Southern verwendet (2.8). Die AID PCR-Produkte wurden in einem Agarose Gel detektiert (2.13).

Primer	Basenabfolge
β-actin extern sense	5`GTCCTCTCCCAAGTCCACACA 3`
β-actin extern antisense	5`CTGGTCTCAAGTCAGTGTACAGGTAA 3`
β-actin nested sense	5`TGATAGCATTGCTTTTCGTGTAA 3`
β-actin nested antisense	5`TACATCTCAAGTTGGGGGACA 3`
RAG 1 extern sense	5`GAGCAAGGTACCTCAGCCAG 3`
RAG 1 extern antisense	5`ACAATGGCTGAGTTGGGAC 3`
RAG 1 nested sense	5`TTCTGCCCCCAGATGAAATTC 3`
RAG 1 nested antisense	5`TGACCATCAGCCTTGTCCAG 3`
RAG 2 extern sense exon 1a	5`GCAGCCCCTCTGGCCTTC 3`
RAG 2 extern sense exon 1b	5`GCGGTCTCCAGACAAAAATC 3`
RAG 2 extern antisense	5`TTTCAGACTCCAAGCTGCCT 3`
RAG 2 nested sense	5`TCTCTGCAGATGGTAACAGTCAG 3`
RAG 2 nested antisense	5`AGCGAAGAGGAGGGAGGTAG 3`
IgG extern sense	5`GCTGCCTGGTCAAGGACTAC 3`
IgG extern antisense	5`CATCACGGAGCATGAGAAGA 3`
IgG nested sense	5`TTCCCCCAAACCCAAGGA 3`
IgG nested antisense	5`CATCACGGAGCATGAGAAGA 3`
AID extern sense	5`GAGGCAAGAAGACACTCTGG 3`
AID extern antisense	5`GCAACTTCCAGGAATGTCAC 3`
AID nested sense	5`TACTTCTGTGAGGACCGCAA 3`
AID nested antisense	5`CATCCTTTTGCCCCTGTATG 3`

Tabelle 8. Basenabfolgen der verwendeten PCR-Primer

2.8. Übertragung der PCR-Produkte auf Membranen durch Vakuum Dot-Blot

Um die Detektion der PCR-Produkte zu ermöglichen, wurde die DNA nun mittels einer Vakuum-Blot-Anlage (BioRad, Hercules, USA) auf eine Nylon Membran (BioRad) überführt. Dieses Verfahren wird nach seinem Entdecker Edwin Southern auch als Southern-Blotting bezeichnet [138]. Zur Denaturierung der DNA wurde zunächst jede der 96 Vertiefungen mit 17 µl 30 mM EDTA und 17 µl 1,2 mM NaOH bestückt. Nach Zentrifugation wurde die gesamte Platte für 10 min bei 100°C inkubiert. Nach Einspannen der befeuchteten Nylonmembran wurden nun je 50 µl des noch heißen Gemisches in die 96 Vertiefungen des Dot-Blot-Gerätes pipettiert. Durch Anlegen eines Vakuums wurde die negativ geladene DNA nun punktförmig auf der positiv geladenen Nylonmembran fixiert. Im Anschluss folgten zwei Waschschrte mit 0,4 M NaOH. Die Membran wurde dann aus dem Gerät entnommen und für 1 min in 2x konzentriertem SSC-Puffer geschwenkt. Anschließend erfolgte die Trocknung der Membran bei 80°C (30 min) in einem Vakuumofen mit nachfolgender Quervernetzung (cross-linking) durch UV-Bestrahlung (Stratalinker 1800, Stratagene, USA). Auf diese Weise war die DNA dauerhaft kovalent auf der Membran fixiert worden, auf welcher nun die spezifische Detektion erfolgen konnte.

2.9. Prinzip des spezifischen Nachweises der PCR-Produkte

Um das Produkt der PCR Reaktionen auf den Membranen sichtbar zu machen, wurde ein mehrstufiges Prinzip angewandt: Zunächst werden zu der Zielsequenz komplementäre Oligonukleotide mit Digoxigenin (DIG) verknüpft und mit der Membran in Verbindung gebracht. Die nun DIG-gekoppelten Membranen werden danach mit einem spezifischen Antikörper gegen DIG inkubiert, welcher wiederum mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) konjugiert ist. Unter Zugabe von CSPD (Disodium 3-(4-methoxy Spiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo(3.3.1.1^{3,7})decan}-4-yl) phenylphosphat) kommt es dann durch enzymatische Dephosphorylierung zur Bildung eines metastabilen Phenolat-Anions, welches zerfällt und dabei Licht einer Wellenlänge von 477 nm emittiert (Chemolumineszenz). Dieses kann nach Entwicklung auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht und analysiert werden. So erhält man nur an

denjenigen Punkten ein Signal, wo sich auf der Membran ein spezifisches Amplifikat befunden hat (Abbildung 7).

2.10. Tailing spezifischer Oligonukleotide mit DIG-dUTP

Die zur Detektion notwendigen spezifischen Oligonukleotide (Tabelle 9) mussten vor ihrer Verwendung noch an Digoxigenin-11-deoxyuridine-triphosphate (DIG-dUTP) gekoppelt werden, um in einem späteren Schritt von einem Antikörper erkannt zu werden. Dies erfolgte durch Inkubation mit dem Enzym Terminale Transferase bei 37°C für 15 min, welches sequenzunabhängig am 3'-Ende des Oligonukleotids einen DNA-Schwanz (Tail) mit DIG-gekoppelten Nucleotiden anhängt. Zum Stoppen des Prozesses wurden der Ansatz auf Eis gestellt und 0,2 M EDTA hinzugefügt.

Ansatz zum Oligonukleotid-Tailing	
Molecular Grade Water	8,0 µl
Oligonukleotid 50 mM	2,0 µl
Reaction Buffer 5x	4,0 µl
CoCl ₂ 25mM	4,0 µl
DIG-dUTP 1mM	0,9 µl
dATP solution 10mM	0,1 µl
Terminale Transferase 50U/µl	1,0 µl

Oligonukleotide	Basenabfolge
β-actin	5`TTGAATGATGAGCCTTCGTG 3`
RAG 1	5`TCTCTGGAGCAATCTCCAGCA 3`
RAG 2	5`TTCCTGGATGTAAAGCAT 3`
IgG	5`GGGTGTACACCTGTGGTTCT 3`
AID	5`ACTTTCAAAGCCTGGGAAGG 3`

Tabelle 9. Ansatz zum Oligonukleotid-tailing und Basenabfolge der verwendeten Oligonukleotide für die Gene β-actin, RAG 1 und 2, IgG sowie AID

2.11. Hybridisierung und Detektion der Amplifikate

Die Hybridisierung der PCR Amplifikate erfolgte in einem dritten, für die Zielsequenz spezifischen Schritt mit Hilfe der markierten Oligonukleotide. Dazu wurden die Membranen zunächst für 6 Stunden bei 50°C mit 40 ml Prähybridisierungslösung

(Tabelle 10) in länglichen Flaschen inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu maskieren. Daran anschließend gab man das DIG-gekoppelte Oligonukleotid in einer Konzentration von 2,5 μM hinzu und ließ diese für 15 Stunden bei 50°C im Hybridisierungssofen laufen. Die Prä- und Hybridisierung erfolgten unter ständiger Rotation, um eine gleichmäßige Verteilung auf der gesamten Membran sicherzustellen. Zwei konsekutive Waschschrte mit 2x SSC-Puffer bei RT für 10 min und 0,5x SSC-Puffer bei 50°C für 30 min beendeten diesen Schritt.

Zur Detektion wurden die Membranen bei RT erst für 1 min in Waschpuffer (0,1M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; 0,3 % Tween 20; pH 7,5) gewaschen und anschließend für 30 min in Blockierungslösung (1x blocking solution, Roche Applied Science, Mannheim; 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5) inkubiert. Schließlich wurde der anti-DIG-AP Antikörper im Verhältnis 1:10.000 hinzugegeben und die Membranen für weitere 30 min bei RT geschwenkt. Nach zweimaligem Waschen für je 15 min mit Waschpuffer und Einstellung des pH-Wertes im Detektionspuffer (0,5 M Tris-HCL; 0,1 M NaCl; pH 9,5) für 5 min, wurde die Membran zusammen mit 1 ml 0,25 mM CSPD in einer Plastikhülle für 10 min bei RT inkubiert. Schließlich wurde das CSPD ausgestrichen, die Folie luftdicht verschweißt und mit einem Röntgenfilm (Lumi-Film, Roche Applied Science, Mannheim) in eine Filmkassette eingelegt.

Prähybridisierungslösung	
Aqua bidestillata	26,60 ml
SSC Puffer 20x	12,00 ml
SDS 20 %	1,00 ml
Geschertes Lachssperma	0,40 ml

Tabelle 10. Prähybridisierungslösung zur Maskierung unspezifischer Bindungsstellen

2.12. Film Entwicklung

Nach einer Expositionszeit von ca. einer Stunde wurden die Filme entwickelt (Abbildung 7). Durch Digitalisierung der Filme (Gel Documentation System, BioRad) waren diese nun einer Software-gestützten Analyse zugänglich (Quantity One, BioRad).

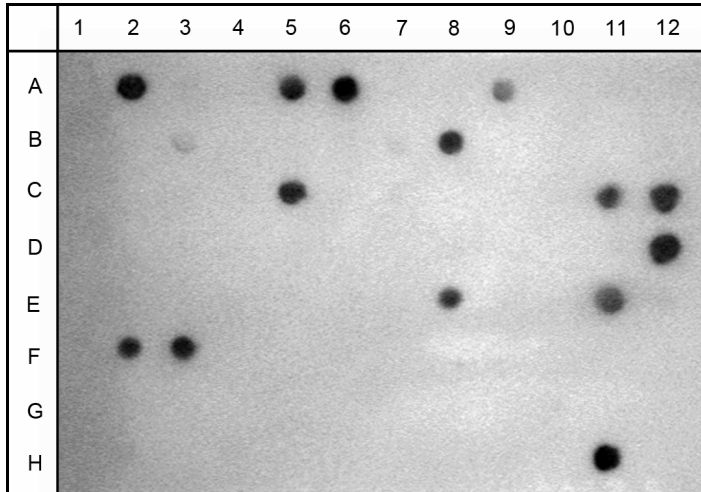


Abbildung 7.

Beispiel einer Dot-Blot
Darstellung der PCR Produkte
für das Gen RAG 2B mittels
Southern Blotting und
sequenzspezifischen
Oligonukleotidsonden
(Positivkontrollen: 12 C + D,
Negativkontrollen: 12 E - H).

2.13. Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel für das Gen AID

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte für das Gen AID wurde ein 1,5 % Agarose Gel in TBE-Puffer gegossen und mit Ethidiumbromid ($C_{21}H_{20}N_3Br$) gefärbt. Prinzip dieses Verfahrens ist die größenabhängige Laufgeschwindigkeit negativ geladener Nucleinsäuren entlang eines Spannungsgradienten im Agarose Gel. Im Anschluss werden die entstehenden Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht. Ursache der entstehenden Fluoreszenz ist dabei die Interkalierung von Ethidiumbromid zwischen die Basen der DNA, wodurch sich dessen Anregungsspektrum verändert. Die entstehende Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Menge der vorhandenen Nucleinsäure.

2.14. Extraktion der PCR-Produkte zur Sequenzierung

Nach der Auftrennung wurden einzelne Banden zur Ermittlung ihrer Basensequenz aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert. Hierzu löst man die ausgeschnittenen Gelquader zunächst unter intermittierendem Vortexen (10 min, 50°C) in 300 µl QG Puffer. Nach Zugabe von 100 µl Isopropanol wird der Ansatz nun durch eine Säule (QIAquick column) zentrifugiert, wodurch die DNA auf einer Silika-Membran gebunden wird. Nach einem Waschschrift wird die DNA durch Zugabe von EB Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) von der Säule eluiert. Zuletzt folgt die Lyophilisierung in einer Vakuumzentrifuge bei 37°C.

2.15. Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzierung wurde durch die Firma MWG-Biotech mit der Methode nach Frederick Sanger durchgeführt. Hierbei wird die Probe mit dem bekannten Primer und vier verschiedenen fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotidtriphosphaten (ddNTP) in einen normalen PCR Ansatz gegeben. Durch die Kombination von ddNTP's und konventionellen dNTP's kommt es während der Elongation an zufälligen Stellen zu Strangabbrüchen, sobald ein ddNTP gebunden wird. Daraus resultieren DNA-Stränge aller verschiedenen Längen, welche jeweils ein ddNTP gebunden haben und somit die gesuchte Base anzeigen. Die Position der Base wird mittels Kapillarelektrophorese der PCR-Produkte dekodiert.

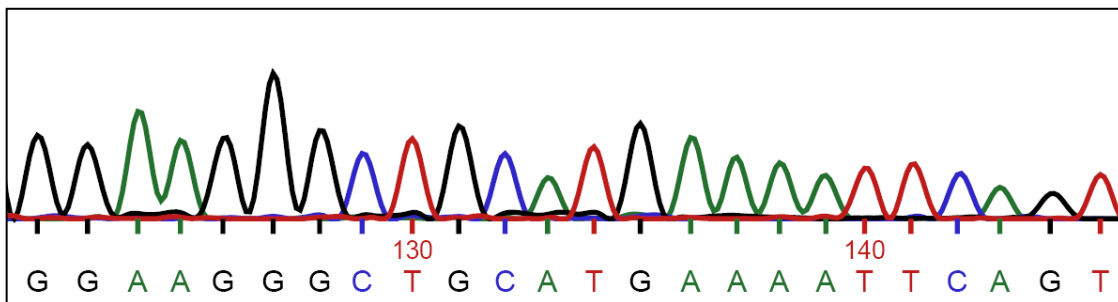


Abbildung 8. Ausschnitt aus den Sequenzierresultaten eines AID PCR-Produktes

2.16. Statistische Auswertung

Zur Auswertung wurden ausschließlich β -Actin positive Zellen herangezogen. Die Anzahl der Einzelzellen, die positiv auf das untersuchte Gen war, ist in Prozent der β -Actin positiven Zellen angegeben. Die Mittelwerte der o-JIA oder der gesunden Gruppe wurden anhand aller Zellen aus einer Gruppe berechnet, statt den Mittelwert der prozentualen Einzelwerte zu ermitteln. Damit wurde sichergestellt, dass jeder Patient nur entsprechend der Anzahl seiner untersuchten Zellen zum Gesamt-Mittelwert beiträgt. Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen wurden mit dem χ^2 -Test und dem Fisher Test ermittelt. Nur p-Werte unter 0,05 wurden als signifikant erachtet, hochsignifikant bezeichnet $p < 0,01$ sowie $p < 0,001$.

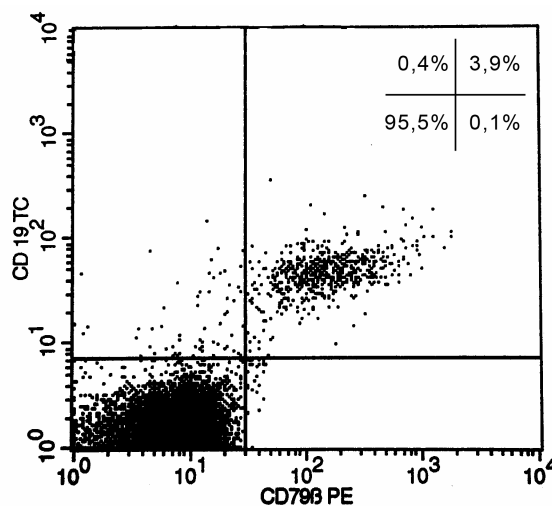
3. ERGEBNISSE

3.1. Vorversuche

3.1.1. Austestung von B Zell Antikörpern: CD19 vs. CD79b

Zunächst sollte ein Marker verwendet werden, der sämtliche B Zellen markiert und so die restlichen Leukozyten außen vor hält. Hierzu wurde ein Antikörper gegen das humane Antigen CD19 sowie ein Antikörper gegen das CD79b Antigen (Ig-beta) getestet. CD19 ist ein Zelloberflächenprotein von ca. 95 kDa, welches in sämtlichen Entwicklungsstufen des B-Lymphozyten außer dem der Plasmazelle exprimiert wird. CD79b stellt einen nicht-kovalent gebundenen Bestandteil des BCR dar, welcher auf jeder B Zelle exprimiert wird, die einen BCR trägt. Somit sind bei beiden Varianten die Gedächtnis B Zellen mit eingeschlossen.

Im direkten Vergleich an mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) unter Vorschaltung eines Lymphozyten-Fensters ergab sich ein nahezu identisches Bindungsverhalten der beiden Antikörper (Abbildung 9). Lediglich eine stärkere Auftrennung fiel bei dem anti-CD79b AK auf. Dies hatte allerdings für die Fragestellung keine Bedeutung. Bei mangelnder Überlegenheit des CD79b AK wurde für die folgenden Experimente der besser etablierte CD19 AK verwendet.



	Hersteller	Konjugiert mit
Anti-CD19	Caltag, Burlingame, CA/USA	Tri-Color
Anti-CD79b	Caltag, Burlingame, CA/USA	R-Phycoerythrin

Abbildung 9. Darstellung des Färbeverhaltens des CD19 AK in Relation zum CD79b AK an gesunden PBMC ohne vorgeschaltetes Lymphozytenfenster sowie deren Spezifikationen.

3.1.2. Austestung eines anti-IgG Antikörpers

Unter Verwendung von Antikörpern gegen die schwere Kette des humanen IgG Moleküls kann man diejenige Population reifer B Zellen markieren, welche bereits einen Klassenwechsel durchlaufen hat und IgG auf der Oberfläche exprimiert. Die Verwendung eines Antikörpers gegen IgG ist allerdings insofern problematisch, dass er nicht nur in der Membran verankertes IgG auf B Zellen erkennt, sondern zusätzlich Zellen der myeloischen Reihe anfärbt, welche einen Fc-Rezeptor besitzen und über diesen Serum-IgG gebunden haben [139]. Dies bestätigte sich auch bei eigenen Versuchen: Hier wurde CD64, der Fc γ -Rezeptor I (Fc γ RI), welcher auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird, in einem Ansatz mit dem Antikörper gegen IgG an mononukleären Zellen des peripheren Bluts untersucht. Wie in Abbildung 10 zu erkennen, gibt es hier eine große Population, die beide Antikörper bindet. Da CD64 allerdings nicht auf B Zellen exprimiert wird, kann man hieraus folgern, dass der anti-IgG AK auch indirekt gebundenes Serum-IgG auf Monozyten und Makrophagen bindet. Daher eignet er sich nur bedingt zur Identifizierung von IgG exprimierenden B Zellen. Aus diesem Grunde wurde entschieden auf die technisch unsichere, phänotypische Identifikation der IgG⁺ B Zellen zu verzichten und diesen Nachweis stattdessen nach der Sortierung auf mRNA-Ebene zu führen.

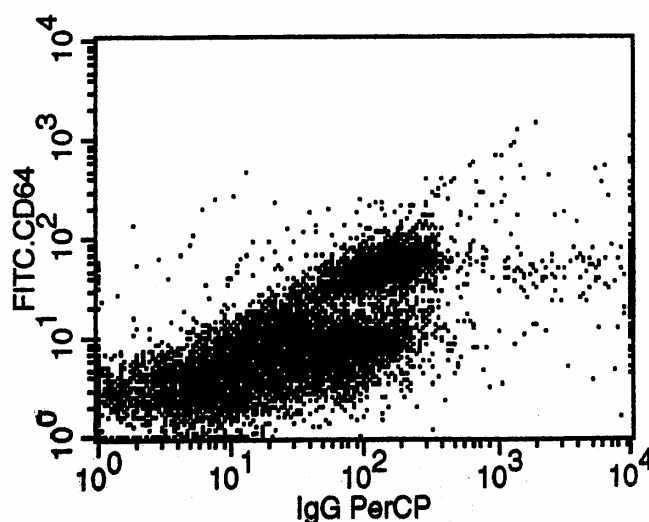


Abbildung 10. Darstellung des Färbeverhaltens des anti-IgG AK in Relation zu dem Makrophagen-Monozyten-Marker CD64 (Fc γ RI) an mononukleären Zellen des peripheren Bluts ohne Vorschaltung eines Lymphozytenfensters.

3.2. Expressionsanalyse der peripheren CD27⁺ B Zellpopulationen auf RAG1, RAG2A, RAG2B, IgG und AID

Zellen des peripheren Bluts von drei gesunden Kindern, drei o-JIA Patienten sowie jeweils einem Patienten mit s-JIA und einem mit Pneumonie wurden als Material verwendet. Nach der durchflusszytometrischen Analyse und Sortierung von je zwei B Zellpopulationen (CD19⁺CD27⁺CD5⁺ und CD19⁺CD27⁺CD5⁻) wurde durch Reverse Transkription eine cDNA Bibliothek erstellt, welche nun zur Einzelzellanalyse der Expression der Gene β -Actin, RAG1, RAG2A und 2B, IgG und AID mittels PCR herangezogen wurde. Außer AID wurden alle PCR-Produkte mittels der erläuterten Southern-Blot Technik detektiert, AID selbst im Agarose-Gel. Die zwei Splicevarianten RAG2A und RAG2B des gemeinsamen Gens RAG2 sind im Folgenden nicht aufgeschlüsselt dargestellt, da sie keine funktionelle Relevanz besitzen. Im Folgenden werden die für ein gegebenes Gen positiven Zellen jeweils als prozentualer Anteil aller β -Actin positiven Zellen angegeben. Im Falle von mehreren untersuchten Individuen einer Gruppe stellen die angegebenen prozentualen Werte jeweils den rechnerischen Mittelwert aller Zellen dar. In Klammern ist die interindividuelle Range innerhalb der Gruppe angegeben.

	Kontrollen	o-JIA			s-JIA	Pneumonie
		# 1	# 2	# 3		
CD19+CD27+CD5+	n= 226	n= 89	n= 76	n= 19	n= 51	n= 85
RAG1 (n)	24	12	18	3	19	40
RAG2 (n)	65	6	5	1	21	14
RAG1 + 2 (n)	3	1	3	0	2	3
IgG (n)	19	6	6	4	6	78
CD19+CD27+CD5-	n= 183	n= 87	n= 87	n= 10	n= 75	n= 75
RAG1 (n)	29	24	16	1	44	24
RAG2 (n)	52	16	6	0	11	23
RAG1 + 2 (n)	9	0	0	0	1	4
IgG (n)	43	32	32	2	31	48

Tabelle 11. Expression der Gene RAG1, RAG2 und IgG auf Einzelzellebene für die verschiedenen untersuchten Individuen sowie die drei o-JIA Patienten. Die angegebenen Zahlen stehen für die Anzahl von allen β -Actin positiven Zellen, die mRNA für das angegebene Gen exprimieren.

3.3. Analyse der CD27⁺CD5⁺ B Zellpopulation

Zur Untersuchung der CD27⁺CD5⁺ B-Zellpopulation wurden insgesamt 184 β -actin positive B-Lymphozyten von 3 verschiedenen o-JIA Patienten herangezogen (n = 89, 76, 19). Von 3 gesunden Kindern, die als Kontrolle fungierten, gingen 226 Zellen in die Analyse ein (n = 86, 65, 75). Zudem wurden von einem Patienten mit der systemischen Form der Juvenilen Idiopathischen Arthritis (s-JIA) 51 B Zellen untersucht, sowie 85 Zellen eines Kindes mit Pneumonie als Entzündungskontrolle nicht-autoimmuner Genese.

3.3.1. Vergleich der RAG1 Expression

Bei den drei o-JIA Patienten ließen sich im Mittel in 17,9 % (13-24 %) der B Zellen mRNA-Transkripte des RAG1 Gens nachweisen. In B Zellen von gesunden Probanden fand sich RAG1 dagegen mit 10,6 % (6-16 %) statistisch signifikant seltener ($p < 0,05$). Deutlich höhere RAG1 Expressionsfrequenzen fanden sich bei den Patienten mit s-JIA (37,3 %) und Pneumonie (47,1 %), womit sie sich ebenfalls hochsignifikant von der o-JIA Gruppe unterscheiden (p jeweils $< 0,01$; Abbildung 11).

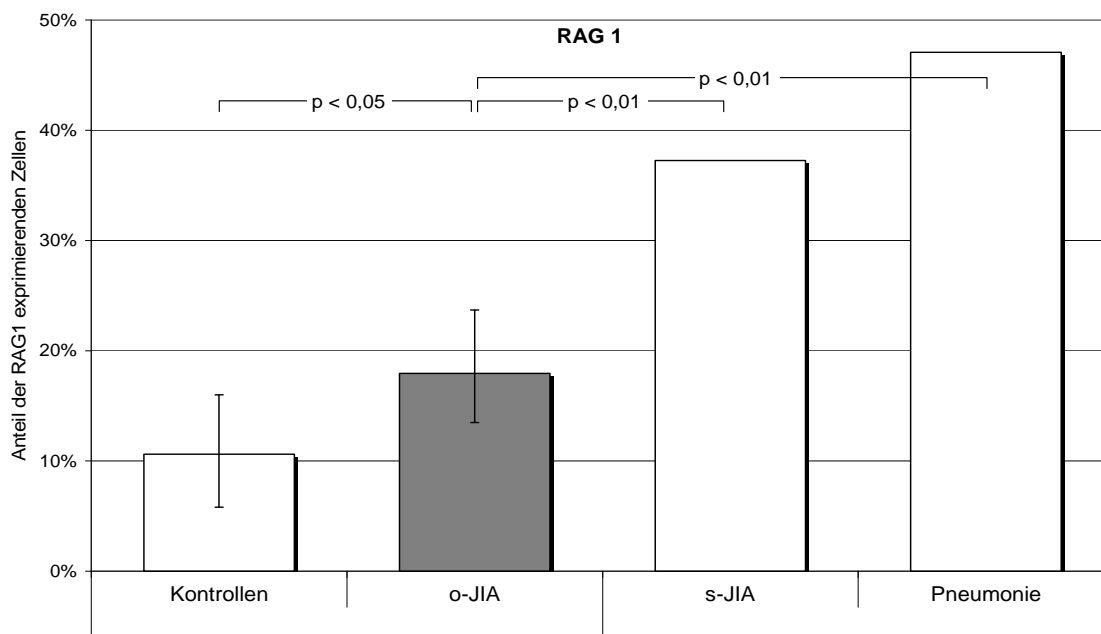


Abbildung 11. Anteil CD27⁺CD5⁺ Gedächtnis B Zellen, die RAG1 mRNA exprimieren. Darstellung als prozentualer Mittelwert aller β -Actin positiven Zellen. Vertikale Linien repräsentieren die interindividuelle Streubreite innerhalb einer Gruppe.

3.3.2. Vergleich der RAG2 Expression

Die Analyse der Expressionsdaten von RAG2 ergab eine erhebliche Differenz zwischen den o-JIA Patienten mit lediglich 6,5 % (5-7 %) und den Gesunden mit 28,8 % (16-48 %). Dieser Unterschied war statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$). Besonders fiel hierbei die geringe interindividuelle Schwankung zwischen den drei o-JIA Patienten auf (6,7 % ; 6,6 % ; 5,3 %).

Für die s-JIA und die Pneumonie zeigte sich mit 41,2 % und 16,5 % ein inhomogenes Bild, wobei beide signifikant höhere Werte zeigten als bei der o-JIA ($p < 0,001$ bzw. $< 0,05$; Abbildung 12).

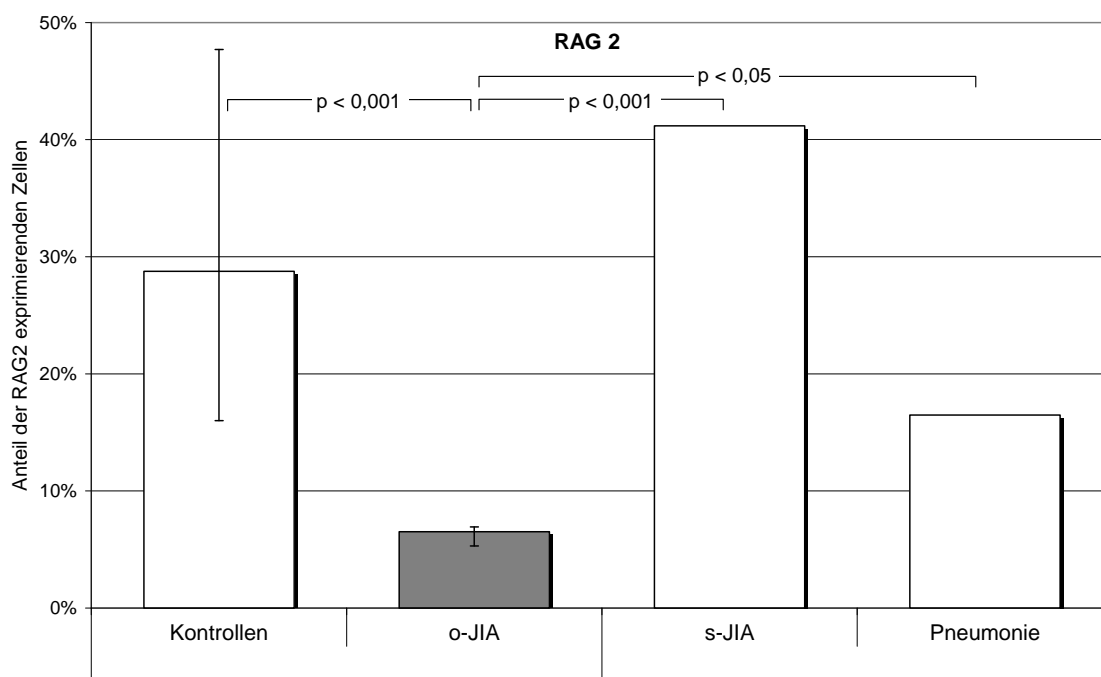


Abbildung 12. Anteil $CD27^+CD5^+$ Gedächtnis B Zellen, die RAG2 mRNA exprimieren. Darstellung als prozentualer Mittelwert aller β -Actin positiven Zellen. Vertikale Linien repräsentieren die interindividuelle Streubreite innerhalb einer Gruppe.

3.3.3. Unkoordinierte und koordinierte RAG Expression

Der Begriff der unkoordinierten RAG-Expression bezeichnet hier die Gesamtheit der Zellen, welche entweder nur RAG1 oder nur RAG2 exprimieren. Diese steht im Kontrast zur koordinierten RAG Expression (RAG1+RAG2), die den Anteil der Zellen repräsentiert, in welchen simultan mRNA beider RAG Gene nachweisbar war. Von

funktioneller Relevanz ist die koordinierte Expression, da für den Rekombinationsprozess beide Proteine gleichzeitig vorliegen müssen, um das aktive Enzym zu bilden [25, 26]. Bislang ist keine Funktion für das isolierte Vorliegen nur eines RAG Proteins beschrieben.

In der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich in 36,7 % (27-59 %) der B Zellen eine unkoordinierte und nur in 1,3 % (0-3 %) eine koordinierte RAG-Expression. Im Gegensatz dazu fand sich in den o-JIA Proben eine unkoordinierte Expression mit 20,1 % aller Zellen signifikant seltener ($p < 0,001$), was zum größten Teil auf die geringe RAG2 Expression zurückzuführen ist. Beide RAG Gene in einer Zelle ließen sich hier in 2,2 % (0-4 %) der $CD27^+CD5^+$ B Zellen nachweisen. Dieser Unterschied erreichte gegenüber den Gesunden keine Signifikanz (Abbildung 13).

Im Falle der s-JIA und der Pneumonie fand sich eine unkoordinierte RAG Expression in 70,6 % und 56,5 %. Koordinierte RAG Transkripte konnten in 3,9 % (s-JIA) und 3,5 % (Pneumonie) dieser B Zellpopulation detektiert werden (nicht signifikant gegenüber o-JIA).

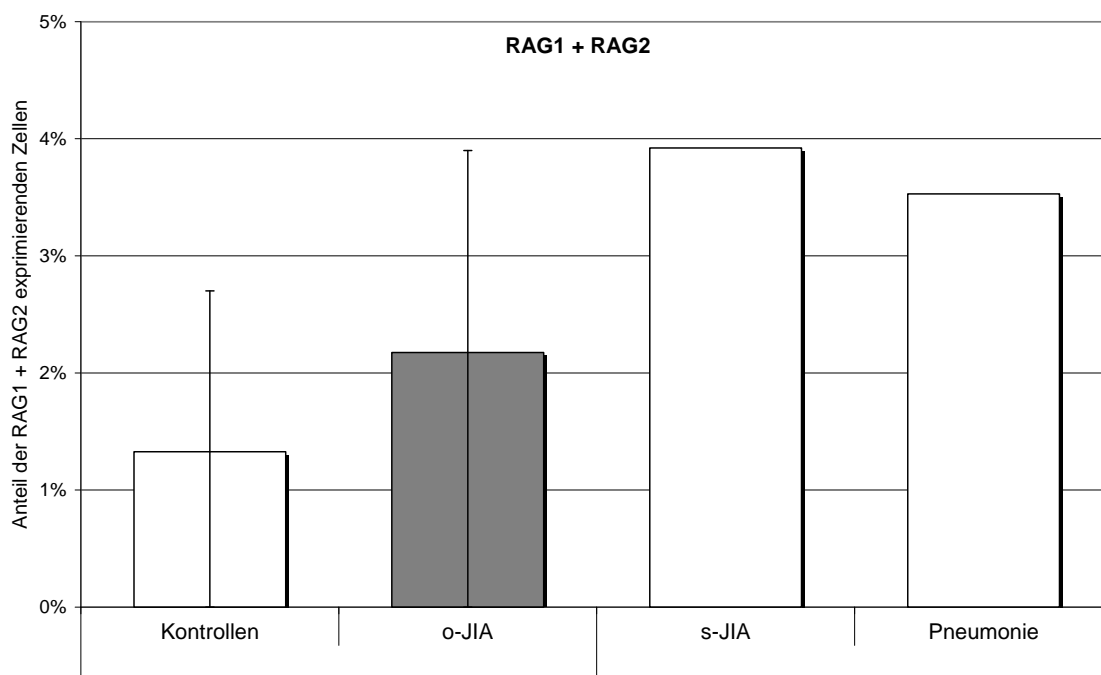


Abbildung 13. Anteil $CD27^+CD5^+$ Gedächtnis B Zellen, die RAG1 und RAG2 mRNA exprimieren. Darstellung als prozentualer Mittelwert aller β -Actin positiven Zellen. Vertikale Linien repräsentieren die interindividuelle Streubreite innerhalb einer Gruppe.

3.3.4. Ko-Expression von IgG und RAG

Die Expression von IgG kennzeichnet solche B Zellen, die bereits einen Klassenwechsel (CSR) durchlaufen haben. Die Häufigkeit der Transkription von IgG-mRNA in den CD27⁺CD5⁺ Populationen zeigte mit 8,4 % (2-12 %) bei Gesunden und 8,7 % (7-21 %) bei der o-JIA keine auffälligen Unterschiede (Abbildung 14). Bei der Korrelation der IgG-Daten mit denen der RAG Expression fanden sich in dieser Gruppe ebenfalls keine signifikanten Differenzen (Tabelle 12).

Im Falle der s-JIA waren 11,8 % der Zellen positiv für IgG-mRNA. Bei der Pneumonie dagegen fanden sich extrem hohe 91,8 % und damit ein hoch signifikantes Differenzniveau gegenüber der o-JIA Gruppe ($p < 0,001$). Die Analyse der Co-Expression von IgG, RAG1 und RAG2 zeigte, dass die koordinierte RAG Expression bei der Pneumonie mehrheitlich mit der IgG Expression assoziiert ist (Tabelle 12).

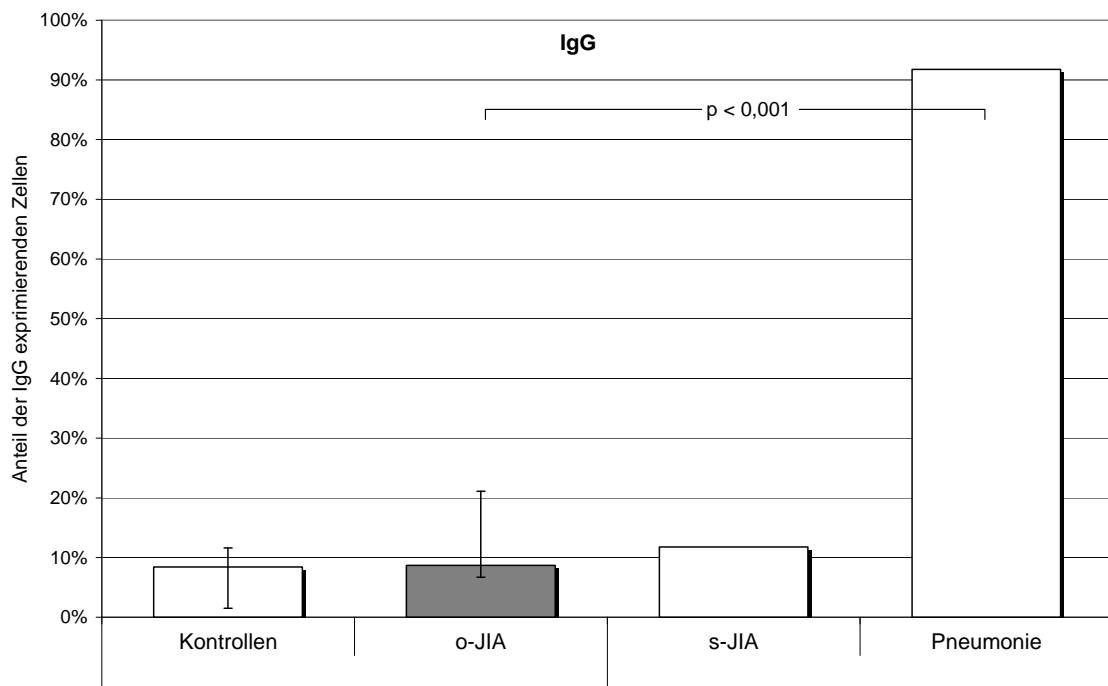


Abbildung 14. Anteil CD27⁺CD5⁺ Gedächtnis B Zellen, die IgG mRNA exprimieren. Darstellung als prozentualer Mittelwert aller β -Actin positiven Zellen. Vertikale Linien repräsentieren die interindividuelle Streubreite innerhalb einer Gruppe.

Ergebnisse

	Kontrollen		o-JIA		s-JIA		Pneumonie	
	IgG +	IgG -	IgG +	IgG -	IgG +	IgG -	IgG +	IgG -
CD19⁺CD27⁺CD5⁺	n= 19	n= 207	n= 16	n= 168	n= 6	N= 45	n= 78	n= 7
RAG1 (%)	11	11	13	18	50	36	46	57
RAG2 (%)	32	29	0	7	17	44	17	14
RAG1 + 2 (%)	0	1	0	2	17	2	4	0
CD19⁺CD27⁺CD5⁻	n= 43	n= 140	n= 66	n= 118	n= 31	N= 44	n= 48	n= 27
RAG1 (%)	30*	11*	23	22	67	52	31	33
RAG2 (%)	33	27	14	11	3**	23**	38	19
RAG1 + 2 (%)	9	4	0	0	0	2	8	0

Tabelle 12. RAG Expressionsdaten getrennt für die IgG⁺ und IgG⁻ Subpopulationen (* p<0,01; ** p<0,05)

3.4. Analyse der CD27⁺CD5⁻ B Zellpopulation

Von der CD27⁺CD5⁻ B-Zell-Population gingen insgesamt 183 Zellen von drei gesunden Kontrollen (n = 69, 62, 52) sowie 184 Zellen von drei o-JIA Patienten (n = 87, 87, 10) in die Analyse ein. Weiterhin wurden jeweils 75 Zellen von einem s-JIA Patienten und einem Kind mit Pneumonie bezüglich Ihrer Genexpression betrachtet.

3.4.1. Vergleich der RAG1 Expression

Die Resultate der RAG1 Expression in der CD27⁺CD5⁻ Population entsprachen mit 15,8 % (5-23 %) bei Gesunden und 22,3 % (10-28 %) für die Oligoarthritis in ihrem Trend der CD5⁺ Population. Dennoch erreichte der hier vorhandene Unterschied keine statistische Signifikanz (Abbildung 15).

Für die s-JIA fand sich mit 58,7 % wiederum ein signifikant höherer Wert als bei dem o-JIA Kollektiv (p<0,001). Bei der Pneumonie (32,0 %) zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

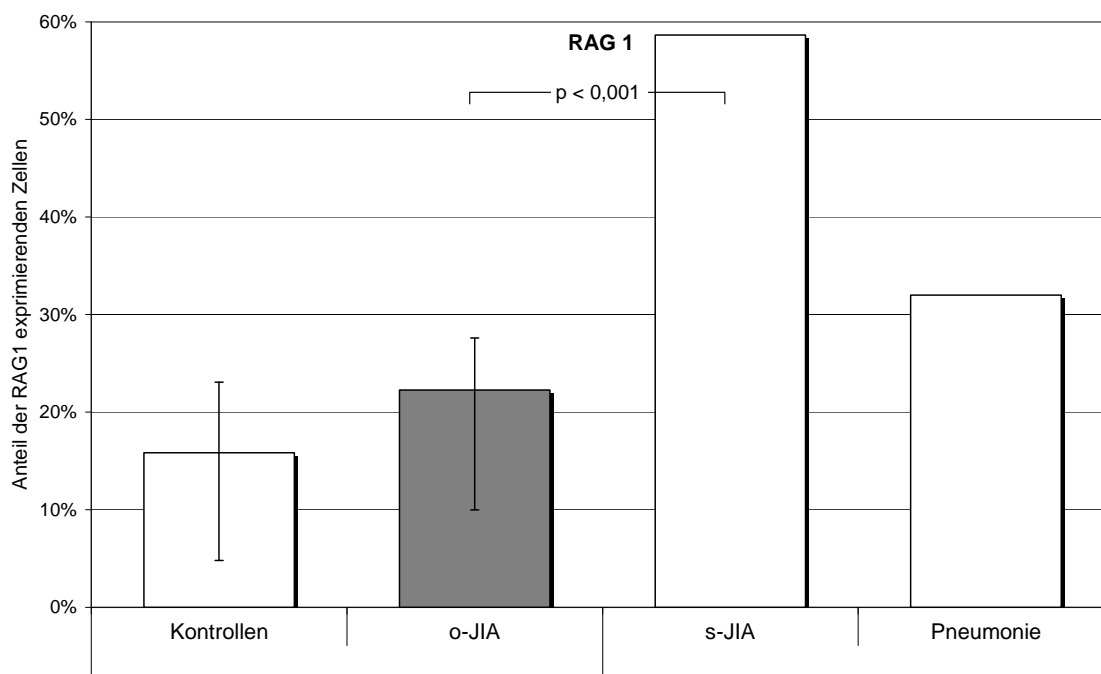


Abbildung 15. Anteil CD27⁺CD5⁻ Gedächtnis B Zellen, die RAG1 mRNA exprimieren. Darstellung als prozentualer Mittelwert aller β -Actin positiven Zellen. Vertikale Linien repräsentieren die interindividuelle Streubreite innerhalb einer Gruppe.

3.4.2. Vergleich der RAG2 Expression

Ebenfalls vergleichbar zu der CD5⁺ Population verhalten sich die Ergebnisse der RAG2 Expression. Auch hier lagen die Kontrollen mit 28,4 % RAG2-positiver Zellen (22-35 %) weit über den 12,0 % (0-18 %) bei den o-JIA Patienten. Diese Differenz war statistisch ebenso hochsignifikant ($p < 0,001$; Abbildung 16).

Die systemische Form der JIA zeigte wie die o-JIA eine sehr geringe Häufigkeit von RAG2 (14,7 %), während die Pneumonie mit 30,7 % den Gesunden vergleichbare Werte erreichte (Differenz zu o-JIA $p < 0,001$).

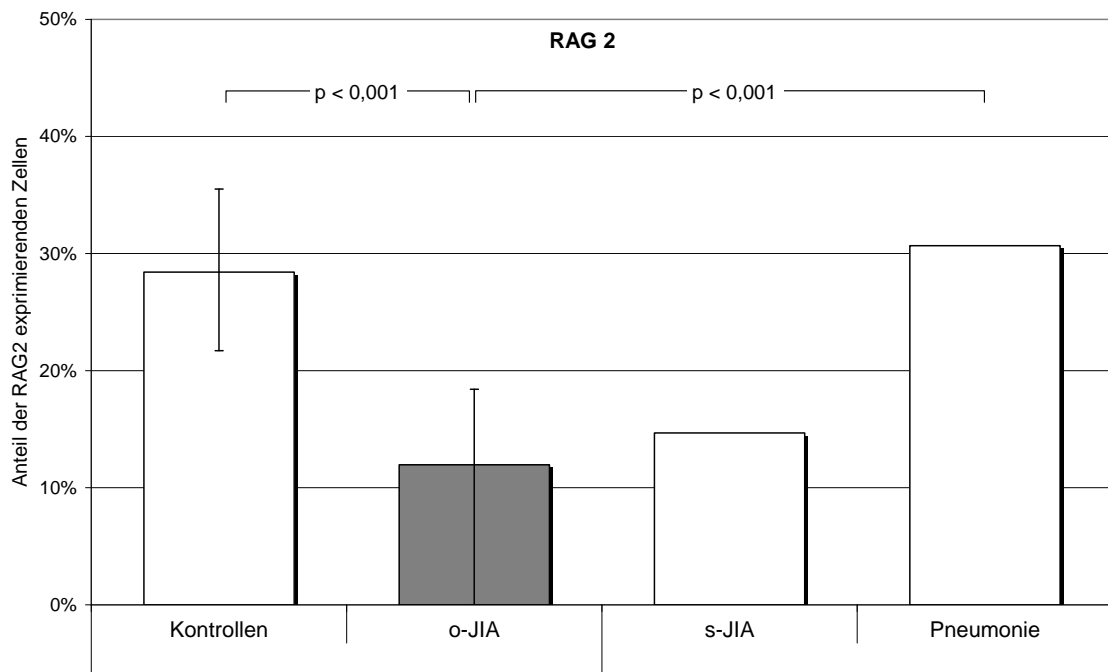
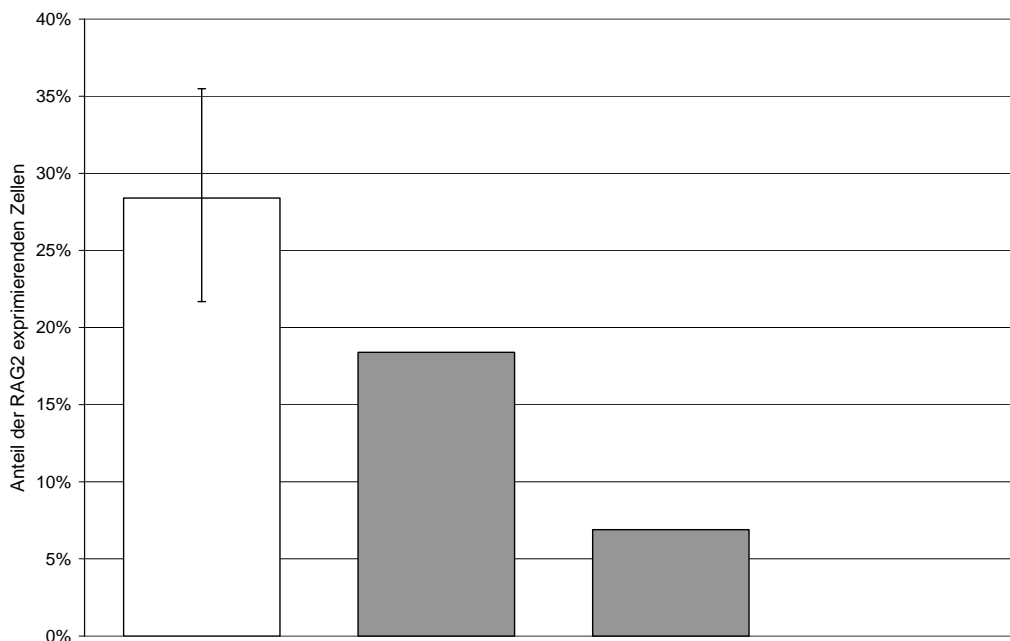


Abbildung 16. Anteil CD27⁺CD5⁻ Gedächtnis B Zellen, die RAG2 mRNA exprimieren. Darstellung als prozentualer Mittelwert aller β -Actin positiven Zellen. Vertikale Linien repräsentieren die interindividuelle Streubreite innerhalb einer Gruppe.

Bei Betrachtung der einzelnen o-JIA Patienten fiel für die RAG2 Expression eine Degression auf, die invers mit Parametern der Krankheitsaktivität und der Medikation korrelierte (Tabelle 13).



	Kontrollen	o-JIA #1	o-JIA #2	o-JIA#3
Alter [Jahre]	4,7 J.	5 J.	3 J.	4 J.
betroffene Gelenke	-	0	1	1
BSG* [mm/h]	n.b.	7	14	20
ANA**	n.b.	1:640	1:640	1:2.560
Medikation	-	-	+	++

* Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit

** Anti-Nukleäre Antikörper

Tabelle 13. Inverse Korrelation der RAG2 Expression mit Parametern der Krankheitsaktivität und der Medikation bei CD27⁺CD5⁻ Gedächtnis B Zellen von gesunden Kontrollen (Mittelwert mit Range) und drei o-JIA Patienten (n.b.=nicht bestimmt).

3.4.3. Unkoordinierte und koordinierte RAG Expression

Deutliche Unterschiede fanden sich in dieser Population in der koordinierten RAG Expression: Während sowohl bei den Gesunden als auch bei den o-JIA Patienten 34,4 % (28-40 %) bzw. 34,2 % (10-46 %) aller Zellen nur eines der beiden RAG-Gene exprimierten, fand sich eine simultane Co-Expression beider Gene zwar in 4,9 % (0-8 %) der gesunden B-Lymphozyten, jedoch in keiner der 184 untersuchten o-JIA B Zellen. Dieser Unterschied in der koordinierten Expression war statistisch klar signifikant ($p < 0,01$; Abbildung 17). Dabei waren die Einzelwerte bei den drei gesunden Kindern 7,2; 0,0 und 7,8 %, so dass bei zwei Drittel eine solide Expression vorliegt.

Interessanterweise fanden sich für die unkoordinierte Expression bei der s-JIA und der Pneumonie fast identische Werte wie in der entsprechenden CD5⁺ Population (70,7 und 52,0 %). Die koordinierte Expression jedoch war bei dem systemischen JIA-Subtyp mit 1,3 % wie bei der o-JIA deutlich supprimiert. Für die Pneumonie fand sich mit 5,3 % ein signifikant höherer Wert gegenüber der o-JIA ($p < 0,01$).

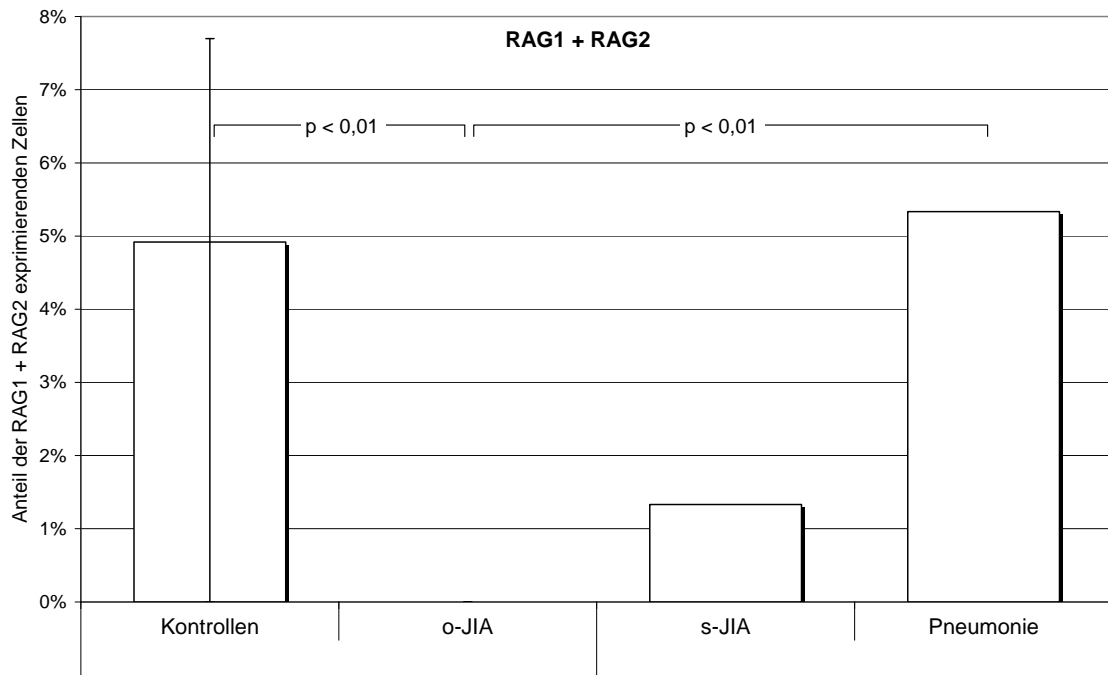


Abbildung 17. Anteil CD27⁺CD5⁻ Gedächtnis B Zellen, die RAG1 und RAG2 mRNA exprimieren. Darstellung als prozentualer Mittelwert aller β -Actin positiven Zellen. Vertikale Linien repräsentieren die interindividuelle Streubreite innerhalb einer Gruppe.

3.4.4. Ko-Expression von IgG und RAG

Unter allen CD27⁺CD5⁻ o-JIA B-Lymphozyten fanden sich mit 35,9 % (20-37 %) signifikant mehr IgG exprimierende Zellen als in der gesunden Kontrollgruppe mit 23,5 % (18-31 %; $p < 0,01$). Noch deutlich häufiger fanden sich IgG-Transkripte im Falle der s-JIA mit 41,3 %. Bei der Pneumonie (64,0 %) war der Unterschied im Vergleich mit der o-JIA signifikant ($p < 0,01$; Abbildung 18).

Die Expression von RAG-Genen wies zwischen den IgG positiven und IgG negativen o-JIA Subpopulationen keine wesentlichen Unterschiede auf. Unter den gesunden Kontrollen allerdings zeigte sich in der IgG positiven Subpopulation ($n = 43$) eine

deutlich erhöhte Ko-Expressionsrate speziell von RAG1, welche dort 30 % ausmachte, im Gegensatz zur IgG negativen Gruppe (n = 140) mit lediglich 11 % (p<0,01). In der koordinierten RAG-Expression fanden sich ebenfalls Unterschiede zu Gunsten der IgG positiven Population mit 9 % vs. 4 % in der IgG negativen Gruppe. Dieselbe Tendenz ließ sich bei dem Pneumonie-Patienten für die koordinierte RAG Expression nachvollziehen (8 % vs. 0 %). Im Falle der s-JIA war die Expression von RAG2 in IgG positiven Zellen signifikant seltener als in IgG negativen (3 % vs. 23 %; p<0,05; Tabelle 12).

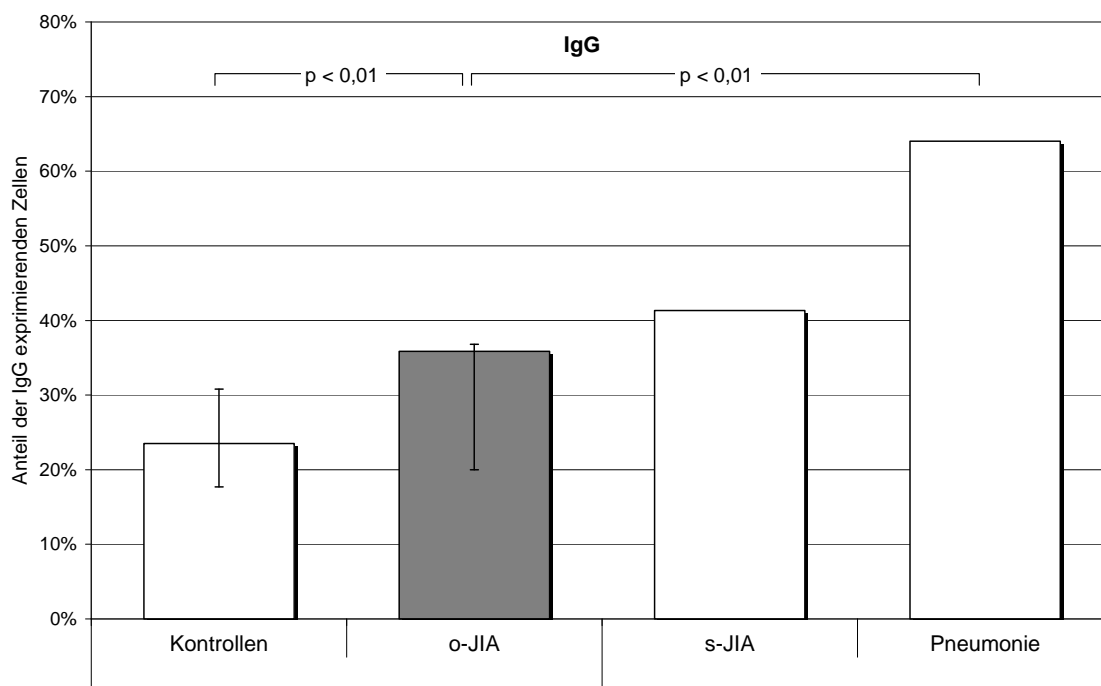


Abbildung 18. Anteil CD27⁺CD5⁻ Gedächtnis B Zellen, die IgG mRNA exprimieren. Darstellung als prozentualer Mittelwert aller β -Actin positiven Zellen. Vertikale Linien repräsentieren die interindividuelle Streubreite innerhalb einer Gruppe.

Betrachtet man lediglich die IgG positiven CD5⁻ Gedächtnis B Zellen bezüglich ihrer RAG1+RAG2 Expression, zeigt sich der Unterschied zwischen o-JIA (0 %) und Gesunden (9,3 %; p<0,05) noch deutlicher. Interessanterweise findet sich unter den IgG positiven CD5⁻ B Zellen der s-JIA ebenfalls keine koordinierte RAG Expression (0 %). Dagegen weist die Pneumonie mit 8,3 % einen den Gesunden vergleichbaren Wert auf (Abbildung 19 b). Eine ähnliche Akzentuierung ergibt sich auch für die Differenzen in der RAG2 Expression, wenn isoliert die IgG positiven CD5⁻ Gedächtnis B Zellen betrachtet werden (Abbildung 19 a).

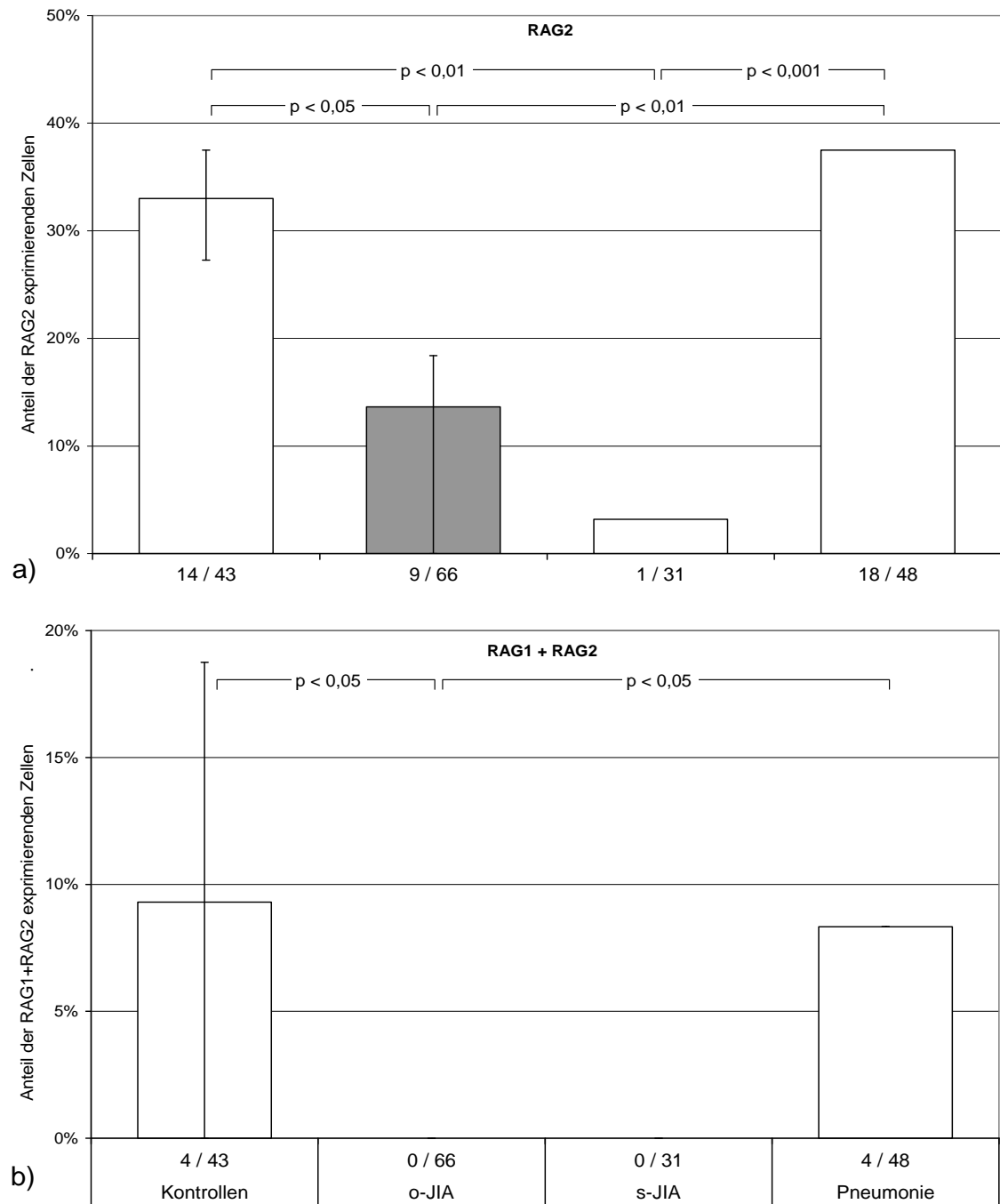


Abbildung 19 a + b. Anteil IgG-positiver, CD27⁺CD5⁻ Gedächtnis B Zellen, die (a) RAG2 bzw. (b) RAG1+RAG2 mRNA exprimieren. Darstellung als prozentualer Mittelwert aller β -Actin positiven Zellen. Vertikale Linien repräsentieren die interindividuelle Streubreite innerhalb einer Gruppe. Auf der x-Achse ist zusätzlich die absolute Anzahl positiver Zellen angegeben.

3.5. Vergleich der CD5⁺ und CD5⁻ Populationen

In diesem Abschnitt werden keine neuen Daten hinzugezogen. Es sollen lediglich wichtige Unterschiede bezüglich der Expression der untersuchten Gene zwischen den

zwei untersuchten CD5 Populationen innerhalb einer Patientengruppe herausgearbeitet werden. Deshalb werden nicht alle Zahlenwerte erneut genannt. Hierzu sei auf die Abschnitte 3.3 und 3.4 sowie auf die entsprechenden Graphen und Tabellen verwiesen.

3.5.1. Unterschiede zwischen den CD5 Fraktionen bei o-JIA Patienten

Sowohl in der isolierten Betrachtung von RAG1 als auch von RAG2 finden sich für die CD5⁻ Zellen jeweils höhere Werte als für die CD5⁺, wobei der Unterschied in beiden Fällen statistisch nicht signifikant ist. Auffällig ist die sehr geringe interindividuelle Streuung der RAG2-exprimierenden Zellen innerhalb der CD5⁺ Population (Abbildung 12). In der CD5⁻ Gruppe fand sich dagegen eine ausgesprochene Heterogenität in der Frequenz der RAG2 exprimierenden B-Lymphozyten, welche invers mit der Krankheitsaktivität korreliert war (Tabelle 13).

Während die unkoordinierte Expression (RAG1 oder RAG2) statistisch signifikant häufiger bei den CD5⁻ Zellen auftritt ($p < 0,01$), führt die Untersuchung der koordinierten Expression beider RAG Gene zu einem entgegengesetzten Resultat. Dort findet sich in der CD5⁻ Population, trotz hoher Einzel-Genraten, keine doppelt RAG positive B Zelle – statistisch signifikant unterschiedlich zu der CD5⁺ Gruppe mit 2,2 % ($p < 0,05$).

Das Auftreten von IgG-mRNA exprimierenden B-Lymphozyten war in der CD5⁻ Subgruppe weitaus häufiger zu beobachten als in der CD5⁺ ($p < 0,001$).

3.5.2. Unterschiede zwischen den CD5 Fraktionen bei Gesunden

Innerhalb der CD19⁺CD27⁺ Population der gesunden Kontrollen fanden sich generell geringere Unterschiede zwischen den verschiedenen CD5 Kompartimenten.

Während die RAG1 Expression in der CD5⁻ Gruppe mit 15,8 % vs. 10,6 % in der CD5⁺ ein etwas häufigeres Ereignis war (statistisch nicht signifikant), zeigte sich bei der RAG2- und bei der unkoordinierten RAG Expression zwischen den beiden CD5 Kompartimenten kein Unterschied. Lediglich in der koordinierten Expression beider RAG Gene heben sich die beiden Populationen mit 4,9 % (CD5⁻) vs. 1,3 % (CD5⁺) deutlich voneinander ab ($p < 0,05$). Eine Expression von IgG fand sich ebenfalls deutlich häufiger in der CD5⁻ Subgruppe als in der CD5⁺ ($p < 0,001$).

3.6. Expression des Enzyms Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID)

Das Enzym Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID) stellt eine wesentliche Voraussetzung für den Prozess der Somatischen Hypermutation (SHM) und des Klassenwechsels (CSR) dar [37, 38]. Beide Ereignisse laufen im Keimzentrum ab. Um auszuschließen, dass es sich bei den nachgewiesenen RAG exprimierenden Zellen aus dem peripheren Blut vereinzelt um Keimzentrums B Zellen handelt, wurde das CD5⁺ und CD5⁻ B-Zell Kompartiment eines o-JIA Patienten (#2) zusätzlich auf die Expression von AID mRNA untersucht.

Zur Validierung der Technik wurden zunächst definierte B Zell-Populationen aus der Tonsille eines gesunden Kindes nach elektiver Tonsillektomie verwendet.

3.6.1. AID Expression in Tonsillen B Zellen eines gesunden Kindes

Nach Anfärbung mit konjugierten Antikörpern gegen CD19, IgD und CD38 wurden fünf definierte Populationen (Tabelle 14) durchflusszytometrisch sortiert und durch Reverse Transkription cDNA Bibliotheken auf Einzelzellebene erstellt. Diese wurden im Anschluss mittels PCR auf die Expression von AID mRNA untersucht. Eine Sequenzierung einzelner PCR-Produkte bestätigte die korrekte Basenabfolge.

Gruppe	Analysierte		AID Expression	
	B Zellen (n)	Phänotyp	absolut	prozentual
A	80	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD38 ⁻	3 / 80	3,8%
B	75	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD38 ⁺	18 / 75	24,0%
C	76	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD38 ⁺⁺	6 / 76	7,9%
D	62	CD19 ⁺ IgD ⁻ CD38 ⁺⁺	0 / 62	0,0%
E	85	CD19 ⁺ IgD ⁻ CD38 ⁻	0 / 85	0,0%

Tabelle 14. AID Expression in Tonsillen B Zellen. Absolute und prozentuale Angaben jeweils als Anteil an allen β -Actin positiven Zellen.

Hierbei zeigte sich in naiven B Zellen (Gruppe A) mit 3,8 % eine geringe AID Expression. Dagegen fand sich in der Gruppe B der „Germinal Center Founder (GCF)“ Zellen mit 24,0 % ein signifikant höherer Anteil ($p < 0,001$). Gruppe C zeigte nur in 7,9 % eine Expression von AID, was sich wiederum signifikant von Gruppe B

unterschied ($p < 0,01$). In den Gruppen D und E ließen sich keine mRNA-Transkripte des Enzyms nachweisen.

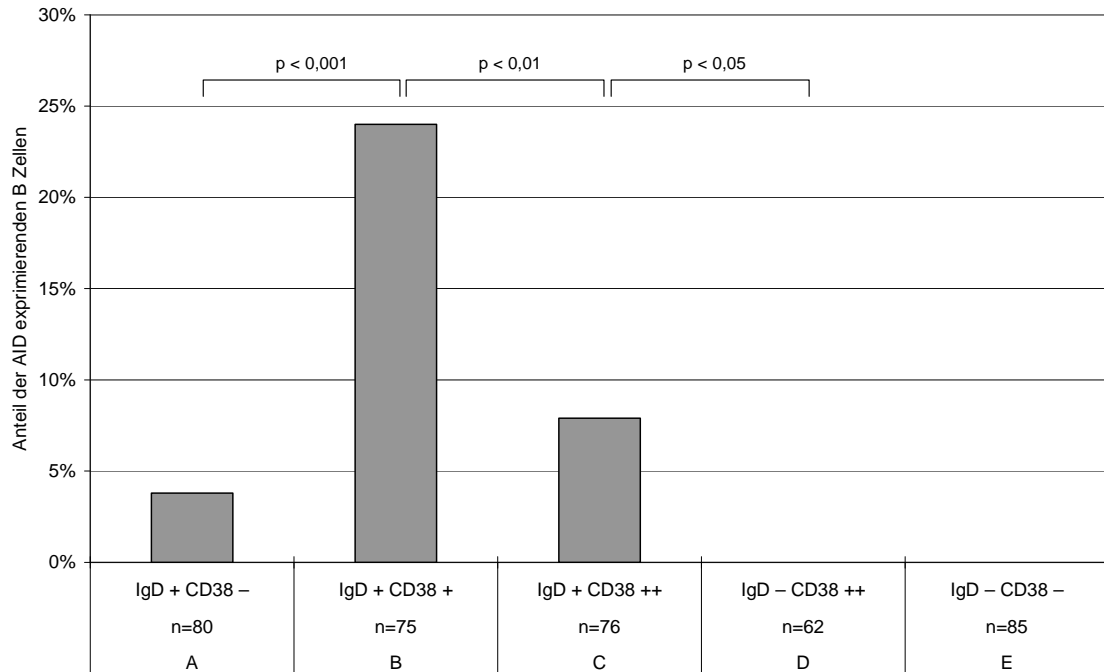


Abbildung 20. Anteil verschiedener B Zellpopulationen aus der Tonsille, die AID mRNA exprimieren. Darstellung der prozentualen Anteile von allen β -Actin positiven Zellen.

3.6.2. AID Expression in peripheren B Zellen des o-JIA Patienten # 2

In den $CD19^+CD27^+$ Zellen des o-JIA Patienten # 2 ließ sich weder in der $CD5^+$, noch in der $CD5^-$ Population eine Expression von AID dokumentieren. In den – in der selben PCR-Platte mitgeführten – Positivkontrollen aus der Tonsille ließen sich dagegen AID Transkripte nachweisen.

4. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden insgesamt 1.063 CD27⁺ Gedächtnis B Zellen von Kindern mit verschiedenen akuten und chronischen entzündlichen Erkrankungen (o-JIA, s-JIA, Pneumonie) sowie von gesunden Kontrollen untersucht. Davon entfielen 546 auf eine CD5⁺ und 517 auf eine CD5⁻ Subpopulation der Gedächtnis B Zellen. Der Focus war hierbei auf die Expression der RAG Gene gerichtet, um festzustellen, ob bei der ANA-positiven o-JIA immunregulatorische Abnormalitäten zu beobachten sind. Weiterhin sollte hinterfragt werden, ob diese Phänomene Ausdruck einer allgemeinen Entzündungsreaktion sind oder spezifisch mit dem autoimmunen Charakter der o-JIA zusammenhängen. Zusätzlich sollte die Relevanz der Koexpression des Oberflächenmoleküls CD5 untersucht werden.

Über die Grenzen der zwei CD5 Populationen hinweg zeigte sich bei der o-JIA ein charakteristisches Muster: eine leicht erhöhte RAG1 Expressionsrate, bei gleichzeitig massiv supprimierter RAG2 Expression im Vergleich zu den gesunden Individuen. Die Auswirkung auf die koordinierte Expression (RAG1+RAG2) allerdings war sehr unterschiedlich. Im CD5⁺ Segment fanden sich bei Gesunden und o-JIA Patienten vergleichbar wenige Zellen mit der Expression beider RAG Gene. Im CD5⁻ Segment dagegen zeigte sich bei Gesunden mit 5 % ein hoher Wert, während in der o-JIA Population keine einzelne Zelle beide Gene koordiniert exprimierte.

Die zwei akut entzündlichen Krankheitsbilder stellten sich uneinheitlicher dar. Im CD5⁺ Segment lagen die Werte für die koordinierte RAG Expression über denen von Gesunden und denen mit o-JIA. Im CD5⁻ Segment dagegen ähnelte die s-JIA stark der o-JIA mit einer geringen RAG2- und einer extrem niedrigen koordinierten RAG Expression. Dabei verhielten sich die B Zellen des Pneumonie-Patienten nahezu identisch zu den Gesunden. Diese Differenzen in der CD5⁻ Fraktion zeigen sich noch akzentuierter in der IgG positiven Subpopulation.

Aus diesen Resultaten ergeben sich folgende Fragen:

- Was für eine Relevanz hat der hohe Anteil unkoordinierter RAG Transkripte?
- Wie ist die wesentlich geringere Frequenz RAG2 positiver Zellen bei o-JIA Patienten im Vergleich zu Gesunden zu bewerten, welche sowohl im CD5⁺ als auch im CD5⁻ Kompartiment auftritt?
- Weshalb sind andererseits bei der koordinierten Expression so unterschiedliche Resultate zwischen den CD5 Subpopulationen der o-JIA Patienten festzustellen?
- Welche Bedeutung hat das Fehlen von RAG1+RAG2 exprimierenden CD27⁺CD5⁻ B-Lymphozyten, welches sich insbesondere in der IgG positiven Subpopulation zeigt, in der Pathogenese der JIA und welche Parallelen existieren zwischen der o-JIA und der s-JIA?

4.1. Was für eine Relevanz hat der hohe Anteil unkoordinierter RAG Transkripte? – RAG Expression in peripheren Gedächtnis B Zellen

Die Expression von RAG Genen in peripheren Gedächtnis B Zellen ist kein seltenes Phänomen. Je nach untersuchter Krankheitsentität ließ sich in dieser Untersuchung in 20 bis 70 % aller B Zellen mRNA von mindestens einem der beiden RAG Gene nachweisen. Das Vorhandensein von beiden RAG Transkripten in einer Zelle war dagegen mit 0 bis 5 % weitaus seltener. Diese Erkenntnis steht im Kontrast zu der Annahme, dass die beiden RAG Gene physiologisch ausschließlich koordiniert reguliert und transkribiert werden [140]. Allerdings liegen insbesondere aus Einzelzellanalysen vergleichbare Daten über einen erheblichen Anteil unkoordinierter RAG Expression in der Literatur vor [49, 53].

Bei der Analyse der Einzelzelldaten muss indes berücksichtigt werden, dass sehr geringe Quantitäten von mRNA Transkripten unter Umständen nicht erfasst werden. Dennoch ließen sich die hier erhobenen Unterschiede zwischen den Gruppen nicht hinreichend mit methodischen Mängeln der PCR für ein bestimmtes Gen erklären, da in manchen Entitäten RAG1, in anderen dagegen RAG2 überrepräsentiert war. Es wäre lediglich denkbar, dass in einigen Zellen extrem geringe mRNA Mengen von einem der RAG Gene der Detektion entgingen. Diese wären dann als falsch negativ bezüglich der koordinierten RAG Expression zu bewerten. Dabei bliebe allerdings weiterhin die Frage

offen, weshalb eines der beiden Gene derartig „relativ“ überexprimiert wird, während in anderen Fällen eine umgekehrte Relation auftritt. Somit erscheint ein methodischer Fehler unwahrscheinlich.

In Übereinstimmung mit der Theorie der ausschließlich koordinierten Expression wäre es theoretisch auch denkbar, dass posttranskriptionelle Mechanismen für die hier beschriebene Diskordanz verantwortlich sind. Dazu liegen ausführliche Untersuchungen zur Zellzyklus-abhängigen Regulation von RAG2 in einer progenitor-B Zell Linie vor [141, 142]. Dies wäre insbesondere plausibel, da bei einer entzündlichen Erkrankung wie der o-JIA eine größere Fraktion proliferierender B Zellen zu erwarten wäre als bei Gesunden. In der genannten Studie wurde gezeigt, dass sich die Konzentration des RAG2 Proteins um den Faktor 20 verringert, sobald die Zelle in die S-Phase des Zellzyklus eintritt. Die RAG1 Konzentration bleibt dabei relativ konstant. Somit agiert RAG2 in dieser Konstellation als der limitierende Faktor. Dies wird als sinnvoller Mechanismus angesehen, um die Zelle in der vulnerablen S-Phase vor einem unselektiven Rekombinationsprozess zu schützen, welcher insbesondere aus der guten Erreichbarkeit der DNA während der Replikation resultieren könnte („accessibility hypothesis“). Dennoch finden diese Veränderungen offensichtlich ausschließlich auf Proteinebene statt, wobei es nach Phosphorylierung am Thr-490 durch Cyclin-abhängige Kinasen anschließend zu einer schnellen Degradation des RAG2 Proteins kommt. Die mRNA Konzentrationen blieben unter denselben Versuchsbedingungen unverändert [141]. Von daher kann dieser Zellzyklus-abhängige Mechanismus nicht für die in der vorliegenden Studie auf mRNA Ebene beschriebenen Diskordanzen verantwortlich sein. Es ist dennoch nicht auszuschließen, dass weitere, noch nicht beschriebene Signalwege oder RNA Interferenzmechanismen [143] zusätzlich auch auf die mRNA Konzentration regulierend einwirken.

Als weiteren Unterschied zwischen Patienten mit Oligoarthritis und Gesunden, könnte man eine verstärkte Lymphopoese im Rahmen der systemischen Entzündungsaktivität annehmen. Eine erhöhte Anzahl CD19⁺, insbesondere CD19⁺CD5⁺ B Zellen bei der o-JIA legen das nahe [13, 14]. Das Resultat wäre ein größerer Anteil unreifer B Zellen im peripheren Blut, bei denen die im Knochenmark initiierte RAG Expression noch nicht völlig zum Stillstand gekommen ist. Diese Vermutung ist in mehreren Publikationen geäußert worden, die eine RAG Expression in peripheren, reifen B Zellen

grundsätzlich in Frage stellen. Hierbei wurde sich insbesondere auf den unreifen Phänotyp der RAG exprimierenden Zellen bezogen [54-59]. Dies kann allerdings auf die hier vorliegenden Daten nicht angewendet werden, da ausschließlich CD27⁺ B Zellen untersucht wurden. CD27 ist ein Marker für somatisch mutierte Gedächtnis B Zellen und auf naiven B Zellen nicht nachweisbar [22]. Zusätzlich wurde Immunglobulin G (IgG) als eindeutiger Marker für solche B Zellen analysiert, die bereits einen Klassenwechsel in der Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben. In der Subklassenanalyse dieser IgG positiven Gruppe zeigte sich dabei je nach Krankheitsentität eine vergleichbare oder sogar größere Häufigkeit von RAG Transkripten im Vergleich zur IgG negativen Gruppe (Tabelle 12). Auch diese Beobachtung spricht gegen eine RAG Expression ausschließlich in unreifen B Zellen. Weiterhin zeigt bei Patient o-JIA #2 der fehlende Nachweis von AID mRNA, welche ausschließlich im Keimzentrum sekundär lymphatischer Organe exprimiert wird [38], dass es sich hierbei nicht um Keimzentrums-B Zellen handelt.

Eine zusätzliche Störgröße, welche die RAG Expression beeinflussen könnte, stellt die Medikation der drei o-JIA Patienten dar. Diese erhielten zum Untersuchungszeitpunkt kein Medikament (#1), Naproxen (#2) bzw. Naproxen, Diclofenac und Methotrexat (#3).

Insbesondere die nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSA) Naproxen und Diclofenac üben über die Hemmung des Schlüsselenzyms Cyclooxygenase und der damit einhergehenden Interferenz mit dem Prostaglandin- und Thromboxan-Stoffwechsel einen wesentlichen immunmodulatorischen Effekt aus. Studien an erwachsenen RA Patienten zeigen beispielsweise eine verminderte Produktion von IgM-RF unter NSA-Therapie, welche eng mit der klinischen Verbesserung korreliert ist [144-146]. Ob dieser Effekt direkt oder T-Zell vermittelt auftritt, ist noch nicht eindeutig geklärt – weist aber unabhängig davon auf eine Beeinflussung der B-Zell Reihe hin. Die Komposition der lymphozytären Subpopulationen unter NSA-Therapie scheint dagegen kaum verändert zu sein [145, 147].

Methotrexat (MTX) zählt als kompetitiver Inhibitor der Dihydrofolat-Reduktase zur Gruppe der Folatantagonisten. Da durch die Hemmung dieses Enzyms kein Tetrahydrofolat regeneriert werden kann, wird die DNA- und RNA-Synthese –

insbesondere durch die blockierte *de novo*-Synthese von Purinen und durch Blockade der Thymidylat-Synthase – unterbunden. Dosisabhängig wirkt MTX dadurch antiinflammatorisch und immunsuppressiv, in sehr hohen Konzentrationen auch zytostatisch. Bei *in vitro* Studien mit humanen Lymphozyten waren sowohl die klonale Proliferation von B- und T-Lymphozyten als auch die Produktion sämtlicher Immunglobulin-Klassen nach Mitogen-Stimulation bei Anwesenheit von MTX signifikant beeinträchtigt [148-150]. Bei niedrigeren MTX-Konzentrationen ließ sich in einer Studie paradoxerweise eine verstärkte Produktion der IgG- und IgM-Subklasse nachweisen [148]. *In vivo* Studien an peripheren Lymphozyten von Patienten mit RA unter MTX-Medikation zeigten eine Reduktion der totalen Lymphozytenzahlen, wobei B Zellen davon stärker als T-Zellen betroffen waren [151, 152]. Bei SLE Patienten konnte man parallel zur Verminderung der B Zellen auch einen Rückgang der Auto-Antikörper feststellen [153]. Weiterhin zeigte sich in der detaillierteren Betrachtung der B-Lymphozyten eine besonders deutliche Beeinträchtigung der CD5⁺ B-Zellpopulation durch die MTX-Medikation [154].

Rückschlüsse auf den direkten Effekt der Medikation auf die RAG Expression sind aufgrund der vorliegenden Daten nicht möglich. Dennoch ist der Einfluss der Pharmaka auf diese Studie nur von sekundärer Relevanz, da bewusst drei Patienten mit wesentlich unterschiedlicher Krankheitsaktivität miteinbezogen wurden (keine Medikation, bis hin zu einer Dreifachkombination; Tabelle 4). Aus diesem Grund können bei allen Individuen durchgängig beobachtete Phänomene zunächst als krankheits-assoziiert und nicht als Medikamenten-verursacht angenommen werden.

Die Funktion der unkoordinierten Expression der RAG Gene ist nicht geklärt. Bisher ist für ein einzelnes RAG Protein keine physiologische Funktion beschrieben. Für den Prozess der V(D)J-Rekombination sind zwingend beide Proteine erforderlich, welche zusammen den aktiven Enzymkomplex bilden [25, 26]. Stöchiometrisch hat eine neuere Studie Belege dafür aufgezeigt, dass RAG2 als Dimer, RAG 1 dagegen mindestens als Trimer, wenn nicht als noch höhergradiges Multimer im aktiven Enzymkomplex vorliegt [155]. Dies würde ein entsprechend asymmetrisches Verhältnis auch in der Transkription plausibel machen. Weiterhin zeigten *in vitro* Analysen, welche auf die Effizienz der Rekombinationsreaktion abzielten, dass eine gezielte Erhöhung der RAG1

Transkripte eine Erhöhung der Effizienz mit sich bringt. Im Kontrast dazu brachte eine Erhöhung des RAG2 Anteils die V(D)J-Rekombination gänzlich zum Erliegen [156]. Eine weitere Gruppe konnte einen direkten Interaktionsnachweis erbringen, indem sie zeigte, dass sich die Halbwertszeit des RAG1 Proteins erhöht, wenn RAG2 nicht exprimiert wird [157]. Zusätzlich zeigte sich nach Stimulation von Tonsillen B Zellen ein zeitlich deutlich verzögertes Auftreten der RAG2 Transkripte im Vergleich zu frühzeitig nachweisbarer RAG1 mRNA [53]. Diese exemplarischen Hinweise zeichnen ein noch unvollständiges Bild der gesamten Interaktionen, legen aber eine regulative Funktion von RAG2 in der Beeinflussung der V(D)J-Rekombinase-Aktivität nahe und lassen eine physiologische Relevanz vermuten. Dennoch stammen die meisten bislang vorliegenden Daten zur RAG Expression aus Studien zur „primären“ V(D)J-Rekombination in unreifen B Zellen, sodass das hier festgestellte Expressionsmuster bei Gedächtnis B Zellen differenziert betrachtet werden muss.

4.2. Wie ist die wesentlich geringere Frequenz RAG2 positiver Zellen bei o-JIA Patienten im Vergleich zu Gesunden zu bewerten, welche sowohl im CD5⁺ als auch im CD5⁻ Kompartiment auftritt?

Das auffälligste Resultat dieser Studie war eine um das 4- (CD5⁺) bzw. 2-fache (CD5⁻) reduzierte Häufigkeit RAG2 positiver Zellen bei den o-JIA Patienten im Vergleich zu Gesunden (p jeweils <0,001). Dies ließ sich sowohl in der CD27⁺CD5⁺ als auch in der CD27⁺CD5⁻ Fraktion beobachten. Die RAG1 Frequenz war im Gegensatz dazu tendenziell eher etwas höher als bei den Kontrollen, ebenfalls in beiden CD5 Fraktionen. Dieses charakteristische Muster, das sich konstant über die Grenzen der CD5 Fraktionen hinweg zeigte, lässt auf eine differenzierte Regulation der beiden RAG Gene schließen.

Bei Betrachtung der drei klinisch sehr verschiedenen o-JIA Patienten im Einzelnen, fällt allerdings ein Unterschied auf. Bei den CD5⁺ Gedächtnis B Zellen liegt der Anteil RAG2 positiver Zellen konstant zwischen 5-7 % bei allen drei Patienten. Dagegen zeigt die Häufigkeit RAG2 positiver B-Lymphozyten in der CD5⁻ Fraktion ein interindividuelles Spektrum von 0 % bis zu 18 % und dabei interessanterweise eine inverse Korrelation mit der Krankheitsaktivität und der Medikation (Tabelle 13). Dieser

Zusammenhang deutet auf eine Reduktion der RAG2 Expression bei zunehmender Krankheitsaktivität hin. Alternativ könnte hierfür die Medikation ursächlich sein. Auch wenn sich ein definitiver Schluss bei dieser kleinen Fallzahl verbietet, unterstützt diese Erkenntnis ebenso die bereits vorher abgeleitete These einer regulativen Funktion von RAG2.

Die Regulation der V(D)J-Rekombination ist ein streng regulierter Prozess, da die Veränderung genomischer DNA immer auch mit dem Risiko des Verlustes der ganzen Zelle oder der malignen Entartung einhergeht [23]. Neben einigen ubiquitär vorhandenen Faktoren, scheinen die Chromatinstruktur der Immunglobulin-Loci sowie das Vorhandensein der beiden RAG Proteine die zwei kritischen Faktoren für die erfolgreiche V(D)J-Rekombination darzustellen [158].

Die komplexe Transkriptionskontrolle der RAG Gene ist nicht vollständig geklärt. Es müssen mehrere Ebenen berücksichtigt werden: Einerseits die Linienspezifität, wodurch sichergestellt wird, dass RAG nur in der lymphoiden Reihe exprimiert wird. Zweitens muss die zeitliche Abfolge auch innerhalb einer Linie streng reguliert sein. Zuletzt wird sichergestellt, dass jeder Lymphozyt nur eine einzige BCR Spezifität exprimiert (allelic exclusion) [159, 160].

Es sind bereits mehrere cis- und trans-wirksame Faktoren identifiziert, darunter auch verschiedene Transkriptionsfaktoren [161]. Allerdings zeigen sich fundamentale Unterschiede beispielsweise zwischen der B- und T-Zelllinie. So führt die gezielte Deletion des 22kb 5' des RAG2 Promotors gelegenen ERAG Enhancers zu deletären Effekten auf die B Zell Entwicklung, ohne dabei die T Zellentwicklung zu beeinflussen [162]. Kürzlich zeigte sich dafür die Bindung des Forkhead Transkriptionsfaktors Foxp1 verantwortlich [163]. Dennoch war auch in den B Zellen nicht der gesamte Ablauf der V(D)J-Rekombination gestört. Nach unproblematischer D-zu-J- war lediglich die anschließende V-zu-DJ-Rekombination der schweren Kette blockiert, was zu einem Stillstand zwischen dem pro- und prä-B Zell-Stadium führte.

Dies demonstriert exemplarisch, wie differenziert die RAG Expression in verschiedenen Linien und selbst in verschiedenen Entwicklungsstadien derselben Linie reguliert ist. Somit ist es schwierig, Erkenntnisse aus frühen Entwicklungsstufen auf die in dieser Hinsicht weniger gut charakterisierte Gedächtnis B-Zellpopulation zu übertragen. Dennoch weisen die unter 4.1 diskutierten Besonderheiten von RAG2 (Zellzyklus-

abhängige Degradation, ungleiche Stöchiometrie im Enzymkomplex, Terminierung der V(D)J-Rekombination bei Erhöhung des RAG2 Anteils, Einfluss auf die Halbwertszeit des RAG1 Proteins, verzögertes Auftreten von RAG2 mRNA nach Stimulation) in Zusammenschau mit den hier erhobenen Daten auf eine regulatorische Funktion hin.

Für eine abschließende Beurteilung fehlt es allerdings an aussagekräftigen Daten zur Regulation der RAG Gene speziell in Gedächtnis B Zellen.

4.3. Weshalb sind bei der koordinierten Expression so unterschiedliche Resultate zwischen den CD5 Subpopulationen der o-JIA Patienten festzustellen? – Einfluss des Oberflächenmoleküls CD5 auf die RAG Expression

Die koordinierte Expression von RAG1+RAG2 präsentierte sich bei CD5⁺ und CD5⁻ B Zellen als grundlegend verschieden. Hier zeigte sich in der CD5⁺ o-JIA Gruppe ein den Gesunden vergleichbarer Wert. In der CD5⁻ Population dagegen ließen sich unabhängig von Krankheitsaktivität und Medikation in keiner o-JIA Zelle beide RAG Transkripte nachweisen, während die gesunden Kontrollen in zwei von drei Fällen mit 7 % einen soliden Wert zeigten (Abbildung 17).

Bei dem dritten gesunden Kind ließ sich ebenfalls keine koordinierte Expression dokumentieren. Hierbei kann es sich einerseits um einen „Ausreißer“ handeln. Andererseits ist es bei der kleinen Fallzahl von drei untersuchten Individuen theoretisch auch denkbar, dass die zwei anderen Kontrollen zufällig in diesem Bereich lagen, also falsch positiv waren. Bei einer Expressionshäufigkeit von zweimal über 7 %, womit sie sich diese deutlich von der Null unterscheidet, ist dies allerdings die weniger wahrscheinliche Alternative.

Die beobachtete Diskrepanz ist überraschend, da sich in früheren Studien an Tonsillen B Zellen und an peripheren IgD⁺ B Zellen bei kindlichem SLE eher in der CD5⁺ Population eine verstärkte RAG Expression ausmachen ließ, nicht in der CD5⁻ [53, 75]. Dennoch ließ sich auch in diesen Studien eine Stadienabhängigkeit demonstrieren. Hillion et al. zeigten bei der detaillierten Untersuchung verschiedener Entwicklungsstadien von Tonsillen-B Zellen, dass die Expression des CD5-Moleküls prinzipiell mit der RAG1+RAG2 Expression assoziiert ist. Die einzige Ausnahme

bildeten in dieser Studie ebenfalls die (frühen) Gedächtnis B Zellen (IgD⁻CD38⁺) [53], bei denen sich RAG1+RAG2 in 6 % der CD5⁺, aber in 16,6 % der CD5⁻ B Zellen nachweisen ließ. Diese 1:3 Relation findet sich – wenn auch in geringeren absoluten Werten – in den ebenfalls gesunden Kontrollen dieser Untersuchung mit 1,3 % (CD5⁺) und 4,9 % (CD5⁻) wieder. Somit scheint physiologisch ein geringer Anteil RAG1+RAG2 exprimierender Gedächtnis-B Zellen auch in der Peripherie zu verbleiben. Diese Zellen besitzen damit die Voraussetzung für „sekundäre Rekombinationen“ ihres Immunglobulin-Locus im Sinne der Rezeptor Revision.

Von daher stellt sich die Frage, weshalb sich diese Fraktion bei den o-JIA Patienten gar nicht ($p < 0,01$) und bei dem s-JIA Patienten mit 1,3 % ebenfalls nur deutlich reduziert wieder findet (siehe 4.4). Weiterhin ist zu klären, warum diese Defizienz in der koordinierten RAG Expression nur isoliert in der CD5⁻ Population auftritt.

Wie bereits angeführt, ist die RAG Expression in reifen B Zellen durch eine T-Zell ähnliche Stimulation mit IL-4 und CD40-Ligand oder LPS induzierbar [35, 46]. IL-7 kann in Kombination mit CD40-Ligand denselben Effekt ausüben [63]. Eine Stimulation des BCR führt dagegen zu einer Terminierung der RAG Expression [34, 62]. Weiterhin scheinen auch Komplement-Rezeptoren (CD21/CD35) an der Regulation beteiligt zu sein [164].

Im Falle der o-JIA ist eine starke autoimmune Last im Sinne von reichlich vorhandenem Autoantigen anzunehmen. Damit ist es gemäß der bislang bekannten Signalwege denkbar, dass eine starke BCR Aktivierung durch Autoantigene zu einer völligen Suppression der RAG Expression in der CD5⁻ Gruppe führt. Andererseits findet sich aber in der CD5⁺ Population ein normaler Wert. Dies könnte der Funktion des Oberflächenmoleküls CD5 zuzuschreiben sein. Dieses Glykoprotein führt zu einer Rekrutierung der Protein Tyrosin Phosphatase SHP-1 (SH2-domain-containing protein tyrosin phosphatase-1) in den BCR. Dadurch kommt es zu einer negativen Regulation BCR vermittelter Signale [165, 166]. Auf diese Weise könnte es in CD5⁺ B Zellen – trotz hoher autoimmuner Last – zu einer Inhibition von BCR-Signalen kommen, wodurch eine RAG Expression ermöglicht wäre.

Neben der Inhibition durch BCR-Signale ist auch ein Defekt in der Signaltransduktion RAG-induzierender Signale als Ursache der nicht-vorhandenen RAG Expression denkbar. Hierbei könnten sowohl ein Mangel an T-Zell Stimulation (CD40L, IL-4), als

auch Defekte in der nachgeschalteten Signaltransduktion verantwortlich sein. Dies könnte allerdings nicht hinreichend die Diskrepanz zwischen $CD5^+$ und $CD5^-$ Gedächtnis B Zellen erklären.

In einem alternativen Modell wird die $CD5^+$ B Zelle nicht als aktivierter Zustand des konventionellen B-Lymphozyten betrachtet [9, 10, 53], sondern als sich parallel entwickelnde, eigenständige Linie [7, 8]. Unterstützende Daten hierzu stammen allerdings primär aus Mausmodellen. Aus dieser Perspektive würde man einen Defekt der koordinierten RAG Expression bei o-JIA Patienten nur isoliert in der konventionellen Linie ($CD5^-$) beschreiben, während sich die $CD5^+$ B Zelle in dieser Hinsicht normal verhält. Auch diese Hypothese könnte die Differenzen zwischen den $CD5$ -Fraktionen erklären.

**4.4. Welche Bedeutung hat das Fehlen von RAG1+RAG2 exprimierenden $CD27^+CD5^-$ B-Lymphozyten, welches sich insbesondere in der IgG positiven Subpopulation zeigt, in der Pathogenese der JIA und welche Parallelen existieren zwischen der o-JIA und der s-JIA?
– Defizite in der Rezeptor Revision bei IgG^+ Gedächtnis B Zellen von Patienten mit Juveniler Idiopathischer Arthritis**

In der $CD27^+CD5^-$ Population fanden sich Zellen mit mRNA Transkripten von RAG1+RAG2 bei der o-JIA (0,0 %) und bei der s-JIA (1,3 %) wesentlich seltener als bei Gesunden (4,9 %) oder bei dem Pneumonie-Patienten (5,3 %). Betrachtet man aus dieser Population ausschließlich die IgG exprimierenden Gedächtnis B Zellen, wird der Unterschied noch deutlicher (o-JIA und s-JIA 0 % – Kontrollen 9,3 % – Pneumonie 8,3 %; Abbildung 19 b). Bei der Betrachtung der Daten der s-JIA und der Pneumonie muss berücksichtigt werden, dass hierbei jeweils Zellen nur eines Patienten untersucht wurden und die Werte von daher als weniger repräsentativ zu werten sind.

Diese Beobachtung ist dennoch sehr interessant, da sowohl die o-JIA als auch die s-JIA zwar zur Gruppe der Juvenilen Idiopathischen Arthritis zählen, diese Klassifikation aber im Wesentlichen auf klinischer Grundlage geschaffen wurde. Gemeinsamkeiten in der Pathophysiologie sind von daher nicht zwingend zu erwarten. Somit kann hier eine

Gemeinsamkeit demonstriert werden, die bisher nicht beschrieben ist und eventuell auf einen gemeinsamen Defekt hinweist.

Weiterhin heben sich beide JIA Formen in diesem Punkt nicht nur von den Gesunden, sondern auch von dem Pneumonie-Patienten ab. Das deutet daraufhin, dass es sich hierbei nicht um ein generelles Phänomen einer Entzündung handelt, sondern eher um ein spezifisches Charakteristikum der JIA. Ob dies ebenfalls für andere pädiatrische Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis zutrifft, ist derzeit nicht bekannt.

Im Kontrast dazu war die koordinierte RAG Expression im $CD5^+$ Kompartiment der o-JIA Patienten gering erhöht. $CD5^+$ B Zellen der systemischen JIA und der Pneumonie zeigten noch höhere Werte. Von daher wäre diese Beobachtung eher als ein allgemeines Entzündungsphänomen anzusehen, vermag aber nicht die Differenzen in der Einzelgenexpression (RAG2) zu erklären.

Da das Vorliegen beider RAG Proteine bzw. ihrer mRNA Transkripte eine notwendige Voraussetzung zur Veränderung der Rezeptorspezifität durch sekundäre Rekombination darstellt, besitzen $CD27^+CD5^-$ Gedächtnis B Zellen bei der o-JIA nicht die Möglichkeit zur „Rezeptor Revision“. Andererseits scheint unter physiologischen Umständen ein Anteil von $CD5^-$ Gedächtnis B Zellen zu existieren (5 %), der diese Voraussetzung erfüllt. In der IgG^+ Fraktion macht diese Population sogar 9 % aus. Dabei handelt es sich weder um unreife B Zellen, noch um aktivierte Keimzentrums-B Zellen. Ob diese Lymphozyten allerdings auch tatsächlich ihren Immunglobulin-Locus neu rekombinieren, kann aufgrund der vorliegenden Expressions-Daten nicht mit Sicherheit geklärt werden. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise darauf, dass sekundäre Rekombinationsprozesse auch in der Peripherie einen physiologisch relevanten Mechanismus darstellen [47-50, 52, 53].

Daher unterstützt die vorliegende Studie die Hypothese, dass bei der JIA toleranzsichernde, periphere „sekundäre Rekombinationsprozesse“ im Sinne der Rezeptor Revision nicht ausreichend wirken und somit ein peripherer „Toleranz-Kontrollpunkt“ [71] defekt ist. Damit könnte es zu einer mangelnden Elimination autoreaktiver B-Zellrezeptoren kommen, wie dies bereits für andere autoimmune Erkrankungen beschrieben wurde [70, 167].

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die oligoartikuläre Form der Juvenilen Idiopathischen Arthritis (o-JIA) stellt in kaukasischen Populationen den häufigsten Subtyp dieser Gruppe chronisch entzündlicher Gelenkerkrankungen im Kindesalter dar. Ein wesentliches Charakteristikum dieser klinisch gut definierten Entität ist das Vorliegen von Antinukleären Antikörpern (ANA) im Serum von Betroffenen, welche in 75-80 % der Fälle nachweisbar sind. Dies legt einen Defekt der Toleranzentstehung im Rahmen der Lymphozytenentwicklung nahe.

Speziell in B-Lymphozyten spielen die Produkte der Rekombinations-Aktivierenden Gene – die RAG Enzyme – eine wesentliche Rolle in der Entstehung der Antikörpervielfalt durch V(D)J-Rekombination der Immunglobulingene. Neben der primären Rekombination im Knochenmark scheinen die RAG Enzyme auch in der Peripherie sekundäre Rekombinationsprozesse zu vermitteln, was als Rezeptor Revision bezeichnet wird. Pathologien in diesen Mechanismen sind für verschiedene autoimmune Erkrankungen bereits beschrieben. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob sich in Gedächtnis B Zellen des peripheren Bluts von Patienten mit ANA⁺ o-JIA ebenfalls Auffälligkeiten in der Expression der RAG Gene finden lassen. Eine Aufteilung nach dem CD5 Antigen erlaubte eine getrennte Analyse der CD5⁺ Subpopulation.

Insgesamt wurden 1.063 Gedächtnis B Zellen des peripheren Bluts von drei ANA⁺ o-JIA Patienten, drei gesunden Kontrollen, einem Patienten mit der systemischen Form der JIA (s-JIA) sowie einem Kind mit Pneumonie auf die Expression von RAG1, RAG2 und Immunglobulin G untersucht. Nach durchflusszytometrischer Sortierung einzelner Zellen in eine CD19⁺CD27⁺CD5⁺ und eine CD19⁺CD27⁺CD5⁻ Population wurde durch Reverse Transkription eine cDNA Bibliothek auf Einzelzellebene erstellt. Hieraus wurden im Anschluss die einzelnen Gene mittels einer Sequenz aus externer und nested PCR amplifiziert und daraufhin mittels Southern Blotting und Oligonukleotidsonden sequenzspezifisch detektiert.

Die Expression von nur einem der beiden RAG Gene zeigte sich je nach Krankheit in 20-70 % der untersuchten Zellen. Die koordinierte Expression von RAG1+RAG2 war dagegen mit 0-5 % weitaus seltener.

Bei den o-JIA Patienten ließen sich RAG1 positive Gedächtnis B Zellen etwas häufiger, RAG2 positive Zellen dagegen signifikant seltener als bei Gesunden nachweisen. Dieses charakteristische Muster fand sich in beiden CD5-Populationen. Bei der Expression von RAG1+RAG2 allerdings zeigte sich nur in der CD5⁻ Fraktion ein signifikant geringerer Wert bei den o-JIA Patienten als bei Gesunden (0 % vs. 5 %; p<0,01). Unter den CD5⁺ B Zellen war mit 1,3 % (Kontrollen) und 2,2 % (o-JIA) kein signifikanter Unterschied vorhanden.

Die systemische Form der JIA und die Pneumonie zeigten in der CD5⁺ Fraktion jeweils eine höhere Anzahl RAG1-, RAG2- sowie RAG1+RAG2-positiver B Zellen gegenüber der o-JIA. In der CD5⁻ Gruppe dagegen fand sich für die s-JIA – wie auch bei der o-JIA – eine sehr geringe RAG1+RAG2 Expression (1,3 %), während die Pneumonie mit 5,3 % einen den Gesunden vergleichbaren Wert aufwies. Eine Subanalyse der IgG exprimierenden CD27⁺CD5⁻ B Zellen bezüglich ihrer RAG1+RAG2 Expression verstärkt diese Differenz noch (o-JIA und s-JIA 0 % – Kontrollen 9,3 % – Pneumonie 8,3 %).

Die Expression von RAG1+RAG2 – als essentielle Voraussetzung für eine Veränderung der BCR-Spezifität durch „sekundäre Rekombinationsprozesse“ – lässt sich in CD27⁺CD5⁻ Gedächtnis B Zellen von gesunden Kindern nachweisen. Dies könnte Ausdruck einer aktiven „sekundären Rekombination“ in der Peripherie sein. Dabei fanden sich Hinweise auf ein Defizit bei der o-JIA, in geringerem Ausmaß auch bei der s-JIA. Die Differenz war noch deutlicher, wenn lediglich die IgG exprimierenden B-Lymphozyten betrachtet wurden. Da die Pneumonie normale Werte zeigte, spricht diese Beobachtung eher gegen eine allgemein entzündliche Erscheinung. Im Gegensatz dazu war in der CD27⁺CD5⁺ Population die koordinierte Expression bei der o-JIA nicht auffällig gegenüber den Gesunden verändert. Höhere Werte bei s-JIA und Pneumonie weisen hier eher auf ein generell inflammatorisches Phänomen hin.

6. ABKÜRZUNGEN

ACR	American College of Rheumatology
AG	Antigen
AID	Activation-Induced Cytidine Deaminase
AK	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
BCR	B Zell Rezeptor
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CD	Cluster of Differentiation
CD40-L	CD40-Ligand
cDNA	complementary/copy DNA
CSR	Class Switch Recombination
DIG	Digoxigenin
DNA-PK	DNA dependent protein kinase
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
E2A	Gen, das für Transkriptionsfaktoren E12 und E47 codiert
EBF	early-B-cell activating factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOPA	Early Onset Pauciarticular Arthritis
EULAR	European League Against Rheumatism
FACS	fluorescence activated cell sorting
FcγRI	Fc gamma Rezeptor I = CD64
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	Green Fluorescent Protein
HLA	Human Leucocyte Antigen
HMG-Proteine	high mobility group-Proteine
HSP	Hitzeschockproteine
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IL-4	Interleukin 4
IL-7	Interleukin 7
ILAR	International League of Associations for Rheumatology
JCA	Juvenile Chronische Arthritis

Abkürzungen

JIA	Juvenile Idiopathische Arthritis
JRA	Juvenile Rheumatoide Arthritis
LOPA	Late Onset Pauciarticular Arthritis
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MTX	Methotrexat
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NSA	Nicht-Steroidale Antiphlogistika
o-JIA	oligoartikuläre Form der Juvenilen Idiopathischen Arthritis
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
RA	Rheumatoide Arthritis
RAG	Rekombination Aktivierende Gene
RF	Rheumafaktor
RSS	Recombination Signal Sequence
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SHM	Somatische Hypermutation
s-JIA	systemische Form der Juvenilen Idiopathischen Arthritis
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
TdT	Terminale Deoxynucleotidyl Transferase
V(D)J-Rekombination	Rekombination der Gensegmente Variable, Diversity, Joining
XRCC4	X-ray repair cross complementing protein 4

Tabelle 15. Alphabetische Liste häufig verwendeter Abkürzungen

7. VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Tabellenverzeichnis		Seite
<u>Tabelle 1</u>	Differentialdiagnosen der Arthritis bei Kindern	17
<u>Tabelle 2</u>	Gegenüberstellung verschiedenener Klassifikationen der juvenilen Arthritiden	18
<u>Tabelle 3</u>	Klinische Manifestationen häufiger JIA Entitäten	21
<u>Tabelle 4</u>	Klinische Patientendetails	32
<u>Tabelle 5</u>	Laborchemische Patientendetails	32
<u>Tabelle 6</u>	Zusammensetzung der Ansätze zur RT-PCR	36
<u>Tabelle 7</u>	Ansatz für die externe und nested PCR	37
<u>Tabelle 8</u>	Basenabfolgen der verwendeten PCR-Primer	38
<u>Tabelle 9</u>	Ansatz zum Oligonukleotid tailing und Basenabfolge der verwendeten Oligonukleotide für die Gene β -actin, RAG 1 und 2, IgG sowie AID	40
<u>Tabelle 10</u>	Prähybridisierungslösung zur Maskierung unspezifischer Bindungsstellen	41
<u>Tabelle 11</u>	Expression der Gene RAG1, RAG2 und IgG auf Einzelzellebene für die verschiedenen untersuchten Individuen sowie die drei o-JIA Patienten.	46
<u>Tabelle 12</u>	RAG Expressionsdaten getrennt für die IgG+ und IgG- Subpopulationen	51
<u>Tabelle 13</u>	Inverse Korrelation der RAG2 Expression mit Parametern der Krankheitsaktivität und der Medikation bei CD27+CD5- Gedächtnis B Zellen von gesunden Kontrollen (Mittelwert mit Range) und drei o-JIA Patienten	54
<u>Tabelle 14</u>	AID Expression in Tonsillen B Zellen.	59
<u>Tabelle 15</u>	Alphabetische Liste häufig verwendeter Abkürzungen	74

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Abbildungsverzeichnis		Seite
<u>Abbildung 1</u>	Vereinfachte Darstellung wichtiger Stufen der B-Zellentwicklung.	3
<u>Abbildung 2</u>	Struktur eines Immunglobulins.	5
<u>Abbildung 3</u>	Die Keimzentrumsreaktion	7
<u>Abbildung 4</u>	Schematische Darstellung der V(D)J Rekombination am Beispiel eines Leichtkettenlocus.	9
<u>Abbildung 5</u>	Die Abbildung illustriert alternative Funktionen der Rezeptor Revision.	15
<u>Abbildung 6</u>	Exemplarische Darstellung der FACS Analyse der Oberflächenantigene CD19, CD27 und CD5.	35
<u>Abbildung 7</u>	Beispiel einer Dot-Blot Darstellung der PCR Produkte für das Gen RAG 2B mittels Southern Blotting und sequenzspezifischen Oligonukleotidsonden	42
<u>Abbildung 8</u>	Ausschnitt aus den Sequenzierresultaten eines AID PCR-Produktes	43
<u>Abbildung 9</u>	Darstellung des Färbeverhaltens des CD19 AK in Relation zum CD79b AK an gesunden PBMC ohne vorgeschaltetes Lymphocytenfenster	44
<u>Abbildung 10</u>	Darstellung des Färbeverhaltens des anti-IgG AK in Relation zu dem Makrophagen-Monocyten-Marker CD64 (FcγRI) an mononukleären Zellen des peripheren Bluts.	45
<u>Abbildung 11</u>	Anteil CD27+CD5+ Gedächtnis B Zellen, die RAG1 mRNA exprimieren.	47
<u>Abbildung 12</u>	Anteil CD27+CD5+ Gedächtnis B Zellen, die RAG2 mRNA exprimieren.	48
<u>Abbildung 13</u>	Anteil CD27+CD5+ Gedächtnis B Zellen, die RAG1 und RAG2 mRNA exprimieren.	49
<u>Abbildung 14</u>	Anteil CD27+CD5+ Gedächtnis B Zellen, die IgG mRNA exprimieren.	50
<u>Abbildung 15</u>	Anteil CD27+CD5– Gedächtnis B Zellen, die RAG1 mRNA exprimieren.	52
<u>Abbildung 16</u>	Anteil CD27+CD5– Gedächtnis B Zellen, die RAG2 mRNA exprimieren.	53
<u>Abbildung 17</u>	Anteil CD27+CD5– Gedächtnis B Zellen, die RAG1 und RAG2 mRNA exprimieren.	55
<u>Abbildung 18</u>	Anteil CD27+CD5– Gedächtnis B Zellen, die IgG mRNA exprimieren.	56
<u>Abbildung 19</u>	Anteil IgG-positiver, CD27+CD5– Gedächtnis B Zellen, die (a) RAG2 bzw. (b) RAG1+RAG2 mRNA exprimieren.	57
<u>Abbildung 20</u>	Anteil verschiedener B Zellpopulationen aus der Tonsille, die AID mRNA exprimieren.	60

8. LITERATUR

1. Ehrlich P and Morgenroth J, *On Haemolysins*, in Himmelweit, F., *The collected papers of Paul Ehrlich*, London. Pergamon, 1957: p. 246-255.
2. Brack C, Hiram M, et al., *A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination*. Cell, 1978. **15**(1): p. 1-14.
3. Lydyard PM, Quartey-Papafio R, et al., *The antibody repertoire of early human B cells. I. High frequency of autoreactivity and polyreactivity*. Scand J Immunol, 1990. **31**(1): p. 33-43.
4. Kipps TJ, *The CD5 B cell*. Adv Immunol, 1989. **47**: p. 117-85.
5. Bhat NM, Kantor AB, et al., *The ontogeny and functional characteristics of human B-1 (CD5+ B) cells*. Int Immunol, 1992. **4**(2): p. 243-52.
6. Gadol N and Ault KA, *Phenotypic and functional characterization of human Leu1 (CD5) B cells*. Immunol Rev, 1986. **93**: p. 23-34.
7. Hayakawa K, Hardy RR, et al., *Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells*. J Exp Med, 1985. **161**(6): p. 1554-68.
8. Kantor AB, Stall AM, et al., *De novo development and self-replenishment of B cells*. Int Immunol, 1995. **7**(1): p. 55-68.
9. Cong YZ, Rabin E, et al., *Treatment of murine CD5- B cells with anti-Ig, but not LPS, induces surface CD5: two B-cell activation pathways*. Int Immunol, 1991. **3**(5): p. 467-76.
10. Wortis HH, Teutsch M, et al., *B-cell activation by crosslinking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3348-52.
11. Casali P and Notkins AL, *Probing the human B-cell repertoire with EBV: polyreactive antibodies and CD5+ B lymphocytes*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 513-35.
12. Youinou P and Lydyard PM, *CD5+ B cells in nonorgan-specific autoimmune diseases: a fresh look*. Lupus, 2001. **10**(8): p. 523-5.
13. Wouters CH, Ceuppens JL, et al., *Different circulating lymphocyte profiles in patients with different subtypes of juvenile idiopathic arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2002. **20**(2): p. 239-48.
14. Martini A, Massa M, et al., *CD5 positive B lymphocytes in seronegative juvenile arthritis*. J Rheumatol, 1990. **17**(7): p. 932-5.
15. Gary-Gouy H, Harriague J, et al., *Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4537-43.
16. Gary-Gouy H, Bruhns P, et al., *The pseudo-immunoreceptor tyrosine-based activation motif of CD5 mediates its inhibitory action on B-cell receptor signaling*. J Biol Chem, 2000. **275**(1): p. 548-56.
17. Hashimoto S, Mohrenweiser HW, et al., *Chromosomal localization, genomic structure, and allelic polymorphism of the human CD79 alpha (Ig-alpha/mb-1) gene*. Immunogenetics, 1994. **40**(4): p. 287-95.
18. Janeway C, Travers P, et al., *Immunobiology - the immune system in health and disease*. Garland Science Publishing, 2005. **6th edition**.
19. Vos Q, Lees A, et al., *B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms*. Immunol Rev, 2000. **176**: p. 154-70.

20. Maurer D, Fischer GF, et al., *IgM and IgG but not cytokine secretion is restricted to the CD27+ B lymphocyte subset*. J Immunol, 1992. **148**(12): p. 3700-5.
21. Agematsu K, Hokibara S, et al., *CD27: a memory B-cell marker*. Immunol Today, 2000. **21**(5): p. 204-6.
22. Klein U, Rajewsky K, et al., *Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells*. J Exp Med, 1998. **188**(9): p. 1679-89.
23. Shaffer AL, Rosenwald A, et al., *Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(12): p. 920-32.
24. Roth DB, *Restraining the V(D)J recombinase*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(8): p. 656-66.
25. Mombaerts P, Iacomini J, et al., *RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes*. Cell, 1992. **68**(5): p. 869-77.
26. Shinkai Y, Rathbun G, et al., *RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement*. Cell, 1992. **68**(5): p. 855-67.
27. Schwarz K, Gauss GH, et al., *RAG mutations in human B cell-negative SCID*. Science, 1996. **274**(5284): p. 97-9.
28. Villa A, Santagata S, et al., *Partial V(D)J recombination activity leads to Omenn syndrome*. Cell, 1998. **93**(5): p. 885-96.
29. Chun JJ, Schatz DG, et al., *The recombination activating gene-1 (RAG-1) transcript is present in the murine central nervous system*. Cell, 1991. **64**(1): p. 189-200.
30. Jessen JR, Jessen TN, et al., *Concurrent expression of recombination activating genes 1 and 2 in zebrafish olfactory sensory neurons*. Genesis, 2001. **29**(4): p. 156-62.
31. Cannon JP, Haire RN, et al., *The phylogenetic origins of the antigen-binding receptors and somatic diversification mechanisms*. Immunol Rev, 2004. **200**: p. 12-22.
32. Feldhahn N, Schwering I, et al., *Silencing of B cell receptor signals in human naive B cells*. J Exp Med, 2002. **196**(10): p. 1291-305.
33. Hertz M and Nemazee D, *BCR ligation induces receptor editing in IgM+IgD-bone marrow B cells in vitro*. Immunity, 1997. **6**(4): p. 429-36.
34. Meffre E, Papavasiliou F, et al., *Antigen receptor engagement turns off the V(D)J recombination machinery in human tonsil B cells*. J Exp Med, 1998. **188**(4): p. 765-72.
35. Hikida M, Mori M, et al., *Reexpression of RAG-1 and RAG-2 genes in activated mature mouse B cells*. Science, 1996. **274**(5295): p. 2092-4.
36. Longerich S, Basu U, et al., *AID in somatic hypermutation and class switch recombination*. Curr Opin Immunol, 2006.
37. Muramatsu M, Kinoshita K, et al., *Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme*. Cell, 2000. **102**(5): p. 553-63.
38. Muramatsu M, Sankaranand VS, et al., *Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18470-6.

39. Revy P, Muto T, et al., *Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2)*. Cell, 2000. **102**(5): p. 565-75.
40. Burnet FM, *A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection*. Aust J. Sci, 1955. **20**: p. 67-77.
41. Rezanka LJ, Kenny JJ, et al., *2 BCR or NOT 2 BCR - receptor dilution: a unique mechanism for preventing the development of holes in the protective B cell repertoire*. Immunobiology, 2005. **210**(10): p. 769-74.
42. Melchers F, *The death of a dogma?* Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1199-201.
43. Tiegs SL, Russell DM, et al., *Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells*. J Exp Med, 1993. **177**(4): p. 1009-20.
44. Wardemann H, Yurasov S, et al., *Predominant autoantibody production by early human B cell precursors*. Science, 2003. **301**(5638): p. 1374-7.
45. Hillion S, Rochas C, et al., *Expression and reexpression of recombination activating genes: relevance to the development of autoimmune states*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1050**: p. 10-8.
46. Papavasiliou F, Casellas R, et al., *V(D)J recombination in mature B cells: a mechanism for altering antibody responses*. Science, 1997. **278**(5336): p. 298-301.
47. Han S, Zheng B, et al., *Neoteny in lymphocytes: Rag1 and Rag2 expression in germinal center B cells*. Science, 1996. **274**(5295): p. 2094-7.
48. Han S, Dillon SR, et al., *V(D)J recombinase activity in a subset of germinal center B lymphocytes*. Science, 1997. **278**(5336): p. 301-5.
49. Girschick HJ, Grammer AC, et al., *RAG1 and RAG2 expression by B cell subsets from human tonsil and peripheral blood*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 377-86.
50. de Wildt RM, Hoet RM, et al., *Analysis of heavy and light chain pairings indicates that receptor editing shapes the human antibody repertoire*. J Mol Biol, 1999. **285**(3): p. 895-901.
51. Brard F, Shannon M, et al., *Somatic mutation and light chain rearrangement generate autoimmunity in anti-single-stranded DNA transgenic MRL/lpr mice*. J Exp Med, 1999. **190**(5): p. 691-704.
52. Wilson PC, Wilson K, et al., *Receptor revision of immunoglobulin heavy chain variable region genes in normal human B lymphocytes*. J Exp Med, 2000. **191**(11): p. 1881-94.
53. Hillion S, Saraux A, et al., *Expression of RAGs in Peripheral B Cells outside Germinal Centers Is Associated with the Expression of CD5*. J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5553-61.
54. Yu W, Nagaoka H, et al., *Continued RAG expression in late stages of B cell development and no apparent re-induction after immunization*. Nature, 1999. **400**(6745): p. 682-7.
55. Monroe RJ, Seidl KJ, et al., *RAG2:GFP knockin mice reveal novel aspects of RAG2 expression in primary and peripheral lymphoid tissues*. Immunity, 1999. **11**(2): p. 201-12.
56. Kuwata N, Igarashi H, et al., *Cutting edge: absence of expression of RAG1 in peritoneal B-1 cells detected by knocking into RAG1 locus with green fluorescent protein gene*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6355-9.

57. Gartner F, Alt FW, et al., *Antigen-independent appearance of recombination activating gene (RAG)-positive bone marrow B cells in the spleens of immunized mice*. J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1745-54.
58. Igarashi H, Kuwata N, et al., *Localization of recombination activating gene 1/green fluorescent protein (RAG1/GFP) expression in secondary lymphoid organs after immunization with T-dependent antigens in rag1/gfp knockin mice*. Blood, 2001. **97**(9): p. 2680-7.
59. Nagaoka H, Gonzalez-Aseguinolaza G, et al., *Immunization and infection change the number of recombination activating gene (RAG)-expressing B cells in the periphery by altering immature lymphocyte production*. J Exp Med, 2000. **191**(12): p. 2113-20.
60. Rice JS, Newman J, et al., *Receptor editing in peripheral B cell tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1608-13.
61. Melamed D, Benschop RJ, et al., *Developmental regulation of B lymphocyte immune tolerance compartmentalizes clonal selection from receptor selection*. Cell, 1998. **92**(2): p. 173-82.
62. Hertz M, Kouskoff V, et al., *V(D)J recombinase induction in splenic B lymphocytes is inhibited by antigen-receptor signalling*. Nature, 1998. **394**(6690): p. 292-5.
63. Hikida M, Nakayama Y, et al., *Expression of recombination activating genes in germinal center B cells: involvement of interleukin 7 (IL-7) and the IL-7 receptor*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 365-72.
64. Hikida M and Ohmori H, *Rearrangement of lambda light chain genes in mature B cells in vitro and in vivo. Function of reexpressed recombination-activating gene (RAG) products*. J Exp Med, 1998. **187**(5): p. 795-9.
65. Nemazee D and Weigert M, *Revising B cell receptors*. J Exp Med, 2000. **191**(11): p. 1813-7.
66. Verkoczy LK, Martensson AS, et al., *The scope of receptor editing and its association with autoimmunity*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(6): p. 808-14.
67. Bensimon C, Chastagner P, et al., *Human lupus anti-DNA autoantibodies undergo essentially primary V kappa gene rearrangements*. Embo J, 1994. **13**(13): p. 2951-62.
68. Suzuki N, Harada T, et al., *Characterization of a germline Vk gene encoding cationic anti-DNA antibody and role of receptor editing for development of the autoantibody in patients with systemic lupus erythematosus*. J Clin Invest, 1996. **98**(8): p. 1843-50.
69. Suzuki N, Mihara S, et al., *Development of pathogenic anti-DNA antibodies in patients with systemic lupus erythematosus*. Faseb J, 1997. **11**(12): p. 1033-8.
70. Kumar KR, Li L, et al., *Regulation of B cell tolerance by the lupus susceptibility gene Ly108*. Science, 2006. **312**(5780): p. 1665-9.
71. Samuels J, Ng YS, et al., *Human B cell tolerance and its failure in rheumatoid arthritis*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1062**: p. 116-26.
72. Manheimer-Lory A, Monhian R, et al., *Analysis of the V kappa I family: germline genes from an SLE patient and expressed autoantibodies*. Autoimmunity, 1995. **20**(4): p. 259-65.
73. Dorner T, Foster SJ, et al., *Immunoglobulin kappa chain receptor editing in systemic lupus erythematosus*. J Clin Invest, 1998. **102**(4): p. 688-94.

74. Girschick HJ, Grammer AC, et al., *Expression of recombination activating genes 1 and 2 in peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(5): p. 1255-63.
75. Morbach H, Singh SK, et al., *Analysis of RAG expression by peripheral blood CD5+ and CD5- B cells of patients with childhood systemic lupus erythematosus*. *Ann Rheum Dis*, 2006. **65**(4): p. 482-487.
76. Zhang Z, Wu X, et al., *Expression of recombination-activating genes and terminal deoxynucleotidyl transferase and secondary rearrangement of immunoglobulin kappa light chains in rheumatoid arthritis synovial tissue*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(10): p. 2275-84.
77. Itoh K, Meffre E, et al., *Immunoglobulin heavy chain variable region gene replacement As a mechanism for receptor revision in rheumatoid arthritis synovial tissue B lymphocytes*. *J Exp Med*, 2000. **192**(8): p. 1151-64.
78. Monson NL, Brezinschek HP, et al., *Receptor revision and atypical mutational characteristics in clonally expanded B cells from the cerebrospinal fluid of recently diagnosed multiple sclerosis patients*. *J Neuroimmunol*, 2005. **158**(1-2): p. 170-81.
79. Armengol MP, Juan M, et al., *Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers*. *Am J Pathol*, 2001. **159**(3): p. 861-73.
80. Goodman JE and McGrath PJ, *The epidemiology of pain in children and adolescents: a review*. *Pain*, 1991. **46**(3): p. 247-64.
81. Brewer EJ, Jr., Bass J, et al., *Current proposed revision of JRA Criteria*. *JRA Criteria Subcommittee of the Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Section of The Arthritis Foundation*. *Arthritis Rheum*, 1977. **20**(2 Suppl): p. 195-9.
82. Fink CW, *Proposal for the development of classification criteria for idiopathic arthritides of childhood*. *J Rheumatol*, 1995. **22**(8): p. 1566-9.
83. Petty RE, Southwood TR, et al., *Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997*. *J Rheumatol*, 1998. **25**(10): p. 1991-4.
84. Petty RE, Southwood TR, et al., *International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001*. *J Rheumatol*, 2004. **31**(2): p. 390-2.
85. Prahalad S and Glass DN, *Is juvenile rheumatoid arthritis/juvenile idiopathic arthritis different from rheumatoid arthritis?* *Arthritis Res.*, 2002. **4** (suppl 3): p. 303-310.
86. Moe N and Rygg M, *Epidemiology of juvenile chronic arthritis in northern Norway: a ten-year retrospective study*. *Clin Exp Rheumatol*, 1998. **16**(1): p. 99-101.
87. Prieur AM, Le Gall E, et al., *Epidemiologic survey of juvenile chronic arthritis in France. Comparison of data obtained from two different regions*. *Clin Exp Rheumatol*, 1987. **5**(3): p. 217-23.
88. Andersson Gare B, *Juvenile arthritis--who gets it, where and when? A review of current data on incidence and prevalence*. *Clin Exp Rheumatol*, 1999. **17**(3): p. 367-74.

89. Oen K, *Comparative epidemiology of the rheumatic diseases in children*. Curr Opin Rheumatol, 2000. **12**(5): p. 410-4.
90. Oen K, Fast M, et al., *Epidemiology of juvenile rheumatoid arthritis in Manitoba, Canada, 1975-92: cycles in incidence*. J Rheumatol, 1995. **22**(4): p. 745-50.
91. Peterson LS, Mason T, et al., *Juvenile rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota 1960-1993. Is the epidemiology changing?* Arthritis Rheum, 1996. **39**(8): p. 1385-90.
92. von Koskull S, Truckenbrodt H, et al., *Incidence and prevalence of juvenile arthritis in an urban population of southern Germany: a prospective study*. Ann Rheum Dis, 2001. **60**(10): p. 940-5.
93. Kiessling U, Doring E, et al., *Incidence and prevalence of juvenile chronic arthritis in East Berlin 1980-88*. J Rheumatol, 1998. **25**(9): p. 1837-43.
94. Minden K, Niewerth M, et al., *Long-term outcome in patients with juvenile idiopathic arthritis*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(9): p. 2392-401.
95. Al-Matar MJ, Petty RE, et al., *The early pattern of joint involvement predicts disease progression in children with oligoarticular (pauciarticular) juvenile rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(10): p. 2708-15.
96. Hofer M and Southwood TR, *Classification of childhood arthritis*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2002. **16**(3): p. 379-96.
97. Glass DN and Giannini EH, *Juvenile rheumatoid arthritis as a complex genetic trait*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(11): p. 2261-8.
98. Thomson W and Donn R, *Juvenile idiopathic arthritis genetics - what's new? What's next?* Arthritis Res, 2002. **4**(5): p. 302-6.
99. Savolainen A, Saila H, et al., *Magnitude of the genetic component in juvenile idiopathic arthritis*. Ann Rheum Dis, 2000. **59**(12): p. 1001.
100. Silverman ED, Isacovics B, et al., *Synovial fluid cells in juvenile arthritis: evidence of selective T cell migration to inflamed tissue*. Clin Exp Immunol, 1993. **91**(1): p. 90-5.
101. Albert ED and Scholz S, *Juvenile arthritis: genetic update*. Baillieres Clin Rheumatol, 1998. **12**(2): p. 209-18.
102. Rachelefsky GS, Terasaki PI, et al., *Increased prevalence of W27 in juvenile rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 1974. **290**(16): p. 892-3.
103. Moroldo MB, Donnelly P, et al., *Transmission disequilibrium as a test of linkage and association between HLA alleles and pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(9): p. 1620-4.
104. Glass DN and Litvin DA, *Heterogeneity of HLA associations in systemic onset juvenile rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1980. **23**(7): p. 796-9.
105. Miller ML, Aaron S, et al., *HLA gene frequencies in children and adults with systemic onset juvenile rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1985. **28**(2): p. 146-50.
106. Thomson W, Barrett JH, et al., *Juvenile idiopathic arthritis classified by the ILAR criteria: HLA associations in UK patients*. Rheumatology (Oxford), 2002. **41**(10): p. 1183-9.
107. Prahalad S, *Genetics of juvenile idiopathic arthritis: an update*. Curr Opin Rheumatol, 2004. **16**(5): p. 588-94.
108. Pritchard MH, Matthews N, et al., *Antibodies to influenza A in a cluster of children with juvenile chronic arthritis*. Br J Rheumatol, 1988. **27**(3): p. 176-80.

109. Pritchard MH and Munro J, *Successful treatment of juvenile chronic arthritis with a specific antiviral agent*. Br J Rheumatol, 1989. **28**(6): p. 521-4.
110. Takahashi Y, Murai C, et al., *Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8227-32.
111. Nocton JJ, Miller LC, et al., *Human parvovirus B19-associated arthritis in children*. J Pediatr, 1993. **122**(2): p. 186-90.
112. Mimori A, Misaki Y, et al., *Prevalence of antihuman parvovirus B19 IgG antibodies in patients with refractory rheumatoid arthritis and polyarticular juvenile rheumatoid arthritis*. Rheumatol Int, 1994. **14**(3): p. 87-90.
113. Soderlund M, von Essen R, et al., *Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy*. Lancet, 1997. **349**(9058): p. 1063-5.
114. Bateman HE, Kirou KA, et al., *Remission of juvenile rheumatoid arthritis after infection with parvovirus B19*. J Rheumatol, 1999. **26**(11): p. 2482-4.
115. Süß-Fröhlich Y, *Die Serumprävalenz von Parvovirus B19 bei rheumatischen Erkrankungen im Kindesalter*. OPUS Universität Wuerzburg, 2004.
116. Ogra PL, Chiba Y, et al., *Rubella-virus infection in juvenile rheumatoid arthritis*. Lancet, 1975. **1**(7917): p. 1157-61.
117. Chantler JK, Tingle AJ, et al., *Persistent rubella virus infection associated with chronic arthritis in children*. N Engl J Med, 1985. **313**(18): p. 1117-23.
118. Frenkel LM, Nielsen K, et al., *A search for persistent rubella virus infection in persons with chronic symptoms after rubella and rubella immunization and in patients with juvenile rheumatoid arthritis*. Clin Infect Dis, 1996. **22**(2): p. 287-94.
119. Tsai YT, Chiang BL, et al., *Detection of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus genome in white blood cells from patients with juvenile rheumatoid arthritis and childhood systemic lupus erythematosus*. Int Arch Allergy Immunol, 1995. **106**(3): p. 235-40.
120. Massa M, Mazzoli F, et al., *Proinflammatory responses to self HLA epitopes are triggered by molecular mimicry to Epstein-Barr virus proteins in oligoarticular juvenile idiopathic arthritis*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(10): p. 2721-9.
121. De Graeff-Meeder ER, van der Zee R, et al., *Recognition of human 60 kD heat shock protein by mononuclear cells from patients with juvenile chronic arthritis*. Lancet, 1991. **337**(8754): p. 1368-72.
122. Nuallain EM, Monaghan H, et al., *Antibody response of restricted isotype to heat shock proteins in juvenile chronic arthritis*. Scand J Immunol, 1993. **38**(1): p. 83-8.
123. de Graeff-Meeder ER, Rijkers GT, et al., *Antibodies to human HSP60 in patients with juvenile chronic arthritis, diabetes mellitus, and cystic fibrosis*. Pediatr Res, 1993. **34**(4): p. 424-8.
124. de Graeff-Meeder ER, van Eden W, et al., *Juvenile chronic arthritis: T cell reactivity to human HSP60 in patients with a favorable course of arthritis*. J Clin Invest, 1995. **95**(3): p. 934-40.
125. Prakken AB, van Eden W, et al., *Autoreactivity to human heat-shock protein 60 predicts disease remission in oligoarticular juvenile rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1996. **39**(11): p. 1826-32.

126. Vanags D, Williams B, et al., *Therapeutic efficacy and safety of chaperonin 10 in patients with rheumatoid arthritis: a double-blind randomised trial*. Lancet, 2006. **368**(9538): p. 855-63.
127. Anderton SM, van der Zee R, et al., *Activation of T cells recognizing self 60-kD heat shock protein can protect against experimental arthritis*. J Exp Med, 1995. **181**(3): p. 943-52.
128. Prakken BJ, Samodal R, et al., *Epitope-specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(12): p. 4228-33.
129. Kamphuis S, Kuis W, et al., *Tolerogenic immune responses to novel T-cell epitopes from heat-shock protein 60 in juvenile idiopathic arthritis*. Lancet, 2005. **366**(9479): p. 50-6.
130. Perilloux BC, Shetty AK, et al., *Antinuclear antibody (ANA) and ANA profile tests in children with autoimmune disorders: a retrospective study*. Clin Rheumatol, 2000. **19**(3): p. 200-3.
131. Foeldvari I, *Rheumatologische Erkrankungen: Diagnosewege im Kindesalter*. Deutsches Ärzteblatt, 1999. **96**(51-52): p. A3288-A3290.
132. Ravelli A, Felici E, et al., *Patients with antinuclear antibody-positive juvenile idiopathic arthritis constitute a homogeneous subgroup irrespective of the course of joint disease*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(3): p. 826-32.
133. Avcin T, Cimaz R, et al., *Prevalence and clinical significance of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in juvenile idiopathic arthritis*. Ann Rheum Dis, 2002. **61**(7): p. 608-11.
134. Ferucci ED, Majka DS, et al., *Antibodies against cyclic citrullinated peptide are associated with HLA-DR4 in simplex and multiplex polyarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(1): p. 239-46.
135. Shoenfeld Y and Toubi E, *Protective autoantibodies: role in homeostasis, clinical importance, and therapeutic potential*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(9): p. 2599-606.
136. Kaneko Y, Nimmerjahn F, et al., *Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation*. Science, 2006. **313**(5787): p. 670-3.
137. Oettinger MA, Schatz DG, et al., *RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination*. Science, 1990. **248**(4962): p. 1517-23.
138. Southern EM, *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. J Mol Biol, 1975. **98**(3): p. 503-17.
139. Bell J and Gray D, *Antigen-capturing cells can masquerade as memory B cells*. J Exp Med, 2003. **197**(10): p. 1233-44.
140. Schatz DG, Oettinger MA, et al., *V(D)J recombination: molecular biology and regulation*. Annu Rev Immunol, 1992. **10**: p. 359-83.
141. Lin WC and Desiderio S, *Cell cycle regulation of V(D)J recombination-activating protein RAG-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(7): p. 2733-7.
142. Lin WC and Desiderio S, *V(D)J recombination and the cell cycle*. Immunol Today, 1995. **16**(6): p. 279-89.
143. Cebrat M, Miazek A, et al., *Identification of a third evolutionarily conserved gene within the RAG locus and its RAG1-dependent and -independent regulation*. Eur J Immunol, 2005. **35**(7): p. 2230-8.

144. Ceuppens JL, Rodriguez MA, et al., *Non-steroidal anti-inflammatory agent inhibit the synthesis of IgM rheumatoid factor in vitro*. Lancet, 1982. **1**(8271): p. 528-30.
145. Forre O, Thoen J, et al., *Non-steroidal anti-inflammatory drugs in rheumatoid arthritis. Effects on clinical parameters and cellular immunity*. Inflammation, 1984. **8 Suppl**: p. S109-13.
146. Cush JJ, Jasin HE, et al., *Relationship between clinical efficacy and laboratory correlates of inflammatory and immunologic activity in rheumatoid arthritis patients treated with nonsteroidal antiinflammatory drugs*. Arthritis Rheum, 1990. **33**(5): p. 623-33.
147. Forre O, Thoen J, et al., *Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on the immune network*. Semin Arthritis Rheum, 1983. **13**(1 Suppl 1): p. 130-3.
148. O'Meara A, Headon B, et al., *Effect of methotrexate on the immune response in children with acute lymphatic leukaemia*. Immunopharmacology, 1985. **9**(1): p. 33-8.
149. Neshor G and Moore TL, *The in vitro effects of methotrexate on peripheral blood mononuclear cells. Modulation by methyl donors and spermidine*. Arthritis Rheum, 1990. **33**(7): p. 954-9.
150. Nakajima A, Hakoda M, et al., *Divergent effects of methotrexate on the clonal growth of T and B lymphocytes and synovial adherent cells from patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 1996. **55**(4): p. 237-42.
151. Wascher TC, Hermann J, et al., *Cell-type specific response of peripheral blood lymphocytes to methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis*. Clin Investig, 1994. **72**(7): p. 535-40.
152. Lacki JK and Mackiewicz SH, *[The effect of immunosuppressive drugs on expression of surface antigens of lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis]*. Pol Arch Med Wewn, 1997. **97**(2): p. 134-43.
153. Bohm I, *Decrease of B-cells and autoantibodies after low-dose methotrexate*. Biomed Pharmacother, 2003. **57**(7): p. 278-81.
154. Bohm I, *Increased peripheral blood B-cells expressing the CD5 molecules in association to autoantibodies in patients with lupus erythematosus and evidence to selectively down-modulate them*. Biomed Pharmacother, 2004. **58**(5): p. 338-43.
155. Mundy CL, Patenge N, et al., *Assembly of the RAG1/RAG2 synaptic complex*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(1): p. 69-77.
156. Zheng X and Schwarz K, *Making V(D)J rearrangement visible: Quantification of recombination efficiency in real time at the single cell level*. J Immunol Methods, 2006.
157. Grawunder U, Schatz DG, et al., *The half-life of RAG-1 protein in precursor B cells is increased in the absence of RAG-2 expression*. J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1731-7.
158. Krangel MS, *Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond*. Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 624-30.
159. Hesslein DG and Schatz DG, *Factors and forces controlling V(D)J recombination*. Adv Immunol, 2001. **78**: p. 169-232.
160. Bassing CH, Swat W, et al., *The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination*. Cell, 2002. **109 Suppl**: p. S45-55.

161. Schlissel MS, *Regulating antigen-receptor gene assembly*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(11): p. 890-9.
162. Hsu LY, Loring J, et al., *A conserved transcriptional enhancer regulates RAG gene expression in developing B cells*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 105-17.
163. Hu H, Wang B, et al., *Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development*. Nat Immunol, 2006. **7**(8): p. 819-26.
164. Ohmori H, Magari M, et al., *Role for complement receptors (CD21/CD35) in the regulation of recombination activating gene expression in murine peripheral B cells*. Immunol Lett, 2002. **83**(2): p. 95-9.
165. Sen G, Bikah G, et al., *Negative regulation of antigen receptor-mediated signaling by constitutive association of CD5 with the SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells*. Eur J Immunol, 1999. **29**(10): p. 3319-28.
166. Bikah G, Carey J, et al., *CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells*. Science, 1996. **274**(5294): p. 1906-9.
167. Samuels J, Ng YS, et al., *Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis*. J Exp Med, 2005. **201**(10): p. 1659-67.

Danksagung

Ganz besonders möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hermann Girschick für die Überlassung des Themas einerseits und für die unermüdliche Unterstützung andererseits danken.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Hünig für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Ein weiterer besonderer Dank geht an Henner Morbach und Sunit Singh für die vielen Diskussionen und Gespräche zwischen Pipetten und Küvetten.

Außerdem möchte mich bei Ulrike Samfaß, Tina Schuell, Martina Rübiger und Christian Linden für die immer freundliche und allzeit flexible Unterstützung bedanken.

Für den initialen Funken und dessen Übersprung danke ich Ignaz und Istvan.

Zuletzt und doch zuallererst danke ich meiner Freundin Fabienne und meiner Familie für die extrauniversitäre Muße, die sie mir zuteil werden ließen.
