

**Aus dem Institut für Pathologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. H. K. Müller-Hermelink**

**Die B-Lymphozyten-Aktivierung  
in der osteoarthrotischen Synovialmembran -  
ein Beitrag zum molekularpathogenetischen Verständnis der Osteoarthrose**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Andreas Ruppert  
aus Amberg**

**Würzburg, Oktober 2002**

**Referent:** Prof. Dr. med. V. Krenn

**Koreferent:** Prof. Dr. med. H. Höhn

**Dekan:** Prof. Dr. med. V. ter Meulen

**Tag der mündlichen Prüfung:** 20.01.2003

**Der Promovend ist Arzt.**

## Inhaltsverzeichnis

1.	<b>Einleitung</b>	1
1.1	Definition von Osteoarthrose	1
1.1.1	Historischer Abriss der Pathogenese	1
1.1.2	Definition und Synonyme	2
1.2	Morphologie im makroskopischen Aspekt – Standarddiagnostik	2
1.3	Einteilung der Arthrosen	3
1.4	Histopathologie der Arthrose	4
1.4.1	Hyaliner Knorpel	4
1.4.2	Synovialmembran	5
1.4.2.1	Der Entzündungsprozess	5
1.4.2.2	Synovialitis-Arten und deren zelluläre Zusammensetzung	7
1.4.3	Das entzündliche Infiltrat (im Vergleich zur RA)	7
1.4.3.1	Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrats	7
1.4.3.2	Anordnung des entzündlichen Infiltrats	9
1.5	Oberflächenmoleküle bei der B-Zell-Aktivierung	9
1.5.1	Zelluläre Interaktionen im Entzündungsgeschehen	9
1.5.2	Das Oberflächenmolekül CD27 und seine funktionelle Bedeutung	10
1.6	Der Memory-B-Zell-Pool	10
1.7	Die Keimzentrumsreaktion	11
1.8	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	12
2.	<b>Material und Methoden</b>	13
2.1	Patienten, Synovialgewebe und Seren	13
2.2	Aufarbeitung des Synovialgewebes für Immunhistochemie	13
2.3	Immunhistochemie	14
2.3.1	Indirekte Immunperoxidase Technik (iIP)	15
2.3.2	Indirekte Immunperoxidase-alkalische Phosphatase-Doppelfärbung	15
2.3.3	Indirekte alkalische Phosphatase Technik (iAP)	15
2.3.4	Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	16
2.4	Molekularbiologische Methoden	17
2.4.1	DNA-Isolierung mit Higushi-Puffer-Proteaseansatz	17

2.4.2	RNA-Isolierung und denaturierende Gelelektrophorese für die RNA	18
2.4.2.1	RNA-Isolierung mit RNeasy-Kit aus Kryoschnitten	18
2.4.2.2	Denaturierende Gelelektrophorese von RNA	18
2.4.3	Reverse Transkription von mRNA in cDNA	19
2.4.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
2.4.5	Primer-Sequenzen	21
2.4.6	Agarose-Gelelektrophorese (DNA)	22
2.4.7	Aufreinigung der PCR-Produkte für die Klonierung	22
2.4.8	Auffüllen der 3'-Überhänge doppelsträngiger DNA aus der PCR	23
2.4.9	Klonierung von PCR-Produkten	23
2.4.9.1	Klonierung von PCR-Produkten in den pCR-Script Klonierungsvektor (cDNA)	23
2.4.9.2	Klonierung von PCR-Produkten in den pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vektor-System (DNA)	23
2.4.10	Herstellung der kompetenten E.coli (DH5 $\alpha$ )	24
2.4.11	Transformation der kompetenten Bakterien	24
2.4.12	Mini-Plasmid-Isolierung	25
2.4.13	Restriktionsanalyse	25
2.4.14	Automatische DNA-Sequenzierung	26
2.4.15	Auswertung der Sequenzierung	26
2.5	Verbrauchsmittel und Bezugsquellen	27
3.	<b>Ergebnisse</b>	29
3.1	Histopathologie der B-Lymphozyten und Plasmazellen in der chronischen Synovialitis der Arthrose	29
3.2	Morphologische/ immunhistochemische Analyse der B-Lymphozyten und Memory-B-Zellen	30
3.2.1	Semiquantitative Auswertung des entzündlichen Infiltrats	31
3.2.2	Qualitative Auswertung des entzündlichen Infiltrats	33
3.3	Molekulare Analyse der IgVH/L-Gene	36
4.	<b>Diskussion</b>	40
4.1	Einordnung der Synovialitis in den zeitlichen Verlauf des Krankheitsgeschehens	40

4.2	Histopathologie der Arthrose-assoziierten Synovialitis	40
4.3	Zelladhäsionsmoleküle	41
4.3.1	Das Oberflächenmolekül CD27	41
4.3.2	Das Oberflächenmolekül CD20	43
4.3.3	Das Oberflächenmolekül Syndekan	43
4.4	Immunphänotyp des entzündlichen Infiltrats	44
4.5	IgVH-Gen-Analyse; Mutationsgrade (R/S-Ratios, Homologie)	46
4.6	Schlußfolgerung aus den immunhistochemischen und den molekular- biologischen Ergebnissen	48
4.6.1	Homing von vorgebildeten Memory-Zellen	48
4.6.2	Die Adhäsionsmoleküle	49
4.6.3	Das Einwanderungsverhalten der Lymphozyten	50
4.7	Die zwei unterschiedlichen Kompartimente im entzündlichen OA- Zell-Infiltrat	52
4.7.1	Ort und Zeitpunkt der Initiierung der Memory-Zell-Entwicklung	52
4.7.2	Das „Booster-Kompartiment“	53
4.7.3	Die möglichen antigenpräsentierenden Zellen (APZ) des ektopischen Keimzentrums	54
4.8.	Pathogenesekonzepte	55
4.8.1	Einführung in die pathogenetischen Vorstellungen	55
4.8.2	Update der pathogenetischen Vorstellungen	56
4.9	Potentielle Antigene in der synovialen Entzündungsreaktion – und wodurch sie entstehen	58
4.9.1	Kollagen und der oxidative Streß	61
4.9.2	Aggrekan	62
4.9.3	Hyaluronat	63
4.10	Der genetische Aspekt, oder: können veränderte Knorpel- komponenten bzw. Reparaturmechanismen oder die fehlende HLA- Disposition die Pathogenese und den Unterschied zur RA erklären?	64
5.	<b>Zusammenfassung</b>	66
6.	<b>Literatur</b>	68
7.	<b>Abbildungen</b>	75
	Danksagung	

## Abkürzungen

APC	Antigenpräsentierende Zelle
CD	Cluster of Differentiation
COMP	Cartilage Oligomeric Protein
CRP	C-reaktives Protein
iAP	Indirekte alkalische Phosphatase Technik
Ig-	Immunglobulin-
IgVH	Immunglobulin- Variable-Region- Heavy Chain
iIP	Indirekte Immunperoxidase Technik
IL-	Interleukin-
LFA	Leucocyte Function Antigen
OA	Osteoarthrose
RA	Rheumatoide Arthritis
SAC	Staphylococcus aureus Cowan I (Antigen)
TGF	Transforming Growth Factor
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VLA	Very Late Activation Antigen