

1. Einleitung

1.1 Definition von Osteoarthrose

1.1.1 Historischer Abriss der Pathogenese

Früher wurde die Osteoarthrose (OA) als eine Erkrankung degenerativer Art betrachtet, die dem pathogenetischen Prinzip „wear and tear“ gehorcht, bei dem man kaum sofort an ein entzündliches Geschehen im Krankheitsverlauf dachte. Denn mit dieser kurzgefassten Umschreibung stellte man die pathogenetische Vorstellung vom (wörtlich:) „Abtragen und Einreißen“, also den chronisch progredienten, altersabhängigen Aspekt heraus, wobei auf übermäßige oder falsche Belastung Abnutzungserscheinungen des Knorpels folgen.

Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass bei der OA auch die anderen Strukturen eines Gelenkes in Mitleidenschaft gezogen werden, nämlich die Synovialmembran, der subchondrale Knochen, die Bänder und die periartikulären Muskeln. Das entzündliche Infiltrat in der Synovialmembran des betroffenen Gelenkes spielt eine Rolle, die nicht zu unterschätzen ist, weil es das dominierende klinische Symptom charakterisieren kann. Dies wurde schon vor über 20 Jahren bemerkt; ebenso, dass es einige Fälle von OA gibt, in denen das histologische Erscheinungsbild dem der RA und anderen chronischen Synovitiden ähnlich ist (Revell PA et al. 1988). Zu beachten gilt, dass es sich bei der synovialen Entzündung um einen sekundären Prozess handelt, der sich nach metabolischen und strukturellen Veränderungen anschließt (Altman RD et al. 1985).

Daher wird die OA heute, im von der WHO und weiteren Organisationen als „Jahrzehnt des Knochens und der Gelenke“ designierten ersten Jahrzehnt des neuen Jahrtausends, weit umfassender als ein metabolisch aktiver, dynamischer Prozeß mit Destruktion und Reparation betrachtet, der durch ein Aufgebot von biochemischen, sowie mechanischen Vorfällen getriggert wird (Brandt K. et al. 1998). Auf der einen Seite wird die Auffassung vertreten, dass unangemessene Belastung und Schädigung des Knorpels als pathogenetische Ursache den Knochen- und Knorpelzell-Metabolismus verändert, was zur Produktion von Signalmolekülen führt, die eine Knorpeldegeneration induzieren könnten; neue Ansätze dahingegen gehen davon aus, dass neben definitiv bestehenden Umweltfaktoren auch eine starke genetische Komponente eine bisher unterschätzte Rolle spiele (Senior K. 2000). Die Pathogenese ist also inzwischen wieder ein Streitpunkt.

1.1.2 Definition und Synonyme

Die Arthrose ist weltweit das häufigste Gelenkleiden mit einer maximalen Inzidenz zwischen dem 50. und dem 60. Lebensjahr, das mit weiterem Altern eine deutliche Zunahme an Prävalenz erfährt.

Definitionsgemäß ist die *Osteoarthrose (Osteoarthritis, Arthrosis deformans)* eine chronische Erkrankung, die „durch fortschreitende Degeneration und schließlich Verlust des Gelenkknorpels charakterisiert“ ist (Denk H. et al. 1996). Dies betrifft v.a. die stärker belasteten Gelenke, wie beispielsweise am häufigsten das Knie (Niethard FU et al. 1997), sowie die proximalen und distalen Interphalangealgelenke der Hand (Bouchard-, Heberden'sche Arthrose), das Daumengrundgelenk (Rhizarthrose), die ersten carpometacarpalen und tarsometatarsalen Gelenke, die Hüften und die kleinen Wirbelgelenke (Michel BA 1998).

1.2 Morphologie im makroskopischen Aspekt – Standarddiagnostik

Durch ein Mißverhältnis zwischen der lokalen mechanischen Belastung und mechanischen Belastungsfähigkeit des Gelenkknorpels kommt es, nach morphologischen Veränderungen der Chondrozyten (Zusammenballung zu „Clusters“) und der von ihnen produzierten Matrix, zur Fibrillierung und Spaltung der Gelenkoberfläche. Die sich aus anfänglichen Knorpelulzerationen entwickelnden Fissuren schreiten fort bis zum subchondralen Knochen, so dass es teilweise zur kompletten Erosion und zur sog. „Eburnation“ der Knochenoberfläche kommt. Infolgedessen entsteht eine Verdichtung / Sklerose des subchondralen Knochens und anpassungsbedingt bilden sich Osteophyten, das sind Knochenauswüchse im Bereich der Gelenkränder (Hesse I. et al. 1990). Dahingegen wird allerdings von manchen Wissenschaftlern behauptet, dass z.B. in Handgelenken schon vor den meßbaren Veränderungen im Gelenkknorpel knöcherne Veränderungen stattfinden, sowie in anderen Untersuchungen szintigraphische Anormalitäten vor radiographischen gezeigt wurden (Senior K. 2000).

Auffälligkeiten werden jedoch heutzutage im Allgemeinen radiologisch diagnostiziert, wobei zu beachten ist, dass nur ein Teil der auf genanntem Weg festgestellten Arthrosen

symptomatisch manifest ist (B. A. Michel 1998). Dahingegen treten auch Fälle ein, bei denen die beginnende OA sogar mit bildgebenden Verfahren, wie dem MRT, nicht erfaßt wird (von der Mark K. et al. 1990). Hier kann beispielsweise die Skelettszintigraphie mit ^{99m}Tc -markierten Phosphonatverbindungen eingesetzt werden, wenn z.B. eine klinisch vermutete, diskret faßbare, meist seronegative Polyarthrit im Frühstadium vorliegt (Conca W. 1996). Die Szintigraphie ist allerdings hauptsächlich zur Verifizierung des entzündlichen Aspekts der Gelenkerkrankung nötig, also eher zur Abgrenzung zu RA, bakteriellen Arthritiden usw. .

1.3 Einteilung der Arthrosen

Es wird zwischen *primären* (idiopathischen oder durch einen Knorpelbildungsdefekt entstehenden) und *sekundären* Arthrosen (mechanisch, traumatisch, durch angeborene Gelenksdeformität bedingt etc.) unterteilt. Die letzten Studien zeigen, dass die primäre OA eng verbunden ist mit zunehmendem Alter (Felson DT 1990) und übermäßiger Gelenksbelastung (Pap G. et al. 2000). Als Ursache für eine sekundäre Arthrose kommen somit Kreuzbandläsionen / Meniskusschäden, repetitive Überlastung, Adipositas (Knie), Gelenkformveränderungen nach Osteonekrosen, metabolischen Erkrankungen (Gicht, Kalziumpyrophosphatablagerung, Hämochromatose, Diabetes mellitus), ebenso wie der Zustand nach idiopathischen oder bakteriell induzierten Gelenkentzündungen und die Arthrose im Verlauf einer Hämophilie in Frage. Bei diesen Varianten besteht also grundsätzlich eine Vorschädigung und damit verminderte Belastbarkeit des Knorpels durch eine Primärerkrankung. Ebenso existierten ursächlich lokale Überbeanspruchungen aus biomechanischen Gründen, die in angeborenen oder erworbenen Gelenkinkongruenzen (Hüftsubluxation, Hüft dysplasie) und Achsenfehlstellungen (Genu varum/valgum) begründet sind.

In vielen Fällen ist eine klare Unterscheidung zwischen primär und sekundär nicht mehr möglich. Aus anatomischen Studien hat man gelernt, dass die gewichtstragenen Gelenke zum einen altersabhängige, langsam verlaufende Veränderungen durchmachen, wie z.B. Fissuren und letztendlich den Knorpel-Verlust; daraufhin folgen zum anderen altersunabhängige Veränderungen, die mit einem gesteigerten Knorpel-Metabolismus einhergehen (Niethard FU et al. 1999). Die entzündliche Komponente der OA kommt

jedenfalls sowohl bei der idiopathischen, als auch der sekundären, wie der primär generalisierten (polyartikulären) Form der OA vor (Altman R.D. et al. 1986).

Es gibt auch modernere Einteilungen gemäß der radiologischen Erscheinung in hypertrophische und atrophische Formen.

Die *hypertrophischen Formen*, deren Progression langsamer ist, zeigen einen sklerotischen Knochen, das Fehlen von Osteophyten, wenige oder keine Zeichen von Entzündung und Kontraktionen.

Bei den *atrophischen Formen* der OA, die weniger häufig sind und rapide progredieren, findet man charakteristischerweise Destruktion und Knochenverschleiß, oft kalte Ergüsse und Gelenksinstabilität (Wollheim FA 1999).

Ebenfalls denkbar ist eine Einteilung der Arthrose nach dem Reparatur-Potential der beteiligten Strukturen, um der auffallenden Heterogenität der OA gerecht zu werden, woraus sich „kompensierte“ von „dekompenzierten“ Formen (mit Symptomatik, Invalidität und Progression) ergäben (Brandt K. et al. 1998).

Nach klinischem Verlauf bezeichnet man als „stumme Arthrose“ eine röntgenologisch nachweisbare, jedoch asymptomatische Form, als „latente Arthrose“ einen Verlauf mit chronisch rezidivierenden belastungsabhängigen Beschwerden und als „aktivierte Arthrose“ den Verlauf mit akuter Exazerbation.

Allerdings lassen sich solche Untergruppen nicht so einfach klar abgrenzen, da es Übergänge zwischen ihnen gibt, verschiedene Untergruppen an verschiedenen Gelenken am selben Individuum auftauchen können, und es eine Interaktion zwischen primären und sekundären Formen gibt.

1.4 Histopathologie der Arthrose

1.4.1 Hyaliner Knorpel

Die Histopathologie des arthrotischen Gelenks offenbart meist eindeutige Charakteristika, wobei man zunächst an die augenscheinlicheren Veränderungen im

Knorpelgewebe denkt, die nach gängiger Lehrmeinung als pathologische Veränderungen am Anfang des Krankheitsverlaufs stehen (Holderbaum D. et al. 1999). Nach Unregelmäßigkeiten in der Knorpeloberfläche kommt es im Verlauf zu tieferen Knorpeldefekten, die in Folge zur „reaktiven Brutkapselbildung“ (Chondrozytennester/Cluster in der Nachbarschaft der Gewebsdefekte) führen. Letztlich können diese Vorgänge bis zum kompletten Knorpelschwund (Knochenglatze) führen. Nur am Rande sei hier auf die charakteristischen Veränderungen im unter dem Knorpeldefekt liegenden Knochen eingegangen. Hier findet man potentiell im Schnitt gelblich gefärbte keilförmig gestaltete Areale, die oberflächennahen Knocheninfarkten entsprechen (Franchi A. et al. 1992), sowie „Pseudozysten“ genannte Hohlräume (mit Hyaluronan, Knorpel- und Knochenfragmenten und Fibrin gefüllt), als Folge der ischämischen Knochennekrosen.

1.4.2 Synovialmembran

Darüberhinaus sind die fortschreitende Zerstörung der Knorpeloberfläche und die folgende Absprengung von Gewebsfragmenten nicht unwesentlich an den Veränderungen in der arthrotischen Synovialmembran (*Arthrose-assoziierte Synovialitis*) beteiligt, die als Folge der Gelenkknorpel-Destruktion angesehen werden (Fassbender HG 1987).

D.h. im Verlauf der osteoarthrotischen Veränderungen kommt es zu den im Folgenden dargestellten spezifischen Abläufen von in sich greifender Abräumaktion, Reparatur, und Restitution der extrazellulären Matrix-Organisation. Im Anschluß an diese Vorgänge reagiert die Synovialmembran als eine der beteiligten Gelenkstrukturen mit.

1.4.2.1 Der Entzündungsprozess

Die periartikuläre Entzündung ist ein frühes und manchmal sogar herausragendes Merkmal der OA und tritt bei der Mehrheit der Patienten einmal während des Krankheitsverlaufs auf. Sie ist in ihrem Auftreten unabhängig davon, ob die OA idiopathische Ursachen hat, oder durch eine andere Krankheit sekundär entstanden ist.

Besonders bei erosiver OA, die als primär generalisierte (polyartikuläre) OA auftreten kann, ist sie in verschiedenen Ausprägungen zu finden (Altman RD et al. 1985).

Die zu erwartenden Veränderungen entstehen durch Knorpelfragmente, die sich der Synovialmembran anlagern, nachdem sie sich aus dem fibrillierten und von Fissuren durchsetzten Knorpel herausgelöst haben, und zu entzündlichen „Pseudotumoren“ führen (Mohr W. 1993). Ebenso ist in Stadien, in denen ischämische Knochennekrosen auftreten, eine Beteiligung von Knochenfragmenten denkbar, die sich – wie die Knorpelteilchen - in synoviale Buchten einlagern, von Fibrin eingehüllt, und letztendlich (nach Granulationsgewebsbildung) organisiert werden. Vor allem die Knochenfragmente können von (osteoklastären) Riesenzellen umgeben sein; sie sind allerdings nicht in eine inflammatorische Reaktion eingebettet (Soren A. et al. 1988). Wenn die genannten Prozesse verstärkt auftreten, ist es möglich, dass sich sogar eine „rapid destruktive Arthritis mit neurogener Komponente“ entwickelt (Pritzker K. 1998). Teils treten noch Ulzerationen der synovialen Oberfläche und histologisch betrachtet proliferierende Fibroblasten, Fibrozyten und Fibrin, proliferierende Kapillaren, und diffuse Entzündungsinfiltrate auf (allerdings seltener als bei der RA); Hyperämie, fokale Lymphozyten-Aggregate und Ödeme allerdings häufiger als bei RA (Cooper NS et al. 1981, Soren A. et al. 1988).

Durchweg ist eine villöse Hypertrophie und eine Verbreiterung der normal einschichtigen Deckzellschicht im Synovialgewebe als Ausdruck eines Entzündungsgeschehens erkennbar. Normalerweise ist die innere Oberfläche der Gelenkkapsel glatt und durchscheinend. Mit dem Beginn der OA wird die synoviale Deckzellschicht kontinuierlicher und verbreitert sich im Rahmen der synovialen Entzündungsreaktion; so können sich auch Synovial-Zotten entwickeln. Schon in der Früh-Phase der OA beginnen die Synoviozyten Hyaluronat und proteolytische Enzyme zu bilden. Hyaluronat soll eine Retention der eingewanderten Makrophagen erleichtern, die Enzyme werden sezerniert, um die abgeschilferte Knorpel- und Knochenmatrix zu verdauen (Pritzker K. 1998).

Die Entzündungsmerkmale haben bei vielen Patienten mit progressiver OA kein klinisch auffälliges Korrelat, wie z.B. Erwärmung oder Erguß, was den *sekundär* auf metabolische oder strukturelle Veränderungen reagierenden Prozeß verdeutlicht (Altman RD et al. 1985).

Allerdings spricht man von „aktivierter Arthrose“, welche durch z.B. Schmerz und Schwellung, Steifigkeit oder Rötung des Gelenkes klinisch auffällig werden kann, wenn

sich durch den vermehrten Anfall von Knorpelabriebprodukten die Gelenkinnenhaut reaktiv entzündet (Niethard FU et al. 1997).

Zusammenfassend wird ein Zusammenhang zwischen „Gelenk-Entzündung“ und dem Fortschreiten der strukturellen Veränderungen gesehen. Belege dafür stammen aus bildgebenden Verfahren, wie dem Röntgen, dem MRT oder der Arthroskopie. Aber auch aus Verlaufskontrollen von Laborparametern, wie COMP, CRP oder Hyaluronsäure, die Konzentrationserhöhungen während der Entzündung bzw. radiographischen Veränderungen zeigen (Pelletier JP et al. 2001).

1.4.2.2 Synovialitis-Arten und deren zelluläre Zusammensetzung - Detritus- und lymphoplasmazelluläre Synovialitis

Bezüglich der Synovialitis kommen die *Detritus-Synovialitis* und die *lymphoplasmazelluläre Synovialitis* vor, die zwar die leicht ausgeprägte entzündliche Infiltration gemeinsam haben, sich jedoch hinsichtlich des Fibrosierungsgrades unterscheiden. Dieser ist bei der Detritus-Synovialitis v.a. dort, wo Knorpel- oder Knochenfragmente inkorporiert sind (die als inflammatorisch gelten), stärker ausgeprägt.

Grundsätzlich gilt für die synoviale Entzündungsreaktion, dass sie *sekundär* eintritt (sog. Begleitsynovialitis). Sie wird durch gelockerte Knorpelfragmente aus Mikrofrakturen der Gelenkplatte induziert, worauf sich eine Produktion von Matrix-Produkten anschließt.

Eine „akute inflammatorische Episode“ zeigt sich klinisch, im Sinne einer Aufpfropfung auf eine chronische OA, am häufigsten bei interphalangealer OA (Altman RD et al. 1985).

1.4.3 Das entzündliche Infiltrat

1.4.3.1 Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrats (im Vergleich zur RA)

Das *entzündliche Infiltrat* fällt zwar meist leichtgradig aus, kann allerdings in seltenen Fällen die Ausmaße wie bei der Gelenkserkrankung rheumatoide Arthritis (RA)

annehmen, und ist dann histopathologisch kaum mehr von ihr abgrenzbar (Haraoui B. et al. 1991). Die rheumatoide Arthritis jedoch ist wesensmäßig eine Immunerkrankung (Böcker W. et al. 1997) und definitionsgemäß sind RA und OA nach klinischen Gesichtspunkten grundlegend verschiedene Erkrankungen.

In der Synovialitis der OA findet man eine leicht ausgeprägte entzündliche Infiltration der Synovia durch Lymphozyten und (seltener) Plasmazellen, die hauptsächlich perivaskulär (in konzentrischer Anordnung) akzentuiert ist (Cooper NS et al. 1981, Kennedy TD et al. 1988, Revell PA et al. 1988, Soren A. et al. 1988).

Selten fallen neben diffusen Infiltraten auch sehr kleine lymphatische Aggregate auf, die aber nicht mit den lymphatischen Follikeln der RA zu vergleichen sind. Nur äußerst selten kommen im Bereich der Deckzellschicht lymphatische Follikel mit kleinen FDC-Netzwerken vor (Ristow G. et al. 1999), die T-Helfer-, T-Suppressor-, und B-Lymphozyten, als auch CD68⁺ Makrophagen enthalten, womit begleitend eine Granulozyten-Infiltration der oberflächlichen und tieferen Gewebeabschnitte assoziiert ist (Cooper NS et al. 1981, Revell PA et al. 1988, Krenn V. et al. 1999).

CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sind gleich verteilt und nicht nur in der oberen synovialen Region, sondern auch in den Aggregaten gelegen – anders als in der RA (Kennedy TD et al. 1988).

Ki67 ist ein Marker für proliferierende B-Zellen. Ki67⁺ Zellen wurden in der synovialen Deckzellschicht, der Endothelschicht der kleinen Blutgefäße und sehr selten in perivaskulären lymphozytischen Aggregaten identifiziert (Krenn V. et al. 1999). Dies bedeutet also, dass an diesen Loci nur eine geringfügige B-Zell-Proliferation stattfindet. Begleitet ist dies alles ist von moderater Fibrose (bei fortgeschrittener OA auch perivaskulär) mit chronischem ödematösen Stroma und vergrößerter synovialer Deckzellschicht.

Grundsätzlich gilt auch, dass die OA bei Pleozytose-Werten von 5000-10000 Zellen/mm³ Synovialflüssigkeit, im Gegensatz zur RA, vorwiegend mononukleäre Zellen in der Synovialflüssigkeit des Gelenkpunktats enthält (Altman RD et al. 1985, Kraan MC et al. 1999).

1.4.3.2 Anordnung des entzündlichen Infiltrats

In der Osteoarthritis gibt es hauptsächlich zwei verschiedene histopathologische Anordnungen der Entzündungszellen (Krenn V. et al. 1999):

(1) das *lympho-plasmazelluläre Aggregat* (perivaskuläre, zonale Anordnung mit zentraler Lokalisation von dicht gepackten Lymphozyten und lockerer peripherer Anordnung von Plasmazellen). CD20⁺ Lymphozyten und Syndekan-1⁺ Plasmazellen zeigen diese perivaskuläre, zonale Anordnung, unter den T-Lymphozyten sind CD8⁺ häufiger als CD4⁺, und

(2) die *plasmazellulären Gruppen* (einzelne oder in kleinen Gruppen gelegene perivaskuläre Syndekan-1⁺ Plasmazellen) in Nähe zu Kapillaren oder kleinen Blutgefäßen, in denen keine CD20⁺ Lymphozyten nachweisbar waren (Krenn V. et al. 1999).

Die lymphatischen und die Plasmazellen sind nahe der synovialen Deckzellschicht zu finden, meist in der Nähe der Fibrin-Ausschwitzungen.

1.5 Oberflächenmoleküle bei der B-Zell-Aktivierung

1.5.1 Zelluläre Interaktionen im Entzündungsgeschehen

Besonders von Interesse sind hierbei die initialen Schritte, sowie der weitere Verlauf der Entzündungsreaktion in der primär nicht immunkompetenten Synovialmembran.

Da der Beginn einer jeden Immunreaktion mit Interaktionen von B-Lymphozyten mit entweder direkt dem Antigen oder durch Kontakt mit T-Lymphozyten –bei T-Zell-abhängigen Immunreaktionen-, sowie follikulär dendritischen Zellen (FDCs) in Verbindung steht, ist es essentiell, sich mit den beteiligten Oberflächenmolekülen der interagierenden Lymphozyten auseinanderzusetzen. Erst dabei beginnt man die Mechanismen der Entstehung und Aufrechterhaltung des Entzündungsgeschehens zu verstehen. In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die B-Zellen gelegt, wohlwissend, dass es genauso Erklärungsversuche zum Vorkommen und der pathogenetischen Potenz von T-Lymphozyten in der Synovialmembran gibt.

1.5.2 Das Oberflächenmolekül CD27 und seine funktionelle Bedeutung

CD27 (Synonyme: S152, T14) ist ein Typ I Transmembran-Molekül und gehört zu der TNFR- (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-) Familie, sein Ligand CD70 (ein Typ II Transmembran-Molekül) ist TNF-ähnlich.

Es handelt sich dabei um ein Oberflächenmolekül, das in einer bestimmten (fortgeschritteneren) Phase der B-Zell-Differenzierung auftaucht (und zwar in der späten Phase der Keimzentrumsreaktion, nach der somatischen Hypermutation), und in Verbindung mit der Doppelfärbung von CD20 genau ein Differenzierungsstadium der B-Lymphozyten darstellt, und zwar die *Memory-B-Zellen* (Agematsu K. et al. 2000). Das Differenzierungsstadium Memory-B-Zelle wurde zuvor auch schon durch andere Oberflächenmoleküle bestimmt (fehlende IgD-Expression, Expression von IgG und IgA Isotypen, oder als IgD⁻CD38⁻ B-Zellen in Tonsillen (Bancherau J. et al. 1992)).

Nach neuesten Erkenntnissen ist inzwischen auch bekannt, dass sich CD27 auch noch auf Plasmazellen befindet. Es wird sogar spekuliert, dass die Interaktion von CD27 mit seinem Liganden CD70 in den späten Phasen der B-Zell-Differenzierung ein Schlüsselsignal für die Reifung von Memory-B-Zellen in Immunglobulin-produzierende Plasmazellen sei (Odendahl M. et al. 2000).

1.6 Der Memory-B-Zell-Pool

Darüberhinaus existieren inzwischen Untersuchungen des peripheren B-Zell Pool des Blutes (PB B-Zellen), die zeigen, dass mehrheitlich IgD⁺CD27⁺ B-Zellen somatisch mutierte IgVH-Gene in sich tragen, im Gegensatz zu IgD⁺CD27⁻ B-Zellen (Klein U. et al. 1998).

Weitere Untersuchungen konzentrierten sich auf die B-Zellen der sekundär lymphatischen Organe, z.B. aus der menschlichen Milz (Liu YK 1997), bei denen ebenfalls bei CD27⁺ B-Zellen typische Memory-Zell-Charakteristika festgestellt wurden. Letztendlich wurde der Schluß, CD27⁺ B-Zellen als Memory-B-Zellen zu bezeichnen, auch noch durch morphologische Kriterien (CD27⁺- sind größer als CD27⁻ B-Zellen), den Anstieg der CD27-Expression mit dem Lebensalter, hohe Level der Ig-Produktivität auf SAC plus Il-2, das Vorhandensein von Mutationen in den IgV-Regionen von IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen (Klein U. et al. 1998), und durch ihre

verstärkte Fähigkeit, sich in Plasma-Zellen zu differenzieren, festgelegt (Agematsu K. et al. 1995/2000, Kabota T. et al. 1995, Jacquot S. et al. 1997, Lens S. et al. 1998).

Wie unter 1.5 erwähnt, befindet sich CD27 auch noch auf Plasmazellen. Weitere zur Identifikation verwendete Oberflächen-Moleküle sind CD138/Syndekan-1 (auch in dieser Arbeit verwendet), CD 38, CD95, eine verminderte Expression von CD19 und CD20, sowie hypermutierte, rearrangierte VH-Gene (Odendahl M. et al. 2000).

1.7 Die Keimzentrumsreaktion

Der hierfür bestimmte Ort des Geschehens sind die Keimzentren mit ihrem speziellen mikroskopischen Aufbau, die sich in den sekundären lymphatischen Geweben (bzw. vereinzelt auch direkt in der Synovialmembran – Ristow G. et al. 1999) aus lymphozytären (Primär-) Follikeln entwickeln.

In der frühen Phase der Keimzentrumsreaktion findet eine T-B-Zell-Interaktion über die Oberflächenmoleküle CD154 (CD4⁺T-) und CD40 (B-Zelle) zum Zwecke der Expansion des Memory-Zell-Pools statt, sowie ein Kontakt der naiven B-Zelle mit der antigenpräsentierenden FDC. Hierbei kommt es zur somatischen Hypermutation der IgVH/L-Gene, um deren Affinität zu Antigenen zu verbessern.

Daran schließt sich die Interaktion CD27 (B-) mit CD70 (T-Zelle) an, die uns vorgibt, ein wesentlicher Schritt für die Differenzierung der Memory- zur Plasmazelle zu sein, was im Zusammenspiel mit IL-10 geschehen soll (Agematsu K. et al. 1999).

Die Affinitätsselektion geschieht über die Interaktion von Fas/Fas-L Kontakt, und so verlassen nur die auserwählten B-Lymphozyten als Antigen-aktiviert das Keimzentrum des lymphatischen Sekundärfollikels, die ausselektierten sterben durch Apoptose (McHeyzer-Williams MG, Ahmed R. 1999).

Die Keimzentrumsreaktion im lymphatischen Follikel dient somit der somatischen Hypermutation und der Affinitätsselektion zur Herstellung hochaffiner Gedächtnis- und Effektor-B-Zellen (Berek C. et al. 1991, Mac Lennan IC 1994, Camacho SA et al. 1998).

1.8 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

In dieser Untersuchung sollte auf molekularer Ebene der Aktivierungsgrad der synovialen B-Lymphozyten anhand der Mutationsmuster des variablen Abschnittes der schweren Ketten in den Immunglobulin-Genen (IgVH-Gene) analysiert werden.

Durch die Möglichkeit, die Memory-B-Zellen durch Immunphänotypisierung (CD20/CD27) zu lokalisieren, und deren räumliche Nähe zu Blutgefäßen festzustellen, sollte es in dieser Studie gelingen, Beiträge zum Verständnis der Immunopathogenese der Osteoarthritis zu erarbeiten.

Über Darstellungen der Memory-Zellen durch CD27/CD20-Doppelfärbungen in der OA liegen keine histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen vor.

Der immunhistochemische Befund, dass keine FDCs oder Keimzentren in der Synovialmembran vorhanden sind, verleitet zu der Überlegung, ob im Synovialgewebe keine B-Zell-Maturation stattfindet. Denn der morphologische Befund (B-Lymphozyten und Plasmazellen in unmittelbarer Nachbarschaft) legt eine lokale Differenzierung von B- zu Plasmazellen nahe.

Ziel dieser Arbeit war es,

- (1) den Mutationszustand (IgVH-Gene) von synovialen B-Lymphozyten zu analysieren und
- (2) das Expressionsmuster von CD27 zu bestimmen.

Die molekulare und immunhistochemische Analyse erlaubte somit Schlüsse auf den Ort der Antigenaktivierung, sowie das Einwanderungs- und Differenzierungsverhalten der B-Lymphozyten und -Memoryzellen zu ziehen.

Dadurch soll ein weiterer Beitrag zum Verständnis der Immunopathogenese der (sekundären) Begleitsynovialitis geliefert werden.

2. Material und Methoden:

2.1 Patienten, Synovialgewebe und Seren

Von allen Patienten, aus dem Kollektiv der untersuchten Teilnehmer dieser Studie (n=16), wurden die Kriterien des American College of Rheumatology (Altman R. et al. 1986, Arnett F. et al. 1988) erfüllt. Sie zeigten außerdem gemäß des Kellgren Stadiums (Kellgren JH und Lawrence JS 1957) die maximale Knorpeldestruktion (was dem Stadium 3 entspricht).

Das Synovialgewebe, das für die Auswertung zur Verfügung gestellt war, wurde aus arthroskopischen Eingriffen und durch offene Synovektomie als Resektat gewonnen (etwa ½ -3 Stunden nach dem operativem Eingriff). Das Material aus der Arthroskopie bestand aus kleinen, im Durchmesser etwa 3 mm-1,5 cm großen Gewebspartikeln, die im ursprünglichen Zustand weiter verarbeitet wurden. Fett- und Gelenkkapselgewebe wurde aus den Synovektomie-Präparaten entfernt, was unter sterilen Bedingungen (Sterilbank) stattfand.

Daran schloß sich die Isolation von Gewebsfragmenten (Durchmesser etwa 1,5 cm), vor allem aus den Bereichen der makroskopisch gut zu identifizierenden synovialen Deckzellschicht. Sie wurden bis zum Gebrauch bei -70°C gelagert.

2.2 Aufarbeitung des Synovialgewebes für Immunhistochemie (Kryomaterial)

Die Gewebsfragmente (Durchmesser etwa 1,5 cm) wurden unmittelbar nach der Gewebsentnahme bzw. Gewebsaufarbeitung in 4 %igem, gepufferten Formalin fixiert.

Vor der Immunhistochemie wurde eine Behandlung mit H_2O_2 -Methanol durchgeführt (70 ml Methanol + 500 μl 30 % H_2O_2). Dies geschah, um die endogene Peroxidaseaktivität, die vor allem in Granulozyten und Makrophagen vorkommt, zu hemmen.

Von schockgefrorenen Gewebsfragmenten wurden für die Immunhistochemie ca. 6 μm dicke Seriengefrierschnitte am Kryostaten angefertigt, und auf mit mit Poly-L-Lysin^R (Sigma Chemie, Deisenhofen) beschichtete Objektträger aufgebracht. Danach wurden die Schnitte drei bis zwölf Stunden lang bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend bei -70°C aufbewahrt.

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Indirekte Immunperoxidase Technik (iIP)

Zum Nachweis von CD27 und CD20 wurde die indirekte Immunperoxidase-Technik (iIP) angewendet.

Der primäre Antikörper wurde 1:100 mit 0,5 %igem BSA (bovines Serum-Albumin) verdünnt, nachdem sich diese Verdünnung als am effektivsten –was die Farbreaktion betrifft- herausgestellt hatte. Nach Waschen mit TRIS-Puffer wurde der sekundäre, peroxidase-konjugierte Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (DAKO Diagnostica, Hamburg) im Verhältnis 1:50, mit einem Gemisch aus 70 % PBS-Puffer (pH 7,4) und 30 % AB⁺Rh⁺ Humanserum verdünnt. Zur Farbreaktion wurde hier 3,3 Diaminobenzidin (=DAB ; Sigma Chemie, Deisenhofen) in 10 ml PBS-Puffer (pH 7,4) gelöst. Kurz vor Auftragen auf die Schnitte wurde 15 µl 30 %iges H₂O₂ (Merck, Darmstadt) zugesetzt, um die endogene Peroxidase-Aktivität zu unterbinden.

Die indirekte Immunperoxidase-Technik wurde in folgendem standardisierten Schema durchgeführt: zuerst wurden die Gefrierschnitte mit dem primären Antikörper (analog zur alkalischen Phosphatase Technik) je 30 min lang in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend dreimalig in Tris-NaCl-Puffer (pH 7,4) gewaschen, damit nicht gebundene Antikörper entfernt wurden. Zur Entwicklung wurden die Schnitte 10 min mit dem DAB-Substratkomplex (DAB = Diaminobenzidin) inkubiert und im Anschluß an die Substratentwicklung mit Tris-NaCl-Puffer (pH 7,4) gewaschen, um nicht verbrauchtes DAB zu entfernen. Im Resultat waren die nachzuweisenden zytoplasmatischen Antigene braun präzipitiert. Anschließend fand bei den Einfachfärbungen (nur CD20, oder nur CD27) eine 5-minütige Gegenfärbung mit Hämalaun-Lösung statt, wonach durch 15 min Spülung unter laufendem Wasser das überflüssige Hämalaun abgewaschen wurde. Schließlich wurden die Präparate mit spezieller Gelatine eingedeckt.

Damit unspezifische Reaktionen sowohl des sekundären als auch des tertiären Antikörpers an den Schnittpräparaten beurteilen werden konnten, ersetzte man in allen Fällen auch den primären monoklonalen Antikörper (mAK) durch AB⁺Rh⁺ Humanserum. Anhand dieser Kontrolle konnte auch gleichzeitig eine mögliche, trotz der H₂O₂ -Behandlung vorhandene endogene Peroxidasereaktion beurteilt werden.

2.3.2 Indirekte Immunperoxidase-alkalische Phosphatase-Doppelfärbung

Die indirekte Immunperoxidase-Technik (iIP) wurde mit der indirekten Alkalischen Phosphatase Technik (Krenn V. et al. 1996) sequentiell kombiniert, und somit eine simultane Darstellung von CD20, CD27 und Syndekan-1/CD138 (Sanderson RD et al. 1989) in verschiedenen Kombinationen erzielt.

Die Kombinationen, die vorkamen, waren CD27 mit CD20 und CD27 mit Syndekan-1/CD138 in genannter Reihenfolge, wobei jeweils der erste Kombinationspartner mit der iIP, und anschließend der zweite mit der iAP durchgeführt wurde.

2.3.3 Indirekte alkalische Phosphatase Technik (iAP)

Durch die indirekte alkalische Phosphatase Technik (iAP) wurden CD20, bzw. Syndekan-1/CD138 dargestellt.

Zu Beginn wurde mit den primären mAk inkubiert, verdünnt in 0,5 % bovinem Serumalbumin in Tris-Puffer (pH 7,4), um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

Nach 30-minütiger Inkubationszeit und mehrmaligem Spülen (3x) mit Tris-Puffer (pH 7,4) folgte eine wiederum 30 minütige Inkubation mit sekundären, biotinylierten Kaninchen anti-Maus-IgG Immunglobulinen, 1:25 verdünnt mit PBS-Puffer (pH 7,4) und 30 % AB Rh⁺ Humanserum.

Im direkten Anschluß daran wurde eine 30 min. Inkubation mit einem StreptAvidin-Biotin-Alkalische Phosphatase-Komplex durchgeführt, der vorher durch Kombination von einem Tropfen Reagenz A (StreptAvidin in PBS (pH 7,2), 0,01 M Phosphat, 0,15 M NaCl, 15 mM NaN₃), einem Tropfen Reagenz B (biotinylierte alkalische Phosphatase in 0,05 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 15 mM NaN₃ - pH 7,2) und 5 ml Tris-Puffer (pH 7,6) herzustellen war.

Das Substrat für die alkalische Phosphatasereaktion wurde nach der modifizierten Methode nach Lojda et al. 1976 hergestellt. Dazu wurden einem Reagenzien-Ansatz (A) 40 mg Fast Blue BB-Salz (Diazo-4'-amino-2', 5'-diethoxybenz-Anilid-Zink-Chlorid-Salz) mit 40 ml 0,05 M Propandiolpuffer (pH 9,7) und 1 ml N,N-dimethylformamide (DMF) verdünnt. Die Zugabe von 18 mg Levamisole bezweckte, die endogene Gewebsenzymaktivität von Alkalischen Phosphatasen zu hemmen. Der Propandiolpuffer wurde von einer „Stammlösung“ bestehend aus 10,5 g Propandiol (2

Amino-2 Methyl-Propan-1,3-Diol) in 500 ml Aq.dest., zur „Gebrauchslösung“ gemacht, indem die „Stammlösung“ nochmals auf 1 ml mit Aq. dest. aufgefüllt wurde.

In einem anderen Reagenzgemisch (B) wurde 20 mg Naphtol-AS-Phosphat in 1000 µl N,N-dimethylformamide (DMF) gelöst. Erst nach vollständiger Auflösung der Salze und Pulver und kurz bevor der Färbeprozess beginnen sollte, wurden die Gemische (A) und (B) zusammengeschüttet. Der End-pH-Wert wurde mit dem pH-Meter durch Zugabe von 1 M HCl auf pH 8,7 eingestellt. Die Lösung aus (A) und (B) wurde in Standküvetten mit den gespülten und noch feuchten Objektträgern mit Melitta®-Filterpapier filtriert und für ca. 10 bis 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Eine Tris-Puffer (pH 7,4)-Spülung für mehrere Minuten erfolgte nach jedem Inkubationsschritt, sowie auch nach der alkalischen Phosphatasereaktion, damit nicht antigengebundene Antikörper und nicht verbrauchte Entwicklerlösung entfernt werden konnten.

Vor der Eindeckung mit Kaisers® Glyceringelatine wurden die Schnitte nochmals mit destilliertem Wasser gespült.

Der Vergleich sämtlicher immunhistochemischer Doppelfärbungen mit entsprechenden parallel durchgeführten Einfachfärbungen diente als Kontrolle. Dadurch sollten doppelfärbungsbedingte Artefakte ausgeschlossen werden.

Desweiteren dienten die Einzelfärbungen zur Sicherstellung, daß die Anzahl der Zellen, die das Antigen exprimieren, durch die Doppelfärbung unbeeinflusst geblieben war. Mögliche Kreuzreaktionen der monoklonalen Antikörper des iAP-Systems mit dem primären Antikörper des zuvor durchgeführten iIP-Systems wurden durch Ersatz des primären Antikörpers des iAP-Systems mit PBS-Puffer (pH 7,4) kontrolliert und auf diesem Wege ausgeschlossen.

2.3.4 Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen (iIP und iAP)

Um die Färbungen mit den unterschiedlich umfangreichen Zellinfiltraten und den verschiedenen Farbintensitäten - die einfach blauen, den einfach braunen und die blau/braunen = schwarzen B-Lymphozyten zu beurteilen, und weitere Aussagen treffen zu können, wurden semiquantitative Einteilungen entwickelt.

Die Quantität von CD27/CD20-positiven, sowie die von doppelgefärbten CD27/CD20- oder CD27/Syndecan-1 bzw. CD138-positiven B-Lymphozyten wurde semiquantitativ erfaßt und in einer Skala von I-III graduiert.

Dabei sollte [-] = keine, [-] = wenige, [o] = einige, [+] = mehrere Zellen und [++] = reichlich Zellen bedeuten.

Was die Qualität der oben genannten Färbungen anbelangt, waren drei unterschiedliche Farbkombinationen zu erwarten, die ebenso semiquantitativ eingeteilt wurden:

braun (br) = positive iIP, *blau* (bl) = positive iAP und *dunkelbraun/schwarz* = positive Doppelfärbung (iIP und iAP).

2.4 Molekularbiologische Methoden

Es wurden sowohl eine Verarbeitung von DNA in einem nested-PCR-Verfahren, sowie von RNA in einer RT (reverse transcriptase)-PCR durchgeführt. Unterschiedliche Schritte der Präparation werden getrennt aufgeführt, Gemeinsames unter einem zusammenfassenden Punkt.

2.4.1 DNA-Isolierung mit Higushi-Puffer-Proteaseansatz

3x 8 µm dicke Schnitte wurden vom Synovia-Kryoblock des jeweiligen Patienten mit einem Kryotom abgehobelt und in ein steriles Eppendorf-Cup gegeben. Das Messer im Kryotom wurde selbstverständlich vor jedem Wechsel des Patientenmaterials gründlich mit Alkohol gesäubert, um die Verschleppung von DNA zu vermeiden.

Daraufhin wurden die Eppendorf-Cups in einer Ultrazentrifuge 5 min bei 10000 rpm abzentrifugiert, sodaß es zur Pellet-Bildung kam.

Das Pellet wurde in 20 µl DNA-Lysispuffer (nach Higushi) resuspendiert und dazu 4 µl Proteinase K (mind. 10 mg/ml) pipettiert.

Dieser Ansatz wurde mindestens für 3 Stunden oder über nacht bei 56°C im Schüttler inkubiert. Als nächstes mußte die Proteinase K 10 min bei 95°C in einem Wasserbad deaktiviert werden, um die Zellverdauung zu stoppen. Gewebsreste sollten nicht mehr vorhanden sein; wenn dies der Fall war, wurde nochmals kurz abzentrifugiert, und der Überstand abgenommen. Entweder folgte direkt im Anschluß daran die

Weiterverarbeitung auf Eis, oder der Ansatz wurde bis zum Wiedergebrauch bei -20°C eingefroren.

2.4.2 RNA-Isolierung und denaturierende Gelelektrophorese für die RNA

2.4.2.1 RNA-Isolierung mit RNeasy-Kit aus Kryoschnitten

Für die cDNA-Synthese erfolgte die Präparation von RNA durch den RNeasy-Kits von Quiagen. Die RNA wurde aus 20 Kryogewebeschnitten (kryoasserviertes Synovialgewebe; je $20\ \mu\text{m}$ Schnittdicke) entsprechend der Herstellerbeschreibung päpariert. Sämtliche Kunststoffwaren wurden vor Gebrauch autoklaviert und für die Arbeitsschritte wurden Handschuhe und Mundschutz verwendet, um jeglichen Verunreinigungsfaktor auszuschließen, da der Umgang mit RNA sehr fehleranfällig sein kann.

2.4.2.2 Denaturierende Gelelektrophorese von RNA

In 30 ml DEPC- H_2O wurden 0,27 g Agarose durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst, und danach auf 60°C abgekühlt. Im Anschluß daran wurden 1,67 ml 2 M MOPS pH 7,0 und 1,67 ml 37 % (v/v) Formaldehyd hinzugegeben und das Gel angefertigt. Die RNA wurde mit $2\ \mu\text{l}$ 37 % (v/v) Formaldehyd, $5\ \mu\text{l}$ Formamid, $2\ \mu\text{l}$ Gel-Loadingpuffer (1 % (w/v) Ficoll, 0,0025 % (w/v) Bromphenolblau, 2,25 mM EDTA, 1 mM Na-Phosphat-Puffer in DEPC- H_2O), und mit $1\ \mu\text{l}$ Ethidiumbromid (1 mg/ml) gemischt und 10 min bei 65°C denaturiert. Die Proben wurden bei 7 V/cm in RNA-Laufpuffer (100 mM MOPS, 2 % (w/v) Formaldehyd in DEPC- H_2O) im Gel für 60 - 90 min aufgetrennt. Die Kontrollgele mit Ethidiumbromid wurden im UV-Licht kontrolliert. Es kam dann ausschließlich die RNA zur Weiterverarbeitung, bei welcher die Banden ribosomaler RNA erkennbar waren.

2.4.3 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Gearbeitet wurde mit einem Gesamtvolumen von 8 μ l, das man durch Mischen von 5 μ g RNA (1-5 μ l Lösung) mit 1 μ l Oligo-dT₁₅ (1 μ g/ μ l) und 2 μ l Random Primer (40 μ M), sowie darauffolgendes Auffüllen mit H₂O erhielt. Die Denaturierung der RNA erfolgte für 10 min bei 65°C, woran sich eine Abkühlung der Probe auf Eis anknüpfte. Zu Probe wurden dann 17 μ l Mastermix, bestehend aus 5,2 μ l DEPC-H₂O, 5 μ l 5fach Reverse-Transkriptase-Puffer, 2,5 μ l dNTPs (je 10 mM), 2,5 μ l DTT (250 mM), 0,8 μ l RNasin (400 U) und 1 μ l M-MLV Reverse Transkriptase (200 U) pipettiert. Die Synthese der cDNA erfolgte für 70 min bei 37°C, beendet durch eine Erhitzung auf 95°C für 5 min.

2.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Das Volumen DNA, das dem aus 2.4.1. genanntem Proteinase-Verdau entnommen wurde, war aufgrund von immerwiederkehrenden technischen Problemen mit der Funktionalität des PCR-Verfahrens relativ variabel.

Hier soll der letzte, best-funktionierende Ansatz dargestellt werden:

Aus dem Proteinase-Verdau wurden 5 μ l entnommen, und in ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit Mineralöl beschichtet. Dann wurde kurz abzentrifugiert.

Es schloß sich eine 5-minütige Denaturation bei 95 °C an. Alle hier folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die *cDNA* (1-5 μ l) wurde mit dem PCR-Mastermix gemischt und auf 25 μ l Gesamtvolumen mit H₂O aufgefüllt. Dieser PCR-Mastermix besteht aus 2,5 μ l 10fach Taq-Polymerase-Puffer, 0,5 μ l 10 mM dNTPs, 1,5 -2 μ l 25 mM MgCl₂, je 0,5 μ l 20 pM 3' bzw. 5' Primer und 0,2 μ l Taq-Polymerase (1U).

Die *genomische DNA* sollte mit einem nested-PCR-Verfahren amplifiziert werden.

Dazu wird zu den o.g. 5 μ l DNA ein PCR-Mastermix-Ansatz pipettiert. Der PCR-Mastermix bestand aus folgenden Substanzen: 2,5 μ l 10fach Taq-Polymerase-Puffer, 0,5 μ l 10 mM dNTPs, 1,5 -2 μ l 25 mM MgCl₂, je 0,5 μ l 20 pM 3' bzw. 5' Primer und

0,2 µl Taq-Polymerase (1U). Nach dem Zusammenpipettieren und nach dem Aufteilen des Mastermixes auf die PCR-Reaktionsgefäße wurde abzentrifugiert.

Die Amplifikationsbedingungen für die verschiedenen PCR-Produkte sind in der Tabelle dargestellt.

Tab. 1: PCR-Programme für die Amplifikation der verschiedenen VH's

Produkt	Annealing in [°C]	MgCl ₂ [mM]	Extensio nszeit [sec]	Zyklen
V _H ¹ ,	60	1,5	45	35
V _H ²	65	1,5	45	35
V _H ³	65	1,5	45	40
V _H ⁴	65	1,5	45	40
V _H ⁵	60	1,5	50	40
JH1-5, JH6	55	1,5	45	40
VL2-3, JL6	50	1,5	45	40
JH1-5: JL6	65	1,5	45	40

2.4.5 Primer-Sequenzen

Die Sequenzen der PCR-Primer für die Amplifikation der variablen Region der schweren Kette wurden aus einer Veröffentlichung von Marks *et al.* (1991) entnommen.

Tab. 2: Sequenzen PCR-Oligonukleotide

Gen	Primer-Sequenz
<u>Variable Region der schweren Kette (Cryoschnitte, RNA)</u>	
V _H 1	5' CCT CAG TGA AGT <CT>TC CTG CAA GGC 3'
V _H 2	5' GTC CTG CGC TGG TGA AA<GC> CCA CAC A 3'
V _H 3	5' GGG GTC CCT GAG ACT CTC CTG TGC AG 3'
V _H 4	5' GAC CCT GTC CCT CAC CTG C<AG>C TGT C 3'
V _H 5	5' AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG A<AG>G A 3'
V _H 6	5' ACC TGT GCC ATC TCC GGG GAC AGT G 3'
J _H 1-5	5' GGT GAC CAG GGT <TGC>CC <TC>TG GCC CCA G 3'
J _H 6	5' GGT GAC CGT GGT CCC TTG CCC CCA G 3'

Zeichenerklärung: <> an dieser Stelle wurde bei der Synthese des Oligos nach dem Zufallsprinzip eines der angegebenen Nukleotide eingebaut

Variablen Region der schweren Kette (Cryoschnitte, DNA)

V _H 1	5' CCT CAG TGA AGG TCT CCT GCA AGG 3'
V _H 2	5' TCC TGC GCT GGT GAA AGC CAC ACA 3'
V _H 3	5' GGT CCC TGA GAC TCT CCT GTG CA 3'
V _H 4a	5' TCG GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC A 3'
V _H 4b	5' CGC TGT CTC TGG TTA CTC CAT CAG 3'
V _H 5	5' GGA AAA GCC CGG GGA GTC TCT GAA 3'
V _H 6	5' CCT GTG CCA TCT CCG GGG ACA GTG 3'
J _H 1-5	5' GGT GAC CAG GGT <TGC>CC <TC>TG GCC CCA G 3'
J _H 6	5' GGT GAC CGT GGT CCC TTG CCC CCA G 3'

2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese (DNA)

Nach Durchführung der PCR wurden die Proben entweder bei 4°C aufbewahrt, oder sofort ins Kontroll-Agarose-Gel pipettiert. Für die DNA-Auftrennung (Auftrennung von Restriktionsanalysen und Auftrennung von PCR-Fragmenten) wurde ein 2 % (w/v) Gel verwendet.

35 ml TAE-Puffer (40 mM Tris-Azetat, 1 mM EDTA) und 0,8 g Agarose wurden bis zur vollständigen Auflösung (klare Flüssigkeit) gekocht und anschließend, nach Abkühlung, wurden 2 µl Ethidiumbromid, das sich in die DNA interkaliert und flourogen ist; nach Durchmischung im Rührer wird das Gel gegossen. Den DNA Proben wurde 1/6 Volumen DNA-Probenpuffer (0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylen-Cyanol FF, 15 % (v/v) Ficoll 400 in H₂O) zugesetzt, und diese Mischung wurde in die Taschen des Geles pipettiert, wobei darauf geachtet werden mußte, dass die Mischung nicht durch Unachtsamkeit auf andere Geltaschen übergriff, denn die Taschen wurden innerhalb des 1x-TAE-Puffers aufgefüllt (der das Medium für die Gelelektrophorese war), weshalb erhöhte Vorsicht geboten war. Die Auftrennung erfolgte bei 5 V/cm Gel für ca. 45 min. Als Marker wurde ein 100 bp Standard (100 – 1000 bp) bzw. ein Massen-Marker (100, 200, 400, 800, 1200, 2000 bp) verwendet.

Das Gel wurde auf einem UV-Transilluminator analysiert und fotografiert. Wenn Banden auf der Höhe von 300 bp (Orientierung am Ladder/Marker) vorhanden waren, wurde nochmals eine Kontroll-PCR durchgeführt; falls diese Bestätigung brachte, wurden in dem Kontroll-Agarose-Gel die 330 bp-Banden unter UV-Transilluminator-Kontrolle exzidiert und entweder bei -20 °C gelagert, oder gleich in einem Reinigungskit aufgereinigt.

2.4.7 Aufreinigung der PCR-Produkte für die Klonierung

Die DNA aus den ausgeschnittenen 300 bp-Banden des Agarose-Gels (2 %ig) wurde anschließend mit Hilfe des Genomed Jetsorb Kits entsprechend der Herstellerbeschreibung aus dem Gel eluiert und die Konzentration in einem Agarose-Gel bestimmt.

2.4.8 Auffüllen der 3'-Überhänge doppelsträngiger DNA aus der PCR

Die c-DNA aus dem PCR-Ansatz wurde, wie gerade beschrieben, aufgereinigt. Zu 20 µl DNA (2 µg) wurden in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß 2 µl dNTP (je 10 mM), 2 µl *Pfu*-Puffer (10 fach) und 4 µl *Pfu* Polymerase (10 U) gegeben, das Gemisch mit Öl überschichtet und 30 min bei 72°C inkubiert

2.4.9 Klonierung von PCR-Produkten

2.4.9.1 Klonierung von PCR-Produkten in den pCR-Script Klonierungsvektor (cDNA)

In ein 0,5 ml Reaktionsgefäß wurden 1 µl pCR-Script Klonierungsvektor (10 ng/µl), 1 µl pCR-Script Reaktionspuffer (10fach), 0,5 µl rATP (10 mM), 4 µl gereinigtes PCR-Produkt, 1 µl *Srf*I Restriktionsenzym (5 U/µl), 1 µl T4 DNA Ligase (4 U/µl) gemischt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Daran schloß sich eine Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur, welche durch Erhitzen auf 65°C für 10 min abgebrochen wurde.

2.4.9.2 Klonierung von PCR-Produkten in den pGEM[®]-T Easy Vektor-System (DNA)

Zuerst wird der pGEM[®]-T Easy Vektor (Promega) kurz abzentrifugiert, sodass er gänzlich am Boden des Röhrchen gesammelt ist. Darauf werden 4 µl vom PCR-Produkt in einem Ansatz mit 5 µl 2x Rapid Ligation Buffer für T4 DNA-Ligase, 1 µl pGEM[®]-T Easy Vektor, 1 µl T4 DNA-Ligase (3 Weiss units/µl) gemischt und bis zu einem Volumen von 10 µl mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Es folgt eine Inkubation der Reaktionsansätze über Nacht bei 4°C, um die Maximalzahl an Transformationen zu erhalten.

2.4.10 Herstellung der kompetenten *E. coli* (DH5 α)

500 ml LB-Medium wurden mit etwa 10 Kolonien des *E. coli*-Stammes DH5 α angeimpft und bei 37°C im Bakterienrüttler bis zu einer O.D.₅₅₀ = 0,5 — 0,55 angezogen. Im Anschluß wurden die Zellen für 30 min bei 4°C inkubiert und daraufhin für 15 min mit 2.000 x g bei 4°C abzentrifugiert. Nur das Zellpellet wurde in 20 ml eiskaltem Puffer RF1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kac, 10 mM CaCl₂, 15 % (w/v) Glycerin, pH 5,8, sterilfiltriert) resuspendiert und für 20 min bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation für 9 min bei 2.000 x g pelletiert und in Puffer RF2 (10 mM RbCl, 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 15 % (w/v) Glycerin, pH 6,8, sterilfiltriert) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nach 15 minütiger Inkubation bei 4°C in Volumina von 200 μ l Aliquots auf einem Trockeneis/Äthanol-Bad in sterilen Reaktionsgefäßen eingefroren.

2.4.11 Transformation der kompetenten Bakterien

Die kompetenten DH5 α -*E. coli* mußten nach ihrer -70 °C -Lagerung zuerst auf Eis aufgetaut werden. 100 μ l der Bakterien-Suspension wurden in je ein 15 ml Röhrchen pipettiert und mit 0,7 μ l 2-Mercaptoäthanol (1,44 M) versehen. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden 4 μ l des Ligationsansatzes (PCR-Probe) hinzugegeben, und die Zellen weitere 30 min auf Eis inkubiert.

Während der 30 minütigen Inkubationszeit wurde ein SOC-Medium vorbereitet, welches unter sterilen Bedingungen mit 20 % (w/v) steriler Glukose zusammenpipettiert wurde.

Nach der Bakterien-Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock für genau 45 Sekunden bei 42°C, beendet von einer 2 minütigen Abkühlung –wiederum auf Eis.

Anschließend wurden 1000 μ l SOC-Medium zu den Proben gegeben und die Zellen für 75 min im Rotations-Wasserbad bei 37°C und 250 U/min inkubiert. 100 und 150 μ l des Transformationsansatzes wurden auf Ampicillin (50 μ g/ml)-LB-Platten, die mit 30 μ l IPTG/X-Gal/DMI-Mischung (für Laktose-Farbreaktion) unter der Sterilhütte beschichtet wurden, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für die Mini-Plasmid-Isolierung wurden am folgenden Tag 5 ml LB-Medium mit einer „gepickten“ Bakterienkolonie angeimpft, mit 5 µl Ampicillin (50 mg/ml) versehen und über Nacht im Rotations-Wasserbad (37°C) inkubiert.

2.4.12 Mini-Plasmid-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde mit der alkalischen Lysemethode nach Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Die Übernachtskultur (1,5 ml) wurde abzentrifugiert (5 min, 5.000 x g), der Überstand abgesaugt ohne dabei die Bakterien zu berühren, und das Pellet in 100 µl GET (50 mM Glukose, 10 mM EDTA pH 8,0, 25 mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert.

Die Lyse der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 200 µl Lysispuffer (0,2 M NaOH, 10 % (w/v) SDS) und darauffolgender Inkubation bei 4°C für 5 min. Zur Neutralisation wurden 150 µl 3 M Kaliumazetat pH 4,8 appliziert. Die Suspension wurde für 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Daran schloß sich die Extraktion des Überstandes mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1). Danach wurde die DNA mit 3 Volumen 100 % Äthanol ausgefällt und durch 20 minütige Zentrifugation (10.000 x g) fand die Pelletierung statt.

Nach der Trocknung des Pellets unter sterilen Bedingungen, wurden je 50 µl TE (pH 7,4) zu allen Cups pipettiert und für 5 min in ein Wasserbad (60°C) inkubiert. Es wurde bei 13000 U/min für 1 min in einer Ultrazentrifuge ein Überstand abzentrifugiert, und in 0,5er Cups pipettiert; das Pellet wurde verworfen.

2.4.13 Restriktionsanalyse

0,4 µg Plasmid wurde mit 0,5 µl Aat II und 0,5 µl Sac I Restriktionsenzymen (10-15 Einheiten) und 1 µl des entsprechenden 10fach Reaktionspuffers (Y*/TANGO®) in einem Gemisch mit 0,1 µl BSA (bovin serum albumine) für 1 h bei 37°C in einem mit Wasser aufgefüllten 10 µl Ansatz verdaut und aus diesem Ansatz 4 µl in einen 2 % Agarose-Gel aufgetrennt. Plasmide mit Insert wurden anschließend auf direktem Wege sequenziert.

2.4.14 Automatische DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch den Sequenzierautomaten (Applied Biosystems, 373). Für die Sequenzierung klonierter PCR-Produkte wurden folgende Oligos verwendet:

T₃ 5' ATT TAA CCC TCA CTA AAG GG 3'

T₇ 5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'

In einem weiteren PCR-Verfahren wurden 3 µl Plasmid-DNA, wie oben beschrieben, mit 1 µl Primer (3,2 pM), 11 µl H₂O und 5 µl Reaktionsgemisch des AbiPrism Sequencing Kits gemischt und im Thermocycler für 25 Zyklen in folgender Abfolge inkubiert:

Denaturierung	Annealing	Extension
95°C, 30 sec	52°C, 15 sec	60°C, 4 min

Zum Entfernen von Oligos und dNTPs wurde das Reaktionsgemisch über eine Sephadex G-50 Säule gereinigt. Eine 100 µl Pipettenspitze wurde bis zum oberen Rand mit Säulenmaterial beladen und für 3 min bei 2.000 x g zentrifugiert. Hierauf wurde die Probe aufgegeben und das Säulchen nochmals zentrifugiert. Die DNA wurde dann durch 2 µl Na-Azetat (pH 5,2) und 50 µl 100 % Äthanol ausgefällt und durch eine Zentrifugation bei 13.000 x g für 15 min pelletiert. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 3 µl Formamid / 25 mM EDTA (5:1) aufgenommen. Jetzt konnte die Sequenzierung im Sequenzierautomaten durchgeführt werden.

2.4.15 Auswertung der Sequenzierung

Die Sequenzen der klonierten PCR-Fragmente wurden mit Hilfe des DNAMAN (Lynnon-Software, Canada) für Windows verglichen, und eine Konsensus-Sequenz aller Klone aus beiden Leserichtungen erstellt, um Fehler zu beseitigen, welche bei der Amplifikation mit der Taq-Polymerase bzw. der Sequenzierung entstehen hätten

können. Für die Sequenzen der V_H- Fragmente wurden in der V-Base-Datenbank (http://www.genetik.uni-koeln.de/dnaplot/vsearch_human.html) bzw. in der IMGT/DNAPLOT-Gendatenbank (<http://imgt.cines.fr:8104>) und NCBI-BasicBLAST-Search ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) die entsprechenden homologen Keimbahn-Gene identifiziert und dadurch die Anzahl der Mutationen bestimmt. Durch Umschreiben der DNA-Sequenzen in Aminosäure-Sequenzen wurde dann die Anzahl der stillen Mutationen (S) und der Aminosäure-Austauschmutationen (R) ausgewertet, und R/S-Ratios errechnet.

2.5 Verbrauchsmittel und Bezugsquellen

Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, München
Anti-Human-CD27-Antikörper	PharMingen, Heidelberg
Anti-Maus-IgG-Sekundär-Antikörper (biotinylierte Kaninchen-Antikörper)	Dianova, Hamburg
DyeDeoxy Termination Cycle Sequencing Kit	Applied BioSystems, Weiterstadt
Genomed Jetsorb Kits	Fa. Genomed, Bad Oeynhausen
High Pure™ Purification Kit	Boehringer, Mannheim GmbH
JetsorbGel-Extraktions-Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
M-MLV Reverse Transkriptase	Gibco BRL, Eggenstein
Oligonukleotide	MWG, Ebersberg
pCR-Skript AMP SK(+) Cloning Kit	Stratagene, Heidelberg
pGEM®-T Easy Vektor	Promega, Madison, USA
Peroxidase gekoppelte Antikörper	DAKO, Hamburg
Restriktionsenzyme, Ribonuclease-Inhibitor	MBI-Fermentas, St.Leon-Rot
Taq-Polymerase, Nukleotide	MBI-Fermentas, St.Leon-Rot

Alle hier nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (München), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) in der höchsten Reinheitsstufe bezogen. Sämtliche Antikörper wurden von Dianova (Hamburg), Medac (Hamburg) und DAKO

(Dänemark) bezogen. Alle Plastikwaren stammten von der Firma Greiner Labortechnik (Frickenhausen).

Geräte

Aquabidest-Anlage Milli-Q Plus PF	Millipore, Eschborn
Brutschränke	Heraeus Thermotech, Hanau
DNA-Sequencer 373	Applied Biosystems, Weiterstadt
Gelelektrophoresekammer GNA 100	Pharmacia, Freiburg
Kryostat 2800 Frigocut N	Reichert-Jung, Nussloch
Minifuge T	Heraeus, Hanau
PCR-Maschine Robocycler Gradient 96	Stratagene
Rotations-Schüttler	Vortex-Genie 2, N.Y.USA
Rotations-Wasserbad	HT-INFORS AG, Bottmingen
Spannungsgerät Gene Power Supply GPS	Pharmacia, Freiburg
Sterilbank Lamin Air HLB 2448	Heraeus, Hanau

Fotodokumentation

Die Fotodokumentation der H/E und GIEMSA-Färbungen, der immunhistochemischen Färbungen (iIP, iAP und iIP+iAP) erfolgte auf AFGA[®] RSX 50. Die Photographien wurden mit einem Zeiss Axiophot[®] durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Histopathologie der B-Lymphozyten und Plasmazellen in der chronischen Synovialitis der Arthrose

Die Muster des Entzündungs-Infiltrats zeigen hauptsächlich perivaskuläre Ansammlungen, oder Nähe zur synovialen Deckzellschicht. Der Hauptanteil wird von Lymphozyten und Plasmazellen gestellt, wohingegen nur wenige Granulozyten, Mastzellen, sowie Makrophagen, Fibroblasten und Riesenzellen (um die abgesprengten Knorpel-/ Knochen-Fragmente angeordnet) zu finden sind.

In der histopathologischen Analyse wurde jedem untersuchten immunhistochemisch gefärbten Fall (n = 10) eine HE/Giemsa-Färbung gegenübergestellt (siehe Tab. 3), um die strukturelle Beschaffenheit und die Art der Entzündungsmuster besser beurteilen zu können. Es fanden sich überall charakteristische morphologische Veränderungen der durch die Entzündung veränderten Synovialmembran. Diese war leicht bis mäßig villös hypertrophiert bzw. in unterschiedlichem Ausmaß fibrosiert.

Ohne, wie unter 1.4.3.2. beschrieben, eine Isotypen-Verteilung bzw. Immunphänotyp-Bestimmung vorzunehmen, war in der HE/Giemsa-Färbung eine grobe Unterscheidung von „lympho-/plasmazellulärem Aggregat“ (Lymphozyten und Plasmazellen zeigten eine perivaskuläre, zonale Anordnung mit zentraler Lokalisation von Lymphozyten und peripherer Anordnung von Plasmazellen: Bildtafel, Abb.1) und „plasmazellulären Gruppen“ (Gruppierungen von mehreren morphologisch beurteilten Plasmazellen, in Abwesenheit von Lymphozyten, Bildtafel, Abb. 2) möglich.

In Anbetracht der zu erwartenden Lokalisation des entzündlichen Infiltrats, erwies sich eine hauptsächlich perivaskulär betonte Ansammlung von lymphozytären Zellen als stimmig (9/10 Fällen).

Relativ häufig (6/10) waren kleine, locker strukturierte lymphatische Aggregate nachweisbar (ar-02/-06/-07/-12/-13/-14), die jedoch nicht als Keimzentren einzuordnen waren (kein Nachweis von Ki-M4⁺ FDCs zusammen mit peripher lokalisierten CD20⁺ B-Lymphozyten, Ristow G. et al. 1999). Inkorporation von Knorpel-/ Knochenfragmenten war durchwegs zu beobachten.

Tab. 3: Einordnung der untersuchten Synovialgewebeproben, nach Entzündungsgrad und Verteilungsmuster der B-Lymphozyten

Patient-Nr.	Geschlecht und Alter	Verteilungsmuster	
		lympho-plasmazelluläres Infiltrat	Plasmazelluläre Gruppen
ar-02	w, 68 Jahre	o	o
ar-06	w, 82 Jahre	o	o
ar-07	w, 77 Jahre	o	o
ar-09	w, 82 Jahre	-	(-)
ar-11	w, 74 Jahre	-	(-)
ar-12	m, 60 Jahre	+	+
ar-13	w, 79 Jahre	+	o
ar-14	w, 72 Jahre	o	o
ar-15	w, 78 Jahre	-	o
ar-16	w, 58 Jahre	-	o

Zeichenerklärung: - = negativ,
 (-) = wenig,
 o = mäßig,
 + = viel

3.2 Morphologische/immunhistochemische Analyse der B-Lymphozyten und Memory-B-Zellen

Durch die simultane Darstellung der Oberflächenmarker CD20 (blaue) und CD27 (braune Färbung), welche die

- CD20⁺ B-Lymphozyten *blau* (Einfachfärbung), und die
- Memory-B-Zellen *schwarz* („doppelpositiv“) zur Darstellung brachte, war eine semiquantitative und –qualitative Auswertung möglich.

3.2.1 Semiquantitative Auswertung des entzündlichen Infiltrats

In Tabelle 4 soll die Anzahl der einfach braun (CD27⁺), einfach blau (CD20⁺) und schwarz (braun *und* blau = doppelpositiv für CD27 und CD20) gefärbten B-Lymphozyten semiquantitativ klassifiziert werden.

Tab. 4: Verteilungsmuster der immunhistochemisch gefärbten B-Lymphozyten – semiquantitativ erfasst

Patient-Nr.	einfach CD20 ⁺ /blau		einfach CD27 ⁺ /braun		Koexpression von CD27 ⁺ /CD20 ⁺ schwarz	
	follikel-ähnlich	Gruppe *	follikel-ähnlich	Gruppe *	follikel-ähnlich	Gruppe *
ar-02	o	(-)	o/+	(-)/o	(-)	+
ar-06	o	-	o	o	(-)	+
ar-07	o	-	+	+	(-)/o	+(+)
ar-09	n.v.	(-)/o	n.v.	o	n.v.	o
ar-11	n.v.	(-)/o	n.v.	(-)	n.v.	o
ar-12	+	-	o	+	-	o
ar-13	+	(-)	++	o/+	(-)	+
ar-14	n.v.	n.v.	n.v.	o/+	n.v.	n.v.
ar-15	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
ar-16	n.v.	(-)	n.v.	o	n.v.	+

braun (= positive iIP/CD27⁺) ≈ aktivierte B-/T-Zellen, oder Plasmazellen (s.o.),
 blau (= positive iAP/CD20⁺) ≈ naive B-Zellen und
 dunkelbraun/schwarz = positive Doppelfärbung (iIP und IAP) ≈ memory-B-Zellen;

- =negativ, (-) =wenig, o =mäßig, + =viel
 n.v. (=nicht vorhanden), *n.b.* (=nicht beurteilbar)

* Gruppe: i.S.v. lymphozytärem Infiltrat, das wesentlich kleiner ist, als die follikelähnlichen Aggregate, und perivaskulär akzentuiert ist.

Die dargebotene Übersicht bietet einen Einblick in die Verteilung der B-Lymphozyten in Anbetracht der zwei charakteristischen Zellansammlungen: die eher *follikulär geartete Formierung* der Lymphozyten (Bildtafel, Abb.3, 7), d.h. eine rundlich gestaltete Zusammenballung der Zellen, die einem Follikel nahe kommt (allerdings ohne die wesentlichen Kriterien, wie z.B. das Vorkommen von FDC's); und die weiter unten im Text näher spezifizierten „*Gruppen*“ (Bildtafel, Abb. 2, 4), die wesentlich kleinere lymphozytäre Ansammlungen, perivaskulär akzentuiert, beschreiben sollen.

Die Anzahl der CD20⁺ B-Lymphozyten variierte in den Bereichen der Ansammlung lymphatischer Zellen relativ stark. Sie war, auf die *Gesamtheit des Schnittbildes* bezogen, meist etwas geringer als die der braun gefärbten Lymphozyten (wenn man die bläuliche Hintergrundfärbung subtrahiert), und die einfach gefärbten (blaue/braune) übertrafen jeweils mengenmäßig die schwarz doppelgefärbten CD20⁺/CD27⁺ Memory-B-Zellen.

Eine CD20-Positivität stellt B-Lymphozyten spezifisch dar und wird auf Plasmazellen nicht mehr exprimiert. Ein Überwiegen der für CD20 erwarteten *Blau-Färbung* war unter den beurteilbaren Färbungen vor allem in den follikulären Anordnungen erkennbar (ar-02/-06/-12/-13). Fünf Fälle wiesen diese Morphologie auf. Nur die Präparate ar-09 und ar-11 zeigten ein Vorkommen von mäßig angereicherten CD20⁺ Zellen in den perivaskulären „*Gruppen*“. „*Gruppen*“ waren in jeder der *beurteilbaren* Färbungen auffindbar (9/10).

Einfach *braun gefärbte* CD27⁺ Lymphozyten zeigten in Relation zu den anders gefärbten Zellen eine ausgewogene, meist diffuse Verteilung auf die oben genannten Strukturmuster. Bei den Präparaten ar-09 und -14 (2/9) waren braun gefärbte Lymphozyten *nur* in den „*Gruppen*“ nachzuweisen, nicht in den follikulären Anordnungen. Der Anteil der braunen CD27⁺-Zellen in den follikulären Anordnungen war nahezu so hoch bzw. meist höher als der der blauen CD20⁺ B-Zellen (Bildtafel, Abb. 3). In einem untersuchten Fall (ar-02), war sogar in einer follikelähnlichen Formation nur eine einzige blaue CD20⁺ B-Zelle vorhanden (Bildtafel, Abb. 5).

Die *schwarz angefärbten* CD27⁺/CD20⁺ B-Lymphozyten dominierten das Zellbild v.a. in den perivaskulären Gruppen (ar-02/-06/-07/-13 und -16). Hier stellten sie mit den

braun gefärbten den Hauptanteil und waren den blauen semiquantitativ erfaßt überlegen (Bildtafel, Abb. 4, 6). In ar-07 fand sich eine mäßige Anreicherung von „schwarzen“ Lymphozyten in follikulären Strukturen, in ar-02/-06/-13 waren wenige CD27⁺/CD20⁺ Lymphozyten auszumachen.

Das Präparat ar-15 zeigte aufgrund von schlechter Materialbeschaffenheit durch Alterung oder durch Verzögerung beim Vorgang der Materialgewinnung keine auswertbare Anfärbung, und wurde nicht in die endgültige Auswertung miteinbezogen.

3.2.2 Qualitative Auswertung des entzündlichen Infiltrats

Einfach CD27⁺ (*braune*) Zellen stellen die Gruppe der aktivierten B-Lymphozyten, als auch T-Lymphozyten. Abhängig vom morphologischen Aspekt der CD27⁺ gefärbten Zelle, kann es sich bei vergleichsweise größeren Zellen auch um Plasmazellen handeln (Bildtafel, Abb. 5). Dies allerdings wurde in separaten CD27/Syndekan-1 Färbungen dargestellt (s.u.).

Bei der Auswertung der Doppelfärbungen waren spezielle Muster von B-Lymphozyten in den drei möglichen Farbgebungen zu entdecken.

Zum einen war dies in den *follikelähnlichen Strukturen* ein Überwiegen von braun gefärbten Lymphozyten, das besonders im Zentrum dieser Strukturen auffiel (3/9). Es waren auch Formationen erkennbar, die rein nach ihrem Färbeverhalten stark an den typischen Aufbau eines Keimzentrums mit dark zone und light zone erinnerten, da sie zusammengeballte Zonen brauner, halbmondförmig bis konzentrisch umringt von einer Zone hauptsächlich blau gefärbter Zellen zeigten (ar-02, -07, -13). Es traten eher geringere Anzahlen von schwarz gefärbten Memory-Zellen in den Randbereichen der follikelartigen Strukturen auf (ar-07, -13). Dabei bleibt zu beachten, dass aufgrund der variablen Schnittführung durch die Zellansammlungen, als systematischer unveränderbarer Fehler, die teils zonale Anordnung der gefärbten Lymphozyten durchaus verändert im Vergleich zum *in vivo*-Zustand erscheinen kann.

Die tendenziell rundlichen, größeren Zellanhäufungen nennen wir (I) **die follikelähnliche Formation (FäF)** (Bildtafel, Abb. 7).

Andererseits war ein weiteres Muster erkennbar, das sich von gerade erwähntem deutlich unterschied. In diesem waren perivaskulär relativ kleine Einzelzellinfiltrate (vergleichbar den unter Abschnitt 1.4.3.2. beschriebenen Plasmazellulären Gruppen) zu finden. Innerhalb dieses Musters war der Anteil der blau gefärbten B-Lymphozyten, im Gegensatz zu den schwarz gefärbten, viel geringer bis verschwindend gering (siehe Tab. 4), die „schwarzen“ dominierten das Bild (6/9) und befanden sich näher am Gefäß als die weiter entfernten blauen (in dem Fall ihres Vorhandenseins; Bildtafel, Abb. 4, 6, 8). Dabei waren manchmal ausschließlich schwarze, doppelgefärbte CD27⁺/CD20⁺ Memory-Zellen um ein Gefäßlumen angeordnet (Bildtafel, Abb. 4). Deshalb wird diese Konfiguration (II) aus aktivierten Memory-Zellen (*erhöhte Prävalenz perivaskulärer Memory-Zellen* – „PMZ“) deutlich von der FäF abgegrenzt und findet in der Diskussion eine Interpretation.

Perivaskulär ist der Vorgang der Extravasation im Schnittbild direkt zu beobachten, d.h. viele braune und schwarz gefärbte Zellen befanden sich hier um die Arteriolen und Kapillaren.

Plasmazellen, durch CD27/Syndekan-1 Doppelfärbung schwarz dargestellt, waren direkt in der Nähe eines Gefäßes entweder konzentrisch oder longitudinal (je nach Schnittebene) um dieses, ohne erwähnenswertes Begleitinfiltrat angeordnet (Bildtafel, Abb. 2, ohne Syndekan: Abb. 1).

In 6/9 Fällen fand sich ein häufigeres Vorkommen von PMZ gegenüber den FäF, bei einem Patienten war das Häufigkeitsverhältnis ausgewogen (ar-02), und einmal (ar-13) dominierten FäF das Bild (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Vergleichende Darstellung der immunhistochemischen Doppelfärbungen mit den HE-Färbungen beim gleichen Patienten

Patient-Nr.	Infiltrat-Qualität (iIP und iAP)		Verteilungsmuster (HE)	
	FäF [#]	PMZ/ IaM*	lympho- plasma- zelluläres Infiltrat	Plasma- zelluläre Gruppen
ar-02	++	++	0	0
ar-06	(+)	++	0	0
ar-07	+	+	o	o
ar-09	-	+	-	(-)
ar-11	-	+	-	(-)
ar-12	(-)	+	+	+
ar-13	++	+	+	o
ar-14	-	(+)	o	o
ar-15	n.b.	n.b.	-	o
ar-16	-	+	-	o

- =negativ, (-) =wenig, o =mäßig, + =viel

n.v. (=nicht vorhanden), n.b. (=nicht beurteilbar)

follicelähnliche Formation

*erhöhte Prävalenz von perivaskulären Memory-Zellen (PMZ)

⇒ „Immigration aktivierter Memory-B-Lymphozyten“ (IaM) in der Diskussion

Wie bereits unter 3.2.2 erwähnt, existieren immunhistochemisch starke Ähnlichkeiten zwischen den Memory-Zell-Anordnungen, die direkt einwanderten (siehe (II)/PMZ) und den *Plasmazellulären Gruppen* in Tabelle 3 (siehe unter: Verteilungsmuster).

Bei beiden Formationen finden wir die reiferen Stufen der B-Lymphozyten in direkter Nachbarschaft zu kleinen Gefäßen. Plasmazelluläre Gruppen sind in 8 von 10 Fällen vorhanden, PMZs in allen auswertbaren Schnitten. Die Betrachtungsweise der spezifischen Anordnung der lymphatischen Zellen im osteoarthrotischen Synovialgewebe ist jedoch einmal eher funktionell (PMZ), einmal morphologisch (Plasmazelluläre Gruppen) zu sehen.

3.3 Molekulare Analyse der IgVH/L-Gene

Von neun der insgesamt 11 analysierten Osteoarthrose-Patienten wurden durch direkte RNA-Isolation aus Kryogewebsschnitten und darauffolgender RT-PCR 20 verschiedene Klone gewonnen. Von zwei weiteren Patienten wurden mittels eines nested-PCR-Verfahrens 6 verschiedene Klone aus DNA sequenziert, so dass insgesamt 26 Klone zum Auswerten zur Verfügung standen. Für die Auswertung der R/S-Ratio und des Homologiegrades waren es pro angewendetem PCR-Verfahren ein Klon weniger (also insgesamt zwei), da sich die Basensequenz von ar-04/Klon8 und ar-10/Klon170 als nicht funktional erwiesen.

Die IgVH-Regionen wurden mit spezifischen Primern für die VH-Familien (eins bis sieben) in getrennten Ansätzen amplifiziert. Nachdem die PCR-Ansätze im Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt worden waren, konnten die DNA-Fragmente (Größe etwa 300 –350 Bp) den VH-Familien der verwendeten VH-Gene zugeordnet werden. Die PCR-Fragmente wurden eluiert und in den pCR-Script-Vektor kloniert. Die klonierten PCR-Fragmente wurden von beiden Seiten mit T3- und T7-Primern sequenziert. Alle Sequenzen konnten mit Hilfe der V-Base-Datenbank den homologen Keimbahngenen zugeordnet, und die Mutationen identifiziert werden. Indem man die abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen aus den untersuchten DNA-Sequenzen mit den Aminosäure-Sequenzen der Keimbahnkonfiguration verglich, konnte die Anzahl der "stillen" und der "Austausch-" Mutationen der Aminosäuren festgelegt werden.

Als Maß für eine antigeninduzierte Affinitätsmutation sollte die Anzahl von somatischen Mutationen in den CDR-Regionen der IgVH-Gene und das numerische Verhältnis von "stillen" Mutationen (S) zu "Austausch-" (R) Mutationen ($=R/S$) in den CDR-Regionen gelten (Berek C. et al. 1991). Dabei werden vor allem das gemeinsame Vorkommen von R/S Werten in den CDR-Regionen höher als 2,9 und in den FR-Regionen geringer als 1 als ein eindeutiges Kriterium für eine antigengetriebene Affinitätsmutation von B-Lymphozyten angesehen (Shlomchik MJ et al. 1987, Chang B. et al. 1994).

Tab. 6: Ergebnisse aus der IgVH-Gen-Analyse

Patient	Clone	V _H -Familie	Keimbahnen *Allel	Homologie	V-seg								D-seg	J-seg
					CDR ₁₊₂				FR _{1→3}					
					R	S	R/S	Mf	R	S	R/S	Mf		
ar-01	38	VH3	49*01	77%	12	1	12	13	31	8	3,88	39	-/-	-/-
ar-02	30	VH2	5*05	97%	2	1	2	3	3	0	3#	3	-/-	-/-
	32, 34	VH1	8*01	96%	1	1	1	2	4	1	4	5	-/-	-/-
	31,35	VH1	46*01	84%	8	1	8	9	11	3	3,67	14	-/-	-/-
	33	VH1	3*01	93%	5	1	5	6	10	4	2,5	14	DH3	JH4
ar-03	93	VH1	2*02	93%	5	0	5*	5	6	0	6#	6	-/-	-/-
	94	VH1	46*02	78%	5	1	5	6	13	4	3,25	17	DH7	JH4
ar-04	1	VH3	66*01	88%	2	3	0,67	5	11	4	2,75	15	-/-	-/-
	5	VH1	18*01	94%	4	0	4*	4	2	3	0,67	5	DH3	JH4
	7	VH1	18*01	91%	7	0	7*	7	15	3	5	18	-/-	-/-
	8	VH3	30*14	Nicht funktional wegen Stopcodons								-/-	-/-	
	9	VH3	66*01	88%	2	3	0,67	5	10	5	2	15	DH2	JH4
ar-05	7	VH3	23*01	88%	2	5	0,4	7	10	7	1,43	17	DH4	JH4
ar-06	41, 45	VH1	69*01	94%	4	0	4*	4	6	4	1,5	10	-/-	-/-
	42	VH1	69*05	94%	3	1	3	4	4	7	0,57	10	-/-	-/-
	43, 44	VH1	2*02	93%	5	0	5*	5	4	2	2	6	-/-	-/-
	46	VH1	46*02	86%	7	1	7	8	13	2	6,50	15	-/-	-/-
ar-07	111, 116	VH1	18*01	93%	5	0	5*	5	7	2	3,5	9	-/-	-/-
ar-08	70	VH3	23*01	84%	6	2	3	8	12	6	2	18	DH4	JH4
	72	VH3	7*01	99%	2	0	2*	2	1	0	1#	1	-/-	-/-
	122, 124, 127	VH1	3*01	94%	4	1	4	5	4	5	0,8	9	-/-	-/-
ar-09	80	VH1	3*01	93%	2	1	2	3	8	5	1,6	13	-/-	-/-
ar-10	167	VH3	11*01	79%	5	1	5	6	13	4	3,25	17	DH5	JH6
	170	VH3	49*02	Nicht funktional wegen Stopcodons								-/-	JH6	
	180	VH4	31*02	85%	4	1	4	15	11	6	1,83	17	-/-	-/-
ar-11	210	VH3	49*01	81%	13	2	6,5	5	18	7	2,57	25	-/-	-/-

: um die R/S-Ratios vergleichbar zu machen, wurde in den undefinierten Brüchen 0 im Nenner durch 1 ersetzt

Abkürzungen: -seg (-segment), CDR (Complementary Determining Region),
R (Replacement), S (Silent), R/S (R/S-Ratio),
Mf (Mutationsfrequenz)

Die Anzahl der somatischen Mutationen variiert von Fall zu Fall entschieden (Standardabweichung von 2,64 in den CDR's bis 1,55 in den FR's). Aus den ersichtlichen Mutationen (Silent/Replacement) wurden - nach Summation derer - Mittelwerte errechnet, die weiteren Aufschluß über den Durchschnitt der Antigenaktivierung lieferten.

In den CDR(1+2)-Regionen ergab sich eine R/S-Ratio von 4,22 im Mittel, in den FR-Regionen eine R/S-Ratio von 2,72.

Es war eine deutliche Dominanz im Hinblick auf die Verwendung von VH-Familien erkennbar. Auffallenderweise VH 1-Familie war signifikant am häufigsten vertreten (14/26). An zweiter Stelle der Häufigkeitsverteilung stand die Verwendung von VH 3 (10/26). Die Familien VH2 und VH4 waren jeweils nur ein Mal vertreten.

Die Häufigkeit der Fälle, in denen $R/S > 2,9$ in den CDR(1+2)-Regionen der einzelnen Klone war, betrug 17/24. Der Mittelwert der R/S-Ratios in den CDR's war 4,22, die Standardabweichung 2,64.

Die R/S-Ratio in den FR-Regionen wurde nur drei Mal mit geringer als 1 berechnet, in einem weiteren Fall betrug sie genau 1.

Aus der Reihe fallen vier Klone, bei denen die R/S-Ratios in den FR's 4; 5; 6 und 6,5 waren. Der Mittelwert in den FR's war hier 2,72, die Standardabweichung 1,55.

Als Schluß kann daraus durchaus gezogen werden, dass die analysierten Klone als Antigen-aktiviert und in ihrer primären Antikörperstruktur verändert (Berek C., Milstein C. et al. 1987) anzusehen sind, da die hohen R/S-Ratios in den CDR's im Mittel höher als die theoretische zufällige R/S-Rate von 2,9 in Nukleotid-Sequenzen unendlicher Länge (Shlomchik MJ et al. 1987) war. Das Kriterium für antigeninduzierte Affinitätsmaturation von Berek C. et al. (1991), dass die FR's Mutationsraten kleiner dem Wert 1 in den FR-Regionen aufweisen müßten, ist hier größtenteils nicht erfüllt.

Bestätigung für die Antigenaktivierung findet sich bei Betrachtung der Homologie. Hier wurden die erhaltenen Patienten-Sequenzen durch das IMGT-Analyseprogramm mit den Keimbahngenen, denen sie am ähnlichsten waren, verglichen. Dabei fällt grundsätzlich bei den Klonen, die eine Homologie von $<90\%$ zu ihren Keimbahngenen aufweisen, auf, dass gerade auch diese Klone eine R/S-Ratio von $>2,9$ haben. Dies sind

im einzelnen: ar-01 (Klon 38), ar-03 (Klon 94) und ar-10 (Klon 167) mit R/S-Ratios von 12, 5, und 5, die sogar eine Homologie von <80 % haben, und ar-02 (Klon 31,35), ar-03 (Klon 94), ar-06 (Klon 46), ar-08 (Klon 70), ar-10 (Klon 180) und ar-11 (Klon 210) mit R/S-Ratios von 3 bis 8 mit Homologien von 81-86 %.

Auf zwei Klone ist im Besonderen hinzuweisen, denn hier fällt eine deutliche Übereinstimmung der Mutationsfrequenzen und der Homologie auf. Dies sind ar-01/Klon 38 mit einer sehr hohen Mutationsfrequenz (Mf) von 13 (CDR) und 39 (FR), sowie einer sehr geringen Homologie von 77 %. Im Gegensatz dazu steht ar-08/Klon 72 mit einer niedrigen Mf von 2 (CDR) und 1 (FR), sowie einer Homologie von 99 %.

Die Variabilität in Verwendung von Keimbahngenen (die man durch Vergleich des erhaltenen Klons mit dem nahestehendsten Keimbahngen erhielt) war groß. Es kamen jedoch immer wieder auch zwei bis drei gleiche Keimbahngene bei *verschiedenen* Patienten vor. Dies waren (mit Angabe der Anzahl verschiedener Patienten, bei denen sie auftauchten): 2*02 (2x), 3*01 (3x), 18*01 (3x), 23*01 (2x), die Gruppe 46 mit 46*01 (1x) und 46*02 (2x) und 49*01 (2x).

JH-Gene waren bei 8 von 26 Klonen nachweisbar, wobei sich eine deutliche Dominanz für JH4 (6/8) zeigte, der Rest waren 2 aus der Familie JH6. Die verwendeten JH-Segmente sind also JH4 und JH6, was man auch bei einem normalen Immunglobulin-Repertoire eines Erwachsenen erwartet hätte (Ravetch JV et al. 1981).

In den Klonen 8 (ar-04) und 170 (ar-10) kommen Stop-Codons vor. Jedesmal handelt es sich hierbei um die Basenfolge TGA, die bei ar-04 (Klon 8) gleich vier Mal auftaucht, wobei erwähnt werden muß, dass sich nach dem ersten TGA-Stopcodon eine Rasterverschiebung ergibt, denn hierauf sind alle Triplets „mutiert“, bzw. nonsense.

RGYW-Hotspots, die die Abfolge von R = Purin, G = Guanin, Y = Pyrimidin, W = Adenin bzw. Thymin beschreiben (nach Dörner T. et al. 1997), tauchen in Klon 8 zwei Mal (AGTA; GGCA), und in Klon 170 auch zwei Mal (AGCA; GGCA) auf.

4. Diskussion

4.1 Einordnung der Synovialitis in den zeitlichen Verlauf des Krankheitsgeschehens

Anders als bei der rheumatoiden Arthritis ereignet sich der Entzündungsvorgang der Synovialitis nicht primär, sondern sekundär im Sinne einer Begleitsynovialitis, die sich als Folge der Gelenkknorpel-Destruktion ausbildet (Fassbender HG 1987). Die entscheidenden Veränderungen finden somit zu Beginn des Krankheitsprozesses statt, und gehen hierbei, nach noch größtenteils akzeptierter Lehrmeinung, vom Knorpel aus (Holderbaum D. et al. 1999). In den frühen Phasen der OA findet sich höchstens eine leichte entzündliche Reaktion. Erst auf die entscheidenden Stimuli hin (die in der Einleitung erwähnte Einwanderung der Makrophagen, deren produzierte Chemokine, spezifischen Veränderungen in der Synovialmembran als Reaktion auf gelöste Gelenkstruktur-Teilchen und die von den Synovialzellen ausgehende Produktion von proteolytischen Enzymen) entsteht die voll ausgeprägte synoviale Entzündungsreaktion. Die chronische Synovialitis ist also nicht das primäre, ursächliche Geschehen, weshalb Osteoarthritis im Allgemeinen als nicht entzündliche Erkrankung der Gelenke klassifiziert wurde.

4.2 Histopathologie der Arthrose-assoziierten Synovialitis

Die sekundäre, durch diese Knorpelalteration bedingte, chronische Synovialitis stellt sich histopathologisch auf charakteristische Art und Weise dar. Die leicht bis mäßig verbreiterte Deckzellschicht weist im Bereich der inkorporierten Knorpelpartikel eine ausgeprägte Fibrosierung auf. Außerdem entsteht eine leichtgradige, fokale, perivaskulär akzentuierte lymphozytäre und plasmazelluläre entzündliche Infiltration, wie auch schon in diversen anderen Veröffentlichungen dargestellt wurde (Cooper NS et al. 1981, Kennedy TD et al. 1988, Revell PA et al. 1988, Soren A. et al. 1988). Das Infiltrat besteht hauptsächlich aus B-Lymphozyten und CD 4⁺ und CD 8⁺ T-Lymphozyten (Krenn V. et al. 2000), die -in kleinen Aggregaten angeordnet- in Erscheinung treten (Kennedy TD et al. 1988). Die Formation zu lymphatischen

Follikeln ist allerdings selten (Cooper NS et al. 1981, Soren A. et al. 1988), genauso wie die Ausbildung von Keimzentren mit typischerweise FDCs einen seltenen Befund darstellt (Ristow G. et al. 1999). Rote Blutkörperchen können bei ihrer „Extravasation“ beobachtet werden, und gelegentlich treten in der synovialen Intima Makrophagen auf, sowie auch in tieferen synovialen Schichten (Ogilvie-Harris DJ, Fornasier VL 1980). Soweit ergeben sich also in Hinblick auf die Histologie in dieser Arbeit keine wesentlichen neuartigen Befunde. Hinsichtlich der Lokalisation von aktivierten B-Lymphozyten, d.h. Memory-B-Lymphozyten und Plasmazellen, sowie deren Beitrag zur Immunopathologie sind jedoch die bestehenden Forschungsergebnisse, was die OA angeht, lückenhaft. Dies soll hier mit Hilfe der immunhistochemischen Färbetechniken mit CD20, CD27 und Syndekan in Kombination mit der Auswertung der molekularbiologischen Daten „nachgeholt“ werden.

4.3 Zelladhäsionsmoleküle

4.3.1 Das Oberflächenmolekül CD27

Die Wertigkeit von CD27⁺ B-Lymphozyten in der osteoarthrotischen Synovia kann indirekt aus den bisher zahlreich erschienenen Veröffentlichungen über seine aktivierende Funktion auf T-Lymphozyten abgeleitet werden. Es liegen bereits Daten über die CD27-Expression auf sowohl T- als auch B-Lymphozyten (Odendahl M. et al. 2000) vor.

Auch wenn der CD27-gekoppelte Signaltransduktionsweg bei weitem noch nicht vollständig geklärt ist, ist schon einiges über die zellulären Interaktionen, die über CD27/CD70-Kontakt funktionieren, bekannt. Die Effekte bestehen hauptsächlich aus einer Verstärkung der T-/B-Zell-Proliferation, wobei bei den B-Zellen eher die Induktion im Vordergrund steht. Im Gegensatz zu der Fülle an T-Zellen, in denen CD27 exprimiert wird (im peripheren Blut v.a. auf naiven CD45RA⁺ T-Zellen nach Aktivierung und medullären Thymozyten), findet es sich im B-Zell-Pool hauptsächlich an Orten, an denen Memory-B-Zellen generiert werden (Lens S. et al. 1998). Wo dies speziell in der Arthrose nun stattfindet, soll im weiteren diskutiert werden.

So kann zusammengefasst gesagt werden, dass die CD27/CD70-Interaktionen die Größe und Funktion der Antigen-aktivierten Lymphozyten-Pools kontrollieren.

Darüberhinaus wird CD27 auf Natürlichen Killerzellen exprimiert (Bigler RD et al. 1988, Sugita K. et al. 1992, Maurer D. et al. 1990), und es existiert auch eine lösliche

Form von CD27 (sCD27), welche in Körperflüssigkeiten gefunden wurde; diese kann nützlich werden, um lokale und systemische Immunaktivierung zu überwachen (Hintzen RQ 1991).

Bezüglich der *T-Zell*-Aktivierung schlägt Lens S. et al. (1998) vor, den Ablauf einer Immunantwort in zwei Phasen zu teilen. In der „activation phase“, der initialen T-Zell-Aktivierung, reagiert auf der T-Zelle möglicherweise CD28 mit seinem Liganden CD80/CD86 auf der APC (antigenpräsentierende Zelle), worauf die T-Zelle dann CD27⁺ wird. Gleichzeitig wird sie induziert, hohe Level an CD70 zu exprimieren. Sie verstärkt also ebenso ihre Reagibilität auf CD27, von dem wir wissen, dass es auf den B-Lymphozyten exprimiert wird.

In der „expansion phase“ finden über CD27/CD70-Bindung inter-lymphozytische Kontakte statt, die mittels ko-stimulatorischen Signalen zu einer klonalen Expansion spezifischer T-Lymphozyten führen. Der ko-stimulatorische Weg hört auf, wenn das Antigen eliminiert ist.

Ein interessanter Aspekt ist, dass permanente Stimulation von T-Zellen mit Antigen die Konversion in einen CD27⁻ Phänotyp mit begleitender Effektor-Zell-Differenzierung zur Folge hat (de Jong R. 1992). So könnte es also sein, dass bei längerer und anhaltender Stimulation der T-Zellen (z.B. bei der RA oder chronisch entzündlicher OA) die Anzahl der CD27⁺ T-Zellen im Verlauf des Krankheitsgeschehens sinkt. Damit steigt in dieser Versuchsreihe bei chronisch entzündlicher OA die Wahrscheinlichkeit mit einfach braun gefärbten Lymphozyten speziell B-Lymphozyten dargestellt zu haben.

Eine ähnliche Kontrolle, wie das bei den T-Zellen der Fall ist, wird für die Proliferation und Differenzierung der *B-Zellen* vorgeschlagen (Lens S. et al. 1998), die CD27 nur nach der Selektion im Keimzentrum (light zone) exprimieren. Somit ist es nur den durch das Immunsystem definitiv tolerierten B-Zellen erlaubt, über den CD27/CD70-Weg zu expandieren. Die Verstärkung ihrer Proliferation falle über den besagten Kontakt schwächer als bei den T-Zellen aus, allerdings werde die Produktion von Immunglobulinen, wie auch die Ausdifferenzierung zu CD27⁺ Plasmazellen angeregt.

Hier wird ein wesentlicher Punkt für das pathogenetische Verständnis und der Unterschied zur RA klar. In der OA-assozierten Synovialitis sind lymphatische Follikel nicht oder nur ganz selten nachweisbar (Ristow G. et al. 1999). Daher muß der Großteil der identifizierten Memory-B-Zellen schon an einem anderen Ort (sekundäres

lymphatisches Organ?) entstanden sein. Dadurch wird möglicherweise auch verständlicher, warum die entzündliche Aktivität in der OA weitaus geringer als bei der RA ausfällt. Bereits Antigen-aktivierte B-Lymphozyten durchlaufen in der Synovialmembran keine weitere Keimzentrumsreaktion. Eine ausgeprägte folliculäre entzündliche Reaktion findet dadurch nicht statt und erklärt somit den weniger entzündlichen Charakter der OA-assoziierten Synovialitis.

4.3.2 Das Oberflächenmolekül CD20

CD20 war das erste Zelloberflächen-Differenzierungs-Antigen, das mit monoklonalen Antikörpern identifiziert wurde (Staschenko P. et al. 1980). Anders als CD27 taucht CD20 viel eher, in den frühen Vorstufen der B-Zell-Reihe auf (Precursor-/Pre- und reife B-Zellen), ist aber im Stadium der Plasma-Zelle nicht mehr zu finden (Kehrl JH et al. 1994). Da CD20 exklusiv auf B-Lymphozyten exprimiert wird, eignet es sich durch seine absolute Spezifität auch zur Detektion der synovialen B-Zellen. Laut einer Darstellung von T.F. Tedder (1994) ist CD20 sowohl an der B-Zell-Aktivierung (die sich in einer erhöhten transmembranösen Ca^{2+} -Bewegung äußert) als auch als Regulator bei der Proliferation und Differenzierung beteiligt.

Die Anordnung der CD 20⁺ B-Lymphozyten zeigte ein überwiegendes Vorkommen in den Follikelähnlichen Formationen (Bildtafel, Abb.3, 7), in denen sie offensichtlich zum einen als unspezifisches Begleitinfiltrat erscheinen und möglicherweise auch noch zu späteren Differenzierungsstufen weiterreifen.

4.3.3 Das Oberflächenmolekül Syndekan

Die Syndekane gehören zu der Familie der Transmembran (Typ I)-Heparansulfat-Proteoglykane. In dieser Arbeit wurde von dem Plasmazell-spezifischen Antigen Syndekan-1/CD138 (Sanderson RD et al. 1989) Gebrauch gemacht, insgesamt gibt es vier Untergruppen (Syndekan 1-4). Man vermutet (Review von Carey DJ 1997), dass Syndekane eine Rolle in einer Vielzahl von zellulären Funktionen spielen, zu denen Zell-Proliferation, Zell-Matrix-, Zell-Zell-Adhäsion, und Zell-Migration gehören. Syndekan-1 wird spezifisch auf B-Zellen exprimiert, d.h. keine anderen

hämatopoetischen Zellen tragen es. Es wird als sehr nützlicher phänotypischer Marker bezeichnet, um Zellen mit plasmazellulärer Differenzierung zu identifizieren (Kopper L. et al. 2000), wovon in der immunhistochemischen Diagnostik Gebrauch gemacht wurde.

Die Syndekan/CD27-Färbungen der B-Lymphozyten gaben durch die morphologischen Befunde zu weiteren Überlegungen Anlaß. Wenn in den immunhistochemischen Doppelfärbungen, bei dem Ansatz beide Oberflächenmoleküle zu detektieren (für Plasmazellen typische Syndekan-Positivität (Kopper L. et al. 2000), gemeinsam mit der Positivität für CD27), eine Schwarz-/ Doppel-Färbung in der Nähe von Gefäßen auftrat, bedeutet dies, dass es sich bei den detektierten Zellen um Plasmazellen (Odendahl M. et al. 2000) handeln mußte, die darüberhinaus auch noch ihre CD27-Positivität behalten haben (Bildtafel, Abb. 2).

Wie schon beschrieben, kommt ja CD27 erst in den späteren Reifungsstadien der B-Reihe vor, und bleibt auf den Memory-, als auch auf den Plasmazellen erhalten (Odendahl M. 2000).

Die Verteilung der Syndekan⁺ Plasmazellen ergab entweder eine perivaskuläre Anordnung, direkt in der Nähe der Gefäße (PMZ), oder eine kleinere Ansammlung von Plasmazellen gemischt mit sehr wenigen bis keinen B-Lymphozyten (Plasmazelluläre Gruppen). Dies gibt Hinweise auf eine wahrscheinliche *direkte* Einwanderung von Plasmazellen über die synovialen Gefäße.

4.4 Immunphänotyp des entzündlichen Infiltrats

Was die Verteilung der CD 4⁺ und CD 8⁺ T-Lymphozyten in lymphatischen Aggregaten betrifft, existieren bereits nähere Untersuchungen (Kennedy TD et al. 1988), doch über die charakteristische Anordnung der B-Lymphozyten und Plasmazellen in der Arthrose-assoziierten Synovialitis gibt es bisher nur eine Veröffentlichung (Krenn V. et al. 1999). In dieser wird davon ausgegangen, dass sich B-Lymphozyten bzw. Memory-Zellen, die aus dem synovialen Gefäß in dessen nahe Umgebung eingewandert sind, direkt – ohne weitere Proliferation – zu Plasmazellen differenzieren. Im Unterschied dazu entsteht das primäre Entzündungsgeschehen bei der RA in lymphatischen Follikeln, die für die B-Zell-Proliferation, -Aktivierung, und Affinitätsanpassung verantwortlich sind. Somit ist

eine lokale Maturation von B-Lymphozyten im rheumatischen Synovialgewebe gesichert (Kim HJ et al. 1999).

Anders verhält es sich in der OA. Hier setzt sich das entzündliche Infiltrat hauptsächlich aus bereits antigenerfahrenen B-Lymphozyten zusammen, was aus ihrem IgVH-Gen-Mutationsgrad sowie deren meist nicht-follikulärer Anordnung in der Synovia zu schließen ist. Die kleinen Aggregate zeigen einen charakteristischen Aufbau. Innerhalb des konzentrischen Musters befinden sich zentral nahe beisammen liegende, kleine Lymphozyten und locker angeordnete Plasmazellen (hauptsächlich IgA- und IgG-Isotypen) peripher (siehe „lymphoplasmazelluläres Infiltrat“, nach Krenn). Plasmazellen tauchen außerdem in der Nähe von kleinen Blutgefäßen und Kapillaren auf, und dies ohne das Vorkommen von Vorläufer-Lymphozyten. Dabei sind die Plasmazellen entweder in sehr kleinen Aggregaten versammelt oder sie liegen einzeln.

Die immunhistochemische Analyse zeigt, dass –wie bei der Färbung von ar-16 (Bildtafel, Abb. 4, 8) klar zu erkennen ist- sich die reiferen Differenzierungsstufen von B-Lymphozyten ($CD20^+/CD27^+$ Memory-Zellen und $Syndekan^+$ Plasmazellen) näher am Gefäß befinden, als die unreifen $CD20^+$ Lymphozyten (*Immigration aktivierter Memory-Zellen: IaM*).

Follikelähnliche Formationen waren recht häufig anzutreffen. Das Verteilungsmuster der immunhistochemisch gefärbten Zellen bot unterschiedliche Bilder. Die Aggregate bestanden entweder aus überwiegend $CD27^+$ aktivierten B-/(T-)Lymphozyten, oder waren halbmondförmig mit scheinbar typischen Entwicklungszonen eines Keimzentrums aufbaut, oder wiesen von innen nach außen verlaufende, konzentrisch formierte Differenzierungsstufen (zur reiferen Memory-, oder Plasmazelle) auf (Bildtafel, Abb. 7).

Somit wäre es möglich, dass in der Arthrose-assoziierten Synovialitis eine zweite, nachgeschaltete und zusätzliche Affinitätsmaturation vonstatten geht, um eine bessere Adaptation des Antikörper-Repertoires zu erlangen (dazu mehr unter 4.7.2.). Aufgrund der relativ gesehen hohen Anzahl von $CD20^+/CD27^+$ Memory- und $Syndekan^+$ Plasmazellen ist bei einer IgVH-Analyse ein hoher Grad an somatischer Mutation in den IgVH-Genen zu erwarten.

4.5 IgVH-Gen-Analyse; Mutationsgrade (R/S-Ratios, Homologie)

Zu Beginn konzentrierten sich die molekularbiologischen Untersuchungen auf den Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR), um klonale Beziehungen im Zuge einer adaptiven Immunantwort zu analysieren. Denn der TCR steht klonotypisch für das exprimierte somatische Gen, und macht es somit möglich, klonale Verwandtschaften und Oligoklonalität im Falle einer autoreaktiven Erkrankung aufzuzeigen. Die OA wurde häufig als Vergleich zur RA herangezogen, weil man bei der OA in diesem Falle von einer primär nicht entzündlichen Erkrankung ausging, aber trotzdem im Verlauf eine sekundäre entzündliche Aktivität auszumachen ist. Als Kontrolle zur RA wurde die OA beispielsweise in einer Untersuchung über den V-alpha-Gen-Gebrauch in Gewebs-T-Zellen (Zwillich SH et al. 1994) eingeführt, oder über den V-beta-Ketten-Gebrauch in perivaskulären synovialen T-Zellen (Nakamura H. et al. 1999), um neue ätiologische Konzepte bzw. neue therapeutische Strategien zu entwerfen.

Da sich allerdings der B-Zell-Rezeptor (BCR) bei Begegnung mit dem Antigen anpasst, seine Affinität durch Hypermutation verändern kann, und dadurch eine höhere Bindungseffektivität erreichen kann, lag es nahe, adaptive Immunantworten auf Antigen, und somit die Tatsache der Antigenaktivierung von B-Lymphozyten, am BCR zu untersuchen. Darüber existieren noch keine größeren Untersuchungen.

In dieser Versuchsreihe wurden in der Arthrose-assoziierten Synovialitis die IgVH-Gene der B-Lymphozyten auf molekularer Ebene analysiert.

Es ergab sich im Mittel eine R/S-Ratio von 4,22 für die CDR-Regionen, was deutlich eine Antigen-Aktivierung, im Sinne von Antigen-erfahrenen, affinitätsselektierten B-Lymphozyten anzeigt (Berek C. und Milstein C. 1987, Chang B. und Casali P. 1994). Dieser Aktivitätsgrad bzw. der Grad an somatischer Mutation stellte sich – gemessen an der R/S-Ratio – sogar als höher als der der RA heraus (bei einer zeitgleichen Studie im selben Labor).

Im Einklang mit der gängigen Meinung stehen die Ergebnisse der R/S-Ratios der FR-Regionen im Vergleich zu denen der CDR-Regionen; nämlich, dass die CDR-Regionen eine höhere R/S-Ratio aufweisen, als die FR-Regionen, da diese zuständig für die Antikörper-Stabilität sind, wohingegen die CDR's auf eine Affinitätsanpassung (durch höhere Mutationsraten) ausgerichtet sind (Chang B. und Casali P. 1994).

Da man davon ausgeht, dass eine Homologie von 90 % die Zugehörigkeit zu einer VH-Familie noch eindeutig macht (und damit Mutationen kaum Abweichungen von der Keimbahnkonfiguration ergeben) und eine 80 %ige Homologie schon bei Verwandtschaft zwischen verschiedenen VH-Familien auftaucht, deuten die in den Ergebnissen genannten Homologien zusammen mit den hohen R/S-Ratios bei einer hohen Anzahl von Klonen (17/24) auf eine stärkere somatische Hypermutation hin. Diese bewirkt somit eine bessere Passform des Antikörpers auf das Antigen. Respektive der These, dass sich an die Affinitätsanpassung im lymphatischen Gewebe noch eine weitere in der Synovialmembran anschließen könnte, wären hierfür die Sequenzen ar-01 (Klon 38), ar-03 (Klon 94) und ar-10 (Klon 167) mit R/S-Ratios von 12, 5, und 5 und einer Homologie von <80 % geeignete Beispiele, die ausdrücken, dass außergewöhnlich hohe Mutationsraten entstehen, wenn eine mehrmalige Affinitätsanpassung stattfinden würde.

Generell könnten alle der acht im Ergebnisteil aufgeführten Klone mit R/S-Ratios >2,9 und einer Homologie <90 % als verstärkt affinitätsangepaßt gelten. Die Sequenz ar-08/Klon 72 und die Sequenz ar-02/Klon 30 erzielten die höchsten Homologie-Prozentsätze (99 % und 97 %) beim Vergleich mit dem Keimbahngen. Dies könnte als indirekter Beweis dafür gelten, dass das Keimbahngen bereits einen hoch-affinen Antikörper enthält (Williams DG and Taylor PC 1997).

Zu den im höheren Grade mutierten B-Lymphozyten könnten somit sowohl die nachträglich in den FäFs herangereiften B-Zellen, und auch die Memory- bzw. Plasmazellen zählen, welche die somatische Hypermutationsphase bereits durchlaufen haben (Pulendran B. et al. 1997).

Die in Klon 8 (AGTA; GGCA), und in Klon 170 zwei Mal (AGCA; GGCA) auftauchenden spezifischen Mutationen in den RGYW-Hotspots werden für das Vorhandensein von Pseudogenen in kranken Individuen weitgehend verantwortlich gemacht (Dörner T. et al. 1997).

Die immunhistopathologischen Untersuchungen stehen in Einklang mit den molekularbiologischen Ergebnissen. Die Anzahl der in den Schnitten gefärbten Memory-, und Plasmazellen ist in Relation zum Gesamtumfang des Entzündungs-Infiltrats relativ hoch.

So trägt, nach der Identifizierung von Memory-Zellen und Plasmazellen, die sich vorwiegend in Umgebung von Blutgefäßen befinden, alles zu einem plausiblen Gesamtbild bei.

4.6 Schlußfolgerung aus den immunhistochemischen und den molekularbiologischen Ergebnissen

4.6.1 Homing von vorgebildeten Memory-Zellen

B-Lymphozyten wandern offensichtlich teilweise als Antigen-aktivierte Immunzellen ein (denn sie besitzen im Schnitt bei der molekularbiologischen Untersuchung hohe R/S-Ratios), befinden sich auch häufig schon im Entwicklungsstadium einer Memory-B-Zelle (CD27⁺/CD20⁺ doppelgefärbt – siehe Ergebnisteil), die sich hypothetisch direkt, ohne vorherige Proliferation in eine Plasmazelle verwandeln kann, oder Plasmazellen wandern als solche schon direkt ein, denn auch diese beinhalten bereits mutierte IgVH-Gene. Sie sind in den immunhistochemischen Syndekan/CD27-Doppelfärbungen schwarz gefärbt, und befinden sich, wie die Memory-Zellen in Gefäßnähe. Aber auch naive B-Lymphozyten (blau) sind in der Synovialmembran nachweisbar. Dies spricht dafür, dass auch eine unspezifische Einwanderung von Lymphozyten erfolgt. Was mit diesen naiven B-Zellen passieren könnte, soll im Folgenden diskutiert werden.

Zur Erläuterung der Pathogenese der Begleitsynovialitis ist es von entscheidender Bedeutung, das Wanderungsverhalten der Lymphozyten in das Synovialgewebe zu kennen.

Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten, warum Lymphozyten – und damit auch Memory-B-Zellen in die Arthrose-assoziierte Synovialitis einwandern.

Zum einen existieren spezifische Homing-Mechanismen, die es Lymphozyten überhaupt erst ermöglichen, an dafür präformierten Stellen des Endothels zu adhären. Dies kann theoretisch entweder zufällig oder selektiv geschehen.

Zum anderen besteht ab dem Stadium einer beginnenden Entzündungsreaktion ein Milieu im betroffenen Gewebe, das reichlich Mediatoren und Zytokine enthält, welche

wiederum die Immunzellen dazu veranlassen einzuwandern, was wohl als unspezifisch zu interpretieren ist.

Auf die zwei Möglichkeiten der Immigration soll nun im Verlauf weiter eingegangen werden.

Im Falle der Memory-Zellen wäre ein „Homing“ naheliegend, wie es z.B. auch im MALT präferentiell bei IgA-produzierenden Plasmazellen resultiert, die ursprünglich aus Antigen-aktivierten, aus dem Systemkreislauf „zurückkehrenden“ B-Lymphozyten der Peyer-Plaques entstanden.

Ein der OA verwandteres Beispiel wäre die Rezirkulation bzw. der Wiedereintritt von Memory-Zellen, wie es neulich in einer Arbeit von Souto-Carneiro MM et al. (2000) für die RA dargestellt wurde. Hier wird vorgeschlagen, dass bereits mutierte B-Zellen aus früheren RA-Läsionen aufeinanderfolgend neue synoviale Keimzentren besiedeln, indem sie neue anatomische Regionen invadieren und dadurch zum Fortbestehen der chronischen Entzündung in der RA beitragen. Dies läßt ebenso vermuten, dass für die beteiligten Lymphozyten spezielle Homing-Mechanismen verantwortlich sind, die es ihnen ermöglichen, vermehrt in Gelenke durch synoviale Gefäße einwandern zu können.

Jedoch ist bei der klassischen OA meist nur ein Gelenk betroffen, somit kommt die Rezirkulation von einem in ein anderes Gelenk nicht in Frage. Folglich wäre die Herkunft der aktivierten B-Lymphozyten und –Memory-Zellen aus lymphatischen Organen das Wahrscheinlichste.

4.6.2 Die Adhäsionsmoleküle

Als *Adhäsionsmoleküle* kommen im synovialen Gewebe bei OA P-Selektin (auf vaskulärem Endothelium), CD31 (auf Oberflächenepithel, Makrophagen) und CD44 (auf Makrophagen, Oberflächenepithel und Fibroblasten) in Frage, welche nach einer Studie aus dem Jahr 1993 (Johnson et al. 1993) bei RA und OA in einem größeren Ausmaß als bei gesunden Probanden exprimiert wurden. Diese Integrine und Oberflächenmoleküle sollen für das Ermöglichen oder die Verhinderung der Passage von Leukozyten in entzündete Gelenke verantwortlich sein. Trotzdem ist der genaue Mechanismus für die Positionierung von Memory-Zellen in bestimmte Gewebe noch unklar (Qin S. et al. 1998).

4.6.3 Das Einwanderungsverhalten der Lymphozyten

In einem Review von Pitzalis C. (1996) über Homing in allen Typen der chronischen Synovialitis (also auch die der OA) wird davon berichtet, dass es v.a. CD45R0-Memory-T-Zellen sein sollen, die regulatorisch und als Effektoren in der Initiierung und Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses eine Rolle spielen. Aus diesem Grund untersuchte man hier, ob die erwähnten Memory-T-Zellen verstärkt die gegebenen Homing-Mechanismen nutzen und sie organspezifisch einwandern, allgemeingültig für jeden Entzündungsvorgang in Synovialitiden.

Um die Schwierigkeit des Nachweises, dass Lymphozyten im Gelenk aktiviert werden könnten, zu umgehen (da man die Synovialitis nie im Verlauf, sondern immer nur zur einem bestimmten Zeitpunkt untersuchen konnte), erstellte man ein Modell, in dem nun die Entwicklung der Inflammation verfolgen konnte.

Das „Konsensus-Modell der Lymphozytenmigration“ besteht aus vier aufeinanderfolgenden Schritten:

Im ersten Schritt (tethering/rolling) Anbinden und Rollen auf dem Endothel, im zweiten (triggering/activation) können die Lymphozyten bereits von Chemokinen oder anderen Mediatoren aktiviert werden, im dritten (strong adhesion) reagieren Integrine (VLA4 und LFA1/Mac-1) der Lymphozyten mit Rezeptoren der Ig-Superfamilie (VCAM-1 und ICAMs). Im vierten und letzten Schritt (trans-endothelial migration) treten die Zellen aktiv aus den Gefäßen (high endothelial venules, HEV) in die Gewebe aus.

Die geeigneten Voraussetzungen, dass in unserem Falle die Memory-B-Zellen oder Plasmazellen verstärkt einwandern, sind dabei gegeben; vorausgesetzt, sie besitzen jeweils verstärktes Adhäsivitätspotential. Denn die Reaktion auf IL-1, TNF α und andere Zytokine, die in der OA-Synovialitis vorhanden sind (dazu mehr unter dem Kapitel der pathogenetischen Konzepte), liefert genügend Gründe für die Immigration, indem sie zusätzlich eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen bewirkt, sowie eine erhöhte Permeabilität im entzündeten Gewebe, einen niedrigen lokalen Blutfluß und einen erhöhten Aktiviertheitszustand der einwandernden B-Zellen (siehe Ergebnisse).

Da nun bei der Studie von Pitzalis C. von einer gesicherten bevorzugten Einwanderung von CD4⁺ CD45R0 T-Zellen berichtet wird, liefert diese Tatsache wiederum Erklärungen, was die B-Zell-Immigration, und –Proliferation, sowie die Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses anbelangt. Denn die erwähnten T-Zellen

bewirken B-Zell-Hilfe, besitzen keine Suppressorfunktion und proliferieren selbst auf lösliche Antigene hin.

Beim Vorgang des Homing gilt eine selektive Interaktion zwischen Homing-Rezeptoren und Gefäß-Adressinen als gesichert (Jalkanen S. et al. 1986). Die Studie von Pitzalis C. unterstützt die Hypothese dieser Arbeit, dass das Homing von Lymphozyten in Orte synovialer Entzündung von organspezifischen, genauso wie von generellen Mechanismen der Migration (bzgl. der Entzündung) reguliert wird. Ebenso wird spekuliert, dass es Immunzellen möglich ist, eine Art Gedächtnis für eine Menge von bekannten Antigenen zu entwickeln, und sie dabei auch die Fähigkeit besitzen, „microenvironments“ zu erkennen, wo sie wahrscheinlicher das selbe Antigen wieder antreffen. Weiterhin wird darauf hingewiesen, dass „Lymphozyten-Extrazelluläre-Matrix-Interaktionen“ nicht nur für die Retention der bereits eingewanderten Zellen existieren, sondern eine Zell-Aktivierung darüber stattfinden soll. Diese Aktivierung durch das lokale Endothelium bewirkt eine verstärkte Adhäsionsmolekül-Expression, z.B. ICAM-/ VCAM-1 (Carter RA et al. 2001).

Die letztendliche Klärung, ob die Einwanderung als hauptsächlich spezifisch oder unspezifisch einzuordnen ist, läßt sich aufgrund der in dieser Arbeit verwendeten Untersuchungsmethoden nicht mit absoluter Klarheit festlegen.

Der Befund, dass nahe der Gefäße v.a. aktivierte B-Lymphozyten und Plasmazellen dargestellt wurden, und dass im Synovialgewebe überwiegend aktivierte bzw. mutierte B-Lymphozyten sequenziert wurden, macht eine ausschließliche unspezifische Einwanderung unwahrscheinlich.

Vermutlich werden die Memory- und Plasmazellen als aktivierte Zellen eher spezifisch rekrutiert, wobei das Begleitinfiltrat der naiven B- und T-Zellen, Leukozyten und Makrophagen eher unspezifisch einwandert.

4.7 Die zwei unterschiedlichen Kompartimente im entzündlichen OA-Zell-Infiltrat

4.7.1 Ort und Zeitpunkt der Initiierung der Memory-Zell-Entwicklung

Aus den molekularbiologischen als auch immunhistochemischen Daten kann gefolgert werden, dass bereits aktivierte B-Zellen in das Synovialgewebe einwandern. Da die Antigen-induzierte B-Zell-Aktivierung/-Maturation ausschließlich in sekundär lymphatischen Organen erfolgt, muß davon ausgegangen werden, dass synoviale B-Lymphozyten aus lymphatischen Organen in die Synovialmembran eingewandert sind.

Die Freisetzung von Knorpelantigenen wird als Ursache für die Synovialitis angesehen; daher ist davon auszugehen, dass die immigrierten B-Zellen knorpelspezifisch sind. Nimmt man an, dass Knorpelantigene sogenannte „kryptische“ oder „sequestrierte“ Antigene sind, d.h. dem Immunsystem nicht zugänglich, so fragt man sich, wo ein Kontakt des Immunsystems mit Knorpelantigenen während einer Knorpelschädigung stattgefunden haben kann.

Hierfür käme z.B. die Fetal-Zeit in Frage, und zwar die Phase der indirekten Ossifikation, in der hyaliner Knorpel zu Knochenmasse umgebaut wird, und sich deswegen im Abbau befindet. Auf diese Weise könnte der Kontakt mit Knorpel-spezifischen Antigenen stattgefunden haben. Die daraus resultierenden schon „optimal adaptierten Memory-, (und Plasma-)Zellen“ agieren in dem Fall als die eine Front des Immunsystems gegen bereits bekanntes Antigen.

Eine weitere, nachvollziehbarere Variante wäre, dass sobald einmal eine Art von Schädigung des Knorpels stattgefunden hat, eine Immunreaktion initiiert wird. Die erstmals, z.B. zum Zwecke einer Abräumaktion, einwandernden Lymphozyten bilden sofort nach erstmaligem Kontakt mit Knorpelantigenen Memory-Zellen, wandern nach der Phase einer klinisch aktiven OA wieder aus dem Gelenk aus, und werden letztendlich tatsächlich spezifisch wieder in dieses Gelenk rekrutiert. Dies findet statt, sobald erneuter Abrieb im Knorpel entstanden ist.

4.7.2 Das „Booster-Kompartiment“

Somit können die $CD27^+/CD20^+$ Zellen als eine Art „Booster-Kompartiment“ bezeichnet werden. Ein Begriff, den man eher aus der Immunisierung als „Auffrischimpfung“ kennt, die Tatsache einer zusätzlichen „Nachschub-Rekrutierung“ allerdings gut trifft.

Die Behauptung läßt sich gut mit den IgVH-Analysen-Ergebnissen vereinbaren, denn in den meisten Fällen (17/24) bestehen hier hohe Mutationsraten bzw. hohe R/S-Ratios, die den Befund unterstreichen, dass ins arthrotische Synovialgewebe schon vorprogrammierte Memory-B-Lymphozyten immigrieren (Beispiel siehe Abb. Seq. ar-01/38 im Anhang). Allerdings ist es erstaunlich, dass diese somatisch mutierten B-Lymphozyten in Überzahl auftauchen. Denn man könnte ja mindestens genauso viele noch nicht Antigen-aktivierte B-Lymphozyten mit IgVH-Keimbahnkonfiguration erwarten.

Eine prädominante Beteiligung von bereits Antigen-aktivierten B-Zellen ($CD27^+$) in der Osteoarthritis erklärt den Befund des selteneren Vorkommens von FDCs und lymphatischen Follikeln im Vergleich zur RA (Cooper NS et al. 1981, Ristow G. et al. 1999).

$CD27^+$ B-Zellen können sowohl IgD^+ , als auch IgD^- sein, was sie laut einer Veröffentlichung von Maurer D. et al. (1992) in ihrer Eigenschaft bestimmt, IgM- (wie die $CD27^+IgD^+$) oder IgG-Antikörper (wie die $CD27^+IgD^-$) zu bilden. Die Ig-Sekretion wird über CD27/CD70 Interaktionen angekurbelt (Jacquot S. et al. 1997). So wäre es sicherlich auch aufschlußreich, CD27/IgD-Doppelfärbungen im Synovialgewebe zu machen, um das Verhältnis von IgM- zu IgG-produzierenden B-Zellen zu eruieren. Damit wäre ein wahrscheinliches Überwiegen von „post-class-switch“- (also IgG-produzierenden) B-Lymphozyten darzustellen. Für den class-switch ist ja bekanntlich eine Keimzentrumsreaktion Voraussetzung (Berek C. et al. 1991, Mac Lennan IC 1994, Camacho SA et al. 1998).

4.7.3 Die möglichen antigenpräsentierenden Zellen (APZ) des ektopischen Keimzentrums

Die *antigenpräsentierende Rolle* wird auch von anderen MHC-II⁺ Zellen als FDCs übernommen werden (Peter HH/Pichler WJ 1996). Als Kandidaten dafür kämen B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, bzw. ein Korrelat der „Langerhanszellen“ in der Synovialmembran, oder auch vaskuläre Endothelzellen in Frage.

In einer Veröffentlichung von Carter RA et al. (2001) werden *fibroblast-like synovial lining cells* (Fibroblasten-ähnliche synoviale Deckzellschicht-Zellen) als den FDCs nahestehend vorgeschlagen. Sie sollen die gleichen Eigenschaften wie FDCs haben, IgG-Produktion von B-Lymphozyten unterstützen können, und sich in Kultur auf Stimulation von TNF α hin sogar zum FDC-Phänotyp umwandeln. Diese phänotypische Verwandlung soll auch in nicht-RA Synoviozyten induziert werden können (Carter RA et al. 2001). Auch, wenn noch nicht vollständig geklärt ist, ob ihre „FDC-Funktion“ spezifisch für RA ist, besteht zumindest die Möglichkeit, dass OA-B-Lymphozyten durch die fibroblast-like synovial lining cells zur weiteren Maturation aktiviert werden.

Diese Vorstellung steht im Einklang mit den Erkenntnissen von Hannum LG et al. (2000), nämlich, dass für die Initiierung einer Immunantwort und einer Keimzentrumsreaktion (Maturation und Selektion) die Deposition von Immunkomplexen auf FDCs nicht notwendig ist. Für optimale Maturation und Selektion seien Keimzentren nötig, jedoch nicht für einen gewissen (anfänglichen) Grad der Mutation von Lymphozyten. Ebenso könnten die Keimzentrums-Reaktionen und die Memory-B-Zell-Entwicklung auch ohne FDC-gebundenes Antigen auskommen. Denn freies Antigen ist auch im osteoarthrotischen Gelenk in ausreichendem Maße vorhanden, welches die Immunantwort aufrechterhält, indem es extrafollikuläre als auch T-Zell-unabhängige Antworten initiiert (Hannum LG et al. 2000).

Antikörper-Produktion von Plasmazellen könnte auch stimuliert werden, indem Immunkomplexe von FDCs dissoziieren, und dabei gebundenes Antigen freigeben, was stattfindet, wenn Antikörperlevel im Verschwinden begriffen sind. Dies wurde an einem Maus-Modell (mIg Tg mice) gezeigt (Hannum LG et al. 2000).

Somit könnte Antikörper-Produktion und unvollständige Maturation auch mit wenigen bis fehlenden FDCs stattfinden, wie dies bei der OA der Fall ist.

Die *Langerhans-Zellen*, sowie auch die *dendritischen Zellen* sind z.B. nur zur Antigenpräsentation befähigt, nachdem sie wieder den Weg zurück in lokale Lymphknoten genommen haben, in denen sie als interdigitierende Zellen Antigen präsentieren. Das würde eine Rezirkulation dieser ins Synovialgewebe fordern.

Makrophagen, die ortsständig gewordenen Monozyten, kommen ohneweiteres als APZ am Ort eines Entzündungsgeschehens in Frage, wo sie für die lokale T-Zell-Reaktion, aber auch für die Aktivierung von ruhenden „memory“-T-Zellen verantwortlich sind. Ein wichtiges Molekül, das die Eigenschaft verleiht, APZ zu sein, ist CD80, sowie das MHC-II-Molekül.

Es existieren auch *nicht-klassische APZ*, wie z.B. eosinophile Leukozyten oder Keratinozyten, die auf Chemokin-Stimulation MHC-II exprimieren und wahrscheinlich Antigen präsentieren können, jedoch kein CD80 besitzen, um ruhende T-Zellen zu aktivieren. Sie können höchstens bereits aktivierte reaktivieren (Peter HH/Pichler WJ 1996).

Somit kommt eine Reihe von anderen Nicht-FDC-Zellen für die Rolle der APZ in Frage.

Schlußfolgernd könnte man also vermuten, dass zum einen Antigene bei der OA auftauchen, die nur gering arthritogen sind (geringer Entzündungsgrad, Einwandern Antigen-aktivierter Zellen), und zum anderen auch Antigene auftauchen, die dem Körper noch nicht vertraut sind, und den B-Lymphozyten den Weg einer zusätzlichen Maturation abverlangt.

4.8 Pathogenesekonzepte

4.8.1 Einführung in die pathogenetischen Vorstellungen

Auch, wenn Details der genauen Ursachen von Osteoarthrose noch unbekannt sind, gibt es eine Reihe von Pathogenesekonzepten. Grundsätzlich wird das Krankheitsbild mit den Synonymen Osteoarthritis und Osteoarthrosis bezeichnet. Im Anglo-Amerikanischen und Englischen Sprachraum wird die Benennung „Osteoarthritis“ (nach *Sokoloff*) bevorzugt, die eher den sekundären inflammatorischen Aspekt der Krankheit heraushebt, wonach auch die hauptsächlichen Therapieprinzipien ausgerichtet

werden, die sich gegen die daraus resultierenden Symptome Schmerz, Schwellung, Bewegungseinschränkung und Versteifung richten. „Osteoarthritis“ (nach *Mueller*) betont eher den degenerativen Prozess, der auf den primären Vorgang des Knorpelschadens abzielt. Denn auch wenn man die OA nicht allein mit dem Prinzip „wear and tear“ erklären kann, besteht kaum Zweifel, dass mechanische Belastungen der Gelenke eine wesentliche Rolle in der Krankheitsentwicklung spielen. Wo diese Bezeichnung favorisiert wird, legt man eher Wert auf chondroprotektive Medikamente (Niethard *et al.* 2000).

Im folgenden Verlauf sollen wesentliche Eckpfeiler von biologisch-anatomischen Pathogenese-Vorstellungen, die bis dato existieren, umrissen werden, soweit sie themabezogen sind und Einblick in die Entstehung der Begleitsynovialitis, sowie in bestimmte Therapievorstellungen gewährleisten.

4.8.2 Update der pathogenetischen Vorstellungen

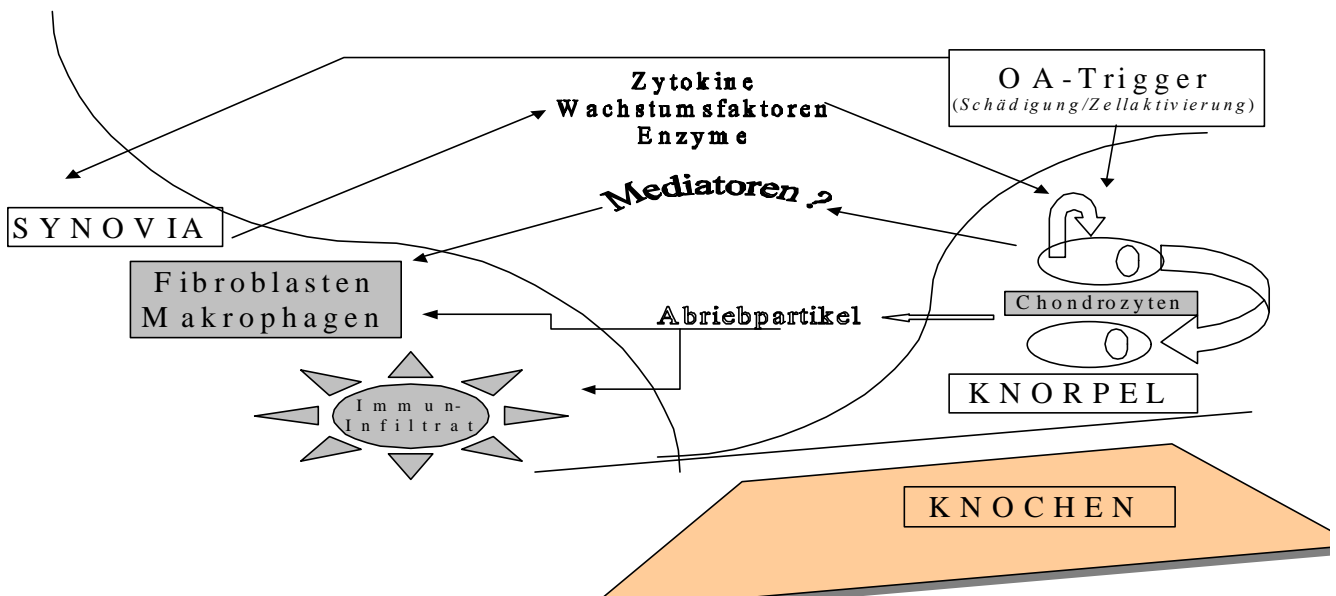
Es besteht ein Konsensus darin, dass OA als Folge von verschiedenen Ursachen entsteht, die vom stumpfen Gelenk-Trauma, biomechanischer Überlastung und angeborener oder erworbener Gelenk-Inkongruenz, über genetische Defekte der Matrix-Komponenten, bis zu einem Ungleichgewicht in der synovialen Homöostase reichen. Im ständigen Bemühen um *Restitutio ad integrum* kommt es zur Dekompensation der körpereigenen Kapazitäten und so entsteht die OA-Läsion als Endstation.

Am Beginn der Pathogenese steht die Hypertrophie des Gelenkknorpels mit einer verstärkten Synthese von Matrix, gefolgt von verstärktem Matrix-Umsatz und letztlich dem Verlust des Kollagen-Netzwerkes (Berg, van den WB *et al.* 1998). Die Zerstörung von Kollagenen und Proteoglykanen findet durch spezifische proteolytische Enzyme statt, die aus den Synovialzellen stammen. Als Folge wird eine Re-Synthese von Kollagen Typ II (IX, XI), sowie der Typen I, III und X (nur in den oberflächlichsten Knorpelschichten, Typ III und X nur im erkrankten Knorpel vorhanden) angesehen. Ebenso wird eine gesteigerte Synthese von Proteoglykanen (Aigner *et al.* 1992) durch Chondrozyten induziert, was in den frühen und mittleren Phasen der OA stattfindet. So schaffen es die körpereigenen Restitutionskräfte den Gesamt-Gehalt der Kollagene und Proteoglykane eine Zeit lang noch stabil zu halten, wohingegen das reparative Vermögen der Chondrozyten durch ihr fortschreitendes Absterben sinkt, und

so der Knorpel erodiert (dekompensierte OA). Dabei findet auch eine bisher noch unklare Veränderung in der Produktionsaktivität von Chondrozyten statt.

In den späten Phasen der OA wird die synoviale Reaktion durch die Abriebpartikel und Kristalle aus dem geschädigten Knorpel aufrechterhalten. Durch diese Trigger werden synoviale Makrophagen und Fibroblasten (bzw. „fibroblast-like synovial lining cells“) stimuliert, die wiederum eine Vielzahl von Entzündungs-Mediatoren, die denen der RA ähneln, generieren. Unter solchen Voraussetzungen könnten diese Vorgänge zu einer Immunreaktion führen, in der das Individuum die Toleranz gegen Autoantigene aus dem Knorpel verliert (Berg, van den WB 1998).

Pathogenese der Osteoarthritis*



Im generellen Konzept für die OA (dargestellt in „Osteoarthritis“, Oxford Medical Publications, 1998), wird festgelegt, dass der erste Schritt im Geschehen, die Aktivierung von Knorpel und Knochen sei (als deren Reaktion auf veränderte Matrix-Beanspruchung), mit wenig Beteiligung des Synoviums. Darauf reagieren die Chondrozyten mit Mediator-Produktion, auto- und parakrin im Knorpel wirkend. Dann könnte eine Diffusion der Mediatoren ins Synovium stattfinden, wo diese synoviale Fibroblasten und Makrophagen triggern, und somit zum Fortbestehen des Prozesses beitragen.

Nach einem Paper von Moos V. et al. (1999), gäbe es zwei verschiedene Typen eines Zytokin-Sekretionsprofils im Knorpel. Die beteiligten Zytokine (TNF-alpha, Interleukin 1alpha (IL-1alpha), IL-1beta, Interferon-gamma, IL-6, IL-4, IL-10, transforming growth factor beta1 (TGF-beta1), insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, platelet derived growth factor AA (PDGF-AA), und PDGF-BB) würden auf zwei verschiedenen Ebenen des Knorpels verteilt sein. Hauptsächlich wären die genannten Zytokine in der mittleren und unteren Schicht zu finden gewesen.

Da ein Milieu von auf diesem Wege gebildeten Mediatoren, Wachstumsfaktoren und aktivierten Zellen die beste Voraussetzung für das Weiterbestehen der synovialen Entzündung mit lymphoplasmazellulärem Infiltrat ist, bedarf es hierauf der Erklärung, weshalb in diesem experimentellen Ansatz verstärkt *aktivierte* Lymphozyten im synovialen Infiltrat gefunden werden, bzw. warum man im Unterschied zur RA gehäuft Memory-B-Lymphozyten perivaskulär antrifft, und sogar wie keine lymphatischen Follikel in der Synovialitis vorhanden sind. Dies ist, wie das schwächere Begleitinfiltrat, der charakteristische Befund für OA.

4.9 Potentielle Antigene, gegen die die in der synovialen Entzündungsreaktion gebildeten Antikörper gerichtet sind – und wodurch sie entstehen

Da man bei der OA erhöhte Antikörpertiter, Immunkomplexe, und sogar IgG-Rheumafaktoren, sowie Antithyroglobulin-Antikörper in bestimmten Untersuchungen entdeckt hatte (Guerassimov A. et al. 1999), liegt wiederum der Vergleich zur RA, bei der knorpelige Autoantigene ebenfalls als arthritogene Komponenten vorgeschlagen wurden, nahe.

Warum ist es nun so wichtig, sich über die potentiellen Antigene, die in der OA auftreten und die Entzündungsreaktion so spezifisch ablaufen lassen, Gedanken zu machen?

Wie schon festgestellt, findet sich bei der OA eine weitaus geringere entzündliche Aktivität als bei der RA, in der das histologische Bild in etwas 10 % von einer großen Anzahl von Follikeln mit Keimzentren bestimmt wird (Becker R., Stiehl P. 1996).

Um nun die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse der Follikel-ähnlichen Formationen und das vermehrte Auftreten von aktivierten Lymphozyten, wie z.B. Memory- und Plasmazellen, erklären zu können, obwohl es sich eigentlich um die gleichen Antigene

aus Knorpelmaterial handeln muß, sollen die Veränderungen, die sich während des Krankheitsablaufs der OA ergeben, genauer betrachtet werden; dies, im Hinblick auf einen grundlegenden Unterschied oder Gemeinsamkeiten der antigenen Eigenschaften zwischen OA und RA.

Der Gehalt an Proteoglykanen in der Synovialflüssigkeit im erkrankten Gelenk kann beispielsweise Werte von 100µg/ml betragen, und überraschenderweise bei OA und RA von ähnlicher Höhe sein! Deshalb vermutet man eigentlich bei der RA einen höheren Grad an Mediatoren, höhere Proteinase-Level und andere pathophysiologische Unterschiede, um sich den stärkeren Entzündungsgrad zu erklären (Raymond J. et al. 1988).

Wenn man die komplett ausgebildete charakteristische Entzündungsmorphologie betrachtet, gibt es sehr deutliche Unterschiede, vor allem im Ausmaß des Infiltrat-Umfangs. Die dichten entzündlichen Infiltrationen bzw. der Pannus bei der RA-Synovialitis sind für die gelenkdestruierende Wirkung verantwortlich. Nun ist allerdings noch nicht ausreichend über die hauptverantwortlichen knorpeligen Antigenen, für die entzündliche Pathogenese bei der OA bekannt, hingegen besteht für die RA eine große heterogene Gruppe von Antigenen, welche an der Pathogenese der Erkrankung möglicherweise beteiligt sind.

Die in der Literatur beschriebenen Serum- und Synovialflüssigkeits-Antikörper zeigen bei der RA Spezifität für den konstanten Teil des Immunglobulin, ANCAS, ANAS, Kollagen Typ 2, Typ 3 und 4, HLADR, Thyreoglobulin, Tetanustoxoid, DNA, Aktin, humane und bakterielle HSP (heat shock proteins), humane HSP, Calpastatin, sowie gegen das seit kurzem erst in einer Veröffentlichung erwähnte COMP (Krenn, Souto-Carneiro, 2000). Dabei können nicht alle Antigenen die Pathogenese der RA verständlich machen.

Diese Daten stützen sich überwiegend auf Antikörper-Analysen und Analysen von B-Zell-Hybridomen synovialer B-Lymphozyten und Plasmazellen.

Man geht jedoch davon aus, dass durch Trauma, falsche Belastung und enzymatischen Abbau bei der OA Knorpelantigenen freigesetzt werden, kennt allerdings noch nicht den genauen pathophysiologischen Mechanismus, der hierbei die Entzündungs-Initiierung verursacht. Für die Bildung und die Sekretion der Matix-Makromoleküle sind die

Chondrozyten verantwortlich. Somit ist die Unversehrtheit der Chondrozyten und ihr Vermögen, die essentiellen Begebenheiten der Knorpel-Matrix aufrechtzuerhalten, ein wesentlicher Punkt, durch den die Gelenk-Integrität bestimmt wird.

Die Synoviozyten sezernieren Kollagenasen, Hyaluronidasen und Proteasen, sowie auch Prostaglandin E₂ und eine Art Interleukin-1, was die Chondrozyten zur Knorpelmatrix-Resorption veranlaßt.

Man spricht sowohl den Metallo-, als auch den Serin- und Asparagin-Proteasen eine pathogenetische Rolle zu (Pap G. et al. 2000).

Besondere Bedeutung, ja sogar eine Schlüsselrolle in der Knorpel-Degeneration wird der *Matrix-Metalloproteinase-3* (MMP-3) Stromelysin und den *Plasminogen-Aktivatoren* (PA) des *Urokinase Typs* nachgesagt. MMP-3 spielt deshalb eine entscheidende Rolle im Zusammenbruch der Matrix, weil es Kollagen Typ IX spaltet, welches wiederum für Kreuzverbindungen verantwortlich ist, und dabei noch parallel dazu die Proteolyse des Aggrekan-Core-/ und Link-Proteins verursacht, welches ja, wie unten erwähnt, eine wichtige Funktion besitzt (Pap G. et al. 2000).

Hierbei vertritt man die Auffassung, dass die mechanischen Veränderungen in frühen Stadien Läsionen verursachen, die als „germ centers“ bezeichnet werden, von welchen die weitere Knorpel-Degradation zu den umgebenden Knorpel-Arealen ausgeht. Chondrozyten können sich im Sinne einer Adaptationsreaktion sogar wieder teilen, oder sie hypertrophieren und beginnen atypische Kollagene (z.B. Typ X) und Proteoglykane zu bilden (von der Mark K. et al. 1992, Aigner T. et al. 1995).

Im Vergleich zur RA, jedoch, wird bei der OA eine stärkere Aktivitätsminderung der Enzyme durch suffizientere Protease-Inhibitoren angenommen.

Durchaus wäre denkbar, dass sich die synoviale Entzündung und Knorpel-Degradation durch demaskierte Antigen-Orte, im weitesten Sinne eines *Autoimmungeschehens*, verstärkt oder aufrechterhalten wird. Trotz alledem wurde noch keine direkte Korrelation zwischen dem Ausmaß der Immunkomplex-Ablagerungen und der mononukleären Infiltration der Synovialis gefunden (Altman RD et al. 1985).

In der Hypothese der *T-Zell vermittelten OA* behauptet man, dass der lokale proinflammatorische Prozess (ähnlich wie in Autoimmunkrankheiten) für die Chondrozyten- und Hyaluronsäure-Degeneration verantwortlich sein könnte. Dabei wird spekuliert, dass man, nachdem die pathogenetischen Peptide identifiziert wären, die zur T-Zell-Aktivierung beitragen, jene T-Zell-Aktivierung mit diesen Peptiden

unterdrücken könnte (Nakamura H. et al. 1999), im Sinne einer „Toleranz-Induktion“. Im Rahmen einer „Toleranz-Induktion“ wird versucht, intranasal oder oral verabreichte Formen der genannten Antigene zu applizieren, um auf diesem Weg eine Kreuz-Toleranz, vermittelt durch T-Zellen, zu induzieren.

4.9.1 Kollagen und der oxidative Streß

Die extrazelluläre Matrix (ECM) des Knorpels besteht zu 95 % aus Kollagen II, weiteren Kollagenen, wie Typ I, III, IX, XI (Aigner T. et al. 1992) und *Proteoglykanen* (5 %), von denen das wichtigste das Aggrekan ist.

Bei genaueren Betrachtungen der knorpeligen Antigene fand man eine Reaktivität des Immunsystems bei OA-Patienten gegen *natives und denaturiertes Kollagen Typ II*, sowie in geringerem Ausmaß gegen *Kollagen Typ I*, ebenso wie gegen das Proteoglykan *Aggrekan* (Pelletier JP et al. 2001) und das *humane Knorpel-Glykoprotein 39 (HC gp-39*, nach Joosten AB et al., 3/2000 in einer Veröffentlichung über intranasale Toleranz-Induktion).

Die Tatsache, dass Kollagen Typ II, als arthitogenes Antigen in Frage kommt, ist nicht allzu verwunderlich, denn es ist klar, dass es sich hierbei um eine Hauptkomponente des Knorpels handelt, die bei der OA am meisten affiziert wird. Allerdings treten auch neue Arten von Kollagenen auf, wie z.B. die Kollagene Typ III und X (Aigner T. et al. 1992).

Hier besteht wieder Anlaß zur Annahme, dass beim Neuauftreten von Knorpelkomponenten, die vorher einfach noch nicht vorhanden waren, eine Anpassung der Immunantwort zu erwarten wäre. Dabei ist es eher die Ausnahme, dass vorher noch nicht vorhandene Produkte neu *gebildet* werden. Eher werden, durch das erosive Geschehen in der OA ständig Antigen-Orte aufgedeckt, die bei unversehrten Oberflächeneigenschaften, den Immunzellen nicht zugänglich waren.

Denn *Kollagen* wird -nach der Meinung von Tiku ML et al. (2000)-, innerhalb altersabhängiger spezifischer Veränderungen in der Lipidzusammensetzung des Knorpels, unkontrolliertem *oxidativem Stress* ausgesetzt. Dieser führt zur Oxidation von Knorpel-Kollagen, welche wiederum dessen Fragmentierung durch bestimmte Enzyme (s.o.) einleitet, und den Verlust seiner charakteristischen Fibrillen-Eigenschaften verursachen könnte, was das Kollagen natürlich empfänglicher für mechanische

Ermüdungserscheinungen macht. Solche Ermüdungserscheinungen könnten der Beginn der Osteoarthritis sein.

Der erwähnte oxidativer Stress kann durch Schwankungen des Redoxpotentials sogar zu Veränderungen der Synthese und Aktivität von Transkriptionsfaktoren führen, die der Kontrolle des bcl-2-Gens unterliegen. Dieses kontrolliert Apoptose und Anergie (Hockenbery DM et al. 1993).

Durch das entsprechend „aggressive Milieu“ mit niedrigem oxidativen Potential kommt es zu einer Hochregulierung des Genlokus bcl-2, was zur Aktivitätssteigerung der T- und B-Lymphozytenpopulation in den Gelenken führt; so wird die Antigen-getriggerte Immunantwort gefördert bzw. erst ermöglicht. Die initiale organspezifische Schädigung könnte somit eine organspezifische Autoimmunität zur Folge haben (Kouskoff V. et al. 1996).

Kollagen ist also ein der OA, als auch der RA gemeinsames Antigen, gegen das Antikörper gebildet werden.

4.9.2 Aggrekan

Das *Aggrekan* (zu 90 % aus Chondroitinsulfat bestehend, das über ein „link protein“ mit Hyaluronat verbunden ist) bestimmt die mechanischen, als auch die trophischen Eigenschaften des Knorpels wesentlich mit (Petrides PE et al. 1997).

Im Verlauf der Krankheitsentwicklung sinkt das Wasserbindungsvermögen des degenerierten Knorpels und somit seine elastische Widerstandskraft, das Kollagen-Netzwerk wird geschwächt, und die Konzentration an Proteoglykanen ist im Abnehmen begriffen. Die Tatsache, dass Kollagen eine wesentliche Rolle in der Knorpelalterung und der Pathogenese der OA spielt, ist unbestritten.

Bei *Aggrekan* soll vor allem die von Keratansulfat getrennte *G1-Domäne*, die sich in der Gelenksflüssigkeit löst, für die Immunreaktionen verantwortlich sein, genauso wie das *cartilage link protein (LP)*. Beide gewährleisten die Interaktion mit Hyaluronat und werden als potentielle pathogenetische Faktoren für die OA angesehen (Guerassimov A. et al. 1999). Die Tatsache, dass Proteoglykane pathophysiologische Veränderungen in Gelenken verursachen, die bis zur Erzeugung von Arthritis gehen, wurde allerdings schon 1988 bei Versuchen mit intraartikulärer Injektion von Proteoglykanen in Kaninchen-Kniegelenke gezeigt (Raymond J. et al. 1988).

4.9.3 Hyaluronat

Der *Metabolismus des Hyaluronat* spielt auch in der Pathogenese eine wesentliche Rolle (Morales TI et al. 1989). Es wird von B-Synoviozyten (fibroblastenähnlicher Typ) der Synovialmembran produziert, die generell für die Produktion von Zell-Matrixbestandteilen verantwortlich sind – im Gegensatz zu den Typ A-Synoviozyten, die eine eher phagozytäre Funktion besitzen (Barland und Novikoff 1962).

Auch wenn sich in vielen Fällen die metabolische Aktivität des Gelenks bei der primären OA vergrößert, muß das Gelenk –bedingt durch einen anwachsenden, immensen katabolischen Prozess durch exzessive Mengen an lysosomalen Enzymen– mit einer reduzierten Konzentration an Hyaluronat in der Synovialflüssigkeit auskommen. Dadurch vermindert sich sowohl der Schmiereffekt, als auch die viscoelastischen Eigenschaften der Synovialflüssigkeit (Niethard FU et al. 1999).

Sobald Hyaluron- (oder auch Keratansulfat-) Fragmente aus dem Knorpelverband gelöst werden, nehmen sie eine biologische Schrittmacher-Funktion ein, indem sie Reparationsmechanismen triggern; - bereits in den 80er Jahren sah man sie als irritierenden, entzündungsauslösenden Faktor an (Soren A. et al. 1987). So sieht man es auch heute noch, denn freies Hyaluronat binde an CD44 von Makrophagen, und fördere deren Ausschüttung von IL-1, TNF α und Monokinen, sowie es auch Monozyten aktiviere (Koller M. et al. 1999), dadurch ergänzt sich das Verständnis der Schrittmacherfunktion.

Die Reparaturvorgänge zeigen sich in Dedifferenzierung, Proliferation der Chondrozyten in den tieferen Schichten und deren Hypermetabolismus, verbunden mit einer erhöhten Produktion von Kollagen, Glykosaminoglykanen und Protein.

Da sich die Knorpelkomponenten, die die knorpeligen Antigenen in OA und RA stellen, in Form von Kollagen Typ II, ja sogar Immunglobulinen und Thyreoglobulin, nicht unterscheiden (Guerassimov A. et al. 1999), und die Tatsache, dass Aggrekan und Hyaluronat auch bei Knorpelerosionen in der RA angegriffen werden (und somit potentielle Antigenen darstellen), liegt der arthritogene Unterschied möglicherweise auf genetischer Ebene.

4.10 Der genetische Aspekt, oder: können veränderte Knorpelkomponenten bzw. Reparaturmechanismen oder die fehlende HLA-Disposition die Pathogenese und den Unterschied zur RA erklären?

In Studien über seltene familiäre Osteoarthritis wird behauptet, dass eine autosomal dominante Mutation im Kollagen Typ II eine wichtige Rolle spielen könnte, aber die Segregations-Analyse der Bevölkerung klassifiziert die OA als ein polygenetisch bedingtes Leiden. Die Tatsache, dass der genetische Aspekt eine Rolle spielen muß, scheint Forscher schon seit längerem zu interessieren: Schon in den 80ern zeigten Studien klare familiäre Anhäufungen von OA. Doch die genaue Identität der möglicherweise beteiligten Gene bleibt unbekannt, verdächtigt wird ein Locus am Chromosom 11q (Senior K. et al. 2000).

Holderbaum et al. 1999 untersuchten genetisch kontrollierte Mechanismen, die die Erbllichkeit speziell bei nodaler OA und primär generalisierter OA mitbestimmen. Schlußfolgernd wird in seiner Veröffentlichung darauf hingewiesen, dass potentiell Gen-Mutationen, die sich auf Knorpelkomponenten (Kollagen, COMP), Kontrollfaktoren (z.B. Enzymen, Inhibitoren, Signal Transduktions-Molekülen) oder Immunzellen (B- und T-Lymphozyten, siehe 4.9.1) zu ähnlich klinischen Bildern führen könnten. Wichtig sei es jedoch nicht zu vergessen, dass neben genetischen auch Umwelt-Faktoren eine Rolle spielen.

Ein besseres Verständnis von deren Zusammenspiel könnte Möglichkeiten für eine Krankheits-Prävention hervorbringen. Das Vererbungsmodell von Osteoarthritis könnte mit der genetischen Dichotomie der Alzheimer-Krankheit verglichen werden (Lohmander LS 2000). Dabei werden seltene Formen von vererbten Krankheiten von seltenen Mutationen mit hoher Penetranz verursacht, die schwerwiegende Effekte haben und „early onset“ auftreten. Häufigere Formen der gleichen Krankheit, im höheren Alter auftretend, werden hingegen mit genetischen Risikofaktoren in Form von allgemeinen Polymorphismen in der Population in Verbindung gebracht.

Von entscheidender Bedeutung könnte die genetische Prädisposition für das Ausmaß der entzündlichen Reaktion auf freigesetzte Antigene des Gelenkes sein. Bei 50-80 % der RA-Patienten wurde ein Locus (HLA-DR4) gefunden. Dabei glaubt man, dass v.a. die Diversität des HLA-DRB1-Locus eine Rolle für die Aggressivität des Krankheitsverlaufs spielt. Denkbar wäre, dass bei der OA eine Art „protektiver Locus“ existiert, der Arthrose-Patienten dazu befähigt, ein primär nicht entzündliches

Reaktionsmuster auszubilden. Denn durch die hauptsächliche Rekrutierung bereits Antigen-aktivierter B-Zellen entfällt die Notwendigkeit von größeren folliculären Anhäufungen, sowie eines sich aufrechterhaltenden entzündlichen Geschehens.

Mit dem Gedanken, eine Art protektiven Genlokus in Individuen zu transferieren, hat man bereits gespielt. Als Kandidaten für den Gentransfer kommen beispielsweise die Gene für IL-10 oder IL-13, aber v.a. für den IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1Ra) in Frage, deren Effekt man in Tiermodellen studiert hat. In vitro hat es IL-1Ra bereits ermöglicht, die Knorpel-Degradation zu stoppen und das Fortschreiten der experimentellen OA zu reduzieren (Pelletier JP et al. 2001).

Durch Anwendung der „microarray cDNA-Gene“ könnten in naher Zukunft Gene mit Relevanz zur OA-Pathologie identifiziert werden, die für die unterschiedlichen Infiltrationsmuster verantwortlich sind, und unser Verständnis für diese Krankheit fördern und neue Wege in Richtung molekularbiologische Diagnostik und neuartige Behandlungstechniken weisen.

5. Zusammenfassung

Die Synovialmembran zeigt bei Osteoarthritis, einer primär degenerativen Erkrankung, ein sekundäres entzündliches Geschehen. Histopathologisch existiert das entzündliche Infiltrat in zwei unterschiedlichen Mustern, die jedoch eine sekundäre, durch Knorpelalteration bedingte Synovialitis gemeinsam haben: (1) Detritus Synovialitis und (2) lympho-plasmazelluläre Synovialitis, beide mit leicht ausgeprägter entzündlicher Infiltration durch Lymphozyten und Plasmazellen.

Ziel dieser Studie war es, ein genaueres Verständnis von der B-Zell-Aktivierung in der Synovialmembran der OA zu eruieren. Denn es ist immer noch ungeklärt, ob die B-Lymphozyten im synovialen Infiltrat Antigen-aktiviert sind, als solche möglicherweise schon einwandern, oder ob sie auch lokal expandieren (im Sinne einer antigenabhängigen Affinitätsmaturation), wie bei der RA. Bei dieser ist inzwischen eine lokale Affinitätsmaturation in synovialen Keimzentren bewiesen.

Dazu wurden **IgVH-Gene** der synovialen B-Lymphozyten **analysiert** und **immunhistochemische Färbungen durchgeführt**, da bis dato noch wenige morphologische, als auch molekularbiologische Daten über die synovialen B-Zellen bzw. Plasmazellen in der OA vorliegen.

Ein Fokus wurde auf die Antigen-Aktivierung der synovialen B-Lymphozyten (charakterisiert durch hohe R/S-Ratios) gerichtet.

Um der Herkunft des Entzündungsgeschehens nachzugehen, wurde die Histologie verschiedener Differenzierungsstufen von B-Lymphozyten im entzündlichen Infiltrat von nicht-follikulären und follikelähnlichen B-Zell-Ansammlungen analysiert. Durch CD27/CD20- und CD27/Syndekan-Doppelfärbungen konnte die bevorzugte Lokalisation von Memory- und Plasma-Zellen identifiziert werden. Diese gab nähere Hinweise auf den Ort der Antigen-Aktivierung bei Osteoarthritis.

Die **Resultate** der hohen R/S-Ratios (17/24 Klonen), gerade in den CDR-Regionen, stehen im Einklang mit der gängigen Meinung, dass die CDR-Regionen mehr mutieren als die FR-Regionen, da in diesen eher ein konstantes Antikörpermerkmal erhalten wird, wohingegen die CDR's auf eine Affinitätsanpassung (durch höhere Mutationsraten)

ausgerichtet sind. Die Mutationsrate weist auf eine stattgefundene Antigenaktivierung dieser B-Lymphozyten hin.

Aus den histologischen Schnittbildern mit den oben genannten Doppelfärbungen war v.a. perivaskulär ein Vorkommen von vielen $CD27^+/CD20^+$ Memory-B-Zellen (*PMZ/IaM*), sowie Plasmazellen zu erkennen, dahingegen relativ betrachtet wenige $CD27^+CD20^+$ B-Lymphozyten. Dies deutet darauf hin, dass bei der OA vermehrt bereits aktivierte Memory-Zellen ins Synovialgewebe einwandern. Allerdings zeigte sich eine unerwartete Anhäufung von *Follikelähnlichen Formationen* ohne Keimzentrumscharakter, die Anlaß zu weiteren Überlegungen geben.

Die **Diskussion** findet im Rahmen des generellen *Pathogenese-Konzepts der OA* statt, mit besonderem Augenmerk auf die unterschiedlichen Entzündungstypen und -muster, sowie die dominierenden Zelltypen in der osteoarthrotischen Synovialmembran.

Da in dem Entzündungsinfiltrat der osteoarthrotischen Synovialmembran keine Keimzentren zu finden sind, nur *Follikelähnliche Formationen*, muss von einer Antigen-Aktivierung und Affinitätsreifung außerhalb des Gelenkes ausgegangen werden. Bei nahezu allen morphologischen Betrachtungen der osteoarthrotischen Synovia fiel eine deutlich hohe Anzahl von $CD27^+/CD20^+$ Memory-B-Lymphozyten perivaskulär auf. Daher kann davon ausgegangen werden, dass wir es beim arthrotischen Entzündungsinfiltrat mit einer Sekundär-Antwort zu tun haben, die auf Antigene reagiert, an die sich das Immunsystem „erinnert“ und bereits aktivierte B-Zellen einwandern.

Zusammenfassend legt die Datenlage nahe, dass man offensichtlich von einer immunologischen Bekanntheit es körpereigenen Immunsystems mit freigesetzten Antigenen in der OA sprechen kann.

Hierdurch wurde ein Beitrag zum immunpathogenetischen Verständnis der sekundären Begleitsynovialitis dahingehend gefunden, dass die geringer ausgeprägte Entzündung in der Arthrose -im Gegensatz zur RA- ein Ausdruck der Reaktivität auf „dem Immunsystem in Erinnerung gebliebener“ Antigene ist.

Der Vergleich der potentiellen Antigene bei den Krankheitsbildern RA und OA weist einige Gemeinsamkeiten auf, wodurch sich die Frage einer genetischen Prädisposition für das Ausmaß des Entzündungsgrades in den Gelenken ergibt.

6. Literatur

1. Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Komiyama A (2000): CD27: a memory B-cell marker. *Imm Today*, Vol.21: 204-205
2. Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Shinozaki K, Yamada S, Komiyama A (1999): Plasma cell generation from B-lymphocytes via CD27/CD70 interaction. *Leuk Lymphoma*, 35 (3-4): 219-25
3. Aigner T, Stöß H, Weseloh G, Zeiler G, von der Mark (1992): Activation of collagen type II expression in osteoarthrotic and rheumatoid cartilage. *Virchows Archiv (B)*:62:337-345
4. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M (1986): Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 29:1039-1049.
5. Altman RD, Gray R (1985): Inflammation in Osteoarthritis. *Clinics in Rheumatic Diseases*: 353-65
6. Arnett F, Edworthy S, Bloch D, *et al.* (1988): The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315-324.
7. Bancherau J, Rousset F (1992): Human B lymphocytes: phenotype, proliferation, and differentiation. *Adv Immunol* 52: 125-162
8. Becker R, Stiehl P (1996): Connections between antigen presenting cells (synovial dendritic cells) and various histologic types of synovial membrane in rheumatoid arthritis. *Verh Dtsch Ges Pathol.*;80:328
9. Berek C, Berger A, Apel M (1991): Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 67:1121-1129.
10. Berek C, Milstein C (1987): Mutation drift and repertoire shift in the maturation of immune response. *Immunol Rev* 96:23-41.
11. Bigler RD, Bushkin Y, Chiorazzi N (1988): S152 (CD27). A modulating disulfid-linked T-cell activation antigen. *J Immunol* 141: 21-28
12. Böcker W, Denk H, Heitz PhU, Pathologie. *Generalisierte immunologische Krankheiten*: 977f

13. Brandt K, Lohmander SL and Doherty M (1998): Pathogenesis of Osteoarthritis. Oxford Medical Publications: 70-73
14. Brewerton Derrick, M.D. (1992): All about Arthritis, Harvard University Press, 124-135
15. Camacho SA, Kosco-Vilbois MH, Berek C (1998): The dynamic structure of the germinal center. *Immunol Today* 19:511-514.
16. Carey DJ (1997): Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem. J.* 327, 1–16
17. Carter RA and Ian PW (2001): Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (CD106) – a multifaceted regulator of joint inflammation: *Arthr Rheum*, 44(5), 985-994
18. Chang B, Casali P (1994): The CDR1 sequences of a major proportion of human germline IgVH genes are inherently susceptible to amino acid replacement. *Immunol. Today* 15 (8): 367-373.
19. Conca W (1996), *Klinische Immunologie*, hrg. v. Peter & Pichler S, U&S: 134-138
20. Cooper NS, Soren A, McEwen C, Rosenberger JL (1981): Diagnostic specificity of synovial lesions. *Hum Pathol* 12:314-328.
21. de Jong R, Brouwer M, Hooibrink B, van der Puow-Kraan T, Miedema F, van Lier RAW (1992): The CD27⁺ subset of peripheral blood memory CD4⁺ lymphocytes contains functionally differentiated T lymphocytes that develop by persistent antigenic stimulation in vivo. *Eur J Immunol* 22: 993-999
22. Denk H, Böcker W, Heitz PhU (1997): Degenerative Gelenkerkrankungen. *Pathologie, Urban & Schwarzenberg*: 895 ff
23. Dörner T, Brezinschek HP, Brezinscheck RI, et al: Analysis of the frequency and pattern of somatic mutations within nonproductively rearranged human variable heavy chain genes. *J Immunol* 1997, 158: 2779-2789
24. Fassbender HG (1987): Role of chondrocytes in the development of osteoarthritis. *Am J Med* 83:17-24.
25. Felson DT (1990): The epidemiology of knee osteoarthritis: results from the Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 20: 42-50
26. Franchi A, Bollough PF (1992): Secondary avascular necrosis in coxarthrosis: A morphologic study. *J Rheumatol* 19: 1263-1268
27. Guerassimov A, Zhang Y, Cartman A, Rosenberg LC, Esdaile J, Fitzcharles MA, Poole AR: Immune responses to cartilage link protein and the G1 domain of proteoglycan aggrecan in patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1999 Mar;42(3):527-33.

28. Haraoui B, Pelletier JP, Cloutier JM, Faure MP, Martel-Pelletier J. Synovial membrane histology and immunopathology in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: in vivo effects of antirheumatic drugs. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 153-63
29. Hesse I, Mohr W, Hesse W (1990): Morphologische Veränderungen in frühen Stadien der Arthrose. *Orthopäde*, 19: 16-27
30. Hintzen RQ, de Jong R, Hack CE, Chamuleau M, De Vries EFR, ten Berge IHM, Borst J, van Lier RAW (1991): A soluble form of the human T cell differentiation antigen CD27 is released after triggering of the TCR/CD3 complex. *J Immunol* 147: 29-35
31. Hintzen RQ, Lens SMA, Lammers K, Kuiper H, Beckmann MP, Goodwin RG, van Lier RAW (1995): Engagement of CD27 with its ligand (CD70) provides a second signal for T-cell-activation. *J Immunol* 154: 2612-2630
32. Hockenberry DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ: Bcl-2 function in a antioxidant pathway to prevent apoptosis (1993): *Cell* 85: 241-251
33. Holderbaum D, Haqqi TM, Moskowitz RW (1999): Genetics and osteoarthritis: exposing the iceberg. *Arthritis Rheum* 42:397-405.
34. Holderbaum D, Haqqi TM, Moskowitz RW (1999): Genetics and osteoarthritis: exposing the iceberg. *Arthritis Rheum* 42:397-405.
35. Jacquot S, Kabota T, Iwata S, Morimoto C, Schlossman SF (1997): CD154/CD40 and CD70/CD27 interactions have different and sequential functions in T-cell dependent B-cell responses. *J Immunol* 159: 2652-2657
36. Jalkanen S, Steere AC, Fox RI, Butcher EC (1986): A distinct endothelial cell recognition system that controls lymphocyte traffic into inflamed synovium. *Science* 1986, 233: 565-568
37. Johnson BA, Haines GK, Harlow LA, Koch AE (1993): Adhesion molecule expression in human synovial tissue. *Arthritis & Rheumatism*, 36 (2): 137-46
38. Kabota T, Jacquot S, Kozlowski S, Agematsu K, Schlossman SF, Morimoto C (1995): CD70/CD27 interactions regulate B-cell activation by T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11249-11253
39. Kehrl JH, Riva A, Wilson GL and Claire Thevenin: Molekular mechanisms regulating CD19, CD20 and CD22 gene expression. *Imm Today*, Vol. 15, 9: 432-442
40. Kellgren JH, Lawrence JS (1957): Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 16:494-501.

41. Kennedy TD, Plater-Zyberk C, Partridge TA, Woodrow DF, Maini RN (1988): Morphometric comparison of synovium from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *J Clin Pathol* 41:847-852.
42. Kim HJ, Krenn V, Steinhauser G, Berek C (1999). Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J Immunol* 162 (5):3052-3062
43. Klein U, Rajewsky K, Küppers R (1998): Human Immunglobulin (Ig)M+IgD+ Peripheral Blood B Cells Expressing the CD27 Cell Surface Antigen Carry Somatic Mutated Variable Region Genes: CD27 as a General Marker for Somatic Mutated (Memory) B Cells. *J Exp Med*, Vol. 188, 9, Nov 2: 1679- 1689
44. Koller M, Aringer M, Kiener H, Erlacher L, Machold K, Eberl G, Studnicka-Benke A, Graninger W, Smolen J (1999): Expression of adhesion molecules on synovial fluid and peripheral blood monocytes in patients with inflammatory joint disease and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.*;58(11):709-12.
45. Kopper L, Sebestyen A (07/2000) : Syndecans and the lymphoid system. *Leuk Lymphoma*;38(3-4):271-81
46. Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D: Organ-Specific Disease Provoked by Systemic Autoimmunity (1996): *Cell*. 87: 811-822
47. Kraan MC, Haringman JJ, Post WJ, Versendaal J, Breedveld FC, Tak PP: Immunohistological analysis of synovial tissue for differential diagnosis in early arthritis. *Rheumatology* 1999; 38: 1074-1080.
48. Krenn V, Hensel F, Kim HJ, Souto Carneiro MM, Starostik P, Ristow G, König A, Vollmers HP, Müller-Hermelink HK (1999): Molecular IgV(H) analysis demonstrates highly somatic mutated B-cells in synovialitis of osteoarthritis: a degenerative disease is associated with a specific, not locally generated immune response. *Lab Invest* , 79(11): 1377-84
49. Krenn V, Souto Carneiro MM, Kim HJ, et al: Histopathology and molecular pathology of synovial B-lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Histol Histopath* 2000
50. Lens S MA, Tesselaar K, van Oers M HJ and van Lier RAW (1998): Control of lymphocyte function through CD27-CD70 interactions: *Immunol*, Vol. 10: 491-499
51. Liu YJ (1997): Reuse of B lymphocytes in germinal centers. *Science* 278: 238
52. Lohmander LS (2000): What can we do about osteoarthritis?. *Arthritis Res* 2000, 2; 95-100

53. MacLennan IC (1994): Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12:117-139.
54. Maurer D, Fischer GF, Fae I, Majdic O, Stuhlmeier K, Von Jeney N, Holter W, Knapp W (1992): IgM and IgG but not cytokine secretion is restricted to the CD27+ B lymphocyte subset. *J Immunol* 148: 3700-3705
55. Maurer D, Holter W, Majdic O, Fischer GF, Knapp W (1990): CD27 expression by a distinct subpopulation of human B lymphocytes. *Eur J Immunol* 20: 2679-2684
56. McHeyzer-Williams MG, Ahmed R (1999): B cell memory and the long-lived plasma cell. *Current Opinion in Immunology* 11:172-179.
57. Michel B.A (1998): Arthrosen. *Rheumatologie in Kürze*, hrg. v. Niklaus J. Gerber, Thieme. 43-54
58. Mohr W (1993): Pathogenese der Arhrose-primäre Ereignisse und Folgen. *Med.Orthop.Tech* 113:54-58
59. Morales TI, Hascall VC (1989): Factors involved in the regulation of proteoglycan metabolism in articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 32:1197-1202
60. Moos V, Muller B, Sieper J(2000): Cytokine two different phenotypes. *Arthritis Rheum* 2000 Nov;43(11):2417-22
61. Nakamura H, Yoshino S, Kato T, Tsuruha J, Nishioka K (1999): T-cell mediated inflammatory pathway in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 1999 Jul;7(4):401-2.
62. Niethard FU, Pfeil J. (1997): Gelenkerkrankungen. *Orthopädie, MLP*:181-196
63. Niethard, Fritz U (1999): Pathogenesis of Osteoarthritis – Approaches to a Specific Therapy. *Am J Orthop* 28 (11 Suppl): 8-10
64. Odendahl M et al. (2000): Disturbed Peripheral B Lymphocyte Homeostasis in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 15; 165 (10): 5970-9
65. Ogilvie-Harris DJ, Fornasier VL (1980): Synovial iron disposition in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 7: 30-36
66. Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B, Mackay CR (1998): The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T-cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest*, 101 (4): 746-54
67. Pap G, Eberhardt R, Röcken C, Nebelung W, Neumann HW and Roessner A (2000): Expression of Stromelysin and Urokinase Type Plasminogen Activator Protein in Resection Specimens and Biopsies at Different Stages of Osteoarthritis of the Knee. *Pathol Res Pract* 196: 219-226
68. Peter HH, Pichler WJ (1996): *Klinische Immunologie*, Urban und Fischer Verlag, 16ff

69. Petrides Petro E, Löffler, Petrides, Springer (1997): Binde- und Stützgewebe, 732-52
70. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Steven BA: Osteoarthritis, an inflammatory disease: Potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum*; 44(6), 1237-47
71. Pitzalis C. (1996): The Michael Mason Prize Essay 1996, Role of adhesion mechanisms in the pathogenesis of chronic synovitis. *Brit. Jour. of Rheum.* 1996, 35: 1198-1215
72. Pritzker Kenneth PH (1998): Pathology of Osteoarthritis. Osteoarthritis, Oxford Medical Publications, 56-57
73. Pulendran B, van Driel R., Nossal GJV: Immunological tolerance in germinal centres. *Immunol Today*, 18(1), 27-31
74. Ravetsch JV, Siebenlist U, Korsmeyer S, Waldmann T, Leder P: Structure of the human immunoglobulin λ locus: characterisation of embryonic and rearranged J and D genes. *Cell* 1981, 27: 583-591
75. Raymond JB, Cain PR, Evans CH (1988): Articular Responses to purified cartilage proteoglycans. *Arthr Rheum*, 31(2): 258-66
76. Revell PA, Mayston V, Lalor P and Mapp P (1988): The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. *Annals of Rheumatic Diseases* 47: 300-307
77. Ristow G, Krenn V, Souto Carneiro MM, König A, Kramer C, Müller-Hermelink HK (1999): Immunophenotype of the inflammatory infiltrate and expression of interleukin 2 and interleukin 10 in osteoarthrotic synovial tissue. *Pathol Res Pract* 195 (5):317.
78. Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M (1989): B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul* 1:27-35.
79. Senior K (2000): Osteoarthritis research: on the verge of revolution?. *The Lancet*, Vol 355, p. 208
80. Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A, Wolfowicz CB, Rothstein TL, Weigert MG (1987): The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity. *Nature* 328:805-811.
81. Soren A, Cooper NS, Waugh TR (1988): The nature and designation of osteoarthritis determined by its histopathology. *Clin Exp Rheumatol* 6:41-46.
82. Soren A, Cooper NS, Waugh TR (1988): The nature and designation of osteoarthritis determined by its histopathology. *Clin Exp Rheumatol* 6:41-46.

83. Souto Carneiro MM, Krenn V, Hermann R, König A, Müller-Hermelink HK: IgVH genes from different anatomical regions, with different histopathological patterns, of a rheumatoid arthritis patient suggest cyclic re-entry of mature synovial B-cells in the hypermutation process (2000). *Arthr Res* 2: 303-314
84. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R and Schlossman SF (1980). *J Immunol* 125, 1678-1685
85. Sugita K, Robertson MJ, Torimoto Y, Ritz J, Schlossman SF, Morimoto C (1992): Participation of the CD27 antigen in the regulation of the IL-2-activated human natural killer cells. *J Immunol* 149: 1199-1203
86. Tedder TF, Engel Pablo (1994): CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immun Today*, Vol.15, 9: 450-454
87. Tiku ML, Shah R, Allison GT (2000): Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation. Possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. *J Biol Chem*. 2000 Jun 30;275(26):20069-76.
88. von der Mark K, Glückert K (1990): Biochemische und molekularbiologische Aspekte zur Früherfassung humaner Arthrosen, *Orthopäde* 19: 2-15
89. von der Mark K, Frischholz S, Aigner T, Beier F, Belke J, Erdmann S, Burkhardt H (1995): Upregulation of type X collagen expression in osteoarthritic cartilage. *Acta Orthop Scand. Suppl* 266, 125-129
90. Williams DG, Taylor PC (1997): Clonal analysis of immunoglobulin mRNA in rheumatoid arthritis synovium: characterization of expanded IgG3 populations. *Eur J Immunol* 1997, 27: 476-485
91. Wollheim FA (1999): Osteoarthritis, New Challenges in an Old Disease. *RheumaDerm*: 423-428
92. Zwillich SH, Fang Q, Kieber-Emmons T, Vonfeldt J, Monos D, Ramanujam T, Wang B, Weiner DB, Willams WV (1994): V alpha gene usage in rheumatoid compared with osteoarthritic synovial tissue T cells. *DNA Cell Biol* 13:923-931.

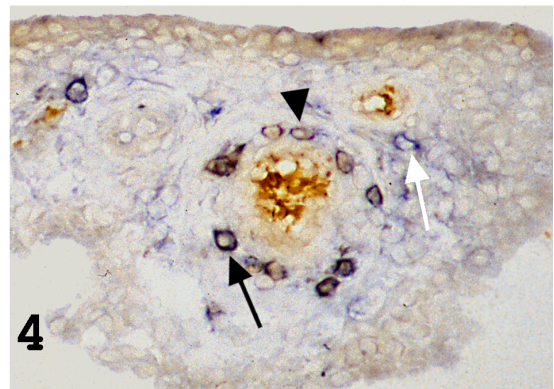
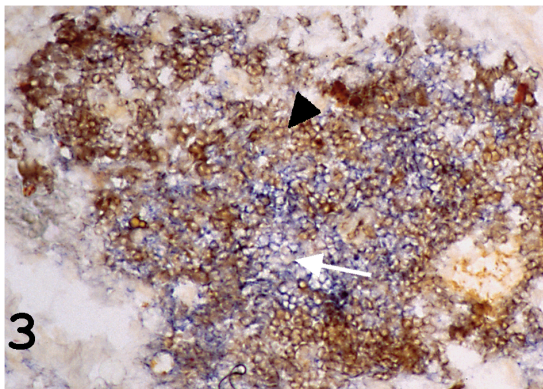
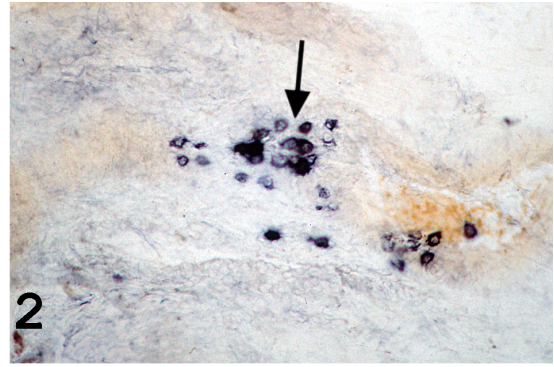
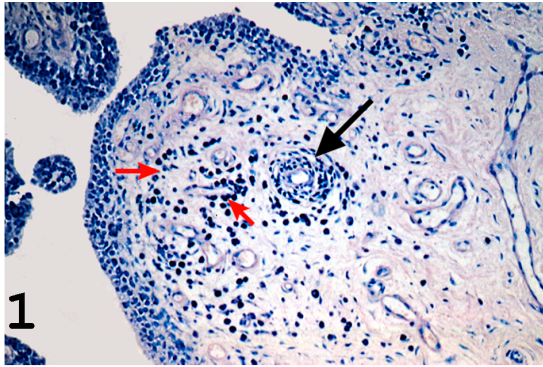


Abbildung 1: Giemsa-Färbung; *schwarzer Pfeil:* „lymphoplasmazelluläres Infiltrat“, perivaskulär, *rote Pfeile:* „Plasmazelluläre Gruppen“ einzeln liegender, morphologisch größerer Lymphozyten in der Nähe von Kapillaren

Abbildung 2: immunhistochemische CD27/Syndekalin-Doppelfärbung → schwarze Plasmazellen in einer kleinen Gruppe (*scharzer Pfeil*)

Abbildung 3: Follikelähnliche Formation mit CD27⁺CD20⁻ B-Lymphozyten (braun, *Pfeilspitze*) und CD20⁺CD27⁻ B-Lymphozyten (blau, *weißer Pfeil*) in immunhistochemischer Doppelfärbetechnik

Abbildung 4: perivaskuläre Anordnung von mehreren CD27⁺CD20⁻ B-Lymphozyten (braun, *Pfeilspitze*), wenigen CD27⁺ CD20⁺ doppelgefärbten Memory-Zellen (*schwarz, schwarzer Pfeil*) und einer CD20⁺CD27⁻ B-Zelle (blau, *weißer Pfeil*) in immunhistochemischer Doppelfärbetechnik

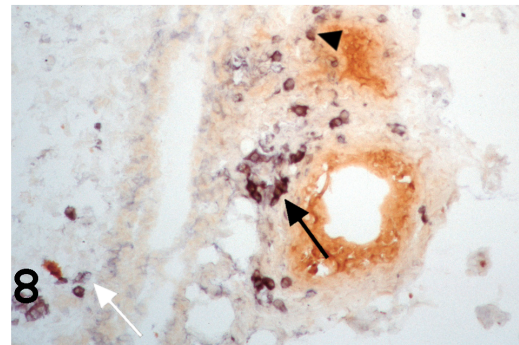
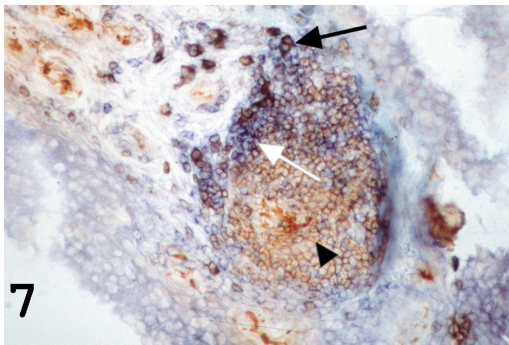
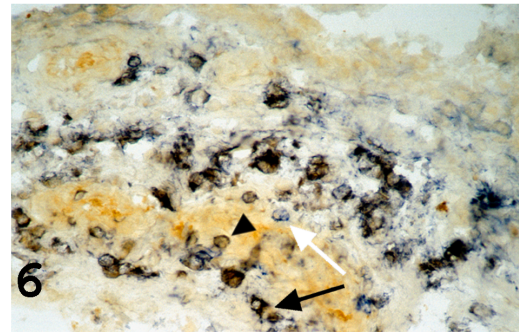
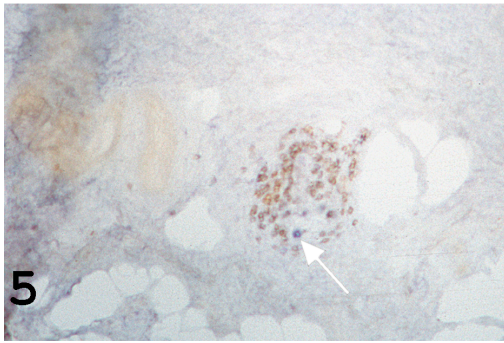


Abbildung 5: Eine $CD20^+CD27^-$ B-Zelle (blau, *weißer Pfeil*) unter vielen $CD27^+CD20^-$ B-Lymphozyten (braun) in iIP und iAP-Färbung

Abbildung 6: längs-perivaskuläre Anordnung von hauptsächlich $CD27^+ CD20^+$ doppelgefärbten Memory-Zellen (schwarz, *schwarzer Pfeil*), mehreren $CD27^+CD20^-$ B-Lymphozyten (braun, *Pfeilspitze*) und wenigen $CD20^+CD27^-$ B-Zellen (blau, *weißer Pfeil*)

Abbildung 7: Follikelähnliche Formation mit $CD27^+ CD20^+$ doppelgefärbten Memory-Zellen (schwarz, *schwarzer Pfeil*), $CD27^+CD20^-$ B-Lymphozyten (braun, *Pfeilspitze*) und $CD20^+ CD27^-$ B-Zellen (blau, *weißer Pfeil*)

Abbildung 8: perivaskuläre Anordnung von $CD27^+ CD20^+$ doppelgefärbten Memory-Zellen (schwarz, *schwarzer Pfeil*), $CD27^+CD20^-$ B-Lymphozyten (braun, *Pfeilspitze*) und wenigen $CD20^+CD27^-$ B-Zellen (blau, *weißer Pfeil*), weiter vom Blutgefäß entfernt

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. K. Müller-Hermelink danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas.

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. V. Krenn für den fortwährenden Kontakt und die Hilfestellungen beim Erstellen der Arbeit, trotz des Rufes nach Berlin. Nicht minder Dank schulde ich der ursprünglichen Betreuerin, Frau Dr. M. M. Souto-Carneiro, die ihre wissenschaftliche Tätigkeit in die Vereinigten Staaten führte.

Auch danke ich Herrn E. Schmitt und C. Kabalo für die professionelle Zusammenarbeit bei der Bildbearbeitung, M. Stockinger u.v.a. für die gemeinsame Zeit im Labor, Frau Seifert für ihre bibliothekarische Expertise, Prof. H. Höhn für die Zweitkorrektur, sowie allen, die an der Erstellung der Arbeit beteiligt waren und mich während meiner Zeit in Würzburg begleitet haben: J. Blondelot, P. Haiduk, J. Pokall, Johnny Ponster, D. Brookman-Amissah, S. Geis, Joe „el impresor“, A. Krug, M. Oberkötter, T. Smul, F. Weber, D. Ziegler, u.v.a.

Ein spezieller Dank gilt meinen Eltern und Großeltern für ihre unermüdliche Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit.