

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR Innere Medizin I
Direktor: Prof. Dr. Martina Müller-Schilling
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

REZEPTOREN FÜR B CELL ACTIVATING FACTOR OF THE TUMOR NECROSIS
FACTOR FAMILY (BAFF) AUF SYNOVIALEN FIBROBLASTEN – VERGLEICHENDE
STUDIE ZWISCHEN RHEUMATOIDER ARTHRITIS UND OSTEOARTHROSE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tareq Marius Anssar

2016

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR Innere Medizin I
Direktor: Prof. Dr. Martina Müller-Schilling
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

REZEPTOREN FÜR B CELL ACTIVATING FACTOR OF THE TUMOR NECROSIS
FACTOR FAMILY (BAFF) AUF SYNOVIALEN FIBROBLASTEN – VERGLEICHENDE
STUDIE ZWISCHEN RHEUMATOIDER ARTHRITIS UND OSTEOARTHROSE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tareq Marius Anssar

2016

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Georg Pongratz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Tobias Renkawitz

Tag der mündlichen Prüfung: 30.08.2016

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 7 |
| 1.1 | Rheumatoide Arthritis | 7 |
| 1.1.1 | Ätiologie | 7 |
| 1.1.2 | Klinik und Diagnose | 7 |
| 1.1.3 | Pathogenese | 9 |
| 1.1.3.1 | Überblick über die beteiligten Immunzellen | 9 |
| 1.1.3.2 | Synoviale Fibroblasten (SF)..... | 11 |
| 1.2 | Regulation synovialer Fibroblasten | 13 |
| 1.3 | Das BAFF/APRIL-System | 14 |
| 1.3.1 | Liganden..... | 14 |
| 1.3.1.1 | BAFF..... | 14 |
| 1.3.1.2 | APRIL..... | 14 |
| 1.3.1.3 | Vorkommen von BAFF und APRIL..... | 15 |
| 1.3.2 | Rezeptoren..... | 15 |
| 1.3.2.1 | BAFF-Rezeptor | 16 |
| 1.3.2.2 | TACI..... | 16 |
| 1.3.2.3 | BCMA | 17 |
| 1.3.2.4 | Weitere Rezeptoren | 17 |
| 1.3.3 | Funktionen des BAFF/APRIL-Systems | 17 |
| 1.3.3.1 | Homöostase der B-Zellen | 17 |
| 1.3.3.2 | Antikörper-Klassenwechsel | 18 |
| 1.3.3.3 | T-Zell-Physiologie..... | 18 |
| 1.3.4 | Rolle des BAFF/APRIL-Systems bei verschiedenen Erkrankungen | 19 |
| 1.3.5 | Entwicklung zielgerichteter Therapeutika im BAFF/APRIL-System..... | 21 |
| 1.4 | Zielsetzung der Arbeit | 22 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 23 |
| 2.1 | Material | 23 |
| 2.1.1 | Geräte | 23 |
| 2.1.2 | Verbrauchsmaterial..... | 24 |
| 2.1.3 | Chemikalien..... | 25 |
| 2.1.4 | Stimulanzien..... | 26 |
| 2.1.5 | Antikörper zum Nachweis von BAFF-R, BCMA und TACI in der FACS-Analyse..... | 26 |
| 2.1.6 | Reagenzien zur Untersuchung der Apoptose..... | 27 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.1.7 | Antikörper und Färbelösungen für Gelelektrophorese und Western Blot | 27 |
| 2.1.8 | Antikörper für die Immunhistochemie | 28 |
| 2.1.9 | Zusammensetzung der für die FACS-Analyse und die Immunhistochemie verwendeten Puffer und Medien | 29 |
| 2.1.10 | Lösungen für Gelelektrophorese und Western Blot | 30 |
| 2.2 | Methoden | 31 |
| 2.2.1 | Patienteneigenschaften | 31 |
| 2.2.2 | Gewinnung von Fibroblasten aus Synovialgewebe..... | 32 |
| 2.2.3 | Zellkultur | 32 |
| 2.2.4 | Untersuchung der Expression von BAFF-R, BCMA und TACI mittels FACS-Analyse..... | 33 |
| 2.2.4.1 | Grundlagen der Durchflusszytometrie | 33 |
| 2.2.4.2 | Stimulation der Proben | 33 |
| 2.2.4.3 | Färbung der Proben und Messung im FACS-Gerät | 34 |
| 2.2.5 | Untersuchung der Wirkung von BAFF-Standard und rekombinatem BAFF auf die Apoptoserate von Fibroblasten..... | 36 |
| 2.2.5.1 | Inkubation mit BAFF-Standard | 36 |
| 2.2.5.2 | Inhibitionsversuche mittels Antikörper gegen BAFF | 37 |
| 2.2.5.3 | Untersuchung der Wirkung von rekombinatem BAFF mit und ohne Zugabe eines blockierenden Antikörpers gegen BCMA..... | 37 |
| 2.2.5.4 | Untersuchung der Apoptoserate per FACS-Analyse..... | 38 |
| 2.2.5.5 | Auswertung der FACS-Daten | 38 |
| 2.2.5.6 | Statistische Methoden..... | 40 |
| 2.2.6 | Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)..... | 40 |
| 2.2.7 | Coomassie-Färbung..... | 41 |
| 2.2.8 | Western Blot | 41 |
| 2.2.9 | Immunhistochemie | 43 |
| 2.2.9.1 | Grundlagen der Immunhistochemie | 43 |
| 2.2.9.2 | Vorbereitung der Proben..... | 43 |
| 2.2.9.3 | Färbung der Proben..... | 43 |
| 2.2.9.4 | Aufnahme der Bilder | 44 |
| 3 | ERGEBNISSE | 45 |
| 3.1 | Untersuchung der Expression von BAFF-R, TACI und BCMA auf synovialen Fibroblasten von Patienten mit Osteoarthrose und Rheumatoider Arthritis per FACS-Analyse | 45 |
| 3.1.1 | Charakterisierung synovialer Fibroblasten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis..... | 45 |
| 3.1.2 | Einflüsse verschiedener Stimulanzen auf die Rezeptorexpression | 49 |
| 3.1.2.1 | Zytokine | 49 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.1.2.2 | Liganden der Toll-like Rezeptoren | 55 |
| 3.1.2.3 | PMA | 58 |
| 3.1.2.4 | BAFF | 59 |
| 3.2 | Immunhistochemische Untersuchung der Expression von BAFF-R, TACI und BCMA auf synovialen Fibroblasten | 61 |
| 3.3 | Untersuchung des Einflusses von BAFF auf die Apoptoserate synovialer Fibroblasten | 66 |
| 3.3.1 | Abhängigkeit der Apoptoserate von der Konzentration des verwendeten BAFF-Standards..... | 66 |
| 3.3.1.1 | Frühapoptose | 67 |
| 3.3.1.2 | Spätapoptose..... | 68 |
| 3.3.1.3 | Nekrose..... | 69 |
| 3.3.1.4 | Gesamtapoptose | 70 |
| 3.3.2 | Untersuchung der selektiven Blockade von BAFF-R, TACI und BCMA unter Stimulation mit BAFF-Standard | 71 |
| 3.3.3 | Untersuchung der Wirkung von rekombinantem BAFF auf die Apoptoserate mit und ohne Blockade des BCMA | 75 |
| 3.3.4 | Vergleichende Untersuchung der Zusammensetzung des BAFF-Standards und des rekombinanten BAFF | 77 |
| 3.3.4.1 | Untersuchung der Proteinzusammensetzung von BAFF-Standard und rekombinantem BAFF mittels nativer PAGE und Coomassie-Färbung | 77 |
| 3.3.4.2 | Detektion von BAFF im Western Blot nach Durchführung einer nativen PAGE | 79 |
| 3.3.4.3 | Detektion von BAFF im Western Blot nach Durchführung einer SDS-PAGE..... | 80 |
| 4 | DISKUSSION | 81 |
| 4.1 | Expression der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA auf synovialen Fibroblasten von OA- und RA-Patienten | 81 |
| 4.2 | Expression von BAFF-R, TACI und BCMA in Abhängigkeit verschiedener Stimulanzen..... | 83 |
| 4.2.1 | Expression von BAFF-R, TACI und BCMA in Abhängigkeit der Zytokine IL-1 β , IFN- γ und TNF- α | 83 |
| 4.2.2 | Expression von BAFF-R, TACI und BCMA in Abhängigkeit der TLR-Liganden CpG und Poly (I:C) | 85 |
| 4.2.3 | Expression der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA nach Stimulation mit PMA..... | 86 |
| 4.2.4 | Expression der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA nach Stimulation mit BAFF | 87 |
| 4.3 | Untersuchung des Einflusses von BAFF auf die Apoptoserate synovialer Fibroblasten..... | 88 |
| 4.3.1 | Steigerung der Apoptoserate unter Verwendung eines BAFF-Standards..... | 88 |
| 4.3.2 | Versuch der Antagonisierung des BAFF-Standards durch Blockade der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA | 89 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.3.3 | Untersuchung der Wirkung von rekombinantem BAFF auf die Apoptoserate synovialer Fibroblasten | 90 |
| 4.3.4 | Unterschiedliche Zusammensetzung von BAFF-Standard und rekombinantem BAFF | 90 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 94 |
| 6 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 95 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 98 |
| 8 | LEBENS LAUF | 115 |
| 9 | DANKSAGUNG..... | 116 |

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

Unter Rheumatoider Arthritis (RA) versteht man eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung, die sich bevorzugt an den Gelenken manifestiert und unbehandelt in der Regel zu fortschreitender Zerstörung führt. Die Prävalenz liegt in Europa bei etwas weniger als 0,5 %, wobei Frauen etwa zwei- bis dreimal häufiger betroffen sind als Männer ¹. Der Erkrankungsgipfel liegt bei Frauen zwischen 55 und 64 Jahren, bei Männern zwischen 65 und 74 Jahren ².

1.1.1 Ätiologie

Die Ätiologie der RA ist noch nicht vollständig geklärt. In Zwillingsstudien konnte gezeigt werden, dass die Konkordanz monozygoter Zwillinge etwa 15 % beträgt, die dizygoter Zwillinge etwa 4 % ³. Genetische Faktoren sollen zu ca. 60 % für die Ausprägung der Erkrankung verantwortlich sein, die restlichen 40 % gehen in erster Linie auf Umwelteinflüsse zurück ⁴. Ein erhöhtes genetisches Risiko besteht bei einigen HLA (human leukocyte antigen)-DR4-Subtypen, wobei es sich um MHC-II-Moleküle (major histocompatibility complex) handelt, die durch bestimmte Varianten des DRB1-Gens kodiert werden. Diese besitzen als gemeinsames Merkmal an der dritten hypervariablen Region des Moleküls die gleiche Aminosäuresequenz, die als „*Shared Epitope*“ bezeichnet wird ^{5 6}. Weitere bedeutende, mit RA assoziierte Mutationen betreffen das *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22* (PTPN22)-Gen ⁷ und das dritte Intron im *Signal transducer and activator of transcription 4* (STAT4)-Gen ⁸. Mögliche, durch die Umwelt bedingte Risikofaktoren sind Rauchen, Übergewicht, Parodontitis und verkehrsbedingte Luftschadstoffe ^{9 10 11 12}. Mögliche protektive Faktoren sind die Einnahme oraler Kontrazeptiva und Alkoholkonsum ^{13 14}.

1.1.2 Klinik und Diagnose

Unspezifische Symptome der RA sind Schmerzen, Schwächegefühl, Müdigkeit, Fieber und Gewichtsverlust. Die Erkrankung betrifft vor allem distale Gelenke und befällt im Verlauf bevorzugt symmetrisch die proximalen Interphalangeal-, sowie die Finger- und Zehengrundgelenke. Die ablaufende Entzündung zeichnet sich dabei durch Schwellung, Druckschmerz bei Palpation, Erythem, Ergüsse, Morgensteifigkeit und Überwärmung aus. Später kommt es zu Ankylosierungen, Subluxationen und Deformitäten und somit zu einer Einschränkung des Bewegungsumfangs. ¹⁵. Nach einer Erkrankungsdauer von zehn Jahren sollen ohne adäquate Behandlung etwa 35-44 % der Patienten arbeitsunfähig sein ^{16 17}. Im

Vergleich zur Normalbevölkerung ist die Mortalität um den Faktor 1,5-1,6 erhöht, wobei kardiovaskuläre Erkrankungen bereits bei jüngeren Patienten auftreten und Infektionen sowie Lungen- und Nierenerkrankungen gehäuft vorkommen¹⁸. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten extraartikulären Manifestationen der RA.

Tabelle 1: Extraartikuläre Manifestationen nach Lee und Weinblatt 2001

| Organ | Beschwerden |
|--------------|---|
| Haut | Rheumaknoten |
| Auge | Keratokonjunktivitis sicca, Episkleritis, Iritis |
| Lunge | Lungenfibrose |
| Herz | Perikarditis, Myokarditis, Herzklappenveränderungen |
| Leber | Erhöhte Aminotransferasen |
| Blut | Anämie, Thrombozytose, Leukozytose |
| Gefäße | Vaskulitis |

Innerhalb von drei Jahren kommt es bei 63,6 - 70 % der Patienten zu röntgenologisch sichtbaren Erosionen^{19 20}. Weitere typische Befunde neben Erosionen sind lokalisierte Dekalzifikationen und Gelenkspaltverschmälerungen^{21 22}. Weitere zunehmend an Bedeutung gewinnende bildgebende Verfahren zum Nachweis inflammatorischer und destruktiver Vorgänge in den Gelenken sind die Magnetresonanztomographie und der Ultraschall²³.

Eine frühe Therapie ist effektiver und verzögert das Fortschreiten der Erkrankung deutlich, während Patienten mit länger bestehender RA wesentlich schlechter ansprechen²⁴⁻³⁰. Die im Jahr 2010 gemeinsam vom *American College of Rheumatology* (ACR) und der *European League Against Rheumatism* (EULAR) ausgearbeiteten Klassifikationskriterien sollen helfen, die dafür nötige frühzeitige Diagnose zu stellen³¹.

Tabelle 2: ACR/EULAR-Klassifikationskriterien nach Aletaha et al. 2010, Abkürzungen: Rheumafaktor (RF), Antikörper gegen zitruillierte Proteine (ACPA), C-reaktives Protein (CRP), Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG)

| Kriterium | Punkte |
|--|--------|
| A Gelenkbeteiligung | |
| 1 großes Gelenk | 0 |
| 2-10 große Gelenke | 1 |
| 1-3 kleine Gelenke | 2 |
| 4-10 kleine Gelenke | 3 |
| >10 Gelenke (mindestens 1 kleines) | 4 |
| B Serologie | |
| RF und ACPA negativ | 0 |
| RF oder ACPA niedrig positiv | 1 |
| RF oder ACPA hoch positiv (dreifach höher als oberer Normwert) | 2 |
| C Entzündungsparameter | |
| CRP und BSG normal | 0 |
| CRP oder BSG erhöht | 1 |
| D Dauer der Beschwerden | |
| < 6 Wochen | 0 |
| >6 Wochen | 1 |

Die Kriterien sollten nur bei Patienten angewandt werden, die in mindestens einem Gelenk an einer Synovitis leiden und diese nicht durch eine andere Diagnose erklärt werden kann. Von der Wertung ausgeschlossen sind distale Interphalangeal-, Daumensattel- und Großzehengrundgelenke, da sich in diesen häufig Zeichen der Osteoarthritis (OA) zeigen. Ab einem Wert von mindestens sechs Punkten kann die Erkrankung als RA klassifiziert werden³¹. Für RF liegt die Sensitivität bei 69 %, die Spezifität bei 85 %. Für ACPA beträgt die Sensitivität 67 % und die Spezifität 95 %³². RF und ACPA können der klinischen Manifestation der RA zum Teil um Jahre vorausgehen^{33 34}.

1.1.3 Pathogenese

Durch Fortschritte im Verständnis der Pathomechanismen der RA konnten in den letzten Jahren neue Medikamente mit guter Wirksamkeit entwickelt werden. Dennoch sind die genauen Ursachen und Abläufe der Erkrankung noch nicht vollständig verstanden³⁵.

1.1.3.1 Überblick über die beteiligten Immunzellen

Eine wichtige Rolle in der Pathogenese der RA scheint dem adaptiven Immunsystem zuzukommen. Möglicherweise ist eine abgeschwächte negative Selektion bei der Reifung der T-Zellen im Thymus ein wichtiger Faktor, was zu einer erhöhten Zahl potentiell autoreaktiver Zellen führt³⁶. Die Assoziation mit infektiösen Erregern wie dem Epstein-Barr-Virus, dem

Zytomegalievirus, *Proteus mirabilis* oder *E. coli* lässt sich durch eine Form des molekularen Mimikry erklären³⁵. Obwohl sich im Synovium von RA-Patienten viele T-Zellen befinden³⁷, konnte durch eine T-Zell-Depletion keine wesentliche Wirkung nachgewiesen werden³⁸. Abatacept, ein Fusionsprotein aus humanem zytotoxischen T-Zell-assoziierten Antigen 4 und einem Fragment aus der Fc-Region von humanem IgG1, das sich durch einen Angriff an CD80 (*cluster of differentiation*) und CD86 auf Antigen-präsentierenden Zellen gegen die Kostimulation von T-Zellen richtet, ist hingegen gut wirksam³⁹. In den letzten Jahren richtet sich die Aufmerksamkeit immer mehr auf Th17-Zellen⁴⁰, deren Differenzierung durch IL-6 (Interleukin 6) und *transforming growth factor beta* (TGF- β) induziert wird. Diese wird in Anwesenheit von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Interleukin 1 beta (IL-1 β) noch verstärkt, wobei IL-23 wichtig für das Überleben ist^{41 42 43}. Th17-Zellen produzieren in erster Linie die Interleukine 17A, 17F, 21 und 22, sowie TNF- α und wirken somit unter anderem auf Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoblasten^{44 36}. Erhöhte IL-17-Spiegel konnten in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA nachgewiesen werden, nicht jedoch bei Patienten mit OA⁴⁵. Es konnte gezeigt werden, dass Th17-Zellen über die Expression von *receptor activator of NF- κ B ligand* (RANKL) wahrscheinlich auch Bedeutung bei der Aktivierung von Osteoklasten zukommt⁴⁶. Auch sogenannte regulatorische, durch den Transkriptionsfaktor FoxP3 gekennzeichnete CD4+/CD25+- T-Zellen, die andere T-Effektor-Zellen durch direkten Zell-Zell-Kontakt oder über Bildung von IL-10 und TGF- β supprimieren und somit anti-inflammatorisch wirken, scheinen eine wichtige Rolle zu spielen^{47 48}. Es konnte gezeigt werden, dass die erhöhten TNF- α -Spiegel bei Patienten mit RA zu einer verminderten Fähigkeit der regulatorischen T-Zellen führten, die Proliferation⁴⁹ und Bildung von TNF- α und Interferon gamma (IFN- γ)⁵⁰ durch andere T-Zellen zu supprimieren.

Die erfolgreiche Behandlung von RA-Patienten mit Rituximab, einem selektiven Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD20 auf B-Lymphozyten, konnte deren pathogenetische Beteiligung nachweisen⁵¹. Diskutiert werden neben der Produktion von Autoantikörpern wie RF und anti-CCP, die den Verlauf der RA verschlechtern⁵², auch eine Rolle bei der Präsentation von Autoantigenen, sowie der Produktion von Zytokinen wie IL-6, TNF- α und Lymphotoxin- β ³⁵.

Auch dem angeborenen Immunsystem kommt eine große Bedeutung zu. Die Zahl der Makrophagen im Synovialgewebe korreliert mit dem Ausmaß der Erosionen⁵³. Ihre Aktivierung erfolgt zum einen über sogenannte Toll-like-Rezeptoren (TLR), zum anderen

können Makrophagen durch verschiedene Zytokine wie *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) oder *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), Interaktionen mit T-Lymphozyten, Immunkomplexe, Lipoproteine oder ein Protease-reiches Milieu aktiviert werden³⁵. Dies führt zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, -6, -12, -18, -23 und TNF- α , was die Differenzierung von Th1- und Th17-Zellen fördert⁵⁴. Weitere Folgen sind die vermehrte Bildung Matrix-schädigender Enzyme und reaktiver Sauerstoffmetabolite sowie eine verstärkte Präsentation von Antigenen und eine Steigerung der Phagozytose³⁵.

1.1.3.2 Synoviale Fibroblasten (SF)

Die Synovialmembran besteht physiologisch aus einer äußeren, relativ zellarmen, bindegewebigen Schicht mit vereinzelt Blutgefäßen und einer ein bis zwei Zellen breiten, inneren Schicht, in der makrophagenähnliche Typ-A-Synoviozyten und fibroblastenähnliche Typ-B-Synoviozyten vorherrschen⁵⁵. Unterschiede der Typ-B-Synoviozyten zu anderen Fibroblasten sind beispielsweise die Fähigkeit zur Adhäsion untereinander über Cadherin-11⁵⁶ oder die Bildung von Hyaluronan⁵⁷. Physiologisch unterstützt die Synovialmembran die Gelenke strukturell und produziert Synovialflüssigkeit, die als Schmiermittel dient und den Gelenkknorpel ernähren soll⁵⁸.

RA ist durch eine starke synoviale Hyperplasie gekennzeichnet. Während sich in der äußeren Schicht der Synovialmembran T- und B-Lymphozyten anhäufen und zum Teil Lymphfollikel bilden⁵⁹, erhöht sich in der stark verbreiterten inneren Schicht die Zahl der synovialen Makrophagen und Fibroblasten. Die erhöhte Makrophagenzahl lässt sich vermutlich in erster Linie durch eine verstärkte Migration aus dem Knochenmark erklären⁵⁸. Als Ursache für die Zunahme der SF werden neben einer verstärkten Einwanderung mesenchymaler Zellen^{35 60} vor allem Veränderungen in der Resistenz gegen Apoptose angesehen³⁵. So konnte im Synovialgewebe von Patienten mit RA eine verstärkte Expression antiapoptotischer Moleküle wie *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2), *small ubiquitin-related modifier 1* (Sumo-1) und *FLICE-inhibitory protein* (FLIP) nachgewiesen werden⁶¹. Außerdem exprimieren nur 40 % der SF bei RA den Tumor-Suppressor *phosphatase and tensin homolog* (PTEN)⁶². Das Protein p53, das beschädigte DNA-Abschnitte erkennt und daraufhin den Zellzyklus stoppt, um Reparaturmechanismen und gegebenenfalls die Apoptose einzuleiten⁶³, konnte zwar vermehrt in der inneren Synovialschicht nachgewiesen werden, weist aber somatische Mutationen auf⁶⁴. Außerdem besitzen SF weitere tumorartige Eigenschaften wie Wachstum ohne feste Verankerung, Verlust der Kontaktinhibition und invasives Wachstum in den

Knorpel^{65 66 61}. Das dem Knorpel aufliegende Gewebe, das vor allem SF, Makrophagen und Osteoklasten enthält und für die Erosionen in Knorpel und Knochen verantwortlich ist, wird als Pannus bezeichnet⁶⁷.

SF bei RA produzieren eine große Zahl verschiedener Moleküle, was durch die Anwesenheit der proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- α gefördert wird. Durch Chemokine wie *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), *macrophage inflammatory Proteine 1 alpha* (MIP-1 α), MIP-3 α und *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted* (RANTES) werden vor allem Makrophagen angezogen. Durch *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) und *chemokine (C-X-C motif) ligand 16* (CXCL16) werden in erster Linie T-Zellen angelockt⁵⁸. Ein weiteres Kennzeichen der RA ist die schon früh einsetzende Angiogenese, die unter anderem durch Bildung von *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), IL-8 und TGF- β gefördert wird⁶⁸. Das Überleben von B-Zellen in der äußeren Synovialschicht wird unter anderem durch die Bildung von *B-cell activating factor of the TNF-family* (BAFF) verbessert⁶⁹. Des Weiteren führt die Sekretion von M- und GM-CSF unter anderem zur Aktivierung von Makrophagen^{70 71}. Außerdem ist noch die Produktion von IL-6, sowie der Interleukine 18, 32 und 33 aus der IL-1-Familie zu erwähnen⁷².

Die Zerstörung des Gelenkknorpels erfolgt durch direkte Beteiligung der SF. In einem ersten Schritt verankern sich die SF über verschiedene Adhäsionsmoleküle am Gelenkknorpel⁵⁸. Integrine sind $\alpha\beta$ -Heterodimere, die sich aus 18 verschiedenen α - und 8 verschiedenen β -Untereinheiten zusammensetzen können⁷³. Mit ihrer Hilfe binden die SF an Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Laminin oder Kollagene, wobei bei RA vor allem den Integrinen $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$ besondere Bedeutung zukommt^{74 75}. *Vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) ist ein weiteres wichtiges Adhäsionsmolekül⁷⁶. Anschließend erfolgt über die Bildung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), Cathepsinen und Aggrecanasen die eigentliche Zerstörung des Knorpels (Bartok und Firestein 2010). Ihre Expression wird unter anderem durch hohe IL-1- und TNF- α -Spiegel⁷⁷ sowie die Interaktion der aktivierten Adhäsionsmoleküle mit bestimmten Signalwegen induziert⁶¹. MMPs sind Endopeptidasen, die fast alle Bestandteile der extrazellulären Matrix abbauen können⁷⁷, wobei die Membran Typ 1-MMP für die Invasion des Knorpels entscheidend zu sein scheint⁷⁸.

Die Zerstörung des Knochens erfolgt durch Osteoklasten, deren Differenzierung wiederum durch vor allem von SF gebildeten Zytokinen wie M-CSF und RANKL induziert und durch das Milieu aus TNF- α , IL-1 und IL-6 noch verstärkt wird^{79 80 81}.

1.2 Regulation synovialer Fibroblasten

Große Bedeutung bei der Regulation von SF haben über Mitogen-aktiviertes Protein (MAP)-Kinasen führende Signalwege, die durch TNF- α , IL-1 und andere Zytokine sowie durch TLRs aktiviert werden. Dabei sind die *extracellular signal-regulated kinase* (Erk)-, *c-jun-N-terminal-kinase* (JNK)- und p38-Signalwege besonders gut untersucht. Die Effekte werden schließlich durch die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren vermittelt ⁵⁸.

Ein wichtiger Weg zur Regulation von SF führt über den heterodimeren Transkriptionsfaktor *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF κ B), der vermehrt im Synovialgewebe nachgewiesen wurde ⁸². Im Zytoplasma liegt NF κ B gebunden an den Inhibitor I κ B vor und ist somit inaktiv ⁸³. Die Bindung von IL-1 und TNF α an SF führt über verschiedene Zwischenschritte zur Aktivierung der I κ B-Kinase 2 (IKK2) ⁸⁴, die durch Phosphorylierung von I κ B zu dessen Abbau durch das 26S-Proteasom führt ⁸⁵. Das somit im Zytoplasma freigesetzte NF κ B transloziert in den Zellkern und verstärkt unter anderem die Expression von IL-6, IL-8, ⁸⁴, MMP13 ⁸⁶, sowie der oben erwähnten Adhäsionsmoleküle ⁸⁷. Außerdem erhöht NF κ B über eine Suppression der PTEN-Expression die Apoptose-Resistenz ⁸⁸.

Beim *Activator protein 1* (AP-1) handelt es sich um einen weiteren wichtigen Transkriptionsfaktor im Synovialgewebe ⁸². Das als Homo- oder Heterodimer vorliegende Protein setzt sich aus Protoonkogenen wie Jun und Fos zusammen, die über eine Leucin-Zipper-Region miteinander in Verbindung stehen ⁸⁹. Insbesondere die Untereinheiten c-Jun und c-Fos kontrollieren über AP-1-Bindestellen in den jeweiligen Promotorregionen die Expression der meisten MMPs ⁵⁸.

Beim Menschen sind zehn verschiedene TLRs bekannt, wobei im Synovialgewebe bei Patienten mit RA insbesondere die TLRs 2, 3, 4 und 7 exprimiert werden ^{90 91 92}. Diese erkennen verschiedene *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) und *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), wie bakterielle, virale oder auch körpereigene Bestandteile und führen so unter anderem zur Aktivierung verschiedener Signalwege (Seibl et al. 2003) ⁵⁸. TLR2 wird vor allem durch Lipopolysaccharid (LPS) und Bestandteile grampositiver Bakterien wie Peptidoglykane aktiviert ⁹³, was zur Bildung verschiedener Chemokine führt ⁵⁸. TLR3 erkennt insbesondere virale Doppelstrang-RNA oder deren synthetisches Analogon Poly (I:C) ⁹⁴. TLR 4 erkennt unter anderem LPS oder Hitzeschock-

Proteine, TLR 7 wird durch Bindung viraler Einzelstrang-RNA aktiviert und CG-reiche DNA-Abschnitte (CpG) binden an TLR 9⁹⁴. Nach Aktivierung der genannten TLRs auf SF kommt es über eine gesteigerte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und MMPs sowie einer vermehrten Expression des RANKL zu einer Verstärkung der Knochendestruktion^{96 92 95 97}.

1.3 Das BAFF/APRIL-System

1.3.1 Liganden

Die TNF-Familie besteht aus 19 derzeit bekannten Typ II-Transmembranproteinen, die als gemeinsames Merkmal über eine sogenannte „*TNF homology domain*“ (THD) verfügen. Dabei handelt es sich um die für die Rezeptorbindung verantwortliche Basensequenz, die zwischen den verschiedenen Vertretern in der TNF-Familie zu 20-30 % übereinstimmt⁹⁸. Die Gruppe umfasst neben schon lange bekannten Vertretern wie TNF- α oder Lymphotoxin- α auch die Liganden BAFF⁹⁹ und *a proliferation-inducing ligand* (APRIL).

1.3.1.1 BAFF

Bei BAFF handelt es sich um ein 285 Aminosäuren umfassendes Protein, das auch unter den Bezeichnungen *B-lymphocyte stimulator* (BLyS), *TNF- and ApoL-related leukocyte-expressed ligand 1* (TALL-1), CD256 und TNFSF13B bekannt ist^{100 101}. Das auf Chromosom 13 lokalisierte BAFF-Gen⁹⁹ enthält sechs Exons, wobei Exon 1 die Transmembrankomponente, Exon 2 die für die Furin-Prozessierung nötige Sequenz und die restlichen Exons die THD kodieren¹⁰². Neben der membrangebundenen Form liegt BAFF auch als löslicher, trimerer Ligand vor. Dieser entsteht durch proteolytische Prozessierung an der Furin-Konsensus-Sequenz zwischen THD und Transmembrankomponente¹⁰². Bei einem physiologischen pH-Wert können sich 20 BAFF-Trimere zu einer 60 Monomere umfassenden, virusähnlichen Struktur zusammensetzen, die biologisch etwas aktiver ist^{103 104}. Die dafür nötigen Interaktionen zwischen den Trimeren werden durch Abschnitte vermittelt, die nur bei BAFF-Molekülen vorkommen und aufgrund ihrer Form als Flap-Regionen bezeichnet werden¹⁰³.

1.3.1.2 APRIL

APRIL ist ein 250 Aminosäuren langes Protein, dessen THD-Sequenz eine etwa 20 %ige Übereinstimmung mit der von TNF- α ¹⁰⁵ und eine mit etwa 33 % besonders hohe Übereinstimmung mit der von BAFF aufweist⁹⁹. Wie die anderen Liganden aus der TNF-Familie wird APRIL zunächst als Typ II-Transmembranprotein synthetisiert und verfügt

somit über eine zytoplasmatische, eine transmembrane und eine extrazelluläre Domäne¹⁰⁵. Im Gegensatz zu BAFF liegt APRIL jedoch nicht membrangebunden vor, sondern wird nach der Synthese bereits im Golgi-Apparat durch Furin zur biologisch aktiven Form prozessiert¹⁰⁶. Kristallstrukturanalysen bei verschiedenen pH-Werten konnten zeigen, dass APRIL ebenfalls als kompaktes Trimer auftritt und auch sonst strukturelle Ähnlichkeiten mit BAFF besitzt. Es kommt jedoch nicht zur Ausbildung von Oligomeren wie bei BAFF¹⁰⁷.

Das April-Gen ist auf Chromosom 17 neben dem Gen für *TNF-like weak inducer of apoptosis* (TWEAK) lokalisiert, einem weiteren Liganden der TNF-Familie¹⁰⁸. Durch sogenanntes intergenetisches Splicing entsteht das Hybrid-Transkript für TWE-PRIL, das sich aus den zytoplasmatischen und transmembranen Komponenten von TWEAK sowie der extrazellulären Komponente von APRIL zusammensetzt und somit die membrangebundene Form von APRIL darstellt¹⁰⁸.

Außerdem wurden auch biologisch aktive BAFF/APRIL-Heterotrimere beschrieben, die insbesondere bei Patienten mit Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis vermehrt auftreten sollen¹⁰⁹.

1.3.1.3 Vorkommen von BAFF und APRIL

Eine Hauptquelle der beiden Liganden BAFF und APRIL sind myeloische Zellen wie Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen¹¹⁰, wobei die Expression in Anwesenheit von Typ I-Interferonen, IFN- γ , IL-10 und G-CSF sowie durch Aktivierung der TLRs 4 und 9 erhöht werden kann¹¹¹. In sekundär lymphatischen Organen scheinen insbesondere fibroblastische Retikulumzellen eine wichtige Quelle der BAFF-Produktion darzustellen¹¹². Außerdem werden BAFF und APRIL unter anderem durch aktivierte B-Zellen¹¹³, Epithelzellen der Luftwege¹¹⁴, Epithelzellen der Speicheldrüsen von Patienten mit Sjögren-Syndrom¹¹⁵ und Astrozyten bei Patienten mit multipler Sklerose und Lymphomen des zentralen Nervensystems gebildet¹¹⁶. Auch SF bei Patienten mit RA produzieren vermehrt BAFF⁶⁹. Stimulationen mit IFN- γ und Poly(I:C) scheinen einen fördernden, solche mit TNF- α , LPS oder CpG einen eher hemmenden Effekt auf die Syntheseleistung zu haben^{117 118}.

1.3.2 Rezeptoren

Beim Menschen zählen 29 Rezeptoren zur TNF-Rezeptor-Familie, von denen die meisten Typ I-Transmembranproteine sind. Bei den drei für das BAFF/APRIL-System relevanten Rezeptoren *B-cell activating factor receptor* (BAFF-R), *Transmembrane Activator and*

Calcium signal modulating cyclophilin ligand Interactor (TACI) und *B-cell maturation antigen* (BCMA) handelt es sich jedoch um Typ III-Transmembranproteine⁹⁸. Das gemeinsame Merkmal der TNF-Rezeptoren sind für die THD-Bindung zuständige Cysteinreiche Domänen (CRDs), die sich typischerweise jeweils aus sechs Cystein-Resten zusammensetzen⁹⁸. Bei BAFF-R, TACI und BCMA kommt einer strukturell konservierten β -Schleife entscheidende Bedeutung in Bezug auf die Affinität zu den einzelnen Liganden zu. Diese unterscheidet sich zwischen den Rezeptoren durch ihre Seitenketten, die jeweils positive oder negative Einflüsse auf die Bindung zu den Liganden besitzen¹⁰².

1.3.2.1 BAFF-Rezeptor

Das Gen für den BAFF-R ist auf Chromosom 22 lokalisiert und kodiert ein Protein, das aus 184 Aminosäuren besteht. Der Rezeptor hat mit nur vier Cystein-Resten die kleinste CRD unter den Mitgliedern der TNF-Familie und bindet spezifisch nur BAFF, nicht aber APRIL¹¹⁹¹²⁰. Es konnte gezeigt werden, dass BAFF-R in praktisch allen Reifungsstadien der B-Zellen vorkommt, außer in Plasmazellen des Knochenmarks¹²¹. Außerdem konnte der Rezeptor auf CD4⁺-T-Zellen, insbesondere auf regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden¹²².

1.3.2.2 TACI

TACI wurde ursprünglich durch seine Affinität zu *calcium-modulator and cyclophilin ligand* (CAML) isoliert und ist wie BAFF-R ein Transmembranprotein, das sich an der Zelloberfläche befindet¹²³. Das Protein enthält zwei CRD-Regionen, die zu etwa 50 % identisch und sich somit ähnlicher sind als die CRDs aller anderen TNF-Liganden¹²³. Die Besetzung der Seitenketten in der bereits oben erwähnten β -Schleife vermittelt bei TACI eine hochaffine Bindung sowohl zu BAFF, als auch zu APRIL¹²⁴¹²⁵. In einer Splice-Variante von TACI ist die erste CRD, die durch Exon 2 kodiert wird, durch ein Tryptophan ersetzt. Es konnte gezeigt werden, dass diese kürzere Variante genauso gut an BAFF und APRIL bindet wie die lange und somit vor allem die zweite CRD für die Liganden-Bindung entscheidend ist¹²⁵. Die Liganden BAFF und APRIL scheinen allerdings entweder membrangebunden oder als Oligomere vorliegen zu müssen, um die durch TACI vermittelten Signalwege aktivieren zu können¹²⁶. Außerdem konnte eine selektive TACI-Aktivierung durch Syndekane nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um Heparansulfat-Proteoglykane an der Zelloberfläche verschiedener Zellen, die an biologischen Vorgängen wie Adhäsion, Motilität oder Proliferation beteiligt sind¹²⁷.

TACI wird in erster Linie auf aktivierten B-Zellen exprimiert. So konnte der Rezeptor auf CD27⁺-B-Gedächtniszellen und Plasmazellen in Tonsillen und Knochenmark sowie auf einer

kleinen Population peripherer CD27⁻-B-Zellen nachgewiesen werden¹²¹. Dabei konnte die Expression von TACI durch Stimulation mit CpG induziert werden¹²¹.

1.3.2.3 BCMA

Der dritte Rezeptor für BAFF und APRIL ist BCMA, ein 184 Aminosäuren umfassendes Peptid, das im Gegensatz zu BAFF-R und TACI nicht an der Zellmembran, sondern intrazellulär am Golgi-Apparat lokalisiert ist^{128 129 130}. Dabei weist BCMA zu APRIL eine vielfach höhere Affinität als zu BAFF auf¹³¹. Der Rezeptor konnte in Plasmazellen aus Tonsillen, Milz und Knochenmark sowie auf B-Gedächtniszellen in den Tonsillen nachgewiesen werden. Außerdem konnte durch Stimulation mit CpG/IL-2+IL-15 die Expression von BCMA induziert werden¹²¹.

1.3.2.4 Weitere Rezeptoren

Es konnte gezeigt werden, dass APRIL neben TACI und BCMA auch an auf verschiedenen Zellen verbreiteten Heparansulfat-Proteoglykane bindet und auf diesem Weg beispielsweise das Wachstum mancher Tumoren fördert^{132 133}. Die für diese Bindung nötige Aminosäuresequenz (Gln-Lys-Gln-Lys-Lys-Gln) befindet sich außerhalb der THD-Domäne von APRIL, nahe des N-Terminus¹³², so dass APRIL gleichzeitig sowohl an einen klassischen Rezeptor als auch an Proteoglykane binden kann¹³³. Es konnte gezeigt werden, dass an den Heparansulfat-Proteoglykanen eine Aggregation von APRIL zu Oligomeren möglich ist, was insbesondere für die Bindung an TACI große Bedeutung hat¹³⁴.

BAFF bindet außerdem an den auf Astrozyten vorkommenden Nogo-66-Rezeptor, wodurch das axonale Wachstum von Neuronen gehemmt wird¹³⁵.

1.3.3 Funktionen des BAFF/APRIL-Systems

1.3.3.1 Homöostase der B-Zellen

Eine entscheidende Rolle kommt BAFF bei der Reifung und beim Überleben von B-Lymphozyten zu. Die dafür nötigen BAFF-Spiegel werden dabei in erster Linie von strahlenresistenten Stromazellen produziert¹³⁶. Nach ihrer Bildung im Knochenmark wandern unreife B-Lymphozyten während ihrer Differenzierung zu reifen B-Zellen in die Milz und durchlaufen dort die sogenannten transitionellen Stadien T1 und T2¹³⁷. Durch eine Hemmung von BAFF oder BAFF-R konnte eine Reduktion der Zahl reifer B-Zellen um etwa 90 % nachgewiesen werden^{138 119 139}. Der starke Verlust von B-Zellen konnte dabei erst bei T2- und reifen B-Zellen nachgewiesen werden, was zeigt, dass das Überleben der Zellen im T1-Stadium noch nicht abhängig von BAFF ist¹³⁹. Durch Versuche mit erzwungener Expression

anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 oder Bcl-xL in Mäusen mit aufgehobener BAFF-Wirkung konnte die normale B-Zell-Funktion nicht vollständig wiederhergestellt werden. Deshalb geht man davon aus, dass BAFF neben der das Überleben fördernden Wirkung auch Bedeutung für die Differenzierung der B-Zellen hat ^{140 141 142}. Außerdem ist BAFF auch wichtig für die Aufrechterhaltung einer korrekt ablaufenden Keimzentrumsreaktion, für die Ausbildung des beteiligten Netzes aus follikulären DCs ¹⁴³ sowie für das Überleben reifer follikulärer und Marginalzonen-B-Zellen ¹⁴⁴. IgG-produzierende B-Gedächtniszellen und langlebige Plasmazellen sind von BAFF als Überlebenssignal hingegen weitgehend unabhängig ^{145 146}.

TACI hingegen scheint auf das B-Zell-Überleben eher negativ regulierend zu wirken. So ist die Zahl reifer B-Zellen bei TACI-defizienten Mäusen deutlich erhöht ¹⁴⁷, eine Inkubation mit TACI-agonistischen Antikörpern führt zu einer Hemmung der B-Zell-Proliferation ¹⁴⁸. Im Rahmen der Differenzierung spielt BCMA keine Rolle ¹³⁸, jedoch ist der Rezeptor bei der Förderung des Langzeitüberlebens von Plasmazellen im Knochenmark entscheidend ¹⁴⁹.

1.3.3.2 Antikörper-Klassenwechsel

Außerdem induzieren BAFF und APRIL in B-Lymphozyten in Anwesenheit verschiedener Zytokine einen CD40-unabhängigen Immunglobulin-Klassenwechsel von IgM und IgD zu IgA, IgG und IgE ¹⁵⁰. Dabei sind die beiden Rezeptoren BAFF-R und TACI beteiligt, wobei bei Mäusen über BAFF-R der Klassenwechsel zu IgG1 und IgE und über TACI der Klassenwechsel zu IgG1, IgE und IgA vermittelt wird ¹⁵¹.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass bis zu 10 % der Patienten mit variablem Immundefektsyndrom homo- oder heterozygote Mutationen im TACI-Gen aufweisen ^{152 153}. Diese Patienten zeigen in Einklang mit den bereits erwähnten Funktionen von TACI bei B-Zellen niedrige Antikörperspiegel im Serum oder einen selektiven IgA-Mangel, während die Anzahl der B-Zellen normal oder sogar erhöht ist ^{152 153}.

1.3.3.3 T-Zell-Physiologie

Neben diesen vor allem B-Zellen betreffenden Funktionen werden durch Kostimulation über den BAFF-R auch reife T-Lymphozyten beeinflusst. Bei den so aktivierten T-Zellen wird die Produktion von Zytokinen angeregt, das Überleben durch verstärkte Expression von Bcl-2 gefördert und die Proliferation gesteigert ^{154 155}.

Im Besonderen könnte CD4⁺ T-Helfer-Zellen eine wichtige Rolle bei der BAFF-vermittelten Expansion von B-Zellen zukommen ¹⁵⁶. Anders als bei Mäusen wird bei Menschen vor allem

das Überleben von CD8⁺ T-Zellen gefördert, wohingegen die Apoptose von CD4⁺ -T-Zellen unbeeinflusst bleibt ¹⁵⁶. Die Zahl follikulärer T-Helfer-Zellen und somit auch der B-Zellen in den Keimzentren ist eher vermindert ¹⁵⁷.

Besondere Bedeutung kommt BAFF auch bei der Förderung der Differenzierung zu Th17-Zellen zu. Wahrscheinlich geschieht dies unter Beteiligung des IL-6-Signalwegs ¹⁵⁸, der entscheidend für die Entwicklung zu Th17-Zellen ist ^{159 160}.

1.3.4 Rolle des BAFF/APRIL-Systems bei verschiedenen Erkrankungen

Das BAFF/APRIL-System scheint bei einer Vielzahl von Erkrankungen beeinflusst zu werden oder sogar pathophysiologisch eine Rolle zu spielen. So wurden bei Infektionen durch virale Erreger wie das Humane Immundefizienzvirus (HIV) ¹⁶¹, Hepatitis C-Virus (HCV) ¹⁶², *respiratory syncytial virus* (RSV) ¹⁶³ sowie einige andere Viren erhöhte Serumspiegel von BAFF gemessen ¹⁶⁴. Auch bei bakteriellen Infektionen scheint BAFF über die Förderung der Antikörperbildung wichtig für die Immunabwehr zu sein ¹⁶⁵. Bei Patienten mit akuter Pankreatitis konnte gezeigt werden, dass der BAFF-Spiegel prognostische Bedeutung für den Schweregrad der Erkrankung hat und vergleichbar mit dem CRP als Akute-Phase-Protein angesehen werden kann ¹⁶⁶.

Eine weitere Krankheitsgruppe, bei der das BAFF-System eine Rolle spielt sind maligne hämatologische Erkrankungen. Bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen werden durch das BAFF-System proapoptotische Faktoren herunter- und antiapoptotische Faktoren hochreguliert ^{167 168}. Dabei korrelieren hohe BAFF-Spiegel mit einer höheren Krankheitsaktivität, einem geringen Ansprechen auf die Therapie und somit einem geringeren medianen Überleben ¹⁶⁸. Auch bei anderen malignen Erkrankungen wie der akuten lymphatischen Leukämie ¹⁶⁹, der chronischen lymphatischen Leukämie ¹⁷⁰ oder bei klassischen Hodgkin-Lymphomen ¹⁷¹ ist wahrscheinlich die BAFF-BAFF-R-Achse beteiligt.

Aufgrund der vielfältigen Einflüsse auf die verschiedenen Mechanismen des Immunsystems, wurde schon früh eine entscheidende Rolle des BAFF-Systems in der Pathophysiologie von Autoimmunerkrankungen diskutiert. Bei transgenen Mäusen mit einer Überexpression von BAFF fielen neben einer erhöhten Zahl an B-Zellen auch eine Hypergammaglobulinämie auf ^{172 173}. Außerdem konnte man im Serum der Tiere vermehrt RF, zirkulierende Immunkomplexe sowie anti-ssDNA- und anti-dsDNA-Antikörper nachweisen ^{172 173}. Mit zunehmendem Alter entwickelten die Mäuse ein dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) ähnliches Krankheitsbild, wobei sich zunehmend auch Immunkomplexablagerungen in

den Glomeruli der Nieren fanden ¹⁷³. Sekundär kam es in noch höherem Alter zu einer dem Sjögren-Syndrom ähnlichen Sialadenitis ¹⁷⁴. Pathophysiologisch verbessert eine hohe BAFF-Konzentration das Überleben niedrigaffiner, autoreaktiver B-Zellen insbesondere in der Marginalzone, während die Elimination hochaffiner autoreaktiver B-Zellen weitestgehend unverändert bleibt ¹⁷⁵. Die bei BAFF-transgenen Mäusen aufgefallenen SLE-ähnlichen Manifestationen scheinen sich dabei unabhängig von T-Lymphozyten zu entwickeln ¹⁷⁶. Bedeutend scheinen hingegen TLR-abhängige Signalwege zu sein, wobei BAFF die TLR7- und TLR9-Expression auf B-Lymphozyten fördert ¹⁷⁶. Eine Aktivierung der TLR, beispielsweise durch CpG an TLR9 oder Einzelstrang-DNA an TLR7, führt unter anderem zu einer vermehrten Expression von TACI und einer gesteigerten Antikörperproduktion mit den oben genannten Folgen ^{177 178 176}. Bemerkenswert hierbei ist jedoch, dass im Tierversuch auch ein Mangel an TACI zu einem SLE-ähnlichen Krankheitsbild führt ¹⁴⁸.

Auch beim Menschen lassen sich bei einem großen Teil der Patienten mit SLE erhöhte BAFF-Spiegel im Serum nachweisen ¹⁷⁹. Dabei korrelieren die BAFF-Spiegel mit erhöhten anti-dsDNA-Antikörper-Titern und einer Erhöhung der akute-Phase-Proteine ^{179 180 181}. Bei Patienten mit Sjögren-Syndrom konnten ebenfalls erhöhte BAFF-Spiegel nachgewiesen werden ¹⁷⁴, die auch hier mit den für diese Erkrankung typischen anti-SSA- und anti-SSB-Antikörpern korrelieren ¹⁸². In den Speicheldrüsen betroffener Patienten lässt sich außerdem eine erhöhte BAFF-Expression durch infiltrierende T- und B-Lymphozyten sowie durch duktales Epithelzellen nachweisen ^{183 184}. Beispiele für weitere Autoimmunerkrankungen, bei denen erhöhte BAFF-Konzentrationen nachgewiesen werden konnten sind unter anderem Morbus Wegener, Sklerodermie oder die HCV-assoziierte Kryoglobulinämie sowie im Liquor bei Multipler Sklerose ^{116 185 186 187}.

Auch bei Patienten mit RA wurden erhöhte BAFF-Konzentrationen im Serum festgestellt ¹⁸⁸ ¹⁸⁹. Die Produktion von BAFF erfolgt dabei insbesondere lokal im Bereich der betroffenen Gelenke ^{190 191}. Außerdem wurden bei Patienten mit RA deutlich erhöhte Konzentrationen von APRIL nachgewiesen, wobei sich kein wesentlicher Unterschied zwischen Serum und Synovialflüssigkeit ergab ¹⁹². Erwähnenswert ist hierbei auch, dass die BAFF-Spiegel bei seronegativer RA höher zu sein scheinen als bei seropositiver RA und mit der Krankheitsaktivität korrelieren ¹⁹³. Der APRIL-Spiegel im Serum scheint hingegen insbesondere bei der seropositiven RA erhöht zu sein und zeigt keine Korrelation mit der Krankheitsaktivität ¹⁹⁴. BAFF wird in den betroffenen Gelenken unter anderem durch Makrophagen, T- und B-Lymphozyten sowie SF produziert ^{195 191}. APRIL wird durch

dendritische Zellen, Neutrophile und lokale Makrophagen exprimiert sowie zu einem geringen Teil durch SF^{195 192 196}. Bei einem Teil der RA-Patienten können im Synovialgewebe ektote Lymphfollikel mit Keimzentren nachgewiesen werden^{197 198}, deren Bildung abhängig von BAFF und APRIL ist¹⁹⁵. Plasmazellen reichern sich insbesondere in Regionen des Synovialgewebes an, die eine besonders hohe Konzentration von APRIL aufweisen¹⁹⁶. Des Weiteren erhöht APRIL bei RA-Patienten die Proliferation synovialer Fibroblasten und verstärkt auf diesen die Expression von RANKL¹⁹². Pathogenetisch bedeutsam ist außerdem die Bildung von Autoantikörpern wie RF und anti-CCP-AK¹⁹⁹. SF induzieren in Kokultur mit B-Lymphozyten bei diesen in Abhängigkeit von BAFF und unabhängig von Keimzentren einen Antikörperklassenwechsel von IgM zu anderen Ig-Typen¹¹⁸. Der dabei ablaufende Mechanismus kann durch Aktivierung des TLR3, beispielsweise durch Stimulation mit Poly(I:C), potenziert werden¹¹⁸.

1.3.5 Entwicklung zielgerichteter Therapeutika im BAFF/APRIL-System

Das einzige, bislang zugelassene Medikament, das im BAFF/APRIL-System angreift, ist Belimumab. Es handelt sich um einen rekombinanten, monoklonalen IgG1-Antikörper, der sich spezifisch gegen lösliches BAFF richtet²⁰⁰. Die Zulassung beschränkt sich momentan auf Patienten mit SLE, bei denen Belimumab in zwei Phase III-Studien seine Wirksamkeit und gute Verträglichkeit zeigte^{201 202}. Auch bei RA-Patienten mit nur eingeschränkter Wirksamkeit anderer Therapien zeigte Belimumab in einer Phase II-Studie eine Besserung der Krankheitsaktivität²⁰³.

Atacicept ist ein weiterer BAFF-Antagonist, dessen Wirksamkeit gegen SLE derzeit in Studien untersucht wird. Dabei handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der sich aus dem extrazellulären Teil von TACI und dem Fc-Teil von humanem IgG1 zusammensetzt und somit gegen BAFF und APRIL gerichtet ist²⁰⁰. Bei RA-Patienten zeigte sich eine deutliche Reduktion der Antikörperspiegel, einschließlich RF und anti-CCP-Antikörpern²⁰⁴. Eine Phase II/III-Studie musste jedoch aufgrund vermehrt aufgetretenen Infektionen bei deutlich abgefallenem IgG-Spiegel vorzeitig abgebrochen werden²⁰⁵.

Zwei weitere Medikamente, deren klinische Wirksamkeit und Verträglichkeit derzeit getestet werden sind Blisibimod und Tabalumab, die beide spezifisch gegen lösliches und im Gegensatz zu Belimumab auch gegen membrangebundenes BAFF gerichtet sind²⁰⁶.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis zeichnet sich durch ein komplexes Zusammenspiel der verschiedensten Zellarten, Zytokine und Einflüsse von außen aus. Eine zentrale Rolle kommt dabei den synovialen Fibroblasten zu, die bedeutend für die Regulation anderer Zellen, die Aufrechterhaltung des proinflammatorischen Milieus und die ablaufende Gelenkdestruktion sind. Bei ausreichendem Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge stellen sie deshalb jedoch auch einen möglicherweise entscheidenden Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Medikamente dar. Unzureichend untersucht ist bislang das Zusammenspiel zwischen den Liganden des BAFF/APRIL-Systems und SF. In der vorliegenden Arbeit soll daher zunächst untersucht werden, ob SF die dafür nötigen Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA exprimieren und ob sich dabei Unterschiede zwischen RA- und OA-Patienten finden. In einem weiteren Schritt soll versucht werden, unter Verwendung verschiedener Zytokine, TLR-Agonisten und Zell-Aktivatoren das Expressionsprofil der Rezeptoren zu beeinflussen. Schließlich soll aufgrund der bekannten BAFF-Funktionen bei anderen Zellarten untersucht werden, wie sich eine entsprechende Stimulation auf die Apoptoserate bei SF auswirkt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Geräte

| Geräte-Bezeichnung | Hersteller |
|--|---------------------------------|
| Brutschrank | Binder |
| ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software | Bio-Rad |
| Durchflusszytometer Epics XL-MCL | Beckman Coulter |
| Gefrierschrank premium no-frost | Liebherr |
| Handdispenser Multipette plus | Eppendorf |
| Kühlschrank 4°C | Liebherr |
| Mikroskop Axiovert 200M | Carl Zeiss |
| Mikroskop Leica DM IRB | Leica Microsystems Wetzlar GmbH |
| Mini Trans-Blot® Cell, Western Blot | Bio-Rad |
| Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems | Bio-Rad |
| Pipetten 0,1-2,5 µl 0,5-10 µl 10-100 µl 20-200 µl 200-1000 µl | Eppendorf |
| Pipettierhelfer accu-jet | Brand |
| PowerPac™ Basic Power Supply | Bio-Rad |
| Sterilbank HB2448 S GS | Heraeus |
| Tischzentrifuge Megafuge 1,0 R | Heraeus |
| Vortex-Mixer Genie | neoLab |
| Wasserbad SW-20C | Julabo |
| Zählkammer, Neubauer improved | Neubauer |
| Zentrifuge Biofuge fresco | Heraeus |
| Zentrifuge, Mikro | Sprout |

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Das verwendete Verbrauchsmaterial wird in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Verbrauchsmaterial

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|----------------------------|
| Aspirationspipette 2 ml, Falcon | BD Biosciences |
| Culture-Slides, 8 Chamber Polysterene Vessel | BD Biosciences |
| Eppendorf-Tubes 1,5 ml | Eppendorf |
| FACS-Tubes 5ml | Sarstedt AG & Co |
| Gel-Blotting-Bögen, GB005, Whatman | VWR |
| Immun-Blot PVDF-Membran | Bio-Rad |
| Pipettenspitzen 10 µl 20 µl 200 µl 1000 µl | Sarstedt |
| Polypropylenröhrchen 50 ml, konisch, Falcon | BD Biosciences |
| Polystyrenpipetten (Costar Stripette) 5 ml 10 ml 25 ml 50 ml | Corning Life Sciences |
| Steriler Filter, TPP „rapid“ 500 | Techno Plastic Products AG |
| Zellkulturflaschen, 75 cm ² canted neck | Corning Life Sciences |

2.1.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien

| Bezeichnung | Produkt-Nummer | Hersteller |
|--|----------------|----------------------|
| Accutase, 100 ml | L11-007 | PAA Laboratories |
| Acrylamid 40 % | 161-0140 | Bio-Rad |
| Ammonium-Persulfat (APS) | 161-0700 | Bio-Rad |
| Amphotericin B (AmphoB) | D01AA10 | Bristol-Myers Squibb |
| Bisacrylamid | 161-0142 | Bio-Rad |
| Bromphenolblau | B-5525 | Sigma Aldrich |
| Erythrozyten-Lysepuffer | 79217 | Qiagen |
| FCS | F0804 | Sigma Aldrich |
| Fluorescence Mounting Medium | S3023 | Dako |
| Formaldehyd 37 % | 4979.1 | Carl Roth |
| Glyzerin | G5516-12 | Sigma Aldrich |
| Glyzin | 3908.3 | Carl Roth |
| Hepes | H0887 | Sigma Aldrich |
| Isopropanol | 1096342511 | Merck Millipore |
| L-Glutamin 20mM, 100 ml | G7513 | Sigma-Aldrich |
| Magermilchpulver frema reform | 0201 | Granovita GmbH |
| NaCl | 27810.295 | VWR |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | 20765.03 | Serva |
| PBS | D8537 | Sigma Aldrich |
| Penicillin-Streptomycin in 0,9 % NaCl, 100 ml | P0781 | Sigma-Aldrich |
| Permeabilisationspuffer | 554723 | BD Biosciences |
| RPMI-1640 Medium | R7509 | Sigma-Aldrich |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED) | 15524-010 | Invitrogen |
| Tris-Aminomethan (Tris-NH ₃) | 1083822500 | Merck Millipore |
| Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl) | 1185-53-1 | Sigma Aldrich |
| Triton X100, 500ml | T8787 | Sigma Aldrich |
| Trypanblau, 100 ml | T8154 | Sigma Aldrich |
| Trypsin-EDTA (10x), 100 ml | T4174 | Sigma-Aldrich |
| TWEEN 20 | 9005-64-5 | Sigma Aldrich |

2.1.4 Stimulanzen

Die verwendeten Stimulanzen werden in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Stimulanzen

| Bezeichnung | Katalog-Nummer | Hersteller |
|------------------------------|----------------|-------------------|
| BAFF/BLyS Standard | DBLYS0B | R&D Systems |
| CpG, ODN 2006 | tIrl-2006 | Invivogen |
| Interferon- γ | 300-02 | PeptoTech |
| Interleukin-1 β | AF-200-01B | PeptoTech |
| PMA (Phorbolmyristataacetat) | P1585 | Sigma-Aldrich |
| Poly (I:C) | 4287 | Tocris bioscience |
| Rekombinantes BAFF | 2149-BF-010 | R&D Systems |
| TNF- α | 300-01A | PeptoTech |

2.1.5 Antikörper zum Nachweis von BAFF-R, BCMA und TACI in der FACS-Analyse

Die für die FACS-Analyse verwendeten Antikörper werden in Tabelle 7 aufgeführt

Tabelle 7: Antikörper in der FACS-Analyse

| Bezeichnung | Katalog-Nummer | Hersteller |
|--|----------------|----------------|
| Goat anti-mouse IgG PE | P9287 | Sigma-Aldrich |
| Goat anti-rat IgG PE | 550767 | BD Biosciences |
| Mouse IgG1 PE | IC002P | R&D Systems |
| Mouse-monoclonal anti-BAFF-receptor (Biotin) | ab16582 | Abcam |
| Mouse-monoclonal anti-TACI-Phycoerythrin | FAB174 | R&D-Systems |
| Rat IgG PE | 557078 | BD Biosciences |
| Rat-monoclonal anti-BCMA antibody [Vicky-1] | ab17323 | Abcam |
| Streptavidin/RPE | R0438 | Dako |

2.1.6 Reagenzien zur Untersuchung der Apoptose

Die in der Vorbereitung der Versuche zur Bestimmung der Apoptoserate verwendeten Antikörper sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Antikörper für die Apoptose-Versuche

| Bezeichnung | Katalog-Nummer | Hersteller |
|--|----------------|----------------|
| Anti-Human BAFF Antibody | AF124 | R&D Systems |
| Anti-Human BAFF-R Antibody | AF1162 | R&D Systems |
| anti-Human BCMA Antibody | AF193 | R&D Systems |
| Anti-Human TACI Antibody | AF174 | R&D Systems |
| FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I | 556547 | BD Biosciences |
| Normal Goat IgG Control | AB-108-C | R&D Systems |

2.1.7 Antikörper und Färbelösungen für Gelelektrophorese und Western Blot

Die für die einzelnen Färbeschritte in der Gelelektrophorese und im Western Blot verwendeten Substanzen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Antikörper und zur Färbung nötige Substanzen für Gelelektrophorese und Western Blot

| Bezeichnung | Katalognummer | Hersteller |
|--|---------------|-------------------------|
| Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution | 161-0436 | Bio-Rad |
| Donkey anti-rabbit IgG-HRPO | 711-035-152 | Dianova |
| Human BAFF biotinylated antibody | BAF124 | R&D Systems |
| Protein-Marker V | 27-2210 | Peqlab |
| Rabbit polyclonal to BAFF | Ab65360 | Abcam |
| Streptavidin Poly-HRP | 21140 | ThermoFisher Scientific |

2.1.8 Antikörper für die Immunhistochemie

Die für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper werden in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Antikörper für die Immunhistochemie

| Bezeichnung | Katalog-Nummer | Hersteller |
|------------------------------------|-----------------------|-------------------|
| Alexa Fluor 546, Goat anti-Rabbit | A11010 | Invitrogen |
| DAPI | D1306 | Invitrogen |
| Rabbit polyclonal to BAFF-Receptor | ab5965 | Abcam |
| Rabbit polyclonal to BCMA | ab5972 | Abcam |
| Rabbit polyclonal to TACI | ab79023 | Abcam |

2.1.9 Zusammensetzung der für die FACS-Analyse und die Immunhistochemie verwendeten Puffer und Medien

Die Zusammensetzung der Puffer und Medien ist in Tabelle 11 aufgeführt. Das Zellkulturmedium wurde nach Zusammengeben aller Bestandteile steril filtriert.

Tabelle 11: Verwendete Puffer und Medien für die FACS-Analyse und Immunhistochemie

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|--------------------|--|
| Block-Lösung (IHC) | PBS 10 % FCS 10 % BSA 10 % Goat-Serum 0,1 % Triton X 100 |
| FACS-Puffer | PBS 0,5 % FCS |
| Färbe-Puffer (IHC) | PBS 3 % BSA 0,3 % Triton X 100 |
| Wasch-Puffer (IHC) | PBS 0,3 % Triton X 100 |
| Zellkulturmedium | 500 ml SIGMA RPMI ohne Phenolrot 50 ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml Hepes 0,5 ml Amphotericin B |

2.1.10 Lösungen für Gelelektrophorese und Western Blot

Die zur Durchführung der Gelelektrophorese und des Western Blot nötigen Lösungen sind in Tabelle 12 aufgeführt. Für die native Gelelektrophorese wurde in den Lösungen SDS und β -Mercaptoethanol durch entsprechende Mengen ddH₂O ersetzt.

Tabelle 12: verwendete Lösungen für Gelelektrophorese und Western Blot

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|---------------------------------|--|
| 15 %iges Laufgel | 30,0 ml Acrylamid 40 % 3,4 ml Bisacrylamid 2 % 10,0 ml Tris-HCl 3M pH 8,7 0,4 ml SDS 20 % 32,0 ml ddH ₂ O |
| 5 %iges Sammelgel | 5,0 ml Acrylamid 40 % 2,6 ml Bisacrylamid 2 % 5,0 ml Tris-HCl 1M pH 6,8 0,2 ml SDS 20 % 24,0 ml ddH ₂ O |
| Antikörperpuffer (Western-Blot) | 7,5 g BSA 0,5 g Natriumazid 0,5 g TWEEN 20 0,5 l TBS |
| Blockierlösung (Western Blot) | 5 g Magermilchpulver 100 ml TBST |
| SDS-Laufpuffer (10x) | 144 g Glyzin 30 g Tris-NH ₃ 50 ml SDS 20 % 1 l ddH ₂ O |
| SDS-Probenpuffer | 5 ml Glycerin 20 % 300 μ l Tris-HCl 1 M pH 6,8 2 ml SDS 20 % 1ml β -Mercaptoethanol 0,025 g Bromphenolblau 10 ml ddH ₂ O |
| TBS | 100 ml TBA, pH 7,6 (10x) 1 l ddH ₂ O |

| | |
|--------------------------|--|
| TBST | 100 ml TBA, pH 7,6 (10x) 1 ml Tween 20 1 l ddH ₂ O |
| Transferpuffer-Grundlage | 140 g Glyzin 30 g Tris- NH ₃ 5 g SDS 20 % 1 l ddH ₂ O |
| Wet-Transfer-Puffer | 200 ml Methanol 80 ml Transferpuffer-Grundlage 1 l ddH ₂ O |

2.2 Methoden

Im folgenden Abschnitt werden das verwendete Zellmaterial und die durchgeführten Untersuchungsmethoden näher beschrieben.

2.2.1 Patienteneigenschaften

Die in den Versuchen verwendeten Zellen stammen aus Synovialgewebe von 32 Patienten mit OA und 30 Patienten mit RA. Das Gewebe wurde dabei nach Aufklärung und Einverständnis im Rahmen von Knie-TEP-Operationen (totale Endoprothese) am Asklepios-Klinikum in Bad Abbach gewonnen. Die Versuche wurden von der lokalen Ethikkommission des Universitätsklinikums Regensburg genehmigt. Bei den OA-Patienten fanden sich etwa doppelt so viele Männer wie Frauen, bei den RA-Patienten verhielt sich dies umgekehrt. Das Alter der Patienten lag bei den OA-Patienten durchschnittlich etwa 4 Jahre höher als bei den untersuchten RA-Patienten. Ein Vergleich des *Body-Mass-Index* (BMI) ergab keinen wesentlichen Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen. In beiden Fällen handelte es sich um leicht adipöse Patienten. In Bezug auf die Entzündungszeichen waren bei den RA-Patienten das CRP ($p=0,012$) sowie die BSG-Werte nach einer ($p=0,000$) und zwei Stunden ($p=0,001$) signifikant höher als bei den OA-Patienten. Die Leukozytenzahl unterschied sich zwischen den beiden Gruppen kaum (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Patienteneigenschaften, * = p<0,05, ** = p<0,01

| | Gesamtzahl | Anzahl Frauen | Anzahl Männer | Alter [y] | BMI [kg/m ²] | CRP [mg/dl]* | BSG 1 h**/ 2 h** | Leukozyten [/nl] |
|----|------------|---------------|---------------|-----------|--------------------------|--------------|------------------|------------------|
| OA | 32 | 12 | 20 | 66,78 | 30,63 | 2,70 | 8,2 / 19,9 | 7,52 |
| RA | 30 | 21 | 9 | 62,90 | 30,46 | 7,05 | 26,6 / 47,2 | 8,53 |

2.2.2 Gewinnung von Fibroblasten aus Synovialgewebe

Unmittelbar nach der Entnahme wurde das Synovialgewebe in *phosphate buffered saline* (PBS) eingelegt und auf Eis gekühlt innerhalb einer Stunde zur Weiterverarbeitung ins Labor transportiert. Unter der Sterilbank wurde das Gewebe zunächst in einer Petrischale mit einem Skalpell zerkleinert und nach Zugabe von 25 ml Liberase der Konzentration 0,05 mg/ml (0,26 Wünsch units/ml) für eine Stunde bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von 20 ml PBS gestoppt. Um die nun aus dem Zellverband herausgelösten Zellen zu gewinnen, wurde die Zellsuspension durch ein Sieb gegeben. Die nicht passierbaren Gewebestandteile wurden ein weiteres Mal mit 25 ml der Liberase-Lösung versetzt und der beschriebene Vorgang wiederholt.

Die gelösten Zellen wurden zentrifugiert (535 g, 8 min, 4 °C), der Überstand dekantiert und das Pellet mit 5ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5-10 Minuten erfolgte die Deaktivierung des Lysepuffers durch Zugabe von ca. 15 ml PBS. Die Zellen wurden ein weiteres Mal unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und in Zellkulturmedium aufgenommen. Nach einer weiteren Passage durch ein 70 µm-Zellsieb, um eventuell noch vorhandene Verklumpungen und Fettzellen zurück zu halten, wurden die Zellen entsprechend ihrer Anzahl auf mehrere Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.3 Zellkultur

Die Fibroblasten wurden in 75 cm² großen Zellkulturflaschen bei 37 °C im Brutschrank angezüchtet. Für die Kultivierung kam das im Materialteil (2.1.6) aufgeführte Zellkulturmedium zum Einsatz, das alle 3-4 Tage unter sterilen Bedingungen ausgetauscht wurde. Dabei wurde das adhärente Zellwachstum regelmäßig lichtmikroskopisch kontrolliert. Sobald der gesamte Flaschenboden gleichmäßig bewachsen war, wurde der Inhalt subkultiviert.

Dazu wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und einmal mit 10 ml PBS gespült. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 6 ml Trypsin-EDTA (1x), um die Zellen von der

Flasche abzulösen und die Querverbindungen untereinander zu hydrolysieren. Nach ca. zehn Minuten wurde die ablaufende Reaktion durch Zugabe von 9 ml Medium gestoppt, die Zellsuspension in Falcon-Tubes überführt und anschließend zentrifugiert (535 g, 8 min, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 12 ml Medium resuspendiert und der Inhalt jeder alten 75 cm² Flasche auf jeweils zwei neue Flaschen verteilt. Zuletzt wurde das Medium jeder Flasche auf jeweils ca. 10 ml aufgefüllt und die Flaschen zur weiteren Inkubation wieder in den Brutschrank gestellt.

2.2.4 Untersuchung der Expression von BAFF-R, BCMA und TACI mittels FACS-Analyse

2.2.4.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die FACS-Analyse ist eine Methode, mit der man verschiedene Eigenschaften von Zellen untersuchen kann. Dabei werden die Zellen einzeln nacheinander an einem Laserstrahl vorbeigeführt und es wird das Streulicht gemessen. Während das Vorwärtsstreulicht (FSC) mit der Größe der Zellen korreliert, ist das Seitwärtsstreulicht (SSC) abhängig von Granularität, Membranfaltung und äußerer Form. Des Weiteren ist über die Messung von Fluoreszenzlicht die Sortierung der Zellen nach bestimmten Oberflächenmolekülen möglich. Dazu müssen die zu untersuchenden Zellen zunächst mit einem gegen bestimmte Oberflächenantigene gerichteten Antikörper behandelt werden, der eine fluoreszierende Gruppe trägt. Diese gekoppelten Fluorochrome absorbieren das Laserlicht und emittieren längerwelliges Licht, das nun detektiert werden kann. Die Detektion und Umwandlung in elektrische Signale erfolgt dabei sowohl beim Streulicht als auch beim Fluoreszenzlicht über Photomultiplier. Beispiele für beliebte Fluorochrome, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind Phycoerythrin (PE), Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Propidiumiodid (PI). Nach Exzitation liegt das Maximum des emittierten Lichts in den folgenden Versuchen mit FITC bei einer Wellenlänge von ca. 520 nm, mit PE bei 578 nm, und mit PI bei 617 nm.

2.2.4.2 Stimulation der Proben

Nach Anzucht von ca. vier Zellkulturflaschen jedes Patienten, wurden diese bei ausreichender Konfluenz jeweils 72 Stunden vor Beginn der Färbeschritte mit verschiedenen Stimulanzen versetzt. Dabei wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und im Anschluss die in

Tabelle 14 aufgeführten Stimulanzen in 10 ml Medium angesetzt und zugegeben. Eine Zellkulturflasche pro Patient enthielt als Vergleichswert jeweils nur das Medium.

Tabelle 14: Stimulanzen mit jeweils verwendeter Konzentration

| Stimulation mit | Eingesetzte Konzentration |
|--|----------------------------------|
| BAFF | 1 ng/ml |
| CpG | 1 µg/ml |
| Interferon- γ | 10 ng/ml |
| Interleukin-1 β | 10 ng/ml |
| Interleukin-1 β + Interferon- γ | Je 10 ng/ml |
| PMA | 10 ng/ml |
| Poly I:C | 10 ng/ml |
| TNF- α | 10 ng/ml |

2.2.4.3 Färbung der Proben und Messung im FACS-Gerät

Nach einer Inkubationszeit der Stimulanzen von 72 Stunden wurden die Zellkulturflaschen zur Analyse mit dem FACS-Gerät vorbereitet. Dazu musste zunächst das Kulturmedium abgesaugt und ein Waschschrift mit je 10 ml PBS durchgeführt werden. Dann wurden 6 ml Accutase (1x) zugegeben und 20 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Accutase besitzt proteolytische und kollagenolytische Aktivität, im Vergleich zu Trypsin verläuft die Ablösung der Zellen voneinander und von der Flasche jedoch wesentlich schonender für die Oberflächenantigene. Nach erfolgter Ablösung wurde der Flascheninhalt jeweils mit 10 ml Medium aufgefüllt, in 50 ml-Falcon-Tubes umpipettiert und zentrifugiert (535 g, 8 min 4 °C). Nach Dekantieren des Überstands und Resuspendieren des Pellets in 400 µl PBS, erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, was durchschnittlich 600000-700000 Zellen pro Zellkulturflasche ergab. Bei einigen Proben wurden nun ca. 60000 Zellen für die spätere Untersuchung mit immunhistochemischen Methoden entnommen (siehe Kapitel 2.2.9).

Die restliche Zellsuspension wurde mit 1,6 ml Formaldehyd (3,7 %) versetzt und 5-10 Minuten bei 4 °C inkubiert, um die Zellen zu fixieren. Im folgenden Waschschrift wurden die Falcon-Tubes mit PBS auf ca. 25 ml aufgefüllt, zentrifugiert (1882 g, 10 min, 4 °C), der Überstand dekantiert und schließlich das Zellpellet in 700 µl resuspendiert. Für die weiteren Färbeschritte wurden für jede Stimulation nach dem in Tabelle 15 aufgeführten Schema je sieben Eppendorf-Cups mit ca. 95 µl der jeweiligen Zellsuspension befüllt.

Tabelle 15: Überblick der jeweils primären Antikörper der 7 verwendeten Tubes

| Kontrollen | Antikörper |
|-------------------|------------------------|
| --- | keiner/ungefärbt (1) |
| Streptavidin (2) | Anti-BAFF-Rezeptor (3) |
| Mouse IgG1 PE (4) | Anti-TACI (5) |
| Rat IgG PE (6) | Anti-BCMA (7) |

In Anlehnung an das Protokoll des Herstellers wurden die Cups für BCMA und die entsprechende Isotyp-Kontrolle mit 1 ml Permeabilisationspuffer gewaschen, zentrifugiert (855 g, 10 min, 4 °C) und das Pellet in 95 µl Permeabilisationspuffer resuspendiert. Die permeabilisierten Zellen konnten somit auch intrazellulär durch die Antikörper markiert werden. Schließlich wurden alle sieben Eppendorf-Tubes mit jeweils 5 µl humanem Fc-Block auf insgesamt 100 µl aufgefüllt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten die eigentlichen Färbeschritte nach dem in Tabelle 17 angegebenen Schema, die Ausgangskonzentrationen der Antikörper sind in Tabelle 16 aufgeführt. Die Inkubationszeit der primären Antikörper betrug jeweils 15 Minuten bei 4 °C, gefolgt von einem Waschschrift mit je 1 ml PBS (bzw. 1 ml Permeabilisationspuffer für BCMA und Rat IgG) und anschließender Zentrifugation (855 g, 10 min, 4 °C). Die Färbung mit den sekundären Antikörpern erfolgte analog.

Tabelle 16: Ausgangskonzentration der verwendeten Antikörper

| Antikörper/Reagenzien | Ausgangskonzentration |
|-----------------------|-----------------------|
| Anti-BAFF | 1 mg/ml |
| Anti-BCMA | 1 mg/ml |
| Anti-Rat IgG PE | 0,2 mg/ml |
| Anti-TACI PE | 25 µg/ml |
| Mouse IgG1 PE | 25 µg/ml |
| Rat IgG | 0,2 mg/ml |
| Streptavidin PE | 0,3 mg/ml |

Tabelle 17: Überblick der pro Tube verwendeten primären und sekundären Antikörper mit jeweils eingesetzter Konzentration

| Probe | Primärer Antikörper | Eingesetzte Konzentration | Sek. Antikörper/Reagenz | Konzentration |
|-------|---------------------|---------------------------|-------------------------|---------------|
| 1 | --- | --- | --- | --- |
| 2 | Mouse IgG1 PE | 1 µg/ml | --- | --- |
| 3 | Anti-TACI PE | 1 µg/ml | --- | --- |
| 4 | --- | --- | Streptavidin | 2 µg/ml |
| 5 | Anti-BAFF | 1 µg/ml | Streptavidin | 2 µg/ml |
| 6 | Rat IgG PE | 1 µg/ml | --- | --- |
| 7 | Anti-BCMA | 1 µg/ml | Anti-Rat PE | 2 µg/ml |

Nach dem letzten Waschschrift wurde das abzentrifugierte Zellpellet jeweils in 400 µl FACS-Puffer resuspendiert und bei 4 °C gelagert.

Die Analyse am Durchflusszytometer erfolgte in der Regel sofort, spätestens jedoch innerhalb von 24 Stunden. Kurz vor der Messung wurden die Proben noch mehrmals auf und ab pipettiert, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen und Adhäsionen an der Gefäßwand zu vermeiden.

2.2.5 Untersuchung der Wirkung von BAFF-Standard und rekombinatem BAFF auf die Apoptoserate von Fibroblasten

2.2.5.1 Inkubation mit BAFF-Standard

Zunächst wurden die zu untersuchenden Fibroblasten wie unter 2.2.2 beschrieben kultiviert, bis pro Patient eine 75 cm² Flasche zugewachsen war. Die Zellen wurden anschließend analog dem Verfahren zur Subkultivierung auf 12-Well-Platten verteilt. Pro Patient wurden dabei sechs Wells benötigt. Nach einer Kultivierungsdauer von drei Tagen in 1 ml Medium pro Well wurden die Zellen jedes Patienten für 48 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen des BAFF-Standards (siehe Tabelle 18) inkubiert und anschließend analysiert.

Tabelle 18: Eingesetzte Konzentrationen des BAFF-Standards

| Well | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----------------------|---|------|-----|-----|---|---|
| Konzentration (ng/ml) | 0 | 0,01 | 0,1 | 0,5 | 1 | 5 |

2.2.5.2 Inhibitionsversuche mittels Antikörper gegen BAFF

Analog zu 2.2.4.1 wurden die Fibroblasten von 5 OA- und 6 RA-Patienten zunächst kultiviert, bei ausreichender Konfluenz auf je eine 24-Well-Platte pro Patient verteilt und für drei Tage in 1 ml Medium angezüchtet. Dann erfolgte die Zugabe der unten genannten Antikörper in einer Konzentration von 5 µg/ml in 0,5 ml Medium sowie nach einer Inkubationszeit von ca. 20 Minuten zusätzlich die Gabe des BAFF-Standards, um die in Tabelle 18 aufgeführten Konzentrationen zu erreichen. Die für jede der eingesetzten Konzentrationen verwendeten Antikörper waren gegen BAFF, BAFF-R, BCMA und TACI gerichtet und haben laut Herstellerangaben eine inhibierende Wirkung. Außerdem wurde eine Isotyp-Kontrolle eingesetzt und eine Konzentrationsreihe ohne Zugabe von Antikörpern oder Kontrollen belassen. Die eingesetzten Konzentrationen waren 0 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 5 ng/ml (siehe Tabelle 19). Die Analyse erfolgte nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden.

Tabelle 19: Schema zur Verdeutlichung der jeweils pro Well eingesetzten Konzentration des BAFF-Standards und der Verteilung der blockierenden Antikörper auf einer 24-Well-Platte

| Konzentration | Verwendete Antikörper je Well | | | | | |
|----------------------|--------------------------------------|--------|------|--------|------|------|
| 0 ng/ml | Keiner | Isotyp | BAFF | BAFF-R | BCMA | TACI |
| 0,1 ng/ml | Keiner | Isotyp | BAFF | BAFF-R | BCMA | TACI |
| 1 ng/ml | Keiner | Isotyp | BAFF | BAFF-R | BCMA | TACI |
| 5 ng/ml | Keiner | Isotyp | BAFF | BAFF-R | BCMA | TACI |

2.2.5.3 Untersuchung der Wirkung von rekombinantem BAFF mit und ohne Zugabe eines blockierenden Antikörpers gegen BCMA

Die Kultivierung der Zellen erfolgte auch hier analog zu 2.2.5.1, wobei für jeden Patienten eine 12-Well-Platte benötigt wurde. Zur Anzucht der Fibroblasten wurden diese zunächst über drei Tage in 1 ml Medium pro Well inkubiert. Dann erfolgte ein Mediumwechsel und die Zugabe der Antikörper in einer Konzentration von 3 µg/ml sowie nach ca. 20 Minuten die Zugabe von rekombinantem BAFF in drei Konzentrationsreihen mit 0 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml und 15 ng/ml nach dem in Tabelle 20 aufgeführten Schema. Für die erste Konzentrationsreihe wurde ein Antikörper gegen BCMA, für die zweite eine entsprechende Isotypkontrolle und für die dritte eine Negativkontrolle ohne Antikörper verwendet. Die Analyse erfolgte nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden.

Tabelle 20: Schema zur Verdeutlichung der jeweils pro Well eingesetzten Konzentration des rekombinanten BAFFs und der Verteilung der blockierenden Antikörper auf einer 12-Well-Platte

| Antikörper | Eingesetzte Konzentrationen des rekombinanten BAFF in ng/ml | | | |
|-------------------|--|---|---|----|
| Keiner | 0 | 1 | 5 | 15 |
| Anti-BCMA | 0 | 1 | 5 | 15 |
| Isotyp | 0 | 1 | 5 | 15 |

2.2.5.4 Untersuchung der Apoptoserate per FACS-Analyse

Zunächst wurde das Medium jeden Wells entnommen und in das jeweilige FACS-Röhrchen überführt, um auch spätapoptotische und nekrotische Zellen, die nicht mehr an der Well-Platte adhären waren in die folgende Analyse einzuschließen. Nach einem Waschschrift mit 500 µl PBS erfolgte die Inkubation mit 250 µl Trypsin (1x) in den Abschnitten 2.2.5.1 und 2.2.5.3 beziehungsweise 400 µl Trypsin (1x) im Abschnitt 2.2.5.2 für 20 Minuten, um die restlichen Zellen abzulösen. Daraufhin wurde die Reaktion mit 500 µl Medium gestoppt und die Zellsuspension in das jeweils zugehörige FACS-Röhrchen überführt. Nun erfolgte eine Zentrifugation (836 g, 4 °C, 10 Minuten). Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen bis zur Analyse innerhalb von maximal zwei Stunden bei 4 °C gekühlt.

Zur Detektion der Apoptoserate wurde das FITC Annexin Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) verwendet. Zu jedem FACS-Tube wurde eine 100 µl Lösung, bestehend aus 90 µl Annexin-Bindepuffer (1x), 5 µl Annexin V und 5 µl Propidiumiodid, zugegeben und für exakt 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz mit 300 µl des Bindepuffers verdünnt und unmittelbar darauf im FACS-Gerät analysiert.

2.2.5.5 Auswertung der FACS-Daten

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo (Tree Star, Ashland, USA). Die Angabe der Werte aller FACS-Versuche erfolgt in der vorliegenden Arbeit als Prozentsatz der jeweiligen Subpopulation. Dieser Prozentsatz wurde in den Versuchen zur Untersuchung der Expressionsrate der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA aufgrund der zum Teil nur gering ausgeprägten Effekte mit Hilfe der kumulativen Subtraktionsmethode nach Overton berechnet. Mit diesem Algorithmus werden die Eventzahlen aller Kanäle eines Kontroll-Histogramms von den Eventzahlen aller korrespondierenden Kanäle des entsprechenden Test-Histogramms subtrahiert. Negative Differenzen werden zu positiven Differenzen aus niedrigeren Kanälen addiert. Sobald dies für alle Kanäle durchgeführt wurde,

müssen alle noch verbliebenen negativen Differenzen gleich Null gesetzt werden. Die Summe der restlichen Differenzen entspricht nun der Anzahl positiver Zellen (Overton 1988).

Für die Auswertung der Versuche zur Untersuchung des Einflusses des BAFF-Standards und des rekombinanten BAFF wurden die Gates im DotPlot-Diagramm für jeden Patienten so gesetzt, dass diese jeweils den Anteil der nekrotischen, frühapoptotischen, spätapoptotischen und lebenden Zellen der untersuchten Subpopulation angaben. Bei lebenden Zellen sind negativ geladene Phospholipide wie Phosphatidylserin insbesondere an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert. Während der Apoptose kommt es jedoch bereits in der frühen Phase zu einer zunehmenden Translokation des Phosphatidylserins an die Membranaußenseite, wobei die Zellmembran zunächst noch weitestgehend intakt bleibt²⁰⁷. Annexin V ist ein Protein mit hoher Affinität zu Phospholipiden, weshalb man es an einen Farbstoff wie FITC gekoppelt gut zur Detektion von Apoptose verwenden kann²⁰⁸. Zur Unterscheidung von einer Nekrose, bei der auch die Membranintegrität gestört ist, kann man nun zusätzlich mit PI färben. Dieses bindet Nukleinsäuren im Zellkern, den es bei intakter Zellmembran nicht erreicht²⁰⁸.

Lebende Zellen lassen sich also weder mit Annexin V noch mit Propidiumiodid, frühapoptotische Zellen nur mit Annexin V, spätapoptotische Zellen mit beiden Farbstoffen und nekrotische Zellen nur mit Propidiumiodid anfärben. Beispielhaft ist dies in Abbildung 1 für die Zellen eines OA-Patienten veranschaulicht. Die Summe aus Frühapoptose und Spätapoptose wird im Folgenden als Gesamtapoptose bezeichnet.

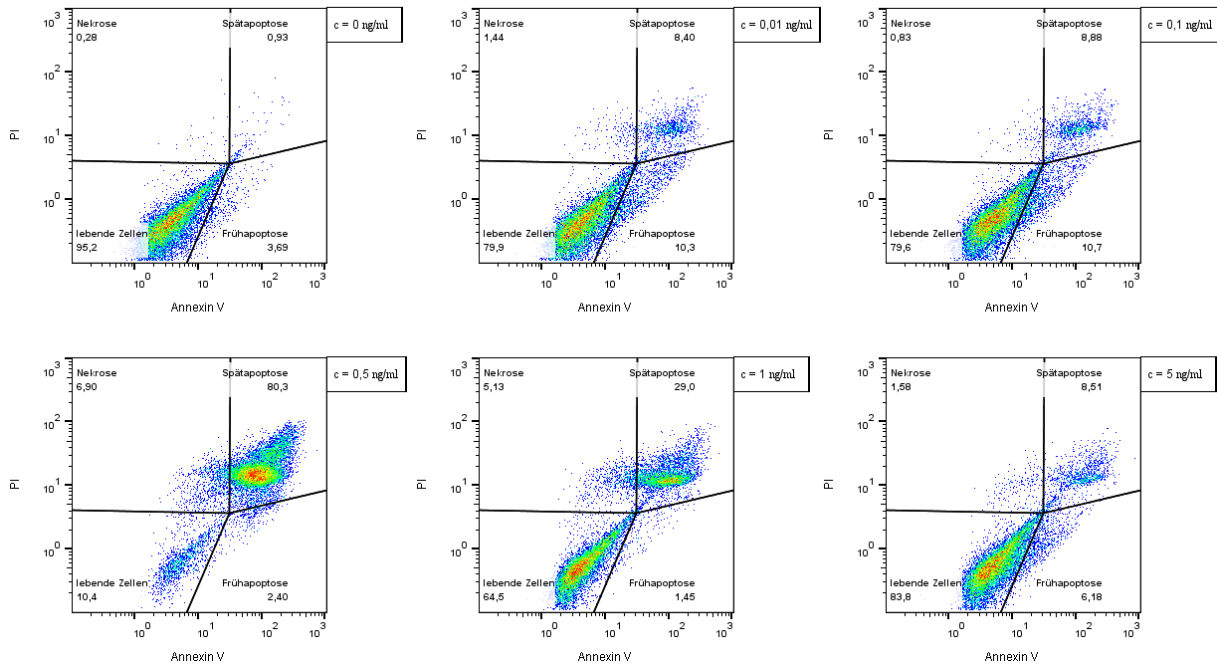


Abbildung 1: Beispiel für Lage der Gates anhand eines OA-Patienten mit aufsteigenden BAFF-Konzentrationen. Dargestellt ist der Dot Plot eines OA-Patienten, wobei auf der X-Achse die Fluoreszenzintensität der Annexin-gefärbten Zellen und auf der y-Achse die Fluoreszenzintensität der PI-gefärbten Zellen aufgetragen wurde. Die Gates wurden so gesetzt, dass folgende Populationen abgegrenzt werden konnten: lebende Zellen, Zellen in Frühapoptose, Zellen in Spätapoptose, nekrotische Zellen.

2.2.5.6 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der FACS-Daten erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit IBM SPSS Statistics Version 21 für Windows (IBM, Armonk, USA). Mittelwerte wurden mit der Standardabweichung angegeben. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde im Folgenden der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden dabei als statistisch signifikant angesehen. Darüber hinaus wurde zum Vergleich der verschiedenen Gruppen nach Stimulation mit verschiedenen BAFF-Konzentrationen und blockierenden Antikörpern die Varianzanalyse (ANOVA) mit post-hoc Bonferroni-Test durchgeführt. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse mit Box-Plots wurde das Programm SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Chicago, US) verwendet, die Erstellung der Overlay-Histogramme erfolgte mit FlowJo V10 (Tree Star, Ashland, USA).

2.2.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Mit Hilfe der PAGE lassen sich Proteine anhand ihrer Ladung (native PAGE) oder Masse (denaturierende PAGE) auftrennen. Bei einer denaturierenden PAGE wird durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) und β -Mercaptoethanol die Tertiär- und Quartärstruktur der

untersuchten Proteine aufgehoben, sodass insbesondere die Untereinheiten der jeweiligen Proteine untersucht werden.

Vor der eigentlichen Auftrennung musste in einem ersten Schritt das Gel hergestellt werden. Dazu wurden zunächst pro Gel je 6 ml des 15 %igen Laufgels mit 30 μ l APS und 18 μ l TEMED versetzt, um die Kettenreaktion zur Bildung des Polyacrylamids in Gang zu setzen. Dieses wurde anschließend zwischen zwei Glasplatten gegossen und zur Glättung des oberen Randes mit Propanol überschichtet. Nach Auspolymerisierung des Gels wurde der Alkohol abgetupft. Daraufhin wurden pro Gel je 2 ml des 5 %igen Sammelgels mit 20 μ l APS und 6 μ l TEMED versetzt, über das Laufgel gegeben und Käbme zur Formung der Sammelaschen eingesetzt. Nach Abwarten der Auspolymerisierung konnten die Käbme entfernt und noch vorhandene Gelreste in den Sammelaschen abgesaugt werden. Nun wurden die Gele in die für die Auftrennung vorgesehene Apparatur eingespannt und mit Laufpuffer bedeckt.

Die Proteine wurden zunächst mit PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Daraufhin wurde der Probenpuffer zugegeben und das Proteingemisch für die SDS-PAGE 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Anschließend wurden je 30 μ l der Proteinmischungen auf die verschiedenen Taschen verteilt. Zusätzlich wurde ein Proteinstandard (Protein-Marker V) aufgetragen, um später die Größe der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können. Daraufhin wurde für etwa 70 Minuten die Elektrophorese mit einer Stromstärke von 25 mA pro Gel durchgeführt.

2.2.7 Coomassie-Färbung

Mit Hilfe dieser Färbemethode lassen sich nach Durchführung der PAGE die Proteine auf dem Polyacrylamidgel oder nach dem Western Blot auf der Membran optisch nachweisen. Dazu wurden die Gele oder Membranen bei Raumtemperatur über etwa 30 Minuten auf dem Schüttler mit der Coomassie-Lösung inkubiert, wobei der Farbstoff Komplexe mit den vorhandenen Proteinen ausbildet. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die Gele oder Membranen mit einem Wasser-Methanol-Gemisch gewaschen bis die gewünschte Färbung erreicht war.

2.2.8 Western Blot

Mit einem Western Blot lassen sich die in der PAGE aufgetrennten Proteine mit Hilfe einer angelegten Spannung auf eine Membran übertragen und anschließend mit Hilfe primärer und sekundärer Antikörper spezifisch nachweisen.

Die Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurde zunächst mit Methanol und Wet-Transfer-Puffer rehydriert. Vor der Übertragung wurden die nötigen Bestandteile so zusammengesetzt, dass sich innen Polyacrylamidgel (zur Kathode) und PVDF-Membran (zur Anode), weiter außen auf beiden Seiten erst Whatman-Filterpapiere, dann Schaumstoffpads befanden. Dieses so genannte Blot-Sandwich wurde in die Apparatur eingespannt, mit Wet-Transfer-Puffer befüllt und über 90 Minuten bei einer Spannung von 80 V unter laufender Kühlung die Übertragung der Proteine durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran über eine Stunde in 5 % Magermilch, die als Blocklösung diente, auf dem Schüttler inkubiert. Daraufhin folgten drei Waschschrte mit TBS-T zu je 15 Minuten. Die Inkubation der 1:500 mit Antikörperpuffer verdünnten primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Morgen folgten erneut drei Waschschrte und anschließend für 60 Minuten die Inkubation mit den sekundären Antikörpern, die mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert waren. Danach wurden drei weitere Waschschrte von je 10 Minuten mit TBS-T durchgeführt, gefolgt von zwei weiteren Waschschrten mit TBS für jeweils 5 Minuten. Die Entwicklung der Blots erfolgte mit Hilfe des ECL Prime Western Blotting Detection Reagent. Dazu wurden die beiden enthaltenen Reagenzien 1:1 vermischt und auf jede Membran je 750 µl der Mischung gegeben. Die Inkubation erfolgte für 5 Minuten im Dunkeln unter einer Klarsichtfolie, um eine Austrocknung zu verhindern. Dabei katalysierte HRP die Umsetzung von Luminol zu seiner oxidierten Form, deren Lumineszenz anschließend detektiert werden konnte. Daraufhin wurde das überschüssige Reagenz entfernt und die Chemilumineszenz mit Hilfe des ChemiDoc-Detektionsgeräts (Bio-Rad, Hercules, USA) nachgewiesen. Tabelle 21 gibt einen Überblick über die einzelnen Färbeschritte.

Tabelle 21: Färbeschritte des Western Blot

| primärer Antikörper | Waschschritt | Sekundärer Antikörper | Waschschritt |
|---|-----------------------|---|---|
| Anti-BAFF (rabbit) 1:500 in Antikörperpuffer | 3x15 min mit TBS-T | Donkey anti-rabbit HRP 1:5000 in 5 % Milch | 3x10 min mit TBS-T, dann 2x5 min mit TBS |
| anti-BAFF (biotinyliert) 1:500 in Antikörperpuffer | 3x15 min mit TBS-T | Streptavidin Poly-HRP 1:3333 in Antikörperpuffer | 3x10 min mit TBS-T, dann 2x5 min mit TBS |

2.2.9 Immunhistochemie

2.2.9.1 Grundlagen der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, mit dessen Hilfe man Proteine im Gewebeschnitt oder an kultivierten Zellen anfärben kann. Typischerweise erfolgt die Färbung in zwei Schritten: der primäre Antikörper sollte spezifisch an das zu untersuchende Antigen binden, sofern dieses in den betrachteten Zellen vorhanden ist. Im zweiten Schritt gibt man einen mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörper dazu, der gegen Immunglobuline aus der Tierart des primären Antikörpers gerichtet ist. Wahlweise kann der primäre Antikörper auch direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sein. Die so angefärbten Proben können nun mit einem Fluoreszenzmikroskop auf das Vorhandensein des jeweiligen Proteins untersucht werden.

2.2.9.2 Vorbereitung der Proben

Die unter 2.2.4.3 entnommenen Zellen wurden auf Chamber-Slides verteilt, so dass jede Chamber-Slides-Platte jeweils sechs befüllte Wells mit den Zellen aus einem bestimmten Stimulationsansatz enthielt. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert, damit diese am Objektträgerboden adhären konnten. Am nächsten Tag erfolgte nach Absaugen des Mediums die Fixierung mit Formalin (2 % in PBS) für 10 Minuten. Im Anschluss wurden die Fibroblasten ca. 20 Minuten lang mit eisgekühltem Methanol (100 %) permeabilisiert, bis dieses unter dem Abzug komplett abgedampft war. Dann wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren.

2.2.9.3 Färbung der Proben

Zur Färbung wurden die Zellen etwa 15 Minuten aufgetaut und anschließend mit PBS rehydriert. Daraufhin erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit jeweils 200 µl der Blocklösung bei Raumtemperatur, um unspezifische Bindungen zu vermindern. Nach drei Waschschritten zu je 5 Minuten mit jeweils 200 µl des Waschpuffers wurden die primären Antikörper in der Konzentration 5 µg/ml im Färbepuffer angesetzt und von diesem Ansatz jeweils 100 µl in die Wells gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Tag wurden die nicht gebundenen Antikörper in drei Waschschritten mit jeweils 200 µl des Waschpuffers abgewaschen und die sekundären Antikörper mit Färbepuffer auf eine Konzentration von 2,5 µg/ml verdünnt, bevor in die zugehörigen Wells jeweils 100 µl des Ansatzes gegeben wurden. Nach einer Inkubationszeit von etwa 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln folgten zwei weitere Waschschrritte. Um die Zellkerne

anzufärben, erfolgte nun die Zugabe von *4',6-Diamidin-2-phenylindol* (DAPI) (1:10000 in PBS) und nach drei Minuten Inkubation ein letzter Waschschrift mit 200 µl PBS. Tabelle 22 gibt einen Überblick über die Färbeschritte der primären und sekundären Antikörper in jeder Chamber-Slide-Platte.

Tabelle 22: Übersicht über Färbe- und Waschschrift in der Immunhistochemie

| Probe | Primärer Antikörper (5µg/ml) in 100µl | Waschschrift | Sekundärer Antikörper (2,5µg/ml) in 100µl | Waschschrift |
|----------------------|--|---------------------|--|---------------------|
| Isotyp | 0,5µl Rabbit IgG | 3x mit 200µl | 0,25µl goat anti-rabbit Alexa Fluor 546 | 3x mit 200µl |
| BAFF-Rezeptor | 0,5µl Rabbit anti-BAFF receptor | 3x mit 200µl | 0,25µl goat anti-rabbit Alexa Fluor 546 | 3x mit 200µl |
| TACI | 1µl Rabbit anti-TACI | 3x mit 200µl | 0,25µl goat anti-rabbit Alexa Fluor 546 | 3x mit 200µl |
| BCMA | 0,5µl Rabbit anti-BCMA | 3x mit 200µl | 0,25µl goat anti-rabbit Alexa Fluor 546 | 3x mit 200µl |

Die Kammern wurden mit Hilfe des bei den Chamber-Slides mitgelieferten Werkzeugs von den Objektträgern entfernt. Zuletzt wurden die Deckgläser mittels Mounting-Medium aufgebracht und die Proben bis zum Mikroskopieren bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.9.4 Aufnahme der Bilder

Zum Mikroskopieren wurde das Gerät Axiovert 200M (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit Hilfe einer eingebauten Kamera und der Software AxioVision (Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Im Folgenden sind die Bilder als Overlays der DAPI- und Alexa Fluor 546-Aufnahmen dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Expression von BAFF-R, TACI und BCMA auf synovialen Fibroblasten von Patienten mit OA und RA per FACS-Analyse

SF spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der RA. Bei der Erkrankung konnten außerdem erhöhte BAFF- und APRIL-Spiegel in der Synovialflüssigkeit festgestellt werden, woran SF durch Sekretion der Zytokine beteiligt sind^{190 191 192 195}. Ob SF auch über die Rezeptoren des BAFF-/ APRIL-Systems verfügen und wie die Expression reguliert wird wurde bislang nur in wenigen Studien untersucht.

3.1.1 Charakterisierung synovialer Fibroblasten von Patienten mit OA und RA

Zuerst sollte untersucht werden, ob die Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA auf SF exprimiert werden und ob sich diesbezüglich Unterschiede zwischen Zellen von RA- und OA-Patienten finden. Dazu wurden im Folgenden die Zellen von insgesamt 19 Patienten mit OA und 18 Patienten mit RA analysiert.

Es zeigte sich, dass bei OA-Patienten durchschnittlich 4,32 +/- 4,9 % der Zellen BAFF-R exprimieren, bei RA-Patienten 4,19 +/- 8,06 % der Zellen. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen OA und RA ($p=0,707$). Zwischen Männern und Frauen ergaben sich weder bei OA ($p=0,657$) noch bei RA ($p=1$) signifikante Unterschiede (siehe Abbildung 2 und Abbildung 3).

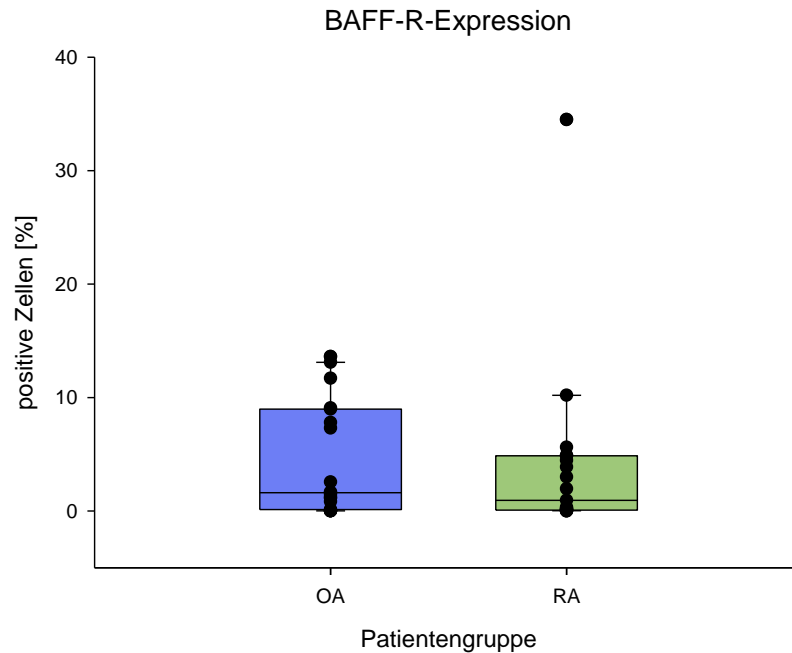


Abbildung 2: BAFF-R-Expression auf synovialen Fibroblasten von Patienten mit OA und RA. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 10., 25., 50., 75. und 90. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Die Expression des BAFF-R wurde mittels Durchflusszytometrie und nachfolgender Overton-Analyse auf SF von Patienten mit OA ($n=19$) und RA ($n=18$) bestimmt.

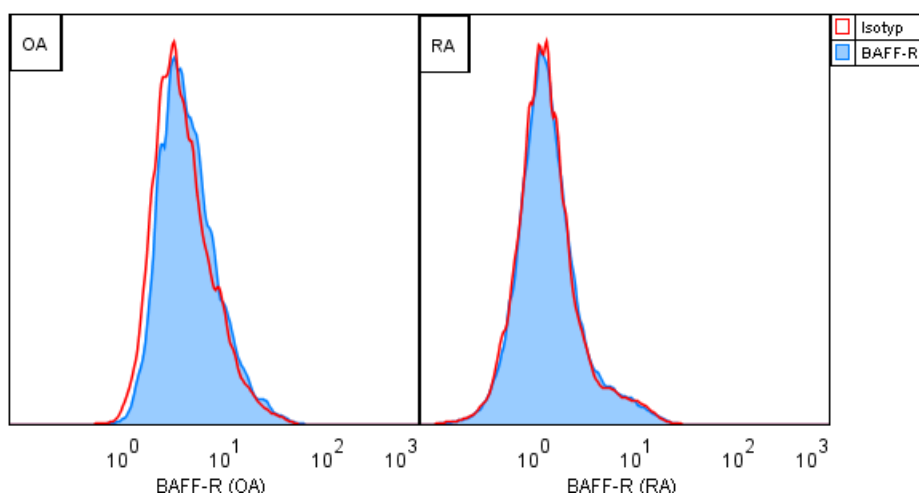


Abbildung 3: Histogramme zur Darstellung der BAFF-R-Expression auf synovialen Fibroblasten von Patienten mit OA und RA. Die Darstellung zeigt jeweils ein repräsentatives Overlay-Fluoreszenzhistogramm von insgesamt 19 OA- und 18 RA-Patienten nach durchflusszytometrischer Bestimmung der BAFF-R-Expression auf SF. Dazu wurden die Zellen der Patienten jeweils mit einem anti-BAFF-R-Antikörper (blauer Graph) oder einer Isotyp-Kontrolle (roter Graph) angefärbt.

Auch TACI wurde auf SF nur bei einem geringen Teil der Patienten exprimiert. Hierbei verfügten die Zellen von Patienten mit RA mit durchschnittlich 4,97 +/- 5,22 % signifikant häufiger über TACI als Zellen von OA-Patienten mit 2,24 +/- 3,03 % ($p=0,036$) (siehe Abbildung 4 und Abbildung 5). Das Geschlecht hatte weder bei OA- ($p=0,131$) noch bei RA-Patienten ($p=0,291$) einen signifikanten Einfluss auf die Rezeptorexpression.

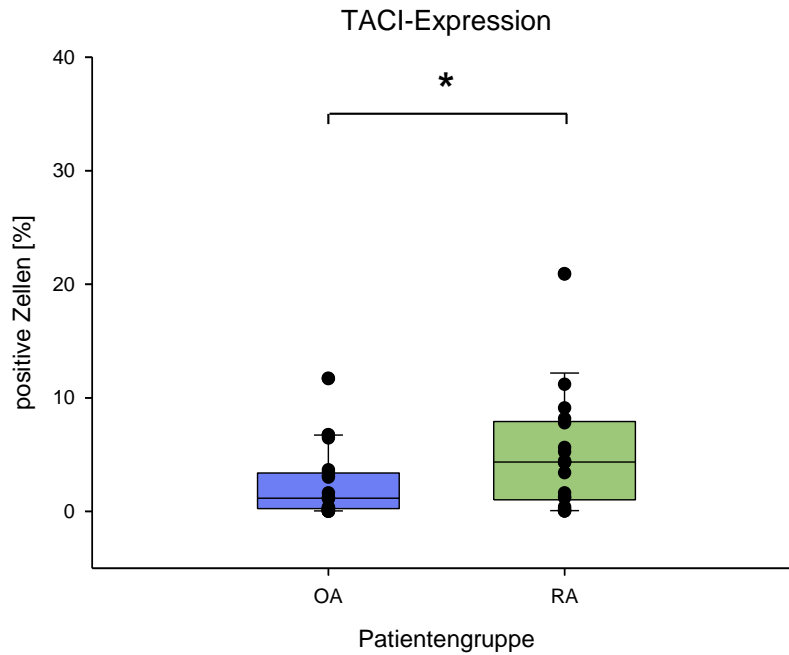


Abbildung 4: TACI-Expression auf synovialen Fibroblasten von Patienten mit RA und OA. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 10., 25., 50., 75. und 90. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Die TACI-Expression wurde mittels Durchflusszytometrie und nachfolgender Overton-Analyse auf SF von Patienten mit OA ($n=20$) und RA ($n=18$) bestimmt. * = $p<0,05$

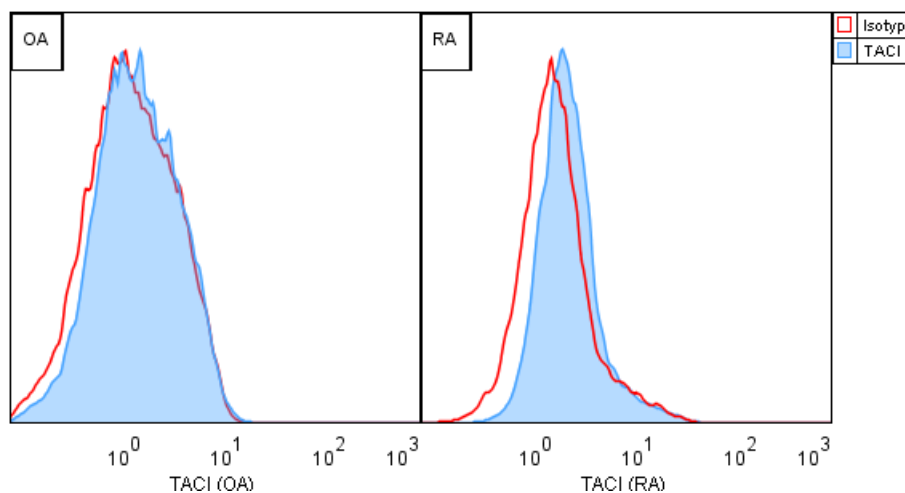


Abbildung 5: Histogramme zur Darstellung der TACI-Expression auf synovialen Fibroblasten von Patienten mit OA und RA. Die Darstellung zeigt jeweils ein repräsentatives Overlay-Fluoreszenzhistogramm von insgesamt 20 OA- und 18 RA-Patienten nach durchflusszytometrischer Bestimmung der TACI-Expression auf SF. Dazu wurden die Zellen der Patienten jeweils mit einem anti-TACI-Antikörper (blauer Graph) oder einer Isotyp-Kontrolle (roter Graph) angefärbt.

BCMA konnte auf 7,82 +/- 12,04 % der Zellen von OA-Patienten sowie auf 15,91 +/- 10,53 % der Zellen von RA-Patienten nachgewiesen werden. Der Rezeptor wurde somit signifikant häufiger auf Zellen von RA-Patienten exprimiert (p=0,005) (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7). Auffällig war ein Unterschied zwischen Frauen und Männern. Bei Frauen ließ sich auf 12,25 +/- 16,74 % der Zellen bei OA und 17,53 +/- 10,89 % der Zellen bei RA BCMA nachweisen. Männer hingegen exprimierten BCMA nur auf 4,20 +/- 4,36 % der Zellen bei OA sowie 12,67 +/- 9,89 % der Zellen bei RA, wobei die Unterschiede weder bei OA (p=0,112) noch bei RA (p=0,385) statistisch signifikant waren.

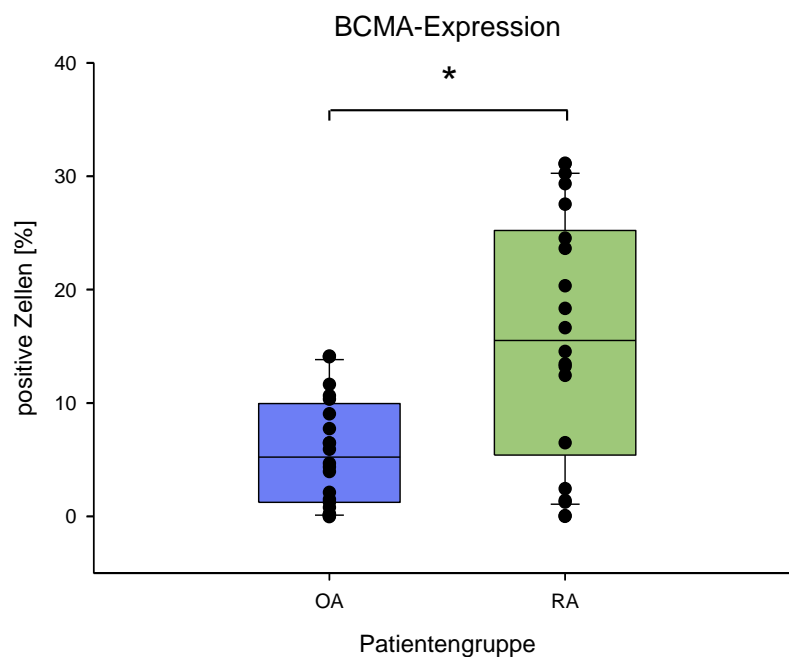


Abbildung 6: BCMA-Expression auf synovialen Fibroblasten von Patienten mit RA und OA. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 10., 25., 50., 75. und 90. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Die BCMA-Expression wurde mittels Durchflusszytometrie und nachfolgender Overton-Analyse auf SF von Patienten mit OA (n=20) und RA (n=18) bestimmt. * = p<0,05

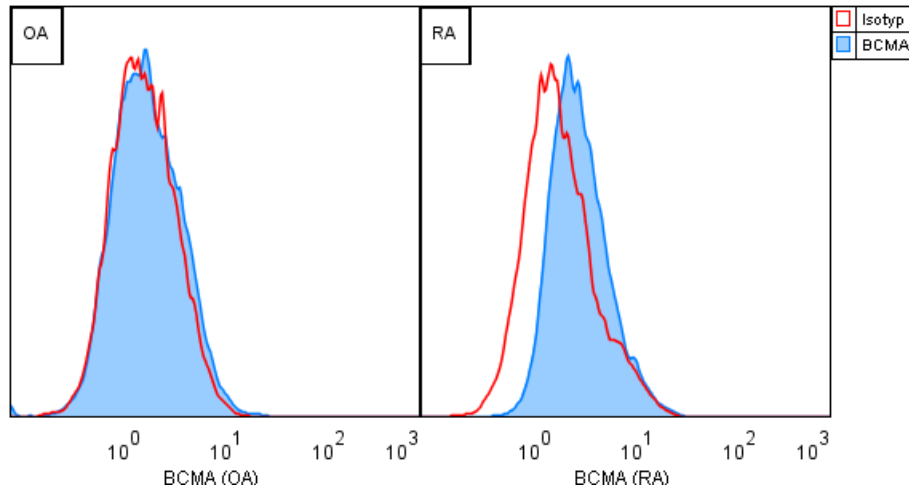


Abbildung 7: Histogramme zur Darstellung der BCMA-Expression auf synovialen Fibroblasten von Patienten mit OA und RA. Die Darstellung zeigt jeweils ein repräsentatives Overlay-Fluoreszenzhistogramm von insgesamt 20 OA- und 18 RA-Patienten nach durchflusszytometrischer Bestimmung der BCMA-Expression auf SF. Dazu wurden die Zellen der Patienten jeweils mit einem anti-BCMA-Antikörper (blauer Graph) oder einer Isotyp-Kontrolle (roter Graph) angefärbt.

3.1.2 Einflüsse verschiedener Stimulanzen auf die Rezeptorexpression

In einem weiteren Versuch sollten mögliche Einflussfaktoren auf die Expressionsrate der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA identifiziert werden. Die im Folgenden angegebenen p-Werte beziehen sich auf den Mann-Whitney-U-Test, der nach Standardisierung auf die nicht stimulierten Zellen durchgeführt wurde.

3.1.2.1 Zytokine

Im Vorversuch konnte gezeigt werden, dass SF von RA und OA die Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA in unterschiedlichem Maße exprimieren. In der Pathogenese der RA spielen Zytokine eine entscheidende Rolle, die im Synovialgewebe über komplexe Regulationsmechanismen an der fortschreitenden Gelenkszerstörung mitwirken und die chronische Entzündung fördern³⁵. Daher sollte als nächstes untersucht werden, ob eine Stimulation mit verschiedenen Zytokinen einen Einfluss auf die Rezeptorexpression hat.

Interleukin-1

Eine Stimulation mit IL-1 führte bei Zellen von Patienten mit OA im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen zu keiner wesentlichen Änderung der Expression von BAFF-R ($p=0,709$) und TACI ($p=0,712$). Bei BCMA war nach Stimulation mit IL-1 ein Trend zu einer Steigerung der Expression erkennbar ($p=0,059$). Von elf untersuchten Patienten ergab sich bei acht eine Zu- und bei drei Patienten eine Abnahme der BCMA-Expression (siehe Abbildung 8).

Bei Zellen von Patienten mit RA konnte durch die Stimulation mit IL-1 nach Standardisierung eine signifikante Steigerung der Expressionsrate von TACI ($p=0,006$) und BCMA ($p=0,006$) festgestellt werden. Dabei kam es von acht untersuchten Patienten jeweils bei sieben zu einer Steigerung und bei einem zu einer Reduktion der Expression. BAFF-R blieb von der Stimulation unbeeinflusst ($p=0,364$) (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9).

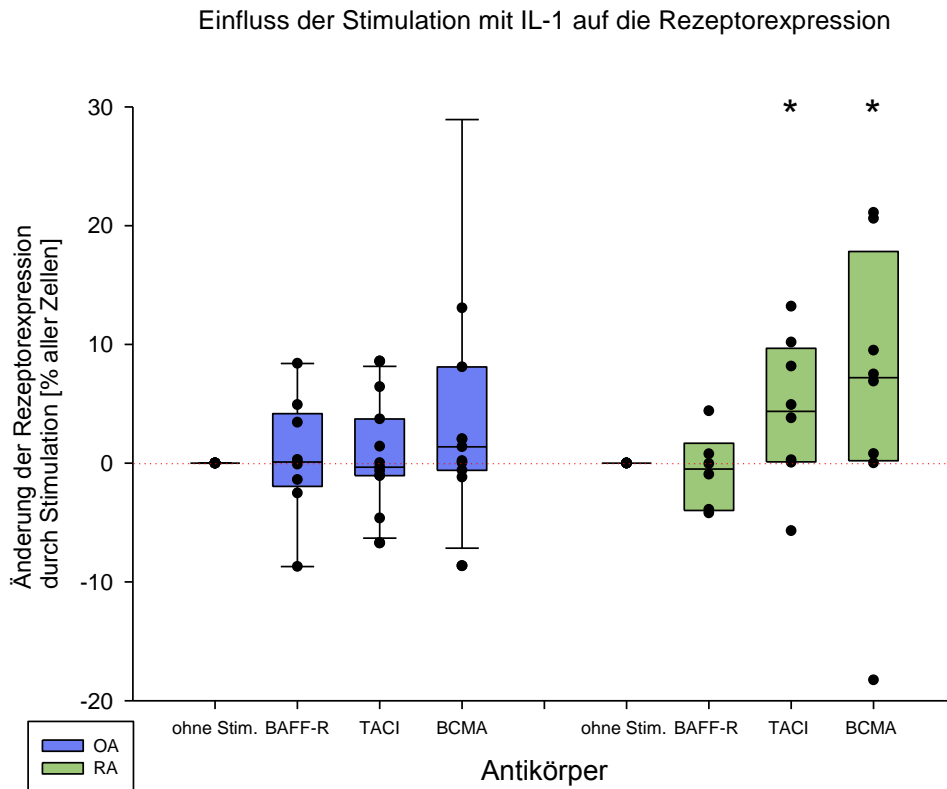


Abbildung 8: Expression der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA auf synovialen Fibroblasten von Patienten mit OA und RA vor und nach Stimulation mit IL-1. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 10., 25., 50., 75. und 90. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Vor der Analyse wurden die Zellen der Versuchsgruppe 72 Stunden mit IL-1, die Zellen der Kontrollgruppe in einfachem Medium inkubiert. Die Rezeptorexpression wurde mittels Durchflusszytometrie und nachfolgender Overton-Analyse auf SF von Patienten mit OA ($n=11$) und RA ($n=8$) bestimmt. Vor der statistischen Testung erfolgte für jeden Patienten jeweils die Standardisierung auf die Rezeptorexpression ohne Stimulation (rote Linie). * = $p < 0,05$. Signifikanzen sind im Vergleich zur Rezeptorexpression ohne Stimulation angegeben.

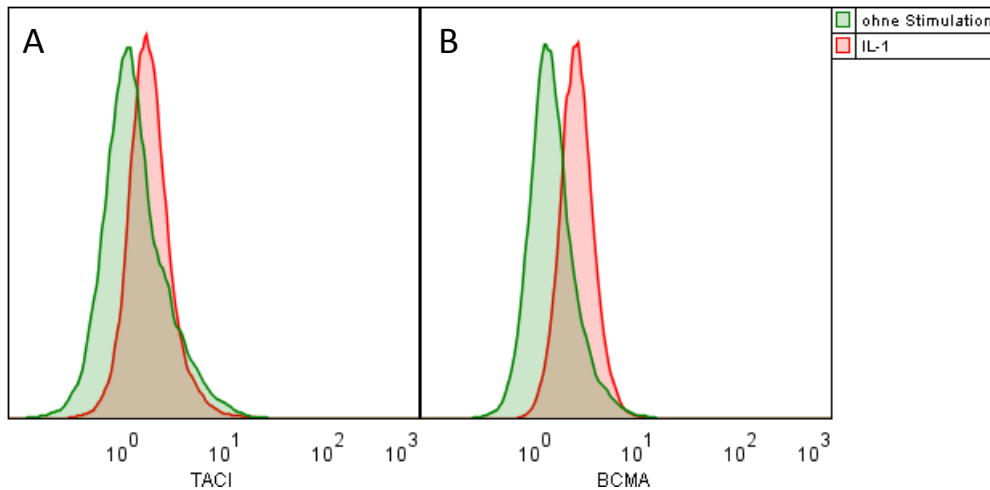


Abbildung 9: Histogramme zur Darstellung des Einflusses von IL-1 auf die TACI und BCMA-Expression bei RA-Patienten. Die Darstellung zeigt jeweils ein repräsentatives Overlay-Fluoreszenzhistogramm von insgesamt 8 RA-Patienten nach durchflusszytometrischer Bestimmung der TACI- (A) und BCMA-Expression (B) auf SF. Vor der Analyse wurden die Zellen der Versuchsgruppe 72 Stunden mit IL-1 (roter Graph), die Zellen der Kontrollgruppe in einfachem Medium (grüner Graph) inkubiert.

Interferon- γ

SF von OA-Patienten zeigten nach Stimulation mit IFN- γ bezüglich BCMA einen Trend zur Reduktion der Expressionsrate ($p=0,083$), wobei von acht untersuchten Patienten bei sechs eine Reduktion und bei zwei eine Zunahme der Expression beobachtet werden konnte. BAFF-R ($p=0,364$) und TACI ($p=0,690$) blieben unbeeinflusst (siehe Abbildung 10).

Bei RA-Patienten zeigte sich durch Stimulation mit IFN- γ weder bei BAFF-R ($p=0,683$) noch bei TACI ($p=0,364$) ein signifikanter Einfluss auf die Rezeptorexpression. Bei BCMA führte die Behandlung zu einer Erhöhung der Rezeptorexpression ($p=0,048$) (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11).

Einfluss der Stimulation mit IFN-gamma auf die Rezeptorexpression

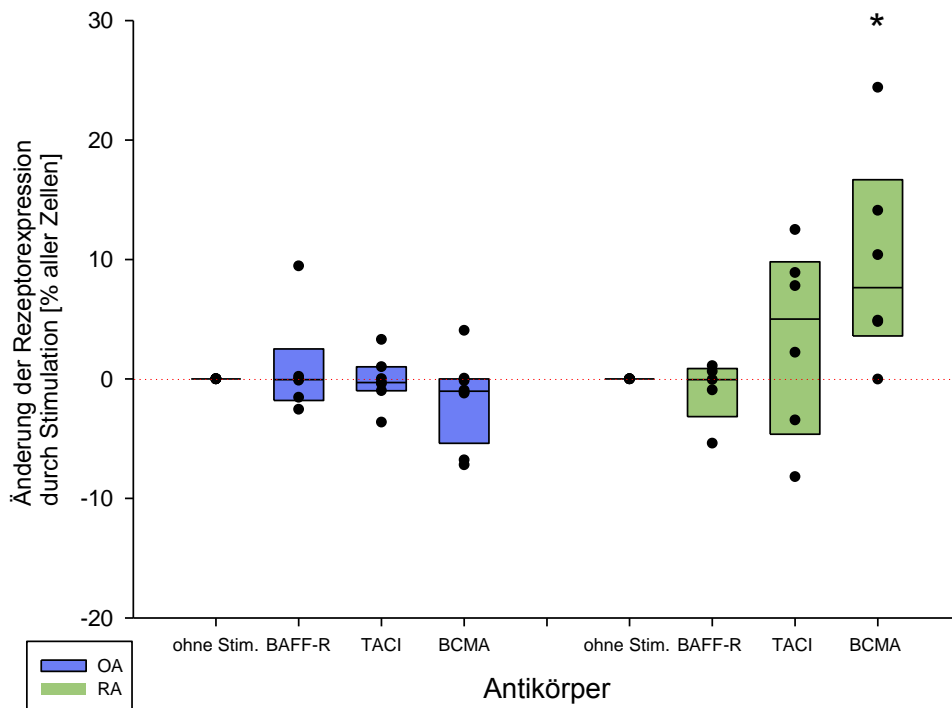


Abbildung 10: Expression der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA auf synovialen Fibroblasten von Patienten mit OA und RA vor und nach Stimulation mit IFN- γ . Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 25., 50. und 75. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Vor der Analyse wurden die Zellen der Versuchsgruppe 72 Stunden mit IFN- γ , die Zellen der Kontrollgruppe in einfachem Medium inkubiert. Die Rezeptorexpression wurde mittels Durchflusszytometrie und nachfolgender Overton-Analyse auf SF von Patienten mit OA (n=8) und RA (n=6) bestimmt. Vor der statistischen Testung erfolgte für jeden Patienten jeweils die Standardisierung auf die Rezeptorexpression ohne Stimulation (rote Linie). * = $p < 0,05$. Signifikanzen sind im Vergleich zur Rezeptorexpression ohne Stimulation angegeben.

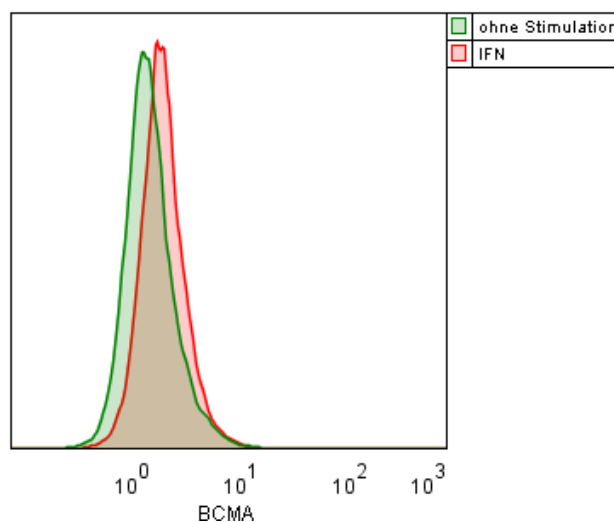


Abbildung 11: Histogramm zur Darstellung des Einflusses von IFN- γ auf die BCMA-Expression bei RA-Patienten. Die Darstellung zeigt ein repräsentatives Overlay-Fluoreszenzhistogramm von insgesamt 6 RA-Patienten nach durchflusszytometrischer Bestimmung der BCMA-Expression (B) auf SF. Vor der Analyse wurden die Zellen der Versuchsgruppe 72 Stunden mit IFN- γ (roter Graph), die Zellen der Kontrollgruppe in einfachem Medium (grüner Graph) inkubiert.

Tumornekrosefaktor-alpha

Durch eine Stimulation mit TNF- α konnte bei SF von OA-Patienten eine leichte Reduktion der Expression von BAFF-R ($p=0,127$) und BCMA ($p=0,127$) erreicht werden, die statistisch jedoch nicht signifikant war. Die Reduktion ließ sich jeweils bei vier von fünf untersuchten Patienten feststellen. Ein Einfluss auf TACI ($p=0,683$) ließ sich nicht beobachten (siehe Abbildung 12).

Bei RA-Patienten hingegen führte eine Stimulation mit TNF- α zu einer Steigerung der TACI-Expression ($p=0,048$) auf SF. Die Expressionsrate von BAFF-R ($p=0,683$) und BCMA ($p=0,364$) blieb unbeeinflusst (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13).

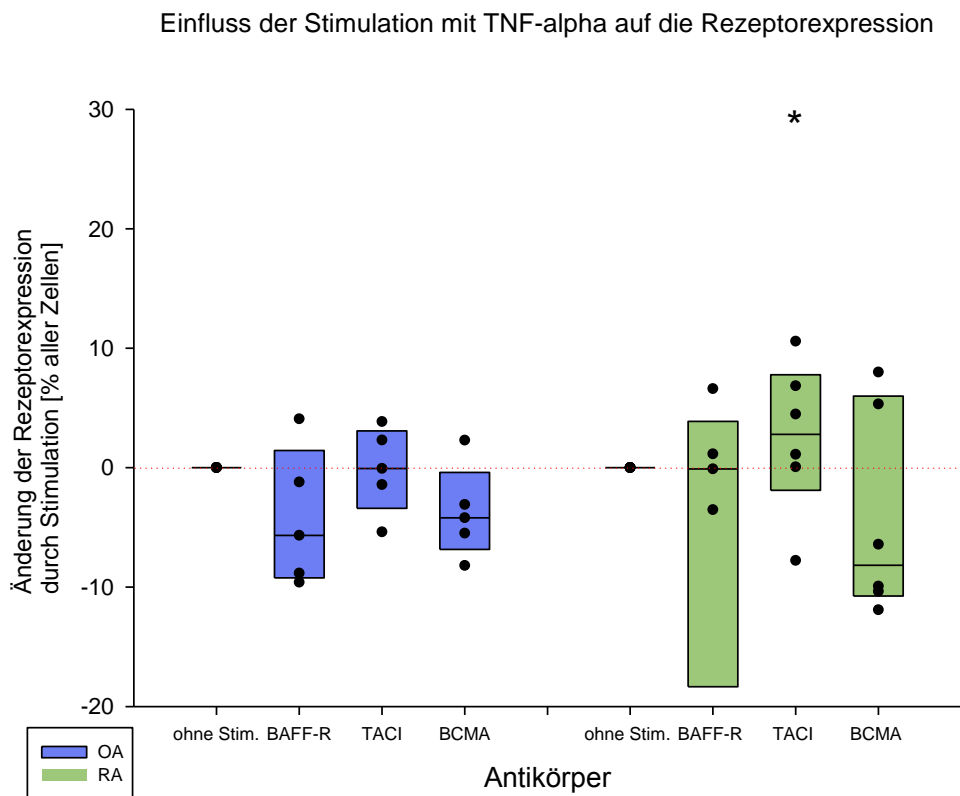


Abbildung 12: Expression der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA auf synovialen Fibroblasten von Patienten mit OA und RA vor und nach Stimulation mit TNF- α . Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 25., 50. und 75. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Vor der Analyse wurden die Zellen der Versuchsgruppe 72 Stunden mit TNF- α , die Zellen der Kontrollgruppe in einfachem Medium inkubiert. Die Rezeptorexpression wurde mittels Durchflusszytometrie und nachfolgender Overton-Analyse auf SF von Patienten mit OA ($n=5$) und RA ($n=6$) bestimmt. Vor der statistischen Testung erfolgte für jeden Patienten jeweils die Standardisierung auf die Rezeptorexpression ohne Stimulation (rote Linie). * = $p<0,05$. Signifikanzen sind im Vergleich zur Rezeptorexpression ohne Stimulation angegeben.

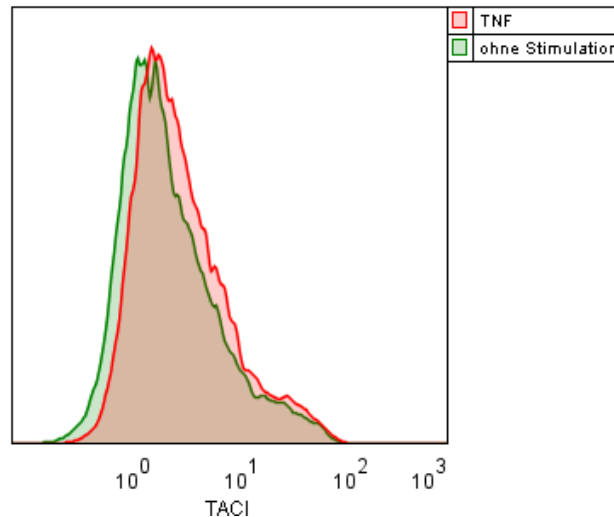


Abbildung 13: Histogramm zur Darstellung des Einflusses von TNF- α auf die TACI-Expression bei RA-Patienten. Die Darstellung zeigt ein repräsentatives Overlay-Fluoreszenzhistogramm von insgesamt 6 RA-Patienten nach durchflusszytometrischer Bestimmung der BCMA-Expression (B) auf SF. Vor der Analyse wurden die Zellen der Versuchsgruppe 72 Stunden mit TNF- α (roter Graph), die Zellen der Kontrollgruppe in einfachem Medium (grüner Graph) inkubiert.

Kombinierte Stimulation mit Interleukin-1 und Interferon- γ

Bei Zellen von OA-Patienten konnte man durch eine gleichzeitige Stimulation mit IL-1 und IFN- γ keine signifikante Änderung der Expression von BAFF-R ($p=0,683$), TACI ($p=0,683$) oder BCMA ($p=0,127$) feststellen. Bei BCMA kam es bei vier von fünf untersuchten Patienten zu einer Reduktion der Expression, bei einem Patienten zu einer Steigerung (siehe Abbildung 14).

Bei SF von RA-Patienten ergaben sich durch eine kombinierte Stimulation mit IL-1 und IFN- γ keinerlei Veränderungen der Expressionsrate von BAFF-R ($p=0,683$), TACI ($p=0,364$) und BCMA ($p=0,364$) (siehe Abbildung 14).

Einfluss der Stimulation mit IL-1 und IFN-gamma auf die Rezeptorexpression

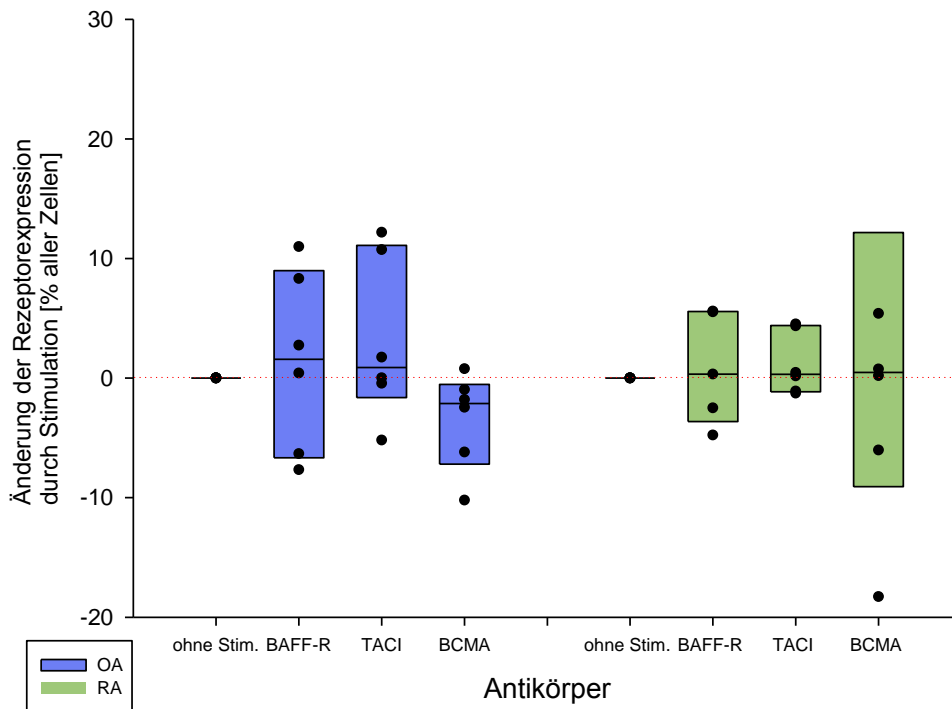


Abbildung 14: Expression der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA auf synovialen Fibroblasten von Patienten mit OA und RA vor und nach kombinierter Stimulation mit IL-1 und IFN- γ . Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 25., 50. und 75. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Vor der Analyse wurden die Zellen der Versuchsgruppe 72 Stunden mit IL-1 und IFN- γ , die Zellen der Kontrollgruppe in einfachem Medium inkubiert. Die Rezeptorexpression wurde mittels Durchflusszytometrie und nachfolgender Overton-Analyse auf SF von Patienten mit OA (n=5) und RA (n=6) bestimmt. Vor der statistischen Testung erfolgte für jeden Patienten jeweils die Standardisierung auf die Rezeptorexpression ohne Stimulation (rote Linie). * = p<0,05. Signifikanzen sind im Vergleich zur Rezeptorexpression ohne Stimulation angegeben.

3.1.2.2 Liganden der Toll-like Rezeptoren

Auf SF konnten bereits mehrere TLRs nachgewiesen werden, deren Aktivierung über verschiedene Wege zu einer verstärkten Knochendestruktion führt^{92 95 97}. Daher sollte untersucht werden, ob eine Aktivierung der TLRs durch deren Liganden Poly (I:C) und CpG die Expression von BAFF-R, TACI und BCMA beeinflusst.

Poly (I:C)

Durch eine Stimulation mit Poly (I:C) konnte auf SF von OA-Patienten keine Veränderung der Expressionsrate der Rezeptoren BAFF-R (p=0,683), TACI (p=0,404) oder BCMA (p=0,690) beobachtet werden (siehe Abbildung 15).

Auch bei Patienten mit RA bewirkte eine Stimulation mit Poly (I:C) keine signifikanten Veränderungen der Expressionsrate von BAFF-R ($p=0,683$), TACI ($p=0,690$) oder BCMA ($p=0,657$) (siehe Abbildung 15).

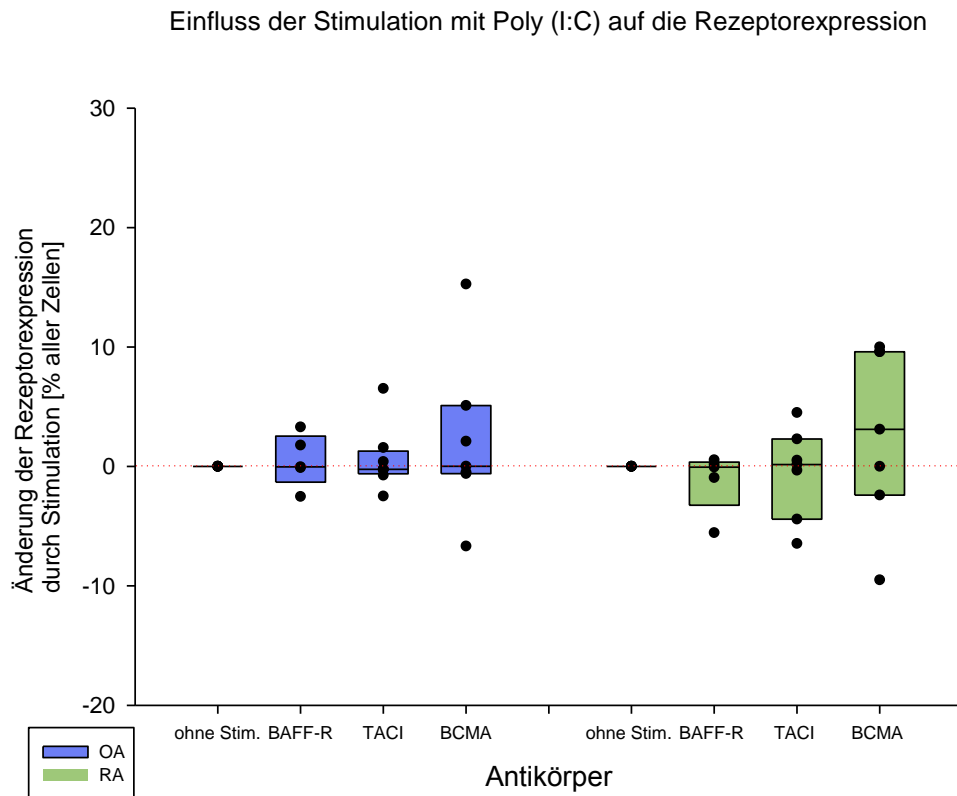


Abbildung 15: Expression der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA auf synovialen Fibroblasten von Patienten mit OA und RA vor und nach Stimulation mit Poly (I:C). Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 25., 50. und 75. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Vor der Analyse wurden die Zellen der Versuchsgruppe 72 Stunden mit Poly (I:C), die Zellen der Kontrollgruppe in einfachem Medium inkubiert. Die Rezeptorexpression wurde mittels Durchflusszytometrie und nachfolgender Overton-Analyse auf SF von Patienten mit OA ($n=7$) und RA ($n=7$) bestimmt. Vor der statistischen Testung erfolgte für jeden Patienten jeweils die Standardisierung auf die Rezeptorexpression ohne Stimulation (rote Linie). * = $p<0,05$. Signifikanzen sind im Vergleich zur Rezeptorexpression ohne Stimulation angegeben.

CpG

Bei Zellen von OA-Patienten konnte durch Stimulation mit CpG eine signifikante Verminderung der Expression der beiden Rezeptoren TACI ($p=0,008$) und BCMA ($p=0,008$) festgestellt werden. BAFF-R wurde durch die Stimulation insgesamt nicht beeinflusst ($p=0,127$) (siehe Abbildung 16 und Abbildung 17).

Ebenfalls mit CpG behandelte Zellen von RA-Patienten zeigten hingegen nur eine leichte, nicht signifikante Steigerung der TACI-Expression ($p=0,127$), die sich bei vier von fünf untersuchten Patienten zeigte. Auf BAFF-R ($p=0,683$) und BCMA ($p=0,683$) hatte die Stimulation keinen statistisch relevanten Einfluss (siehe Abbildung 16).

Einfluss der Stimulation mit CpG auf die Rezeptorexpression

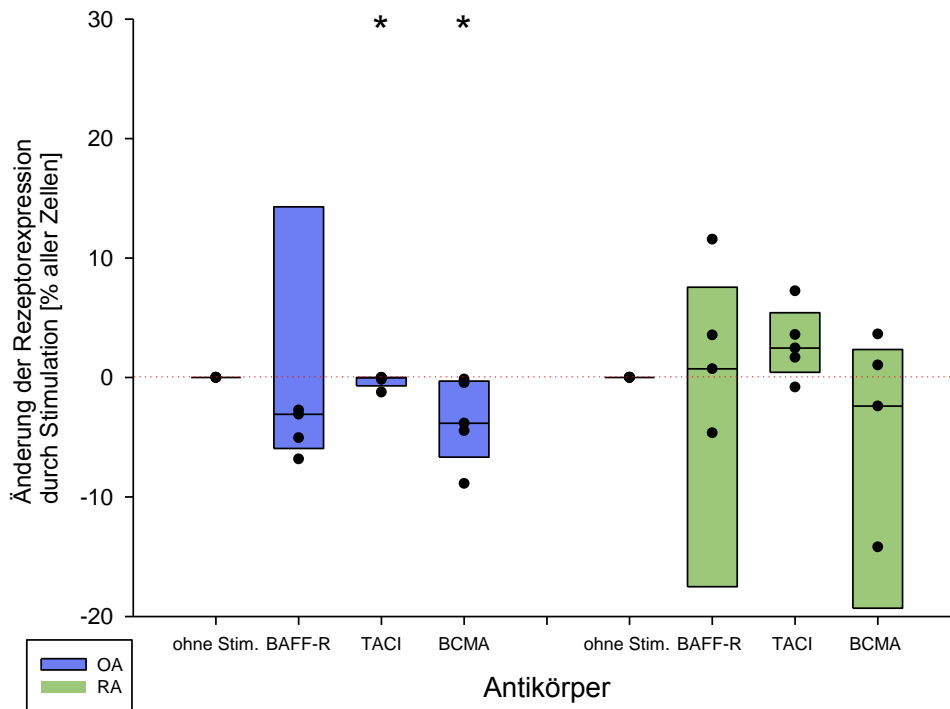


Abbildung 16: Expression der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA auf synovialen Fibroblasten von Patienten mit OA und RA vor und nach Stimulation mit CpG. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 25., 50. und 75. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Vor der Analyse wurden die Zellen der Versuchsgruppe 72 Stunden mit CpG, die Zellen der Kontrollgruppe in einfachem Medium inkubiert. Die Rezeptorexpression wurde mittels Durchflusszytometrie und nachfolgender Overton-Analyse auf SF von Patienten mit OA (n=5) und RA (n=5) bestimmt. Vor der statistischen Testung erfolgte für jeden Patienten jeweils die Standardisierung auf die Rezeptorexpression ohne Stimulation (rote Linie). * = $p < 0,05$. Signifikanzen sind im Vergleich zur Rezeptorexpression ohne Stimulation angegeben.

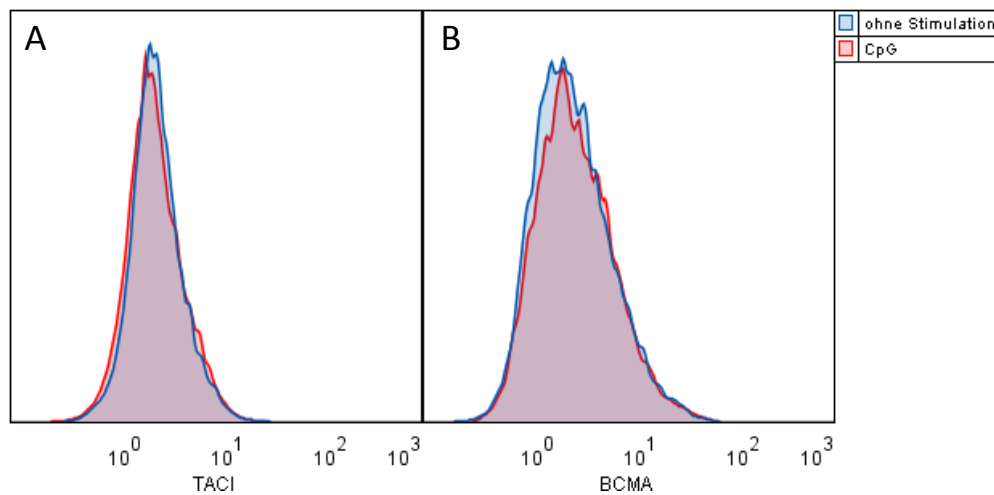


Abbildung 17: Histogramme zur Darstellung des Einflusses von CpG auf die TACI und BCMA-Expression bei OA-Patienten. Die Darstellung zeigt jeweils ein repräsentatives Overlay-Fluoreszenzhistogramm von insgesamt 5 OA-Patienten nach durchflusszytometrischer Bestimmung der TACI- (A) und BCMA-Expression (B) auf SF. Vor der Analyse wurden die Zellen der Versuchsgruppe 72 Stunden mit CpG (roter Graph), die Zellen der Kontrollgruppe in einfachem Medium (blauer Graph) inkubiert.

3.1.2.3 PMA

PMA als Aktivator der Proteinkinase C induziert bei SF unter anderem die Produktion von Kollagenasen. Ob sich PMA bei SF auch auf die Präsentation der Rezeptoren des BAFF/APRIL-Systems auswirkt, sollte in einem weiteren Versuch geklärt werden.

Nach Stimulation der SF von OA-Patienten mit PMA ließen sich keine signifikanten Änderungen der Expression von BAFF-R ($p=0,314$), TACI ($p=1,00$) und BCMA ($p=0,314$) feststellen (siehe Abbildung 18).

Mit PMA behandelte Zellen bei Patienten mit RA zeigten bei unbeeinflusstem TACI ($p=0,683$) und BCMA ($p=0,683$) eine Reduktion der BAFF-R-Expression ($p=0,008$) (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19).

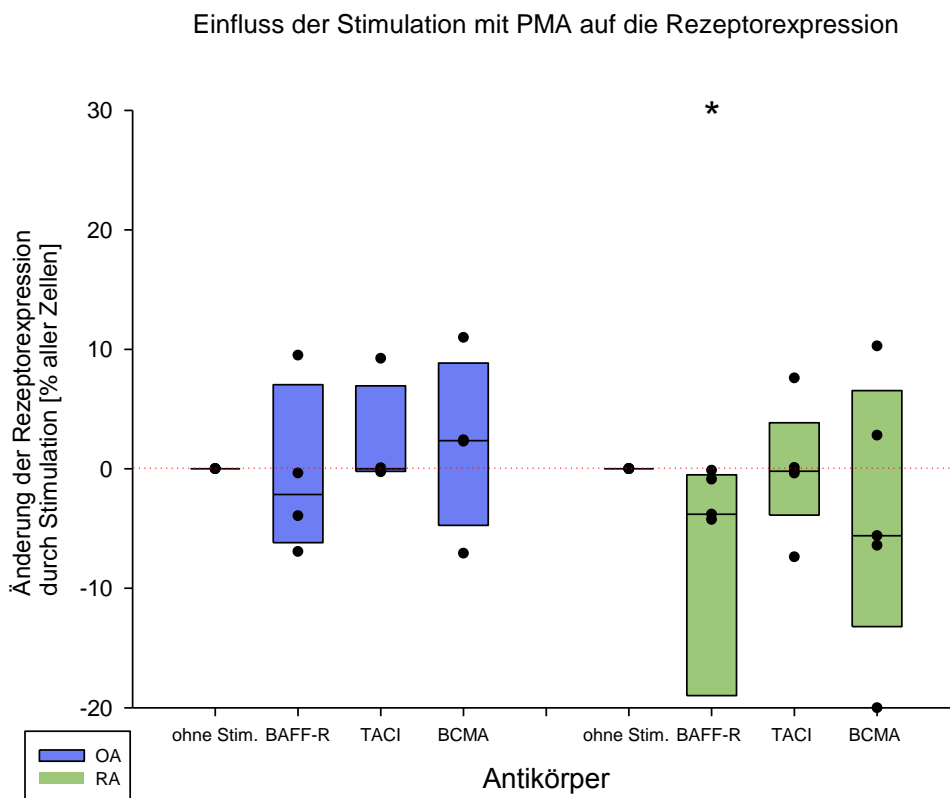


Abbildung 18: Expression der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA auf synovialen Fibroblasten von Patienten mit OA und RA vor und nach Stimulation mit PMA. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 25., 50. und 75. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Vor der Analyse wurden die Zellen der Versuchsgruppe 72 Stunden mit PMA, die Zellen der Kontrollgruppe in einfachem Medium inkubiert. Die Rezeptorexpression wurde mittels Durchflusszytometrie und nachfolgender Overton-Analyse auf SF von Patienten mit OA ($n=4$) und RA ($n=5$) bestimmt. Vor der statistischen Testung erfolgte für jeden Patienten jeweils die Standardisierung auf die Rezeptorexpression ohne Stimulation (rote Linie). * = $p<0,05$. Signifikanzen sind im Vergleich zur Rezeptorexpression ohne Stimulation angegeben.

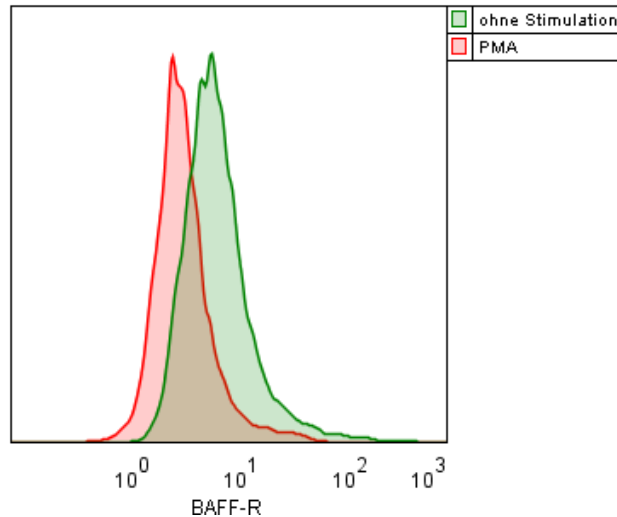


Abbildung 19: Histogramm zur Darstellung des Einflusses von PMA auf die BAFF-R-Expression bei RA-Patienten. Die Darstellung zeigt ein repräsentatives Overlay-Fluoreszenzhistogramm von insgesamt 5 RA-Patienten nach durchflusszytometrischer Bestimmung der BAFF-R-Expression (B) auf SF. Vor der Analyse wurden die Zellen der Versuchsgruppe 72 Stunden mit PMA (roter Graph), die Zellen der Kontrollgruppe in einfachem Medium (grüner Graph) inkubiert.

3.1.2.4 BAFF

Im Synovialgewebe von RA-Patienten wurden erhöhte BAFF-Spiegel festgestellt, wobei BAFF zum Teil durch SF selbst produziert wird^{190 192 209}. Denkbar ist daher auch eine Regulation der Rezeptorexpression durch den Liganden selbst, was im Folgenden untersucht wurde.

Eine Autostimulation mit BAFF führte bei OA-Patienten zu einer Zunahme der Expression des BAFF-R ($p=0,048$) und TACI ($p=0,002$). BCMA wurde hingegen nicht beeinflusst ($p=0,364$) (siehe Abbildung 20 und Abbildung 21).

Auch bei RA-Patienten konnte man nach Behandlung mit BAFF eine leichte, jedoch nicht signifikante Steigerung der BAFF-R- ($p=0,127$) und der TACI-Expression ($p=0,127$) beobachten. Die Zunahme der Expression zeigte sich dabei jeweils bei vier von fünf untersuchten Patienten. BCMA blieb von dieser Stimulation hingegen unbeeinflusst ($p=0,683$) (siehe Abbildung 20).

Einfluss der Stimulation mit BAFF auf die Rezeptorexpression

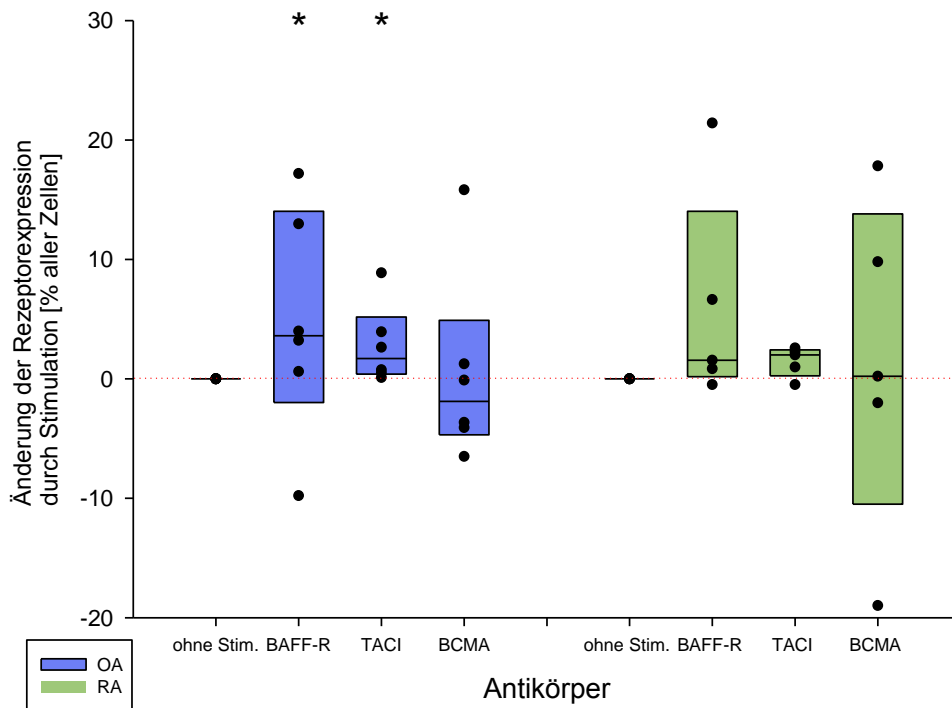


Abbildung 20: Expression der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA auf synovialen Fibroblasten von Patienten mit OA und RA vor und nach Stimulation mit BAFF. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 25., 50. und 75. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Vor der Analyse wurden die Zellen der Versuchsgruppe 72 Stunden mit BAFF, die Zellen der Kontrollgruppe in einfachem Medium inkubiert. Die Rezeptorexpression wurde mittels Durchflusszytometrie und nachfolgender Overton-Analyse auf SF von Patienten mit OA (n=6) und RA (n=5) bestimmt. Vor der statistischen Testung erfolgte für jeden Patienten jeweils die Standardisierung auf die Rezeptorexpression ohne Stimulation (rote Linie). * = $p < 0,05$. Signifikanzen sind im Vergleich zur Rezeptorexpression ohne Stimulation angegeben.

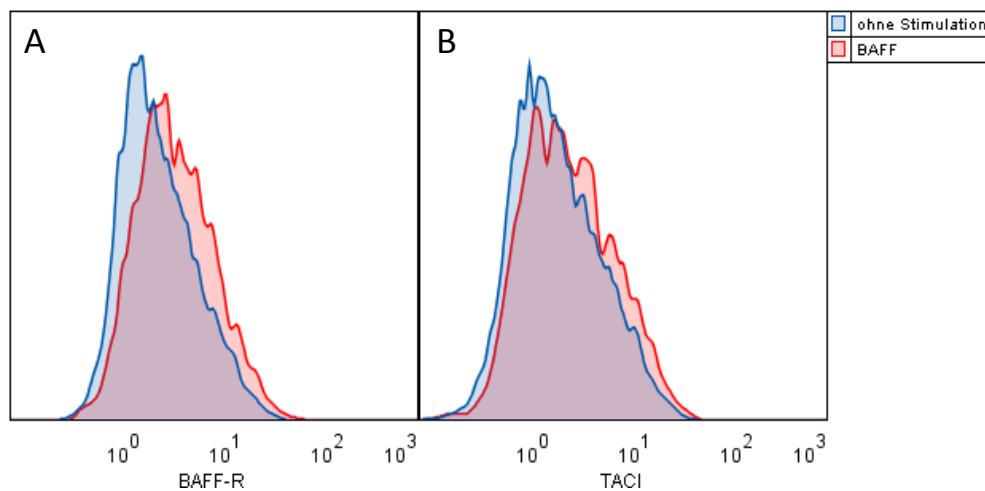


Abbildung 21: Histogramme zur Darstellung des Einflusses von BAFF auf die BAFF-R- und TACI-Expression bei OA-Patienten. Die Darstellung zeigt jeweils ein repräsentatives Overlay-Fluoreszenzhistogramm von insgesamt 6 OA-Patienten nach durchflusszytometrischer Bestimmung der BAFF-R- (A) und TACI-Expression (B) auf SF. Vor der Analyse wurden die Zellen der Versuchsgruppe 72 Stunden mit BAFF (roter Graph), die Zellen der Kontrollgruppe in einfachem Medium (blauer Graph) inkubiert.

3.2 Immunhistochemische Untersuchung der Expression von BAFF-R, TACI und BCMA auf synovialen Fibroblasten

Zur Überprüfung der Ergebnisse aus der FACS-Untersuchung wurden SF von Patienten mit OA und RA zum Teil immunhistochemisch auf die Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass alle drei Rezeptoren in wechselnder Ausprägung sowohl auf Zellen von OA-Patienten, als auch auf Zellen von RA-Patienten exprimiert werden. Insgesamt konnten TACI und BCMA häufig nachgewiesen werden. BAFF-R war nur bei einzelnen Patienten vorhanden. Im Folgenden ist dies für je einen OA- und einen RA-Patienten exemplarisch veranschaulicht (siehe Abbildungen 22 und 23).

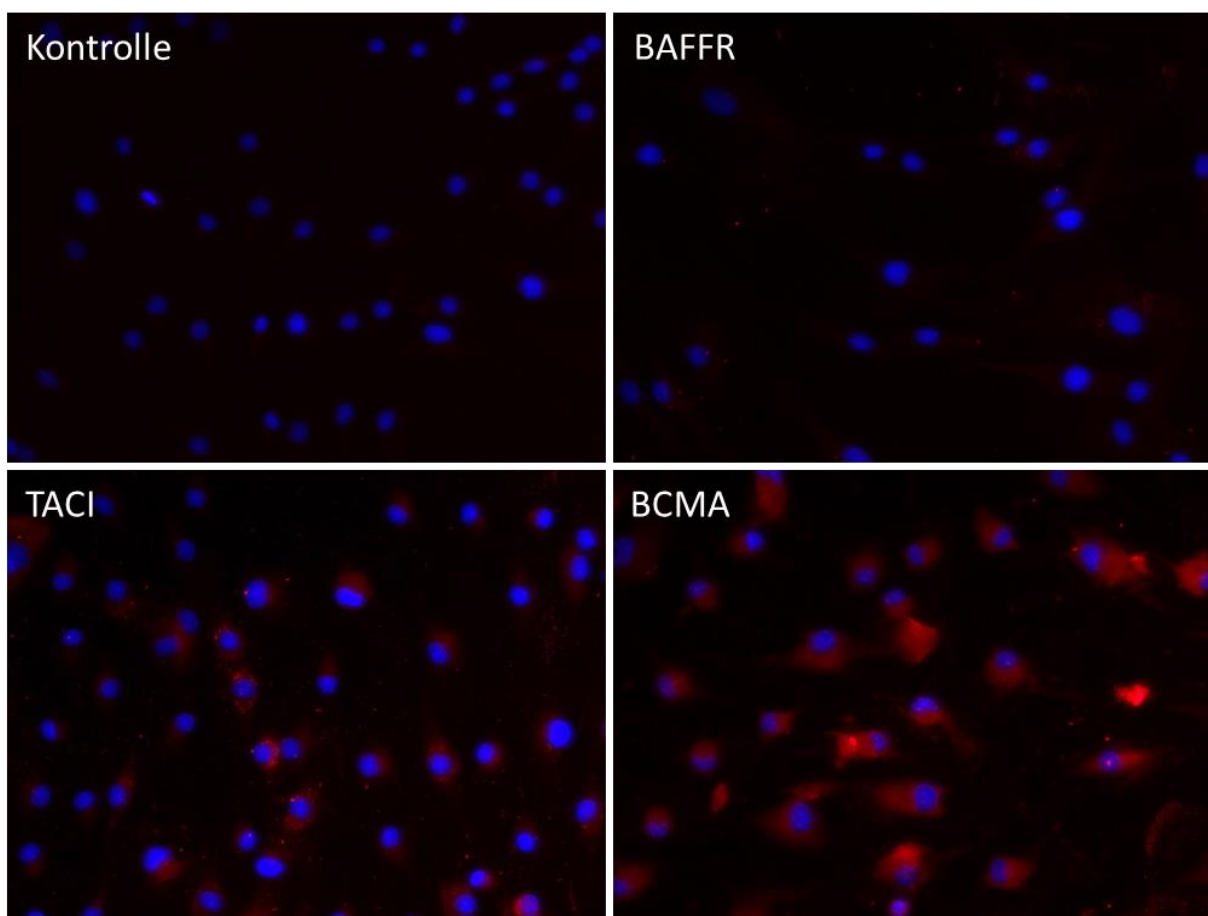


Abbildung 22: Expression von TACI und BCMA auf SF eines RA-Patienten (RA331). Dargestellt sind immunhistochemische Aufnahmen zur Untersuchung der Expression von BAFF-R, TACI und BCMA auf SF eines RA-Patienten. Zur Vorbereitung wurden die Zellen mit Antikörpern gegen BAFF-R, TACI und BCMA sowie mit Kaninchen-Immunglobulinen (Kontrolle) inkubiert und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper angefärbt. Bei diesem Patienten ließen sich TACI und BCMA nachweisen, BAFF-R befand sich nur auf vereinzelt Zellen.

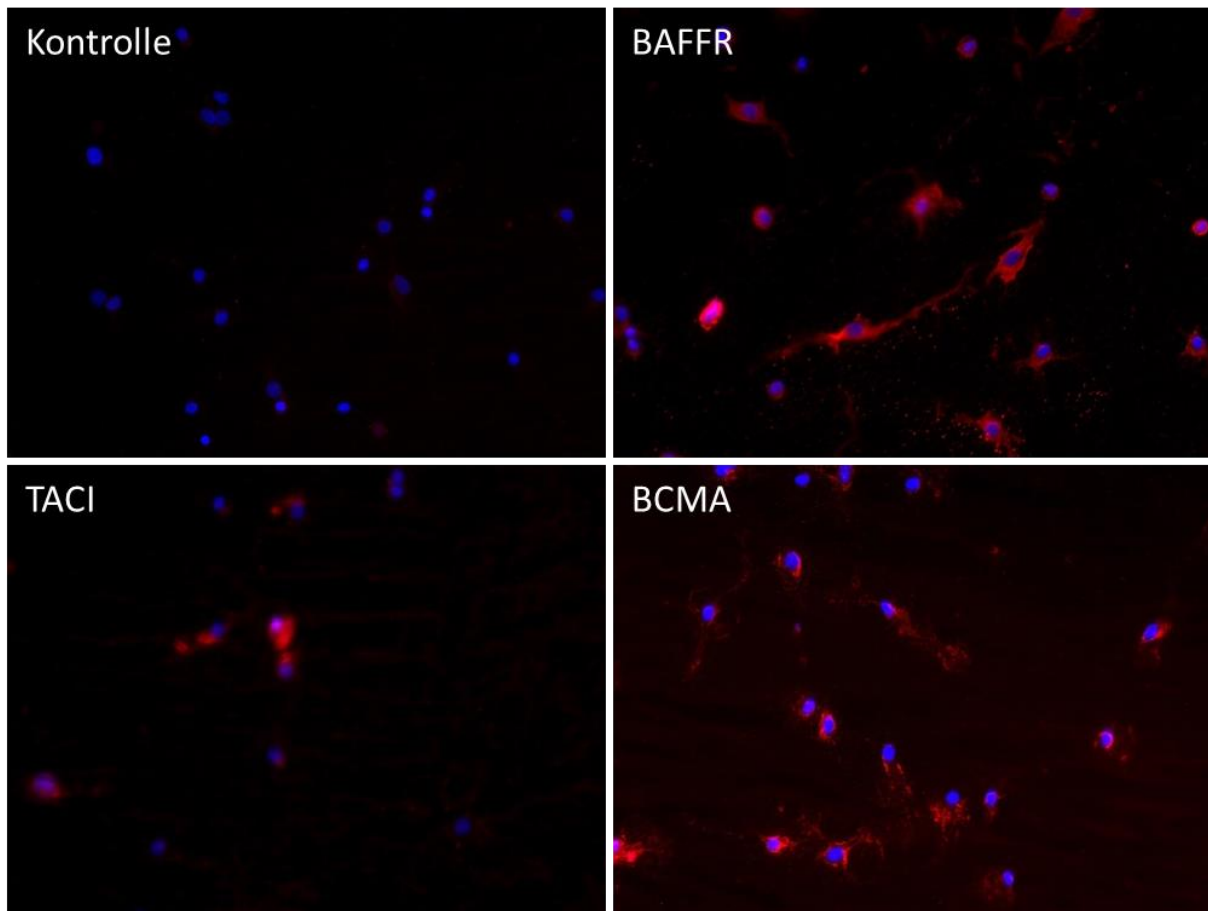


Abbildung 23: Expression von BAFF-R, TACI und BCMA auf SF eines OA-Patienten (OA628). Dargestellt sind immunhistochemische Aufnahmen zur Untersuchung der Expression von BAFF-R, TACI und BCMA auf SF eines OA-Patienten. Zur Vorbereitung wurden die Zellen mit Antikörpern gegen BAFF-R, TACI und BCMA sowie mit Kaninchen-Immunglobulinen (Kontrolle) inkubiert und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper angefärbt. Bei diesem Patienten ließen sich BAFF-R, TACI und BCMA nachweisen.

Somit konnte insbesondere der per FACS-Analyse erfolgte Nachweis der Rezeptoren TACI und BCMA auf RA und OA bestätigt werden. Auch der BAFF-R, dessen Expression in der FACS-Untersuchung nur bei einigen Patienten nachgewiesen wurde, konnte mittels Immunhistochemie bestätigt werden.

Auch der Einfluss von IL-1, IFN- γ und CpG wurde mittels Immunhistochemie für einige Patienten untersucht. Dabei konnten bei mehreren Patienten deutliche Veränderungen in Bezug auf die Expressionsrate der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA festgestellt werden. Im Folgenden ist zu jeder Stimulation je ein Beispiel abgebildet (siehe Abbildungen 24, 25 und 26):

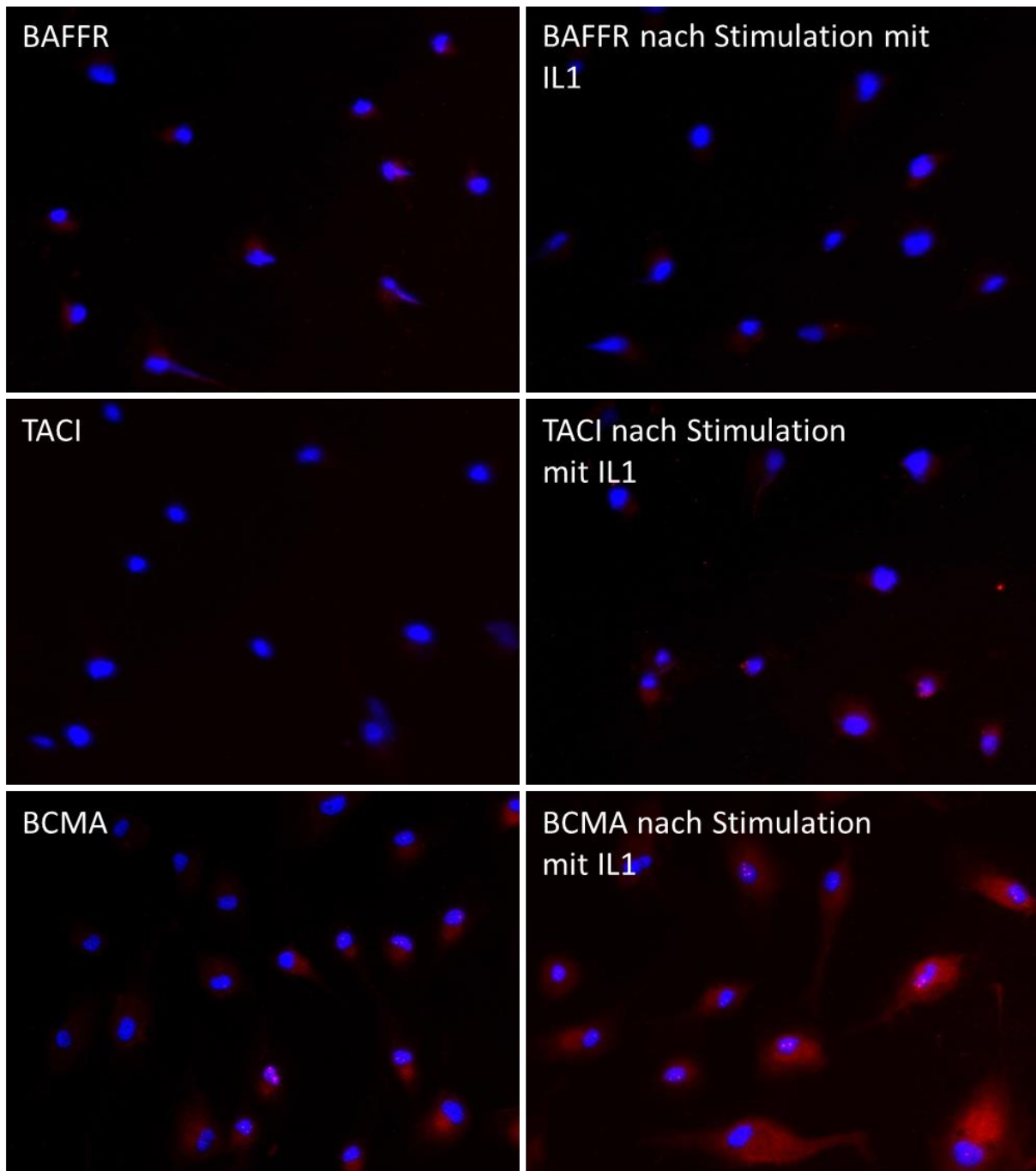


Abbildung 24: Steigerung der Expression von TACI und BCMA auf SF eines RA-Patienten (RA329) durch Stimulation mit IL-1. Dargestellt sind immunhistochemische Aufnahmen zur Untersuchung der Expression von BAFF-R, TACI und BCMA auf SF eines RA-Patienten. Die Zellen der Versuchsgruppe wurden 72 Stunden lang mit IL-1, die Zellen der Kontrollgruppe in einfachem Medium inkubiert. Zur Vorbereitung wurden die Zellen mit Antikörpern gegen BAFF-R, TACI und BCMA inkubiert und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper angefärbt. Durch die Behandlung waren bei diesem Patienten eine leichte Steigerung der TACI-Expression sowie eine deutliche Steigerung der BCMA-Expression zu beobachten.

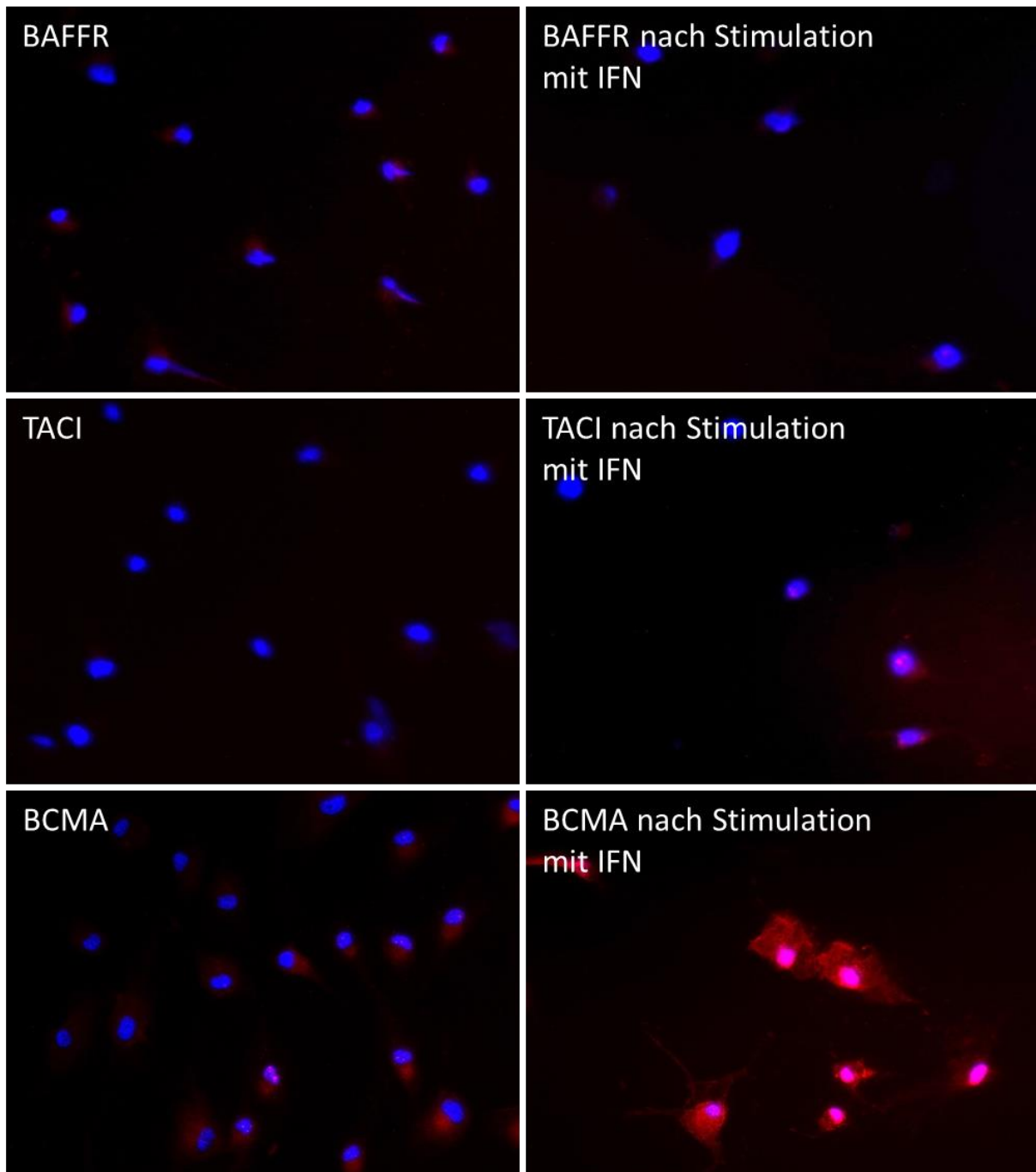


Abbildung 25: Steigerung der Expression von TACI und BCMA auf SF eines RA-Patienten (RA329) durch Stimulation mit IFN- γ . Dargestellt sind immunhistochemische Aufnahmen zur Untersuchung der Expression von BAFF-R, TACI und BCMA auf SF eines RA-Patienten. Die Zellen der Versuchsgruppe 72 wurden Stunden lang mit IFN- γ , die Zellen der Kontrollgruppe in einfachem Medium inkubiert. Zur Vorbereitung wurden die Zellen mit Antikörpern gegen BAFF-R, TACI und BCMA inkubiert und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper angefärbt. Bei diesem Patienten war eine diskrete Verminderung der BAFF-R-, eine leichte Steigerung der TACI- und deutliche Steigerung der BCMA-Expression zu beobachten.

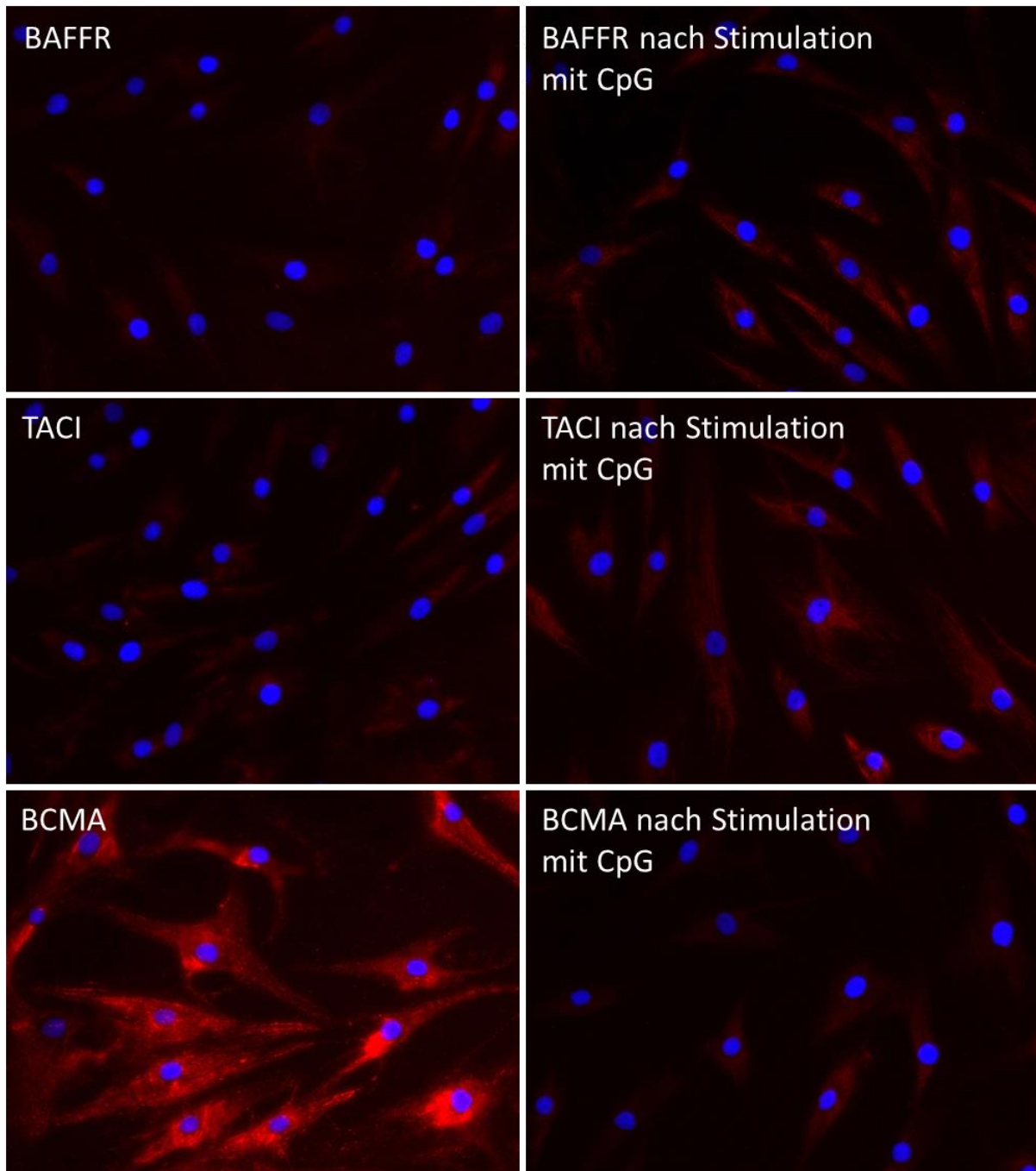


Abbildung 26: Reduktion der Expression von BCMA auf SF eines OA-Patienten (OA723) durch Stimulation mit CpG. Dargestellt sind immunhistochemische Aufnahmen zur Untersuchung der Expression von BAFF-R, TACI und BCMA auf SF eines OA-Patienten. Die Zellen der Versuchsgruppe wurden 72 Stunden lang mit CpG, die Zellen der Kontrollgruppe in einfachem Medium inkubiert. Zur Vorbereitung wurden die Zellen mit Antikörpern gegen BAFF-R, TACI und BCMA inkubiert und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper angefärbt. Bei diesem Patienten war durch die Behandlung eine deutliche Reduktion der BCMA-Expression zu beobachten.

Durch die immunhistochemischen Färbungen konnten somit die Ergebnisse der FACS-Untersuchung im Wesentlichen gestützt werden.

3.3 Untersuchung des Einflusses von BAFF auf die Apoptoserate synovialer Fibroblasten

Die Auswirkungen von BAFF wurden bisher vor allem bei Lymphozyten und bei diesen insbesondere bei B-Zellen gut untersucht. Hierbei erfüllt das Zytokin eine Vielzahl von Funktionen, wobei eine der wichtigsten und am besten untersuchten die antiapoptotische Wirkung auf B-Lymphozyten ist^{138 119 139}. Für SF wurden die Auswirkungen einer BAFF-Stimulation bislang nur unzureichend untersucht. Aufgrund der gut beschriebenen Schlüsselrolle von BAFF als überlebensförderndes Zytokin bei B-Zellen sollte in den folgenden Versuchen untersucht werden, ob sich eine BAFF-Stimulation auch positiv auf das Überleben von SF auswirkt.

3.3.1 Abhängigkeit der Apoptoserate von der Konzentration des verwendeten BAFF-Standards

Zunächst sollte die Abhängigkeit der Apoptoserate von der BAFF-Konzentration bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen von insgesamt 7 Patienten mit RA und 6 Patienten mit OA wie in 2.2.5.1 beschrieben behandelt und anschließend mit Hilfe des Annexin-Apoptose-Kits die Apoptoserate bestimmt.

Dabei fiel insbesondere bei OA-Patienten nach Stimulation mit einem BAFF-Standard bereits lichtmikroskopisch eine Ablösung der Fibroblasten von der Zellkulturflasche auf (siehe Abbildung 27).

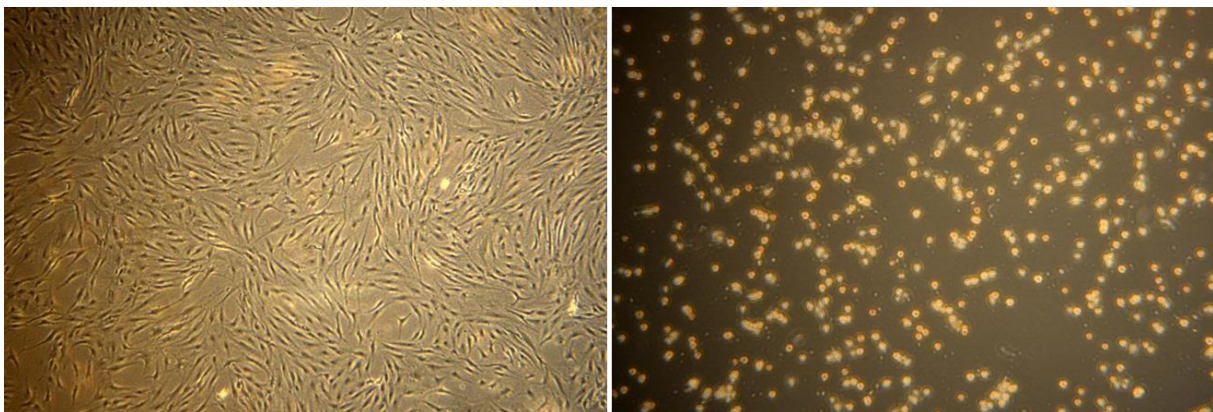


Abbildung 27: Ablösung synovialer Fibroblasten eines OA-Patienten von der Zellkulturflasche nach Inkubation mit BAFF-Standard. Lichtmikroskopische Aufnahmen der SF eines OA-Patienten in Zellkulturflaschen. Die linke Aufnahme wurde 48 Stunden nach einem Mediumwechsel aufgenommen, die rechte Aufnahme nach Inkubation mit 1 ng/ml eines BAFF-Standards über 48 Stunden. Deutlich erkennbar ist dabei eine Ablösung der Zellen von der Kulturflasche.

3.3.1.1 Frühapoptose

Der Anteil frühapoptotischer Zellen nahm bei OA- und RA-Patienten durch Inkubation mit BAFF zu und war für OA bei 0,01 ng/ml BAFF ($p=0,013$) sowie für RA bei 1 ng/ml BAFF ($p=0,043$) signifikant höher als bei unbehandelten Zellen. Bei den BAFF-Konzentrationen 0,1, 0,5 und 1 ng/ml lag die Apoptoserate bei RA-Patienten höher als bei entsprechenden OA-Patienten (siehe Abbildung 28). In der ANOVA war dieser Unterschied jedoch lediglich bei 1 ng/ml signifikant ($p=0,025$) (siehe Abbildung 28).

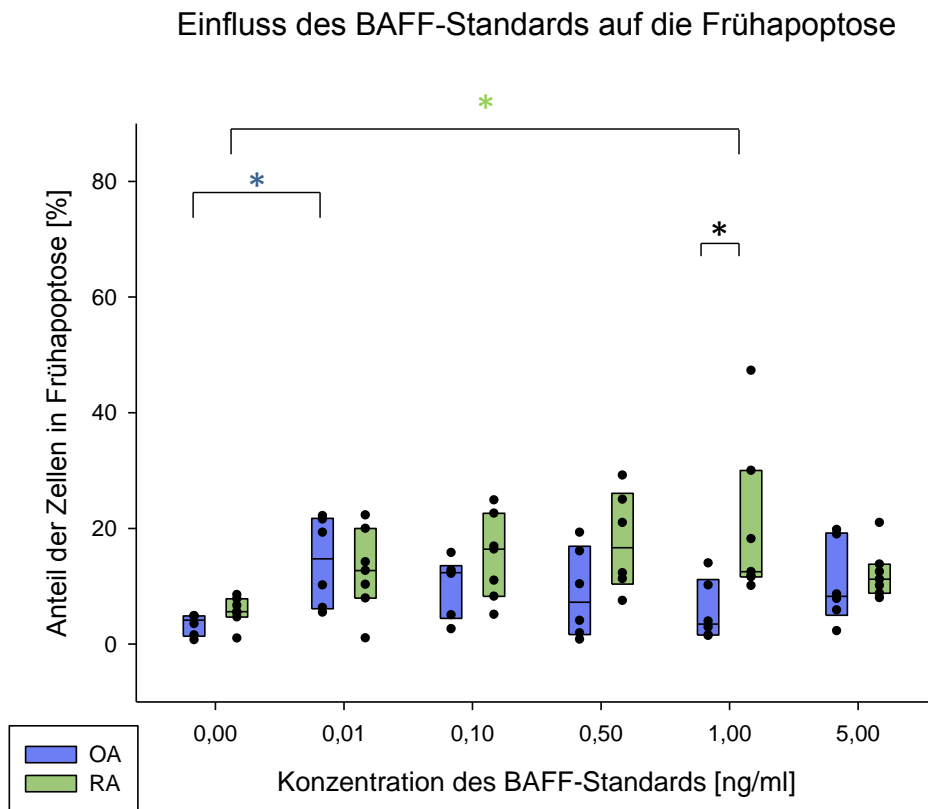


Abbildung 28: Anteil der Zellen in der Frühapoptose nach Stimulation synovialer Fibroblasten von Patienten mit OA und RA mit verschiedenen Konzentrationen des BAFF-Standards. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 25., 50. und 75. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Vor der Analyse wurden die Zellen 48 Stunden lang mit BAFF-Standard verschiedener Konzentrationen inkubiert. Die Apoptose wurde mittels Durchflusszytometrie auf SF von Patienten mit OA ($n=6$) und RA ($n=7$) bestimmt. * = $p<0,05$.

3.3.1.2 Spätapoptose

Bei OA-Patienten ergab sich insbesondere bei mittleren BAFF-Konzentrationen ein Trend zur Erhöhung des Anteils spätapoptotischer Zellen ($p=0,089$). Bei RA-Patienten blieb er weitestgehend konstant ($p=0,298$) (siehe Abbildung 29). Bei 0,1 ng/ml befanden sich signifikant mehr Zellen von OA-Patienten in Spätapoptose als bei entsprechenden RA-Patienten ($p=0,048$) (siehe Abbildung 29).

Einfluss des BAFF-Standards auf die Spätapoptose

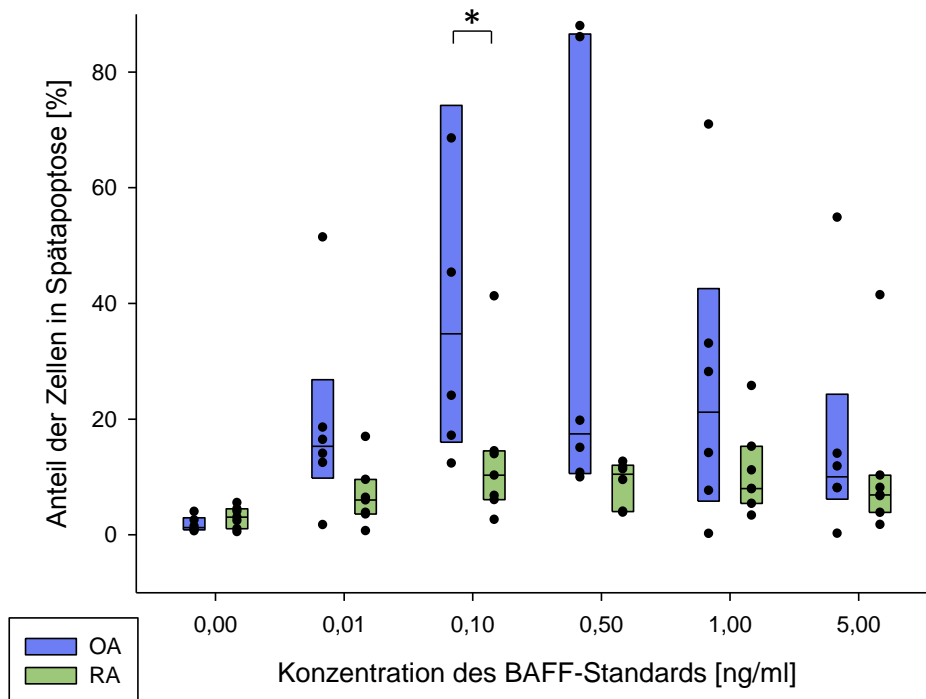


Abbildung 29: Anteil der Zellen in der Spätapoptose nach Stimulation synovialer Fibroblasten von Patienten mit OA und RA mit verschiedenen Konzentrationen des BAFF-Standards. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 25., 50. und 75. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Vor der Analyse wurden die Zellen 48 Stunden lang mit BAFF-Standard verschiedener Konzentrationen inkubiert. Die Apoptose wurde mittels Durchflusszytometrie auf SF von Patienten mit OA (n=6) und RA (n=7) bestimmt. * = $p < 0,05$.

3.3.1.3 Nekrose

Der Anteil rein nekrotischer Zellen veränderte sich unter Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen des BAFF-Standards nicht und es fielen keine Unterschiede zwischen OA- und RA-Patienten auf (siehe Abbildung 30).

Einfluss des BAFF-Standards auf die Nekrose

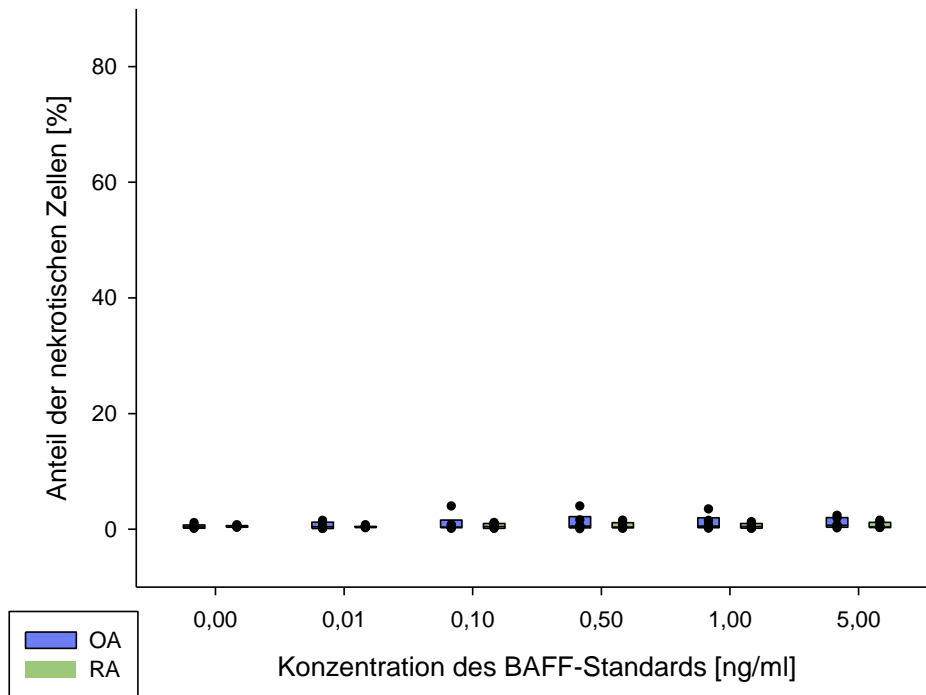


Abbildung 30: Anteil der nekrotischen Zellen nach Stimulation synovialer Fibroblasten von Patienten mit OA und RA mit verschiedenen Konzentrationen des BAFF-Standards. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 25., 50. und 75. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Vor der Analyse wurden die Zellen 48 Stunden lang mit BAFF-Standard verschiedener Konzentrationen inkubiert. Die Nekroserate wurde mittels Durchflusszytometrie auf SF von Patienten mit OA (n=6) und RA (n=7) bestimmt. * = $p < 0,05$.

3.3.1.4 Gesamtpoptose

Durch Zugabe des BAFF-Standards zeigte sich eine Zunahme der Gesamtpoptoserate sowohl bei OA- als auch bei RA-Patienten. Die Stärke des Anstiegs war dabei individuell unterschiedlich stark ausgeprägt und konzentrationsabhängig. Darüber hinaus fiel bei OA-Patienten bei Einsatz der Konzentrationen 0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml und 0,5 ng/ml eine stärkere Zunahme der Apoptose auf als bei RA-Patienten unter gleichen Stimulationsbedingungen. Die statistische Testung ergab für OA- ($p=0,046$) und RA-Patienten ($p=0,043$) jeweils signifikante Steigerungen des Anteils apoptotischer Zellen. Die beobachteten Unterschiede zwischen OA und RA waren für die verschiedenen Konzentrationen jeweils nicht signifikant (siehe Abbildung 31).

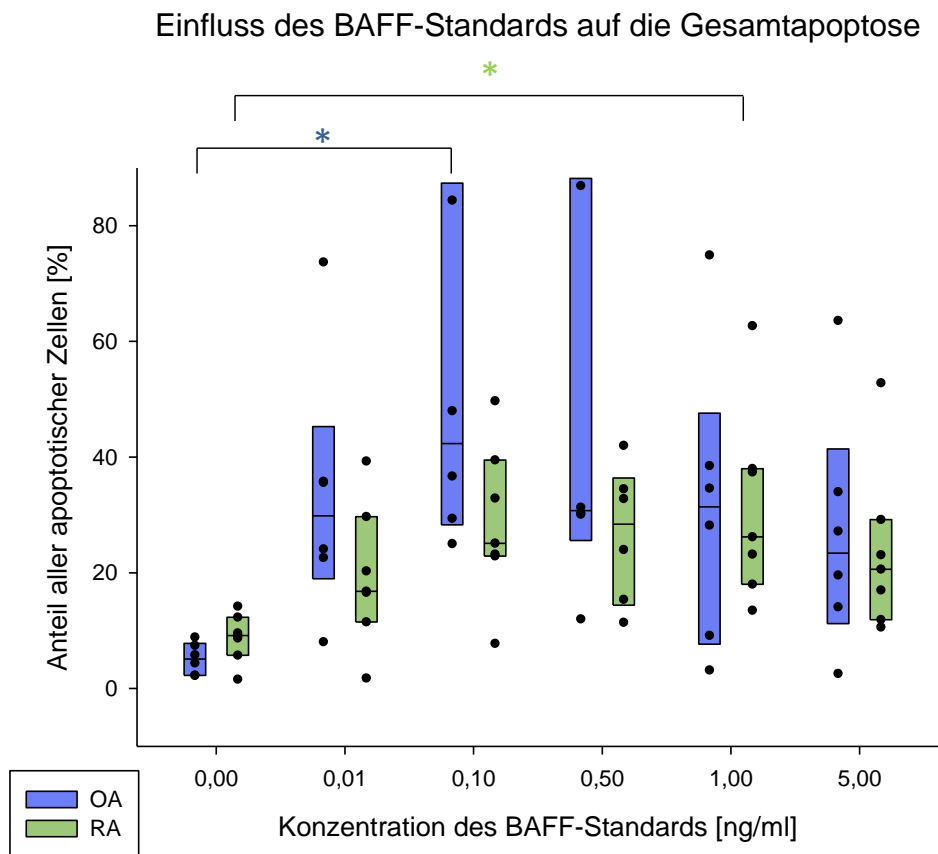


Abbildung 31: Anteil der Zellen in Früh- oder Spätapoptose nach Stimulation synovialer Fibroblasten von Patienten mit OA und RA mit verschiedenen Konzentrationen des BAFF-Standards. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 25., 50. und 75. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Vor der Analyse wurden die Zellen 48 Stunden lang mit BAFF-Standard verschiedener Konzentrationen inkubiert. Die Apoptose wurde mittels Durchflusszytometrie auf SF von Patienten mit OA ($n=6$) und RA ($n=7$) bestimmt. * = $p < 0,05$.

3.3.2 Untersuchung der selektiven Blockade von BAFF-R, TACI und BCMA unter Stimulation mit BAFF-Standard

Eine mögliche Erklärung für die im letzten Versuch festgestellte Induktion der Apoptose wäre die BAFF-vermittelte Aktivierung eines seiner Rezeptoren. In einem weiteren Versuch sollte daher untersucht werden, ob sich die oben für SF beschriebene proapoptische Wirkung des BAFF-Standards unter Blockade jeweils eines der drei bekannten Rezeptoren des BAFF/APRIL-Systems verhindern lässt. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse für jeden Antikörper nach BAFF-Stimulation jeweils auf die Werte ohne Stimulation mit BAFF standardisiert.

In diesem Versuch zeigte sich bei OA-Patienten unter Stimulation mit 0,1 ng/ml und 1 ng/ml BAFF keine signifikante Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen. Nach Stimulation mit 5 ng/ml BAFF war die Steigerung hingegen signifikant ($p=0,034$) (siehe Abbildung 32), weshalb nachfolgend der Einfluss der Antikörper für diese Konzentration näher beschrieben wird.

Einfluss des BAFF-Standards auf die Apoptose bei OA-Patienten

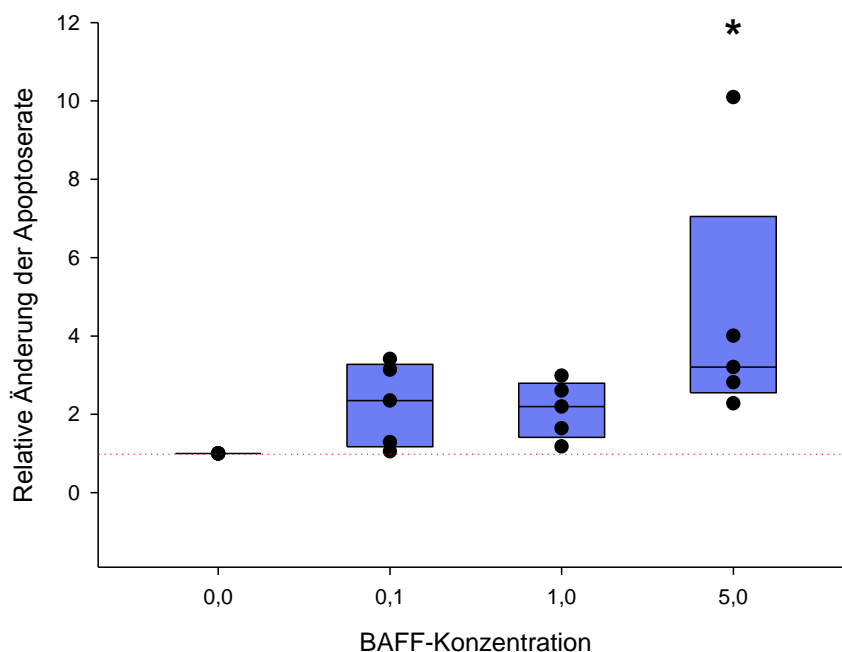


Abbildung 32: Einfluss verschiedener Konzentrationen des BAFF-Standards auf die Apoptoserate von OA-Patienten ohne Zugabe weiterer Antikörper. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 25., 50. und 75. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Vor der Analyse wurden die Zellen 48 Stunden lang mit BAFF-Standard verschiedener Konzentrationen inkubiert. Die Apoptose wurde mittels Durchflusszytometrie auf SF von 5 OA-Patienten bestimmt. Zur Analyse wurden die Ergebnisse jeweils auf die Werte ohne BAFF-Stimulation standardisiert (rote Linie). * = $p < 0,05$. Signifikanzen sind im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen angegeben.

In der ANOVA mit post-hoc-Bonferroni-Test fanden sich durch Stimulation mit 5 ng/ml BAFF im Vergleich zu 0 ng/ml außerdem signifikante Steigerungen der Gesamtapoptoserate trotz Zugabe des Antikörpers gegen BCMA ($p=0,045$) und der Isotyp-Kontrolle ($p=0,023$). Keine signifikante Veränderung zeigte sich unter Verwendung der Antikörper gegen BAFF-R ($p=0,064$), TACI ($p=0,518$) und lösliches BAFF ($p=0,071$) (siehe Abbildung 33).

Hemmung der BAFF-Wirkung mittels verschiedener Antikörper (OA)

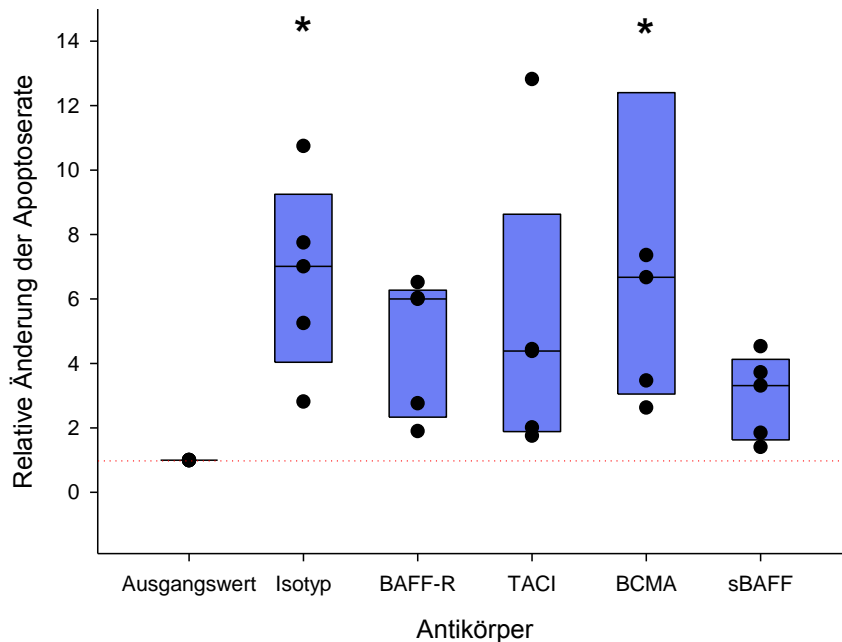


Abbildung 33: Relative Änderung des Anteils apoptotischer Zellen nach Stimulation synovialer Fibroblasten von OA-Patienten mit einem BAFF-Standard unter Zugabe hemmender Antikörper im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 25., 50. und 75. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Zur Vorbereitung der Proben wurden jeweils gegen BAFF-R, TACI, BCMA oder lösliches BAFF gerichtete Antikörper zugegeben und die Zellen 48 Stunden lang in einfachem Medium (Ausgangswert) oder mit 5 ng/ml BAFF-Standard inkubiert. Als Kontrolle diente Goat IgG. Die Apoptoserate so behandelter Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie auf SF von 5 OA-Patienten bestimmt. Zur Analyse wurden die Ergebnisse für jeden Antikörper jeweils auf Werte ohne BAFF-Stimulation standardisiert (rote Linie). * = $p<0,05$. Signifikanzen sind jeweils im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen (Ausgangswert) angegeben.

Eine signifikante Verringerung der Apoptoserate bei 5 ng/ml nach Standardisierung auf die Isotyp-Kontrolle war jedoch durch keinen der verwendeten Antikörper festzustellen. Die Einzelwerte waren jedoch in den meisten Fällen geringer als die der jeweiligen Isotyp-Kontrolle.

Auch bei den RA-Patienten ergaben sich in dieser Versuchsreihe nach Stimulation mit 0,1 ng/ml und 1 ng/ml BAFF keine wesentlichen Änderungen der Apoptoserate. Bei einer Konzentration von 5 ng/ml ließ sich eine Zunahme der Apoptoserate beobachten ($p=0,003$) (siehe Abbildung 34), weshalb sich die folgenden Ausführungen auf diese Konzentration beziehen.

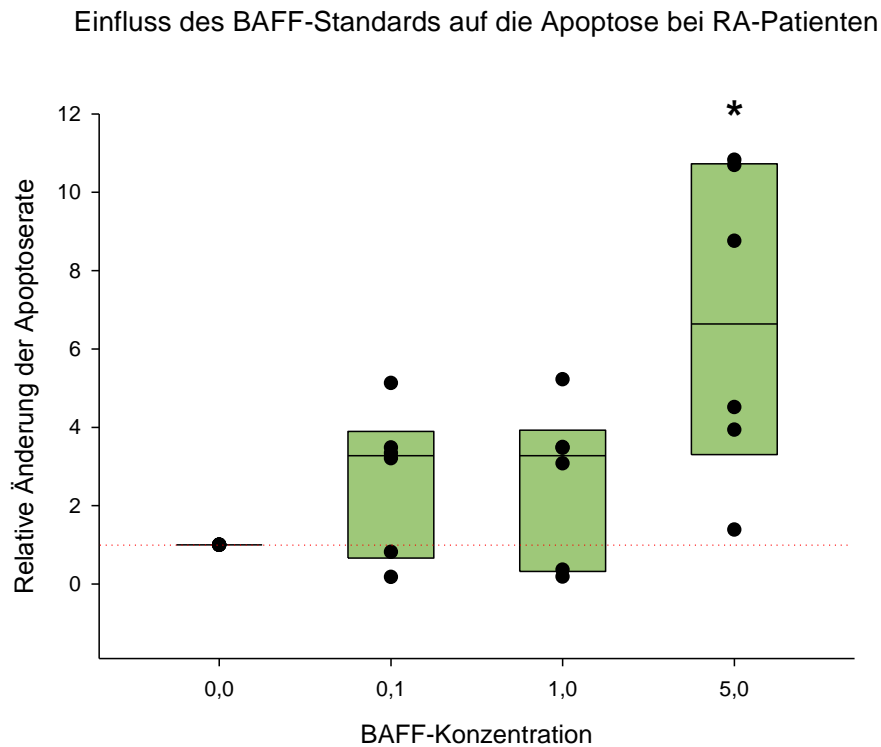


Abbildung 34: Einfluss verschiedener Konzentrationen des BAFF-Standards auf die Apoptoserate von RA-Patienten ohne Zugabe weiterer Antikörper. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 25., 50. und 75. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Vor der Analyse wurden die Zellen 48 Stunden lang mit BAFF-Standard verschiedener Konzentrationen inkubiert. Die Apoptose wurde mittels Durchflusszytometrie auf SF von 6 RA-Patienten bestimmt. Zur Analyse wurden die Ergebnisse jeweils auf die Werte ohne BAFF-Stimulation standardisiert (rote Linie). * = $p<0,05$. Signifikanzen sind im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen angegeben.

Die Apoptosesteigerung bei 5 ng/ml war in der ANOVA mit Post-hoc-Bonferroni-Test im Vergleich zu 0 ng/ml BAFF auch nach Zugabe der Isotyp-Kontrolle ($p=0,000$) sowie der Antikörper gegen TACI ($p=0,004$) und BCMA ($p=0,001$) signifikant. Keine signifikanten Veränderungen ergaben sich nach der Behandlung mit Antikörpern gegen BAFF-R ($p=0,052$) und lösliches BAFF ($p=0,099$) (siehe Abbildung 35).

Hemmung der BAFF-Wirkung mittels verschiedener Antikörper (RA)

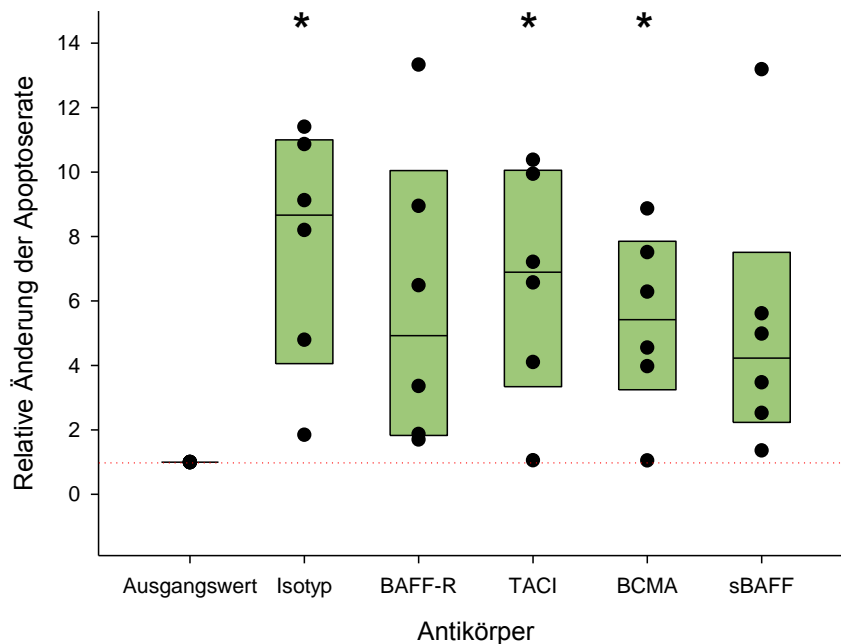


Abbildung 35: Relative Änderung des Anteils apoptotischer Zellen nach Stimulation synovialer Fibroblasten von RA-Patienten mit einem BAFF-Standard unter Zugabe hemmender Antikörper im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 25., 50. und 75. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Zur Vorbereitung der Proben wurden jeweils gegen BAFF-R, TACI, BCMA oder lösliches BAFF gerichtete Antikörper zugegeben und die Zellen 48 Stunden lang in einfachem Medium (Ausgangswert) oder mit 5 ng/ml BAFF-Standard inkubiert. Als Kontrolle diente Goat IgG. Die Apoptoserate so behandelter Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie auf SF von 6 RA-Patienten bestimmt. Zur Analyse wurden die Ergebnisse für jeden Antikörper jeweils auf Werte ohne BAFF-Stimulation standardisiert (rote Linie). * = $p < 0,05$. Signifikanzen sind jeweils im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen (Ausgangswert) angegeben.

Auch bei RA-Patienten ergab sich bei einer Konzentration von 5 ng/ml BAFF nach Standardisierung auf die Isotyp-Kontrolle durch keinen Antikörper eine signifikante Reduktion der Apoptoserate. Wie bei OA liegen die Einzelwerte in den meisten Fällen niedriger als die der jeweiligen Isotyp-Kontrolle.

3.3.3 Untersuchung der Wirkung von rekombinantem BAFF auf die Apoptoserate mit und ohne Blockade des BCMA

In dem für die Versuche verwendeten BAFF-Standard sind weitere Substanzen wie Konservierungsmittel und ein Protein-basierter Puffer enthalten²⁴⁹. Nicht auszuschließen ist daher, dass eine dieser Substanzen für den Zelltod der SF verantwortlich ist. Deshalb sollte in einem weiteren Versuch untersucht werden, ob auch eine Stimulation mit für Zellkulturen entwickeltem rekombinantem BAFF zu einer Erhöhung der Apoptoserate bei SF führt.

Mit zunehmender BAFF-Konzentration konnte man bei den RA-Patienten einen leichten Anstieg der Gesamtapoptoserate um 2,7 % beobachten. Dieser war bei der höchsten Konzentration 15 ng/ml am deutlichsten erkennbar, statistisch zeigte sich jedoch nur ein Trend ($p=0,082$) im Vergleich zu 0 ng/ml. Bei den OA-Patienten ließ sich durch steigende BAFF-Konzentrationen keine wesentliche Änderung erkennen. Bei 15 ng/ml war der Anteil apoptotischer Zellen bei RA-Patienten signifikant höher als bei gleich behandelten OA-Patienten ($p=0,017$) (siehe Abbildung 36).

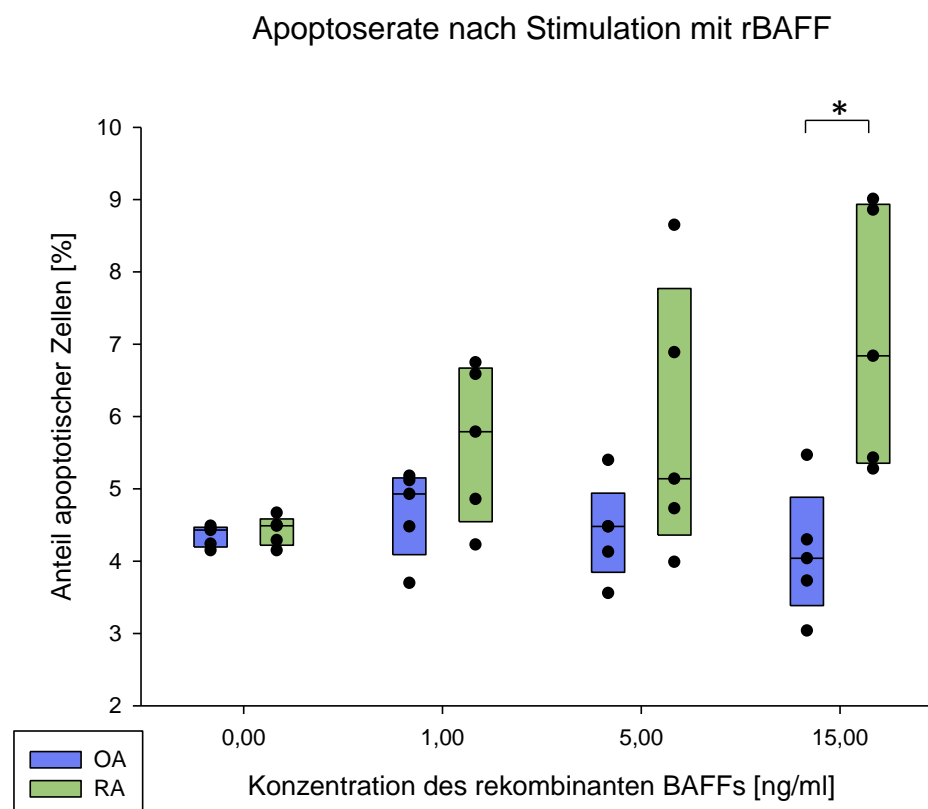


Abbildung 36: Anteil der apoptotischen Zellen nach Stimulation synovialer Fibroblasten von OA- und RA-Patienten mit verschiedenen Konzentrationen eines für Zellkulturen hergestellten, rekombinanten BAFF. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 25., 50. und 75. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Vor der Analyse wurden die Zellen 48 Stunden lang mit rekombinantem BAFF verschiedener Konzentrationen inkubiert. Die Apoptose wurde mittels Durchflusszytometrie und nachfolgender Overton-Analyse auf SF von je 5 OA- und 5 RA-Patienten bestimmt. * = $p<0,05$.

Weiter oben wurde bereits beschrieben, dass BCMA der am häufigsten exprimierte Rezeptor des BAFF-/APRIL-Systems auf SF bei RA-Patienten ist und daher am ehesten für Wirkungen der Liganden verantwortlich ist. Deshalb sollte in einem weiteren Schritt versucht werden, mit Hilfe eines Antikörpers gegen BCMA die leichte Apoptosesteigerung durch rekombinantes BAFF bei RA-SF zu verhindern. Auch nach Inkubation der Zellen von RA-Patienten mit dem Antikörper gegen BCMA oder der Isotyp-Kontrolle konnte man bei höheren BAFF-Konzentrationen einen diskreten Anstieg der Apoptoserate beobachten, der jedoch statistisch nicht signifikant war ($p=1$). Bei gleich behandelten OA-Patienten blieb die Apoptoserate weitestgehend unverändert. Insgesamt war der Anteil apoptotischer Zellen bei RA-Patienten bei allen verwendeten BAFF-Konzentrationen höher als bei OA-Patienten. Die Apoptoserate der mit dem Isotyp behandelten Zellen lag bei 5 ng/ml und 15 ng/ml bei den RA-Patienten signifikant höher als bei entsprechenden OA-Patienten (bei 5 ng/ml $p=0,024$, bei 15 ng/ml $p=0,036$). Nach Behandlung mit dem Antikörper gegen BCMA war der Unterschied bei keiner der beiden Konzentrationen mehr signifikant (siehe Abbildung 37).

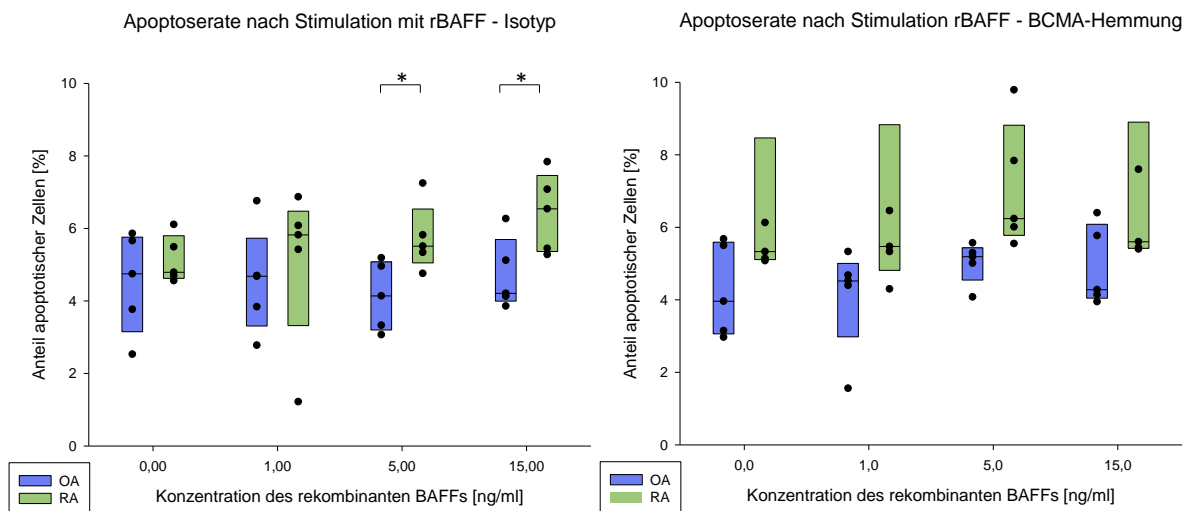


Abbildung 37: Anteil der apoptotischen Zellen nach Stimulation synovialer Fibroblasten von OA- und RA-Patienten mit rekombinatem BAFF unter Zugabe eines hemmender Antikörper gegen BCMA. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Plots zur Verdeutlichung der 25., 50. und 75. Perzentile. Die Vertical Scatter Plots dienen der Hervorhebung der Einzelwerte. Zur Vorbereitung der Proben wurde jeweils ein gegen BCMA gerichteter Antikörper (rechts) zugegeben und die Zellen 48 Stunden lang mit rekombinatem BAFF verschiedener Konzentrationen inkubiert. Als Isotyp-Kontrolle diente Goat IgG (links). Die Apoptoserate so behandelter Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie und nachfolgender Overton-Analyse auf SF von 5 OA- und 5 RA-Patienten bestimmt. * = $p < 0,05$.

3.3.4 Vergleichende Untersuchung der Zusammensetzung des BAFF-Standards und des rekombinanten BAFF

Für die deutlich stärkere apoptosefördernde Wirkung des BAFF-Standards im Vergleich zum rekombinanten BAFF sind grundsätzlich zwei Erklärungen denkbar. Eine Möglichkeit wäre, dass die Apoptose durch Zusätze im BAFF-Standard, die zytotoxisch wirken, ausgelöst wird. Eine andere Erklärung wäre, dass sich BAFF-Standard und rekombinantes BAFF bezüglich ihrer Affinität zu den Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA unterscheiden. Bekannt ist beispielsweise, dass BAFF-60-mere sowohl BAFF-R, als auch TACI aktivieren können, während die vorwiegend zirkulierenden BAFF-Trimere insbesondere BAFF-R binden ¹²⁶. Denkbar wäre daher auch, dass im BAFF-Standard eine biologisch aktivere BAFF-Variante vorliegt.

3.3.4.1 Untersuchung der Proteinzusammensetzung von BAFF-Standard und rekombinatem BAFF mittels nativer PAGE und Coomassie-Färbung

Aus diesem Grund sollten zunächst mit Hilfe einer nativen PAGE die Proteine, die im BAFF-Standard und der rekombinanten Form vorliegen aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt werden. Dadurch sollten eventuell vorhandene Unterschiede bezüglich Größe und Zusammensetzung der in den beiden Substanzen vorhandenen Proteine nachgewiesen werden. Dazu wurde für beide Substanzen unter Einsatz der Konzentrationen 10 ng/ml, 5 ng/ml, 1 ng/ml und 0,1 ng/ml sowie beim rekombinanten BAFF zusätzlich 1 µg/ml eine native PAGE mit nachfolgender Coomassie-Färbung durchgeführt. Dabei zeigte sich beim BAFF-Standard mit allen verwendeten Konzentrationen eine kräftige Bande bei etwa 60 kDa sowie schwächere Banden für größere Proteine. Beim rekombinanten BAFF war lediglich bei der höchsten Konzentration von 1 µg/ml ebenfalls eine Bande bei 60 kDa zu erkennen (siehe Abbildung 38).

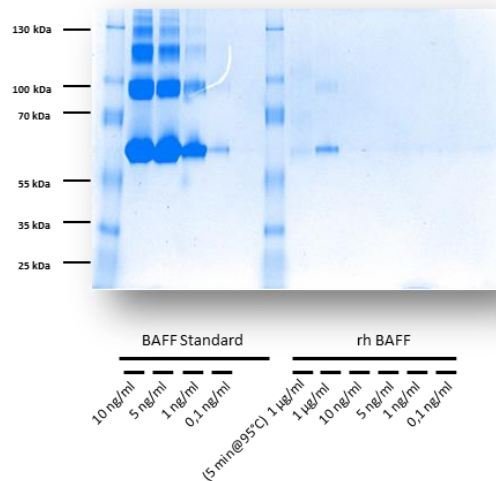


Abbildung 38: Coomassie-Färbung zur Untersuchung der Proteinzusammensetzung des BAFF-Standards und rekombinanten BAFFs. Die Abbildung zeigt die Coomassie-Färbung eines Gels nach Durchführung einer nativen PAGE mit verschiedenen Konzentrationen des BAFF-Standards und des rekombinanten BAFFs sowie jeweils eines Proteinstandards, mit dessen Hilfe sich die Proteingrößen abschätzen ließen. *Spuren 1 und 7:* Proteinstandard, *Spuren 2-5:* BAFF-Standard, *Spuren 8-13:* rekombinantes BAFF

Eine Wiederholung des Versuchs mit BAFF-Standard in den Konzentrationen 5 ng/ml und 1 ng/ml, rekombinatem BAFF mit 5 µg/ml und 1 µg/ml sowie zusätzlich aufgetragenem BSA mit 1000 µg/ml und 100 µg/ml ergab für alle drei Substanzen ein ähnliches Bandenmuster (siehe Abbildung 39). Wahrscheinlich lässt sich mit Hilfe der durchgeführten Coomassie-Färbung also nur das Trägerprotein darstellen, aufgrund einer zu geringen Sensitivität der Methode jedoch nicht das eigentliche BAFF-Protein.

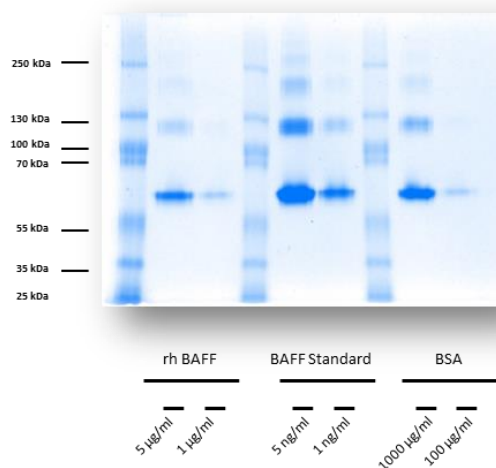


Abbildung 39: Vergleich der Proteinzusammensetzung von BAFF-Standard, rekombinatem BAFF und BSA mittels Coomassie-Färbung. Die Abbildung zeigt die Coomassie-Färbung eines Gels nach Durchführung einer nativen PAGE mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinatem BAFF, BAFF-Standard, BSA sowie jeweils eines Proteinstandards, mit dessen Hilfe sich die Proteingrößen abschätzen ließen. *Spuren 1, 4 und 7:* Proteinstandard, *Spuren 2 und 3:* rekombinantes BAFF, *Spuren 5 und 6:* BAFF-Standard, *Spuren 8 und 9:* BSA.

3.3.4.2 Detektion von BAFF im Western Blot nach Durchführung einer nativen PAGE

Da sich in der Coomassie-Färbung keine für BAFF typischen Banden abgrenzen ließen, sollte als nächstes überprüft werden, ob sich bei den beiden Substanzen im sensitiveren Western Blot BAFF detektieren lässt. Dazu wurde zunächst erneut eine native PAGE mit den gleichen Substanzen wie im vorherigen Versuch durchgeführt. Anschließend wurde versucht, bei diesen Substanzen mit Hilfe des oben genannten biotinylierten anti-BAFF-Antikörpers im Western Blot BAFF nachzuweisen, wobei BSA hierbei als Negativkontrolle diente. Der Nachweis gelang hierbei nur beim rekombinanten BAFF (siehe Abbildung 40). Eine Erklärung dafür wäre, dass der verwendete biotinylierte anti-BAFF-Antikörper Epitope erkennt, die beim BAFF-Standard nicht vorhanden sind. Für den Versuch musste allerdings eine 1000-fach niedrigere Konzentration des Standard-BAFFs im Vergleich zum rekombinanten BAFF verwendet werden. Dies war dadurch bedingt, dass der BAFF-Standard als ein Pulver mit deutlich höherem Träger/BSA Anteil vorliegt und deshalb eine höhere Konzentration nach Lösung nicht zu erreichen war. Der Nachweis von BAFF im Standard war daher möglicherweise aufgrund des Einsatzes einer zu geringen Konzentration limitiert. Dies ist aufgrund der um ein Vielfaches höheren apoptoseinduzierenden Wirkung des BAFF-Standards überraschend.

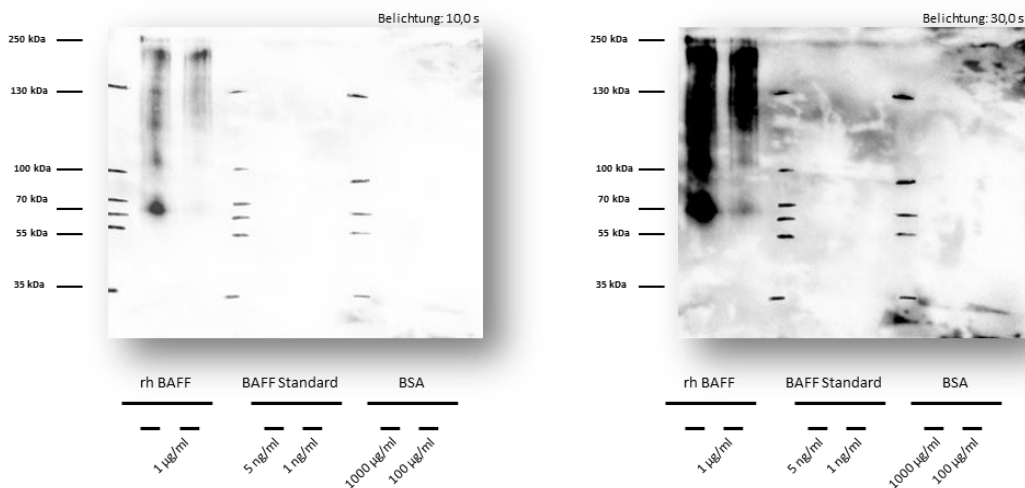


Abbildung 40: Western Blot zur Detektion des in rekombinanten BAFF, BAFF-Standard und BSA vorhandenem BAFF nach nativer PAGE. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse eines Western Blots nach Durchführung einer nativen PAGE mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinanten BAFF, BAFF-Standard, BSA sowie jeweils eines Proteinstandards, mit dessen Hilfe sich die Proteingrößen abschätzen ließen. Zur Detektion wurde die Membran mit einem biotinylierten anti-BAFF-Antikörper inkubiert und anschließend mit Streptavidin-HRP markiert. Ein Nachweis gelang hierbei nur im rekombinanten BAFF.

3.3.4.3 Detektion von BAFF im Western Blot nach Durchführung einer SDS-PAGE

Mit dem im letzten Versuch verwendeten Antikörper gelang beim BAFF-Standard kein Nachweis des BAFF-Proteins. Daher sollte in einem weiteren Versuch nach Durchführung einer SDS-PAGE erneut überprüft werden, ob sich unter Verwendung eines anderen Antikörpers mittels Western Blot BAFF im BAFF-Standard und in der rekombinanten Form detektieren lässt. Für das rekombinante BAFF wurden die Konzentrationen 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,05 µg/ml und 0,01 µg/ml eingesetzt. Der BAFF-Standard wurde bei 0,05 µg/ml untersucht. Zur Detektion wurde der Rabbit-anti-BAFF-Antikörper verwendet.

Beim rekombinanten BAFF gelang ein deutlicher Nachweis von BAFF in mehreren Banden, wobei sich am deutlichsten zwei Banden im Bereich von 28 bis 33 kDa sowie weitere bei etwa 65 und 100 kDa fanden. Beim BAFF-Standard fand sich eine Bande bei 26 kDa (siehe Abbildung 41).

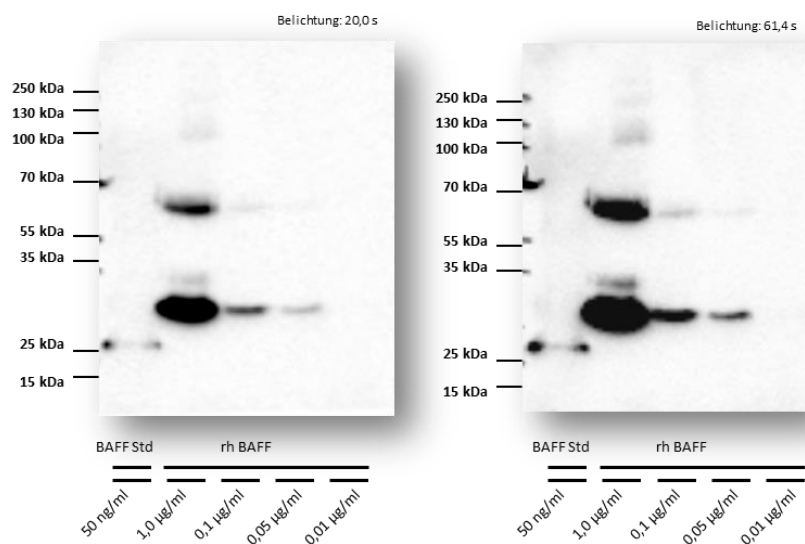


Abbildung 41: Western Blot zur Detektion des in rekombinanten BAFF und BAFF-Standard vorliegenden BAFF nach SDS-PAGE. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse eines Western Blots nach Durchführung einer SDS-PAGE mit 50 ng/ml BAFF-Standard und verschiedenen Konzentrationen des rekombinanten BAFFs sowie eines Proteinstandards, mit dessen Hilfe sich die Proteingrößen abschätzen ließen. Zur Detektion wurde die Membran mit einem anti-BAFF-Antikörper (rabbit) inkubiert und anschließend mit einem sekundären Antikörper angefärbt.

Festzuhalten ist, dass es bei hier nicht dargestellten Ansätzen mit 80 ng/ml des BAFF-Standards zunächst zu einer starken Schaumbildung und anschließend zu einer Ausfällung einer geleeartigen Substanz kam. Auch ließ sich der Ansatz aufgrund einer herabgesetzten Oberflächenspannung nicht exakt pipettieren, sodass eine weitere Steigerung der Konzentration praktisch nicht durchführbar war. Die Beobachtungen legen außerdem nahe, dass der BAFF-Standard weitere Moleküle enthält, die an der beschriebenen Reaktion beteiligt waren.

4 Diskussion

4.1 Expression der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA auf synovialen Fibroblasten von OA- und RA-Patienten

Wie eingangs beschrieben, wurden bei Patienten mit RA erhöhte BAFF- und APRIL-Spiegel im Serum festgestellt^{188 192 189}. Zum Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge und der Wirkungsweise neuer Medikamente ist es wichtig zu wissen, welche Zellarten durch BAFF und APRIL beeinflusst werden und die für eine Aktivierung nötigen Rezeptoren exprimieren.

Große Bedeutung kommt hier SF zu, die über die Sekretion einer Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen an der Regulation der für die Pathogenese der RA entscheidenden Zellarten beteiligt sind. Darüber hinaus sind sie auch selbst unmittelbar für die ablaufende Destruktion des Gelenkknorpels wichtig⁵⁸. Bekannt ist bereits, dass SF bei RA-Patienten BAFF⁶⁹ und APRIL¹⁹² synthetisieren. Nur wenige Studien haben sich jedoch bislang mit der Frage befasst, ob auch die Rezeptoren des BAFF/APRIL-Systems auf SF vorhanden sind und was diese für eine Bedeutung haben.

In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst die Zellen von OA- und RA-Patienten auf das Vorhandensein von BAFF-R, TACI und BCMA hin untersucht werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass RA-SF mit durchschnittlich 15,9 +/- 10,5 % positiven Zellen eine höhere Expressionsrate für BCMA aufweisen als OA-SF. Es wurde jedoch mit durchschnittlich 7,8 +/- 12,0 % positiven Zellen auch auf einem Teil der OA-SF BCMA nachgewiesen. Des Weiteren konnte auf RA-FS signifikant mehr TACI detektiert werden als auf OA-SF. Bezüglich BAFF-R ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen OA und RA. Da die Unterschiede der Messungen zum Teil nur gering ausgeprägt waren und die verwendete Overton-Analyse anfällig für leichte Veränderungen der Geräteeinstellungen und des Färbeprotokolls ist²¹⁰, sollten die Ergebnisse in einem weiteren Schritt durch immunhistochemische Untersuchungen überprüft werden. Hierbei zeigte sich bei einem Großteil der untersuchten RA-Patienten ein deutlicher Nachweis von BCMA und TACI. Auch bei mehreren OA-Patienten war die Färbung für diese beiden Rezeptoren positiv. Bei vereinzelten OA- und RA-Patienten fanden sich auch BAFF-R-exprimierende Zellen.

Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zu einer Arbeit von Nagatani aus dem Jahr 2007, der zufolge SF von RA-Patienten BCMA exprimieren, nicht jedoch BAFF-R oder TACI. Bei OA-Patienten wurde keiner der drei Rezeptoren nachgewiesen¹⁹². Die beiden Rezeptoren

BAFF-R und TACI wurden in genannter Studie jedoch nur mittels mRNA-Expression untersucht. In einer ebenfalls durchgeführten FACS-Untersuchung wurde bezüglich der Rezeptoren lediglich die BCMA-Expression auf OA- und RA-Patienten miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich in Einklang mit der vorliegenden Arbeit bei RA-SF eine höhere BCMA-Expression als bei OA-SF¹⁹². Eine neuere Arbeit konnte in einem Tiermodell mit adjuvant induzierter Arthritis hingegen auch die mRNA-Expression von BAFF-R, TACI und BCMA in SF nachweisen²¹¹.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die VEGF-Expression bei SF möglicherweise durch BAFF reguliert wird²¹². Nach Stimulation von RA-SF mit APRIL konnte die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α sowie die Expression von APRIL und RANKL gesteigert werden¹⁹². Außerdem wurde durch gleiche Stimulation der Zellzyklus von SF beschleunigt^{192 211}.

Die Funktion der Rezeptoren wurde bislang vor allem für Lymphozyten untersucht. TACI ist dabei wichtig für den Antikörper-Klassenwechsel zu IgG1, IgA und IgE¹⁵¹, eine Förderung der T-Zell-unabhängigen Antikörperproduktion²¹³ sowie für die negative Regulation im Rahmen der B-Zell-Homöostase¹⁴⁸. Eine Aktivierung von BCMA fördert das Langzeitüberleben von Plasmazellen im Knochenmark¹⁴⁹, induziert die Antigenpräsentation auf B-Lymphozyten und erhöht die Proliferation und das Überleben von Adipozyten und anderen Zellen^{214 215}. Der BAFF-R ist insbesondere für die Differenzierung zu und das Überleben von reifen B-Zellen verantwortlich^{138 119 139 141 144}.

Da BAFF-R in der vorliegenden Arbeit nur bei wenigen Patienten nachzuweisen war und APRIL außerdem nicht durch den BAFF-R gebunden wird¹²⁰, sind bei SF vermutlich TACI oder BCMA für die oben genannten Wirkungen von BAFF und APRIL ausschlaggebend. Bislang wurden die Wirkungen von BAFF und APRIL auf SF jedoch nur in wenigen Studien betrachtet. Einen wertvollen Beitrag dazu liefert die vorliegende Arbeit, in der der Einfluss von BAFF auf die Apoptoserate bei SF untersucht wurde. Der Frage, ob die beiden Zytokine weitere, bisher unbekannte Auswirkungen auf SF besitzen, muss in weiteren Studien nachgegangen werden.

4.2 Expression von BAFF-R, TACI und BCMA in Abhängigkeit verschiedener Stimulanzen

Im oben diskutierten Versuch konnte gezeigt werden, dass RA-SF signifikant mehr TACI und BCMA exprimieren als OA-SF. Daher sollte in weiteren Versuchen geklärt werden, ob und wie sich die Expressionsrate der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA in Anwesenheit verschiedener Stimulanzen verändert und ob man durch bestimmte Stimulationen die Expressionsrate der Rezeptoren von OA-SF an die von RA-SF angleichen kann.

4.2.1 Expression von BAFF-R, TACI und BCMA in Abhängigkeit der Zytokine IL-1 β , IFN- γ und TNF- α

Zytokine spielen, wie in der Einleitung bereits näher beschrieben, eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der RA ³⁵. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass bestimmte Zytokine wie TNF- α oder IFN- γ zu einer gesteigerten Synthese von BAFF durch SF führen ²⁰⁹. Ob jedoch auch die Ausbildung der entsprechenden Rezeptoren beeinflusst wird, wurde bislang nicht hinreichend untersucht.

Aus diesem Grund sollte zunächst der Einfluss einer Auswahl von Zytokinen auf die Expression von BAFF-R, TACI und BCMA bestimmt werden. Dazu wurden SF von OA- und RA-Patienten 72 Stunden mit IL-1 β , IFN- γ , TNF- α oder einer Kombination aus IL-1 β und IFN- γ inkubiert und im Anschluss per FACS-Analyse auf das Vorhandensein der Rezeptoren untersucht.

Wichtige Zytokine in der Pathogenese der RA sind insbesondere TNF- α und IL-1 β . Sie fördern unter anderem die Synthese von Chemokinen, MMPs, Proteinasen, proinflammatorischen Mediatoren und Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) auf Endothelzellen sowie die Aktivierung von Osteoklasten ²¹⁶. Besondere Bedeutung hat dabei TNF- α , das außerdem die Expression weiterer proinflammatorischer Zytokine, die Angiogenese, die Suppression regulatorischer T-Zellen sowie die Protektion von SF fördert ^{217 218 35}. Die Rolle von IFN- γ bei RA ist hingegen nicht eindeutig bestimmt. Es konnte zum einen gezeigt werden, dass IFN- γ die Motilität von RA-SF fördert ²¹⁹ und deren Expression von BAFF erhöht ^{209 220}. Andererseits ließ sich durch Einsatz von IFN- γ über eine Reduktion der IL-1 β -Expression die Synthese der MMP-1 und MMP-3 verringern ²²¹. Auch in mehreren Tiermodellen wirkte sich das Vorhandensein von IFN- γ protektiv aus ^{222 223}. Bei der Entstehung anderer systemischer Autoimmunerkrankungen wie SLE oder SS scheint IFN- γ jedoch eindeutig beteiligt zu sein ²²⁴.

In der vorliegenden Arbeit blieb BAFF-R vom Einsatz der Zytokine weitestgehend unbeeinflusst und zeigte nur bei OA-Patienten nach Stimulation mit TNF- α eine weitere Reduktion der ohnehin geringen Expressionsrate. Die TACI-Expression konnte bei OA-Patienten durch keines der verwendeten Zytokine verändert werden. Bei RA-Patienten führten Stimulationen mit IL-1 β oder TNF- α jeweils zu signifikanten Steigerungen der Expression von TACI. Etwas stärker ließ sich die Expression von BCMA beeinflussen. Bei OA führte zwar auch hier keine der Behandlungen zu einer signifikanten Veränderung. Bei RA ließ sich hingegen durch IL-1 und durch IFN- γ die Expression von BCMA steigern.

Auffällig hierbei ist, dass bei RA-SF zwar sowohl IL-1 als auch IFN- γ einzeln zu einer erhöhten BCMA-Expression führten, die kombinierte Stimulation mit beiden Zytokinen jedoch keinen Einfluss mehr hatte. IFN- γ besitzt bekanntermaßen IL-1-antagonistische Funktionen²²¹. Bekannt ist außerdem, dass IFN- γ die IL-1-induzierte IL-1-Bildung auf transkriptioneller Ebene hemmt²²⁵. In der Literatur ist eine Steigerung der Promotoraktivität und mRNA-Expression des BAFF-R nach Stimulation mit IFN- γ beschrieben²²⁶. In der aktuellen Arbeit wurde jedoch in der FACS-Analyse weder bei OA, noch bei RA eine Änderung des BAFF-R festgestellt. Weiter bemerkenswert ist, dass sich bei RA-SF die im Vergleich zu OA-SF ohnehin schon höhere TACI- und BCMA-Expression bei TACI durch IL-1 β und TNF- α , bei BCMA durch IL-1 β und IFN- γ weiter steigern ließ. Aufgrund der Tatsache, dass die Einflüsse der verwendeten Zytokine auf die Expression der Rezeptoren zwischen OA und RA zum Teil unterschiedlich ausfallen, lässt sich ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Einflussfaktoren vermuten. Hierbei hat die Veränderung eines einzelnen Zytokins wahrscheinlich nur in Verbindung mit weiteren Unterschieden zwischen den stimulierten Zellen einen Einfluss auf die Rezeptorexpression. Denkbar ist beispielsweise, dass SF von OA- und RA-Patienten selbst unterschiedliche Substanzen sezernieren, die im Sinne einer Autostimulation die Empfänglichkeit für die Stimulation „von außen“ variieren. In früheren Studien bei RA-Patienten konnten bei verschiedenen Patienten stark unterschiedliche Zytokinkonstellationen in der Synovialflüssigkeit festgestellt werden²²⁷, was auch eine Erklärung für das unterschiedliche Expressionsmuster der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA zwischen den einzelnen Patienten wäre. Erwähnt werden muss an dieser Stelle, dass die in der vorliegenden Arbeit für die Stimulationen jeweils verwendeten Konzentrationen bei 10 ng/ml lagen und somit höher waren als die in vivo gemessenen Werte. Die für TNF- α gemessenen Werte liegen in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten bei etwa 94 pg/ml, bei OA-Patienten bei etwa 39 pg/ml²²⁸. Die IL-1 β -Konzentration in der Synovialflüssigkeit scheint zwischen den verschiedenen Patienten deutlich zu variieren.

Während eine neuere Studie bei RA Werte von ca. 9,26 pg/ml, bei OA von ca. 7,76 pg/ml beschreibt ²²⁹, wurden in älteren Arbeiten zum Teil Werte von über 200 pg/ml beschrieben ²³⁰ ²²⁷. Die Konzentration von IFN- γ in der Synovialflüssigkeit bei RA ist hingegen sehr gering ²²¹. Dennoch bleibt festzuhalten, dass die eingesetzten Zytokine in den verwendeten Konzentrationen einen Einfluss auf die Rezeptorexpression im BAFF-/APRIL-System haben.

4.2.2 Expression von BAFF-R, TACI und BCMA in Abhängigkeit der TLR-Liganden CpG und Poly (I:C)

Wie eingangs bereits beschrieben, werden im Synovialgewebe von RA-Patienten insbesondere die TLRs 2, 3, 4 und 7 vermehrt exprimiert ^{90 91 92}. Außerdem wurden inzwischen mehrere endogene TLR-Liganden wie Hitzeschockproteine, Fibrinogen, Serumamyloid A oder Tenascin-C identifiziert, die über eine TLR-Aktivierung die Inflammation und Knochendestruktion bei RA-Patienten fördern ²³¹. Auch das BAFF/APRIL-System scheint durch TLR-Liganden beeinflusst zu werden. So konnte an Speicheldrüsenzellen bei Patienten mit SS durch Stimulation des TLR 3 mit Poly (I:C) eine Steigerung der BAFF-Produktion festgestellt werden ¹¹⁵. Darüber hinaus ließ sich an DCs durch Stimulation mit CpG oder Poly (I:C) eine Steigerung der APRIL-Synthese nachweisen ²³². Auch bei SF wurde durch Stimulation mit Poly (I:C) eine Steigerung der BAFF-Sekretion sowie der BAFF- und APRIL-Expression auf der Zellmembran erreicht ¹¹⁸. Ob sich eine Aktivierung der TLR auch auf die Rezeptoren des BAFF/APRIL-Systems auswirkt, wurde bei SF bislang nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich durch Stimulation mit Poly (I:C) sowohl bei OA als auch bei RA keine Unterschiede bezüglich der Ausbildung der Rezeptoren im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen. Eine Behandlung mit CpG führte bei OA zu einer Reduktion von TACI und BCMA..

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen ist nach Stimulation von Deidualzellen mit Poly (I:C) eine deutliche Steigerung der Sekretion von löslichem BAFF-R beschrieben worden ²³³. Bei SF scheint eine Aktivierung des TLR 3 in Anbetracht der Ergebnisse hingegen keinen Einfluss auf die Rezeptoren des BAFF/APRIL-Systems zu haben.

Ähnliche Stimulationsversuche mit CpG wurden bislang hauptsächlich mit B-Zellen durchgeführt. Dabei wurde eine Steigerung der Expression von BAFF-R und TACI beobachtet ²³⁴. Von anderen Autoren wurde lediglich eine Erhöhung von TACI

beschrieben²³⁵. Wiederum andere Untersuchungen mit B-Zellen zeigten zusätzlich zu einer Erhöhung von TACI eine verstärkte Expression von BCMA bei gleichzeitigem Rückgang von BAFF-R^{121 236}. Letztgenannte Veränderungen begannen dabei jedoch erst ab einer Inkubationszeit von mindestens 72 Stunden und waren erst später deutlich ausgeprägt¹²¹. Gemeinsam ist den genannten Arbeiten also eine Erhöhung der TACI-Expression nach Stimulation mit CpG, die auch in der vorliegenden Arbeit bei RA-SF beobachtet werden konnte. Auffällig an den Ergebnissen dieser Arbeit sind die unterschiedlichen Auswirkungen der Stimulation mit CpG auf SF von OA und RA. Bekannt ist, dass die Expression bestimmter TLRs wie TLR 2, 3 oder 4 auf SF von RA-Patienten höher ist als auf solchen von OA-Patienten^{96 92}. Dadurch lassen sich unterschiedliche Wirkungen von TLR-Liganden auf OA und RA erklären. In SF wurde inzwischen die mRNA-Expression mehrerer TLRs nachgewiesen. So wird auf SF neben den TLRs 1-6 in geringerem Maße auch der TLR 9 exprimiert^{95 237 238}. Durch eine Stimulation mit CpG, einem Liganden des TLR 9⁹⁴, ließen sich SF jedoch nur unzureichend aktivieren, was die Autoren sich mit einer zu geringen Expression des Rezeptors erklären^{237 238}. In Anbetracht der Ergebnisse in dieser Arbeit ist dies jedoch überraschend. Es stellt sich daher die Frage, ob eine CpG-Wirkung auch über einen TLR 9-unabhängigen Signalweg denkbar wäre. Einen möglichen Erklärungsansatz liefert eine Arbeit aus dem Jahr 2007, in der gezeigt werden konnte, dass CpG in dendritischen Zellen unabhängig von TLR 9 über eine Aktivierung des Proteinkinase-Rezeptors (PKR) eine Steigerung der APRIL-Produktion bewirken kann²³². Die TACI-Expression erfolgt in B-Zellen abhängig von einer Aktivierung des ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinsase)-Signalwegs¹²¹.

4.2.3 Expression der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA nach Stimulation mit PMA

PMA ist ein guter Aktivator der Proteinkinase C (PKR), die bei vielen Rezeptoren nach deren Aktivierung eine wichtige Rolle bei der weiteren Signaltransduktion spielt²³⁹. Mit PMA stimulierte B-Zellen zeigten eine gesteigerte Sekretion von BAFF²³⁶ sowie eine Hochregulation der TACI-Expression¹²¹. Im Rahmen einer anderen Studie wurde nach Stimulation mit PMA auf Makrophagen BAFF-R, TACI und BCMA nachgewiesen²⁴⁰. Bei SF kommt es als Folge der genannten Stimulation unter anderem zu einer Steigerung der Produktion von Kollagenasen²⁴¹. In der vorliegenden Arbeit wurde geklärt, wie sich PMA bei SF auf die Expression der Rezeptoren des BAFF/APRIL-Systems auswirkt.

Die Stimulation mit 10 ng/ml PMA über 72 Stunden führte bei OA-SF zu keiner Änderung der Rezeptor-Expression. Bei RA-SF kam es zu einem weiteren Rückgang der BAFF-R-Expression.

In Anbetracht der Ergebnisse der oben genannten Studie mit Makrophagen²⁴⁰ sowie aufgrund der Überlegungen des vorigen Versuchs, wäre bei einer möglichen Aktivierung des PKR durch CpG auch nach Aktivierung der PKC durch PMA eine Steigerung der TACI-Expression zu erwarten gewesen. Es ist daher zu vermuten, dass CpG doch über TLR 9 und nicht über den PKR wirkt.

4.2.4 Expression der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA nach Stimulation mit BAFF

Wie bereits beschrieben sind SF an der BAFF-Produktion im Synovialgewebe beteiligt. Diese Synthese kann außerdem in Anwesenheit der proinflammatorischer Zytokine TNF- α und IFN- γ weiter gesteigert werden²⁰⁹. In den ersten Versuchen dieser Arbeit konnten auf SF insbesondere die Rezeptoren TACI und BCMA nachgewiesen werden, womit diese grundsätzlich durch BAFF beeinflusst werden können. In einem weiteren Versuch sollte daher geklärt werden, ob BAFF selbst die Expressionsrate seiner Rezeptoren regulieren kann.

Nach Inkubation von OA- und RA-SF mit 1 ng/ml BAFF über 72 Stunden ließ sich in der FACS-Analyse bei OA eine Zunahme der BAFF-R- und TACI-Expression feststellen. Bei RA konnte man lediglich eine nominale Steigerung feststellen. BCMA blieb von der Stimulation in beiden Fällen unbeeinflusst.

Im Gegensatz dazu, zeigt eine andere Studie mit B-Zellen eine Reduktion des nachweisbaren BAFF-R bei erhöhtem BAFF, was jedoch nicht durch Regulation der Transkription erklärt wird. Die Autoren vermuten, dass über längere Zeit erhöhte BAFF-Spiegel zu einer verstärkten TACI-Expression auf peripheren B-Zellen führen²⁴², was in dieser Arbeit für SF bestätigt wurde.

Bekannt ist, dass BAFF-R selektiv durch BAFF aktiviert wird^{119 120}, TACI gleichermaßen BAFF und APRIL bindet^{124 125} und BCMA eine vielfach höhere Affinität zu APRIL besitzt als zu BAFF¹³¹. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen also nahe, dass BAFF auf SF insbesondere die Expression der beiden Rezeptoren induziert, an die es selbst bevorzugt bindet. Über die genauen Signalwege bezüglich der Regulation der TACI- und BCMA-Expression ist bislang nur wenig bekannt. In B-Zellen von RA-Patienten konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression des BAFF-R abhängig vom NF- κ B-Signalweg ist²⁴³.

Des Weiteren ist bekannt, dass über den BAFF-R weitergeleitete Signale zu einer Aktivierung des klassischen und alternativen NF- κ B-Signalwegs führen²⁴⁴. Auch TACI und BCMA können den klassischen NF- κ B-Signalweg aktivieren²⁴⁵. Somit wäre eine verstärkte Ausbildung des BAFF-R im Sinne einer Autostimulation denkbar.

4.3 Untersuchung des Einflusses von BAFF auf die Apoptoserate synovialer Fibroblasten

4.3.1 Steigerung der Apoptoserate unter Verwendung eines BAFF-Standards

Bei der Untersuchung des Einflusses von BAFF auf das Überleben von SF konnte man überraschenderweise nach der Stimulation bereits unter dem Lichtmikroskop eine Ablösung der eigentlich adhären Zellen von der Zellkulturflasche beobachten. In der FACS-Analyse zeigte sich eine deutliche Zunahme der Zahl apoptotischer Zellen bei allen eingesetzten Konzentrationen. Bei drei der untersuchten OA-Patienten waren bei tendenziell niedrigeren Konzentrationen sogar über 80 % der Zellen apoptotisch. Unterschiede zwischen OA und RA zeigten sich am ehesten bezüglich des Stadiums der Apoptose. Während sich unter den frühapoptotischen Zellen mehr RA-SF als OA-SF fanden, verhielt sich dies unter den spätapoptotischen Zellen umgekehrt. Gegen eine unspezifische lytische Wirkung durch bisher unbekannte Bestandteile des BAFF-Standards spricht eine Betrachtung der rein nekrotischen Zellen, deren Zahl sich durch die Stimulation nicht erhöhte.

Klassischerweise kann Apoptose über zwei verschiedene Wege aktiviert werden, die jedoch zum Teil miteinander in Verbindung stehen. Der extrinsische Signalweg wird über so genannte Todesrezeptoren vermittelt, die zur TNF-Superfamilie gehören²⁴⁶. Beim intrinsischen Signalweg werden aus dem Mitochondrium proapoptotische Proteine wie Cytochrom C freigesetzt. Dies wird beispielsweise durch Überwiegen der proapoptotischen gegenüber den antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie ausgelöst²⁴⁶. Für B-Zellen und B-Zell-Lymphome konnte gezeigt werden, dass BAFF antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1 hochreguliert und den Anteil der proapoptotischen Mitglieder wie Bax, Bmf oder Bim senkt^{247 248 249 250}. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse weisen jedoch auf einen gegenteiligen Effekt hin, wobei der genaue Mechanismus noch unklar ist. Ob hierfür dieselben Signalwege in Frage kommen wie für die anti-apoptotische Wirkung, muss durch zukünftige Studien erforscht werden.

Weiter oben wurde in der vorliegenden Arbeit bereits der Nachweis der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA auf SF beschrieben, wobei die Expressionsrate von TACI und BCMA sich zwischen OA und RA unterscheidet. Die unterschiedliche Verteilung von OA- und RA-SF in Früh- und Spätapoptose könnte daher, unter Annahme eines spezifisch durch BAFF hervorgerufenen Effekts, auf einen unterschiedlichen Rezeptorstatus zwischen OA und RA zurückzuführen sein.

4.3.2 Versuch der Antagonisierung des BAFF-Standards durch Blockade der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA

Als nächstes sollte geklärt werden, ob die apoptosefördernde Wirkung des BAFF-Standards auf die Aktivierung eines der Rezeptoren des BAFF/APRIL-Systems zurückzuführen ist. BAFF-R fördert unter anderem über PI3K- und NF- κ B-abhängige Signalwege das Überleben von B-Zellen²⁵¹. BCMA ist für das Überleben von Plasmazellen wichtig und fördert die Expression des antiapoptotischen Mcl-1²⁵². TACI scheint einigen älteren Arbeiten zufolge eher eine das B-Zell-Überleben negativ regulierende Funktion zu haben^{147 148} und kommt daher zur Erklärung der beobachteten Apoptosesteigerung bei SF am ehesten in Betracht.

Für den Versuch wurden erneut SF von OA- und RA-Patienten über 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des BAFF-Standards stimuliert, wobei durch vorherige Zugabe eines entsprechenden Antikörpers jeweils die Aktivierung von BAFF-R, TACI oder BCMA blockiert wurde. Als Negativkontrolle diente ein Isotyp, als Positivkontrolle ein Antikörper gegen lösliches BAFF.

Bei OA und RA stieg die Apoptoserate dabei konzentrationsabhängig an und war bei beiden Patientengruppen bei der maximalen Konzentration von 5 ng/ml am stärksten erhöht, weshalb sich die folgenden Ausführungen auf diese Konzentration beziehen. Die Steigerung ließ sich dabei auch unter Blockade der einzelnen Rezeptoren beobachten. Bei ausschließlicher Betrachtung der mit 5 ng/ml BAFF behandelten Proben, konnte die Apoptoserate im Vergleich zum Isotyp durch keinen der eingesetzten Antikörper signifikant reduziert werden. Zu erwähnen ist jedoch, dass beispielsweise bei OA-Patienten alle Einzelwerte nach Behandlung mit anti-BAFF-R geringer waren als die der Isotyp Kontrolle. Möglicherweise zeigen sich daher in zukünftigen Versuchen mit größeren Stichproben signifikante Ergebnisse.

Bei Einsatz eines gegen lösliches BAFF gerichteten Antikörpers war die Apoptoserate weder bei OA noch bei RA signifikant gesteigert, was trotz der nur eingeschränkten Hemmbarkeit

durch die anderen Antikörper auf eine spezifisch durch BAFF hervorgerufene Wirkung hinweist. Denkbar wäre daher auch die Beteiligung eines weiteren, bislang nicht identifizierten BAFF-Rezeptors auf SF. So wurde BAFF inzwischen beispielsweise auch als Ligand des Nogo-66-Rezeptors beschrieben¹³⁵. Darüber hinaus ließen sich bei OA-Patienten auch durch Behandlungen mit den Antikörpern gegen BAFF-R und TACI, bei RA durch Behandlung mit einem Antikörper gegen BAFF-R keine signifikanten Steigerungen der Apoptose nach Stimulation mit 5 ng/ml BAFF mehr feststellen.

4.3.3 Untersuchung der Wirkung von rekombinantem BAFF auf die Apoptoserate synovialer Fibroblasten

Unter Verwendung eines für Zellkulturen hergestellten rekombinanten BAFF konnte bei OA-Patienten keine wesentliche Steigerung der Zahl apoptotischer Zellen mehr festgestellt werden. Bei RA-Patienten war hingegen eine diskrete Steigerung um 2,7 Prozentpunkte vorhanden.

Es lässt sich also zusammenfassen, dass der BAFF-Standard bei OA- und RA-SF eine deutliche Steigerung der Apoptoserate induziert, während rekombinantes BAFF bei RA-SF eine vielfach geringere und bei OA-SF keine Apoptosesteigerung bewirkt. Versuche, die Auswirkungen der Stimulationen zu inhibieren waren erfolglos.

Die oben beschriebenen unterschiedlichen Effekte zwischen rekombinantem BAFF und BAFF-Standard legen Unterschiede in der Zusammensetzung der beiden Substanzen nahe. So sind in dem für die Versuche verwendeten BAFF-Standard weitere Substanzen wie Konservierungsmittel und ein Protein-basierter Puffer enthalten²⁴⁹. Außerdem ist bekannt, dass TACI eine hohe Affinität zu BAFF 60-meren zeigt und nur unzureichend durch Trimere, die die hauptsächlich auftretende Form von BAFF darstellen, aktiviert werden kann¹²⁶. Prinzipiell wäre also auch denkbar, dass das im BAFF-Standard enthaltene Zytokin aufgrund eines dafür förderlichen Milieus vorwiegend als höhergradiges Multimer vorliegt, im rekombinanten BAFF jedoch nicht.

4.3.4 Unterschiedliche Zusammensetzung von BAFF-Standard und rekombinantem BAFF

Um auch Multimere detektieren zu können wurde eine Coomassie-Färbung nach nativer PAGE durchgeführt. Es fiel auf, dass sich im BAFF-Standard in hoher Konzentration Proteine verschiedener Größe fanden. Diese ließen sich auch beim rekombinanten BAFF feststellen, jedoch in deutlich geringeren Mengen.

Laut Angabe des Herstellers wurde dem rekombinanten BAFF als Trägerprotein BSA beigefügt²⁵³. Daher sollte in einem weiteren Versuch überprüft werden, ob eine oder mehrere der im Vorversuch festgestellten Banden durch das beigefügte BSA entstehen. Dabei zeigte sich, dass alle Banden, die beim BAFF-Standard und beim rekombinanten BAFF bemerkt wurden auch durch Auftrennung von BSA ohne weitere Zusätze entstehen. Somit ließ sich keine der Banden als BAFF identifizieren. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür ist, dass in den beiden BAFF-haltigen Substanzen BSA in einer vielfach größeren Menge vorliegt als BAFF und dieses somit aufgrund einer zu geringen Sensitivität der Methode in den Gelen nicht sichtbar wurde.

Daher sollte in einem weiteren Schritt versucht werden, nach der Durchführung einer nativen PAGE wie im vorherigen Versuch, BAFF im Western Blot nachzuweisen. Hierbei gelang der Nachweis jedoch nur beim rekombinanten BAFF. Dort zeigten sich eine erste Bande bei etwa 70 kDa sowie weitere Banden mit größeren Molekülen. Gemäß der Herstellerangabe soll sich das rekombinante BAFF in der SDS-PAGE bei 22-29 kDa zeigen²⁵³. Somit könnte das rekombinante BAFF vorwiegend in seiner auch physiologisch vorkommenden Form als Trimer vorliegen¹⁰². Der Nachweis größerer Moleküle legt nahe, dass es sich auch zu noch größeren Multimeren zusammenlagern kann. In einem weiteren Versuch sollten die Proteine der beiden BAFF-Lösungen zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und somit eventuell vorhandene Multimere aufgelöst werden. Im Anschluss sollte im Western Blot wieder BAFF detektiert werden. Auch hier ließen sich beim rekombinanten BAFF mehrere Banden erkennen. Neben Banden im Bereich von 28 bis 33 kDa fanden sich weitere deutliche Banden etwa bei 65 und 100 kDa, die trotz der Denaturierung als Multimere gedeutet werden können. Beim BAFF-Standard war nur eine Bande bei etwa 26 kDa zu erkennen.

Die Molekülmasse von physiologisch vorkommendem BAFF liegt bei 31,223 kDa als Monomer²⁵⁴. Für das rekombinante BAFF wird eine erwartete Molekülmasse von 19,6 kDa angegeben, die Banden in der SDS-PAGE sollen laut Hersteller zwischen 22 und 29 kDa liegen²⁵³. Sowohl beim BAFF-Standard, als auch beim rekombinanten BAFF konnten somit Banden in diesem Bereich detektiert werden. Offensichtlich unterscheiden sich jedoch die Molekülgrößen zwischen den beiden BAFF-Formen. Multimere konnten darüber hinaus nur beim rekombinanten BAFF, nicht jedoch beim Standard nachgewiesen werden. Denkbar ist, dass der BAFF-Standard in einer trunkeierten Version vorliegt, die sich nicht zu Multimeren zusammenlagern kann. Dies könnte auch die Ursache für den unterschiedlichen Effekt der beiden Substanzen auf die Apoptose darstellen. So ist möglicherweise monomeres BAFF

ursächlich für die Induktion der Apoptose, während multimeren Formen diese weniger stark auslösen können.

Laut Angabe des Herstellers sind im Standard neben BSA auch Konservierungsmittel enthalten ²⁵⁵. In Anbetracht der Tatsache, dass im Standard noch weitere Substanzen als BAFF enthalten sind, ist nicht auszuschließen, dass eine dieser Substanzen für die Auslösung der Apoptose bei synovialen Fibroblasten verantwortlich ist. Der Hersteller macht hierzu keine genaueren Angaben.

Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass BAFF im Standard in einer die Rezeptoren nicht aktivierenden Form vorliegt, die Rezeptoren durch Bindung jedoch blockieren kann. Möglicherweise sind SF zum Überleben auf das Vorliegen von membranständigem oder löslichem BAFF der benachbarten SF angewiesen, das jedoch aufgrund einer Blockade durch den BAFF-Standard nicht binden kann. Dies könnte auch erklären, weshalb sich die Wirkung des BAFF-Standards nicht entscheidend durch die Zugabe ebenfalls inhibitorischer Antikörper gegen die Rezeptoren reduzieren ließ. Rekombinantes BAFF hingegen aktiviert möglicherweise teilweise die Rezeptoren und verhindert somit eine übermäßige Apoptose.

Die Mehrzahl der Arbeiten, die sich mit dem Einfluss von BAFF auf die Apoptose bei B-Zellen beschäftigten, verwendeten ein rekombinantes BAFF mit den Aminosäuren 83-285 ²⁵⁶ ²⁵⁷. In einer weiteren Untersuchung wurde daneben die auch von R&D angebotene Sequenz mit den Aminosäuren 134-285 verwendet ²⁵³ ²⁵⁸. Welche Form im BAFF-Standard zum Einsatz kommt wird vom Hersteller nicht angegeben ²⁵⁵. In den durchgeführten Versuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die Größe der BAFF-Moleküle zwischen Standard und rekombinanter Form voneinander unterscheiden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass diese Unterschiede auch Auswirkungen auf die Affinität der Moleküle zu den Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA haben. Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass TACI sich eher negativ auf das Überleben von B-Zellen auswirkt ¹⁴⁷ ¹⁴⁸ ²¹³, weshalb dieser Rezeptor für die hier nachgewiesene Apoptosesteigerung auf SF am ehesten in Betracht gezogen werden sollte. Für B-Zellen wurde in mehreren Studien bereits eine das Überleben fördernde Wirkung von BAFF nachgewiesen. In zwei Arbeiten konnte beispielsweise unter Verwendung von 2 µg/ml rekombinanten BAFFs die Apoptoserate von Splenozyten reduziert werden ²⁵⁶ ²⁵⁸. In einer weiteren Studie konnte die Apoptoserate Antikörper-produzierender B-Zellen durch Einsatz von 2,5 µg/ml BAFF reduziert werden, was wahrscheinlich durch BCMA vermittelt wurde ²⁵⁹. Auch in einer Arbeit, in der die protektive BAFF-Wirkung auf peritoneale B-Zellen gezeigt wurde, kam eine Konzentration von 100 ng/ml zum Einsatz ²⁵⁷. Gemeinsam ist den

vorgestellten Untersuchungen also eine vielfach höhere BAFF-Konzentration, als die in der vorliegenden Arbeit verwendete Konzentration von maximal 5 ng/ml beim BAFF-Standard. Im Serum von RA-Patienten wurden Spiegel zwischen etwa 3 und 15 ng/ml festgestellt^{179 188}. Bekanntermaßen verfügt BAFF über eine wesentlich höhere Affinität zu TACI als zu BCMA¹⁰². Möglicherweise überwiegen daher bei niedrigeren Konzentrationen zunächst TACI-vermittelte Wirkungen, während bei höheren Konzentrationen die Folgen der BCMA-Aktivierung deutlich werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte auf SF von OA- und RA-Patienten erstmals TACI nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten Ergebnisse, denen zufolge RA-SF BCMA exprimieren bestätigt werden und dieses außerdem erstmals auch auf OA-SF detektiert werden. Beide Rezeptoren kamen dabei signifikant häufiger auf SF von RA-Patienten vor. Auf Zellen einzelner Patienten konnte in der Immunhistochemie außerdem BAFF-R markiert werden. Mit Hilfe einer Reihe von Stimmulationsversuchen konnten darüber hinaus mehrere die Expression der Rezeptoren beeinflussende Substanzen identifiziert werden. So stellte sich BAFF als ein Zytokin heraus, dass die BAFF-R Expression zumindest auf OA Fibroblasten hochregulierte. Eine Steigerung der TACI-Expression gelang bei RA-Patienten durch Stimulation mit IL-1, TNF- α , tendenziell durch CpG sowie insbesondere bei OA durch BAFF. Nach Stimulation mit CpG konnte bei OA die TACI-Expression hingegen verringert werden. Als positive Regulatoren für BCMA ließen sich IL-1 und IFN- γ identifizieren. Vor allem bei OA wirkte sich CpG hingegen negativ auf die BCMA-Expression aus.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich BAFF entgegen der Erwartungen bei SF eher negativ auf das Überleben der Zellen auswirkt. Die Versuche, diese Wirkung durch Hemmung der bekannten Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA aufzuheben blieben jedoch erfolglos. Des Weiteren ergaben sich Hinweise darauf, dass diese Wirkungen möglicherweise mit Größe und Art des verwendeten BAFFs zusammenhängen.

6 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| ACPA | Antikörper gegen zitrullinierte Proteine |
| ACR | American College of Rheumatology |
| ANOVA | analysis of variance |
| AP | activator protein |
| APRIL | a proliferation-inducing ligand |
| BAFF | B-cell activating factor of the TNF-family |
| BAFF-R | B-cell activating factor of the TNF-family-Rezeptor |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma 2 |
| BCMA | B-cell maturation antigen |
| bFGF | basic fibroblast growth factor |
| BLyS | B-lymphocyte stimulator |
| BMI | Body-Mass-Index |
| BSG | Blutsenkungsgeschwindigkeit |
| CAML | calcium-modulator and cyclophilin ligand |
| CD | cluster of differentiation |
| CpG | CG-reiche DNA-Abschnitte |
| CRD | Cystein-reiche Domäne |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CXCL16 | chemokine (C-X-C motif) ligand 16 |
| DAMP | damage-associated molecular pattern |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| Erk | extracellular signal-regulated kinase |
| EULAR | European League Against Rheumatism |
| FACS | fluorescence-activated cell sorting |
| FITC | Fluoresceinisothiocyant |
| FLIP | FLICE-inhibitory protein |
| FSC | Vorwärtsstreulicht |
| GM-CSF | granulocyte-macrophage colony-stimulating factor |
| HCV | Hepatitis C-Virus |
| HIV | human immunodeficiency virus |
| HLA | human leukocyte antigen |
| HRP | Meerrettichperoxidase |
| IFN | Interferon |
| IKK | IκB-Kinase |
| IL | Interleukin |
| JNK | c-jun-N-terminal-kinase |

| | |
|---------------|--|
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MAP | Mitogen-aktiviertes Protein |
| MCP | monocyte chemoattractant protein |
| M-CSF | macrophage colony-stimulating factor |
| MHC | major histocompatibility complex |
| MIP | macrophage inflammatory protein |
| MMP | Matrix-Metalloproteinase |
| NFκB | nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| NgR | Nogo-66-Rezeptor |
| OA | Osteoarthrose |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PAMP | pathogen-associated molecular pattern |
| PE | Phycoerythrin |
| PI | Propidiumiodid |
| PMA | Phorbolmyristataacetat |
| PTEN | phosphatase and tensin homolog |
| PTPN22 | protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RA | Rheumatoide Arthritis |
| RANKL | receptor activator of NF-κB ligand |
| RANTES | regulated on activation, normal T cell expressed and secreted |
| RF | Rheumafaktor |
| RSV | respiratoy syncytial virus |
| SDF | stromal cell-derived factor |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SF | Synoviale Fibroblasten |
| SLE | Systemischer Lupus erythematodes |
| SSC | Seitwärtsstreulicht |
| STAT4 | Signal transducer and activator of transcription 4 |
| Sumo-1 | small ubiquitin-related modifier 1 |
| TAC1 | Transmembrane Activator and Calcium signal modulating cyclophilin ligand Interactor |
| TALL-1 | TNF- and ApoL-related leukocyte-expressed ligand 1 |
| TBS | Tris-buffered saline |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TEP | Totale Endoprothese |
| TGF | transforming growth factor |

| | |
|--------------|------------------------------------|
| THD | TNF homology domain |
| TLR | Toll-like-Rezeptor |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TWEAK | TNF-like weak inducer of apoptosis |
| VCAM | vascular cell adhesion molecule |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |

7 Literaturverzeichnis

1. Cross, M. *et al.* The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Annals of the Rheumatic Diseases* (2014).
2. Symmons, D.P. Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* **16**, 707–722 (2002).
3. Silman, A.J. *et al.* Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br. J. Rheumatol.* **32**, 903–907 (1993).
4. MacGregor, A.J. *et al.* Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* **43**, 30–37 (2000).
5. Stastny, P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **298**, 869–871 (1978).
6. Gregersen, P.K., Silver, J. & Winchester, R.J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **30**, 1205–1213 (1987).
7. Begovich, A.B. *et al.* A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 330–337 (2004).
8. Remmers, E.F. *et al.* STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* **357**, 977–986 (2007).
9. Symmons, D.P. *et al.* Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum.* **40**, 1955–1961 (1997).
10. Albano, S.A., Santana-Sahagun, E. & Weisman, M.H. Cigarette smoking and rheumatoid arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* **31**, 146–159 (2001).
11. Pablo, P. de, Chapple, Iain L C, Buckley, C.D. & Dietrich, T. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* **5**, 218–224 (2009).
12. Hart, J.E., Laden, F., Puett, R.C., Costenbader, K.H. & Karlson, E.W. Exposure to traffic pollution and increased risk of rheumatoid arthritis. *Environ. Health Perspect.* **117**, 1065–1069 (2009).
13. Doran, M.F., Crowson, C.S., O'Fallon, W.M. & Gabriel, S.E. The effect of oral contraceptives and estrogen replacement therapy on the risk of rheumatoid arthritis: a population based study. *J. Rheumatol.* **31**, 207–213 (2004).
14. Källberg, H. *et al.* Alcohol consumption is associated with decreased risk of rheumatoid arthritis: results from two Scandinavian case-control studies. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 222–227 (2009).
15. Lee, D.M. & Weinblatt, M.E. Rheumatoid arthritis. *Lancet* **358**, 903–911 (2001).
16. Allaire, S., Wolfe, F., Niu, J. & Lavalley, M.P. Contemporary prevalence and incidence of work disability associated with rheumatoid arthritis in the US. *Arthritis Rheum.* **59**, 474–480 (2008).

17. Sokka, T., Kautiainen, H., Möttönen, T. & Hannonen, P. Work disability in rheumatoid arthritis 10 years after the diagnosis. *J. Rheumatol.* **26**, 1681–1685 (1999).
18. Sokka, T., Abelson, B. & Pincus, T. Mortality in rheumatoid arthritis: 2008 update. *Clin. Exp. Rheumatol.* **26**, S35-61 (2008).
19. Machold, K.P. *et al.* Very recent onset rheumatoid arthritis: clinical and serological patient characteristics associated with radiographic progression over the first years of disease. *Rheumatology (Oxford)* **46**, 342–349 (2007).
20. Dixey, J., Solymossy, C. & Young, A. Is it possible to predict radiological damage in early rheumatoid arthritis (RA)? A report on the occurrence, progression, and prognostic factors of radiological erosions over the first 3 years in 866 patients from the Early RA Study (ERAS). *J Rheumatol Suppl* **69**, 48–54 (2004).
21. Sharp, J.T., Lidsky, M.D., Collins, L.C. & Moreland, J. Methods of scoring the progression of radiologic changes in rheumatoid arthritis. Correlation of radiologic, clinical and laboratory abnormalities. *Arthritis Rheum.* **14**, 706–720 (1971).
22. Larsen, A. A radiological method for grading the severity of rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* **4**, 225–233 (1975).
23. Østergaard, M., Pedersen, S.J. & Døhn, U.M. Imaging in rheumatoid arthritis--status and recent advances for magnetic resonance imaging, ultrasonography, computed tomography and conventional radiography. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **22**, 1019–1044 (2008).
24. Anderson, J.J., Wells, G., Verhoeven, A.C. & Felson, D.T. Factors predicting response to treatment in rheumatoid arthritis: the importance of disease duration. *Arthritis Rheum.* **43**, 22–29 (2000).
25. Bukhari *et al.* Influence of disease-modifying therapy on radiographic outcome in inflammatory polyarthritis at five years: results from a large observational inception study. *Arthritis Rheum.* **48**, 46–53 (2003).
26. Egsmose, C. *et al.* Patients with rheumatoid arthritis benefit from early 2nd line therapy: 5 year followup of a prospective double blind placebo controlled study. *J. Rheumatol.* **22**, 2208–2213 (1995).
27. Lard, L.R. *et al.* Early versus delayed treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis: comparison of two cohorts who received different treatment strategies. *Am. J. Med.* **111**, 446–451 (2001).
28. Symmons, D.P., Jones, M.A., Scott, D.L. & Prior, P. Longterm mortality outcome in patients with rheumatoid arthritis: early presenters continue to do well. *J. Rheumatol.* **25**, 1072–1077 (1998).
29. van Aken, J. *et al.* Radiological outcome after four years of early versus delayed treatment strategy in patients with recent onset rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 274–279 (2004).
30. van der Heide, A *et al.* The effectiveness of early treatment with "second-line" antirheumatic drugs. A randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.* **124**, 699–707 (1996).

31. Aletaha, D. *et al.* 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 1580–1588 (2010).
32. Nishimura, K. *et al.* Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann. Intern. Med.* **146**, 797–808 (2007).
33. Rantapää-Dahlqvist, S. *et al.* Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 2741–2749 (2003).
34. Nielen, Markus M J *et al.* Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* **50**, 380–386 (2004).
35. McInnes, I.B. & Schett, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2205–2219 (2011).
36. Imboden, J.B. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annu Rev Pathol* **4**, 417–434 (2009).
37. Firestein, G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* **423**, 356–361 (2003).
38. Panayi, G.S. Even though T-cell-directed trials have been of limited success, is there reason for optimism? *Nat Clin Pract Rheumatol* **2**, 58–59 (2006).
39. Emery, P. The therapeutic potential of costimulatory blockade with CTLA4Ig in rheumatoid arthritis. *Expert Opin Investig Drugs* **12**, 673–681 (2003).
40. Steinman, L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med.* **13**, 139–145 (2007).
41. Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M. & Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179–189 (2006).
42. Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, Kingston H G & Lavelle, E.C. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **203**, 1685–1691 (2006).
43. Mangan, P.R. *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **441**, 231–234 (2006).
44. Miossec, P., Korn, T. & Kuchroo, V.K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N. Engl. J. Med.* **361**, 888–898 (2009).
45. Hirota, K. *et al.* Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med* **204**, 2803–2812 (2007).
46. Ju, J.H. *et al.* IL-23 induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression on CD4+ T cells and promotes osteoclastogenesis in an autoimmune arthritis model. *J. Immunol.* **181**, 1507–1518 (2008).
47. Thornton, A.M. & Shevach, E.M. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.* **164**, 183–190 (2000).

48. Leipe, J., Skapenko, A., Lipsky, P.E. & Schulze-Koops, H. Regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **7**, 93 (2005).
49. Valencia, X. *et al.* TNF downmodulates the function of human CD4⁺CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood* **108**, 253–261 (2006).
50. Ehrenstein, M.R. *et al.* Compromised Function of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Reversal by Anti-TNF α Therapy. *J Exp Med* **200**, 277–285 (2004).
51. Edwards, Jonathan C W *et al.* Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2572–2581 (2004).
52. Kuhn, K.A. *et al.* Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J Clin Invest* **116**, 961–973 (2006).
53. Hamilton, J.A. & Tak, P.P. The dynamics of macrophage lineage populations in inflammatory and autoimmune diseases. *Arthritis Rheum.* **60**, 1210–1221 (2009).
54. Gierut, A., Perlman, H. & Pope, R.M. Innate Immunity and Rheumatoid Arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* **36**, 271–296 (2010).
55. Smith, M.D. *et al.* Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints. *Ann. Rheum. Dis.* **62**, 303–307 (2003).
56. Valencia, X. *et al.* Cadherin-11 Provides Specific Cellular Adhesion between Fibroblast-like Synoviocytes. *J Exp Med* **200**, 1673–1679 (2004).
57. Pitsillides, A.A., Wilkinson, L.S., Mehdizadeh, S., Bayliss, M.T. & Edwards, J.C. Uridine diphosphoglucose dehydrogenase activity in normal and rheumatoid synovium: the description of a specialized synovial lining cell. *Int J Exp Pathol* **74**, 27–34 (1993).
58. Bartok, B. & Firestein, G.S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* **233**, 233–255 (2010).
59. Takemura, S. *et al.* Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J. Immunol.* **167**, 1072–1080 (2001).
60. Lefevre, S. *et al.* Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med* **15**, 1414–1420 (2009).
61. Huber, L.C. *et al.* Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **45**, 669–675 (2006).
62. Pap, T. *et al.* Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction. *Arthritis Res* **2**, 59–64 (2000).
63. Lane, D.P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15–16 (1992).
64. Tak, P.P., Zvaifler, N.J., Green, D.R. & Firestein, G.S. Rheumatoid arthritis and p53: how oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases. *Immunology Today* **21**, 78–82 (2000).

65. Lafyatis, R. *et al.* Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids. *J. Clin. Invest.* **83**, 1267–1276 (1989).
66. Müller-Ladner, U. *et al.* Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am. J. Pathol.* **149**, 1607–1615 (1996).
67. Paleolog, E.M. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* **4 Suppl 3**, S81-90 (2002).
68. Bodolay, E., Koch, A.E., Kim, J., Szegedi, G. & Szekanecz, Z. Angiogenesis and chemokines in rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases. *J Cellular Mol Med* **6**, 357–376 (2002).
69. Ohata, J. *et al.* Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines. *J. Immunol.* **174**, 864–870 (2005).
70. Hamilton, J.A., Filonzi, E.L. & Ianches, G. Regulation of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) production in cultured human synovial fibroblasts. *Growth Factors* **9**, 157–165 (1993).
71. Leizer, T., Cebon, J., Layton, J.E. & Hamilton, J.A. Cytokine regulation of colony-stimulating factor production in cultured human synovial fibroblasts: I. Induction of GM-CSF and G-CSF production by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Blood* **76**, 1989–1996 (1990).
72. Brennan, F.M. & McInnes, I.B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **118**, 3537–3545 (2008).
73. Hynes, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687 (2002).
74. Ishikawa, H. *et al.* An immunohistochemical and immunoelectron microscopic study of adhesion molecules in synovial pannus formation in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* **16**, 53–60 (1996).
75. Rinaldi, N. *et al.* Increased expression of integrins on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis in vitro correlates with enhanced binding to extracellular matrix proteins. *Ann. Rheum. Dis.* **56**, 45–51 (1997).
76. Kriegsmann, J. *et al.* Expression of vascular cell adhesion molecule-1 mRNA and protein in rheumatoid synovium demonstrated by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Lab. Invest.* **72**, 209–214 (1995).
77. Burrage, P.S., Mix, K.S. & Brinckerhoff, C.E. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front. Biosci.* **11**, 529–543 (2006).
78. Sabe, F., Fox, D. & Weiss, S.J. Membrane-type I matrix metalloproteinase-dependent regulation of rheumatoid arthritis synoviocyte function. *J. Immunol.* **184**, 6396–6406 (2010).
79. Gravallese, E.M. *et al.* Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am. J. Pathol.* **152**, 943–951 (1998).
80. Gravallese, E.M. *et al.* Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum.* **43**, 250–258 (2000).

81. Takayanagi, H. *et al.* Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **43**, 259–269 (2000).
82. Han, Z., Boyle, D.L., Manning, A.M. & Firestein, G.S. AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity* **28**, 197–208 (1998).
83. Li, Z. & Nabel, G.J. A new member of the I kappaB protein family, I kappaB epsilon, inhibits RelA (p65)-mediated NF-kappaB transcription. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6184–6190 (1997).
84. Aupperle, K.R. *et al.* NF-kappa B regulation by I kappa B kinase in primary fibroblast-like synoviocytes. *J. Immunol.* **163**, 427–433 (1999).
85. Chen, Z. *et al.* Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* **9**, 1586–1597 (1995).
86. Mengshol, J.A., Vincenti, M.P. & Brinckerhoff, C.E. IL-1 induces collagenase-3 (MMP-13) promoter activity in stably transfected chondrocytic cells: requirement for Runx-2 and activation by p38 MAPK and JNK pathways. *Nucleic Acids Res.* **29**, 4361–4372 (2001).
87. Chen, C.C., Rosenbloom, C.L., Anderson, D.C. & Manning, A.M. Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I kappa B-alpha phosphorylation. *J. Immunol.* **155**, 3538–3545 (1995).
88. Vasudevan, K.M., Gurusurthy, S. & Rangnekar, V.M. Suppression of PTEN Expression by NF-B Prevents Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 1007–1021 (2004).
89. Karin, M., Liu, Z.g. & Zandi, E. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 240–246 (1997).
90. Iwahashi, M. *et al.* Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **50**, 1457–1467 (2004).
91. Radstake, Timothy R D J *et al.* Expression of toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon-gamma. *Arthritis and rheumatism* **50**, 3856–3865 (2004).
92. Roelofs, M.F. *et al.* The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis and rheumatism* **52**, 2313–2322 (2005).
93. Iwaki, D. *et al.* The extracellular toll-like receptor 2 domain directly binds peptidoglycan derived from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **277**, 24315–24320 (2002).
94. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **124**, 783–801, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867406001905> (2006).
95. Ospelt, C. *et al.* Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. *Arthritis and rheumatism* **58**, 3684–3692 (2008).

96. Brentano, F., Schorr, O., Gay, R.E., Gay, S. & Kyburz, D. RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3. *Arthritis and rheumatism* **52**, 2656–2665 (2005).
97. Kim, K.-W. *et al.* TLR-3 enhances osteoclastogenesis through upregulation of RANKL expression from fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Immunology letters* **124**, 9–17 (2009).
98. Bodmer, J.-L., Schneider, P. & Tschopp, J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 19–26 (2002).
99. Schneider, P. *et al.* BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J. Exp. Med.* **189**, 1747–1756 (1999).
100. Shu, H.B., Hu, W.H. & Johnson, H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 680–683 (1999).
101. Moore, P.A. *et al.* BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science* **285**, 260–263 (1999).
102. Bossen, C. & Schneider, P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin. Immunol.* **18**, 263–275 (2006).
103. Liu, Y. *et al.* Crystal structure of sTALL-1 reveals a virus-like assembly of TNF family ligands. *Cell* **108**, 383–394 (2002).
104. Cachero, T.G. *et al.* Formation of virus-like clusters is an intrinsic property of the tumor necrosis factor family member BAFF (B cell activating factor). *Biochemistry* **45**, 2006–2013 (2006).
105. Hahne, M. *et al.* APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J. Exp. Med.* **188**, 1185–1190 (1998).
106. Lopez-Fraga, M., Fernandez, R., Albar, J.P. & Hahne, M. Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. *EMBO Rep* **2**, 945–951 (2001).
107. Wallweber, Heidi J A, Compaan, D.M., Starovasnik, M.A. & Hymowitz, S.G. The crystal structure of a proliferation-inducing ligand, APRIL. *J. Mol. Biol.* **343**, 283–290 (2004).
108. Pradet-Balade, B. *et al.* An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein. *EMBO J* **21**, 5711–5720 (2002).
109. Roschke, V. *et al.* BLyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *J. Immunol.* **169**, 4314–4321 (2002).
110. Schneider, P. The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 282–289 (2005).
111. Mackay, F. & Schneider, P. Cracking the BAFF code. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 491–502 (2009).
112. Cremasco, V. *et al.* B cell homeostasis and follicle confines are governed by fibroblastic reticular cells. *Nature immunology* **15**, 973–981 (2014).

113. van Chu, T., Enghard, P., Riemekasten, G. & Berek, C. In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells. *J. Immunol.* **179**, 5947–5957 (2007).
114. Kato, A., Truong-Tran, A.Q., Scott, A.L., Matsumoto, K. & Schleimer, R.P. Airway epithelial cells produce B cell-activating factor of TNF family by an IFN-beta-dependent mechanism. *J. Immunol.* **177**, 7164–7172 (2006).
115. Ittah, M. *et al.* Viruses induce high expression of BAFF by salivary gland epithelial cells through TLR- and type-I IFN-dependent and -independent pathways. *Eur. J. Immunol.* **38**, 1058–1064 (2008).
116. Krumbholz, M. *et al.* BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J. Exp. Med.* **201**, 195–200 (2005).
117. Alsaleh, G. *et al.* BAFF synthesis by rheumatoid synoviocytes is positively controlled by alpha5beta1 integrin stimulation and is negatively regulated by tumor necrosis factor alpha and Toll-like receptor ligands. *Arthritis Rheum.* **56**, 3202–3214 (2007).
118. Alsaleh, G. *et al.* Synovial fibroblasts promote immunoglobulin class switching by a mechanism involving BAFF. *European journal of immunology* **41**, 2113–2122 (2011).
119. Thompson, J.S. *et al.* BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science* **293**, 2108–2111 (2001).
120. Yan, M. *et al.* Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. *Curr. Biol.* **11**, 1547–1552 (2001).
121. Darce, J.R., Arendt, B.K., Wu, X. & Jelinek, D.F. Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. *J. Immunol.* **179**, 7276–7286 (2007).
122. Mackay, F. & Leung, H. The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin. Immunol.* **18**, 284–289 (2006).
123. Bülow, G.v. NF-AT Activation Induced by a CAML-Interacting Member of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily. *Science* **278**, 138–141 (1997).
124. Wu, Y. *et al.* Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BLyS. *J. Biol. Chem.* **275**, 35478–35485 (2000).
125. Hymowitz, S.G. *et al.* Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. *J. Biol. Chem.* **280**, 7218–7227 (2005).
126. Bossen, C. *et al.* TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. *Blood* **111**, 1004–1012 (2008).
127. Bischof, D. *et al.* Selective activation of TACI by syndecan-2. *Blood* **107**, 3235–3242 (2006).
128. Gras, M.P. *et al.* BCMAp: an integral membrane protein in the Golgi apparatus of human mature B lymphocytes. *Int. Immunol.* **7**, 1093–1106 (1995).

129. Marsters, S.A. *et al.* Interaction of the TNF homologues BLYS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI. *Curr. Biol.* **10**, 785–788 (2000).
130. Gross, J.A. *et al.* TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* **404**, 995–999 (2000).
131. Patel, D.R. *et al.* Engineering an APRIL-specific B cell maturation antigen. *J. Biol. Chem.* **279**, 16727–16735 (2004).
132. Ingold, K. *et al.* Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *J. Exp. Med.* **201**, 1375–1383 (2005).
133. Hendriks, J. *et al.* Heparan sulfate proteoglycan binding promotes APRIL-induced tumor cell proliferation. *Cell Death Differ.* **12**, 637–648 (2005).
134. Kimberley, F.C. *et al.* The proteoglycan (heparan sulfate proteoglycan) binding domain of APRIL serves as a platform for ligand multimerization and cross-linking. *FASEB J.* **23**, 1584–1595 (2009).
135. Zhang, L. *et al.* Identification of BLYS (B lymphocyte stimulator), a non-myelin-associated protein, as a functional ligand for Nogo-66 receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**, 6348–6352 (2009).
136. Gorelik, L. *et al.* Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells. *J. Exp. Med.* **198**, 937–945 (2003).
137. Loder, F. *et al.* B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J. Exp. Med.* **190**, 75–89 (1999).
138. Schiemann, B. *et al.* An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* **293**, 2111–2114 (2001).
139. Gross, J.A. *et al.* TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLYS. *Immunity* **15**, 289–302 (2001).
140. Amanna, I.J., Dingwall, J.P. & Hayes, C.E. Enforced bcl-xL gene expression restored splenic B lymphocyte development in BAFF-R mutant mice. *J. Immunol.* **170**, 4593–4600 (2003).
141. Rahman, Z. & Manser, T. B cells expressing Bcl-2 and a signaling-impaired BAFF-specific receptor fail to mature and are deficient in the formation of lymphoid follicles and germinal centers. *J. Immunol.* **173**, 6179–6188 (2004).
142. Tardivel, A. *et al.* The anti-apoptotic factor Bcl-2 can functionally substitute for the B cell survival but not for the marginal zone B cell differentiation activity of BAFF. *Eur. J. Immunol.* **34**, 509–518 (2004).
143. Vora, K.A. *et al.* Cutting edge: germinal centers formed in the absence of B cell-activating factor belonging to the TNF family exhibit impaired maturation and function. *J. Immunol.* **171**, 547–551 (2003).

144. Rauch, M., Tussiwand, R., Bosco, N. & Rolink, A.G. Crucial role for BAFF-BAFF-R signaling in the survival and maintenance of mature B cells. *PLoS ONE* **4**, e5456 (2009).
145. Benson, M.J. *et al.* Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J. Immunol.* **180**, 3655–3659 (2008).
146. Scholz, J.L. *et al.* BLyS inhibition eliminates primary B cells but leaves natural and acquired humoral immunity intact. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 15517–15522 (2008).
147. Yan, M. *et al.* Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nat. Immunol.* **2**, 638–643 (2001).
148. Seshasayee, D. *et al.* Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor. *Immunity* **18**, 279–288 (2003).
149. O'Connor, B.P. *et al.* BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J. Exp. Med.* **199**, 91–98 (2004).
150. Litinskiy, M.B. *et al.* DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat. Immunol.* **3**, 822–829 (2002).
151. Castigli, E. *et al.* TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J. Exp. Med.* **201**, 35–39 (2005).
152. Salzer, U. *et al.* Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat. Genet.* **37**, 820–828 (2005).
153. Castigli, E. *et al.* TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat. Genet.* **37**, 829–834 (2005).
154. Huard, B., Schneider, P., Mauri, D., Tschopp, J. & French, L.E. T cell costimulation by the TNF ligand BAFF. *J. Immunol.* **167**, 6225–6231 (2001).
155. Ng, L.G. *et al.* B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J. Immunol.* **173**, 807–817 (2004).
156. Chen, M. *et al.* The function of BAFF on T helper cells in autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* (2013).
157. Ou, X., Xu, S. & Lam, K.-P. Deficiency in TNFRSF13B (TACI) expands T-follicular helper and germinal center B cells via increased ICOS-ligand expression but impairs plasma cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 15401–15406 (2012).
158. Zhou, X. *et al.* BAFF promotes Th17 cells and aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS ONE* **6**, e23629 (2011).
159. Serada, S. *et al.* IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 9041–9046 (2008).

160. Zheng, S.G., Wang, J. & Horwitz, D.A. Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6. *J. Immunol.* **180**, 7112–7116 (2008).
161. Rodriguez, B. *et al.* Plasma levels of B-lymphocyte stimulator increase with HIV disease progression. *AIDS (London, England)* **17**, 1983–1985 (2003).
162. Toubi, E. *et al.* Elevated serum B-Lymphocyte activating factor (BAFF) in chronic hepatitis C virus infection: association with autoimmunity. *Journal of autoimmunity* **27**, 134–139 (2006).
163. McNamara, P.S. *et al.* Respiratory syncytial virus infection of airway epithelial cells, in vivo and in vitro, supports pulmonary antibody responses by inducing expression of the B cell differentiation factor BAFF. *Thorax* **68**, 76–81 (2013).
164. Ittah, M. *et al.* Induction of B cell-activating factor by viral infection is a general phenomenon, but the types of viruses and mechanisms depend on cell type. *Journal of innate immunity* **3**, 200–207 (2011).
165. Jones, D.D. *et al.* B cell activating factor inhibition impairs bacterial immunity by reducing T cell-independent IgM secretion. *Infection and immunity* **81**, 4490–4497 (2013).
166. Pongratz, G., Hochrinner, H., Straub, R.H., Lang, S. & Brännler, T. B cell activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) behaves as an acute phase reactant in acute pancreatitis. *PloS one* **8**, e54297 (2013).
167. He, B. *et al.* Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **172**, 3268–3279 (2004).
168. Novak, A.J. *et al.* Expression of BLyS and its receptors in B-cell non-Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome. *Blood* **104**, 2247–2253 (2004).
169. Parameswaran, R., Müschen, M., Kim, Y.-M., Groffen, J. & Heisterkamp, N. A functional receptor for B-cell-activating factor is expressed on human acute lymphoblastic leukemias. *Cancer research* **70**, 4346–4356 (2010).
170. Novak, A.J., Bram, R.J., Kay, N.E. & Jelinek, D.F. Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood* **100**, 2973–2979 (2002).
171. Tecchio, C. *et al.* High serum levels of B-lymphocyte stimulator are associated with clinical-pathological features and outcome in classical Hodgkin lymphoma. *British journal of haematology* **137**, 553–559 (2007).
172. MacKay, F. *et al.* Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *The Journal of experimental medicine* **190**, 1697–1710 (1999).
173. Khare, S.D. *et al.* Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 3370–3375 (2000).

174. Groom, J. *et al.* Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. *The Journal of clinical investigation* **109**, 59–68 (2002).
175. Thien, M. *et al.* Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* **20**, 785–798 (2004).
176. Groom, J.R. *et al.* BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1959–1971 (2007).
177. Katsenelson, N. *et al.* Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF- and APRIL-mediated immunoglobulin secretion. *European journal of immunology* **37**, 1785–1795 (2007).
178. Treml, L.S. *et al.* TLR stimulation modifies BLyS receptor expression in follicular and marginal zone B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**, 7531–7539 (2007).
179. Zhang, J. *et al.* Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **166**, 6–10 (2001).
180. Stohl, W. *et al.* B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations. *Arthritis and rheumatism* **48**, 3475–3486 (2003).
181. Eilertsen, G.Ø., van Ghelue, M., Strand, H. & Nossent, J.C. Increased levels of BAFF in patients with systemic lupus erythematosus are associated with acute-phase reactants, independent of BAFF genetics: a case-control study. *Rheumatology (Oxford, England)* **50**, 2197–2205 (2011).
182. Mariette, X. *et al.* The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases* **62**, 168–171 (2003).
183. Lavie, F. *et al.* Expression of BAFF (BLyS) in T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *The Journal of pathology* **202**, 496–502 (2004).
184. Daridon, C. *et al.* Aberrant expression of BAFF by B lymphocytes infiltrating the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis and rheumatism* **56**, 1134–1144 (2007).
185. Krumbholz, M. *et al.* BAFF is elevated in serum of patients with Wegener's granulomatosis. *Journal of autoimmunity* **25**, 298–302 (2005).
186. Fabris, M. *et al.* B-Lymphocyte stimulator (BLyS) up-regulation in mixed cryoglobulinaemia syndrome and hepatitis-C virus infection. *Rheumatology (Oxford, England)* **46**, 37–43 (2007).
187. Matsushita, T. *et al.* Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis and rheumatism* **54**, 192–201 (2006).
188. Cheema, G.S., Roschke, V., Hilbert, D.M. & Stohl, W. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis and rheumatism* **44**, 1313–1319 (2001).
189. Bosello, S. *et al.* Concentrations of BAFF correlate with autoantibody levels, clinical disease activity, and response to treatment in early rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* **35**, 1256–1264 (2008).

190. Tan, S.-M. *et al.* Local production of B lymphocyte stimulator protein and APRIL in arthritic joints of patients with inflammatory arthritis. *Arthritis and rheumatism* **48**, 982–992 (2003).
191. Nakajima, K. *et al.* Expression of BAFF and BAFF-R in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology* **36**, 365–372 (2007).
192. Nagatani, K. *et al.* Rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes express BCMA and are stimulated by APRIL. *Arthritis and rheumatism* **56**, 3554–3563 (2007).
193. Geng, Y. & Zhang, Z.-I. Comparative study on the level of B lymphocyte stimulator (BlyS) and frequency of lymphocytes between sero-negative and sero-positive rheumatoid arthritis patients. *International journal of rheumatic diseases* **15**, 478–485 (2012).
194. Zhao, J., Guo, J., Wang, L., Zhou, W. & Zhang, Z. The role of a proliferation-inducing ligand (APRIL) in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology* **43**, 462–469 (2014).
195. Seyler, T.M. *et al.* BlyS and APRIL in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation* **115**, 3083–3092 (2005).
196. Gabay, C. *et al.* Synovial tissues concentrate secreted APRIL. *Arthritis research & therapy* **11**, R144 (2009).
197. Magalhães, R., Stiehl, P., Morawietz, L., Berek, C. & Krenn, V. Morphological and molecular pathology of the B cell response in synovitis of rheumatoid arthritis. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **441**, 415–427 (2002).
198. Weyand, C.M. & Goronzy, J.J. Ectopic germinal center formation in rheumatoid synovitis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **987**, 140–149 (2003).
199. Song, Y.W. & Kang, E.H. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* **103**, 139–146 (2010).
200. Fairfax, K., Mackay, I.R. & Mackay, F. BAFF/BlyS inhibitors: A new prospect for treatment of systemic lupus erythematosus. *IUBMB life* **64**, 595–602 (2012).
201. Navarra, S.V. *et al.* Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* **377**, 721–731 (2011).
202. Furie, R. *et al.* A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* **63**, 3918–3930 (2011).
203. Stohl, W. *et al.* Efficacy and safety of belimumab in patients with rheumatoid arthritis: a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging Study. *The Journal of rheumatology* **40**, 579–589 (2013).
204. Tak, P.P. *et al.* Atacicept in patients with rheumatoid arthritis: results of a multicenter, phase Ib, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating, single- and repeated-dose study. *Arthritis and rheumatism* **58**, 61–72 (2008).

205. Ginzler, E.M. *et al.* Atacicept in combination with MMF and corticosteroids in lupus nephritis: results of a prematurely terminated trial. *Arthritis research & therapy* **14**, R33 (2012).
206. Stohl, W. Therapeutic targeting of the BAFF/APRIL axis in systemic lupus erythematosus. *Expert opinion on therapeutic targets* **18**, 473–489 (2014).
207. Fadok, V.A. *et al.* Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **148**, 2207–2216 (1992).
208. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods* **184**, 39–51 (1995).
209. Ohata, J. *et al.* Fibroblast-Like Synoviocytes of Mesenchymal Origin Express Functional B Cell-Activating Factor of the TNF Family in Response to Proinflammatory Cytokines. *The Journal of Immunology* **174**, 864–870 (2005).
210. Lugli, E., Roederer, M. & Cossarizza, A. Data analysis in flow cytometry: the future just started. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **77**, 705–713 (2010).
211. Chang, Y. *et al.* APRIL promotes proliferation, secretion and invasion of fibroblast-like synoviocyte from rats with adjuvant induced arthritis. *Molecular immunology* **64**, 90–98 (2015).
212. Lee, G.-H., Lee, J., Lee, J.-W., Choi, W.S. & Moon, E.-Y. B cell activating factor-dependent expression of vascular endothelial growth factor in MH7A human synoviocytes stimulated with tumor necrosis factor- α . *International immunopharmacology* **17**, 142–147 (2013).
213. von Bülow, G U, van Deursen, J M & Bram, R.J. Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity* **14**, 573–582 (2001).
214. Hatzoglou, A. *et al.* TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **165**, 1322–1330 (2000).
215. Zonca, M. *et al.* APRIL and BAFF proteins increase proliferation of human adipose-derived stem cells through activation of Erk1/2 MAP kinase. *Tissue engineering. Part A* **18**, 852–859 (2012).
216. Kay, J. & Calabrese, L. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* **43 Suppl 3**, iii2-iii9 (2004).
217. Brennan, F.M., Chantry, D., Jackson, A., Maini, R. & Feldmann, M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)* **2**, 244–247 (1989).
218. Feldmann, M., Brennan, F.M. & Maini, R.N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annual review of immunology* **14**, 397–440 (1996).

219. Karonitsch, T. *et al.* IFN-gamma promotes fibroblast-like synoviocytes motility. *Annals of the Rheumatic Diseases* **69**, A63 (2010).
220. Reyes, L.I. *et al.* Dexamethasone inhibits BAFF expression in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine* **42**, 170–178 (2008).
221. Page, C.E. *et al.* Interferon-gamma inhibits interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase production by synovial fibroblasts and protects articular cartilage in early arthritis. *Arthritis research & therapy* **12**, R49 (2010).
222. Vermeire, K. *et al.* Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **158**, 5507–5513 (1997).
223. Williams, A.S. *et al.* Interferon-gamma protects against the development of structural damage in experimental arthritis by regulating polymorphonuclear neutrophil influx into diseased joints. *Arthritis and rheumatism* **56**, 2244–2254 (2007).
224. Rönnblom, L. & Eloranta, M.-L. The interferon signature in autoimmune diseases. *Current opinion in rheumatology* **25**, 248–253 (2013).
225. Ghezzi, P. & Dinarello, C.A. IL-1 induces IL-1. III. Specific inhibition of IL-1 production by IFN-gamma. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **140**, 4238–4244 (1988).
226. Yuan, H. *et al.* Characterization of the 5'-flanking region and regulation of transcription of human BAFF-R gene. *DNA and cell biology* **29**, 133–139 (2010).
227. Lettesjö, H. *et al.* Synovial fluid cytokines in patients with rheumatoid arthritis or other arthritic lesions. *Scandinavian journal of immunology* **48**, 286–292 (1998).
228. McNearney, T. *et al.* Excitatory amino acids, TNF-alpha, and chemokine levels in synovial fluids of patients with active arthropathies. *Clinical and experimental immunology* **137**, 621–627 (2004).
229. Kokebie, R. *et al.* The role of synovial fluid markers of catabolism and anabolism in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and asymptomatic organ donors. *Arthritis research & therapy* **13**, R50 (2011).
230. Sacerdote, P. *et al.* Plasma and synovial fluid interleukin-1, interleukin-6 and substance P concentrations in rheumatoid arthritis patients: effect of the nonsteroidal anti inflammatory drugs indomethacin, diclofenac and naproxen. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* **44**, 486–490 (1995).
231. Goh, F.G. & Midwood, K.S. Intrinsic danger: activation of Toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* **51**, 7–23 (2012).
232. Hardenberg, G. *et al.* Specific TLR ligands regulate APRIL secretion by dendritic cells in a PKR-dependent manner. *European journal of immunology* **37**, 2900–2911 (2007).
233. Deng, B.P. *et al.* Soluble BAFF-R produced by decidual stromal cells plays an inhibitory role in monocytes and macrophages. *Reproductive biomedicine online* **24**, 654–663 (2012).

234. Ng, L.G. *et al.* BAFF costimulation of Toll-like receptor-activated B-1 cells. *European journal of immunology* **36**, 1837–1846 (2006).
235. Acosta-Rodríguez, E.V. *et al.* BAFF and LPS cooperate to induce B cells to become susceptible to CD95/Fas-mediated cell death. *European journal of immunology* **37**, 990–1000 (2007).
236. Abu-Rish, E.Y., Amrani, Y. & Browning, M.J. Toll-like receptor 9 activation induces expression of membrane-bound B-cell activating factor (BAFF) on human B cells and leads to increased proliferation in response to both soluble and membrane-bound BAFF. *Rheumatology (Oxford, England)* **52**, 1190–1201 (2013).
237. Kyburz, D. *et al.* Bacterial peptidoglycans but not CpG oligodeoxynucleotides activate synovial fibroblasts by toll-like receptor signaling. *Arthritis & Rheumatism* **48**, 642–650 (2003).
238. Hu, F. *et al.* Toll-like receptors expressed by synovial fibroblasts perpetuate Th1 and th17 cell responses in rheumatoid arthritis. *PloS one* **9**, e100266 (2014).
239. Imboden, J.B. & Stobo, J.D. Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. *The Journal of experimental medicine* **161**, 446–456 (1985).
240. Jeon, S.-T. *et al.* Reverse signaling through BAFF differentially regulates the expression of inflammatory mediators and cytoskeletal movements in THP-1 cells. *Immunology and cell biology* **88**, 148–156 (2010).
241. Brinckerhoff, C.E., McMillan, R.M., Fahey, J.V. & Harris, E.D. Collagenase production by synovial fibroblasts treated with phorbol myristate acetate. *Arthritis and rheumatism* **22**, 1109–1116 (1979).
242. Barbosa, R.R. *et al.* Reduced BAFF-R and increased TACI expression in common variable immunodeficiency. *Journal of clinical immunology* **34**, 573–583 (2014).
243. Woo, Y.J. *et al.* Regulation of B cell activating factor (BAFF) receptor expression by NF-KB signaling in rheumatoid arthritis B cells. *Experimental & molecular medicine* **43**, 350–357 (2011).
244. Patke, A., Mecklenbräuer, I. & Tarakhovsky, A. Survival signaling in resting B cells. *Current opinion in immunology* **16**, 251–255 (2004).
245. Endo, T. *et al.* BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway. *Blood* **109**, 703–710 (2007).
246. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* **35**, 495–516 (2007).
247. Craxton, A., Draves, K.E., Gruppi, A. & Clark, E.A. BAFF regulates B cell survival by downregulating the BH3-only family member Bim via the ERK pathway. *The Journal of experimental medicine* **202**, 1363–1374 (2005).
248. Woodland, R.T. *et al.* Multiple signaling pathways promote B lymphocyte stimulator dependent B-cell growth and survival. *Blood* **111**, 750–760 (2008).

249. Rickert, R.C., Jellusova, J. & Miletic, A.V. Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease. *Immunological reviews* **244**, 115–133 (2011).
250. Woess, C. *et al.* Combined loss of the BH3-only proteins Bim and Bmf restores B-cell development and function in TACI-Ig transgenic mice. *Cell death and differentiation* **22**, 1477–1488 (2015).
251. Yang, S., Li, J.-Y. & Xu, W. Role of BAFF/BAFF-R axis in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Critical reviews in oncology/hematology* **91**, 113–122 (2014).
252. Peperzak, V. *et al.* Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells. *Nature immunology* **14**, 290–297 (2013).
253. Recombinant Human BAFF/BLyS/TNFSF13B Protein: R&D Systems. Available at https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-baff-blys-tnfsf13b-protein_2149-bf.
254. Uniprot Knowledgebase: Q9Y275-1. Tumor necrosis factor ligand superfamily member 13B. Available at <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y275>.
255. Human BAFF/BLyS/TNFSF13B Quantikine ELISA Kit: R&D Systems. Available at https://www.rndsystems.com/products/human-baff-blys-tnfsf13b-quantikine-elisa-kit_dblys0b.
256. Batten, M. *et al.* BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* **192**, 1453–1466 (2000).
257. Amezcua Vesely, María C *et al.* Fc γ RIIb and BAFF differentially regulate peritoneal B1 cell survival. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **188**, 4792–4800 (2012).
258. Thompson, J.S. *et al.* BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population. *The Journal of experimental medicine* **192**, 129–135 (2000).
259. Avery, D.T. *et al.* BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *The Journal of clinical investigation* **112**, 286–297 (2003).

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Tareq Marius Anssar

Geburtsdatum 28. November 1988

Geburtsort München

Schulausbildung

1995 – 1999 Grundschule Altdorf, Altdorf bei Landshut

1999 – 2008 Hans-Leinberger-Gymnasium, Landshut

Juli 2008 Schulabschluss: Abitur, Note 1,6

Grundwehrdienst

Juli 2008 – März 2009 in Roth und Regen

Hochschulausbildung

Okt. 2009 bis Nov. 2015 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg

September 2011 Abschluss des ersten Abschnitts der ärztlichen Prüfung mit der Note „sehr gut“ (1,5) an der Universität Regensburg

Oktober 2014 Abschluss des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung mit der Note „sehr gut“ an der Universität Regensburg

November 2015 Abschluss des dritten Abschnitts der ärztlichen Prüfung mit der Note „sehr gut“ an der Universität Regensburg

9 Danksagung

Meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Georg Pongratz danke ich für die interessante Themenstellung sowie die stets schnelle, freundliche und kompetente Beantwortung aufkommender Fragen.

Auch herzlich danken möchte ich Herrn Dr. Torsten Lowin, auf dessen Rat man sich bei der Planung und Durchführung der Versuche stets verlassen konnte.

Besonderen Dank möchte ich auch Frau Madlen Meltzer für die exzellente Einführung in die Laborarbeit und Frau Tanja Späth für die freundliche Unterstützung bei Fragen zur Methodik aussprechen. Vielen Dank auch an das restliche Laborteam für die angenehme Arbeitsatmosphäre.