

Aus dem CharitéCentrum für Innere Medizin und Dermatologie (CC12)
Medizinische Klinik für Rheumatologie und Klinische Immunologie
Direktor: Prof. Dr. med. Burmester

Habilitationsschrift

Rolle der B-Lymphozyten in der Pathogenese des systemischen Lupus erythematodes - Rationale und Mechanismen B-Zell-modulierender Therapien

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Annett Marita Jacobi
aus Berlin**

Eingereicht: Juli 2009

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

Gutachter 1: Prof. Dr. med. Hanns-Martin Lorenz

Gutachter 2: Prof. Dr. med. Harald Burkhardt

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
2.	Eigene Arbeiten	5
2.1.	Charakterisierung peripherer B-Zell-Subpopulationen von Patienten mit SLE	6
2.1.1.	B-Zellen im peripheren Blut eines SLE-Patienten weisen hochmutierte V-Gene auf	6
2.1.2.	Im peripheren Blut von SLE-Patienten finden sich Plasmazellen mit hochmutierten V-Genen	7
2.1.3.	Die Frequenz der Plasmazellen im peripheren Blut von SLE Patienten korreliert mit der Krankheitsaktivität	8
2.1.4.	Identifikation und Charakterisierung CD27-negativer Gedächtnis-B-Zellen im peripheren Blut von SLE-Patienten	9
2.1.5.	Bei der Mehrheit der CD27 ⁺⁺ CD20 ⁻ Zellen im peripheren Blut von SLE Patienten handelt es sich um HLA-DR ⁺⁺ Plasmablasten	11
2.2.	Mechanismen der B-Zell Toleranz und deren Versagen bei Patienten mit SLE	14
2.3.	Analysen inhibitorischer Co-Rezeptoren des B-Zell-Rezeptors	17
2.3.1.	Siglecs (Sialic-acid binding immunoglobuline-like lectins)	17
2.3.2.	Fc-Rezeptoren und Fc-Rezeptor-ähnliche (FcRL) Moleküle	20
2.3.3.	Intrazelluläre Effekte monoklonaler Antikörper gegen CD22 oder FcγRIIb	22
2.4.	Die Dominanz antigenerfahrener B-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut von SLE-Patienten wird durch selektive BAFF-Blockade verstärkt	23
3.	Diskussion und Ausblick	26
3.1.	Mechanismen der B-Zellaktivierung und Analyse autoreaktiver B-Zellen	26
3.2.	Rationale und Optionen eines selektiven Targetings autoreaktiver B-Lymphozyten	27
3.3.	Therapeutische Beeinflussung aberrant aktivierter B-Lymphozyten	31
4.	Zusammenfassung	32
5.	Literaturangaben	33
6.	Danksagung	40
7.	Erklärung	41

Abkürzungen

AID – activation induced cytidine deaminase

APRIL - a proliferation inducing ligand

BAFF- B cell activating factor

BALB/c – im Labor gezüchtete Albino-Maus-Linie

BCMA - B cell maturation protein

BCR – B cell receptor

BLyS - B lymphocyte costimulator,

CD – cluster of differentiation

CDR – complementarity-determining region

CFSE – carboxyfluorescein succinimidyl ester

ELISA - enzyme linked Immuno sorbent assay

ELISpot Assay- enzyme linked Immuno spot assay

Fc – fragment crystallizable

Fab – fragment antigen binding

HLA – human leukocyte antigen

Ig- immunoglobulin

ITIM - immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif

ITAM - immunoreceptor tyrosine-based activation motif

MDC – myeloid dendritic cell

PBMC – peripheral blood mononuclear cells

PCR – polymerase chain reaction

SCID – severe combined immunodeficiency

SLE – systemischer Lupus erythematosus

SLEDAI – systemic lupus erythematosus disease activity index

TACI -transmembran activator and calmodulin interactor

TLR – Toll-like receptor

TTC-Tetanus Toxoid Fragment C

V-Gen - variable gene

1. Einleitung

Im Laufe der letzten Jahre hat sich die Einstellung zur Rolle der B-Lymphozyten in der Pathogenese verschiedenster Autoimmunerkrankungen deutlich gewandelt. Während bisher angenommen wurde, dass B-Lymphozyten nur bei einer Gruppe von antikörpervermittelten Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen, liegen nun Hinweise vor, die eine Bedeutung von B-Lymphozyten bei der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis, Sklerodermie und sogar des Diabetes mellitus nahe legen (Baroni et al., 2006; Brodie et al., 2008; Wong et al., 2004; Xiu et al., 2008). Neben der Sekretion von Autoantikörpern, ist dabei vor allem die Rolle als antigenpräsentierende Zelle, welche eine Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten herbeiführen kann, in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Es folgte der Einsatz B-Zell-depletierender monoklonaler Antikörper, wie Rituximab, die eigentlich zur Therapie von B-Zell-Lymphomen entwickelt wurden, im Rahmen klinischer Studien an Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen. Im Gegensatz zu Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden die hohen Erwartungen, hinsichtlich der Therapie des SLE, in ersten placebokontrollierten randomisierten Studien bislang nicht erfüllt, obwohl es mittlerweile große Fallserien gibt, die den Erfolg von Rituximab in der SLE-Therapie nahelegen (Anolik et al., 2004; Lu et al., 2009). Es liegen nur unzureichende Erfahrungen zum Thema der Rekonstitution des B-Zellrepertoires nach Depletion vor. Erkenntnisse, die durch Studien autoreaktiver B-Zellen in verschiedenen Tiermodellen gewonnen wurden, deuten auf eine Expansionsneigung derselben nach Beseitigung konkurrierender nicht-autoreaktiver B-Lymphozyten hin (Ekland et al., 2004; Knoechel et al., 2005). Eine mögliche Ursache könnten erhöhte BAFF-Spiegel sein, die nach B-Zell-Depletion gemessen werden (Cambridge et al., 2007), denn BAFF unterstützt das Überleben autoreaktiver B-Zellen (Thien et al., 2004).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten decken in vier Abschnitten (2.1.-2.4.) einige Ursachen für das nur begrenzte Ansprechen vieler SLE-Patienten auf konventionelle aber auch experimentelle, B-Zell-gerichtete Therapien auf. Sie machen deutlich, dass der Pool antigenerfahrener B-Zellen, welcher alle Voraussetzungen zur Antigenpräsentation, raschen Differenzierung und Antikörpersekretion erfüllt und eine Vielzahl autoreaktiver Spezifitäten in sich birgt, trotz immunsuppressiver Therapie bei Patienten mit SLE oft nicht ausreichend beeinflusst wird, was häufig mit Therapieversagen einhergeht. Hinzu kommt eine aberrante, polyklonale Aktivierung der B-Zellen, insbesondere im Rahmen von Erkrankungsschüben, die durch ein Ungleichgewicht B-Zell-aktivierender und -inhibierender Faktoren entsteht und die Fehlfunktion peripherer B-Zell-Toleranzmechanismen verstärken kann. Abschließend werden innovative B-Zell-modulierende Therapieoptionen vorgestellt und diskutiert.

2. Eigene Arbeiten

2.1. Charakterisierung peripherer B-Zell-Subpopulationen von Patienten mit SLE

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) ist ein Prototyp systemischer Autoimmunerkrankungen. Im Gegensatz zur rheumatoiden Arthritis, ist die pathogenetische Schlüsselrolle der B-Zellen und Plasmazellen durch eine Vielzahl tierexperimenteller Studien und Untersuchungen an Patienten mit SLE seit Jahren belegt (Dorner et al., 2009; Hostmann et al., 2008; Jacobi and Diamond, 2005). Im Mittelpunkt steht dabei eine Verschiebung des Gleichgewichtes von antigennaiven und antigenerfahrenen B-Zellsubpopulationen, zugunsten der letzteren (Dorner et al., 2009; Jacobi et al., 2000; Jacobi et al., 2003; Jacobi et al., 2008b). Diese wird beispielsweise durch verschiedene B-Zell-extrinsische Faktoren, wie z.B. Zytokine oder co-stimulatorische Signale (Dorner et al., 2009; Jacobi and Diamond, 2005) oder durch genetische Polymorphismen verschiedener, für die Regulation der B-Zell-Aktivierung wichtiger Strukturen oder Enzyme, hervorgerufen (Harley et al., 2006; Tsuchiya et al., 2006). Dieses Ungleichgewicht mit einer Dominanz antigenerfahrener B-Zellen, welche Gedächtnis-B-Zellen und antikörpersezernierende Zellen umfassen, wird weiter durch die nur geringe Empfindlichkeit dieser B-Zell-Subpopulationen auf nahezu alle bisher etablierten aber auch weitere, bisher noch experimentelle Therapiestrategien, verstärkt (Dorner et al., 2009; Jacobi et al., 2008a; Jacobi et al., 2010a). Die ausgeprägte Aktivierung von B-Zellen bei Patienten mit SLE hat auch die kontinuierliche Differenzierung zu antikörpersezernierenden Zellen zur Folge, was mit einer spontanen Ig-Sekretion einhergehen kann (Dar et al., 1988; Saiki et al., 1985). Wie eigene Untersuchungen an PBMC von SLE-Patienten zeigten, haben neben Zytokinen und co-stimulatorischen Signalen auch Hormone, wie Prolaktin, bereits in physiologischer oder leicht erhöhter Konzentration Einfluss auf die Ig-Sekretion von SLE-B-Zellen (Jacobi et al., 2001).

Im Folgenden sollen zunächst fünf Arbeiten vorgestellt werden, die zum Ziel hatten, die B-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut von SLE-Patienten zu charakterisieren und zu untersuchen, ob ihrem Monitoring eine Rolle in der Diagnostik und Therapieüberwachung von SLE-Patienten zukommt.

2.1.1. *B-Zellen im peripheren Blut eines SLE-Patienten weisen hochmutierte V-Gene auf*

Enhanced mutational activity and disturbed selection of mutations in V_H gene rearrangements in systemic lupus erythematosus.

Jacobi AM, Hansen A, Burmester GR, Dörner T, Lipsky PE. Autoimmunity. 2000;33 (1):61-76.

Die somatische Hypermutation ist ein bedeutender Mechanismus des adaptiven Immunsystems. Durch das Enzym „Activation Induced Cytidine Deaminase“ (AID) kommt es zum Austausch von Basenpaaren, die einen Austausch von Aminosäuren im Bereich der Antigenbindungsstellen des B-Zell-Rezeptors und somit eine Erhöhung der Affinität für ein bestimmtes Antigen mit sich bringen können. Prädilektionsstellen für diesen in Keimzentren ablaufenden Prozess finden sich im Bereich der variablen (V) Gen-Abschnitte der Immunglobulin-Gene. Antigenerfahrene Gedächtnis-B-Zellen weisen somatische Mutationen ihrer V-Gene auf.

Gen-Analysen einzelner aus dem peripheren Blut eines SLE-Patienten und normaler Kontrollen isolierter CD19-positiver B-Zellen erbrachten signifikante Unterschiede in der Mutationsfrequenz und dem Anteil mutierter Schwereketten Gene am Gesamtrepertoire, vereinbar mit einer Dominanz von Gedächtnis-B-Zellen bzw. antigenerfahrenen B-Zellen im peripheren Blut der Patienten (Jacobi et al., 2000). Während ca. 90% der von Lupus-B-Zellen produktiv rearrangierten Schwereketten Gene mutiert waren, wiesen lediglich 40% der B-Zellen normaler Kontrollen mutierte, produktiv rearrangierte Schwereketten Gene auf.

Im Bereich der variablen Ig-Gen-Abschnitte finden sich sogenannte „Hotspots“ der somatischen Hypermutation, welche einen Angriffspunkt für die AID darstellen.

Obwohl sich das Targeting dieser „Hotspots“ im Falle des untersuchten SLE-Patienten nicht von dem gesunder Kontrollen unterschied, deutet doch das erhöhte Verhältnis von Austausch-(R) /stummen (S) Mutationen im Bereich der Genabschnitte, die die Antigen-Bindungsstellen kodieren (CDR, complementarity determining region), auf eine positive Selektion affinitätsgereifter, antigenerfahrener B-Zellen hin.

2.1.2. *Im peripheren Blut von SLE-Patienten finden sich Plasmazellen mit hochmutierten V-Genen*

Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus.

Odendahl M, Jacobi AM, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR, Lipsky PE, Radbruch A, Dörner T.
J Immunol, 2000, 165: 5970-5979.

Unter Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper zur durchflusszytometrischen Phänotypisierung und Differenzierung von B-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut von SLE-Patienten ließen sich weitere Erkenntnisse gewinnen, die das Ungleichgewicht antigenerfahrener und antigennaiver B-Zellen bestätigten (Odendahl et al., 2000). Im Rahmen der durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde ein Antikörper gegen CD27 zur Differenzierung antigennaiver (CD27-negativer) und antigenerfahrener (CD27-positiver) B-Zell-Subpopulationen verwendet, basierend auf den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen von Klein und Agematsu (Agematsu et al., 2000; Klein et al., 1998), die CD27 als Marker für Gedächtnis-B-Zellen etabliert hatten.

Initial fiel eine bei gesunden Kontrollen nicht nachweisbare Subpopulation CD27⁺⁺CD20⁻ Zellen, mit einem Plasmazell-Phänotyp im peripheren Blut mancher SLE-Patienten auf. Die weiterführende Charakterisierung dieser Plasmazellen mittels V-Gen-Analyse zeigte, dass CD27⁺⁺CD20⁻ Plasmazellen im Wesentlichen hochgradig mutierte Schwereketten gene aufwiesen. Erwähnenswert ist auch die Klonalität einiger dieser hochmutierten Schwereketten gene. Obwohl unter Verwendung der Single-Cell-PCR-Technik das rearrangierte Leichtketten gen in dem konkreten Fall nicht amplifiziert werden konnte, und die Spezifität der klonalen Plasmazellen demzufolge nicht zu ermitteln war, ist in Anbetracht der Klonalität und der hohen Mutationsfrequenz sowie des Mutationsmusters von einer antigenabhängigen Affinitätsreifung der analysierten Plasmazellen auszugehen. In Hinblick auf die zum Untersuchungszeitpunkt aktive Erkrankung des SLE-Patienten, erschien die Expansion eines autoreaktiven Klons in der Plasmazell-Subpopulation in diesem Fall sehr wahrscheinlich.

Patienten mit aktiver Erkrankung wiesen eine signifikant höhere Frequenz CD27⁺⁺CD20⁻ Plasmazellen auf als inaktive Patienten, und erste Verlaufsbeobachtungen zeigten, dass CD27-positive Gedächtnis-B-Zellen unter immunsuppressiver Therapie in ihrer Frequenz anstiegen, während die als Plasmazellen charakterisierte Subpopulation abfiel.

2.1.3. *Die Frequenz der Plasmazellen im peripheren Blut von SLE Patienten korreliert mit der Krankheitsaktivität*

Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus.

Jacobi AM, Odendahl M, Reiter K, Bruns A, Burmester GR, Radbruch A, Valet G, Lipsky PE, Dörner T.
Arthritis Rheum. 2003 May;48(5):1332-42.

Weiterführende Analysen an 60 Patienten mit SLE zeigten, dass CD27⁺⁺CD20⁻ Plasmazellen mit der Krankheitsaktivität korrelieren (Jacobi et al., 2003). Zudem war eine Assoziation mit verschiedenen Autoantikörpern im Serum der Patienten nachweisbar. Multiple Regressionsanalysen erbrachten, dass neben Haut- und Schleimhautmanifestationen, IgG-Antikörper gegen Doppelstrang-DNS und die Frequenz der CD27⁺⁺CD20⁻ Plasmazellen im peripheren Blut der Patienten in der Lage waren, zwischen Patienten mit hoher Krankheitsaktivität (SLEDAI \geq 8) und geringerer Aktivität zu diskriminieren. Die untersuchte CD27⁺⁺CD20⁻ Plasmazell-Subpopulation wurde daraufhin als zellulärer Parameter für Verlaufsuntersuchungen im Rahmen klinischer Studien durch die „Food and Drug Administration“ empfohlen.

2.1.4. Identifikation und Charakterisierung CD27-negativer Gedächtnis-B-Zellen im peripheren Blut von SLE-Patienten

Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus. Deliniation by expression of IgD, CD27, and CD95.

Jacobi AM, Reiter K, Mackay M, Aranow C, Hiepe F, Radbruch A, Hansen A, Burmester GR, Diamond B, Lipsky PE, Dörner T. *Arthritis Rheum.* 2008 Jun;58(6):1762-73.

Weiterführende durchflusszytometrische Analysen an peripherem Blut von SLE-Patienten bestätigten die bereits durch mehrere Gruppen beschriebene verstärkte Expression von CD95 auf B-Zellen von SLE-Patienten (Bijl et al., 2001; Huck et al., 1998). CD95 wird auch bei gesunden Kontrollen auf Gedächtnis-B-Zellen exprimiert. Auffallend war, dass die Expression von CD95 auf den B-Zellen der SLE-Patienten über die bis dahin als Gedächtnis-B-Zellen klassifizierten Subpopulationen (CD27⁺, (Klein et al., 1998)) hinausging. Parallel durchgeführte Analysen der IgD-Expression bei 40 SLE-Patienten zeigten eine CD27⁻IgD⁻ B-Zell-Subpopulation, die interessanterweise mit der vermehrten Expression von CD95 auf CD27-negativen, mutmaßlich naiven B-Lymphozyten assoziiert war (Jacobi et al., 2008c).

Während eine Expansion CD27⁻IgD⁻ B-Zellen auch bei einigen Patienten mit Infektionen (z.B. Pneumokokken-Pneumonie) nachweisbar war, beschränkte sich die Expression von CD95 auf CD27-negativen B-Zellen auf Patienten mit SLE.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen und deren Zusammenhang zu analysieren, wurden weitere 40 SLE-Patienten mit variablem genetischem Hintergrund mittels Multi-Parameter-Durchflusszytometrie untersucht. Ergänzend wurden auch V-Gen-Analysen der zu charakterisierenden CD27-negativen-B-Zell-Subpopulationen bei drei Patienten durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten den postulierten Gedächtnis-Zell-Charakter CD95-positiver CD27⁻IgD⁻ B-Zellen, basierend auf mutierten Schwerekettenen und stattgehabtem Ig-Klassenwechsel, während sich nicht alle CD95-negative CD27⁻IgD⁻ B-Zellen als Gedächtnis-B-Zellen klassifizieren ließen.

Bisher nicht publizierte Ergebnisse weiterführender Real-Time-PCR-Untersuchungen an zwei SLE-Patienten und einer gesunden Kontrolle zeigten, dass im Vergleich mit anderen B-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut vor allem CD95-negative CD27⁻IgD⁻ B-Zellen AID exprimieren. Dabei liegt die Expression zehnfach über der der klassischen CD27⁺IgD⁻ Post-Switch-Gedächtnis-B-Zellen. Auch im Falle eines gesunden Spenders fand sich eine 50-fach über der der CD27⁺IgD⁻ B-Zellen liegende AID-Expression durch CD27⁻IgD⁻ B-Zellen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass CD27⁻IgD⁻ B-Zellen einen engen Bezug zu Keimzentrums-B-Zellen aufweisen. Erste Ergebnisse von Proliferations-Assays nach Isolierung und *in vitro* Stimulation unterschiedlicher B-Zell-Subpopulationen gesunder Kontrollen zeigen zudem, dass ein

Teil der CD27⁺IgD⁻ B-Zellen im Falle der Inkubation mit verschiedenen Stimuli, wie z.B. CPG, IL-2, IL-10, IL-21 und anti-Ig, ein stärkeres Proliferationsverhalten aufweist als CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen und wie diese nach wenigen Tagen in antikörperproduzierende Zellen differenzieren kann. Weitere funktionelle Analysen sind nötig, um Schlussfolgerungen zur Genese und Rolle CD27⁺IgD⁻ B-Zellen bei Patienten mit SLE ziehen zu können. Möglicherweise ist der Nachweis dieser Population im peripheren Blut mit einer Aktivierung des Immunsystems und vermehrten B-Zell-Differenzierung in Keimzentren assoziiert. Wobei die Besonderheit des Überlebens CD95-positiver CD27⁺IgD⁻B-Zellen im Falle der SLE-Patienten auf die Anwesenheit bestimmter Zytokine oder Genpolymorphismen, die eine Apoptose dieser Zellen verhindern, zurückzuführen sein könnte. Die Frequenz CD95-positiver CD27⁺IgD⁻ B-Zellen im peripheren Blut der SLE-Patienten korrelierte signifikant mit der Krankheitsaktivität, und die absolute Anzahl dieser Zellen war signifikant höher bei Patienten mit Komplementverbrauch.

Des Weiteren erbrachte eine vorläufige Subanalyse von 17 Patienten, dass Lupus-Patienten mit erhöhter Serum-BAFF-Konzentration einen höheren Anteil CD95-positiver B Zellen in der CD27⁺IgD⁻ Subpopulation aufweisen (p=0.05). Ob es tatsächlich eine signifikante Assoziation von BAFF und der Präsenz CD95-positiver CD27⁺IgD⁻ B-Zellen im peripheren Blut von SLE-Patienten gibt, wird derzeit durch die Fortsetzung der begonnenen Studien untersucht.

Von großem Interesse in Hinblick auf die Entwicklung innovativer Therapiestrategien ist die Frage, ob autoreaktive B-Lymphozyten T-Zell-vermittelt oder T-Zell-unabhängig aktiviert werden, proliferieren und schließlich in autoantikörpersezernierende Zellen differenzieren. Es ist unklar, ob sich ein bestimmter Weg der B-Zell-Aktivierung und -Differenzierung auch in einem definierten Gedächtnis-B-Zell-Phänotyp niederschlägt. Funktionelle Analysen zur Untersuchung der Spezifität von Gedächtnis-B-Zellen mit unterschiedlichem Phänotyp werden diesbezüglich weiterhelfen.

Der exakte Differenzierungsweg und die Spezifität CD27⁺⁺CD20⁻ Plasmazellen, die im peripheren Blut von SLE-Patienten vermehrt nachweisbar sind, und deren Frequenz mit der Krankheitsaktivität korreliert ist, sind bisher nicht weiterführend untersucht worden. V-Gen-Analysen und die Expression der rearrangierten B-Zell-Rezeptoren bzw. Immunglobuline in repräsentativem Umfang sind sehr teuer und zeitaufwändig. Aus diesem Grunde wird derzeit die Optimierung von ELISPOT-Assays vorangetrieben. Zellen mit einem Plasmazellphänotyp können direkt *ex vivo* auf die Antigen-beschichteten ELISPOT-Platten sortiert und somit funktionell untersucht werden. Bisherige auf diesem Wege vorgenommene Analysen an 5 SLE-Patienten zeigten, dass zwischen 42-81% der CD27⁺⁺CD20⁻ Zellen spontan Immunglobuline sezernieren. Interessanterweise ist oft IgA, wie im Falle des bereits publizierten Beispiels, der dominante Isotyp (Jacobi et al., 2003).

2.1.5. *Bei der Mehrheit der CD27⁺⁺CD20⁻ Zellen im peripheren Blut von SLE Patienten handelt es sich um HLA-DR⁺⁺ Plasmablasten*

HLA-DR^{high}/CD27^{high} plasmablasts indicate active disease in patients with SLE.

Jacobi AM, Mei H, Hoyer BF, Mumtaz IM, Thiele K, Radbruch A, Burmester GR, Hiepe F, Dörner T.
Ann Rheum Dis. 2010 Jan;69(1):305-8.

Eine weiterführende Analyse des Phänotyps CD27⁺⁺CD20⁻ Plasmazellen im peripheren Blut von 25 Lupus Patienten erbrachte, dass der Großteil derselben stark HLA-DR-positiv war (Jacobi et al., 2010a). Dies traf insbesondere für Patienten mit einer aktiven Erkrankung zu. Der Anteil HLA-DR⁺⁺ Zellen am Plasmazell-Pool korrelierte signifikant mit der Krankheitsaktivität (SLEDAI) und den Doppelstrang-DNS-Antikörper-Titern im Serum. Ähnlich wie Patienten mit aktivem SLE weisen gesunde Kontrollen sechs Tage nach Tetanus-Immunisierung CD27⁺⁺CD20⁻ Plasmazellen im peripheren Blut auf (Odendahl et al., 2005). Diese sind nur zum Teil tetanuspezifisch. Interessanterweise weisen die tetanuspezifischen CD27⁺⁺CD20⁻ Zellen eine besonders hohe HLA-DR-Expression auf, was in diesem Zusammenhang nahe legt, dass eine starke HLA-DR-Expression als Zeichen einer kürzlich stattgehabten Differenzierung gewertet werden kann. Diese Theorie wird auch durch Ergebnisse von Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen unterstützt (z.B. (Piskurich et al., 2000). Dies legt folglich nahe, dass insbesondere der Nachweis frisch generierter HLA-DR⁺⁺ CD27⁺⁺CD20⁻ Plasmablasten im peripheren Blut von SLE-Patienten mit einer erhöhten Krankheitsaktivität und dem serologischen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Doppelstrang-DNS assoziiert ist.

Obwohl in einem bisher analysierten Patienten die Frequenz der anti-dsDNA-Antikörpersezernierenden Zellen vom IgG-Isotyp in der HLA-DR⁺⁺CD27⁺⁺CD20⁻ Plasmablasten-Subpopulation mehr als doppelt so hoch war, wie in der HLA-DR-negativen, müssen weitere funktionelle Analysen folgen, um zu klären, ob es sich dabei um den generellen Trend oder einen Einzelfall handelt. Interessanterweise waren, anders als bei gesunden Kontrollen, auch im Knochenmark zweier bisher diesbezüglich analysierter SLE-Patienten HLA-DR⁺⁺CD27⁺⁺CD20⁻ Plasmablasten nachweisbar (Jacobi et al., 2010b). Diese Ergebnisse suggerieren eine Migration der kontinuierlich produzierten Plasmablasten bzw. frisch generierten Plasmazellen in das Knochenmark bei Patienten mit SLE.

Zusammenfassend finden sich im peripheren Blut von Patienten mit SLE vor allem folgende B-Zell-Subpopulationen:

1) CD27⁺IgD⁺CD38⁺⁺CD10⁺IgM⁺ transitionale B-Zellen

2) CD27⁺IgD⁺CD38⁺CD10⁻IgM⁺ naive B-Zellen

3) CD27⁺IgD⁻CD95⁺CD10⁻ Gedächtnis-B-Zellen mit aktiviertem Phänotyp

4) IgM⁺CD27⁺IgD^{+/-}CD38⁻ Gedächtnis-B-Zellen

5) IgM⁻IgD⁻CD27⁺CD38⁻ Post-Switch-Gedächtnis-B-Zellen

6) CD27⁺⁺CD20⁻CD38⁺⁺HLA-DR^{high} Plasmablasten

Die Subpopulationen 3 und 6, die bei Gesunden im Wesentlichen nicht nachweisbar sind, korrelieren mit der Krankheitsaktivität und dem Anti-dsDNA-Antikörper-Titer der SLE-Patienten (Jacobi et al., 2010a; Jacobi et al., 2003; Jacobi et al., 2008b; Odendahl et al., 2000). Subpopulation 4 (IgM⁺CD27⁺IgD^{+/-}CD38⁻) ist hingegen im peripheren Blut von SLE-Patienten deutlich vermindert (Wehr et al., 2004), was wahrscheinlich durch eine erhöhte Bereitschaft dieser Zellen zum Ig-Klassenwechsel bedingt ist. Die deutliche, teilweise durch die Therapie verstärkte Verminderung naiver B-Zellen im peripheren Blut von SLE-Patienten führt außerdem zu einer relativen Expansion der transitionalen B-Zellen (Subpopulation 1) sowie der Post-Switch-Gedächtnis-B-Zellen (Subpopulation 5).

Die bisher noch nicht publizierten Ergebnisse weiterer Analysen zeigen, dass CD27⁺IgD⁻ B-Zellen aus dem peripheren Blut von SLE-Patienten AID (Activation-induced cytidine deaminase) exprimieren, und dass ein Teil dieser Zellen sich durch eine hohe Proliferationsbereitschaft und Differenzierung in IgG-sezernierende Zellen nach Inkubation mit CPG und anti-Ig, IL-2, IL-10 oder IL-21 auszeichnet. Diese Beobachtungen legen nahe, dass CD27⁺IgD⁻ B-Zellen aus dem peripheren Blut von SLE-Patienten Merkmale von Keimzentrums-B-Zellen aufweisen und somit Ausdruck einer gestörten Regulation terminal angesiedelter Mechanismen der B-Zell-Toleranz sein könnten. Ähnlich verhält es sich mit den CD27⁺⁺CD20⁻CD38⁺⁺ HLA-DR^{high} Plasmablasten, die unter anderem Autoantikörper sezernieren und ein therapeutisches Target darstellen (Jacobi et al., 2010a).

Kürzlich zur Publikation eingereichte Verlaufsuntersuchungen an 20 Patienten mit SLE, die sich wegen eines Schubes ihrer Erkrankung einer Endoxan-Bolus-Therapie unterziehen mussten, haben ergeben, dass CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen eine Resistenz gegenüber Cyclophosphamid aufweisen, da ihre absolute Anzahl im peripheren Blut im Gegensatz zu allen anderen B-Zellsubpopulationen nach durchschnittlich drei bis sechs Monaten Therapie nicht signifikant absank (Dorner et al., 2009).

Antigenerfahrene B-Lymphozyten weisen, im Vergleich zu naiven B-Zellen, eine niedrigere Aktivierungsschwelle auf. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass humane Gedächtnis-B-Zellen in der Milz sich allein durch IL-21-Exposition rasant in Plasmazellen differenzieren lassen (Ettinger et al., 2007). IL-21 ist ein Zytokin, das verstärkt durch TH17 Zellen sezerniert wird (Odegard et al., 2008). Deshalb ist es vorstellbar, dass IL-21 zur Expansion von Plasmablasten im peripheren Blut von SLE-Patienten beiträgt, was die Notwendigkeit spät greifender, peripherer B-Zell-Toleranzmechanismen bei der Unterdrückung der Autoantikörpersekretion bei dieser Erkrankung verdeutlicht.

2.2. Mechanismen der B-Zell Toleranz und deren Versagen bei Patienten mit SLE

Kürzlich wurde beschrieben, dass die Mechanismen der zentralen und peripheren B-Zell-Toleranz bei Patienten mit SLE gestört sind (Yurasov et al., 2005), was zu einer Expansion von autoreaktiven B-Lymphozyten im naiven B-Zellrepertoire führt. Ungeklärt ist bisher jedoch, ob diese Expansion hinsichtlich der Entwicklung autoreaktiver Gedächtnis- und Plasmazellen von Bedeutung ist. Obwohl der Mechanismus der Differenzierung autoreaktiver B-Zellen individuell unterschiedlich aussehen kann (Jacobi and Diamond, 2005; Zhang et al., 2008b), ist das Versagen der peripheren B-Zell-Toleranz-Mechanismen eine wesentliche Voraussetzung für deren Entwicklung (Abb. 1).

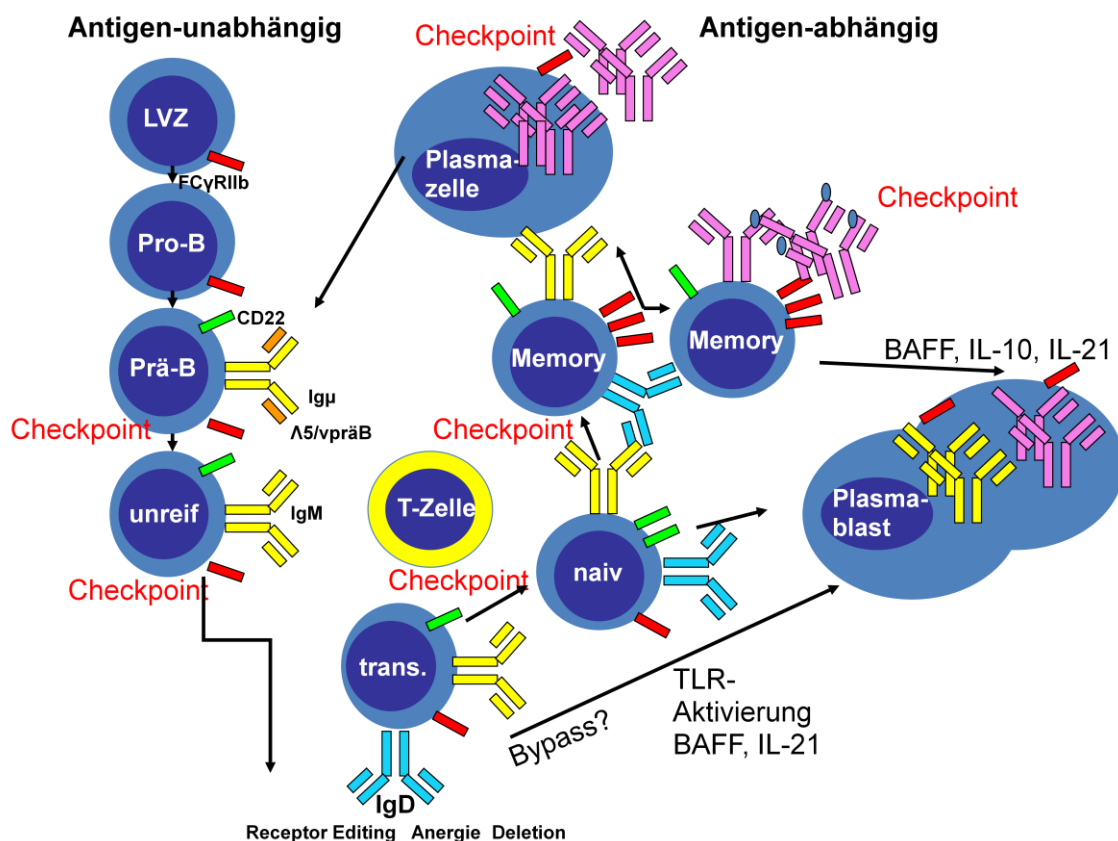


Abb. 1 B-Zell-Reifung und -Differenzierung nach Antigenkontakt. Eine Vielzahl von Checkpoints sorgen normalerweise für die Beseitigung autoreaktiver B-Zellen. Rezeptor-Editing, klonale Deletion, Anergie, Ausschluss autoreaktiver B-Zellen von der Keimzentrumsreaktion, Fas-vermittelte Apoptose, FcγRIIb-induzierte Apoptose von Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen und viele bisher weniger ausführlich charakterisierte Mechanismen können bei Patienten mit SLE und anderen Autoimmunerkrankungen gestört sein. In der Abbildung ist auch die Expression von CD22 und FcγRIIb im Laufe der B-Zell-Entwicklung dargestellt. Unter anderem kommt diesen Rezeptoren eine regulatorische Rolle in Hinblick auf die B-Zell-Aktivierung zu.

Im Rahmen von Krankheitsschüben kann es bei Patienten mit SLE zu einer Verschlechterung bereits vorbestehender Defekte zentraler und peripherer B-Zell-Toleranz-Mechanismen kommen (Yurasov et al., 2006), was insbesondere im Hinblick

auf die letzteren auf ein Ungleichgewicht von B-Zell-aktivierenden und –inhibierenden Faktoren zurückzuführen ist (siehe Abb.2).

+	-
<p>Antigen</p> <p>Costimulation CD40-CD154 CD86-CD28 CD80-CD28 CD27-CD70</p> <p>Zytokine IL-10 IL-21 IL-6 IFNα BAFF</p> <p>TLR-Agonisten DNS-haltige Immunkomplexe Infektionserreger</p> <p>weitere BCR-assoziierte Signalverstärker CD79 CD81 CD45 CD19 FcγRIIa (CD32) CR2 (CD21)</p>	<p>BCR-assoziierte Inhibitoren FcγRIIb (CD32) CD22 CR1 (CD35)</p> <p>FCRL-Moleküle?</p> <p>CD72?</p> <p>Fas</p> <p>PD-1</p>

Abb. 2 B-Zell-aktivierende Faktoren (+) und -Regulatoren/-Inhibitoren (-). Das normalerweise gesunde Gleichgewicht ist bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen gestört. Krankheitsschübe können dieses Ungleichgewicht weiter verstärken.

Die im Folgenden vorgestellte Arbeit bestätigt das Vorhandensein peripherer B-Zell-Toleranzmechanismen bei Patienten mit SLE, zeigt aber auch, dass Schübe der Erkrankung, die in der Regel mit einer vermehrten B-Zell-Aktivierung und -Differenzierung einhergehen, ein partielles Versagen dieser Toleranzmechanismen bedingen können.

Phenotypic characterization of autoreactive B cells - checkpoints of B cell tolerance in patients with systemic lupus erythematosus.

Jacobi AM, Zhang J, Mackay M, Aranow C, Diamond B.
 PLoS one. 2009, Vol.4, Issue 6, e5776.

Durchflusszytometrische Untersuchungen einer dsDNS-reaktiven B-Zellsubpopulation im peripheren Blut von 22 Patienten mit SLE identifizierten einen Toleranz-Mechanismus, der jenseits der B-Zell-Aktivierung durch Antigen angesiedelt ist und durch eine erhöhte Krankheitsaktivität teilweise aufgehoben werden kann (Jacobi et al., 2009). Während die Frequenz dsDNS-reaktiver B-Lymphozyten sich während der Differenzierung der B-Zellen nach mutmaßlichem Antigen-Kontakt nur bei einem von sieben Patienten mit aktiver Erkrankung (SLEDAI>4) um >60% reduzierte, war eine

solche Reduktion bei der Hälfte aller Patienten mit weniger aktiver Erkrankung nachweisbar.

Die Analysen, die sich ein dsDNS-Mimotop (DWEYSVWLSN) zunutze machten, welches in der Lage ist, nach Polymerisierung murine oder humane B-Lymphozyten zu binden (Newman et al., 2003; Rice et al., 2005; Zhang et al., 2008a) (Abb.3), bestätigten auch das Vorliegen eines bisher nur bei einzelnen SLE-Patienten beschriebenen Toleranzmechanismus. Dieser überwacht die Differenzierung transitionaler B-Lymphozyten zu naiven B-Lymphozyten und ist bei SLE-Patienten mit aktiver Erkrankung nur eingeschränkt wirksam ((Yurasov et al., 2006; Yurasov et al., 2005)+Abb. 3).

In diesem Zusammenhang erscheint erwähnenswert, dass unter Verwendung des gleichen dsDNS-Mimotops kürzlich auch im Mausmodell ein völlig neuer Mechanismus der peripheren B-Zell-Toleranz aufgedeckt wurde (Wang and Diamond, 2008). Auch nach durchlaufener Keimzentrumsreaktion waren autoreaktive Prä-Plasmazellen der Milz MAP-Mimotop-immunisierter BALB/c Mäuse offensichtlich in der Lage, ihre Leichtketten über einen antigen(DNS)-abhängigen und IL-7-vermittelten Mechanismus zu editieren und ihre autoreaktive Spezifität somit abzulegen. Bislang wurde angenommen, dass das Rezeptor-Editing oder die Revision des B-Zell-Rezeptors als Toleranzmechanismus ausschließlich prä-naiven B-Zellen vorbehalten ist.

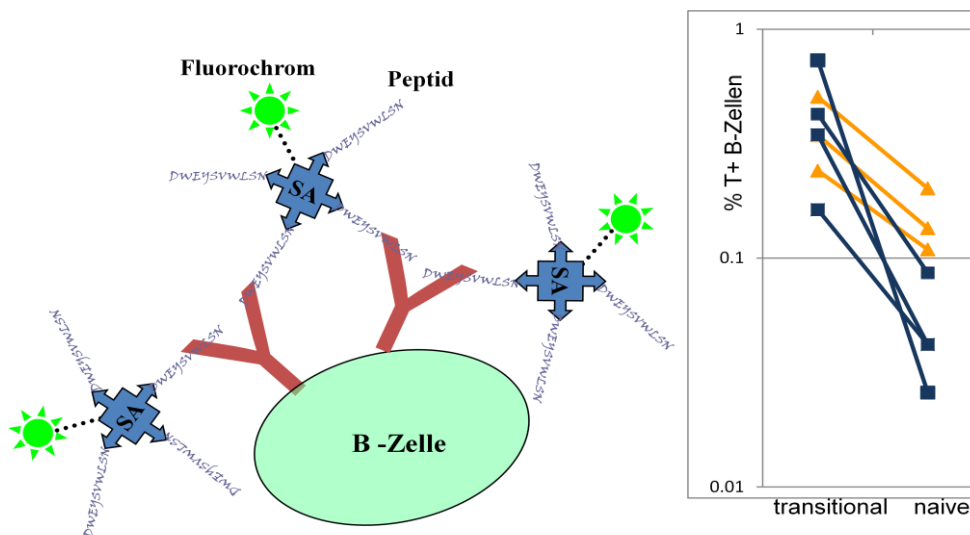


Abb. 3. DWEYSVWLSN-Tetramer* und Frequenz Mimotop-Tetramer-bindender B-Zellen in der transitionalen und naiven B-Zell-Subpopulation von Patienten mit SLE. Dargestellt ist die Frequenz Mimotop-Tetramer⁺ (T⁺) Zellen in der transitionalen und naiven B-Zell-Subpopulation aus dem peripheren Blut dreier aktiver (orange, SLEDAI > 4) und vier inaktiver (blau, SLEDAI < 4) SLE-Patienten. SA = Streptavidin

*modifiziert nach Ying-Hua Wang

2.3. Analysen inhibitorischer Co-Rezeptoren des B-Zell-Rezeptors

Das BCR-Signal ist nicht nur von zentraler Bedeutung für die Entwicklung, Selektion und Aktivierung der B-Lymphozyten, sondern auch für die Differenzierung zu Gedächtnis-B- oder Plasmazellen. Im Folgenden soll auf inhibitorische Co-Rezeptoren des B-Zell-Rezeptors oder sonstige Oberflächenmoleküle mit inhibitorischem Potential (siehe Abb. 2) eingegangen werden, da diese neben dem BCR von Interesse sind, wenn es um die selektive Beeinflussung autoreaktiver oder die Inhibition überschießend aktivierter B-Zellen geht. Wie wichtig intakte B-Zell-Toleranzmechanismen, insbesondere nach Durchlaufen der Keimzentrumsreaktion sind, wird deutlich, wenn man bedenkt, dass selbst bei Gesunden ein relativ hoher Prozentsatz des antigenerfahrenen B-Zell-Repertoires autoreaktiv sein kann (Tiller et al., 2007).

2.3.1. Siglecs (*Sialic-acid binding immunoglobuline-like lectins*)

Siglecs enthalten eine Ig-Domäne und binden Sialinsäure (Crocker et al., 2007). Auf das auf B-Lymphozyten beschränkte Siglec-2 (CD22) soll hier näher eingegangen werden. CD22 und alle CD33-ähnlichen Siglecs weisen ITIMs (Immunrezeptor tyrosinhaltige inhibitorische Motive) in ihren zytoplasmatischen Anteilen auf, die eine immunregulatorische Funktion dieser Moleküle nahelegen. Eine solche Funktion ist bisher nicht nur für CD22 sondern auch Siglec-G nachgewiesen worden (Hoffmann et al., 2007).

CD22 ist ein B-Zell-spezifisches Adhäsionsmolekül und ein Co-Rezeptor des BCR. Im Zuge der Expression von Oberflächen-Ig und der damit verbundenen Fähigkeit, Antigen zu binden, wird auf Prä-B-Zellen auch CD22 erstmals exprimiert. Verschiedene Liganden, die α 2,6-Sialinsäure als wesentlichen Bestandteil enthalten, sind beschrieben worden (Kelm et al., 1994; LePrince et al., 1993; Pflugh et al., 2002; Powell et al., 1993; Sgroi et al., 1993; Sjöberg et al., 1994; Stamenkovic et al., 1991). Als BCR-Co-Rezeptor ist CD22 in der Lage, das BCR-Signal negativ zu beeinflussen. Dies erfolgt durch die Rekrutierung der Tyrosine Phosphatase, SHP-1 (Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase-1) oder die Interaktion mit SHIP (Src homology 2 domain-containing inositol polyphosphate 5' phosphatase) (Hashimoto et al., 1999; Poe et al., 2000) nach vorausgegangener Phosphorylierung des zytoplasmatischen Tyrosin-Restes. Die durch CD22 verursachte Abschwächung des Kalzium-Signals wird außerdem durch die SHP-1-abhängige Aktivierung der PMCA (plasma membrane calcium ATPase) herbeigeführt (Chen et al., 2004).

B-Zellen von CD22-Knockout-Mäusen zeigen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* einen aktivierten Phänotyp, reagieren aber auch empfindlicher auf apoptosevermittelnde Signale, was ihr verkürztes Überleben erklärt (Nitschke et al., 1997; O'Keefe et al., 1996; Otipoby et al., 1996).

CD22 reguliert die Oberflächenexpression von IgM und MHC-Klasse II und spielt im Mausmodell außerdem eine Rolle bei der Erhaltung der Marginalzone. Diese Funktionen sind abhängig von zahlreichen Liganden, die bisher nicht vollständig identifiziert worden sind. Die Regulierung des BCR-Signals scheint dagegen unabhängig von diesen Liganden zu erfolgen (Nitschke et al., 1999; Poe et al., 2004), was die Vielschichtigkeit der durch CD22 vermittelten Prozesse unterstreicht. Erst kürzlich wurde die Existenz eines weiteren, bisher nicht identifizierten Liganden, der auf dendritischen Zellen exprimiert wird und einen die B-Zell-Proliferation hemmenden Einfluss hat, postuliert (Santos et al., 2008).

Fast alle bisher gesammelten Erfahrungen basieren auf tierexperimentellen Untersuchungen. Erst kürzlich bot sich im Rahmen klinischer Studien zur Untersuchung der Effektivität und Sicherheit von Epratuzumab (humanisierter monoklonaler Anti-CD22-Antikörper) in der Therapie von Patienten mit B-Zell-Lymphomen und SLE die Möglichkeit, den Effekt von Anti-CD22-Antikörpern im Menschen näher zu untersuchen (Jacobi et al., 2008a; Leonard et al., 2003). Obwohl die Bindung von Epratuzumab nicht im Bereich der Ligandenbindungsstelle erfolgt, hat diese eine rasche Internalisierung von CD22 und Phosphorylierung des zytoplasmatischen Anteils zur Folge (Carnahan et al., 2003). Die Ergebnisse der im Folgenden vorgestellten Arbeit sprechen für das Vorliegen mehrerer wahrscheinlich voneinander unabhängiger Effekte dieses monoklonalen Antikörpers auf humane B-Zellen.

Differential effects of epratuzumab on peripheral blood B cells of patients with systemic lupus erythematosus versus normal controls.

Jacobi AM, Goldenberg DM, Hiepe F, Radbruch A, Burmester GR, Dörner T. *Ann Rheum Dis.* 2008 Apr;67(4):450-7.

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Untersuchungen legen nahe, dass Epratuzumab in der Lage ist, die bei SLE-Patienten beobachtete Hyperreagibilität der B-Lymphozyten in Bezug auf unterschiedliche Stimuli zu mindern ohne Apoptose herbeizuführen (Jacobi et al., 2008a). Der zugrunde liegende Mechanismus ist allerdings bisher nicht im Detail aufgedeckt worden, obwohl die Ergebnisse weiterführender, bisher nicht publizierter Untersuchungen nahelegen, dass die Bindung von Epratuzumab an CD22 eine Herabsetzung des BCR-Signals herbeiführen kann (siehe Abb. 5A).

CD22 findet sich auf allen B-Zellen, wird jedoch im Gegensatz zu FcγRIIb auf Gedächtnis-B-Zellen eher herunterreguliert und ist auf Plasmablasten oder Plasmazellen nicht nachweisbar.

In vivo bewirkt Epratuzumab eine rasche und selektive Reduktion CD27-negativer B-Zellen mit einem Maximum 10 Wochen nach der ersten Infusion (Woche 2, $p=0.047$, Woche 10, $p=0.008$), ohne dass ein signifikanter Effekt auf antigenerfahrene B-Zell-Subpopulationen nachzuweisen ist.

2.3.2. Fc-Rezeptoren und Fc-Rezeptor-ähnliche (FcRL) Moleküle

Fc-Rezeptoren (FcR) binden Fc-Anteile unterschiedlicher Ig-Isotypen, im Gegensatz zu FcR-like Molekülen, die zwar eine Ig-Bindungsdomäne aufweisen, deren Liganden aber bisher nicht identifiziert worden sind (Davis, 2007). Am besten untersucht im Hinblick auf ihre Funktion sind FcR, die IgG binden (Fcγ-Rezeptoren). Es werden Fcγ-Rezeptoren mit hoher Affinität (z.B. FcγRI oder CD64), die auch monomeres IgG binden, von Rezeptoren mit geringer Affinität (z.B. FcγRIIb oder CD32), die IgG nur in komplexer Form binden, unterschieden. Neben der Affinität stellt auch die Funktion ein wesentliches Unterscheidungskriterium dar. Während FcγRIIb ähnlich wie CD22 ITIMs im zytoplasmatischen Anteil aufweist und einen negativen Einfluss auf das BCR Signal hat, enthält FcγRIIa, welches auf menschlichen B-Zellen neben FcγRIIb exprimiert wird, ITAMs und kann somit die Aktivierung der B-Zellen verstärken. Der Umstand, dass die extrazellulären Domänen von FcγRIIb und FcγRIIa zu 95% homolog sind, erschwert deren Identifikation und das Targeting durch monoklonale Antikörper. Ein durch MacroGenics (Rockville, MD, USA) synthetisierter Klon (2B6) bindet allerdings selektiv FcγRIIb und zeigt in ersten *in vitro* Assays eine antiproliferative Wirkung in Bezug auf B-Zellen (Mackay et al., 2006; Veri et al., 2007). Für die im Anschluss beschriebenen Untersuchungen wurde deshalb ausschließlich dieser Antikörper verwendet.

- Fcγ-Rezeptor IIb

Aktivierte B-Zellen (Amigorena et al., 1989; Pritchard et al., 2000) und Keimzentrums-B-Zellen (Rahman and Manser, 2005) zeigen eine erhöhte Expression von FcγRIIb. Ein Ausbleiben dieses FcγRIIb-Anstieges nach Antigen-Kontakt geht mit Störungen der B-Zell-Toleranz in Mausmodellen einher (Fukuyama et al., 2005; Rahman et al., 2007). Auch CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen einer Subgruppe von Patienten mit SLE weisen eine verminderte Expression von FcγRIIb mit funktionellen Konsequenzen, im Sinne einer mangelnden Kontrolle des BCR-Signals, auf (Mackay et al., 2006; Su et al., 2007). Dabei ist jedoch unklar, ob diese durch B-Zell-intrinsische Defekte, die auf genetische Polymorphismen zurückzuführen sind, oder extrinsische Faktoren, wie z.B. Zytokine oder Faktoren der Komplementkaskade (C5a) verursacht wird (Rudge et al., 2002; Shushakova et al., 2002). Eine verminderte Expression oder Malfunktion von FcγRIIb auf Gedächtnis-B-Zellen, Plasmablasten oder Plasmazellen, kann zum Versagen von peripheren B-Zell-Toleranz-Mechanismen bei Patienten mit SLE beitragen und sowohl die Expansion von Plasmablasten und verstärkte Produktion von Immunglobulinen als

auch die Sekretion von Autoantikörpern erklären (Fukuyama et al., 2005; Jacobi et al., 2003; Rahman et al., 2007). In einer weiteren Studie wurde kürzlich außerdem die Bedeutung von FcγRIIb für die Homöostase von Knochenmarks-Plasmazellen dargelegt (Xiang et al., 2007).

Lupus-Mäuse zeigten eine verminderte FcγRIIb -Expression auf Plasmazellen, welche mit einer Resistenz in Bezug auf die normalerweise durch die FcγRIIb-Kreuzvernetzung ausgelösten Apoptose einherging und in dem untersuchten Mausmodell zur Zunahme des Pools der langlebigen Plasmazellen führte.

Weiter unterstützt wird die Rolle der verminderten FcγRIIb-Expression als Prädispositionsfaktor für SLE am Beispiel von FcγRIIb -defizienten C57BL/6-Mäusen, die spontan ein SLE-artiges Krankheitsbild entwickeln (Bolland and Ravetch, 2000).

Ein eleganter therapeutischer Ansatz wurde im letzten Jahr auf dem ACR-Meeting vorgestellt. Durch gezielte Mutagenese der Fc-Domäne eines monoklonalen humanisierten IgG1 Anti-CD19-Antikörpers gelang es, die Affinität für FcγRIIb um ein Vielfaches zu erhöhen. Als würde es sich um Immunkomplexe handeln, ist der so hergestellte Antikörper in der Lage, die gebundenen B-Zellen durch Crosslinking von FcγRIIb und CD19 zu hemmen, ohne sie zu depletieren. Wird eine Isotypkontrolle des Antikörpers eingesetzt und somit ein Crosslinking vermieden, ist hingegen keine Inhibition der B-Zellen zu verzeichnen (Chu et al., 2008).

Die Ergebnisse eigener Analysen belegen, dass FcγRIIb auf allen B-Zellen exprimiert wird. Auch Plasmablasten zeigen eine deutlich höhere Oberflächenexpression als z.B. Monozyten oder T-Zellen, was die Bedeutung als potenzielles therapeutisches Target nahelegt. Die Expression von FcγRIIb auf B-Zell- und Plasmazell-Subpopulationen zweier repräsentativer SLE-Patienten und eines Kontrollindividuums ist in Abb. 4 A und B dargestellt. Diese Beispiele illustrieren, dass insbesondere CD27⁻IgD⁻CD95⁺CD10⁻ Gedächtnis-B-Zellen mit aktiviertem Phänotyp FcγRIIb herauf regulieren, was eine potenzielle regulatorische Rolle dieses Rezeptors in Hinblick auf die entsprechende B-Zell-Subpopulation nahelegt.

- FcRL-Moleküle

Auch einige Mitglieder der kürzlich identifizierten Familie der FcRL-Moleküle weisen ITIMs im Bereich ihrer zytoplasmatischen Anteile auf. Anders als FcγRIIb werden einige Vertreter der FcRL-Familie, wie FcRL2 und FcRL4, selektiv auf Gedächtnis-B-Zellen exprimiert (Davis, 2007). Obwohl die Liganden bisher nicht identifiziert wurden, legt die Struktur und das Expressionsmuster von FcRL2 und FcRL4 eine immunoregulatorische Funktion nahe. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Ergebnisse von Untersuchungen zur Funktion von chimären Proteinen, die sich aus dem extrazellulären und transmembranösen Anteil von FcγRIIb und dem intrazellulären Anteil von FcRL4 zusammensetzen. Die durch das chimäre Protein vermittelte

Hemmung des Kalzium-Signals war deutlich größer als die durch FcγRIIb erzielte (Ehrhardt et al., 2003). Sowohl die differentielle Expression als auch die inhibitorische Funktion einiger FcRL-Moleküle sprechen für deren Eignung als therapeutisches Target.

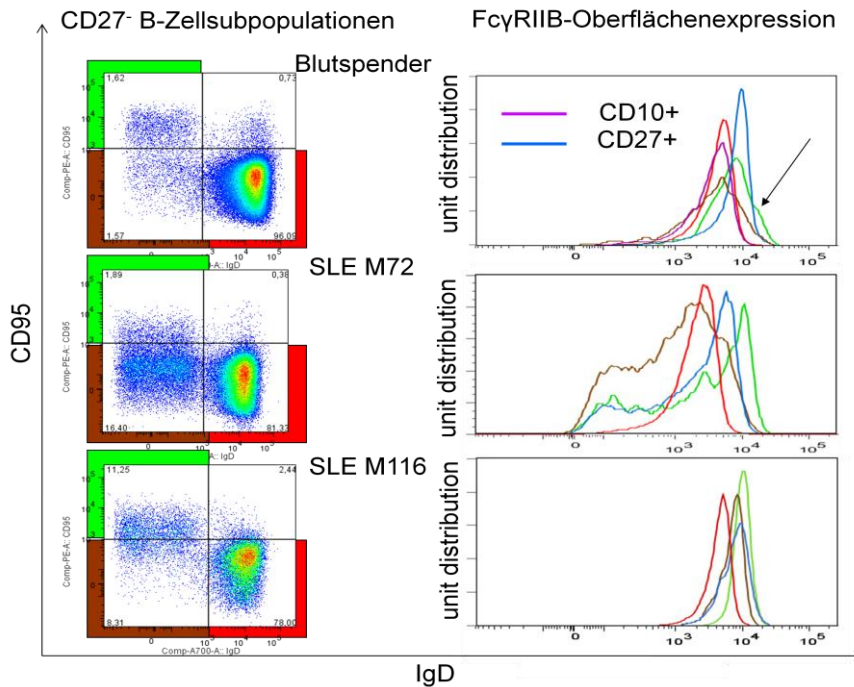


Abb. 4. A. Expression von FcγRIIb auf CD27⁻ B-Zell-Subpopulationen zweier repräsentativer SLE Patienten und einer Kontrolle. Das Gating ist links dargestellt. Die bei SLE-Patienten mit hoher Krankheitsaktivität zu beobachtende CD27⁻IgD⁻CD95⁺ Gedächtnis-B-Zell-Subpopulation mit aktiviertem Phänotyp (grün) weist die höchste FcγRIIb-Expression auf. Zum Vergleich ist die FcγRIIb-Expression auf CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen (blau) und auf transitionalen B-Zellen (violett) dargestellt.

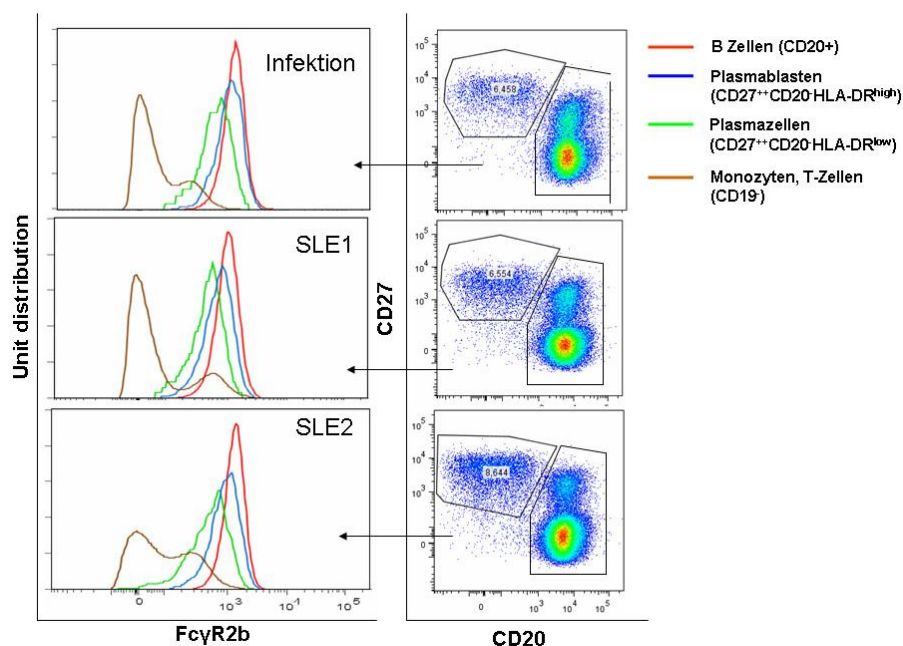


Abb. 4. B. Die Expression von FcγRIIb auf Plasmablasten (CD27⁺⁺CD20⁻HLA-DR^{high}, blau) ist bei SLE-Patienten vergleichbar mit der bei der Analyse eines Kontrollindividuums mit vorliegender Infektion beobachteten.

2.3.3. Intrazelluläre Effekte monoklonaler Antikörper gegen CD22 oder FcγRIIb

Bisher nicht publizierte Ergebnisse der Untersuchungen des Kalzium-Fluxes und der Phosphorylierung intrazellulärer Signalproteine, wie ERK und SYK zeigen, dass gegen CD22 gerichtete Antikörper, wie Epratuzumab, oder gegen FcγRIIb gerichtete Antikörper inhibitorisch auf das BCR-Signal wirken (Abb. 5). Diese Herabsetzung des BCR-Signals ist Antigen-unabhängig und betrifft scheinbar sowohl naive als auch Gedächtnis-B-Zellen. Völlig offen bleibt allerdings, welche Konsequenzen eine solche Modulation des BCR-Signals *in vivo* hat. Während der Effekt bei transitionalen B-Zellen möglicherweise ein Überleben autoreaktiver Zellen zur Folge haben könnte, kann die Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen eventuell unterbunden werden.

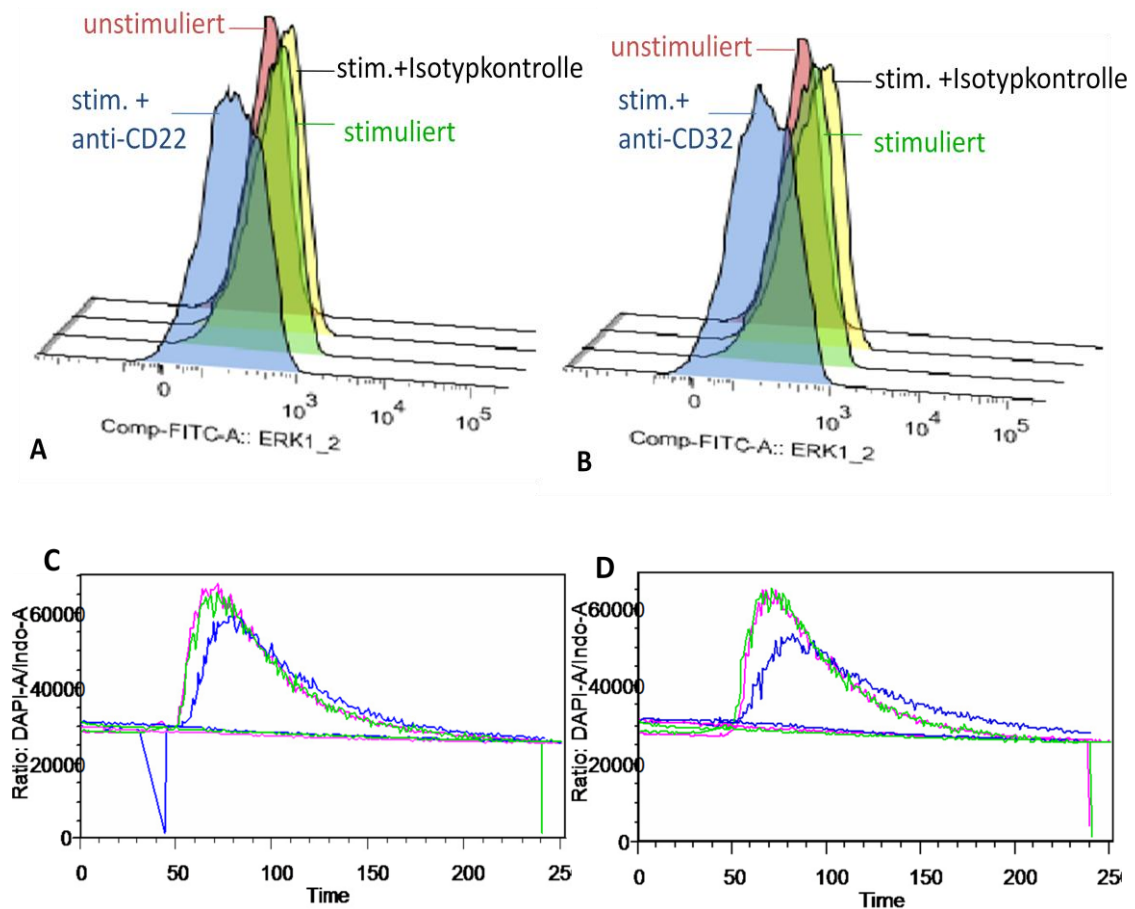


Abb. 5. Intrazelluläre Effekte monoklonaler Antikörper gegen inhibitorisch wirkende B-Zell-Rezeptor-Co-Rezeptoren.

Die bei Gedächtnis-B-Zellen durch 8-minütige Inkubation mit F(ab')₂ anti-IgG hervorgerufene Phosphorylierung von ERK wird durch eine einstündige Präinkubation mit LL2 (anti-CD22, A) oder 2B6 (anti-FcγRIIb/CD32, B) herabgesetzt.

Die Präinkubation peripherer B-Lymphozyten mit einem Anti-CD22-Antikörper (LL2/anti-CD22 für 1h) bewirkt eine Reduktion des durch Zugabe von Anti-IgD-Antikörpern ausgelösten Ca-Fluxes. C. ähnlich verhält es sich nach Präinkubation mit 2B6 einem FcγRIIb-Antikörper. D blau: Kurve nach Präinkubation mit den entsprechenden Antikörpern, grün: ohne Antikörper, pink: Kurve nach Präinkubation mit den entsprechenden Isotypkontrollen.

2.4. Die Dominanz antigenerfahrener B-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut von SLE-Patienten wird durch selektive BAFF-Blockade verstärkt

BAFF (BLyS) ist ein für B-Zellen bedeutendes homöostatisches Zytokin, das im Rahmen von Entzündungen vermehrt synthetisiert wird und die unspezifische mit der spezifischen Immunantwort verzahnt (Mackay et al., 2007). Es bindet drei unterschiedliche Rezeptoren, BAFF-Rezeptor, TACI und BCMA, die in unterschiedlichem Ausmaß von B-Zellen exprimiert werden, während diese ihre Differenzierung durchlaufen (Bossen and Schneider, 2006) (Abb. 6). BAFF ist insbesondere für die Differenzierung transistionaler B-Zellen erforderlich, sowie für die Entwicklung der Marginal-Zonen-B-Zellen (Mackay and Ambrose, 2003). Der Wettbewerb um BAFF ist zu diesem Entwicklungszeitpunkt ein wichtiger Selektionsmechanismus, denn erhöhte BAFF-Konzentrationen können das Überleben autoreaktiver B-Zellen begünstigen (Lesley et al., 2004; Thien et al., 2004). APRIL hingegen, das nicht an den BAFF-Rezeptor sondern TACI und BCMA bindet, beeinflusst B-Zellen erst im Laufe ihrer weiteren Entwicklung (Schiemann et al., 2001; Seshasayee et al., 2003). Durch die Bindung an TACI und BCMA unterstützen BAFF und APRIL das Überleben von Plasmazellen (O'Connor et al., 2004; Trembl et al., 2006). Die Bildung von Keimzentren scheint auch in Abwesenheit von BAFF möglich zu sein. Allerdings fallen die Keimzentren in diesem Fall kleiner aus, ermöglichen aber Keimzentrumsvorgänge wie somatische Hypermutation und der Ig-Klassenwechsel und die Produktion von hochaffinen Antikörpern gegen Fremdanitgen, wenn auch in reduziertem Umfang (Rahman et al., 2003; Ramanujam and Davidson, 2004). In der Maus scheint weder BAFF noch APRIL für das Überleben oder die Reaktivierung ruhender Gedächtnis-B-Zellen zwingend erforderlich zu sein (Ramanujam and Davidson, 2004).

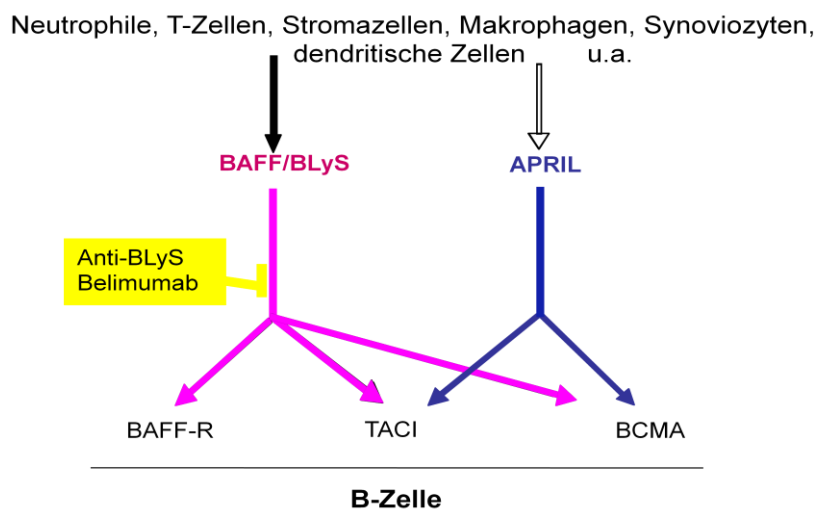


Abb.6 Darstellung der Quellen und Targets von BAFF und APRIL und der selektiven BAFF-Blockade mit Belimumab. BAFF: B cell activating factor, APRIL: A Proliferation Inducing Ligand, BLyS: B lymphocyte costimulator, TACI: transmembran activator and calmodulin interactor, BCMA: B cell maturation protein.

Da BAFF-Überschuss mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wie SLE vergesellschaftet ist (Gross et al., 2000; Khare et al., 2000), stellt es ein therapeutisches Target dar. Im Mausmodell führt die selektive Blockade von BAFF zu einer raschen Depletion von transitionalen (T2), Marginal-Zonen- sowie folliculären B-Zellen (Ramanujam and Davidson, 2004; Ramanujam et al., 2006). Dabei werden vor allem die von Marginal-Zonen-B-Zellen und in etwas geringerem Maße auch die primäre T-Zell-abhängige Immunantwort beeinträchtigt. Während nicht zu erwarten ist, dass die selektive BAFF-Blockade einen direkten Effekt auf Plasmazellen hat, da APRIL in der Lage ist, das fehlendes BAFF zu kompensieren, kann die kombinierte Blockade von BAFF und APRIL eine Depletion von Plasmazellen bewirken (Ramanujam and Davidson, 2008).

Belimumab ist ein voll-humanisierter BAFF-blockierender monoklonaler Antikörper, der lösliches BAFF bindet (Baker et al., 2003). Die Effektivität der selektiven BAFF-Blockade durch Belimumab wurde in Phase II-Studien an mehr als 400 Patienten mit moderat aktivem SLE untersucht (bisher nicht publiziert (Wallace et al., 2009). Obwohl die primären Endpunkte (Reduktion der "time to flare" und des Krankheitsaktivitäts-Scores (Selena SLEDAI) in der 24. Woche) in den ersten 52 Wochen nicht erreicht wurden, zeigten verschiedene Post-hoc-Analysen, dass vor allem serologisch aktive Patienten nach ca. einem Jahr von der Therapie profitiert hatten und weniger Schübe aufwiesen. Dieser Effekt war bis zur 76. Woche nachweisbar.

Vereinbar mit der Klinik, traten auch relevante Veränderungen zellulärer Parameter nur sehr verzögert auf, wie im Rahmen einer bisher noch nicht publizierten Subanalyse von 17 Patienten mittels ELISPOT und Durchflusszytometrie festgestellt werden konnte (Jacobi et al., 2010a). Während bereits in den ersten Wochen ein signifikanter Abfall der transitionalen und der naiven B-Zellen nachweisbar war, dauerte es 12 Monate, bis auch CD27⁺IgD⁻ B-Zellen einen signifikanten Abfall zeigten. Schließlich nach 18 Monaten gingen auch die Plasmablasten und Prä-Switch-Gedächtnis-B-Zellen signifikant zurück. Allerdings war selbst nach 24 Monaten kein signifikanter Abfall der Post-Switch-Gedächtnis-B-Zellen nachweisbar, was mit den Ergebnissen der serologischen und funktionellen Analysen im Einklang stand, die von anderer Seite durchgeführt und ausgewertet wurden. Weder die Anzahl IgG-sezernierender Zellen noch die Anzahl IgG anti-dsDNS-antikörpersezernierender Zellen, noch einer der entsprechenden Serumtiter fielen innerhalb der 24 Monate signifikant ab. Im Gegensatz zum IgG, fiel das IgM im Serum bereits in den ersten Monaten signifikant ab. Dies spiegelte sich auch im Ergebnis der ELISPOT-Assays wider, welche den IgM-Abfall allerdings erst nach einem Jahr abbilden konnten. Auch die IgM anti-dsDNS-antikörpersezernierenden Zellen waren nach einem Jahr signifikant zurückgegangen, zeigten dann aber wieder einen leichten Anstieg im Einklang mit der Anzahl aller IgM-sezernierender Zellen.

Interessanterweise zeigte die CD27⁺IgD⁻ B-Zellsubpopulation, welche bei SLE-Patienten verstärkt ist und im Falle erhöhter BAFF-Serum-Spiegel einen hohen Prozentsatz CD95-positiver Zellen enthält, bereits nach einem Jahr einen signifikanten Abfall, was deren Abhängigkeit von BAFF nahe legt.

Vereinbar mit den Ergebnissen unterschiedlicher tierexperimenteller Studien lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die Mehrheit der antigenerfahrenen B-Zell-Subpopulationen, im Gegensatz zu den antigennaiven nicht direkt von BAFF abhängig sind. Der zeitlich versetzte Rückgang der Plasmablasten im peripheren Blut ist als indirekter Effekt zu werten, der durch die Verminderung direkter Vorläuferzellen zu erklären ist. Wahrscheinlich kompensiert APRIL den fehlenden BAFF-Effekt in Hinblick auf Plasmablasten nahezu vollständig. Auch zeigt die selektive BAFF-Blockade keinen signifikanten Effekt auf Post-Switch-Gedächtnis-B-Zellen über einen Zeitraum von 24 Monaten.

3. Diskussion und Ausblick

3.1. Mechanismen der B-Zellaktivierung und Analyse autoreaktiver B-Zellen

Die Aktivierung von B-Zellen kann durch Antigen-Bindung an den B-Zell-Rezeptor hervorgerufen werden. In Abhängigkeit vom Charakter des Antigens und der in der Umgebung verfügbaren Zytokine benötigen B-Zellen eventuell T-Zell-Hilfe bei diesem Vorgang. Alternativ können B-Zellen auch durch Zytokine und andere lösliche Mediatoren oder durch TLR-Liganden polyklonal aktiviert werden (Briere et al., 1994; Litinskiy et al., 2002; Pene et al., 2004). Vor allem Gedächtnis-B-Zellen, welche im peripheren Blut von Patienten mit SLE dominieren, sind leicht durch Zytokine wie IL-10 und IL-21 zu aktivieren und differenzieren rasch zu Plasmazellen aus (Ettinger et al., 2007). Naive oder transitionale humane B-Zellen zeigen *in vitro* unter bestimmten Bedingungen eine starke Proliferation und differenzieren, wenn auch weniger erfolgreich, in antikörpersezernierende Zellen (Avery et al., 2008a; Avery et al., 2008b; Capolunghi et al., 2008; Ettinger et al., 2005). Welche Mechanismen der B-Zellaktivierung zur Pathogenese des SLE beitragen, ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Die Analyse von Mutationsmustern einzelner Autoantikörper kann zwar diesbezüglich Aufschluss geben, wird durch die niedrige Frequenz autoreaktiver B-Zellen im peripheren Blut von Lupus-Patienten aber erschwert. Hinzu kommt die zentrale Frage zum pathogenen Potential der wenigen bisher isolierten Autoantikörper (Rahman et al., 2002; Zhang et al., 2009; Zhang et al., 2008b).

Die Suche nach autoreaktiven B-Zellen ist bei Patienten mit SLE im Gegensatz zu Maus-Modellen auf das periphere Blut beschränkt. Obwohl ELISPOT-Daten über die Frequenz dsDNS-spezifischer Plasmablasten/PBMC vorliegen, ist bisher unklar, wie die Frequenzen in den einzelnen B-Zell-Subpopulationen aussehen.

Eine Möglichkeit, autoreaktive B-Zellen zu identifizieren, ist die Verwendung fluorochrommarkierter Autoantigene in durchflusszytometrischen Analysen. Obwohl diese Methode einfach und elegant anmutet, ist sie eine bisher nicht gemeisterte technische Herausforderung.

Eine innovative Herangehensweise basiert auf dem Gebrauch von DNS-Mimotopen oder anderen Epitopen relevanter Autoantigene. Diese sind nicht länger als zehn Aminosäuren, werden biotinyliert und anschließend mit Hilfe von fluorochrommarkiertem Streptavidin komplexiert. Die auf diesem Wege generierten Tetramere können für durchflusszytometrische Untersuchungen eingesetzt werden. Die vorläufigen Ergebnisse legen nahe, dass diese Methode in der Lage ist, Autoantigen-spezifische B-Zellen mittels Durchflusszytometrie im peripheren Blut von Patienten mit SLE zu identifizieren (Zhang et al., 2008a).

Die Frequenz der auf diesem Wege identifizierten autoantigenspezifischen B-Zellen ist jedoch sehr gering, was eine funktionelle Charakterisierung erschwert (Jacobi et al., 2009). BALB/c Mäuse, die mit dem dsDNS-Mimotop (DWEYSVWLSN-Map) wiederholt immunisiert worden sind, weisen jedoch eine deutliche Subpopulation Mimotop/DNS-spezifischer B-Zellen im peripheren Blut, der Milz und im Knochenmark auf (Newman et al., 2003; Rice et al., 2005; Wang and Diamond, 2008).

Alternativ können digoxigenierte Autoantigen-Mimotope eingesetzt werden, welche den Vorteil bieten, dass sie auch zur Markierung intrazellulär lokalisierter Antikörper (Plasmazellen) verwendbar sind. Unter Anwendung dieser Methode wurden tetanuspezifische B-Zellen und Plasmablasten nach sekundärer Immunisierung bereits erfolgreich charakterisiert (Odendahl et al., 2005).

In jedem Fall stellt der Umstand, dass die Frequenz (auto)antigenspezifischer B-Zellen im peripheren Blut sehr gering ist, ein wesentliches Problem in Hinblick auf erforderliche funktionelle Analysen dar. Zukünftig werden bereits beschriebene Methoden zur Anreicherung antigenspezifischer B-Zellen (Barcellini et al., 1992; Irsch et al., 1995) re-evaluiert werden müssen, um diese dann ggf. für weiterführende funktionelle Analysen antigenspezifischer B-Zellen nutzen zu können.

Zusammenfassend müssen mindestens drei Mechanismen der Aktivierung autoreaktiver B-Zellen voneinander abgegrenzt werden.

Erstens ist die Formierung eines Pools autoreaktiver Gedächtnis-B-Lymphozyten, die leicht in autoantikörpersezernierende Zellen ausdifferenzieren können und eine Resistenz gegenüber herkömmlichen sowie experimentellen Therapiestrategien (inklusive Anti-BAFF- und Anti-CD22-Therapie) aufweisen, möglich. Voraussetzung dafür ist das Versagen peripherer Toleranzmechanismen (Jacobi et al., 2009; Yurasov et al., 2006; Yurasov et al., 2005).

Davon unterschieden werden sollte eine durch Zytokine und TLR-Liganden ausgelöste, verfrühte und übereilte Differenzierung noch antigennaiver B-Zellsubpopulationen, die unzureichend der Kontrolle peripherer B-Zell-Toleranzmechanismen unterliegt.

Schließlich erscheint unter Berücksichtigung der vorgestellten Daten auch eine Migration autoreaktiver Plasmablasten ins Knochenmark möglich, gefolgt von deren Differenzierung zu langlebigen Plasmazellen, welche einer Therapie ebenso schlecht zugänglich wären wie autoreaktive Gedächtnis-B-Zellen.

3.2. Rationale und Optionen eines selektiven Targetings autoreaktiver B-Lymphozyten

Sowohl herkömmliche als auch alle bisher im Rahmen klinischer Studien eingesetzten Medikamente wie Cyclophosphamid, Rituximab (anti-CD20), Belimumab (anti-BLyS/BAFF) oder Epratuzumab (anti-CD22) sind nicht in der Lage, nachhaltigen

Einfluss auf die Fehlregulation des Immunsystems und die daraus resultierenden geschilderten Verschiebungen der B-Zell-Subpopulationen zu nehmen.

Diese Beobachtung wird durch das Fehlen einer Langzeitremission bei einer Vielzahl der analysierten Patienten unterstützt. Obwohl in dieser Arbeit nur am Rande auf mögliche Effekte von Rituximab eingegangen wird, ist auch dieses Medikament hinsichtlich einer vollständigen Depletion autoreaktiver B-Zell-Subpopulationen nicht immer uneingeschränkt wirksam (Albert et al., 2008; Sfrikakis et al., 2009). Hinzu kommt, dass CD20-negative Plasmablasten bzw. Plasmazellen kein direktes Target darstellen und die Titer einiger Autoantikörper trotz Therapie unverändert bleiben oder nur teilweise abfallen (Cambridge et al., 2007; Cambridge et al., 2006). Dies kann erklären, warum erste Placebo-kontrollierte randomisierte Studien zum Einsatz von Rituximab bei der Therapie des SLE ihre primären Endpunkte verfehlten. Bisher liegen nur unzureichende Erfahrungen zum Thema der Rekonstitution des B-Zellrepertoires nach Depletion vor. Erkenntnisse, die durch Studien autoreaktiver B-Zellen in verschiedenen Tiermodellen gewonnen wurden, deuten auf eine Expansionsneigung autoreaktiver B-Lymphozyten nach Beseitigung konkurrierender nicht-autoreaktiver B-Lymphozyten hin (Ekland et al., 2004; Knoechel et al., 2005). Eine mögliche Ursache könnten die erhöhten BAFF-Spiegel, die nach B-Zell-Depletion gemessen werden, sein (Cambridge et al., 2007), denn BAFF unterstützt das Überleben autoreaktiver B-Zellen (Thien et al., 2004). Zusammengefasst bedeutet dies, dass der Pool langlebiger Gedächtnis-B-Zellen, welcher alle Voraussetzungen zur Antigenpräsentation und unmittelbaren Antikörpersekretion erfüllt, trotz immunsuppressiver Therapie bei Patienten mit SLE oft nicht ausreichend beeinflusst werden kann, was häufig mit Therapieversagen einhergeht. Demzufolge besteht die Notwendigkeit, weitere und vielleicht nachhaltigere therapeutische Ansätze zu entwickeln, die auf die Depletion oder Modulation aberrant aktivierter oder autoreaktiver B-Lymphozyten abzielen, ohne antigennaive B-Zellen zu beeinträchtigen. In diesem Zusammenhang sollen im Folgenden einige erfolgversprechende Ansätze diskutiert und anschließend ein Ausblick auf anstehende persönliche Projekte gegeben werden.

Unter Zuhilfenahme des DNS-Mimotopes DWEYSVWLSN, welches im Überschuss an einen monoklonalen FcγRIIb-Antikörper gekoppelt wurde, konnte ein selektives *in vitro* Targeting dsDNS-spezifischer Splenozyten von an Lupus erkrankten und zusätzlich mit Diphtherie-Toxoid immunisierten MRL/lpr-Mäusen demonstriert werden. Eine schematische Darstellung dieses Ansatzes findet sich in Abb. 7. *In vivo* wurde eine Verzögerung des Anstieges der Anti-dsDNS-Antikörper-Titer und des Auftretens einer Proteinurie beobachtet (Tchorbanov et al., 2007).

Dass diese Strategie nicht auf ein bestimmtes Antigen, die Anwendung im Mausmodell oder die Nutzung von FcγRIIb-Antikörpern beschränkt ist, zeigen zwei weitere Publikationen der gleichen Gruppe (Mihaylova et al., 2008; Voynova et al., 2008).

Des Weiteren kann das isolierte Targeting des B-Zell-Rezeptors mit toxingekoppeltem Antigen erfolgreich sein, wie Studien an Proteinase 3- spezifischen Hybridomzellen nahelegen (Reiners et al., 2004).

Eine weitere Strategie basiert auf der Nutzung eines Autoantigen-Fc γ 1-Fusionsproteins und macht sich die FcR-vermittelte Depletion der gebundenen autoreaktiven B-Zellen zu Nutze (Zocher et al., 2003).

ETI-104 ist ein Antigen-Heteropolymer, das bereits im Rahmen klinischer Studien zur Therapie des SLE eingesetzt wurde (Iking-Konert et al., 2004). Es setzt sich aus einem monoklonalen CR1-Antikörper (IgG2, Maus-anti-human, 7G9) und dsDNS zusammen. Bisher finden sich in der Literatur keine genauen Angaben zum konkreten *in vivo* - Wirkmechanismus der Substanz, und es ist bisher unklar, ob dsDNS-reaktive B-Zellen ein direktes oder indirektes Target des Antigen-Heteropolymers darstellen. Erst kürzlich ist in diesem Zusammenhang die Wirkung eines weiteren Maus-anti-Human-CR1-Antikörpers (3D9, IgG1), der ebenfalls mit dem dsDNS-Mimotop DWEYSVWLSN gekoppelt wurde, getestet worden (Voynova et al., 2008). Im Rahmen dieser *in vitro*-Untersuchungen von PBMC zeigte sich, dass das Konstrukt in der Lage war, dsDNS-spezifische B-Zellen, gezielt zu beeinflussen.

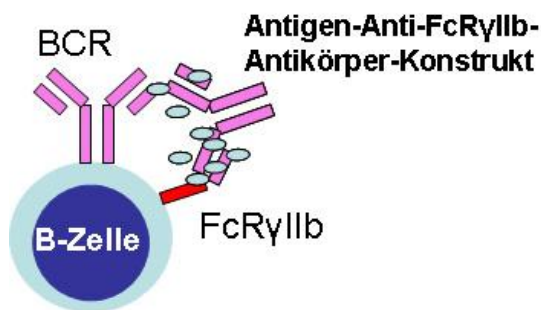


Abb.7. Targeting dsDNS-spezifischer Splenozyten im Mausmodell. Das DNS-Mimotope DWEYSVWLSN, wurde im Überschuss an einen monoklonalen Fc γ RIIb-Antikörper gebunden.

Anknüpfend an den dargelegten Stand der Forschung und eigene Vorarbeiten steht zukünftig das Targeting Antigen-spezifischer B-Lymphozyten im Vordergrund meiner wissenschaftlichen Arbeit. Es ist z.B. die Untersuchung TTC-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen aus dem Blut tetanusimmunisierter Spender hinsichtlich einer selektiven Inhibition unter Zuhilfenahme eines durch gezielte Mutagenese der Fc-Domäne modifizierten monoklonalen humanisierten IgG1 mit hoher Affinität für Fc γ RIIb vorgesehen.

Dieses Konstrukt verursacht lediglich eine Negativregulation des B-Zellrezeptor-Signals, wenn durch Antigen eine Kreuzvernetzung mit dem B-Zell-Rezeptor stattfindet (Abb. 8), was die erforderliche Voraussetzung für die angestrebte Antigen-spezifische

Beeinflussung der B-Zell-Aktivierung zu einem späten Zeitpunkt der Differenzierung schafft.

Wie bereits erläutert, wird FcγRIIb auf CD27-negativen und CD27-positiven Gedächtnis-B-Zellen hochreguliert und sogar auf Plasmablasten und Plasmazellen exprimiert, so dass ein Targeting dieses Rezeptors besonders sinnvoll erscheint, wenn eine Modulation antigenerfahrener B-Zellsubpopulationen erreicht werden soll.

Da die Frequenz antigenspezifischer Gedächtnis-B-Zellen im peripheren Blut selbst nach Immunisierung gering ist (Leyendeckers et al., 1999; Odendahl et al., 2005), werden die geplanten Analysen unter Nutzung von Leukozytenfiltern aus der Blutspende durchgeführt. Gedächtnis-B-Zellen lassen sich *in vitro* durch polyklonale Stimulation z.B. mit CPG und Zytokinen wie z.B. IL-2/10 oder IL-21 in wenigen Tagen zu antikörpersezernierenden Zellen differenzieren (Amana and Slifka, 2006; Bernasconi et al., 2002; Ettinger et al., 2007). Diese können dann anschließend mittels ELISPOT quantifiziert werden. Auch weitere Parameter, wie die Konzentration tetanuspezifischer Antikörper im Kulturüberstand oder durchflusszytometrisch erfassbare Größen, wie die Frequenz und das Proliferationsverhalten CFSE(Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester)-markierter tetanuspezifischer Gedächtnis-B-Zellen unter unterschiedlichen Kulturbedingungen, können zur Beurteilung eines potenziellen antigenspezifischen Effektes von Antigen-Antikörper-Konstrukten beitragen.

Theoretisch können auch Autoantigene an den durch gezielte Mutagenese der Fc-Domäne modifizierten monoklonalen humanisierten IgG1 Antikörper gekoppelt und in vergleichbarer Art und Weise evaluiert werden.

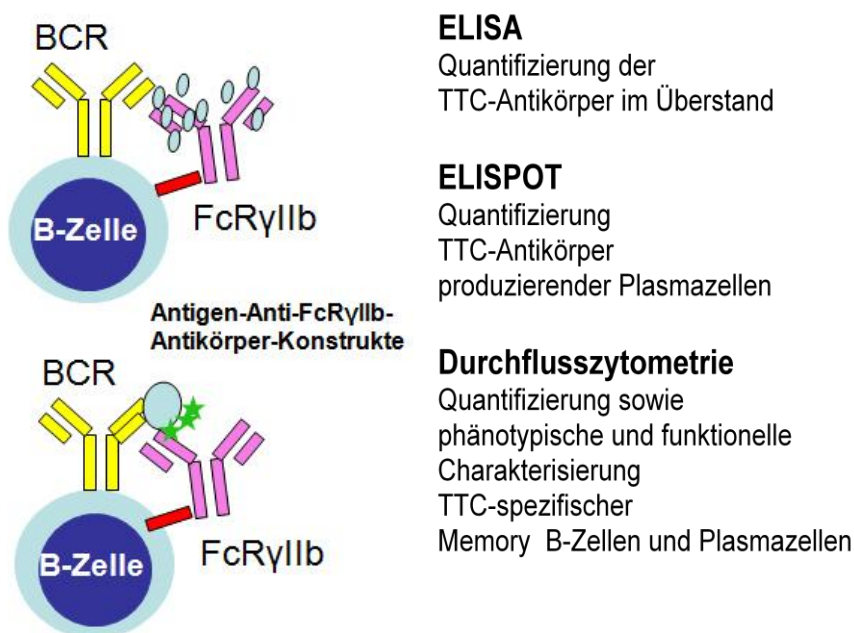


Abb. 8. Modelle zur Antigen-spezifischen Inhibition von Gedächtnis-B-Zellen sowie Methoden zur Evaluation der Effektivität der unterschiedlichen Modelle.

In Frage kommt neben einer kovalenten Bindung von Antigen (obere Abb.) auch der Einsatz FITC-markierter Antigene und FITC-spezifischer Antikörper.

3.3. Therapeutische Beeinflussung aberrant aktivierter B-Lymphozyten

Wie bereits dargelegt, spielt der FcγRIIb eine bedeutende Rolle bei der Regulation der terminalen Abschnitte der B-Zell-Differenzierung und der Plasmazell-Homöostase.

Obwohl nicht antigenspezifisch, wäre der Einsatz von inhibitorisch wirksamen Antikörpern gegen FcγRIIb oder kreuzvernetzenden Antikörpern gegen FcγRIIb und CD19 eine elegante Möglichkeit, eine temporäre Unterbrechung der Differenzierung von B-Lymphozyten zu induzieren, ohne deren Depletion oder eine dauerhafte Funktionsbeeinträchtigung in Kauf nehmen zu müssen. Obwohl erste *in vitro*-Untersuchungen und Experimente mit humanisierten SCID-Mäusen diese Hypothese bestätigen (Chu et al., 2008 und bisher unpublizierte Daten), stehen Untersuchungen an Lupus-B-Zellen noch aus. Diese stellen einen weiteren Schwerpunkt meiner derzeitigen wissenschaftlichen Arbeit dar.

Die Ergebnisse des Einsatzes monoklonaler Antikörper, die gegen auf Gedächtnis-B-Zellen exprimierte FcR-ähnliche Strukturen mit potenziell inhibitorischer Funktion (FCRL2 und FCRL4) gerichtet sind, bleiben derzeit noch abzuwarten.

Obwohl Epratuzumab (anti-CD22) *in vitro* einen inhibierenden Effekt auf aberrant aktivierte B-Lymphozyten von Patienten mit SLE zeigt, ist derzeit noch unklar, inwiefern dieser Mechanismus zur Senkung der Krankheitsaktivität beiträgt. Zudem bedarf der Mechanismus, der der beobachteten Verminderung antigennaiver B-Zellen zugrunde liegt, weiterer Analysen.

Dennoch ist die *in vitro* Testung potenziell B-Zell-modulierender monoklonaler Antikörper an B-Zellsubpopulationen von SLE-Patienten ein nützliches Vorgehen zur Identifikation innovativer Therapiestrategien. Die Weiterentwicklung von auf diesem Wege als wirksam identifizierten Kandidaten und deren Evaluation im humanisierten Tiermodell und im Rahmen klinischer Studien können auf diese Weise vorbereitet und vorangetrieben werden.

4. Zusammenfassung

Der systemische Lupus erythematoses ist durch eine ausgeprägte Aktivierung der B-Lymphozyten gekennzeichnet. Die infolge der Aktivierung und Differenzierung autoreaktiver B-Zellen sezernierten Autoantikörper werden als pathogenetisch bedeutsam angesehen und sind im Falle der Anti-dsDNS-Antikörper auch ein Kriterium des SLE.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse der hier dargestellten Arbeiten nahe, dass der Pool antigenerfahrener B-Lymphozyten, der sowohl Gedächtnis-B-Zellen als auch antikörpersezernierende Zellen umfasst, und somit alle Voraussetzungen zur Antigenpräsentation und unmittelbaren Antikörpersekretion erfüllt, trotz immunsuppressiver Therapie bei Patienten mit SLE oft nicht ausreichend beeinflusst werden kann. Erkrankungsschübe können zum Versagen peripherer B-Zell-Toleranz-Mechanismen führen und eine Anreicherung autoreaktiver B-Zellen im antigenerfahrenen B-Zell-Pool bedingen. Die Ergebnisse longitudinaler Analysen von B-Zell-Subpopulationen zeigen, dass auch innovativere Therapieansätze, wie die Blockade von BAFF oder CD22, keine wesentliche Reduktion von Gedächtnis-B-Zellen und Plasma-Zellen im peripheren Blut von SLE-Patienten herbeiführen. Während Rituximab in der Lage ist, den peripheren Pool der Gedächtnis-B-Zellen und ggf. auch kurzlebigen Plasmazellen temporär zu eliminieren, ist noch unklar, ob sich diese Beobachtung auch auf entzündlich verändertes Gewebe und das Knochenmark übertragen lässt. Ein Nachteil ist außerdem, dass unter Anwendung von Rituximab Therapieerfolge nur durch eine Beseitigung aller B-Lymphozyten erreicht werden können, was trotz des fortbestehenden serologischen Gedächtnisses die Abwehrlage der Patienten im Falle von Primärinfektionen deutlich schwächt und eine Expansion autoreaktiver B-Zellen eventuell sogar fördern könnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten unterstreichen den bestehenden Bedarf an innovativen Therapiestrategien. Einerseits stellen autoantigenspezifische Therapieansätze, welche eine selektive Depletion oder Modulation autoreaktiver B-Lymphozyten ermöglichen, ein vielversprechendes Behandlungskonzept dar. Andererseits könnten B-Zell-inhibierende monoklonale Antikörper eingesetzt werden, die eine durch defekte oder überwältigte B-Zell-Toleranzmechanismen verursachte Akkumulation autoantikörpersezernierender Zellen verhindern, indem sie die überschießende Aktivierung der B-Zellen bei Patienten mit SLE negativ regulieren. Diesbezüglich werden innovative Therapiestrategien vorgestellt und diskutiert.

5. Literaturangaben

- Agematsu, K.**, Hokibara, S., Nagumo, H., and Komiyama, A. (2000). CD27: a memory B-cell marker. *Immunol Today* 21, 204-206.
- Albert, D.**, Dunham, J., Khan, S., Stansberry, J., Kolasinski, S., Tsai, D., Pullman-Moore, S., Barnack, F., Striebich, C., Looney, R.J., *et al.* (2008). Variability in the biological response to anti-CD20 B cell depletion in systemic lupus erythematosis. *Ann Rheum Dis* 67, 1724-1731.
- Amanna, I.J.**, and Slifka, M.K. (2006). Quantitation of rare memory B cell populations by two independent and complementary approaches. *J Immunol Methods* 317, 175-185.
- Amigorena, S.**, Bonnerot, C., Choquet, D., Fridman, W.H., and Teillaud, J.L. (1989). Fc gamma RII expression in resting and activated B lymphocytes. *Eur J Immunol* 19, 1379-1385.
- Anolik, J.H.**, Barnard, J., Cappione, A., Pugh-Bernard, A.E., Felgar, R.E., Looney, R.J., and Sanz, I. (2004). Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50, 3580-3590.
- Avery, D.T.**, Bryant, V.L., Ma, C.S., de Waal Malefyt, R., and Tangye, S.G. (2008a). IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *J Immunol* 181, 1767-1779.
- Avery, D.T.**, Ma, C.S., Bryant, V.L., Santner-Nanan, B., Nanan, R., Wong, M., Fulcher, D.A., Cook, M.C., and Tangye, S.G. (2008b). STAT3 is required for IL-21-induced secretion of IgE from human naive B cells. *Blood* 112, 1784-1793.
- Baker, K.P.**, Edwards, B.M., Main, S.H., Choi, G.H., Wager, R.E., Halpern, W.G., Lappin, P.B., Riccobene, T., Abramian, D., Sekut, L., *et al.* (2003). Generation and characterization of LymphoStat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator. *Arthritis Rheum* 48, 3253-3265.
- Barcellini, W.**, Borghi, M.O., Fain, C., Del Papa, N., Nicoletti, F., and Meroni, P.L. (1992). Enrichment of IgG anti-DNA-producing lymphoblastoid cell lines by antigen-coated immunomagnetic beads. *Clin Immunol Immunopathol* 65, 39-44.
- Baroni, S.S.**, Santillo, M., Bevilacqua, F., Luchetti, M., Spadoni, T., Mancini, M., Fraticelli, P., Sambo, P., Funaro, A., Kazlauskas, A., *et al.* (2006). Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med* 354, 2667-2676.
- Bernasconi, N.L.**, Traggiai, E., and Lanzavecchia, A. (2002). Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298, 2199-2202.
- Bijl, M.**, Horst, G., Limburg, P.C., and Kallenberg, C.G. (2001). Fas expression on peripheral blood lymphocytes in systemic lupus erythematosus (SLE): relation to lymphocyte activation and disease activity. *Lupus* 10, 866-872.
- Bolland, S.**, and Ravetch, J.V. (2000). Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* 13, 277-285.
- Bossen, C.**, and Schneider, P. (2006). BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin Immunol* 18, 263-275.
- Briere, F.**, Servet-Delprat, C., Bridon, J.M., Saint-Remy, J.M., and Banchereau, J. (1994). Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (sIgD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3. *J Exp Med* 179, 757-762.
- Brodie, G.M.**, Wallberg, M., Santamaria, P., Wong, F.S., and Green, E.A. (2008). B-cells promote intra-islet CD8+ cytotoxic T-cell survival to enhance type 1 diabetes. *Diabetes* 57, 909-917.
- Cambridge, G.**, Isenberg, D.A., Edwards, J., Leandro, M.J., Migone, T.S., Teodorescu, M., and Stohl, W. (2007). B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: relationships among serum B lymphocyte stimulator levels, autoantibody profile and clinical response. *Ann Rheum Dis*.
- Cambridge, G.**, Leandro, M.J., Teodorescu, M., Manson, J., Rahman, A., Isenberg, D.A., and Edwards, J.C. (2006). B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: effect on autoantibody and antimicrobial antibody profiles. *Arthritis Rheum* 54, 3612-3622.

Capolunghi, F., Cascioli, S., Giorda, E., Rosado, M.M., Plebani, A., Auriti, C., Seganti, G., Zuntini, R., Ferrari, S., Cagliuso, M., *et al.* (2008). CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J Immunol* *180*, 800-808.

Carnahan, J., Wang, P., Kendall, R., Chen, C., Hu, S., Boone, T., Juan, T., Talvenheimo, J., Montestruque, S., Sun, J., *et al.* (2003). Epratuzumab, a humanized monoclonal antibody targeting CD22: characterization of in vitro properties. *Clin Cancer Res* *9*, 3982S-3990S.

Chen, J., McLean, P.A., Neel, B.G., Okunade, G., Shull, G.E., and Wortis, H.H. (2004). CD22 attenuates calcium signaling by potentiating plasma membrane calcium-ATPase activity. *Nat Immunol* *5*, 651-657.

Chu, S.Y., Vostiar, I., Karki, S., Moore, G.L., Lazar, G.A., Pong, E., Joyce, P.F., Szymkowski, D.E., and Desjarlais, J.R. (2008). Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIb with Fc-engineered antibodies. *Mol Immunol* *45*, 3926-3933.

Crocker, P.R., Paulson, J.C., and Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* *7*, 255-266.

Dar, O., Salaman, M.R., Seifert, M.H., and Isenberg, D.A. (1988). B lymphocyte activation in systemic lupus erythematosus: spontaneous production of IgG antibodies to DNA and environmental antigens in cultures of blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* *73*, 430-435.

Davis, R.S. (2007). Fc receptor-like molecules. *Annu Rev Immunol* *25*, 525-560.

Dorner, T., Jacobi, A.M., and Lipsky, P.E. (2009). B cells in autoimmunity. *Arthritis Res Ther* *11*, 247.

Ehrhardt, G.R., Davis, R.S., Hsu, J.T., Leu, C.M., Ehrhardt, A., and Cooper, M.D. (2003). The inhibitory potential of Fc receptor homolog 4 on memory B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 13489-13494.

Ekland, E.H., Forster, R., Lipp, M., and Cyster, J.G. (2004). Requirements for follicular exclusion and competitive elimination of autoantigen-binding B cells. *J Immunol* *172*, 4700-4708.

Ettinger, R., Sims, G.P., Fairhurst, A.M., Robbins, R., da Silva, Y.S., Spolski, R., Leonard, W.J., and Lipsky, P.E. (2005). IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J Immunol* *175*, 7867-7879.

Ettinger, R., Sims, G.P., Robbins, R., Withers, D., Fischer, R.T., Grammer, A.C., Kuchen, S., and Lipsky, P.E. (2007). IL-21 and BAFF/BLyS synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells. *J Immunol* *178*, 2872-2882.

Fukuyama, H., Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2005). The inhibitory FcγRIIIb receptor modulates autoimmunity by limiting the accumulation of immunoglobulin G+ anti-DNA plasma cells. *Nat Immunol* *6*, 99-106.

Gross, J.A., Johnston, J., Mudri, S., Enselman, R., Dillon, S.R., Madden, K., Xu, W., Parrish-Novak, J., Foster, D., Lofton-Day, C., *et al.* (2000). TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* *404*, 995-999.

Harley, J.B., Kelly, J.A., and Kaufman, K.M. (2006). Unraveling the genetics of systemic lupus erythematosus. *Springer Semin Immunopathol* *28*, 119-130.

Hashimoto, A., Hirose, K., Okada, H., Kurosaki, T., and Iino, M. (1999). Inhibitory modulation of B cell receptor-mediated Ca²⁺ mobilization by Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP). *J Biol Chem* *274*, 11203-11208.

Hoffmann, A., Kerr, S., Jellusova, J., Zhang, J., Weisel, F., Wellmann, U., Winkler, T.H., Kneitz, B., Crocker, P.R., and Nitschke, L. (2007). Siglec-G is a B1 cell-inhibitory receptor that controls expansion and calcium signaling of the B1 cell population. *Nat Immunol* *8*, 695-704.

Hostmann, A., Jacobi, A.M., Mei, H., Hiepe, F., and Dorner, T. (2008). Peripheral B cell abnormalities and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* *17*, 1064-1069.

Huck, S., Jamin, C., Youinou, P., and Zouali, M. (1998). High-density expression of CD95 on B cells and underrepresentation of the B-1 cell subset in human lupus. *J Autoimmun* *11*, 449-455.

Iking-Konert, C., Stocks, S., Weinsberg, F., Engelbrecht, R., Bleck, E., Perniok, A., Fischer-Betz, R., Pincus, S., Nardone, L., and Schneider, M. (2004). First clinical trials of a new heteropolymer technology agent in normal healthy volunteers and patients with systemic lupus erythematosus: safety and proof of principle of the antigen-heteropolymer ETI-104. *Ann Rheum Dis* 63, 1104-1112.

Irsch, J., Hunzelmann, N., Tesch, H., Merk, H., Maggi, E., Ruffilli, A., and Radbruch, A. (1995). Isolation and characterization of allergen-binding cells from normal and allergic donors. *Immunotechnology* 1, 115-125.

Jacobi, A.M., and Diamond, B. (2005). Balancing diversity and tolerance: lessons from patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 202, 341-344.

Jacobi, A.M., Goldenberg, D.M., Hiepe, F., Radbruch, A., Burmester, G.R., and Dorner, T. (2008a). Differential effects of epratuzumab on peripheral blood B cells of patients with systemic lupus erythematosus versus normal controls. *Ann Rheum Dis* 67, 450-457.

Jacobi, A.M., Hansen, A., Burmester, G.R., Dorner, T., and Lipsky, P.E. (2000). Enhanced mutational activity and disturbed selection of mutations in V(H) gene rearrangements in a patient with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 33, 61-76.

Jacobi, A.M., Mei, H., Hoyer, B.F., Mumtaz, I.M., Thiele, K., Radbruch, A., Burmester, G.R., Hiepe, F., and Dörner, T. (2010b). HLA-DR^{high}/CD27^{high} plasmablasts indicate active disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis Jan;69(1)*, 305-308.

Jacobi, A.M., Odendahl, M., Reiter, K., Bruns, A., Burmester, G.R., Radbruch, A., Valet, G., Lipsky, P.E., and Dorner, T. (2003). Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 48, 1332-1342.

Jacobi, A.M., Reiter, K., Mackay, M., Aranow, C., Hiepe, F., Radbruch, A., Hansen, A., Burmester, G.R., Diamond, B., Lipsky, P.E., and Dorner, T. (2008b). Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis Rheum* 58, 1762-1773.

Jacobi, A.M., Rohde, W., Volk, H.D., Dorner, T., Burmester, G.R., and Hiepe, F. (2001). Prolactin enhances the in vitro production of IgG in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus but not from healthy controls. *Ann Rheum Dis* 60, 242-247.

Jacobi, A.M., Zhang, J., Mackay, M., Aranow, C., and Diamond, B. (2009). Phenotypic characterization of autoreactive B cells--checkpoints of B cell tolerance in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One* 4, e5776.

Kelm, S., Pelz, A., Schauer, R., Filbin, M.T., Tang, S., de Bellard, M.E., Schnaar, R.L., Mahoney, J.A., Hartnell, A., Bradfield, P., and et al. (1994). Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Curr Biol* 4, 965-972.

Khare, S.D., Sarosi, I., Xia, X.Z., McCabe, S., Miner, K., Solovyev, I., Hawkins, N., Kelley, M., Chang, D., Van, G., et al. (2000). Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3370-3375.

Klein, U., Rajewsky, K., and Kuppers, R. (1998). Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 188, 1679-1689.

Knoechel, B., Lohr, J., Kahn, E., and Abbas, A.K. (2005). The link between lymphocyte deficiency and autoimmunity: roles of endogenous T and B lymphocytes in tolerance. *J Immunol* 175, 21-26.

Leonard, J.P., Coleman, M., Ketas, J.C., Chadburn, A., Ely, S., Furman, R.R., Wegener, W.A., Hansen, H.J., Ziccardi, H., Eschenberg, M., et al. (2003). Phase I/II trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) in indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 21, 3051-3059.

Leprince, C., Draves, K.E., Geahlen, R.L., Ledbetter, J.A., and Clark, E.A. (1993). CD22 associates with the human surface IgM-B-cell antigen receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3236-3240.

Lesley, R., Xu, Y., Kalled, S.L., Hess, D.M., Schwab, S.R., Shu, H.B., and Cyster, J.G. (2004). Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity* 20, 441-453.

Leyendeckers, H., Odendahl, M., Lohndorf, A., Irsch, J., Spangfort, M., Miltenyi, S., Hunzelmann, N., Assenmacher, M., Radbruch, A., and Schmitz, J. (1999). Correlation analysis between frequencies of circulating antigen-specific IgG-bearing memory B cells and serum titers of antigen-specific IgG. *Eur J Immunol* 29, 1406-1417.

Litinskiy, M.B., Nardelli, B., Hilbert, D.M., He, B., Schaffer, A., Casali, P., and Cerutti, A. (2002). DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol* 3, 822-829.

Lu, T.Y., Ng, K.P., Cambridge, G., Leandro, M.J., Edwards, J.C., Ehrenstein, M., and Isenberg, D.A. (2009). A retrospective seven-year analysis of the use of B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus at University College London Hospital: the first fifty patients. *Arthritis Rheum* 61, 482-487.

Mackay, F., and Ambrose, C. (2003). The TNF family members BAFF and APRIL: the growing complexity. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 311-324.

Mackay, F., Silveira, P.A., and Brink, R. (2007). B cells and the BAFF/APRIL axis: fast-forward on autoimmunity and signaling. *Curr Opin Immunol* 19, 327-336.

Mackay, M., Stanevsky, A., Wang, T., Aranow, C., Li, M., Koenig, S., Ravetch, J.V., and Diamond, B. (2006). Selective dysregulation of the FcγRIIB receptor on memory B cells in SLE. *J Exp Med* 203, 2157-2164.

Mihaylova, N., Voynova, E., Tchorbanov, A., Nikolova, M., Michova, A., Todorov, T., Srebrev, L., Taskov, H., and Vassilev, T. (2008). Selective silencing of disease-associated B-lymphocytes by chimeric molecules targeting their FcγRIIB receptor. *Int Immunol* 20, 165-175.

Newman, J., Rice, J.S., Wang, C., Harris, S.L., and Diamond, B. (2003). Identification of an antigen-specific B cell population. *J Immunol Methods* 272, 177-187.

Nitschke, L., Carsetti, R., Ocker, B., Kohler, G., and Lamers, M.C. (1997). CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr Biol* 7, 133-143.

Nitschke, L., Floyd, H., Ferguson, D.J., and Crocker, P.R. (1999). Identification of CD22 ligands on bone marrow sinusoidal endothelium implicated in CD22-dependent homing of recirculating B cells. *J Exp Med* 189, 1513-1518.

O'Connor, B.P., Raman, V.S., Erickson, L.D., Cook, W.J., Weaver, L.K., Ahonen, C., Lin, L.L., Mantchev, G.T., Bram, R.J., and Noelle, R.J. (2004). BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med* 199, 91-98.

O'Keefe, T.L., Williams, G.T., Davies, S.L., and Neuberger, M.S. (1996). Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice. *Science* 274, 798-801.

Odegard, J.M., Marks, B.R., DiPlacido, L.D., Poholek, A.C., Kono, D.H., Dong, C., Flavell, R.A., and Craft, J. (2008). ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity. *J Exp Med* 205, 2873-2886.

Odendahl, M., Jacobi, A., Hansen, A., Feist, E., Hiepe, F., Burmester, G.R., Lipsky, P.E., Radbruch, A., and Dorner, T. (2000). Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 165, 5970-5979.

Odendahl, M., Mei, H., Hoyer, B.F., Jacobi, A.M., Hansen, A., Muehlinghaus, G., Berek, C., Hiepe, F., Manz, R., Radbruch, A., and Dorner, T. (2005). Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood* 105, 1614-1621.

Otipoby, K.L., Andersson, K.B., Draves, K.E., Klaus, S.J., Farr, A.G., Kerner, J.D., Perlmutter, R.M., Law, C.L., and Clark, E.A. (1996). CD22 regulates thymus-independent responses and the lifespan of B cells. *Nature* 384, 634-637.

Pene, J., Gauchat, J.F., Lecart, S., Drouet, E., Guglielmi, P., Boulay, V., Delwail, A., Foster, D., Lecron, J.C., and Yssel, H. (2004). Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. *J Immunol* 172, 5154-5157.

Pflugh, D.L., Maher, S.E., and Bothwell, A.L. (2002). Ly-6 superfamily members Ly-6A/E, Ly-6C, and Ly-6I recognize two potential ligands expressed by B lymphocytes. *J Immunol* 169, 5130-5136.

Piskurich, J.F., Lin, K.I., Lin, Y., Wang, Y., Ting, J.P., and Calame, K. (2000). BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells. *Nat Immunol* 1, 526-532.

Poe, J.C., Fujimoto, M., Jansen, P.J., Miller, A.S., and Tedder, T.F. (2000). CD22 forms a quaternary complex with SHIP, Grb2, and Shc. A pathway for regulation of B lymphocyte antigen receptor-induced calcium flux. *J Biol Chem* 275, 17420-17427.

Poe, J.C., Fujimoto, Y., Hasegawa, M., Haas, K.M., Miller, A.S., Sanford, I.G., Bock, C.B., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2004). CD22 regulates B lymphocyte function in vivo through both ligand-dependent and ligand-independent mechanisms. *Nat Immunol* 5, 1078-1087.

Powell, L.D., Sgroi, D., Sjoberg, E.R., Stamenkovic, I., and Varki, A. (1993). Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22 beta carry N-linked oligosaccharides with alpha-2,6-linked sialic acids that are required for recognition. *J Biol Chem* 268, 7019-7027.

Pritchard, N.R., Cutler, A.J., Uribe, S., Chadban, S.J., Morley, B.J., and Smith, K.G. (2000). Autoimmune-prone mice share a promoter haplotype associated with reduced expression and function of the Fc receptor Fc gamma RII. *Curr Biol* 10, 227-230.

Rahman, A., Kumar, S., and Potter, K.N. (2002). Anti-DNA antibodies--structure and function. *Lupus* 11, 776-779.

Rahman, Z.S., Alabyev, B., and Manser, T. (2007). Fc gamma RIIB regulates autoreactive primary antibody-forming cell, but not germinal center B cell, activity. *J Immunol* 178, 897-907.

Rahman, Z.S., and Manser, T. (2005). Failed up-regulation of the inhibitory IgG Fc receptor Fc gamma RIIB on germinal center B cells in autoimmune-prone mice is not associated with deletion polymorphisms in the promoter region of the Fc gamma RIIB gene. *J Immunol* 175, 1440-1449.

Rahman, Z.S., Rao, S.P., Kalled, S.L., and Manser, T. (2003). Normal induction but attenuated progression of germinal center responses in BAFF and BAFF-R signaling-deficient mice. *J Exp Med* 198, 1157-1169.

Ramanujam, M., and Davidson, A. (2004). The current status of targeting BAFF/BLyS for autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther* 6, 197-202.

Ramanujam, M., and Davidson, A. (2008). BAFF blockade for systemic lupus erythematosus: will the promise be fulfilled? *Immunol Rev* 223, 156-174.

Ramanujam, M., Wang, X., Huang, W., Liu, Z., Schiffer, L., Tao, H., Frank, D., Rice, J., Diamond, B., Yu, K.O., *et al.* (2006). Similarities and differences between selective and nonselective BAFF blockade in murine SLE. *J Clin Invest* 116, 724-734.

Reiners, K.S., Hansen, H.P., Krussmann, A., Schon, G., Csernok, E., Gross, W.L., Engert, A., and Von Strandmann, E.P. (2004). Selective killing of B-cell hybridomas targeting proteinase 3, Wegener's autoantigen. *Immunology* 112, 228-236.

Rice, J.S., Newman, J., Wang, C., Michael, D.J., and Diamond, B. (2005). Receptor editing in peripheral B cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1608-1613.

Rudge, E.U., Cutler, A.J., Pritchard, N.R., and Smith, K.G. (2002). Interleukin 4 reduces expression of inhibitory receptors on B cells and abolishes CD22 and Fc gamma RII-mediated B cell suppression. *J Exp Med* 195, 1079-1085.

Saiki, O., Saeki, Y., and Kishimoto, S. (1985). Spontaneous immunoglobulin A secretion and lack of mitogen-responsive B cells in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 76, 1865-1870.

Santos, L., Draves, K.E., Boton, M., Grewal, P.K., Marth, J.D., and Clark, E.A. (2008). Dendritic cell-dependent inhibition of B cell proliferation requires CD22. *J Immunol* 180, 4561-4569.

Schiemann, B., Gommerman, J.L., Vora, K., Cachero, T.G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E., and Scott, M.L. (2001). An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 293, 2111-2114.

Seshasayee, D., Valdez, P., Yan, M., Dixit, V.M., Tumas, D., and Grewal, I.S. (2003). Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor. *Immunity* 18, 279-288.

Sfikakis, P.P., Karali, V., Lilakos, K., Georgiou, G., and Panayiotidis, P. (2009). Clonal expansion of B-cells in human systemic lupus erythematosus: evidence from studies before and after therapeutic B-cell depletion. *Clin Immunol* 132, 19-31.

Sgroi, D., Varki, A., Braesch-Andersen, S., and Stamenkovic, I. (1993). CD22, a B cell-specific immunoglobulin superfamily member, is a sialic acid-binding lectin. *J Biol Chem* 268, 7011-7018.

Shushakova, N., Skokowa, J., Schulman, J., Baumann, U., Zwirner, J., Schmidt, R.E., and Gessner, J.E. (2002). C5a anaphylatoxin is a major regulator of activating versus inhibitory FcγR1b in immune complex-induced lung disease. *J Clin Invest* 110, 1823-1830.

Sjoberg, E.R., Powell, L.D., Klein, A., and Varki, A. (1994). Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22 beta can be masked by 9-O-acetylation of sialic acids. *J Cell Biol* 126, 549-562.

Stamenkovic, I., Sgroi, D., Aruffo, A., Sy, M.S., and Anderson, T. (1991). The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and alpha 2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells. *Cell* 66, 1133-1144.

Su, K., Yang, H., Li, X., Li, X., Gibson, A.W., Cafardi, J.M., Zhou, T., Edberg, J.C., and Kimberly, R.P. (2007). Expression profile of FcγR1b on leukocytes and its dysregulation in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 178, 3272-3280.

Tchorbanov, A.I., Voynova, E.N., Mihaylova, N.M., Todorov, T.A., Nikolova, M., Yomtova, V.M., Chiang, B.L., and Vassilev, T.L. (2007). Selective silencing of DNA-specific B lymphocytes delays lupus activity in MRL/lpr mice. *Eur J Immunol* 37, 3587-3596.

Thien, M., Phan, T.G., Gardam, S., Amesbury, M., Basten, A., Mackay, F., and Brink, R. (2004). 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.

Tiller, T., Tsuji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Nussenzweig, M.C., and Wardemann, H. (2007). Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. *Immunity* 26, 205-213.

Tremblay, L.S., Crowley, J.E., and Cancro, M.P. (2006). B₁LyS receptor signatures resolve homeostatically independent compartments among naive and antigen-experienced B cells. *Semin Immunol* 18, 297-304.

Tsuchiya, N., Honda, Z., and Tokunaga, K. (2006). Role of B cell inhibitory receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a negative times a negative makes a positive. *J Hum Genet* 51, 741-750.

Veri, M.C., Gorlatov, S., Li, H., Burke, S., Johnson, S., Stavenhagen, J., Stein, K.E., Bonvini, E., and Koenig, S. (2007). Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory FcγR1b (CD32B) from the activating FcγR1a (CD32A): biochemical, biological and functional characterization. *Immunology* 121, 392-404.

Voynova, E., Tchorbanov, A., Prechl, J., Nikolova, M., Baleva, M., Erdei, A., and Vassilev, T. (2008). An antibody-based construct carrying DNA-mimotope and targeting CR1(CD35) selectively suppresses human autoreactive B-lymphocytes. *Immunol Lett* 116, 168-173.

Wallace, D.J., Stohl, W., Furie, R.A., Lisse, J.R., McKay, J.D., Merrill, J.T., Petri, M.A., Ginzler, E.M., Chatham, W.W., McCune, W.J., *et al.* (2009). A phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 61, 1168-1178.

Wang, Y.H., and Diamond, B. (2008). B cell receptor revision diminishes the autoreactive B cell response after antigen activation in mice. *J Clin Invest* 118, 2896-2907.

Wehr, C., Eibel, H., Masilamani, M., Illges, H., Schlesier, M., Peter, H.H., and Warnatz, K. (2004). A new CD21^{low} B cell population in the peripheral blood of patients with SLE. *Clin Immunol* 113, 161-171.

Wong, F.S., Wen, L., Tang, M., Ramanathan, M., Visintin, I., Daugherty, J., Hannum, L.G., Janeway, C.A., Jr., and Shlomchik, M.J. (2004). Investigation of the role of B-cells in type 1 diabetes in the NOD mouse. *Diabetes* 53, 2581-2587.

Xiang, Z., Cutler, A.J., Brownlie, R.J., Fairfax, K., Lawlor, K.E., Severinson, E., Walker, E.U., Manz, R.A., Tarlinton, D.M., and Smith, K.G. (2007). FcγR1b controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nat Immunol* 8, 419-429.

Xiu, Y., Wong, C.P., Bouaziz, J.D., Hamaguchi, Y., Wang, Y., Pop, S.M., Tisch, R.M., and Tedder, T.F. (2008). B Lymphocyte Depletion by CD20 Monoclonal Antibody Prevents Diabetes in Nonobese Diabetic Mice despite Isotype-Specific Differences in Fc γ R Effector Functions. *J Immunol* 180, 2863-2875.

Yurasov, S., Tiller, T., Tsuiji, M., Velinzon, K., Pascual, V., Wardemann, H., and Nussenzweig, M.C. (2006). Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. *J Exp Med* 203, 2255-2261.

Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V., and Nussenzweig, M.C. (2005). Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 201, 703-711.

Zhang, J., Jacobi, A.M., Mackay, M., Aranow, C., Wang, T., Chinnasamy, P., and Diamond, B. (2008a). Identification of DNA-reactive B cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods* 338, 79-84.

Zhang, J., Jacobi, A.M., Wang, T., Berlin, R., Volpe, B.T., and Diamond, B. (2009). Polyreactive autoantibodies in systemic lupus erythematosus have pathogenic potential. *J Autoimmun* 33, 270-274.

Zhang, J., Jacobi, A.M., Wang, T., and Diamond, B. (2008b). Pathogenic autoantibodies in systemic lupus erythematosus are derived from both self-reactive and non-self-reactive B cells. *Mol Med* 14, 675-681.

Zocher, M., Baeuerle, P.A., Dreier, T., and Iglesias, A. (2003). Specific depletion of autoreactive B lymphocytes by a recombinant fusion protein in vitro and in vivo. *Int Immunol* 15, 789-796.

6. Danksagung

Viele Personen haben mich bei der Durchführung der hier zusammengestellten Arbeiten unterstützt. Diese wurden in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, dem Deutschen Rheumaforschungszentrums Berlin, der Rheumatologischen Abteilung der Medizinischen Klinik der Columbia Universität in New York und dem Feinstein Institut für Medizinische Forschung auf Long Island durchgeführt. Besonderer Dank gilt meinen Mentoren Thomas Dörner, Falk Hiepe, Betty Diamond und Anne Davidson, die mich unterstützten und sehr förderten sowie Gerd Burmester und Andreas Radbruch, die die erforderlichen Rahmenbedingungen schufen und mir auch mit Rat zur Seite standen.

Mein Dank gilt außerdem allen auf den Publikationen erwähnten Koautoren, die in ganz unterschiedlicher Weise zu meiner wissenschaftlichen Entwicklung beigetragen haben.

Besonderen Dank schulde ich beispielsweise denjenigen, die mir geduldig all das Handwerkszeug mit auf den Weg gegeben haben, das für die Durchführung der zusammengestellten Arbeiten nötig war und das eine solide Basis für alle meine zukünftigen Vorhaben darstellt. Mein ganz besonderer Dank gilt diesbezüglich Marcus Odendahl, Karin Reiter, Arne Hansen, Luisa Cigliano, Jie Zhang, Joël Cohen-Solal, Christine Grimaldi, Stella Stefanova, Kristie Gordon, Czeslawa Kowal und Jason Ptacek.

Aber auch allen Kollegen, die mich in anderer Weise unterstützt haben, möchte ich danken. Anne Bruns, Eugen Feist, Bimba Hoyer, Meggan Mackay, Cynthia Aranow, Julia Hübner und Giovanni Franchin gilt mein besonderer Dank für die stets gute und fruchtbare Zusammenarbeit.

Die Arbeiten wurden gefördert durch die universitäre Forschungsförderung der Charité, das MSD-Stipendium Arthrose/Arthritis 2004 und das „Irvington Institute Fellowship Program of the Cancer Research Institute“.

7. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift