

Aus dem CharitéCentrum für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie  
Klinik für Neurologie mit Experimenteller Neurologie

Charité Campus Mitte

Direktor: Prof. Dr. Matthias Endres

## Habilitationsschrift

Untersuchungen zur Pathophysiologie und zu  
experimentellen Therapieansätzen der Myasthenia Gravis

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Neurologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Siegfried Kohler  
geboren in Wangen im Allgäu

Eingereicht: Juni 2020

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter/in: Prof. Dr. Alexander Marx, Mannheim

2. Gutachter/in: Prof. Dr. Michael Schroeter, Köln

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	3
1. Einleitung.....	4
1.1. Allgemeines zur Myasthenia Gravis .....	4
1.2. Pathophysiologie.....	4
1.3. Klinische Verlaufsformen der Myasthenie.....	6
1.4. Aktuelle Therapie der Myasthenie .....	7
1.5. Ziele der Rehabilitationsarbeit.....	8
2. Eigene Arbeiten .....	10
2.1. IL-17-produzierende CD4 <sup>+</sup> T Zellen tragen zum Verlust der B-Zell Toleranz im Mausmodell der experimentellen autoimmunen Myasthenia gravis(EAMG) bei.....	10
2.2. Veränderungen der naiven CD4 <sup>+</sup> T Zell Homöostase in Myasthenia Gravis und Thymom Patienten .....	21
2.3. CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> T regulatorische Zell Subsets in Myasthenia gravis Patienten.....	28
2.4. Veränderte Verteilung der B Zell Subpopulationen und erhöhte Plasmazellen bei Myasthenia Gravis Patienten.....	36
2.5. Die S1P Rezeptor Antagonisten Fingolimod und Siponimod bewirken keine Verbesserung der EAMG bei Verabreichung nach Krankheitsbeginn .....	45
3. Diskussion .....	58
3.1. Pathophysiologie der Myasthenie:.....	58
3.1.1. Neue pathophysiologische Erkenntnisse im Mausmodell: die essentielle Rolle von Th17 Zellen.....	58
3.1.2. Neue pathophysiologische Erkenntnisse bei MG Patienten: Naive T Zellen, regulatorische T Zellen und B und Plasmazellen bei der Myasthenie .....	59
3.2. Neue therapeutische Optionen zur Behandlung der Myasthenia Gravis .....	64
3.2.1. S1P Rezeptor Antagonismus als therapeutisches Prinzip bei der EAMG .....	64
4. Zusammenfassung.....	67
5. Literaturangaben.....	68
6. Danksagung.....	74
7. Erklärung.....	75

# Abkürzungen

MG	Myasthenia Gravis
AChR	Acetylcholinrezeptor
T <sub>reg</sub>	regulatorische CD4 <sup>+</sup> T Zellen
AIRE	Autoimmune Regulator
MuSK	muskelspezifische Kinase
EAMG	experimentelle autoimmune Myasthenia Gravis
IL-17	Interleukin 17
TH17 Zellen	Interleukin 17 produzierende CD4 <sup>+</sup> T Zellen
MS	Multiiple Sklerose
S1P	Sphingosine-1-Phosphate (S1P)
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
NMDA	N-methyl-d- aspartat
QoI	Quality of Life
ADL	Activities of daily living
TFH Zellen	T follikulär Helper Zellen
TREC	T Zell Rezeptor Exzisionsringe

# 1. Einleitung

## 1.1. Allgemeines zur Myasthenia Gravis

Die Myasthenia gravis (MG) ist eine klassische antikörpervermittelte Autoimmunerkrankung deren Hauptantigen, der Acetylcholinrezeptor (AChR) der neuromuskulären Endplatte, bereits vor vielen Jahren identifiziert werden konnte. In der Mehrzahl der Patienten, d.h. in etwa 80-85% sind Antikörper gegen diese Zielstruktur vorhanden (Vincent et al., 2001). Seit einigen Jahren ist zwar bekannt, dass auch andere Antigene, u.a. MuSK und LRP4 eine Rolle zu spielen scheinen, dagegen gerichtete Antikörper sind jedoch deutlich seltener nachweisbar (Hoch et al., 2001, Cordts et al., 2017).

Dass diese Antikörper wiederum für die Krankheitssymptomatik, welche sich in einer belastungsabhängigen Muskelschwäche die unterschiedliche Muskelgruppen in unterschiedlichem Ausmaß betreffen kann äußert, verantwortlich sind, ist weitestgehend unbestritten:

So kann ein Transfer von humanem Serum in Mäuse die Erkrankung sowohl klinisch als auch elektrophysiologisch reproduzieren (Toyka et al., 1977). Umgekehrt führt eine Reduktion des Antikörpertiters z.B. mittels Plasmapherese oder Immunadsorption zu einer deutlichen Besserung der Symptomatik und wird demzufolge im Rahmen der mitunter lebensbedrohlichen myasthenen Krisen regelmäßig angewandt (Sieb, 2014).

## 1.2. Pathophysiologie

Als pathophysiologisches Korrelat der Muskelschwäche geht man von einem relativen Mangel an funktionalem Acetylcholinrezeptor an der neuromuskulären Synapse aus. Dieser entsteht durch die pathologischen Autoantikörper und deren Bindung an den AChR, wodurch dessen Blockade bzw. Degradation verursacht wird (Vincent et al., 2001). Die genaue Ursache der Bildung dieser pathologischen Antikörper ist unklar.

Seit längerem ist jedoch die hohe Assoziation zwischen Thymuspathologien und der MG bekannt. So sind in ca. 50-70% der Patienten eine Vergrößerung und entzündliche Reaktion, eine sogenannte folliculäre Hyperplasie, der Thymusdrüse vorhanden bzw. in 10-15% der Patienten ist ein meist gutartiger Tumor der Thymusdrüse, ein sogenanntes Thymom, nachweisbar (Cavalcante et al., 2011). Diese Erkenntnis hat unter anderem dazu geführt, dass eine operative Entfernung der Thymusdrüse seit

mehreren Jahren als immunmodulatorische Therapie der Myasthenie durchgeführt wird. Der eindeutige Nachweis des positiven therapeutischen Effekts der Thymektomie bei der Myasthenie erfolgte jedoch erst vor kurzem in einer randomisierten kontrollierten Studie (Wolfe et al., 2016).

Der genaue pathophysiologische Zusammenhang zwischen Thymuspathologie und Myasthenie ist unklar, basierend auf der wissenschaftlichen Literatur gibt es eine Reihe von Hypothesen.

So konnte gezeigt werden, dass im Falle einer Thymushyperplasie eine lokale Antikörperproduktion vorhanden zu sein scheint, die sich mikroskopisch in der Bildung von sogenannten Keimzentrumsfollikeln manifestiert. Diese Strukturen dienen der Reifung von B Zellen und der Bildung hochaffiner Antikörper. Dabei kann dann auch lokal die Sekretion des pathologischen anti- AChR Antikörpers nachgewiesen werden (Shiono et al., 2003). Möglicherweise wird dabei die lokale Autoimmunreaktion durch im Thymus befindliche myoide Zellen, die den AChR exprimieren, in Gang gebracht. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion erfolgt dann eine Autosensibilisierung gegen den AChR, welche in einer pathologische Autoimmunreaktion mit Antikörperbildung mündet (Cron et al., 2018).

Im Gegensatz dazu scheint die Assoziation von Thymomen und der Entwicklung einer MG weniger mit einer dort lokalisierten Autoantikörperproduktion im Zusammenhang zu stehen. Jedenfalls werden in Thymomen die oben genannten Keimzentrumsfollikel meist nicht nachgewiesen außerdem sind die oben beschriebenen myoiden Zellen nicht nachweisbar (Marx et al., 2010, Marx et al., 2015b).

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in Thymomen eine Produktion und ein Export naiver T Zellen in die Peripherie stattfindet (Strobel et al., 2002, Willcox et al., 1987, Buckley et al., 2001). Abgesehen von der gestörten Architektur in Thymomen (Marx et al., 2015b) gibt es weitere Hinweise darauf, dass diese T Zellen die Selektion nicht ordnungsgemäß durchlaufen können: Der Transkriptionsfaktor Aire (autoimmune regulator) reguliert die Expression von Zelltyp-spezifischen Proteinen im Thymus, welche essentiell für die Negativ Selektion potentiell autoreaktiver naiver T Zellen sind. In einer Studie mit mehreren Thymom-Präparaten konnte dargestellt werden, dass in fast allen Thymomen dieses Protein jedoch nicht exprimiert wird (Strobel et al., 2007). Daraus könnte man dann schlussfolgern, dass die im Thymom gebildeten T Zellen keine ausreichende Negativ Selektion durchlaufen und somit autoreaktive T Zell Klone

als Ausdruck einer gestörten zentralen Toleranz in die Peripherie gelangen. Zusätzlich konnten durch weitere Arbeitsgruppen Hinweise gefunden werden, dass immunsupprimierende regulatorische T Zellen ( $T_{reg}$ ) im Vergleich zu normalem Thymusgewebe in vermindertem Ausmaß generiert werden und damit ebenso eine Neigung zur Autoimmunität verursacht werden könnte (Scarpino et al., 2007, Strobel et al., 2004). Wenngleich letztere Ergebnisse auch umstritten sind (Fattorossi et al., 2008, Matsui et al., 2010) .

Insgesamt passen beide Elemente einer insgesamt gestörten T Zell Toleranz sehr gut zu der klinischen Beobachtung, dass in Thymom Patienten nicht nur gehäuft eine MG auftritt, sondern auch eine Reihe andere Autoimmunphänomene, wie z. B. SLE, Autoimmun-Enzephalitiden oder das Vorhandensein von Anti Zytokin-Antikörpern (Bernard et al., 2016, Levy et al., 1998, Meager et al., 2003).

### 1.3. Klinische Verlaufsformen der Myasthenie

Wie bereits kurz erwähnt, resultiert die Bildung pathogener, gegen Strukturen der neuromuskulären Synapse gerichteter, Antikörper in einer dort gestörten Transmission der Impulse, die die Umsetzung in Muskelaktion beeinträchtigt. Dabei führt der relative Mangel an funktionalem AChR zu einer meist belastungsabhängigen Muskelschwäche. Betroffen sind dabei unterschiedliche Muskelgruppen, initial oft die Augenmuskulatur, was sich dann in einer Ptosis und Doppelbildern bemerkbar macht (Bever et al., 1983, Grob et al., 1987). Wenn weitere Muskelgruppen betroffen sind, was häufig im Verlauf der Erkrankung eintritt, führt dies dann zum klassischen myasthenen Syndrom mit einer Schwäche der Extremitätenmuskulatur, der Schluck- Kau- und Sprechmuskeln bis hin zu einer respiratorischen Insuffizienz, die zur Notwendigkeit der maschinellen Beatmung führen kann. Dabei ist aus der Literatur bekannt, dass bis zu 50-80% aller Patienten mit einer initial rein okulären Symptomatik im Verlauf generalisieren (Osserman and Genkins, 1971, Bever et al., 1983, Grob et al., 1987) dies tritt dann auch zumeist innerhalb der ersten 2 Jahre nach Erstmanifestation ein (Bever et al., 1983, Grob et al., 1987).

Anhand der MGFA Klassifikation wird die MG in die Schweregrade I-V mit einer Subklassifikation a und b, abhängig von einer vorwiegend die Extremitäten- oder die Bulbärmuskulatur betreffenden Schwäche eingeteilt. Als allgemein akzeptierter Score zur Verlaufsbeurteilung des Ausprägungsgrades wird der qMG Score bestimmt, der

das Ausmaß der Einschränkung der Muskelkraft in einzelnen Muskelgruppen in Werte zwischen 0 und 3 einschätzt. In neueren Studien werden auch patientenzentrierte Scores wie der MG-ADL, Myasthenia Gravis Activities of daily living, als primärer Verlaufsparemeter ausgewertet.

Die Subgruppe an Patienten, in denen ein gegen die muskelspezifische Kinase (MuSK) gerichteter Antikörper nachweisbar ist, leiden oft an einer vorwiegend die bulbären Muskeln betreffenden Muskelschwäche, die durch eine Hemmung der Acetylcholinesterase meist nicht gebessert, im Gegenteil unter Umständen sogar verschlechtert wird, und benötigen häufiger eine stärkere immunsuppressive Therapie.

## 1.4. Aktuelle Therapie der Myasthenie

Aufbauend auf der Pathophysiologie der MG besteht die Therapie auf zwei Säulen: einerseits der symptomatischen Therapie mit Acetylcholinesterase-Hemmern, welche die Spaltung von Acetylcholin blockieren, somit zu einer höheren Konzentration von Acetylcholin im synaptischen Spalt führen und dadurch die Transmission verstärken. Dies führt zwar meist zu einer klinischen Besserung ist jedoch alleine oft unzureichend, so dass eine immunsuppressive Therapie zusätzlich notwendig ist. Diese führt dazu, dass i. die Autoantikörperbildung vermindert wird, ii. die Antikörper selbst entfernt werden oder iii. die aus der Antikörperbindung resultierenden Effektormechanismen unterdrückt werden (Sanders et al., 2016, Muppidi et al., 2019).

Zur Immunsuppression wird bei der Myasthenie initial meist Kortison angewandt, welches im Verlauf durch kortisonsparende Immunsuppressiva wie Azathioprin, Mycophenolatmofetil, Methotrexat, Ciclosporin oder andere ergänzt wird. In den letzten Jahren wird auch mit einigem Erfolg eine B Zell depletierende Therapie mittels Rituximab angewandt. Eine randomisierte kontrollierte Studie, die dessen Nutzen belegt ist zwar aktuell noch nicht publiziert, eine Reihe von Fallserien berichten jedoch von deutlichen positiven Effekten (Roda et al., 2019, Singh and Goyal, 2019, Tandan et al., 2017) und auch eigene Erfahrungen belegen dies. Zudem wurde kürzlich auch der Komplementinhibitor Eculizumab zugelassen, der direkt in die Vorgänge in der neuromuskulären Synapse eingreift und für den in einer randomisierten placebokontrollierten doppelblinden Studie ein signifikanter Effekt nachgewiesen werden konnte (Muppidi et al., 2019, Howard et al., 2017).

## 1.5. Ziele der Rehabilitationsarbeit

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeiten zur Rehabilitation standen zwei Aspekte der MG im Fokus:

Wie bereits einleitend erläutert ist ein klarer Zusammenhang zwischen Auffälligkeiten der Thymusdrüse und der Entwicklung der MG vorhanden. Eine Reihe von Forschungsergebnissen konnte bereits Besonderheiten in MG Patienten aufzeigen, die wichtige Hinweise auf die pathophysiologischen Zusammenhänge geben. Die genauen Mechanismen, die zu der Entwicklung der antikörperabhängigen Autoimmunerkrankung MG führen sind jedoch ungeklärt. Dabei ist insbesondere von Interesse, durch welche Prozesse eine Pathologie des Thymus, einem Organ welches physiologisch primär bei der Entwicklung von T Zellen von herausragender Bedeutung ist, zur Plasmazellautoreaktivität und Antikörperproduktion führt. Auf diesem Hintergrund war ein Teil der hier präsentierten Arbeiten darauf ausgerichtet, neue Erkenntnisse über die Pathophysiologie der MG zu gewinnen, insbesondere im Hinblick auf die Rolle spezieller Subpopulationen von CD4<sup>+</sup> T Zellen. Dies dient einerseits dem Grundverständnis der Erkrankung, andererseits sollen jedoch auch neue Therapieansätze daraus resultieren und zum besseren Verständnis anderer autoantikörpervermittelter Autoimmunerkrankungen beitragen.

In den letzten Jahren wurden zwei Studien veröffentlicht, welchen nach höchsten wissenschaftlichen Kriterien zeigen konnten, dass i. bereits seit längerem durchgeführte Therapiekonzepte wie die Thymektomie bzw. ii. neue Ansätze wie die Hemmung der Komplementkaskade eine deutliche Besserung der MG bewirken können. Es gibt jedoch weiterhin einen gewissen Anteil an Patienten, die aktuelle Therapien nicht vertragen bzw. unzureichend klinisch darauf respondieren. Zudem bleibt die Problematik, dass die Komplementinhibierung mittels Eculizumab eine dauerhafte Abhängigkeit von wöchentlichen Infusionen bedingt und aufgrund des sehr hohen Therapiepreises auch aufgrund von ökonomischen Gründen nicht allen Patienten zur Verfügung steht, insbesondere in Ländern mit einem weniger gut finanziell ausgestatteten Gesundheitssystem.

Unter diesem Hintergrund wurde eine bereits im Rahmen der Schubprophylaxe der Multiplen Sklerose (MS) angewandte Therapie im Tiermodell der MG, der



experimentellen autoimmunen Myasthenia Gravis (EAMG), übergeprüft. Dies sollte die Grundlage für eine mögliche Testung dieses Therapieansatzes bei MG Patienten sein.

## 2. Eigene Arbeiten

### 2.1. IL-17-produzierende CD4<sup>+</sup> T Zellen tragen zum Verlust der B-Zell Toleranz im Mausmodell der experimentellen autoimmunen Myasthenia gravis (EAMG) bei

Schaffert H, Pelz A, Saxena A, Losen M, Meisel A, Thiel A\*, **Kohler S\***

IL-17-producing CD4<sup>+</sup> T cells contribute to the loss of B-cell tolerance in experimental autoimmune myasthenia gravis.

Eur J Immunol. 2015 May;45(5):1339-47. doi: 10.1002/eji.201445064.

\*geteilte Letztautorenschaft

Während eine bedeutende Rolle von Interleukin 17 produzierenden CD4<sup>+</sup> T Zellen (TH17 Zellen) bei der T Zell vermittelten Autoimmunität unbestritten ist und eine Blockade von IL-17 bereits als Therapie angewandt wird (Miossec and Kolls, 2012, Silfvast-Kaiser et al., 2019, Jones et al., 2018), war die Bedeutung dieser Zellen für die Pathogenese autoantikörpervermittelter Zellen unklar und eher indirekt vermutet worden (Hsu et al., 2008, Mitsdoerffer et al., 2010a). Auch bei der Myasthenie Gravis gibt es zwar pathophysiologische Hinweise auf eine Rolle dieser Zellen, ein direkter Nachweis war bisher jedoch nicht geführt worden. (Wang et al., 2007, Aricha et al., Bai et al., 2008, Roche et al., Wang et al.). Daher war es Ziel dieser Arbeit, die exakte Rolle dieser Zellen im EAMG Modell der Myasthenie zu entziffern.

Wir konnten darlegen, dass nach wiederholter Immunisierung mit einem aus dem Torpedofisch extrahierten AChR (tAChR), ein signifikanter Anteil der tAChR-spezifischen CD4<sup>+</sup> T Zellen in der Tat IL-17 exprimiert. Mäuse mit einer kompletten Defizienz an IL-17(IL-17<sup>ko</sup>) zeigten keine oder deutlich verminderte EAMG Symptome, obwohl die Frequenz an tAChR-spezifischen CD4<sup>+</sup> T Zellen die IL-2, IFN- $\gamma$ , oder IL-21 sezernieren, bzw. der Prozentsatz an FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> ähnlich wie in WT Mäusen waren.

Während die gesamt anti tAChR Antikörper Titer vergleichbar waren, war der Komplement- bindende Immunglobulin Subtyp IgG2b in IL-17<sup>ko</sup> im Vergleich zu WT Mäusen reduziert. Insbesondere waren jedoch die direkt pathogenen, gegen den murinen AChR gerichteten Antikörper in IL-17<sup>ko</sup> Mäusen signifikant vermindert. Die essentielle Rolle der Th17 Zellen in der EAMG Pathogenese konnten wir dadurch beweisen, dass wir nach einer Rekonstitution von T Zell defizienten TCR  $\beta/\delta$ <sup>ko</sup> Mäusen

mit WT oder IL-17<sup>ko</sup> CD4<sup>+</sup> T Zellen und EAMG Induktion die oben beschriebenen Ergebnisse reproduzieren konnten. Somit zeigten wir in dieser Forschungsarbeit, dass die Menge an IgG2b und der Verlust der B Zell Toleranz, welcher in pathogenen anti-murin AChR-spezifischen Antikörpern resultiert, von der IL-17 Produktion durch CD4<sup>+</sup> T Zellen abhängt. Damit konnten wir erstmalig beschreiben, wie Th17 Zellen an der Pathogenese einer klassischen antikörpervermittelten Autoimmunreaktion beteiligt sind.

Schaffert H, Pelz A, Saxena A, Losen M, Meisel A, Thiel A\*, **Kohler S\***

IL-17-producing CD4<sup>+</sup> T cells contribute to the loss of B-cell tolerance in experimental autoimmune myasthenia gravis.

Eur J Immunol. 2015 May;45(5):1339-47. [doi: 10.1002/eji.201445064](https://doi.org/10.1002/eji.201445064)

## 2.2. Veränderungen der naiven CD4<sup>+</sup> T Zell Homöostase in Myasthenia Gravis und Thymom Patienten

**Kohler S**, Keil TOP, Alexander T, Thiel A, Swierzy M, Ismail M, Rückert JC, Meisel A. Altered naive CD4<sup>+</sup> T cell homeostasis in myasthenia gravis and thymoma patients. J Neuroimmunol. 2019 Feb 15;327:10-14. doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.01.005

In dieser Arbeit sollte die pathophysiologische Rolle der bekannten hohen Assoziation der Myasthenia Gravis mit Auffälligkeiten der Thymusdrüse weiter beleuchtet werden. Wie bereits in der Einleitung erläutert, war bereits in Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen gezeigt worden, dass zumindest in Thymom Patienten im peripheren Blut auf der molekularbiologischen Ebene eine Produktion naiver T Zellen nachgewiesen werden kann. Wir wollten dies mittels einer neuen deutlich einfacheren durchflusszytometrischen Methode auf der zellulären Ebene überprüfen und auf die Gesamtgruppe der Myasthenie Patienten übertragen. Als Marker für die Produktion naiver CD4<sup>+</sup> T Zellen im Thymus und die Auswirkung auf die CD4<sup>+</sup> T Zell Homöostase bestimmten wir in unterschiedlichen Patientengruppen die Frequenz und absolute Zahl sogenannter <sup>thymisch</sup>naiver CD31<sup>pos</sup> und <sup>zentral</sup>naiver CD31<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> T Zellen (Kohler and Thiel, 2009).

Wir fanden in der Gesamtpopulation der Myasthenia Gravis Patienten eine altersabhängige Reduktion <sup>thymisch</sup>naiver CD31<sup>pos</sup> CD4<sup>+</sup> T Zellen, vergleichbar mit den Ergebnissen der Normalpopulation. Jedoch war eine signifikant erhöhte Zahl <sup>zentral</sup>naiver CD31<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> T Zellen in Myasthenie Patienten vorhanden, auch wenn Patienten mit potentiellen Einflussfaktoren wie Immunsuppression oder erfolgter Thymektomie aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Weiterhin konnten wir zeigen, dass in der Tat in Patienten mit Thymom im peripheren Blut eine erhöhte Zahl <sup>thymisch</sup>naiver CD31<sup>pos</sup> CD4<sup>+</sup> T Zellen nachweisbar ist mit Hinweisen dafür, dass sich dies je nach histologischem Subtyp unterscheidet.

Zusammengefasst konnten wir Anzeichen dafür finden, dass in Myasthenie Patienten unabhängig von immunsuppressiver Therapie eine gestörte Homöostase naiver CD4<sup>+</sup> T Zellen vorhanden ist, die zu einer höheren Zahl <sup>zentral</sup>naiver CD31<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> T Zellen führt. Diese könnten aufgrund ihres eher oligoklonalen und potentiell autoreaktiven T Zell Rezeptor Spektrums ein möglicher Faktor in der Entstehung der Myasthenie sein.

Zudem konnten wir die Produktion naiver CD4<sup>+</sup> T Zellen in Thymomen auf der zellulären Ebene bestätigen und Hinweise darauf finden, dass dies in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp unterschiedlich ist.

**Kohler S**, Keil TOP, Alexander T, Thiel A, Swierzy M, Ismail M, Rückert JC, Meisel A.  
Altered naive CD4+ T cell homeostasis in myasthenia gravis and thymoma patients.  
J Neuroimmunol. 2019 Feb 15;327:10-14. [doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.01.005](https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.01.005)

### 2.3. CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T regulatorische Zell Subsets in Myasthenia gravis Patienten

**Kohler S**, Keil TOP, Hoffmann S, Swierzy M, Ismail M, Rückert JC, Alexander T, Meisel A

CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cell subsets in myasthenia gravis patients.  
Clin Immunol. 2017 Jun;179:40-46. doi: 10.1016/j.clim.2017.03.003.

Obwohl die Myasthenie eine antikörpervermittelte Autoimmunerkrankung darstellt, ist klar, dass auch T Zellen in die Pathogenese involviert sind. Seit einigen Jahren wird bei einer Reihe von Autoimmunerkrankungen auch eine pathophysiologische Rolle von numerischen oder funktionalen Defiziten von immunsuppressiven regulatorischen T Zellen (T<sub>reg</sub>) angenommen (Miyara et al., 2011). In vorherigen Arbeiten durch andere Arbeitsgruppen war deren Rolle bei der Myasthenie Gravis bereits untersucht worden, jedoch mit widersprüchlichen Resultaten (Fattorossi et al., 2008, Matsui et al., 2010, Scarpino et al., 2007, Strobel et al., 2004, Huang et al., 2004, Sun et al., 2004, Thirupathi et al., 2012).

In unserer Studie konnten wir mittels Mehrfarben-Durchflußzytometrie aus OP-Präparaten eindeutig zeigen, dass in Thymomgewebe im Unterschied zu Thymushyperplasie und mikroskopisch normalem Thymusgewebe eine deutlich verringerte Menge an T<sub>reg</sub> zu finden ist. Dies schlug sich jedoch nicht in einer unterschiedlichen Zahl von T<sub>reg</sub> im peripheren Blut nieder. Auch nicht nach Unterteilung der T<sub>reg</sub> in spezialisierte Subpopulationen, die wir mittels der Expression der Marker CD49d, HELIOS und CD45RA identifiziert haben. Es lässt sich aus unseren Ergebnissen und der Korrelation mit klinischen Parametern jedoch ableiten, dass sich deren Frequenzen im Zeitverlauf nach Thymektomie und durch die immunsuppressive Therapie signifikant verändern. Davon unabhängig waren jedoch in MG Patienten im Allgemeinen und im Besonderen in Patienten ohne immunsuppressive Therapie die Frequenz an besonders potent immunsuppressiv wirkenden CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup> T<sub>reg</sub> im Vergleich zu gesunden Spendern signifikant vermindert.

Wir konnten in unserer Studie eine verringerte Zahl an T<sub>reg</sub> in Thymom Gewebe nachweisen, was möglicherweise eine Neigung zur Autoimmunität in diesen Patienten



erklären könnte. Weiterhin könnte eine reduzierte Frequenz potent immunsuppressiver CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup> T<sub>reg</sub> in MG Patienten eine Rolle in der Pathogenese der MG spielen.

**Kohler S**, Keil TOP, Hoffmann S, Swierzy M, Ismail M, Rückert JC, Alexander T, Meisel A

CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cell subsets in myasthenia gravis patients.

Clin Immunol. 2017 Jun;179:40-46. [doi: 10.1016/j.clim.2017.03.003](https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.03.003).

## 2.4. Veränderte Verteilung der B Zell Subpopulationen und erhöhte Plasmazellen bei Myasthenia Gravis Patienten

**Kohler S**, Keil TO, Swierzy M, Hoffmann S, Schaffert H, Ismail M, Rückert JC, Alexander T, Hiepe F, Gross C, Thiel A, Meisel A.

Disturbed B cell subpopulations and increased plasma cells in myasthenia gravis patients.

J Neuroimmunol. 2013 Nov 15;264(1-2):114-9. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.09.006.

Da nur wenige bereits ältere Berichte über Auffälligkeiten der peripheren B Zellen in MG vorhanden waren mit teils widersprüchlichen Ergebnissen (Li et al., 2008, Ragheb and Lisak, 1992, Yi et al., 1992) (Ragheb et al., 1999) wollten wir in dieser Studie die Rolle von B Zellen im peripheren Blut bei MG Patienten näher beleuchten. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass eine Reihe von Fallberichten einen therapeutischen Effekt von B Zell depletierender Therapie mittels Rituximab bereits nahelegt hatten (Lindberg and Bokarewa, 2010, Maddison et al., 2011). Andererseits waren beim systemischen Lupus erythematosus (SLE) einer ebenso wie die MG autoantikörpervermittelten Erkrankung bereits eine Reihe von Auffälligkeiten des B-, bzw. Plasmazell-Kompartiments beschrieben worden (Jacobi et al., 2003, Odendahl et al., 2000, Rodriguez-Bayona et al., 2010, Wei et al., 2007). Somit war eine Fragestellung, inwiefern sich diese beiden autoantikörpervermittelten Erkrankungen in dieser Hinsicht ähneln, bzw. unterscheiden.

Wir führten daher eine detaillierte durchflusszytometrische Analyse von Blut und falls vorhanden auch von zeitgleich im Rahmen einer Thymektomie entnommenen Thymusgewebe von MG Patienten durch. Ziel war es dabei MG spezifische bzw. Therapie induzierte Veränderungen zu aufzudecken. Wir fanden dabei eine Reihe von Unterschieden in der Verteilung von B Zell Subsets im peripheren Blut von MG Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen, diese schienen jedoch zumeist Therapie-induziert. MG Patienten waren jedoch im peripheren Blut durch eine signifikant erhöhte Frequenz an Plasmablasten/zellen gekennzeichnet. Lediglich mit Kortikosteroiden-behandelte Patienten zeigten in dieser Hinsicht keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu gesunden Kontrollen. In der Untergruppe der Patienten mit einer rein okulären Verlaufsform der Erkrankung war der Anteil an kürzlich

aktivierten sogenannten Plasmablasten erhöht. Die Untersuchungen von Thymusgewebe ergaben, dass im Kontrast zu Thymom die B Zell Subset Verteilung in hyperplastischem Thymusgewebe sich eindeutig von peripherem Blut unterscheidet. Jedoch war in beiden Geweben keine im Vergleich zu peripherem Blut erhöhte Anzahl an Plasmazellen nachweisbar.

Insgesamt konnten wir in unseren Untersuchungen keinen Hinweis darauf finden, dass die B Zell Differenzierung im Allgemeinen in MG Patienten defekt ist. Die Verteilung unterschiedlicher Subpopulationen scheint vor allem durch die medikamentöse Therapie beeinflusst zu werden. Weiterhin sind in Analogie zu anderen Autoimmunerkrankungen signifikant erhöhte Frequenzen an Plasmablasten/-zellen in MG Patienten im peripheren Blut zu finden, welche jedoch vor allem durch Kortikosteroide reduziert werden.

**Kohler S**, Keil TO, Swierzy M, Hoffmann S, Schaffert H, Ismail M, Rückert JC, Alexander T, Hiepe F, Gross C, Thiel A, Meisel A.

Disturbed B cell subpopulations and increased plasma cells in myasthenia gravis patients.

J Neuroimmunol. 2013 Nov 15;264(1-2):114-9. [doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.09.006](https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.09.006)

## 2.5. Die S1P Rezeptor Antagonisten Fingolimod und Siponimod bewirken keine Verbesserung der EAMG bei Verabreichung nach Krankheitsbeginn

Pelz A, Schaffert H, Diallo R, Hiepe F, Meisel A, **Kohler S**.

S1P receptor antagonists fingolimod and siponimod do not improve the outcome of experimental autoimmune myasthenia gravis mice after disease onset.

Eur J Immunol. 2018 Mar;48(3):498-508. doi: 10.1002/eji.201747187.

Während die meisten Myasthenie Patienten insgesamt eine gute Prognose haben, gibt es doch einen signifikanten Anteil an Patienten die weitestgehend therapierefraktär sind und unter rezidivierenden Verschlechterungen bis hin zu myasthenen Krisen leiden, bzw. durch deutliche Nebenwirkungen beeinträchtigt sind. Das durch Fingolimod blockierte Herauswandern von Lymphozyten aus dem Lymphknoten zeigt signifikant positive Effekte auf die Schubrate bei der Multiplen Sklerose(MS) (Radick and Mehr, 2015). Zudem war durch eine andere Arbeitsgruppe war in einer Studie bereits ein positiver Effekt einer prophylaktischen Gabe des funktionellen Sphingosine-1-Phosphate (S1P) Antagonisten Fingolimod im EAMG Modell aufgezeigt worden (Kohno et al., 2005).

Wir wollten daher in dieser Arbeit den Effekt einer therapeutischen Gabe von Fingolimod und dem ähnlich wirkenden Siponimod (BAF312) (Kappos et al., 2018) auf die bereits etablierte EAMG ergründen, einem Ansatz der mehr der klinischen Realität entspricht als die prophylaktische Gabe.

Wie zu erwarten war verhinderten beide Medikamente die Lymphozytenauswanderung aus den Lymphknoten, was sich in einer deutlichen peripheren Lymphopenie äußerte. Nach spezifischer T Zell Stimulation von Milzzellen waren zwar Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Placebo, Fingolimod, Siponimod) sichtbar, jedoch waren andere Parameter wie Antikörper Titer oder die Zahl antigen-spezifischer Plasmazellen vergleichbar. Auch Krankheitsinzidenz oder –schwere wurden durch eine Therapie mit Fingolimod oder Siponimod im Vergleich zu Placebo nicht signifikant verändert.

Zusammengefasst führte eine Therapie mit Fingolimod und Siponimod zwar zu Veränderungen der T Zell Antworten in Milzzellen, jedoch waren die in diesem Kontext

bedeutsameren Parameter Autoantikörpertiter und Krankheitsinzidenz oder –schwere nicht verändert. Somit ergibt sich aus dieser Studie kein Hinweis auf ein therapeutisches Potential von funktionellen Antagonisten des S1P Rezeptors in der Myasthenia Gravis.

Pelz A, Schaffert H, Diallo R, Hiepe F, Meisel A, **Kohler S.**

S1P receptor antagonists fingolimod and siponimod do not improve the outcome of experimental autoimmune myasthenia gravis mice after disease onset.

Eur J Immunol. 2018 Mar;48(3):498-508. [doi: 10.1002/eji.201747187](https://doi.org/10.1002/eji.201747187)



## 3. Diskussion

### 3.1. Pathophysiologie der Myasthenie:

Die pathophysiologische Endstrecke der autoimmunen Myasthenia Gravis besteht aus einer fehlgeleiteten humoralen Immunität, die zu einer Produktion von Autoantikörpern führt, welche gegen Strukturen der neuromuskulären Synapse gerichtet sind. Diese Antikörper und deren Bindung an die Zielantigene führen dann zu einer Beeinträchtigung der Signalübertragung vom Nerv zum Muskel, was sich in einer unterschiedlich ausgeprägten und lokalisierten Muskelschwäche äußert. Wieso es jedoch zu der Bildung von pathologischen Antikörpern kommt, welche Zellen dabei involviert sind und welche genaue Rolle der Thymus als T Zell bildendes und „erziehendes“ Organ spielt, ist jedoch im Detail unklar.

Um die dabei involvierten Mechanismen genauer zu ergründen, wurden in dieser Habilitationsschrift sowohl im experimentellen murinen System als auch bei MG Patienten weitere Untersuchungen durchgeführt.

#### 3.1.1. Neue pathophysiologische Erkenntnisse im Mausmodell: die essentielle Rolle von TH17 Zellen

Im Mausmodell der Myasthenie, der EAMG konnten wir dabei die essentielle Rolle von IL-17 produzierenden CD4<sup>+</sup> T Zellen, den sogenannten TH17 Zellen aufzeigen (Schaffert et al., 2015). Zwar waren TH17 Zellen bereits als bedeutende Mitwirkende bei vor allem T Zell vermittelten Autoimmunerkrankungen beschrieben worden, u.a. bei der Multiplen Sklerose, der rheumatoiden Arthritis, der ankylosierenden Spondylitis und dem M. Crohn (Miossec and Kolls, 2012). Jedoch gab es vorher nur wenige Studien die auch eine Rolle bei Autoantikörper vermittelten Erkrankungen vermuten ließen (Hsu et al., 2008, Mitsdoerffer et al., 2010a). Bei der MG im Speziellen waren erhöhte IL17 Konzentrationen bei MG Patienten (Roche et al.) und eine erhöhten Frequenz an IL 17-produzierenden CD4<sup>+</sup> T Zellen in Thymom-assoziiierter MG beschrieben, die mit der Höhe des anti-AChR Antikörperwerts korrelierten (Wang et al.).

In der hier bereits beschriebenen Studie waren in der Abwesenheit von IL-17 bzw. TH17 Zellen eine deutliche verringerte Krankheitsinzidenz und –schwere zu beobachten, während wir keinen Einfluss auf die CD4<sup>+</sup> T Zell Differenzierung oder die

Generierung von regulatorischen T Zellen beobachtet. Auch die Expression von Antikörpern, die gegen den aus dem Torpedofisch aufgereinigten AChR, welcher die Autoimmunreaktion in Gang bringt, gerichtet sind, ist fast identisch. Es war jedoch aus unseren Experimenten ersichtlich, dass in Abwesenheit von TH17 Zellen eine signifikant verringerte Menge direkt pathogener, das heißt gegen den *murinen* AChR gerichteter Antikörper gebildet wird.

Somit scheint die Anwesenheit von TH17 Zellen die Ausbreitung der Immunität von gegen *Fremd*, d.h. gegen *torpedo* AChR gerichteten Antikörpern auf gegen *Auto*, d.h. gegen den *murinen* AChR gerichteter Antikörper zu bestimmen. Der hierfür verantwortliche Mechanismus konnte in unserer Studie nicht analysiert werden. Vorherige Studien aus anderen Arbeitsgruppen konnten jedoch bereits zeigen, dass IL-17 sowohl die Entwicklung von Keimzentrumsfollikeln fördert (Hsu et al., 2008, Mitsdoerffer et al., 2010b), als auch für die Migration und das Aufeinandertreffen von follikulären T Helfer Zellen mit B Zellen (Tarlinton, 2008, Ding et al., 2013). Somit könnte dann aus der Anwesenheit von TH17 Zellen eine vermehrte und verstärkte Interaktion von TFH Zellen und B Zellen in Keimzentren resultieren, woraus eine Rolle bei der Autoantikörper Produktion und dem Wechsel zur Autoimmunität postuliert werden kann. Ungeklärt ist aktuell jedoch die Frage, inwiefern eine Blockade von IL-17 mit therapeutischen Antikörpern, wie sie bereits bei der Ankylosierenden Spondylitis (Jones et al., 2018) oder der Psoriasis (Silfvast-Kaiser et al., 2019) angewandt werden, auch nach der Etablierung einer Erkrankung einen therapeutischen Effekt auf die MG haben könnte. Dadurch könnten auch Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob die TH17 Zellen nur bei der Krankheitsentstehung oder auch bei der Aufrechterhaltung der Krankheitsaktivität eine wichtige Rolle spielen.

### 3.1.2. Neue pathophysiologische Erkenntnisse bei MG Patienten: Naive T Zellen, regulatorische T Zellen und B und Plasmazellen bei der Myasthenie

Um die Pathophysiologie der Myasthenie und insbesondere auch den Zusammenhang mit der Thymusdrüse, bzw. mit Auffälligkeiten an der Thymusdrüse, besser zu verstehen, wurden im Rahmen dieser Habilitation Studien an unterschiedlichen MG Patienten Kohorten durchgeführt. Dabei wurde nicht nur Blut analysiert, ein Teil der

Analysen konnte auch an Thymusgewebe durchgeführt werden, welches perioperativ bei den Patienten entnommen wurde.

Eine Arbeit (Kohler et al., 2019) beschäftigte sich vor allem mit der Rolle des Thymus und dessen Produktion naiver T Zellen im Zusammenhang mit der Myasthenie. Wir konnten demonstrieren, dass eine Produktion naiver T Zellen in Thymom Patienten sich mittels relativ einfacher durchflusszytometrischer Analyse naiver CD4<sup>+</sup> T Zell Subpopulationen im peripheren Blut nachweisen lässt. Dabei waren bei Thymom Patienten signifikant erhöhte Zahlen von <sup>thymisch</sup>naiven CD31<sup>pos</sup> CD4<sup>+</sup> T Zellen im peripheren Blut nachweisbar. Dies bestätigt mittels einer sehr einfachen Methode vorherige Arbeiten, die eine technisch aufwändige und schwierige quantitative PCR Analyse der T cell receptor excision circles (TREC) durchgeführt hatten (Buckley et al., 2001). Aufgrund der Einfachheit unserer Methodik wäre auch eine Anwendung als mögliche Rezidivkontrolle bei Thymomen denkbar. Inwiefern dann ein Anstieg der <sup>thymisch</sup>naiven CD31<sup>pos</sup> CD4<sup>+</sup> T Zellen dann auch wirklich mit einem Rezidiv korreliert, muss jedoch noch nachgewiesen werden. Es wurde zwar bereits gezeigt, dass nach Thyrektomie die Frequenz <sup>thymisch</sup>naiver CD31<sup>pos</sup> CD4<sup>+</sup> T Zellen abnimmt (Gudmundsdottir et al., 2016). Die genaue Kinetik der Reduktion <sup>thymisch</sup>naiver CD31<sup>pos</sup> CD4<sup>+</sup> T Zellen nach Thyrektomie ist jedoch nicht bekannt und es wäre zu erwarten, dass diese auch altersabhängig ist. Wenn man Studien betrachtet, die den Abfall der TREC Level als Maßstab für Thymus Output messen, legen diese jedoch nahe, dass in dem grössten Teil der Patienten nach Thyrektomie die Thymusfunktion innerhalb von mehreren Monaten messbar sinkt (Sempowski et al., 2001, Buckley et al., 2001). Insgesamt sollte somit aus der Thyrektomie eines T Zell produzierenden Thymoms ein relativ rascher Abfall <sup>thymisch</sup>naiver CD31<sup>pos</sup> CD4<sup>+</sup> T Zellen resultieren und ein mögliches Rezidiv an einem erneuten Anstieg erkennbar sein.

Thymome werden in unterschiedliche histologische Subtypen eingeteilt (Marx et al., 2015a), unter anderem in Abhängigkeit von einer vorherrschend eher epithelialen oder lymphatischen Gewebe-Zusammensetzung. In unserer Arbeit ergaben sich auch Hinweise darauf, dass insbesondere histologisch eher lymphatische Thymom Subtypen eine erhöhte Frequenz <sup>thymisch</sup>naiver CD31<sup>pos</sup> CD4<sup>+</sup> T Zellen aufweisen (Kohler et al., 2019). Somit wäre die histologische Differenzierung möglicherweise auch aus dem peripheren Blut ableitbar. Eine klare Aussage ist jedoch bei nur geringer analysierter Patientenzahl aktuell noch nicht möglich.

MG Patienten zeigten in ähnlichem Ausmaß wie gesunden Kontrollen eine alterskorrelierte Reduktion der Frequenz  $\text{thymisch}^{\text{naiver}} \text{CD31}^{\text{pos}} \text{CD4}^+$  T Zellen (Kohler et al., 2019). Jedoch war im Gegensatz zu gesunden Probanden eine signifikant erhöhte Zahl  $\text{zentral}^{\text{naiver}} \text{CD31}^{\text{neg}} \text{CD4}^+$  T Zellen in MG Patienten detektierbar. Bei dieser Subpopulation von naiven T Zellen handelt es sich um Zellen, welche in der Peripherie eine sogenannte homöostatische Expansion durchlaufen haben, d.h. eine Proliferation ohne Umdifferenzierung in eine Gedächtnis Zelle (Kohler and Thiel, 2009). Dabei scheint eine geringe Aktivierung über den T Zell Rezeptor durch Selbst-Antigene möglicherweise im Zusammenspiel mit den sogenannten homöostatischen Zytokinen IL7 und IL15 eine Rolle zu spielen (Yanes et al., 2017). Passend zu diesem Modell konnten wir bereits in eigenen Vorarbeiten zeigen, dass diese  $\text{zentral}^{\text{naiven}} \text{CD31}^{\text{neg}} \text{CD4}^+$  T Zellen ein eher oligoklonales T Zell Rezeptorspektrum besitzen (Kohler et al., 2005). Da man den Prozess der naiven  $\text{CD4}^+$  T Zell Homöostase somit auch als zweite positive Selektion selbst-reaktiver Klone interpretieren kann, kann man daraus auch eine latente Autoreaktivität dieser Zellen ableiten. Somit könnte die erhöhte Zahl dieser Zellen in MG Patienten dann eben auch zur Autoimmunität prädisponieren und damit möglicherweise auch die Entwicklung einer Myasthenie fördern.

In einer weiteren Arbeit lag der Fokus auf Analysen regulatorischer T Zellen ( $T_{\text{reg}}$ ) bei der MG.  $T_{\text{reg}}$  tragen entscheidend zur peripheren Toleranz und Schutz vor Autoimmunität bei (Miyara et al., 2011). Auch bei der Myasthenie waren bereits Vorarbeiten publiziert, jedoch mit uneinheitlichen Ergebnissen. Zwar gab es bereits Hinweise auf eine geringere Expression regulatorische T Zellen in Thymom Patienten, nachfolgende Arbeiten hatten dies jedoch wieder Frage gestellt (Fattorossi et al., 2008, Matsui et al., 2010, Scarpino et al., 2007, Strobel et al., 2004). Im peripheren Blut waren zumeist keine numerischen Unterschiede an  $T_{\text{reg}}$  festgestellt worden (Huang et al., 2004, Sun et al., 2004), es sind jedoch funktionelle Defekte beschrieben (Thiruppathi et al., 2012).

Wir konnten in unserer Studie mittels Durchflusszytometrie klar darstellen, dass eine deutlich verringerte Frequenz an  $T_{\text{reg}}$  in Thymomen gebildet wird, im Vergleich zu hyperplastischem oder histologisch altersentsprechendem Thymusgewebe (Kohler et al., 2017). Somit konnten wir die Ergebnisse vorheriger Arbeiten (Scarpino et al., 2007,

Strobel et al., 2004), welche T<sub>reg</sub> lediglich anhand von Oberflächenmarkern identifiziert hatten, mit unserer Methodik der intrazellulären Anfärbung des T<sub>reg</sub> spezifischen Transkriptionsfaktors FoxP3 bestätigen. Im peripheren Blut konnten wir auch nach weiterer Subdifferenzierung in erst kürzlich identifizierte Subpopulationen von CD49d, CD45RA oder HELIOS exprimierenden T<sub>reg</sub> (Kleinewietfeld et al., 2009, Miyara et al., 2009, Thornton et al., 2010) keine numerischen Defizite in MG Patienten in Abhängigkeit von der Thymushistologie detektieren.

Somit scheint der lokale, im Thymusgewebe nachweisbare Mangel an T<sub>reg</sub> keine im peripheren Blut messbaren numerischen Abnormalitäten zu induzieren. Möglicherweise aufgrund der bereits im Laufe der frühen Pubertät deutlich abnehmenden Produktion neuer T Zellen im Thymus (George and Ritter, 1996, Taub and Longo, 2005), ist dies somit nicht zahlenmäßig relevant. Es sollte jedoch die fehlende Expression von AIRE in Thymomen (Scarpino et al., 2007, Strobel et al., 2007) berücksichtigt werden, was dazu führt, dass gewebespezifische Antigene in Thymomen nicht exprimiert werden. Daraus lässt sich eine Kombination aus einem lokalen Mangel an Immunregulation mit gestörter naiver T Zell Selektion ableiten, was eine global gesteigerte Autoreaktivität erklären könnte. Passend dazu sind Thymome nicht nur mit der MG, sondern auch mit einer Reihe von anderen Autoimmunphänomenen, wie z.B. Autoimmunenzephalitiden, SLE oder anti-Zytokin Antikörpern assoziiert (Bernard et al., 2016, Levy et al., 1998, Meager et al., 2003).

Als möglicher Hinweis auf weitere Defizite in der T Zell Regulation konnten wir in MG Patienten eine signifikant reduzierte Frequenz an CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup> T<sub>reg</sub> im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen detektieren (Kohler et al., 2017). Damit konnten wir vorherige Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe erweitern, die bereits Hinweise auf einen Mangel an sogenannten naiven T<sub>reg</sub> in MG erhoben hatten (Thiruppathi et al., 2012), einen Einfluss immunsuppressiver Therapie jedoch im Gegensatz zu uns nicht ausschließen konnte. Die spezielle Subpopulation der CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup> T<sub>reg</sub>, die erst vor einigen Jahren näher charakterisiert wurde, ist einerseits potent immunsuppressiv und andererseits im Gegensatz zu anderen T<sub>reg</sub> Subsets fähig zur Proliferation (Miyara et al., 2009). Somit ist gut vorstellbar, dass ein Mangel, bzw. Defekt eine Rolle bei der Initiierung bzw. Aufrechterhaltung von Autoimmunität spielen kann. Passend hierzu

wurde bereits bei Typ1 Diabetes und Multipler Sklerose eine geringere Zahl naiver T<sub>reg</sub> beschrieben (Akesson et al., 2015, Haas et al., 2007).

Die B- und Plasmazellen als Vorläufer bzw. Produzenten der pathogenen Antikörper standen im Fokus einer weiteren hier berichteten Arbeit (Kohler et al., 2013). Dabei konnten wir zwar Unterschiede im Vergleich spezifischer Subpopulationen zwischen MG Patienten und gesunden Probanden beobachten, jedoch stellten sich diese nach Unterteilung in klinische Subgruppen als vor allem therapieassoziiert und somit nicht krankheitsursächlich dar.

Wir entdeckten jedoch eine im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöhte Frequenz an Plasmazellen im peripheren Blut von MG Patienten. In dieser Hinsicht scheint die MG anderen antikörpervermittelten Autoimmunerkrankungen wie dem SLE zu ähneln (Jacobi et al., 2003, Odendahl et al., 2000). Passend dazu, dass Kortikosteroide bei MG oft mit gutem und relativ schnellem Effekt eingesetzt werden, (Hoffmann et al., 2014) waren jedoch unter Kortikosteroid Therapie, im Gegensatz zu Immunsuppression mit Azathioprin oder Methotrexat bzw. Cellcept, keine erhöhten Frequenzen nachweisbar. Daraus könnte man auf plasmazellgerichtete Effekte der Kortikosteroide bei der Myasthenie schließen, die bei den sonst eingesetzten Langzeitimmunsuppressiva wie Azathioprin oder Mycophenolatmofetil nicht vorhanden zu sein scheinen und deshalb unter Umständen deren lange Wirklatenz erklären könnten (Palace et al., 1998, Hehir et al., 2010, Muscle Study, 2008).

Interessanterweise war lediglich bei Patienten mit einer okulären Verlaufsform der Erkrankung die Frequenz an kürzlich aktivierten HLA DR positiven Plasmablasten erhöht (Odendahl et al., 2005). Da diese Zellen bereits in SLE Patienten als Aktivitätsparameter nachgewiesen wurden (Jacobi et al., 2010), könnte dies als Zeichen für eine erhöhte Krankheitsaktivität in dieser Population interpretiert werden. Leider konnte dies in unserer Studie wegen nicht ausreichend erhobenen klinischen Parametern nicht eindeutig beantwortet werden. Interessant wäre auch eine prospektive Analyse, inwiefern dieser Marker möglicherweise Patienten ohne bzw. mit einer Generalisierung im Verlauf unterscheiden kann.

In unserer Studie wurde auch perioperativ entnommenes Thymusgewebe auf die Verteilung von B Zell Subpopulationen untersucht. Hyperplastisches Thymusgewebe unterschied sich eindeutig von peripherem Blut mit deutlich reduzierter Frequenz

naiver B Zell Subtypen bei erhöhten Anteilen von klassischen Gedächtnis B Zellen und sogenannten Doppel (CD27 und IgD)-negativen Gedächtnis B Zellen. Letztere sind in der Frequenz ebenso beim SLE erhöht (Wei et al., 2007) und könnten somit eine Neigung zur antikörpervermittelten Autoimmunität anzeigen. Diese Ergebnisse lassen sich auch sehr gut mit der berichteten histologischen Darstellbarkeit von Keimzentrumsfollikeln und Zeichen von Entzündung im Thymusgewebe von MG Patienten (Berrih-Aknin et al., 2013) in Übereinstimmung bringen. In Thymomen waren in unserer Untersuchung keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der B Zell Subset Verteilung im Vergleich zum peripheren Blut detektierbar. Es war jedoch in allen Untergruppen keine erhöhte Zahl an Plasmazellen nachweisbar trotz der bei Thymushyperplasie bereits oben beschriebenen histologischen Befunde und der nachgewiesenen lokalen Autantikörperproduktion (Scadding et al., 1981, Willcox et al., 1983, Gomez et al., 2014). Dies kann möglicherweise eine Ursache in der schwierigen Herauslösung von Plasmazellen aus Thymusgewebe haben (Willcox et al., 1983). Alternativ besteht die Möglichkeit, dass obwohl dort eine lokale AK Produktion stattfindet (Scadding et al., 1981, Willcox et al., 1983, Gomez et al., 2014) und somit die antigenspezifischen Zellen vermehrt vorhanden sein sollten, die Gesamtzahl der Plasmazellen nicht unbedingt nachweisbar erhöht ist.

## 3.2. Neue therapeutische Optionen zur Behandlung der Myasthenia Gravis

Die im letzten Teil dieser Habilitationsschrift aufgeführte Publikation zielte darauf ab, die Therapie der Myasthenie zu verbessern, bzw. die aktuellen therapeutischen Optionen durch Medikamente mit neuen Wirkmechanismen zu erweitern. Dafür wurden Experimente im murinen Modell der MG, der EAMG durchgeführt

### 3.2.1. S1P Rezeptor Antagonismus als therapeutisches Prinzip bei der EAMG

Funktionelle S1P Rezeptor Antagonisten wie Fingolimod und Siponimod bewirken eine Blockade des Auswanderns von Lymphozyten aus den Lymphknoten und dadurch eine relative Lymphopenie mit Immunsuppression. Seit mehreren Jahren ist

Fingolimod aufgrund einer signifikanten Reduktion der Schubrate zur Therapie der Multiplen Sklerose zugelassen (Radick and Mehr, 2015). Eine japanische Arbeitsgruppe hatte bereits gezeigt, dass eine prophylaktische Gabe des funktionellen Sphingosine-1-Phosphate (S1P) Antagonisten Fingolimod im EAMG Modell sowohl die Krankheitsentwicklung als auch die Antikörperproduktion deutlich reduziert (Kohno et al., 2005). Da eine prophylaktische Gabe jedoch nicht der klinischen Realität entspricht, untersuchten wir den Effekt einer therapeutischen Gabe von Fingolimod und dem ähnlich wirkenden Siponimod (BAF312)(Kappos et al., 2018) auf eine bereits klinisch etablierte EAMG.

Krankheitsinzidenz oder –schwere wurden durch eine Therapie mit Fingolimod oder Siponimod im Vergleich zu Placebo nicht signifikant verändert. Ebenso wenig unterschieden sich die pathogenen Antikörper Titer oder die Zahl antigen spezifischer Plasmazellen. Es zeigten sich lediglich Unterschiede nach T Zell Stimulation von Milzzellen, die jedoch gut durch den bereits beschriebenen vorwiegenden Verlust naiver T Zellen in sekundären lymphatischen Organen erklärbar sind (Hofmann et al., 2006).

Wir konnten also im Gegensatz zur Vorarbeit von *Kohno et al* (Kohno et al., 2005) keinen Hinweis darauf finden, dass dieses Medikament einen therapeutischen Nutzen in der MG haben könnte. Somit scheint in unserem Modell die Beeinflussung der physiologischen Lymphozytenwanderung durch funktionellen S1P Rezeptor Antagonismus im Rahmen einer bereits länger etablierten Autoimmunreaktion keinen relevanten Effekt mehr zu haben. Es konnte zwar gezeigt werden, dass eine Fingolimod Administration vor der Immunisierung zu einer reduzierten Keimzentrumsreaktion führt (Han et al., 2004), ebenso kann es das sogenannte Homing von Plasmazellen in das Knochenmark behindern (Kabashima et al., 2006). Für beide angeführten Mechanismen ist gut vorstellbar, dass eine anfängliche Autoantikörperproduktion im Rahmen der EAMG Induktion beeinträchtigt sein sollte. Da das Krankheitsmodell zumindest in Mäusen jedoch von einer dreimaligen Immunisierung abhängt und wir unsere Behandlung erst 1 Woche nach der 3. Immunisierung begonnen haben ist es gut möglich, dass oben genannte Effekte nach Krankheitsbeginn keine relevante Rolle mehr spielen.

Denkbar wäre, dass bei einer Subgruppe von MG Patienten, welche durch schubförmig anmutende Verschlechterungen gekennzeichnet sind, eine Therapie mit



Fingolimod positive Effekte analog zur MS haben könnte. Dafür müsste man dann rezidivierende Booster-Immunisierungsvorgänge als Ursache der erneuten Krankheitsaktivität postulieren. Aufgrund der Tatsache, dass die immunologischen Prozesse, die der Verschlechterung einer Myasthenie zugrunde liegen, nicht verstanden sind sowie auf Grundlage der hier erhobenen Daten, halte ich einen therapeutischen Einsatz bei der MG derzeit jedoch für nicht gerechtfertigt.

## 4. Zusammenfassung

Die autoimmune Myasthenia Gravis ist eine seit vielen Jahren bekannte und in ihrer pathophysiologischen Endstrecke relativ gut charakterisierte antikörpervermittelte Autoimmunerkrankung. Es ist jedoch weiterhin unklar, wie das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen Zellen des Immunsystems, die an der Initiierung einer Antikörperproduktion beteiligt sind, bzw. beteiligt sein können zur Bildung von Antikörpern führen, die im Fall der Myasthenie gegen körpereigene neuromuskuläre Strukturen gerichtet sind.

In dieser Habilitationsschrift werden Arbeiten vorgestellt, die sich mit der Pathophysiologie der Myasthenie sowohl im experimentellen System als auch in der Erkrankung beim Menschen befassen. Dabei konnte im Mausmodell der Myasthenie, der EAMG, gezeigt werden, dass die Anwesenheit von TH17 Zellen essentiell dafür ist, dass die humorale Immunreaktion sich gegen den eigenen Körper richtet und somit zur Erkrankung führt. Bei MG Patienten konnte diese Arbeiten zeigen, dass Besonderheiten in der Homöostase naiver CD4<sup>+</sup> T Zellen dazu führen, dass eine größere Zahl potentiell autoreaktiver naiver CD4<sup>+</sup> T Zellen in der Peripherie vorhanden ist. Andererseits war jedoch auch eine Untergruppe von regulatorischen, immunsupprimierenden T Zellen bei MG Patienten signifikant vermindert, so dass ein Zusammenspiel dieser Faktoren die Entstehung von Autoimmunität fördern könnte. Als Zeichen für die pathologische Aktivierung der humoralen Immunität konnten wir dann auch eine erhöhte Frequenz an antikörperproduzierenden Plasmablasten im Blut von MG Patienten nachweisen, welche durch Kortikosteroide auf Werte ähnlich derer gesunder Kontrollen reduziert werden.

Eine weitere Studie erforschte einen neuen medikamentösen Ansatz zur Therapie der Myasthenie, die funktionelle Blockade des S1P Rezeptors, welche bereits erfolgreich prophylaktisch im murinen Modell eingesetzt worden war. Es konnte jedoch im therapeutischen Ansatz im Mausmodell kein signifikanter Nutzen, weder auf Antikörperspiegel noch auf klinische Parameter, nachgewiesen werden.

Somit konnten im Rahmen dieser Habilitation eine Reihe von neuen pathophysiologischen und therapeutischen Erkenntnissen erhoben werden, die dazu beitragen, die komplexen immunologischen Vorgänge bei der MG besser zu verstehen. Darauf basierend sollte dann zukünftig eine bessere, zielgerichtete Therapie von MG Patienten möglich werden.

## 5. Literaturangaben

- AKESSON, K., TOMPA, A., RYDEN, A. & FARESJO, M. 2015. Low expression of CD39(+)/CD45RA(+) on regulatory T cells (Treg) cells in type 1 diabetic children in contrast to high expression of CD101(+)/CD129(+) on Treg cells in children with coeliac disease. *Clin Exp Immunol*, 180, 70-82.
- ARICHA, R., MIZRACHI, K., FUCHS, S. & SOUROUJON, M. C. Blocking of IL-6 suppresses experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Autoimmun*, 36, 135-41.
- BAI, Y., LIU, R., HUANG, D., LA CAVA, A., TANG, Y. Y., IWAKURA, Y., CAMPAGNOLO, D. I., VOLLMER, T. L., RANSOHOFF, R. M. & SHI, F. D. 2008. CCL2 recruitment of IL-6-producing CD11b+ monocytes to the draining lymph nodes during the initiation of Th17-dependent B cell-mediated autoimmunity. *Eur J Immunol*, 38, 1877-88.
- BERNARD, C., FRIH, H., PASQUET, F., KEREVER, S., JAMILLOUX, Y., TRONC, F., GUIBERT, B., ISAAC, S., DEVOUASSOUX, M., CHALABREYSSE, L., BROUSSOLLE, C., PETIOT, P., GIRARD, N. & SEVE, P. 2016. Thymoma associated with autoimmune diseases: 85 cases and literature review. *Autoimmun Rev*, 15, 82-92.
- BERRIH-AKNIN, S., RAGHEB, S., LE PANSE, R. & LISAK, R. P. 2013. Ectopic germinal centers, BAFF and anti-B-cell therapy in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev*, 12, 885-93.
- BEVER, C. T., JR., AQUINO, A. V., PENN, A. S., LOVELACE, R. E. & ROWLAND, L. P. 1983. Prognosis of ocular myasthenia. *Ann Neurol*, 14, 516-9.
- BUCKLEY, C., DOUEK, D., NEWSOM-DAVIS, J., VINCENT, A. & WILLCOX, N. 2001. Mature, long-lived CD4+ and CD8+ T cells are generated by the thymoma in myasthenia gravis. *Ann Neurol*, 50, 64-72.
- CAVALCANTE, P., LE PANSE, R., BERRIH-AKNIN, S., MAGGI, L., ANTOZZI, C., BAGGI, F., BERNASCONI, P. & MANTEGAZZA, R. 2011. The thymus in myasthenia gravis: Site of "innate autoimmunity"? *Muscle Nerve*, 44, 467-84.
- CORDTS, I., BODART, N., HARTMANN, K., KARAGIORGOU, K., TZARTOS, J. S., MEI, L., REIMANN, J., VAN DAMME, P., RIVNER, M. H., VIGNERON, A., WEIS, J., SCHULZ, J. B., TZARTOS, S. J. & CLAEYS, K. G. 2017. Screening for lipoprotein receptor-related protein 4-, agrin-, and titin-antibodies and exploring the autoimmune spectrum in myasthenia gravis. *J Neurol*, 264, 1193-1203.
- CRON, M. A., MAILLARD, S., VILLEGAS, J., TRUFFAULT, F., SUDRES, M., DRAGIN, N., BERRIH-AKNIN, S. & LE PANSE, R. 2018. Thymus involvement in early-onset myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*, 1412, 137-145.
- DING, Y., LI, J., WU, Q., YANG, P., LUO, B., XIE, S., DRUEY, K. M., ZAJAC, A. J., HSU, H. C. & MOUNTZ, J. D. 2013. IL-17RA is essential for optimal localization of follicular Th cells in the germinal center light zone to promote autoantibody-producing B cells. *J Immunol*, 191, 1614-24.
- FATTOROSSO, A., BATTAGLIA, A., BUZZONETTI, A., MINICUCI, G., RISO, R., PERI, L., SCAMBIA, G. & EVOLI, A. 2008. Thymopoiesis, regulatory T cells, and TCRVbeta expression in thymoma with and without myasthenia gravis, and modulatory effects of steroid therapy. *J Clin Immunol*, 28, 194-206.
- GEORGE, A. J. & RITTER, M. A. 1996. Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunol Today*, 17, 267-72.
- GOMEZ, A. M., WILLCOX, N., VROLIX, K., HUMMEL, J., NOGALES-GADEA, G., SAXENA, A., DUIMEL, H., VERHEYEN, F., MOLENAAR, P. C., BUURMAN, W. A., DE BAETS, M. H., MARTINEZ-MARTINEZ, P. & LOSEN, M. 2014. Proteasome inhibition with bortezomib depletes plasma cells and specific autoantibody production in primary thymic cell cultures from early-onset myasthenia gravis patients. *J Immunol*, 193, 1055-1063.

- GROB, D., ARSURA, E. L., BRUNNER, N. G. & NAMBA, T. 1987. The course of myasthenia gravis and therapies affecting outcome. *Ann N Y Acad Sci*, 505, 472-99.
- GUDMUNSDOTTIR, J., OSKARSDOTTIR, S., SKOGBERG, G., LINDGREN, S., LUNDBERG, V., BERGLUND, M., LUNDELL, A. C., BERGGREN, H., FASTH, A., TELEMO, E. & EKWALL, O. 2016. Early thymectomy leads to premature immunologic ageing: An 18-year follow-up. *J Allergy Clin Immunol*, 138, 1439-1443 e10.
- HAAS, J., FRITZSCHING, B., TRUBSWETTER, P., KORPORAL, M., MILKOVA, L., FRITZ, B., VOBIS, D., KRAMMER, P. H., SURI-PAYER, E. & WILDEMANN, B. 2007. Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *J Immunol*, 179, 1322-30.
- HAN, S., ZHANG, X., WANG, G., GUAN, H., GARCIA, G., LI, P., FENG, L. & ZHENG, B. 2004. FTY720 suppresses humoral immunity by inhibiting germinal center reaction. *Blood*, 104, 4129-33.
- HEHIR, M. K., BURNS, T. M., ALPERS, J., CONAWAY, M. R., SAWA, M. & SANDERS, D. B. 2010. Mycophenolate mofetil in AChR-antibody-positive myasthenia gravis: outcomes in 102 patients. *Muscle Nerve*, 41, 593-8.
- HOCH, W., MCCONVILLE, J., HELMS, S., NEWSOM-DAVIS, J., MELMS, A. & VINCENT, A. 2001. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med*, 7, 365-8.
- HOFFMANN, S., KOHLER, S., ZIEGLER, A. & MEISEL, A. 2014. Glucocorticoids in myasthenia gravis - if, when, how, and how much? *Acta Neurol Scand*, 130, 211-21.
- HOFMANN, M., BRINKMANN, V. & ZERWES, H. G. 2006. FTY720 preferentially depletes naive T cells from peripheral and lymphoid organs. *Int Immunopharmacol*, 6, 1902-10.
- HOWARD, J. F., JR., UTSUGISAWA, K., BENATAR, M., MURAI, H., BAROHN, R. J., ILLA, I., JACOB, S., VISSING, J., BURNS, T. M., KISSEL, J. T., MUPPIDI, S., NOWAK, R. J., O'BRIEN, F., WANG, J. J., MANTEGAZZA, R. & GROUP, R. S. 2017. Safety and efficacy of eculizumab in anti-acetylcholine receptor antibody-positive refractory generalised myasthenia gravis (REGAIN): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. *Lancet Neurol*, 16, 976-986.
- HSU, H. C., YANG, P., WANG, J., WU, Q., MYERS, R., CHEN, J., YI, J., GUENTERT, T., TOUSSON, A., STANUS, A. L., LE, T. V., LORENZ, R. G., XU, H., KOLLS, J. K., CARTER, R. H., CHAPLIN, D. D., WILLIAMS, R. W. & MOUNTZ, J. D. 2008. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol*, 9, 166-75.
- HUANG, Y. M., PIRSKANEN, R., GISCOMBE, R., LINK, H. & LEFVERT, A. K. 2004. Circulating CD4+CD25+ and CD4+CD25+ T cells in myasthenia gravis and in relation to thymectomy. *Scand J Immunol*, 59, 408-14.
- JACOBI, A. M., MEI, H., HOYER, B. F., MUMTAZ, I. M., THIELE, K., RADBRUCH, A., BURMESTER, G. R., HIEPE, F. & DORNER, T. 2010. HLA-DR<sup>high</sup>/CD27<sup>high</sup> plasmablasts indicate active disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 69, 305-8.
- JACOBI, A. M., ODENDAHL, M., REITER, K., BRUNS, A., BURMESTER, G. R., RADBRUCH, A., VALET, G., LIPSKY, P. E. & DORNER, T. 2003. Correlation between circulating CD27<sup>high</sup> plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 48, 1332-42.
- JONES, A., CIURTIN, C., ISMAJLI, M., LEANDRO, M., SENGUPTA, R. & MACHADO, P. M. 2018. Biologics for treating axial spondyloarthritis. *Expert Opin Biol Ther*, 18, 641-652.
- KABASHIMA, K., HAYNES, N. M., XU, Y., NUTT, S. L., ALLENDE, M. L., PROIA, R. L. & CYSTER, J. G. 2006. Plasma cell S1P1 expression determines secondary lymphoid organ retention versus bone marrow tropism. *J Exp Med*, 203, 2683-90.
- KAPPOS, L., BAR-OR, A., CREE, B. A. C., FOX, R. J., GIOVANNONI, G., GOLD, R., VERMERSCH, P., ARNOLD, D. L., ARNOULD, S., SCHERZ, T., WOLF, C., WALLSTROM, E., DAHLKE, F. & INVESTIGATORS, E. C. 2018. Siponimod versus

- placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet*, 391, 1263-1273.
- KLEINewietfeld, M., STARKE, M., DI MITRI, D., BORSELLINO, G., BATTISTINI, L., ROTZSCHKE, O. & FALK, K. 2009. CD49d provides access to "untouched" human Foxp3+ Treg free of contaminating effector cells. *Blood*, 113, 827-36.
- KOHLER, S., KEIL, T., ALEXANDER, T., THIEL, A., SWIERZY, M., ISMAIL, M., RUCKERT, J. C. & MEISEL, A. 2019. Altered naive CD4(+) T cell homeostasis in myasthenia gravis and thymoma patients. *J Neuroimmunol*, 327, 10-14.
- KOHLER, S., KEIL, T. O., SWIERZY, M., HOFFMANN, S., SCHAFFERT, H., ISMAIL, M., RUCKERT, J. C., ALEXANDER, T., HIEPE, F., GROSS, C., THIEL, A. & MEISEL, A. 2013. Disturbed B cell subpopulations and increased plasma cells in myasthenia gravis patients. *J Neuroimmunol*, 264, 114-9.
- KOHLER, S., KEIL, T. O. P., HOFFMANN, S., SWIERZY, M., ISMAIL, M., RUCKERT, J. C., ALEXANDER, T. & MEISEL, A. 2017. CD4(+) FoxP3(+) T regulatory cell subsets in myasthenia gravis patients. *Clin Immunol*, 179, 40-46.
- KOHLER, S. & THIEL, A. 2009. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood*, 113, 769-74.
- KOHLER, S., WAGNER, U., PIERER, M., KIMMIG, S., OPPMANN, B., MOWES, B., JULKE, K., ROMAGNANI, C. & THIEL, A. 2005. Post-thymic in vivo proliferation of naive CD4+ T cells constrains the TCR repertoire in healthy human adults. *Eur J Immunol*, 35, 1987-94.
- KOHNO, T., TSUJI, T., HIRAYAMA, K., IWATSUKI, R., HIROSE, M., WATABE, K., YOSHIKAWA, H., KOHNO, T., MATSUMOTO, A., FUJITA, T. & HAYASHI, M. 2005. A novel immunomodulator, FTY720, prevents development of experimental autoimmune myasthenia gravis in C57BL/6 mice. *Biol Pharm Bull*, 28, 736-9.
- LEVY, Y., AFEK, A., SHERER, Y., BAR-DAYAN, Y., SHIBI, R., KOPOLOVIC, J. & SHOENFELD, Y. 1998. Malignant thymoma associated with autoimmune diseases: a retrospective study and review of the literature. *Semin Arthritis Rheum*, 28, 73-9.
- LI, X., XIAO, B. G., XI, J. Y., LU, C. Z. & LU, J. H. 2008. Decrease of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells and elevation of CD19(+)BAFF-R(+) B cells and soluble ICAM-1 in myasthenia gravis. *Clin Immunol*, 126, 180-8.
- LINDBERG, C. & BOKAREWA, M. 2010. Rituximab for severe myasthenia gravis--experience from five patients. *Acta Neurol Scand*, 122, 225-8.
- MADDISON, P., MCCONVILLE, J., FARRUGIA, M. E., DAVIES, N., ROSE, M., NORWOOD, F., JUNGBLUTH, H., ROBB, S. & HILTON-JONES, D. 2011. The use of rituximab in myasthenia gravis and Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 82, 671-3.
- MARX, A., CHAN, J. K., COINDRE, J. M., DETTERBECK, F., GIRARD, N., HARRIS, N. L., JAFFE, E. S., KURRER, M. O., MAROM, E. M., MOREIRA, A. L., MUKAI, K., ORAZI, A. & STROBEL, P. 2015a. The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Thymus: Continuity and Changes. *J Thorac Oncol*, 10, 1383-95.
- MARX, A., PORUBSKY, S., BELHARAZEM, D., SARUHAN-DIRESKENELI, G., SCHALKE, B., STROBEL, P. & WEIS, C. A. 2015b. Thymoma related myasthenia gravis in humans and potential animal models. *Exp Neurol*, 270, 55-65.
- MARX, A., WILLCOX, N., LEITE, M. I., CHUANG, W. Y., SCHALKE, B., NIX, W. & STROBEL, P. 2010. Thymoma and paraneoplastic myasthenia gravis. *Autoimmunity*, 43, 413-27.
- MATSUI, N., NAKANE, S., SAITO, F., OHIGASHI, I., NAKAGAWA, Y., KUROBE, H., TAKIZAWA, H., MITSUI, T., KONDO, K., KITAGAWA, T., TAKAHAMA, Y. & KAJI, R. 2010. Undiminished regulatory T cells in the thymus of patients with myasthenia gravis. *Neurology*, 74, 816-20.
- MEAGER, A., WADHWA, M., DILGER, P., BIRD, C., THORPE, R., NEWSOM-DAVIS, J. & WILLCOX, N. 2003. Anti-cytokine autoantibodies in autoimmunity: preponderance of neutralizing autoantibodies against interferon-alpha, interferon-omega and interleukin-12 in patients with thymoma and/or myasthenia gravis. *Clin Exp Immunol*, 132, 128-36.

- MIOSSEC, P. & KOLLS, J. K. 2012. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov*, 11, 763-76.
- MITSDOERFFER, M., LEE, Y., JAGER, A., KIM, H. J., KORN, T., KOLLS, J. K., CANTOR, H., BETTELLI, E. & KUCHROO, V. K. 2010a. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 14292-7.
- MITSDOERFFER, M., LEE, Y., JAGER, A., KIM, H. J., KORN, T., KOLLS, J. K., CANTOR, H., BETTELLI, E. & KUCHROO, V. K. 2010b. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 14292-14297.
- MIYARA, M., GOROCHOV, G., EHRENSTEIN, M., MUSSET, L., SAKAGUCHI, S. & AMOURA, Z. 2011. Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*, 10, 744-55.
- MIYARA, M., YOSHIOKA, Y., KITO, A., SHIMA, T., WING, K., NIWA, A., PARIZOT, C., TAFLIN, C., HEIKE, T., VALEYRE, D., MATHIAN, A., NAKAHATA, T., YAMAGUCHI, T., NOMURA, T., ONO, M., AMOURA, Z., GOROCHOV, G. & SAKAGUCHI, S. 2009. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*, 30, 899-911.
- MUPPIDI, S., UTSUGISAWA, K., BENATAR, M., MURAI, H., BAROHN, R. J., ILLA, I., JACOB, S., VISSING, J., BURNS, T. M., KISSEL, J. T., NOWAK, R. J., ANDERSEN, H., CASASNOVAS, C., DE BLEECKER, J. L., VU, T. H., MANTEGAZZA, R., O'BRIEN, F. L., WANG, J. J., FUJITA, K. P., HOWARD, J. F., JR. & REGAIN STUDY, G. 2019. Long-term safety and efficacy of eculizumab in generalized myasthenia gravis. *Muscle Nerve*, 60, 14-24.
- MUSCLE STUDY, G. 2008. A trial of mycophenolate mofetil with prednisone as initial immunotherapy in myasthenia gravis. *Neurology*, 71, 394-9.
- ODENDAHL, M., JACOBI, A., HANSEN, A., FEIST, E., HIEPE, F., BURMESTER, G. R., LIPSKY, P. E., RADBRUCH, A. & DORNER, T. 2000. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 165, 5970-9.
- ODENDAHL, M., MEI, H., HOYER, B. F., JACOBI, A. M., HANSEN, A., MUEHLINGHAUS, G., BEREK, C., HIEPE, F., MANZ, R., RADBRUCH, A. & DORNER, T. 2005. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood*, 105, 1614-21.
- OSSERMAN, K. E. & GENKINS, G. 1971. Studies in myasthenia gravis: review of a twenty-year experience in over 1200 patients. *Mt Sinai J Med*, 38, 497-537.
- PALACE, J., NEWSOM-DAVIS, J. & LECKY, B. 1998. A randomized double-blind trial of prednisolone alone or with azathioprine in myasthenia gravis. Myasthenia Gravis Study Group. *Neurology*, 50, 1778-83.
- RADICK, L. & MEHR, S. R. 2015. The Latest Innovations in the Drug Pipeline for Multiple Sclerosis. *Am Health Drug Benefits*, 8, 448-53.
- RAGHEB, S., BEALMEAR, B. & LISAK, R. 1999. Cell-surface expression of lymphocyte activation markers in myasthenia gravis. *Autoimmunity*, 31, 55-66.
- RAGHEB, S. & LISAK, R. P. 1992. CD5+ B cells in myasthenia gravis. Clinical correlations. *Ann N Y Acad Sci*, 651, 586-7.
- ROCHE, J. C., CAPABLO, J. L., LARRAD, L., GERVA-ARRUGA, J., ARA, J. R., SANCHEZ, A. & ALARCIA, R. Increased serum interleukin-17 levels in patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve*, 44, 278-80.
- RODA, R. H., DOHERTY, L. & CORSE, A. M. 2019. Stopping oral steroid-sparing agents at initiation of rituximab in myasthenia gravis. *Neuromuscul Disord*, 29, 554-561.
- RODRIGUEZ-BAYONA, B., RAMOS-AMAYA, A., PEREZ-VENEGAS, J. J., RODRIGUEZ, C. & BRIEVA, J. A. 2010. Decreased frequency and activated phenotype of blood CD27 IgD IgM B lymphocytes is a permanent abnormality in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res Ther*, 12, R108.
- SANDERS, D. B., WOLFE, G. I., BENATAR, M., EVOLI, A., GILHUS, N. E., ILLA, I., KUNTZ, N., MASSEY, J. M., MELMS, A., MURAI, H., NICOLLE, M., PALACE, J., RICHMAN, D. P., VERSCHUUREN, J. & NARAYANASWAMI, P. 2016. International consensus

- guidance for management of myasthenia gravis: Executive summary. *Neurology*, 87, 419-25.
- SCADDING, G. K., VINCENT, A., NEWSOM-DAVIS, J. & HENRY, K. 1981. Acetylcholine receptor antibody synthesis by thymic lymphocytes: correlation with thymic histology. *Neurology*, 31, 935-43.
- SCARPINO, S., DI NAPOLI, A., STOPPACCIARO, A., ANTONELLI, M., PILOZZI, E., CHIARLE, R., PALESTRO, G., MARINO, M., FACCIOLO, F., RENDINA, E. A., WEBSTER, K. E., KINKEL, S. A., SCOTT, H. S. & RUCO, L. 2007. Expression of autoimmune regulator gene (AIRE) and T regulatory cells in human thymomas. *Clin Exp Immunol*, 149, 504-12.
- SCHAFFERT, H., PELZ, A., SAXENA, A., LOSEN, M., MEISEL, A., THIEL, A. & KOHLER, S. 2015. IL-17-producing CD4(+) T cells contribute to the loss of B-cell tolerance in experimental autoimmune myasthenia gravis. *Eur J Immunol*, 45, 1339-47.
- SEMPOWSKI, G., THOMASCH, J., GOODING, M., HALE, L., EDWARDS, L., CIAFALONI, E., SANDERS, D., MASSEY, J., DOUEK, D., KOUP, R. & HAYNES, B. 2001. Effect of thymectomy on human peripheral blood T cell pools in myasthenia gravis. *J Immunol*, 166, 2808-17.
- SHIONO, H., ROXANIS, I., ZHANG, W., SIMS, G. P., MEAGER, A., JACOBSON, L. W., LIU, J. L., MATTHEWS, I., WONG, Y. L., BONIFATI, M., MICKLEM, K., STOTT, D. I., TODD, J. A., BEESON, D., VINCENT, A. & WILLCOX, N. 2003. Scenarios for autoimmunization of T and B cells in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*, 998, 237-56.
- SIEB, J. P. 2014. Myasthenia gravis: an update for the clinician. *Clin Exp Immunol*, 175, 408-18.
- SILFVAST-KAISER, A., PAK, S. Y. & MENTER, A. 2019. Anti-IL17 therapies for psoriasis. *Expert Opin Biol Ther*, 19, 45-54.
- SINGH, N. & GOYAL, V. 2019. Rituximab as induction therapy in refractory myasthenia gravis: 18 month follow-up study. *J Neurol*, 266, 1596-1600.
- STROBEL, P., HELMREICH, M., MENIOUDAKIS, G., LEWIN, S. R., RUDIGER, T., BAUER, A., HOFFACKER, V., GOLD, R., NIX, W., SCHALKE, B., ELERT, O., SEMIK, M., MULLER-HERMELINK, H. K. & MARX, A. 2002. Paraneoplastic myasthenia gravis correlates with generation of mature naive CD4(+) T cells in thymomas. *Blood*, 100, 159-66.
- STROBEL, P., MURUMAGI, A., KLEIN, R., LUSTER, M., LAHTI, M., KROHN, K., SCHALKE, B., NIX, W., GOLD, R., RIECKMANN, P., TOYKA, K., BUREK, C., ROSENWALD, A., MULLER-HERMELINK, H. K., PUJOLL-BORRELL, R., MEAGER, A., WILLCOX, N., PETERSON, P. & MARX, A. 2007. Deficiency of the autoimmune regulator AIRE in thymomas is insufficient to elicit autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1 (APS-1). *J Pathol*, 211, 563-71.
- STROBEL, P., ROSENWALD, A., BEYERSDORF, N., KERKAU, T., ELERT, O., MURUMAGI, A., SILLANPAA, N., PETERSON, P., HUMMEL, V., RIECKMANN, P., BUREK, C., SCHALKE, B., NIX, W., KIEFER, R., MULLER-HERMELINK, H. K. & MARX, A. 2004. Selective loss of regulatory T cells in thymomas. *Ann Neurol*, 56, 901-4.
- SUN, Y., QIAO, J., LU, C. Z., ZHAO, C. B., ZHU, X. M. & XIAO, B. G. 2004. Increase of circulating CD4+CD25+ T cells in myasthenia gravis patients with stability and thymectomy. *Clin Immunol*, 112, 284-9.
- TANDAN, R., HEHIR, M. K., 2ND, WAHEED, W. & HOWARD, D. B. 2017. Rituximab treatment of myasthenia gravis: A systematic review. *Muscle Nerve*, 56, 185-196.
- TARLINTON, D. 2008. IL-17 drives germinal center B cells? *Nat Immunol*, 9, 124-6.
- TAUB, D. D. & LONGO, D. L. 2005. Insights into thymic aging and regeneration. *Immunol Rev*, 205, 72-93.
- THIRUPATHI, M., ROWIN, J., GANESH, B., SHENG, J. R., PRABHAKAR, B. S. & MERIGGIOLI, M. N. 2012. Impaired regulatory function in circulating CD4(+)CD25(high)CD127(low/-) T cells in patients with myasthenia gravis. *Clin Immunol*, 145, 209-23.

- THORNTON, A. M., KORTY, P. E., TRAN, D. Q., WOHLFERT, E. A., MURRAY, P. E., BELKAID, Y. & SHEVACH, E. M. 2010. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol*, 184, 3433-41.
- TOYKA, K. V., DRACHMAN, D. B., GRIFFIN, D. E., PESTRONK, A., WINKELSTEIN, J. A., FISHBECK, K. H. & KAO, I. 1977. Myasthenia gravis. Study of humoral immune mechanisms by passive transfer to mice. *N Engl J Med*, 296, 125-31.
- VINCENT, A., PALACE, J. & HILTON-JONES, D. 2001. Myasthenia gravis. *Lancet*, 357, 2122-8.
- WANG, W., MILANI, M., OSTLIE, N., OKITA, D., AGARWAL, R. K., CASPI, R. R. & CONTIFINE, B. M. 2007. C57BL/6 mice genetically deficient in IL-12/IL-23 and IFN-gamma are susceptible to experimental autoimmune myasthenia gravis, suggesting a pathogenic role of non-Th1 cells. *J Immunol*, 178, 7072-80.
- WANG, Z., WANG, W., CHEN, Y. & WEI, D. T helper type 17 cells expand in patients with myasthenia-associated thymoma. *Scand J Immunol*, 76, 54-61.
- WEI, C., ANOLIK, J., CAPPIONE, A., ZHENG, B., PUGH-BERNARD, A., BROOKS, J., LEE, E. H., MILNER, E. C. & SANZ, I. 2007. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 178, 6624-33.
- WILLCOX, H. N., NEWSOM-DAVIS, J. & CALDER, L. R. 1983. Greatly increased autoantibody production in myasthenia gravis by thymocyte suspensions prepared with proteolytic enzymes. *Clin Exp Immunol*, 54, 378-86.
- WILLCOX, N., SCHLUEP, M., RITTER, M. A., SCHUURMAN, H. J., NEWSOM-DAVIS, J. & CHRISTENSSON, B. 1987. Myasthenic and nonmyasthenic thymoma. An expansion of a minor cortical epithelial cell subset? *Am J Pathol*, 127, 447-60.
- WOLFE, G. I., KAMINSKI, H. J., ABAN, I. B., MINISMAN, G., KUO, H. C., MARX, A., STROBEL, P., MAZIA, C., OGER, J., CEA, J. G., HECKMANN, J. M., EVOLI, A., NIX, W., CIAFALONI, E., ANTONINI, G., WITONPANICH, R., KING, J. O., BEYDOUN, S. R., CHALK, C. H., BARBOI, A. C., AMATO, A. A., SHAIBANI, A. I., KATIRJI, B., LECKY, B. R., BUCKLEY, C., VINCENT, A., DIAS-TOSTA, E., YOSHIKAWA, H., WADDINGTON-CRUZ, M., PULLEY, M. T., RIVNER, M. H., KOSTERA-PRUSZCZYK, A., PASCUZZI, R. M., JACKSON, C. E., GARCIA RAMOS, G. S., VERSCHUUREN, J. J., MASSEY, J. M., KISSEL, J. T., WERNECK, L. C., BENATAR, M., BAROHN, R. J., TANDAN, R., MOZAFFAR, T., CONWIT, R., ODENKIRCHEN, J., SONETT, J. R., JARETZKI, A., 3RD, NEWSOM-DAVIS, J., CUTTER, G. R. & GROUP, M. S. 2016. Randomized Trial of Thymectomy in Myasthenia Gravis. *N Engl J Med*, 375, 511-22.
- YANES, R. E., GUSTAFSON, C. E., WEYAND, C. M. & GORONZY, J. J. 2017. Lymphocyte generation and population homeostasis throughout life. *Semin Hematol*, 54, 33-38.
- YI, Q., AHLBERG, R., PIRSKANEN, R. & LEFVERT, A. K. 1992. Levels of CD5+ B lymphocytes do not differ between patients with myasthenia gravis and healthy individuals. *Neurology*, 42, 1081-4.



## 6. Danksagung

Ich möchte mich bei Allen bedanken, die mich im Rahmen meiner bisherigen akademischen Karriere begleitet und unterstützt haben.

Besonders hervorzuheben sind dabei Prof. Andreas Thiel und Prof. Andreas Radbruch, die mir die Freude an der Immunologie und der Grundlagenforschung beigebracht haben.

Später wurde ich dann entscheidend von Prof. Andreas Meisel beeinflusst, der mich immer sehr unterstützt hat und mir den Weg in die klinische Tätigkeit und Forschung geebnet hat. Prof. M. Endres gilt mein Dank dafür, dass er mich an seiner Klinik arbeiten und forschen lassen hat.

Das Wissenschaftler-Dasein funktioniert nur durch die Unterstützung durch die jeweiligen Arbeitsgruppen, daher möchte ich mich bei den ehemaligen Mitgliedern der AG Thiel und den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Meisel bedanken. Dabei sind insbesondere Hanne Schaffert, Andreas Pelz, Nicole Bethke, Thomas Keil und Radha Diallo hervorzuheben, die mit mir einen Teil der Projekte bearbeitet haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Hilfe bedanken!

Vor allem bei meinen Eltern, die mich einfach immer haben machen lassen, was ich für richtig hielt. Und bei meiner Frau Alice, die mir immer den Rücken freihält und mich unterstützt, auch wenn es mal länger bei mir dauert! Vielen Dank auch meinen Kindern Amur, Yves und Mae, die mir immer wieder zeigen, was das Leben ausmacht!

## 7. Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

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.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

Unterschrift