

Aus der Klinik  
mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Charakterisierung antigenspezifischer B-Zellen bei  
Autoimmunerkrankungen**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nadja Nomovi

Datum der Promotion: 26.06.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>2</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>10</b>
<b>Abstract (deutsch)</b> .....	<b>11</b>
<b>Abstract (english)</b> .....	<b>13</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>15</b>
1.1 Autoimmunerkrankungen .....	15
1.1.1 Systemischer Lupus erythematodes .....	15
1.1.2 Rheumatoide Arthritis .....	17
1.2 B-Zellen .....	19
1.2.1 Entwicklung der B-Zellen .....	20
1.2.2 B-Zell-Subpopulationen und ihre spezifischen Oberflächenmarker .....	21
1.2.3 Veränderte B-Zell-Subpopulationen bei SLE- und RA-Patienten .....	22
1.3 Die Rolle von Impfungen bei Gesunden und Autoimmunpatienten .....	23
1.4 Die Antigene Tetanustoxin, Ro52 und Pentraxin 3 und ihre Rolle beim SLE und der RA .....	24
1.4.1 Tetanustoxin .....	24
1.4.2 Ro52 .....	25
1.4.3 Pentraxin 3 .....	26
1.5 Zielsetzung .....	26
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>28</b>
2.1 Überblick .....	28
2.2 Material .....	28
2.2.1 Geräte .....	28
2.2.2 Verbrauchsmaterial .....	29
2.2.3 Reagenzien .....	29
2.2.4 Antikörper und Antigene .....	30
2.3 Methodik .....	31
2.3.1 Probandenauswahl und Krankheitsaktivitäts-Scores .....	31
2.3.2 Grundlagen der Durchflusszytometrie .....	32

2.3.3	Absolute B-Zellzahlbestimmung / „TBNK“-Messung .....	34
2.3.4	Siglec1-Nachweis als Marker der Typ I IFN Signatur .....	35
2.3.5	Färbung antigenspezifischer B-Zellen.....	36
2.3.6	ELISA zur TT-Titerbestimmung.....	37
2.3.7	Statistische Analyse und Datenvisualisierung.....	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
3.1	Patientencharakteristika .....	43
3.2	Veränderte B-Zellzahlen und B-Zell-Subpopulationen bei SLE- und RA-Patienten .....	45
3.3	Siglec1 (CD 169)-Expression auf Monozyten.....	48
3.4	Ergebnisse der Basis-Messung.....	49
3.4.1	Nachweis spezifischer TT-Bindung mittels Inhibitionsblock.....	49
3.4.2	Verminderter Nachweis von TT-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen bei SLE- und RA-Patienten.....	50
3.4.3	Verminderter Nachweis Ro52-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen bei SLE- und RA-Patienten.....	52
3.4.4	Verminderter Nachweis von TT <sup>+</sup> Ro52 <sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen bei SLE- und RA-Patienten.....	54
3.4.5	Vergleichbare TT-Titer zwischen Autoimmunpatienten und Gesunden im Grundzustand .....	56
3.4.6	Korrelation TT-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen mit verschiedenen Parametern .....	57
3.5	Ergebnisse der Impfstudie.....	59
3.5.1	Gleichbleibende Siglec1 (CD169)-Signatur nach Impfung.....	59
3.5.2	Typischer Plasmablastenanstieg an Tag 7 nach Impfung.....	60
3.5.3	Generierung TT-spezifischer Plasmablasten an Tag 7 nach Impfung .....	62
3.5.4	Generierung TT-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen an Tag 14 nach Impfung.....	65
3.5.5	Steigende TT-Titer bei Patienten und Gesunden nach Impfung .....	68
3.5.6	Keine Induktion autoantigenspezifischer B-Zellen nach TT-Impfung .....	69
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>72</b>
4.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	72
4.2	Interpretation und Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien .....	73
4.2.1	B-Zell-Subpopulationen und Siglec1-Signatur bei SLE- und RA-Patienten.....	73

---

4.2.2	TT-Impfschutz bei Autoimmunpatienten und Gesunden .....	74
4.2.2.1	TT-Block .....	74
4.2.2.2	Verminderter zellulärer Impfschutz von Autoimmunpatienten .....	74
4.2.2.3	Ausreichender humoraler Impfschutz von Autoimmunpatienten .....	76
4.2.2.4	Entwicklung der Gedächtnis-B-Zell-Subpopulationen nach Auffrisch- impfung bei Gesunden .....	78
4.2.3	Verminderte Anzahl Ro52-spezifischer B-Zellen bei Autoimmunpatienten..	80
4.2.4	Polyreaktive B-Zellen sind eher ein Phänomen von Gesunden .....	81
4.2.5	Impfungen verursachen eine limitierte Bystander-Reaktion.....	82
4.3	Stärken und Limitationen .....	84
4.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	85
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>86</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>94</b>
	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>95</b>
	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>97</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>98</b>

## Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
ABTS	2,2' Azino-di [3-Ethyl-Benzthiazolin-Sulfonat]
ACPA / CCP	Antikörper gegen cyclisches citrulliniertes Peptid
ACR	American College of Rheumatology
AF647	Alexa Fluor® 647
AID	Autoimmune Disease / Autoimmunerkrankung
AK	Antikörper
ANA	antinukleäre Antikörper
APC	allophycocyanin
APC-Cy7	allophycocyanin cyanine 7
APC-H7	allophycocyanin
AZA	Azathioprin
BC	B cells / B-Zellen
BCR	B cell receptor / B-Zell-Rezeptor
BSA	Rinderserumalbumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
BV510	Brilliant™ Violet 510
bzw.	beziehungsweise
CCP	zyklisch zitrulliniertes Peptid
CD	Cluster of Differentiation
CRP	C-reaktives Protein
CST beads	Cytometer Setup and Tracking beads
Cy5	cyanine 5
d.h.	das heißt
DAS28	Disease Activity Score
DIP	distales Interphalangealgelenk / Fingerendgelenk
DN	doppelt negativ / double negative
DNA	deoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure
DRFZ	Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin
dsDNA-AK	Doppelstrang-deoxyribonucleic acid-Antikörper
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

---

ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENA	extrahierbare nukleäre Antikörper
EULAR	European League Against Rheumatism
ex.	excluding / exklusive
FACS	fluorescence-activated cell sorting / Durchflusszytometrie
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	forward scatter / Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GLP	gute Laborpraxis
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCQ	Hydroxychloroquin
HD	healthy donor / gesunder Proband
His	histidine
HPV	Humane Papillomviren
HRP	horseradish peroxidase/ Meerrettichperoxidase
IFN	Interferon(e)
Ig	Immunglobulin
IRF	Interferon-Regulations-Faktor
kDa	Kilodalton
LEF	Leflunomid
max.	maximal
mBCs	memory B cell(s) / Gedächtnis-B-Zelle(n)
MCP	Metacarpophalangealgelenk / Fingergrundgelenk
MFI	median fluorescence intensity / mediane Fluoreszenzintensität
MG	Myasthenia gravis
ml	Milliliter
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MTP	Metatarsophalangealgelenk / Zehengrundgelenk
MTX	Methotrexat
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
o.g.	oben genannten

---

PacB	pacific blue
PBE	0,5% BSA + PBS 2mM EDTA
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PE	R-phycoerythrin
PE-Cy7	R-phycoerythrin cyanine 7
PerCP-Cy5.5	peridinin chlorophyll protein-Cyanine 5.5
PIP	proximales Interphalangealgelenk / Fingermittelgelenk
pSS	primäres Sjögren Syndrom
PTX3	Pentraxin 3
RA	rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
RKI	Robert-Koch-Institut
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity
sog.	sogenannte(n)
SSC	side scatter / Seitwärtsstreulicht
STIKO	Ständige Impfkommission
TBNK	T-Zellen / B-Zellen / Natürliche Killer-Zellen
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRIM	tripartite motif family
TT	Tetanustoxoid
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
$\Delta$	Delta (Differenz)

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Symptome des systemischen Lupus erythematoses .....	16
Abbildung 1.2	Symmetrische Arthritis der Handgelenke bei der rheumatoiden Arthritis.....	18
Abbildung 2.1	Prinzip der Durchflusszytometrie .....	33
Abbildung 2.2	Grafische Darstellungen der Durchflusszytometriedaten .....	33
Abbildung 2.3	Gating-Strategie der TBNK-Färbung. ....	35
Abbildung 2.4	Gating-Strategie der Siglec1-Messung .....	36
Abbildung 2.5	Gating-Strategie der Baseline-Studie zur quantitativen Bestimmung der antigenspezifischen B-Zellen.....	38
Abbildung 2.6	Gating-Strategie der Impfstudie an Tag 0 vor sowie an Tag 7 und Tag 14 nach Boostrix®-Impfung. ....	39
Abbildung 2.7	Darstellung der drei ELISA-Verfahren. ....	40
Abbildung 2.8	Darstellung der Standardkurve des TT-IgG-ELISA.....	41
Abbildung 3.1	B-Lymphopenie bei SLE-Patienten gegenüber Gesunden und RA- Patienten.....	46
Abbildung 3.2	Veränderte B-Zell-Subpopulationen bei SLE- und RA-Patienten gegenüber Gesunden. ....	47
Abbildung 3.3	Verstärkte Siglec1 (CD169)-Expression bei SLE- und RA-Patienten gegenüber HD. ....	48
Abbildung 3.4	Nachweis spezifischer TT-Bindung mittels Block.....	50
Abbildung 3.5	Veränderte TT-spezifische B-Zell-Subpopulationen bei SLE- und RA-Patienten gegenüber Gesunden.....	51
Abbildung 3.6	Veränderte Ro52-spezifische B-Zell-Subpopulationen bei SLE- und RA-Patienten gegenüber Gesunden.....	53
Abbildung 3.7	Veränderte TT <sup>+</sup> Ro52 <sup>+</sup> -B-Zell-Subpopulationen bei SLE- und RA- Patienten gegenüber Gesunden.....	55
Abbildung 3.8	Kein signifikanter Unterschied im TT-Titer-Gehalt zwischen SLE- und RA-Patienten gegenüber Gesunden.....	56
Abbildung 3.9	Gleichbleibende Siglec1-Signatur nach Impfung. ....	60
Abbildung 3.10	Generierung von Plasmablasten an Tag 7 nach Boostrix®-Impfung im Blut.....	62
Abbildung 3.11	Generierung TT-spezifischer Plasmablasten	



---

	(TT-Cy5 <sup>+</sup> TT-PE <sup>+</sup> CD20 <sup>low</sup> CD27 <sup>high</sup> ) nach Boostrix®-Impfung .....	63
Abbildung 3.12	Darstellung der TT-spezifischen Plasmablasten nach HLA-DR-Gehalt nach Boostrix®-Impfung.....	65
Abbildung 3.13	Generierung TT-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen (TT-Cy5 <sup>+</sup> TT-PE <sup>+</sup> CD20 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> ) nach Boostrix®-Impfung. ....	66
Abbildung 3.14	TT-spezifische Gedächtnis-B-Zell-Subpopulationen aller geimpften Probanden an Tag 0 vor sowie an Tag 7 und Tag 14 nach der Boostrix®-Impfung .....	67
Abbildung 3.15	Anstieg der TT-IgG-Titer nach Boostrix®-Impfung.....	69
Abbildung 3.16	Keine vermehrte Induktion von Ro52 <sup>+</sup> - und TT <sup>+</sup> Ro52 <sup>+</sup> -Plasmablasten (CD20 <sup>low</sup> CD27 <sup>high</sup> ) und Gedächtnis-B-Zellen (CD20 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> ) nach Boostrix®-Impfung.....	71

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	EULAR/ACR-Klassifikationskriterien für den SLE 2017.....	16
Tabelle 1.2	ACR/EULAR-Klassifikationskriterien für die RA 2010 .....	19
Tabelle 2.1	Geräte.....	28
Tabelle 2.2	Verbrauchsmaterial.....	29
Tabelle 2.3	Reagenzien.....	29
Tabelle 2.4	Fertiger Antikörpermix der TBNK-Messung .....	30
Tabelle 2.5	Antikörper der Siglec1-Färbung .....	30
Tabelle 2.6	Antikörper zur Färbung antigenspezifischer Zellen .....	30
Tabelle 2.7	Antigene zur Färbung antigenspezifischer Zellen .....	31
Tabelle 3.1	Probandencharakteristika der Baseline-Kohorte.....	44
Tabelle 3.2	Probandencharakteristika der Impfkohorte .....	45
Tabelle 3.3	Korrelationsanalyse der TT-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen.....	58

## Abstract (deutsch)

**Einleitung:** Autoimmunerkrankte sind aufgrund ihrer Erkrankung und der Einnahme immunsuppressiver Medikamente einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt, sodass dem Schutz mittels Impfung eine wichtige Bedeutung zukommt. Bislang ist jedoch nur wenig über die zelluläre Impfantwort bei Autoimmunerkrankten bekannt. Auch das Vorkommen von polyreaktiven Immunzellen, das als ein möglicher Mechanismus in der Pathophysiologie von Autoimmunität diskutiert wird, sowie die Bystander-Reaktion, die als ein möglicher Auslöser eines Krankheitsschubs nach Impfung debattiert wird, sind nicht hinreichend erforscht.

**Zielsetzung:** Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der zellulären Immunantwort gegen impfpräventable Antigene bei Patienten mit Autoimmunerkrankung. Hierzu wurden exemplarisch antigenspezifische B-Zellen analysiert. Des Weiteren wurde überprüft, ob Autoimmunerkrankte im Vergleich zu Gesunden verstärkt polyreaktive B-Zellen exprimieren und ob sie nach einer Impfung zu einer starken B-Zell-Bystander-Reaktion neigen.

**Methodik:** Der Gehalt tetanusspezifischer, Ro52-spezifischer sowie Tetanus-und-Ro52-spezifischer B-Zellen wurde im Blut von 11 Patienten mit systemischem Lupus erythematodes und 12 Patienten mit rheumatoider Arthritis im sogenannten Steady State bestimmt und mit dem von 14 Gesunden verglichen. Ferner wurden jeweils drei Probanden aus den entsprechenden drei Gruppen gegen Tetanus geimpft und ihre tetanusspezifische B-Zell-Reaktion an Tag 0 vor sowie an Tag 7 und Tag 14 nach Impfung gemessen. Parallel wurde die B-Zell-Impfreaktion mit Spezifität für die Autoantigene Ro52 und Pentraxin 3 bestimmt. Neben diesen durchflusszytometrischen Analysen erfolgte für alle Spender ein ELISA zur Bestimmung der Antikörpertiter gegen das Tetanustoxoid.

**Ergebnisse:** Beide Patientengruppen wiesen im Grundzustand signifikant weniger tetanus-, Ro52- sowie tetanus-und-Ro52-spezifische B-Zellen als Gesunde auf. Auch nach Impfung entwickelten beide Patientengruppen weniger tetanusspezifische

Gedächtnis-B-Zellen verglichen mit den Gesunden. Im Gegensatz dazu war der Antikörpertiter gegen das Tetanustoxoid zwischen den drei Gruppen vergleichbar.

Die Impfung löste in keinem der Patienten einen Krankheitsschub aus und führte auch zu keiner nennenswerten Bystander-Reaktion gegen die beiden Kontrollantigene Ro52 und Pentraxin 3.

**Fazit:** Patienten mit Autoimmunerkrankungen weisen ein vermindertes zelluläres Gedächtnis gegenüber impfpräventablen Infektionserregern auf, wohingegen die humorale Immunantwort intakt zu sein scheint. Polyreaktive B-Zellen scheinen eher ein Phänomen von Gesunden als von Autoimmunerkrankten zu sein und treten auch nach Impfung nicht verstärkt auf. Da Impfungen weder einen Krankheitsschub auslösen, noch zu einer starken Bystander-Reaktion führen, sollten sie zum Schutz vor Infektionskrankheiten als fester Bestandteil in den Therapieplan von Autoimmunpatienten integriert werden.

## Abstract (english)

**Introduction:** Patients with autoimmune diseases have an increased risk of developing infections due to the disease itself and the use of immunosuppressive drugs. Thus, infectious risk protection by vaccination plays an important role. So far, however, little is known about the cellular immune response towards vaccine antigens in autoimmunity. Furthermore, the occurrence of polyreactive cells, which is discussed as a possible mechanism in the pathophysiology of autoimmunity, as well as the bystander reaction, which is debated as a possible trigger of disease flare after vaccination, have not been sufficiently explored.

**Objective:** The aim of the present study was to investigate the cellular immune response against vaccine-preventable antigens in patients with autoimmune diseases based on the analysis of B cells. Moreover, the expression of polyreactive B cells as well as the occurrence of a B cell bystander reaction after vaccination were studied in patients with autoimmune diseases and healthy individuals.

**Methods:** The quantity of tetanus-specific, Ro52-specific, and both tetanus-and-Ro52-specific B cells was determined in the blood of 11 patients with systemic lupus erythematosus and 12 patients with rheumatoid arthritis and compared to that of 14 healthy subjects at baseline. Furthermore, three subjects of each group received a tetanus booster vaccination and their tetanus-specific B-cell response was measured on day 0 before and on day 7 and day 14 after vaccination. Simultaneously, the B cell vaccination response to the autoantigens Ro52 and pentraxin 3 was measured. In addition to these flow cytometric analyses, an ELISA for all donors was performed to determine the anti-tetanus toxoid antibody levels.

**Results:** Both patient groups had significantly lower levels of tetanus-, Ro52-, and tetanus-and-Ro52-specific B cells than the healthy individuals at baseline. Also after vaccination, both patient groups developed fewer tetanus-specific memory B cells compared to the healthy group. In contrast, the anti-tetanus toxoid antibody levels were comparable between the three groups. Vaccination did not induce a disease flare in any

of the patients, nor did it lead to any significant bystander reaction against the two control antigens Ro52 and pentraxin 3.

**Conclusions:** Patients with autoimmune diseases exhibit reduced cellular immune protection against vaccine-preventable antigens, whereas the humoral immune response seems to be intact. Polyreactive B cells appear to be a phenomenon of healthy individuals rather than autoimmune patients and do not increase after vaccination. Since vaccinations cause neither a disease flare nor a strong bystander reaction, they should play an integral part in the therapy of autoimmune patients.

# 1 Einleitung

## 1.1 Autoimmunerkrankungen

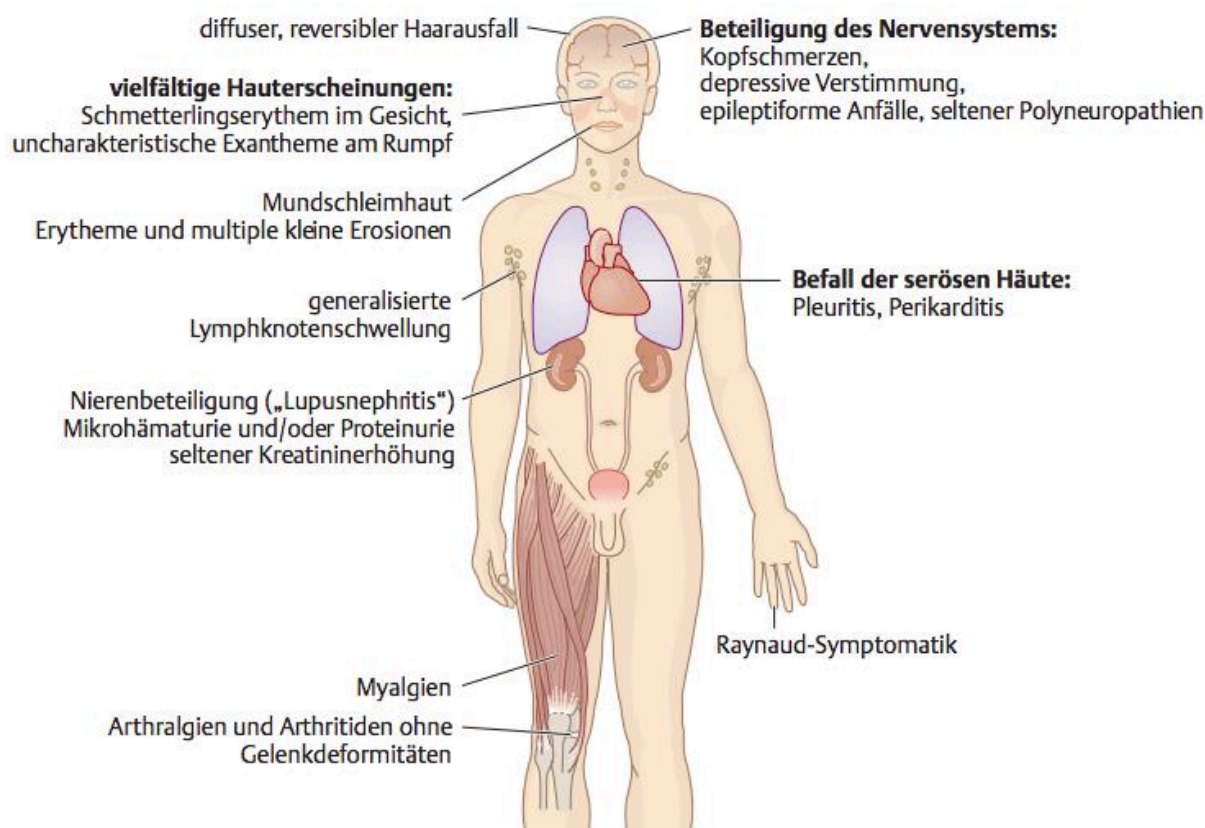
Autoimmunität bedeutet, dass das Immunsystem sich gegen körpereigene Strukturen wendet. Während es der Körper von Gesunden bewerkstelligt, autoreaktive Zellen durch Mechanismen der sog. zentralen und peripheren Toleranz zu eliminieren, sind die dafür notwendigen Mechanismen bei Autoimmunerkrankten gestört (1). Obwohl die genauen pathophysiologischen Prozesse noch weitestgehend ungeklärt sind, konnten dank intensiver Forschungsarbeiten der letzten Jahrzehnte bereits viele Erkenntnisse gewonnen werden. So geht man mittlerweile davon aus, dass nicht nur endogene Faktoren, sondern eine Kombination aus prädisponierenden genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen zum Ausbruch von Autoimmunität führt (2). Auch die Entwicklung neuer Medikamente - insbesondere der Biologika - hat die Therapie von Autoimmunerkrankungen durch zielgerichtete Immunmodulation bzw. – suppression revolutioniert und ermöglicht den Betroffenen eine deutlich höhere Lebensqualität (1).

In den westlichen Ländern leiden ca. 5 % der Menschen an einer Autoimmunerkrankung. Allgemein unterscheidet man zwischen organbezogenen Autoimmunerkrankungen wie der Hashimoto-Thyreoiditis oder dem Diabetes mellitus Typ I sowie systemischen Autoimmunerkrankungen (1). Zwei klassische Vertreter des systemischen Formenkreises sind der systemische Lupus erythematodes und die rheumatoide Arthritis, die im Folgenden detaillierter beschrieben werden.

### 1.1.1 Systemischer Lupus erythematodes

Der systemische Lupus erythematodes (SLE) ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, die vorrangig bei Frauen im gebärfähigen Alter auftritt und zahlreiche Organe befallen kann. Die Prävalenz beträgt ca. 40 Fälle pro 100.000 Einwohner. Charakteristisch ist ein schubartiger Verlauf mit intermediären Remissionsphasen, wobei Schwere und Prognose der Erkrankung je nach betroffenem Organsystem stark variieren können (2).

Die meisten Betroffenen berichten über Allgemeinbeschwerden wie Fieber, Schwäche und Gewichtsverlust. Des Weiteren sind Hautveränderungen wie das „Schmetterlingserythem“ im Gesicht sowie Muskel- und nicht-erosive Gelenkbeschwerden typisch. Der entzündliche Befall innerer Organe kann sich unter



**Abbildung 1.1 Symptome des systemischen Lupus erythematoses**

Kopiert und adaptiert aus Keikawus Arastéh et al.: Duale Reihe Innere Medizin, 2018 (3)

anderem an Herz, Lunge, Niere sowie dem Gefäß- und Nervensystem manifestieren (Abbildung 1.1) (2). Laborchemisch fallen unter anderem eine (Pan-)Zytopenie, erniedrigte Komplementfaktoren sowie verschiedene Auto-Antikörper wie ANA (antinukleäre Antikörper, > 95 %), dsDNA-AK (Antikörper gegen doppelsträngige DNA, ca. 70 %) oder Anti-Ro-Antikörper (ca. 60 %) auf. Die Diagnose wird anhand der in Tabelle 1.1 dargestellten EULAR/ACR-Klassifikationskriterien von 2017 gestellt. Mindestens 10 Punkte sind zur Klassifikation erforderlich (2). Im Verlauf wird die Krankheitsaktivität mithilfe verschiedener Scores wie dem Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI, siehe Kapitel 2.3.1) beurteilt. 2008 beschrieben zudem Biesen et al. Siglec1 (CD169) als einen weiteren Aktivitätsmarker. Der Gehalt des durch Typ I Interferone (IFN) induzierten und auf der Oberfläche von Monozyten exprimierten Glykoproteins korreliert positiv mit der Krankheitsaktivität (SLEDAI) sowie dem Gehalt an dsDNA-AK (4).

Die Therapie des SLE richtet sich nach der Schwere der Erkrankung. Bei leichten Verläufen reicht oft die Einnahme nichtsteroidaler Antirheumatika (NSAR) und die des



Tabelle 1.1 EULAR/ACR-Klassifikationskriterien für den SLE 2017

<b>EULAR/ACR-Klassifikationskriterien für den SLE 2017</b>		
Voraussetzungen und allgemeine Prinzipien:		
- ANA (HEp2-IFT) $\geq$ 1:80 (einmaliger Nachweis ausreichend!)		
- Ein Kriterium wird nicht gewertet, wenn eine andere, wahrscheinlichere Ursache vorliegt (z. B. Infektion, psychiatric lupus, Medikamente, endokrine oder andere autoimmune Erkrankungen).		
- Ein Kriterium ist erfüllt, wenn es einmalig vorgekommen und dokumentiert ist		
- Kriterien müssen nicht gleichzeitig vorliegen		
- Es muss mind. ein Kriterium aktuell vorhanden sein		
- Innerhalb jeder Domäne geht nur der höchste Score in den Gesamtscore ein		
<b>Klinische Domänen und Kriterien:</b>		<b>Punkte</b>
Konstitutionelle Symptome	Fieber	2
Haut	nicht vernarbende Alopezie	2
	orale Ulzera	2
	subakut-kutaner oder diskoider LE	4
	akuter kutaner LE	6
Arthritis	Synovitis in $\geq$ 2 Gelenken oder Druckschmerz in $\geq$ 2 Gelenken + Morgensteife $\geq$ 30 Min.	6
Neurologie	Delirium	2
	Psychose	3
	Anfälle	5
Serositis	Pleura- oder Perikarderguss	5
	akute Perikarditis	6
Hämatologie	Leukopenie	3
	Thrombopenie	4
	Autoimmunhämolyse	4
Nieren:	Proteinurie $>$ 0,5 g/24h	4
	Lupusnephritis (histologisch) Typ II, V	8
	Lupusnephritis (histologisch) Typ III, IV	10
<b>Immunologische Domänen und Kriterien:</b>		
Antiphospholipid-Ak	aCL $>$ 40 GPL oder a $\beta$ 2GPI $>$ 40 GPL oder LA+	2
Complement	C3 oder C4 vermindert	3
	C3 und C4 vermindert	4
Hochspezifische Auto-Ak:	anti-ds-DNS-Ak oder anti-Sm-Ak	6

**Klassifikation als SLE bei  $\geq$  10 Punkten**

ACR = American College of Rheumatology, AK = Antikörper, ANA = antinukleäre Antikörper, anti-Sm-AK = Anti-Smith-Antikörper, a $\beta$ 2GPI =  $\beta$ <sub>2</sub>Glykoprotein, Cardiolipin-Antikörper (aCL), EULAR= European League Against Rheumatism, GPL = IgG Phospholipid Einheit, Hep2 = Human epithelial type 2, IFT = Immunfluoreszenz-Test, LA = Lupus-Antikoagulan, (S)LE= (systemischer) Lupus erythematodes; kopiert aus Gerd Herold und Mitarbeiter: Innere Medizin 2020 (2)

Antimalariamittels Hydroxychloroquin. Bei (mittel-)schweren Verläufen und im akuten Schub hingegen kommen Immunsuppressiva wie Azathioprin oder (hochdosierte) Glukokortikoide zum Einsatz. Sollten diese nicht anschlagen, kann ein Versuch mit Biologika unternommen werden (2). Trotz eines 2-4-fach erhöhten Mortalitätsrisikos gegenüber Gesunden liegt die 10-Jahres-Überlebensrate mittlerweile bei  $>$  90 %. Zu den häufigsten Todesursachen zählen unter anderem kardiovaskuläre Komplikationen und Infektionen (2).

**1.1.2 Rheumatoide Arthritis**

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, die primär die Gelenke betrifft, sich aber auch extraartikulär manifestieren kann. Sie tritt dreimal häufiger bei Frauen als bei Männern auf und gehört mit einer Prävalenz von ca. 1 % zu den häufigsten rheumatologischen Erkrankungen in Deutschland.



**Abbildung 1.2 Symmetrische Arthritis der Handgelenke bei der rheumatoiden Arthritis A:** „Ödematöse Schwellung und Rötung der Handwurzel, des Handrückens sowie spindelförmige Auftreibung und entzündliche Rötung der Fingergrund- und Fingermittelgelenke.“ **B:** „Schwellungen in den Fingergrundgelenken des II–V. Fingers bds. Ulnardeviation der Finger, Atrophie der Mm. interossei, Schwanenhalsdeformierungen vor allem am II. und III. Finger links, Knopflochdeformierung am II. Finger rechts gut sichtbar. 90°/90°-Deformität des linken Daumens, Caput-ulnae-Syndrom bds.“; kopiert und adaptiert aus Gunter Gruber und Andreas Hansch: Blickdiagnosen Innere Medizin, 2018 (5)

Im Gegensatz zum SLE liegt der Erkrankungsgipfel eher im höheren Alter (zwischen dem 55. und 75. Lebensjahr) (2). Neben unspezifischen Allgemeinbeschwerden wie Fieber und Abgeschlagenheit entwickeln die Betroffenen häufig eine symmetrische, potentiell erosive Polyarthritis der kleinen Gelenke, die insbesondere die Metacarpophalangeal- (MCPs), Interphalangeal- (PIPs) (Abbildung 1.2 A) sowie die Metatarsophalangealgelenke (MTPs) betrifft und mit einer Morgensteifigkeit einhergeht. Die distalen Interphalangealgelenke (DIPs) sind typischerweise nicht betroffen. Extraartikuläre Manifestationen involvieren meist Herz, Lunge, Augen und Gefäßsystem (2). Zur Diagnosestellung der RA werden die ACR/EULAR-Klassifikationskriterien von 2010 herangezogen (Tabelle 1.2). Diese berücksichtigen neben der Anzahl der geschwollenen Gelenke und der Dauer des Auftretens der Symptome auch bestimmte serologische Parameter. Typisch sind unter anderem eine Erhöhung der Entzündungsparameter CRP (C-reaktives Protein) und/oder BSG (Blutsenkungsgeschwindigkeit) sowie der Nachweis von Rheumafaktoren (RF, Autoantikörper gegen das Fc-Fragment des IgG) und ACPA (IgG-AK gegen cyclisches citrulliniertes Peptid) (2). Zur Überwachung der Krankheitsaktivität im Verlauf wird oft der DAS28 (Disease Activity Score 28, siehe Kapitel 2.3.1) angewandt. Analog zum SLE kann zusätzlich das durch Typ 1 IFN induzierte Siglec1-Protein als Aktivitätsmarker im Blut bestimmt werden. Es korreliert positiv mit dem DAS28, der BSG und dem IgM-RF (6).

Tabelle 1.2 ACR/EULAR-Klassifikationskriterien für die RA 2010

ACR-/EULAR-Klassifikationskriterien 2010 (American College of Rheumatology/European League against Rheumatism):

Schwellung*// Druckschmerz an Gelenken	Serologie	Akute Phase	Dauer	Punkte
1 großes Gelenk	RF u. CCP negativ	CRP + BSG normal	< 6 Wochen	0
2 - 10 große Gelenke		CRP oder BSG †	≥ 6 Wochen	1
1 - 3 kleine Gelenke	RF oder CCP niedertitrig positiv			2
4 - 10 kleine Gelenke	RF oder CCP hochtitrig positiv			3
> 10 Gelenke, mind. 1 kleines Gelenk				5
Diagnose einer RA ab ≥ 6 Punkten sowie bei Nachweis typischer Usuren *) durch Synovialitis				

BSG = Blutsenkungsgeschwindigkeit, CCP = zyklisches citrulliniertes Peptid, CRP = C-reaktives Protein, RA = rheumatoide Arthritis, RF = Rheumafaktor; kopiert aus Gerd Herold und Mitarbeiter: Innere Medizin 2020 (2)

Die Behandlung der RA setzt sich aus einer medikamentösen Basis- und Schubtherapie sowie einer nicht-medikamentösen Therapie zusammen. Als Basistherapeutika werden häufig Immunsuppressiva wie Methotrexat (MTX), Leflunomid oder Biologika wie TNF $\alpha$ -Blocker angewendet, wohingegen im akuten Schub meist hochdosierte Glukokortikoide zum Einsatz kommen. Dank neuer Medikamente und einem frühzeitigen Therapiebeginn sind Gelenkfehlstellungen und -destruktionen wie die Schwanenhalsdeformität, Knopflochdeformität (Abbildung 1.2 B) oder atlanto-axiale Subluxation heutzutage nur noch selten zu beobachten. „Durch adäquate Kontrolle der Krankheitsaktivität lassen sich Morbidität und Mortalität fast auf das Risiko ansonsten Gesunder reduzieren. Zu beachten sind allerdings auch Komplikationen unter der Therapie (v.a. Infektionen)“ (2).

## 1.2 B-Zellen

B-Zellen, auch B-Lymphozyten genannt, sind eine Unterklasse der Leukozyten, die zusammen mit den T-Zellen für die adaptive Immunantwort verantwortlich ist. Ihre wohl wichtigste Funktion besteht in der Produktion von Antikörpern. Darüber hinaus können sie Antigene präsentieren, Zytokine produzieren und Gedächtniszellen generieren (1). Auch in der Pathophysiologie des SLE und der RA spielen sie eine wichtige Rolle, was unter anderem in der Produktion von Autoantikörpern (siehe Kapitel 1.1) und einer veränderten Komposition der B-Zell-Subpopulationen deutlich wird.

### 1.2.1 Entwicklung der B-Zellen

Die Entwicklung der B-Zellen beginnt im Knochenmark. Aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen entstehen unter dem Einfluss von Zytokinen und umliegender Stromazellen nach Durchlaufen mehrerer Entwicklungsstufen zunächst unreife B-Zellen. Diese exprimieren auf ihrer Oberfläche einen B-Zell-Rezeptor (BCR), der aus dem membranständigen Immunglobulin IgM besteht und nur ein spezifisches Antigen erkennt (1). Sollte der Rezeptor ein Autoantigen oder mehrere Antigene binden, also polyreaktiv sein, stirbt die unreife B-Zelle entweder mittels Apoptose ab (Negativselektion) oder sie durchläuft ein Rezeptor Editing, bei dem durch sekundäre Genumlagerung ein Rezeptor mit veränderter nicht-autoantigener Spezifität entsteht. Diese Kontrollvorrichtung ist Teil der sog. „zentralen Toleranz“ und wirkt der Entstehung von Autoimmunität entgegen (7, 8). Selbsttolerante B-Zellen reifen weiter aus und werden als naive B-Zellen ins Blut und in die sekundären lymphatischen Organe ausgeschwemmt, wo sie neben IgM nun auch das IgD Immunglobulin als BCR exprimieren können. Trifft die naive B-Zelle auf ihr passendes Antigen, bindet und internalisiert sie dieses. Bestimmte Antigene können durch die alleinige Bindung an den BCR eine Aktivierung der B-Zelle induzieren. In diesem Fall differenziert die naive B-Zelle zu einer Plasmazelle aus und produziert antigenspezifische IgM-Immunglobuline mit einer verhältnismäßig niedrigen Affinität. Es werden keine Gedächtniszellen gebildet (8). Ein weitaus effizienterer Weg ist die Aktivierung der B-Zelle mithilfe von T-Zellen, der sog. T-Zell-abhängige Weg. Nach Internalisierung werden bestimmte Epitope des Antigens auf der B-Zell-Oberfläche präsentiert und von einer T-Zelle, die dasselbe Antigen erkennen kann, gebunden. Diese Begegnung findet in einem sekundären lymphatischen Organ statt. Unter Einfluss der T-Zelle proliferieren die B-Zellen und durchlaufen einen Klassenwechsel sowie eine Affinitätsreifung. Der Klassenwechsel bewirkt, dass eine B-Zelle statt IgM- und IgD- nun entweder IgG-, IgE- oder IgA-Immunglobuline produziert. Diese „Immunglobulinklassen haben die gleiche Antigenespezifität, aber unterschiedliche Effektorfunktionen“ (8). Im Zuge der Affinitätsreifung, auch somatische Hypermutation genannt, entstehen durch Punktmutationen Immunglobuline mit einer noch höheren Affinität zum Antigen als der ursprüngliche BCR. Am Ende werden so hochspezifische B-Zellen gebildet, die nun entweder zu antikörperproduzierenden Plasmazellen oder zu Gedächtniszellen ausreifen können. Die Signale, die entscheiden, welche Richtung eine B-Zelle einschlägt, sind noch unbekannt. Plasmazellen sind in der Lage, große Mengen hochspezifischer monoklonaler Antikörper zu produzieren, die das Antigen neutralisieren

und die humorale Säule der Immunantwort bilden (1, 8). Sie entwickeln sich über das Zwischenstadium des Plasmablasten und können sich nicht mehr teilen (1, 9). Während die meisten Plasmazellen kurzlebig sind und nach der primären Immunantwort absterben, sind einige in der Lage, ins Knochenmark zu wandern und dort über lange Zeit hinweg weiterhin Antikörper zu produzieren. So wird dauerhaft ein spezifischer Antikörpertiter gegen den Krankheitserreger aufrechterhalten (8). Langlebige Gedächtnis-B-Zellen (mBCs) zirkulieren im Blut und in den sekundären lymphatischen Organen. Da sie den Klassenwechsel und die Affinitätsreifung bereits durchlaufen haben, können sie bei erneutem Kontakt mit ihrem Antigen eine wesentlich schnellere und effizientere Immunantwort auslösen, indem sie beispielsweise direkt zu Plasmazellen ausdifferenzieren und hochaffine Antikörper produzieren (1, 8). Diese Eigenschaft wird insbesondere bei Impfungen genutzt (siehe Kapitel 1.3).

Sollten doch einige autoreaktive B-Zellen den zentralen Toleranzmechanismen entkommen und das Knochenmark verlassen, gibt es in der Peripherie weitere Mechanismen zur Eliminierung dieser Zellen, die unter der sog. peripheren Toleranz zusammengefasst werden. So führt z.B. die kontinuierliche Autoantigenexposition zu einer verminderten Responsivität bzw. Anergie des BCR, wodurch die Aktivierung der B-Zelle ausbleibt (10).

### **1.2.2 B-Zell-Subpopulationen und ihre spezifischen Oberflächenmarker**

Je nach Entwicklungsstadium exprimieren B-Zellen unterschiedliche Oberflächenmarker, anhand derer sie phänotypisch unterschieden werden können. Bei den meisten Markern handelt es sich dabei um membranständige (Glyko-)Proteine, die mithilfe der CD (Cluster of Differentiation)-Klassifikation eingeteilt werden (11).

Ein Universalmarker für alle B-Zellen ist CD19, welches ab der frühen B-Zell-Entwicklung exprimiert und erst im Plasmazell-Stadium herunterreguliert wird (12). Ein weiterer Marker, der von allen Subpopulationen außer den Plasmazellen exprimiert wird, ist CD20 (13). Die Differenzierung einer naiven B-Zelle in eine Gedächtnis-B-Zelle bewirkt die Hochregulierung des Proteins CD27, das von Plasmablasten und Plasmazellen sogar noch stärker exprimiert wird (14). Daraus ergeben sich folgende Definitionsmöglichkeiten für die einzelnen Subpopulationen:  $CD19^+CD20^+CD27^-$  (naive B-Zellen),  $CD19^+CD20^+CD27^+$  (Gedächtnis-B-Zellen) und  $CD19^{low}CD20^{low}CD27^{high}$  (Plasmablasten/Plasmazellen). Zwei weitere Marker für frisch generierte Plasmablasten

sind CD38 und HLA-DR. Während CD38 bei Ausreifung zu Plasmazellen weiterhin exprimiert wird, wird HLA-DR im Verlauf herunterreguliert (14).

Schaut man sich die Expression der Immunglobuline an, so werden IgD und IgM vorrangig von naiven B-Zellen exprimiert (14). Gedächtnis-B-Zellen, die den Klassenwechsel noch nicht vollzogen haben, können ebenfalls IgD exprimieren (15). In den letzten Jahren wurde zudem eine weitere Population von B-Zellen beschrieben, die weder CD27 noch IgD exprimiert (IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>), doch aufgrund ihrer funktionellen Ähnlichkeit zu klassischen Gedächtnis-B-Zellen diesen zugeteilt wird (16). Somit ergeben sich drei Unterklassen von Gedächtnis-B-Zellen: IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> (nicht-klassengewechselt), IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> und IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> (klassengewechselt).

### **1.2.3 Veränderte B-Zell-Subpopulationen bei SLE- und RA-Patienten**

SLE- und RA-Patienten zeigen häufig eine veränderte Zusammensetzung der verschiedenen B-Zell-Subpopulationen, was deren pathophysiologische Involvierung im Entstehungsprozess von Autoimmunität verdeutlicht. So weisen SLE-Patienten z.B. häufig eine B-Lymphopenie auf (17). In einer 2007 von Wei et al. durchgeführten Studie, welche die sog. doppelt negativen (DN) Gedächtnis-B-Zellen (IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) untersuchte, zeigten SLE-Patienten mit durchschnittlich 19,4 % gegenüber 4,5 % aller B-Zellen bei Gesunden eine deutliche höhere Frequenz dieser Population auf (16). Auch andere Forschungsgruppen bestätigten dieses gesteigerte Vorkommen von sog. doppelt negativen Gedächtnis-B-Zellen bei SLE-Patienten (18, 19). Untersuchungen von klinisch aktiven vs. klinisch inaktiven SLE-Patienten offenbarten ein deutlich gesteigertes Vorkommen von Plasmablasten bzw. Plasmazellen im aktiven Schub, das nach einer immunsuppressiven Therapie deutlich zurückgeht (17).

Während mehrere Studien eine signifikante Verminderung nicht-klassengewechselter Gedächtnis-B-Zellen (IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) im Blut von RA-Patienten gegenüber Gesunden beobachteten (20-22), ist die Datenlage hinsichtlich der anderen B-Zell-Subpopulationen bei RA-Patienten sehr heterogen. Souto-Carneiro et al. konnten keinen Unterschied in der Gesamt-B-Zellzahl zwischen RA-Patienten und Gesunden feststellen (20), wohingegen Conigliaro et al. eine reduzierte Anzahl an B-Zellen bei RA-Patienten fanden, die sich nach der Therapie mit einem TNF- $\alpha$ -Blocker wieder normalisierte (23). Bezüglich der klassengewechselten mBCs, der Gesamt-mBCs, der naiven B-Zellen und Plasmablasten gibt es sowohl Berichte über verminderte Frequenzen bzw. absolute

Zahlen medikamentös therapierter RA-Patienten (24, 25) als auch solche, die keinen Unterschied zwischen RA-Patienten und Gesunden feststellen konnten (20, 21).

### **1.3 Die Rolle von Impfungen bei Gesunden und Autoimmunpatienten**

Impfungen zählen zu den wohl größten Errungenschaften der Medizin, da sie zum Schutz vor zahlreichen Infektionserkrankungen geführt haben. Das Prinzip der Impfung beruht darauf, dass dem Impfling attenuierte oder abgetötete Erreger bzw. Antigene appliziert werden, die eine primäre Immunantwort auslösen, ohne dass die Erkrankung selbst ausbricht. Bei Reexposition mit dem Erreger können die Akteure des immunologischen Gedächtnisses, z.B. langlebige Plasma- oder Gedächtniszellen, schnell aktiviert werden und so einen Krankheitsausbruch verhindern. Neben einer Grundimmunisierung, die standardmäßig in der Kindheit durchgeführt wird, sind bei einigen Erregern Auffrischimpfungen zur Gewährleistung eines ausreichenden Schutzes im Erwachsenenalter notwendig (8). Sowohl nach einer Primär- als auch nach einer Auffrischimpfung beobachtet man den Anstieg antigenspezifischer Plasmablasten und - etwas zeitversetzt - den Anstieg antigenspezifischer Gedächtnis-B-Zellen im Blut. Während antigenspezifische Plasmablasten ca. 10 bis 14 Tagen nach einer Primärimpfung ihren Höchstwert im Blut erreichen, ist der Gipfel nach einer Auffrischimpfung bereits nach ca. sieben Tagen erreicht und von größerem Ausmaß (26-28). Antigenspezifische Gedächtnis-B-Zellen verhalten sich ähnlich: Nach einer Primärimpfung erreichen sie nach ca. 18 bis 21 Tagen und nach einer Auffrischimpfung bereits nach ungefähr 14 Tagen ihren Maximalwert im Blut (27-29).

Das Infektionsrisiko ist bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen (AID-Patienten) einerseits durch die Erkrankung selbst und andererseits durch die Einnahme immunsuppressiver Medikamente stark erhöht. Folglich spielt die Infektionsprophylaxe mittels Impfung eine wichtige Rolle. Grundsätzlich gilt, dass im schubfreien Intervall geimpft werden sollte. Während Totimpfstoffe problemlos unter laufender immunsuppressiver Therapie verabreicht werden können, sollten Lebendimpfstoffe mindestens vier Wochen vor Beginn einer immunsuppressiven Therapie appliziert werden. Andernfalls besteht das Risiko, dass die Erreger, obgleich sie in abgeschwächter Form verabreicht werden, in den immunsupprimierten Individuen zum Ausbruch der Infektion führen (30). Trotz dieser ausdrücklichen Impfempfehlung sind jedoch viele AID-Patienten nicht ausreichend geimpft. Zum einen liegt dies an der geringen Überprüfung

des Impfstatus durch den behandelnden Arzt und zum anderen an der Sorge einer nicht ausreichenden Sicherheit des Impfstoffes, wodurch z.B. ein Krankheitsschub ausgelöst werden könnte (30, 31).

Tatsächlich werden Impfungen seit Langem als möglicher Auslöser einer Autoimmunerkrankung diskutiert. Grundlage hierfür sind einzelne Fallberichte, die über den Ausbruch einer AID nach Impfung berichten (32-34). Als mögliche Mechanismen werden unter anderem das molekulare Mimikry und die Bystander-Aktivierung aufgeführt. Molekulares Mimikry beschreibt die Ähnlichkeit körpereigener Antigene mit körperfremden (Impf-)Antigenen, die eine Aktivierung des Immunsystems gegen das entsprechende Autoantigen zur Folge hat. Die Theorie der Bystander-Aktivierung besagt, dass die Aktivierung des Immunsystems gegen ein körperfremdes (Impf-)Antigen zur gleichzeitigen Aktivierung des Immunsystems gegen Autoantigene führen kann (34, 35). Inwieweit diese Hypothesen jedoch stimmen und ob diese Mechanismen bei bereits diagnostizierten Patienten nach einer Impfung zum Schubausbruch führen könnten, ist nicht ausreichend erforscht.

## **1.4 Die Antigene Tetanustoxin, Ro52 und Pentraxin 3 und ihre Rolle beim SLE und der RA**

### **1.4.1 Tetanustoxin**

Das Tetanustoxin ist ein ubiquitär vorkommendes Neurotoxin, das vom Bakterium *Clostridium tetani* produziert wird und bei Aufnahme bereits sehr niedriger Konzentrationen zum Krankheitsbild des Tetanus, auch Wundstarrkrampf genannt, führt. Die Infektion mit dem Bakterium bzw. der Sporen erfolgt über „Hautabschürfungen, Wunden oder (bei Neugeborenen) über den Nabelstumpf“ (36). Nach Ausschüttung des Toxins gelangt dieses auf retrogradem Weg in die Motoneurone des zentralen Nervensystems, wo es die Freisetzung der inhibitorischen Transmitter Glycin und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) hemmt und so „zu einem erhöhten Muskeltonus und zu Muskelspasmen führt“ (37). Die Erkrankung kann sich entweder lokal oder generalisiert manifestieren. Bei der lokalisierten Form treten Muskelkrämpfe mit Beschränkung auf das Gebiet rund um die Eintrittspforte auf. Die generalisierte Form beginnt meist mit einer Kieferstarre und führt im Verlauf zu schmerzhaften Muskelkrämpfen im gesamten Körper. Die Beteiligung der Atem- und laryngealen Muskulatur erfordert häufig eine intensivmedizinische Behandlung mit Intubation und Beatmung, um eine



lebensbedrohliche Obstruktion der Atemwege sowie einen Atemstillstand abzuwenden. Die Diagnosestellung erfolgt klinisch und sollte durch ergänzende Laboruntersuchungen nicht verzögert werden. Therapeutisch wird ein Antitoxin, z.B. humanes TT-Immunglobulin, verabreicht, um noch im Blut zirkulierende Toxine zu neutralisieren. Des Weiteren werden ein Wunddébridement, eine Metronidazol-Gabe und unterstützende intensivmedizinische Maßnahmen durchgeführt (36). Trotz dieser Maßnahmen ist die Letalität mit ca. 10 bis 20 % sehr hoch (38), weshalb der Prävention mittels Impfung große Bedeutung zukommt. Zur Grundimmunisierung empfiehlt das Robert-Koch-Institut aktuell drei Impfdosen, die innerhalb des ersten Lebensjahres appliziert und durch zwei Auffrischimpfungen im Jugendlichenalter ergänzt werden. Ab dem 18. Lebensjahr sollte alle 10 Jahre eine Auffrischimpfung erfolgen, die im Idealfall als eine Zwei-, Drei- bzw. Vierfachimpfung zusammen mit einem Impfstoff gegen Diphtherie und bei Bedarf noch Pertussis und/oder Poliomyelitis durchgeführt wird. Geimpft wird ein Totimpfstoff, der eine inaktivierte Form des Tetanustoxins, das sog. Tetanustoxoid (TT), enthält (39). Für Patienten mit Autoimmunerkrankungen gelten die gleichen Impfempfehlungen wie für Gesunde (30).

#### **1.4.2 Ro52**

Ro52, auch TRIM21 oder SS-A 52 genannt, ist ein endogen vorkommendes 52 kDa (Kilodalton) Protein. Es zählt zur Familie der TRIM (tripartite motif family)-Proteine, die eine wichtige Rolle in der angeborenen und antiviralen Immunantwort spielen (40, 41). Untersuchungen im Mausmodell konnten ein fast ausschließliches Vorkommen des Ro52-Proteins in Immunzellen nachweisen (42). Als E3-Ubiquitin-Ligase katalysiert es die Übertragung des Proteins Ubiquitin auf andere Strukturen, beispielsweise auf verschiedene Interferon-Regulations-Faktoren (IRF) wie IRF3, IRF5, IRF7 oder IRF8 (42, 43). Während einige Studien in Folge eine verminderte Aktivität der IRF beobachten konnten, zeigten andere Studien das Gegenteil. In jedem Fall scheint das Ro52-Protein, dessen Expression selbst durch Typ I IFN gesteigert werden kann, in der Regulation der Interferonantwort involviert zu sein (40, 41).

Autoantikörper gegen das Ro52-Protein lassen sich bei vielen Autoimmunerkrankungen wie z.B. dem SLE oder dem primären Sjögren Syndrom (pSS) detektieren und werden zusammen mit den Antikörpern gegen das Ro60-Protein zu diagnostischen Zwecken bestimmt (44). Nichtsdestotrotz sind die Ursachen für diese pathologische AK-Bildung

sowie die Rolle des Ro52-Proteins und der Anti-Ro52-AK in der Entstehung von Autoimmunität weitestgehend unbekannt.

### **1.4.3 Pentraxin 3**

Pentraxin 3 (PTX3) ist ein Akute-Phase-Protein, das - genau wie das CRP - zur Familie der Pentraxine gehört. Anders als das CRP wird es bei Entzündung nicht nur in der Leber, sondern von verschiedenen Zelltypen im gesamten Körper, wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten oder Endothelzellen produziert und ausgeschüttet. Es spielt vor allem eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem. Aufgrund der sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Funktionen wird oft von der „Yin und Yang-Rolle“ des PTX3 gesprochen (45).

Erhöhte PTX3-Level lassen sich bei verschiedensten Krankheitsbildern wie kardiovaskulären, infektiösen oder autoimmunen Erkrankungen nachweisen (46). Beim SLE und der RA ist die Lage kontrovers. Mehrere Forschungsgruppen wiesen erhöhte PTX3-Werte im Serum von SLE- und RA-Patienten nach und schlugen das Protein aufgrund seiner Korrelation mit der Krankheitsaktivität als möglichen Aktivitätsmarker vor (46, 47). Andere Studien hingegen beobachteten vergleichbare oder erniedrigte Werte gegenüber Gesunden (47, 48). Analysen PTX3-spezifischer B-Zellen unserer Arbeitsgruppe ergaben erniedrigte Level im Blut von SLE-Patienten gegenüber Gesunden, wobei SLE-Patienten mit aktiver Lupusnephritis noch niedrigere Werte aufwiesen (49).

## **1.5 Zielsetzung**

Autoimmunpatienten sind aufgrund ihrer Erkrankung sowie der Einnahme von Immunsuppressiva einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt, weshalb dem Schutz vor Infektionskrankheiten mittels Impfung eine wichtige Bedeutung zukommt. Der Impferfolg hängt dabei maßgeblich von der Impfreaktion der B-Zellen ab, die für die Generierung antikörperproduzierender Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen verantwortlich sind. Zahlreiche Studien haben bereits die humorale Immunantwort impfpräventabler Antigene bei Autoimmunpatienten untersucht (50-53). Studien zur zellulären Immunantwort sind hingegen rar (54), sodass es ein Ziel dieser Arbeit war, B-Zellen bzw. B-Zell-Subpopulationen mit Spezifität für Impfantigene bei Autoimmunerkrankten zu analysieren.

In einer ersten Studie wurden antigenspezifische B-Zellen bei SLE- und RA-Patienten im sog. Steady State (Baseline/Grundzustand) untersucht und mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Als repräsentatives Impfantigen diente das Tetanustoxoid, mit dem fast alle Menschen in Form der Impfung bereits Kontakt hatten. Um mögliche Unterschiede in der B-Zellantwort zwischen Fremd- und Autoantigenen zu identifizieren, wurde parallel das Ro52-Autoantigen mitbestimmt.

Da polyreaktive Immunzellen, die den zentralen und peripheren Kontrollmechanismen des Immunsystems entkommen, als ein möglicher Faktor in der Pathophysiologie von Autoimmunerkrankungen diskutiert werden, wurde zudem exemplarisch untersucht, ob SLE- und RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden vermehrt B-Zellen exprimieren, die TT und Ro52 gleichzeitig binden und somit polyreaktiv sind.

In einer zweiten Studie wurden SLE- und RA-Patienten sowie Gesunde u.a. gegen Tetanus geimpft und ihre antigenspezifische B-Zellantwort im aktivierten Immunzustand gemessen. Zusätzlich zum TT- und Ro52-Antigen wurde hier das endogene PTX3-Antigen bestimmt. Ziel war neben der Beurteilung der unmittelbaren TT-spezifischen B-Zellantwort die Beurteilung einer impfgetriggerten (B-Zell-)Bystander-Aktivierung, die als möglicher (Schub-)Auslöser für Autoimmunerkrankungen debattiert wird.

Bei den Gesunden wurde nach Impfung insbesondere auf die Analyse der verschiedenen Gedächtnis-B-Zell-Subpopulationen fokussiert, da die Literatur zwar - anders als bei Autoimmunpatienten - zahlreiche Informationen zur zellulären Gedächtnis-B-Zellantwort der Gesamt-mBCs liefert, nicht jedoch zur Entwicklung der verschiedenen Gedächtnis-B-Zell-Untergruppen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Überblick

Für das Projekt wurde zum einen eine Steady State-Messung antigenspezifischer B-Zellen durchgeführt, zum anderen wurden Probanden u.a. gegen Tetanus geimpft und ihre antigenspezifische B-Zell-Impfreaktion an Tag 0 vor sowie an Tag 7 und Tag 14 nach Impfung gemessen. Als Antigene für die Baseline-Messung dienten TT und Ro52, während bei den geimpften Probanden zusätzlich noch PTX3 bestimmt wurde. Des Weiteren wurde bei allen Probanden eine absolute B-Zellzahlbestimmung, eine Erfassung der Typ I IFN Signatur mittels Siglec1-Messung und ein TT-ELISA durchgeführt. Die Erhebung der zellulären Daten erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Alle Untersuchungen erfolgten mit Zustimmung der Ethikkommission der Charité.

### 2.2 Material

#### 2.2.1 Geräte

Tabelle 2.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometer	BD FACS Canto II	BD Biosciences
Durchflusszytometer Software	BD Diva Software Version 6.1.3 BD FACS Canto Clinical Software	BD Biosciences
Zentrifuge	Centrifuge 5804R	Eppendorf AG
Zentrifuge	Heraeus Labofuge 400	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Mini centrifuge ROTILABO®	Carl ROTH
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
ELISA-Reader	ELISA-Reader Sunrise	Tecan Group Ltd.
Trockenschrank	-	Biometra
Diverse Pipetten 0,1 µl-1000 µl	-	Eppendorf AG, Sartorius AG
Multistepper	-	Eppendorf AG
Mehrkanal-Pipette	-	Biozym

## 2.2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Blutentnahme- Röhrchen	9 ml VACUETTE® EDTA	Greiner Bio-One GmbH
Blutentnahme- Röhrchen	5 ml VACUETTE® Serum	Greiner Bio-One GmbH
FACS Röhrchen	5 ml Rundboden-Röhrchen	BD Falcon
	15 ml Falcon-Röhrchen	BD Falcon
Pipettenspitzen	SafeSeal-Tips 2.5 µl -5000 µl	Biozym Scientific GmbH
Pipettenspitzen	ep.T.I.P.S. Reloads 20-200 µl	Eppendorf AG
Trucount-Röhrchen	BD Trucount™ Absolute Counting Tubes	BD Biosciences

## 2.2.3 Reagenzien

Tabelle 2.3 Reagenzien

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole	Invitrogen
Blocking Reagent	FCR Blocking Reagent Human	Miltenyi Biotec GmbH
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	autoMACS Rinsing Solution PBS mit EDTA	Miltenyi Biotec GmbH
BSA (Rinder Serum Albumin)	MACS® BSA Stock Solution	Miltenyi Biotec GmbH
Lysepuffer	FACS Lysing Solution	BD Biosciences
Lysepuffer	BD Pharm Lyse™	BD Biosciences
ELISA-Kit	Human Anti-Tetanus Toxoid IgG ELISA Assay Catalog# IM-217H	Xpress Bio
Destilliertes Wasser	Ampuwa 1000 ml Plastipur	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Tetanus-, Diphtherie-, Pertussis- (und Polio) Impfstoff	Boostrix (Polio)	EMRA-MED Arzneimittel GmbH
Shutdown Solution	BC FACS Shutdown Solution	BD Biosciences
Cleaning Solution	BD FACS Clean	BD Biosciences
Sheath Fluid	BD FACS Flow Sheath Fluid	BD Biosciences
CST Beads	BD Cytometer Setup & Tracking Beads	BD Biosciences
Rainbow Beads	Sphero Rainbow Calibration Particles (8 peaks)	BD Biosciences
Multi-ch-CD4 low control	-	BD Biosciences
Set Up beads 7-color	-	BD Biosciences

## 2.2.4 Antikörper und Antigene

**Tabelle 2.4 Fertiger Antikörpermix der TBNK-Messung**

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Hersteller
CD3	FITC	SK7	BD Biosciences
CD16	PE	B73	BD Biosciences
CD56	PE	NCAM16.2	BD Biosciences
CD45	PerCP-Cy5.5	2D1 (HLe-1)	BD Biosciences
CD4	PE-Cy7	SK3	BD Biosciences
CD19	APC	SJ25C1	BD Biosciences
CD8	APC-Cy7	SK1	BD Biosciences

**Tabelle 2.5 Antikörper der Siglec1-Färbung**

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Volumen (µl) auf 50 µl	Hersteller
CD19	PeCy7	SJ25C1	2	BD Biosciences
CD27	FITC	M-T271	2	BD Biosciences
CD14	APC-H7	MOP9	2	BD Biosciences
CD3	PacB	UCHT1	1	BD Biosciences
CD20	BV510	2H7	1	BioLegend
Siglec1	AF647 (APC)	7-239	1,5	BioLegend

**Tabelle 2.6 Antikörper zur Färbung antigenspezifischer Zellen**

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Volumen (µl) auf 100 µl	Hersteller
CD27	FITC	M-T271	5	BD Biosciences
CD19	PeCy7	SJ25C1	2	BD Biosciences
IgD	PerCp Cy5.5	IA6-2	1	BD Biosciences
CD3/ CD14	PacB	UCHT1/M5E2	1	BD Biosciences
CD20	BV510	2H7	2	BioLegend
CD38	APC-Cy7	HIT2	1	BioLegend
HLA-DR	APC-Cy7	L243	5	BioLegend
Anti- His	PE	GG11-8F3.5.1	7,5	Miltenyi Biotec

**Tabelle 2.7 Antigene zur Färbung antigenspezifischer Zellen**

Antigen	Fluorochrom	Volumen (µl) auf 100 µl	Hersteller
TT (Tetanustoxoid)	Cy5	0,6	Serum Institut Dänemark / DRFZ
TT	PE	0,54	Serum Institut Dänemark / DRFZ
TT	-	8 (100x)	Serum Institut Dänemark
Ro52	His	1	Orgentec
PTX3	PE	0,5	Padua / DRFZ

## 2.3 Methodik

### 2.3.1 Probandenauswahl und Krankheitsaktivitäts-Scores

Für die Baseline-Studie wurde peripher entnommenes EDTA-Blut und Serum von 11 SLE- und 12 RA-Patienten der ambulanten und stationären Rheumatologie der Charité untersucht und mit dem von 14 gesunden Probanden (HD) verglichen. Für die Impfstudie wurden jeweils drei SLE- und RA-Patienten sowie drei HD mit Boostrix® bzw. Boostrix Polio® (Kombi-Impfstoff: Tetanus, Diphtherie, Pertussis (und Poliomyelitis)) geimpft und ihre Impfantwort im Blut an Tag 0 vor sowie an Tag 7 und Tag 14 nach Impfung analysiert. Alle Impfungen erfolgten als Auffrischimpfung im Rahmen der aktuellen STIKO-(Ständige Impfkommision) Empfehlungen des Robert-Koch-Instituts (39). Zwei Probanden, ein HD und ein SLE-Patient, wurden in beide Studien integriert. Alle Probanden wurden ausführlich aufgeklärt und ihre schriftliche Zustimmung eingeholt. Alle Patienten erfüllten die in Kapitel 1.1.1 und Kapitel 1.1.2 beschriebenen ACR/EULAR Klassifikationskriterien zur Diagnosestellung des SLE bzw. der RA.

Zur Bestimmung der Krankheitsaktivität wurde für die SLE-Patienten der SLE Disease Activity Index (SLEDAI) und für die RA-Patienten der Disease Activity Score 28 (DAS28) berechnet. Der SLEDAI berücksichtigt 24 klinische und laborchemische Parameter, die unterschiedlich stark gewichtet sind, sodass je nach Parameter maximal 1, 2, 4 oder 8 Punkte vergeben werden können. Die maximale Punktzahl beträgt 105 (55). Hat ein SLE-Patient einen klinischen SLEDAI-Score (ohne serologische Berücksichtigung) von 0, befindet er sich in Remission. Ein Score von 1-5 entspricht einer milden, ein Score von 6-10 einer moderaten, ein Score von 11-19 einer hohen und ein von Score von über 20

einer sehr hohen Krankheitsaktivität (56). Zur schnelleren Beurteilung werden Patienten oft in klinisch aktiv (SLEDAI  $\geq 6$ ) vs. klinisch inaktiv (SLEDAI  $< 6$ ) geteilt (57).

In den DAS28-Krankheitsscore für Patienten mit RA fließen neben der Beurteilung von Schwellung und Druckschmerzhaftigkeit von 28 Gelenken ein aktueller CRP (C-reaktives Protein)- oder BSG (Blutsenkungsgeschwindigkeit)-Wert sowie die subjektive Einschätzung der Krankheitsaktivität durch den Patienten in die Berechnung mit ein. Für letzteres wird die numerische Analogskala mit einer Spannbreite von 0 bis 100 eingesetzt, wobei 0 gar keine und 100 sehr starke Beschwerden bedeuten. Die vier Variablen werden anschließend in die folgende Formel eingegeben und der DAS28 wird ermittelt (58):

$$\text{DAS28} = \left(0,56 \times \sqrt{\text{TJC28}}\right) + \left(0,28 \times \sqrt{\text{SJC28}}\right) + 0,7 \ln(\text{ESR}) \times 1,07 + 0,14 \times \text{PGA}$$

TJC = Tender Joint Count = druckschmerzhaftige Gelenke, SJC = Swollen Joint Count = geschwollene Gelenke, ESR = BSG = Blutsenkungsgeschwindigkeit, PGA = Patient Global Assessment = subjektive Krankheitseinschätzung; Formel kopiert aus Carpenter L et al.: Validation of methods for converting the original Disease Activity Score (DAS) to the DAS28. *Rheumatology international*. 2018;38(12):2297-305 (58)

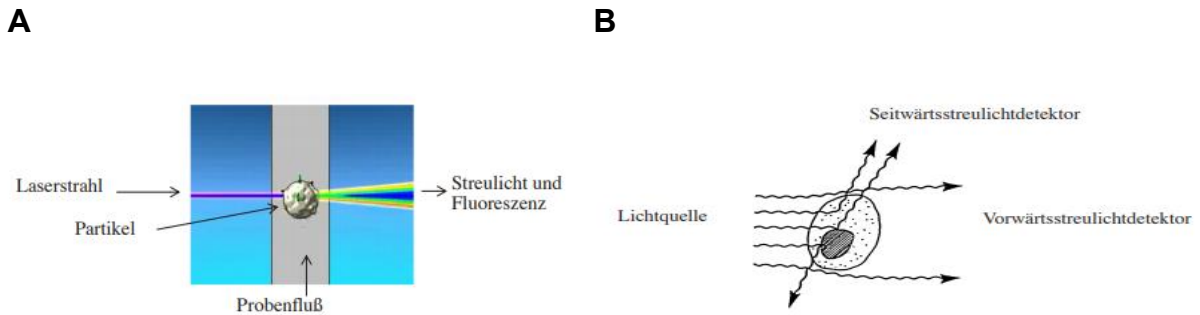
Ein Wert von unter 2,6 bedeutet, dass sich der Patient aktuell in klinischer Remission befindet. Ein Wert von 2,6 bis 3,2 bedeutet eine niedrige, ein Wert von über 3,2 bis 5,1 eine moderate und ein Wert von über 5,1 eine hohe Krankheitsaktivität (59).

### 2.3.2 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Da ein Großteil der Daten mittels Durchflusszytometrie erhoben wurde, erfolgt im Folgenden eine kurze Erläuterung des Untersuchungsprinzips. Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Zellen bzw. Zellpopulationen, die auf dem Einsatz von Lasern beruht. Die Zellen einer Zellsuspension passieren einzeln einen orthogonal zum Zellfluss positionierten Laserstrahl, der dadurch gestreut wird (Abbildung 2.1 A). Streulicht, das eng zum Laserstrahl verläuft, wird als Vorwärtsstreulicht (forward scatter = FSC) bezeichnet und gibt Aufschluss über die Größe einer Zelle. Streulicht, das senkrecht zum Laserstrahl verläuft, wird als Seitwärtsstreulicht (side scatter = SSC) bezeichnet und lässt auf die Granularität der Zelle schließen (Abbildung 2.1 B) (60).

Zur weiteren Charakterisierung einer Zelle können mehrere Laser unterschiedlicher Wellenlänge gleichzeitig eingesetzt sowie bestimmte oberflächliche oder intrazelluläre Zellbestandteile mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert werden. Passieren fluoreszenzmarkierte Zellen einen Laserstrahl, der ihrem Absorptionsspektrum

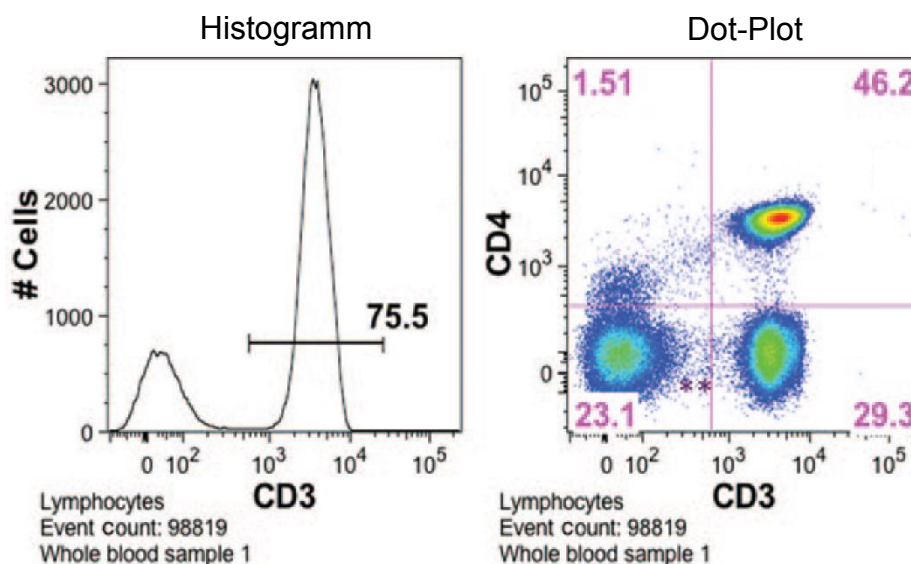




**Abbildung 2.1 Prinzip der Durchflusszytometrie** , **A:** Eine Zelle passiert einzeln einen senkrecht zum Zellfluss positionierten Laserstrahl, der dadurch gestreut wird. **B:** Merkmale der Lichtstreuung einer Zelle; kopiert und adaptiert aus BD Biosciences: Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung. 2014, abgerufen am 05/12/2020; <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=31055>. (60).

entspricht, werden die Fluorochrome angeregt und emittieren je nach spezifischem Emissionsspektrum Licht, dessen Intensität durch einen Detektor registriert wird und mit der Menge des gebundenen Antikörpers korreliert. So kann durch die gleichzeitige Färbung von Zellen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen und dem Einsatz entsprechender Laserstrahlen aus einer einzigen Messung ein hoher Informationsgehalt über eine einzelne Zelle gewonnen werden (60).

Die Darstellung der Zellaufnahmen erfolgt entweder in Form von Histogrammen oder in Form der Punktwolkendarstellung, auch Dot-Plot genannt (Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2 Grafische Darstellungen der Durchflusszytometriedaten.** Links Darstellung der Daten in Form eines Histogramms und rechts Darstellung der Daten als Dot-Plot (Punktwolkendarstellung); kopiert und adaptiert aus Jahan-Tigh R. R. et al.: Flow cytometry. The Journal of investigative dermatology. 2012;132(10):1-6.(61).

Histogramme geben die Häufigkeitsverteilung eines einzelnen Messparameters wieder. Dafür wird in einem Koordinatensystem, auch Gate genannt, auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität des Messparameters und auf der y-Achse die Anzahl der Zellen aufgetragen. Dot-Plots hingegen ermöglichen die gleichzeitige Darstellung zweier Messparameter. Eine Zelle wird entsprechend ihrer x (erster Messparameter)- und y (zweiter Messparameter)-Signalintensitäten in einem Gate dargestellt. Ein einzelner Punkt entspricht dabei einer Zelle. Der Vorgang der Zellauswertung wird als „Gating“ bezeichnet (60).

Das hier verwendete BD FACS Canto II Durchflusszytometer verfügt über drei Laser. Zur Gewährleistung stabiler Messwerte über einen langen Zeitraum wurden entsprechende Qualitätskontrollen nach GLP (gute Laborpraxis)-Erfordernissen durchgeführt.

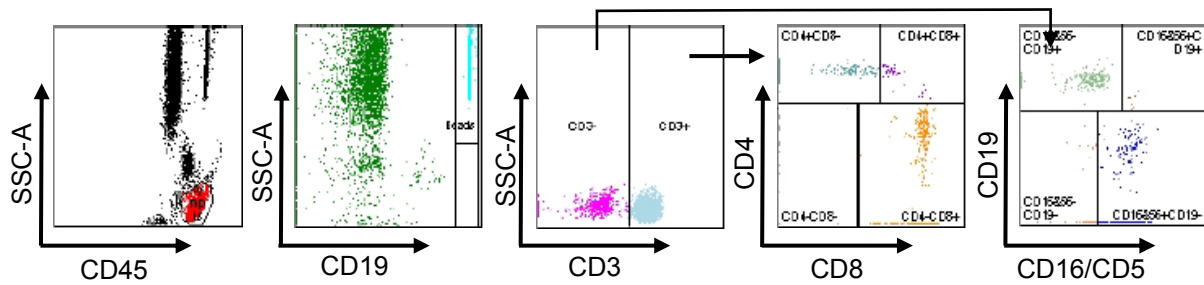
### 2.3.3 Absolute B-Zellzahlbestimmung / „TBNK“-Messung

Die absolute B-Zellzahlbestimmung (Zellen/ $\mu$ l) bzw. „TBNK“-Messung (T-Zell, B-Zell, Natürliche Killerzellen (NK)-Messung) erfolgte mithilfe der Trucount-Methode nach Anleitung des Herstellers (62). Hierzu wurden 20  $\mu$ l des in Tabelle 2.4 aufgelisteten fertigen Antikörper-Mix auf das Gitter eines Trucount-Röhrchens pipettiert, auf dessen Boden sich ein gefriergetrocknetes Pellet befand. Das Pellet bestand aus fluoreszierenden Kügelchen, den sog. „Beads“. Durch Zugabe des Antikörper-Mix löste sich das Pellet auf und die fluoreszierenden Beads wurden freigesetzt. Anschließend wurden 50  $\mu$ l Vollblut hinzugegeben. Das Gemisch wurde gevortext und für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde es mit 450  $\mu$ l BD FACS Lyse-Lösung zur Lyse der Erythrozyten versetzt und erneut gevortext. Nach einer zweiten Inkubation unter gleichen Bedingungen wurden die Proben durchflusszytometrisch bestimmt. Zur Ermittlung der absoluten Zahl der B-Lymphozyten bzw. der anderen Zellpopulationen wurde die Anzahl der zellulären Ereignisse mit den Beads (Mikropartikelereignissen) unter Hinzuziehung folgender Gleichung durch das Durchflusszytometer bzw. die zugehörige Software verglichen:

$$\frac{\text{Anz. Ereignisse in Zellpopulationen}}{\text{Anz. Ereignisse in Mikropartikelregion des Absolutwerts}} \times \frac{\text{Anz. Mikropartikel}^*}{\text{Test}} \cdot \frac{\text{Testvolumen}}{\text{Testvolumen}} = \text{Absolutwert Zellpopulation}$$

Anz. = Anzahl; \*dieser Wert ist auf dem Folienbeutel des BD Trucount Tube angegeben und kann von Charge zu Charge variieren; Formel kopiert aus Becton, Dickinson and Company BD Biosciences: BD Multitest™ 6-Color TBNK. Becton, Dickinson and Company BD Biosciences; 2018. (62)

Die automatisch-generierte Gating-Strategie der TBNK-Messung ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

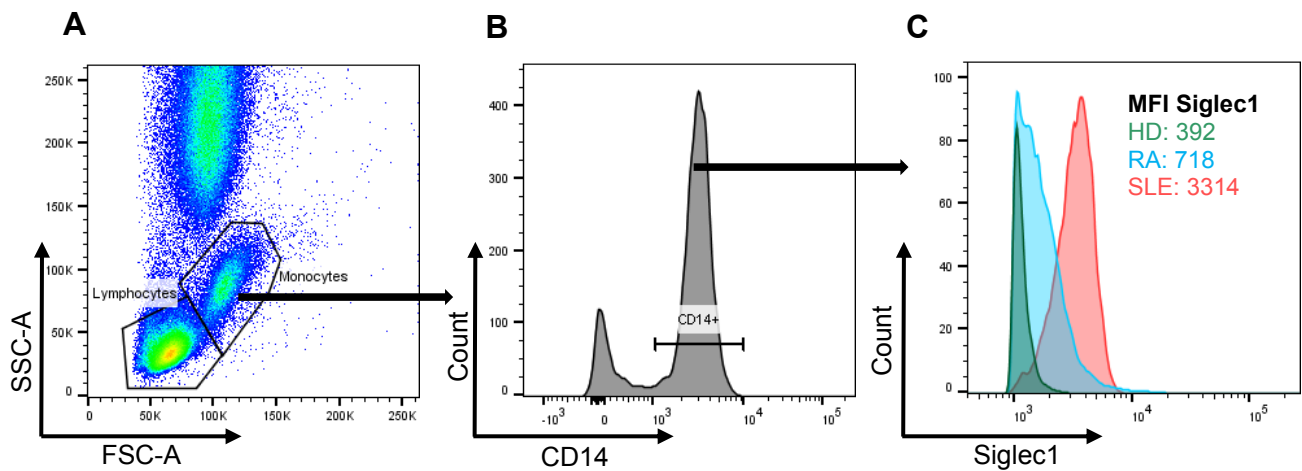


**Abbildung 2.3. Gating-Strategie der TBNK-Färbung.** Mithilfe des Stainings können die prozentualen und absoluten Anteile der B-Zellen (CD19<sup>+</sup> Zellen), der T-Zellen (CD3<sup>+</sup> Zellen) und der NK-Zellen (CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) berechnet werden. Die T-Zellen können weiter in T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) und in zytotoxische T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) unterteilt werden. Der große Pfeil zeigt die Gating-Strategie der B-Zellen an.

### 2.3.4 Siglec1-Nachweis als Marker der Typ I IFN Signatur

Zur weiteren Beurteilung der Krankheitsaktivität erfolgte neben der Erhebung des SLEDAI und des DAS28 eine Siglec1-Messung. Siglec1, auch CD169 genannt, ist ein Oberflächenprotein, das auf CD14<sup>+</sup>-Monozyten unter dem Einfluss von Typ I IFN exprimiert wird (4).

200 µl Vollblut wurden mit 2 ml BD Pharm Lyse gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur in der Dunkelheit lysiert. Nach Zentrifugation bei 330 g bei Raumtemperatur und Entsorgung des Überstandes wurden die Zellen gewaschen. Dazu wurde die Zellsuspension mit 2 ml PBE (0,5 % BSA + PBS 2mM EDTA) versetzt, gevortext und bei 4°C bei 330 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und der Vorgang ein zweites Mal wiederholt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension im Rücklauf resuspendiert und 50 µl wurden in ein neues Röhrchen überführt. Zur Vermeidung unspezifischer FcR-Bindung wurde ein FcR-Rezeptor-Blocker im Verhältnis 1:20 hinzugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur mit den Zellen inkubiert. Als nächstes wurden die in Tabelle 2.5 enthaltenen Antikörper zur Färbung hinzugegeben. Nach einer Färbezeit von 15 min bei 4°C wurde die Zellsuspension erneut gewaschen, mit 1 µl DAPI (Endkonzentration 300 nM) zum Ausschluss toter Zellen versetzt und anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Bestimmt wurde der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) von Siglec1, welcher in Abbildung 2.4 exemplarisch für einen SLE- und RA-Patienten sowie einen HD dargestellt ist. Siglec1-Positivität wurde nach interner Validierung bei einer MFI von > 500 festgelegt.



**Abbildung 2.4 Gating-Strategie der Siglec1-Messung** **A:** Darstellung aller vom Durchflusszytometer erfassten Ereignisse nach Größe (= FSC = forward scatter) und Granularität (= SSC = side scatter). Die Monozyten (oben) sind schwarz eingrahmt. **B:** Identifikation der CD14<sup>+</sup>-Monozyten im Histogramm **C:** Beispielhafter Vergleich der Siglec1 Expression eines HD (grün) sowie eines SLE- (rot) und eines RA-Patienten (blau). Die Intensitätsbestimmung erfolgt mithilfe der MFI (= median fluorescence intensity). Eine Siglec1-MFI von >500 wird als positiv angesehen; HD = healthy donor, RA = rheumatoide Arthritis, SLE = systemischer Lupus erythematoses

### 2.3.5 Färbung antigenspezifischer B-Zellen

Das Protokoll zur Färbung der antigenspezifischen Zellen folgt im Grundprinzip dem der Siglec1-Färbung.

Für die Baseline-Messung wurden pro Proband zwei Färbungen durchgeführt: eine TT-Cy5/Ro52-PE-Doppelfärbung jeweils mit und ohne TT-Block. Für das Impfprojekt wurden pro Spender zusätzlich eine TT-Cy5/TT-PE-Doppelfärbung mit und ohne Block sowie eine TT-Cy5/PTX3-PE-Doppelfärbung durchgeführt.

Pro Probe wurden 1 ml EDTA-Vollblut mit 10 ml BD Pharm Lyse Lösung versetzt, gevortext und 15 min bei Raumtemperatur in der Dunkelheit lysiert. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand entnommen und die verbliebenen Zellen zweimal gewaschen. 100 µl (Impfkohorte) bzw. 150 µl (Basis-Kohorte) von jeder Probe wurden in ein neues Röhrchen überführt und mit einem FcR-Rezeptor Blocker zur Vermeidung unspezifischer FcR-Bindung versetzt. Bei den TT-Block-Färbungen wurden nur jeweils 92 µl bzw. 138 µl der Zellsuspension in ein neues Röhrchen überführt und das Gemisch vor Hinzugabe des FcR-Rezeptor-Blockers mit unkonjugiertem TT in 100-facher Menge zur Prüfung der Spezifität aufgefüllt. Im Anschluss wurden die Zellen mit den in Tabelle 2.6 gelisteten Antikörpern und den im Folgenden aufgelisteten Antigenen (siehe auch Tabelle 2.7) für 15 min bei 4°C gefärbt:

Färbung	Cy5 (APC-Kanal)	PE
TT-Doppelfärbung	TT	TT
TT/Ro52-Färbung	TT	Ro52-His
TT/PTX3-Färbung	TT	PTX3

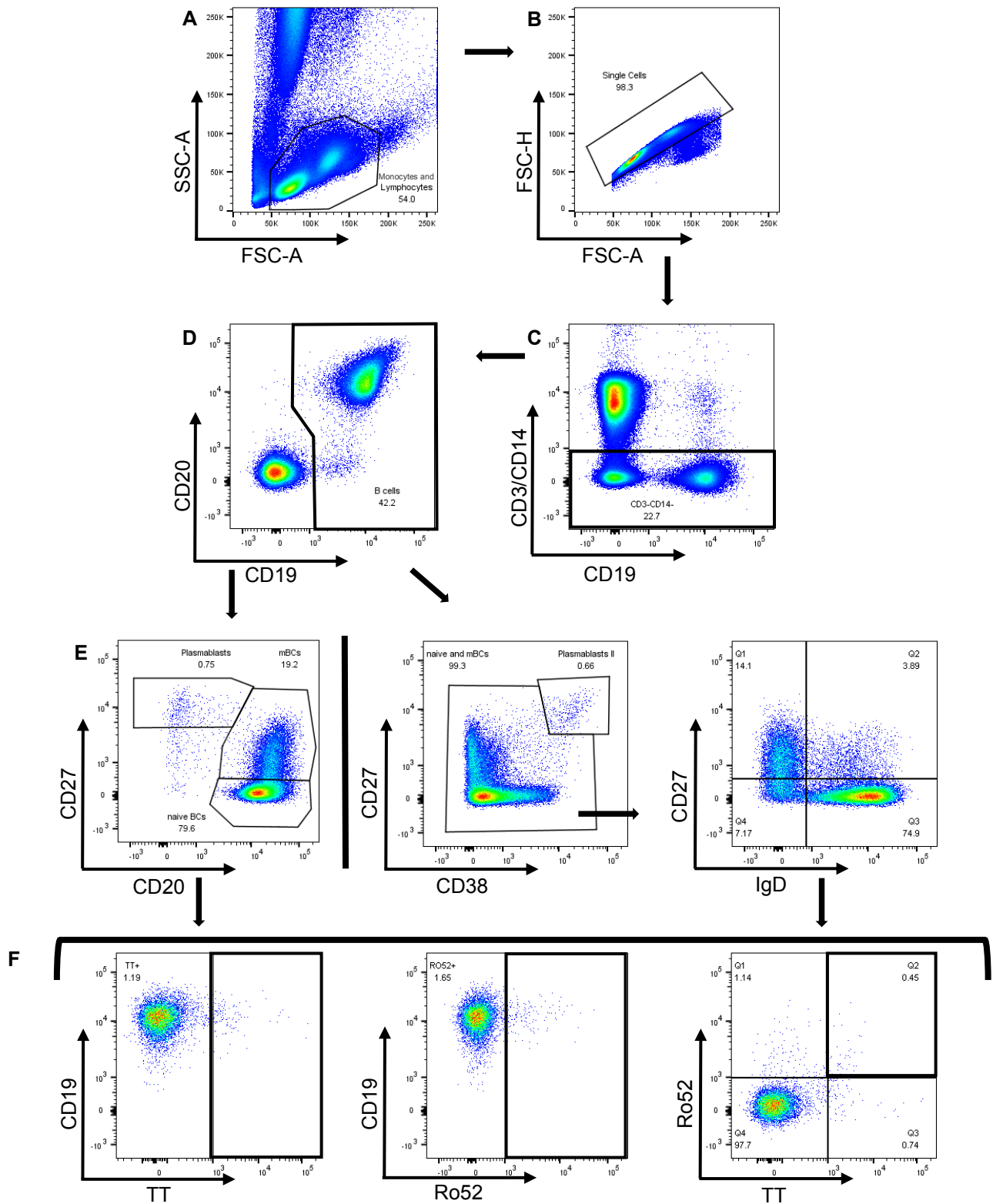
Die Färbung von Ro52 erfolgte hierbei - anders als bei den anderen Antigenen - mittels „Sandwich“-Technik. Dazu wurden die Zellen in einem ersten Färbevorgang mit nicht-fluoreszierendem His-konjugiertem Ro52 Antigen markiert. Nach anschließendem Waschen wurde in einem unter gleichen Bedingungen stattfindenden zweiten Färbevorgang ein mit PE-konjugierter anti-His-Antikörper hinzugegeben. In der Impfkohorte wurde statt APC-Cy7-konjugiertem-anti-CD38 APC-Cy7-konjugiertes-anti-HLA-DR hinzugegeben.

Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen gewaschen, filtriert und mit DAPI zum Ausschluss toter Zellen versetzt. Die Gating-Strategien zur Bestimmung der antigenspezifischen Zellen sind in Abbildung 2.5 (Baseline-Messung) und Abbildung 2.6 (Messung nach Impfung) dargestellt.

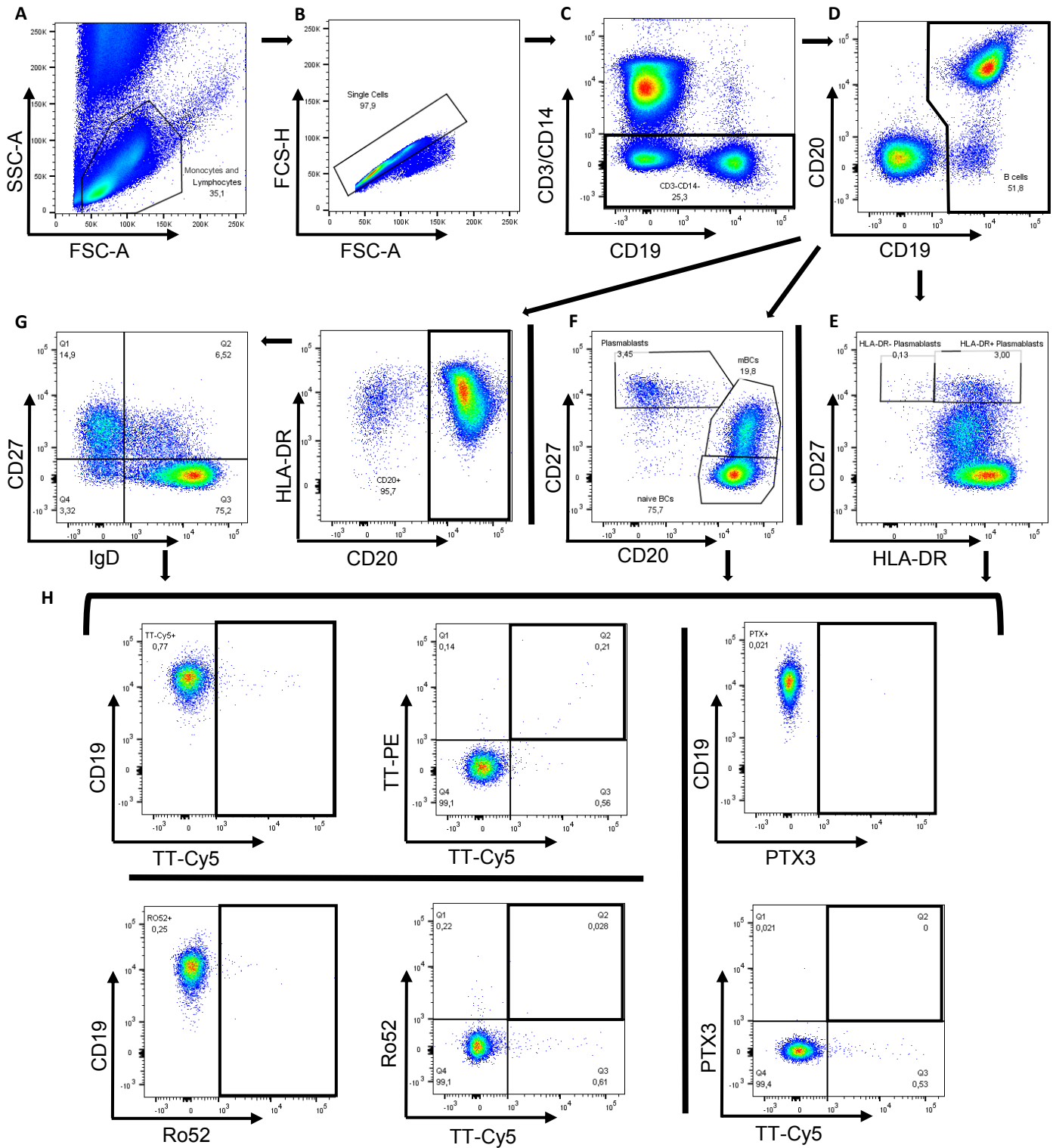
### 2.3.6 ELISA zur TT-Titerbestimmung

Neben der Untersuchung der zellulären Immunantwort erfolgte eine Analyse der humoralen Immunantwort mittels TT-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Der ELISA ist eine antikörperbasierte Methode zum Nachweis verschiedener Strukturen wie z.B. Antikörpern, Hormonen oder Peptiden (63).

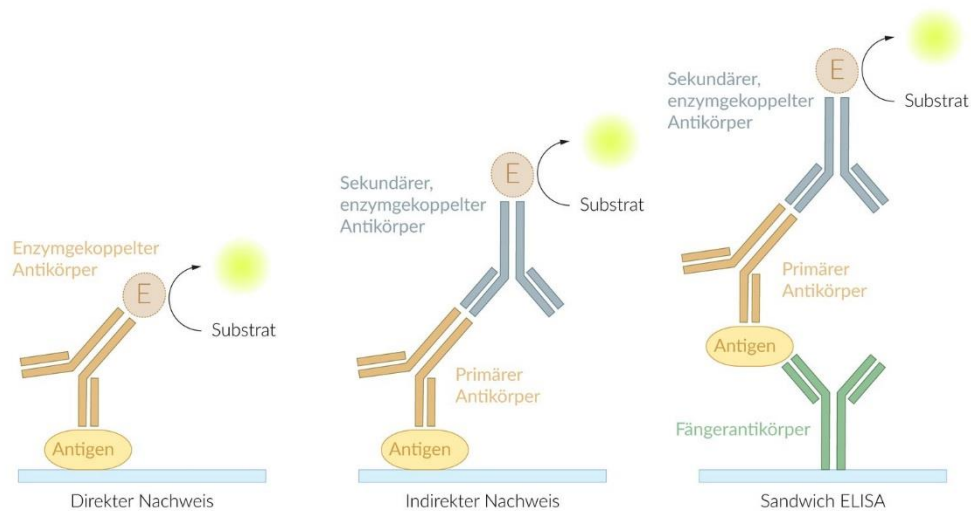
Man unterscheidet zwischen einer direkten und indirekten Nachweismethode sowie dem Sandwich-ELISA (Abbildung 2.7). Bei den ersteren zwei Methoden bindet ein enzymgekoppelter primärer Detektionsantikörper (direkter Nachweis) bzw. ein enzymgekoppelter sekundärer Detektionsantikörper (indirekter Nachweis) an ein fixiertes Antigen. Durch Hinzugabe eines Substrates, das durch das Enzym umgesetzt wird, kommt es zu einem Farbumschlag, dessen Intensität proportional zur Antigen- bzw. beim indirekten Nachweis auch proportional zur Primärantikörpermenge ist. Beim Sandwich-ELISA bindet das zu bestimmende Antigen an einen fixierten Fängerantikörper. Ein weiterer enzymgekoppelter Detektionsantikörper sowie ein Substrat werden hinzugefügt, sodass es durch Umsetzung des Substrats zum Farbumschlag kommt.



**Abbildung 2.5 Gating-Strategie der Baseline-Studie zur quantitativen Bestimmung der antigenspezifischen B-Zellen.** Zunächst erfolgt die Darstellung aller vom Durchflusszytometer erfassten Ereignisse nach Größe (= FSC = forward scatter) und Granularität (= SSC = side scatter) mit Extraktion der Lymphozyten und Monozyten (A). Nach Ausschluss der Dupletten (B) sowie der CD3/CD14 positiven Zellen (C) werden die B-Zellen (D) extrahiert. Es erfolgt eine weitere Unterteilung der B-Zellen in die verschiedenen Subpopulationen- rechts die Einteilung nach IgD und CD27 nach Ausschluss der Plasmablasten und links die Einteilung nach CD20 und CD27 (E). Als letztes werden die antigenspezifischen B-Zellen, sortiert nach TT (= Tetanustoxoid), Ro52 und TT/Ro52 dargestellt (F). Die Auswertung der antigenspezifischen Zellen erfolgt dabei für alle davor bestimmten B-Zell-Subpopulationen.



**Abbildung 2.6 Gating-Strategie der Impfstudie an Tag 0 vor sowie an Tag 7 und Tag 14 nach Boostrix®-Impfung.** Zunächst erfolgt die Darstellung aller vom Durchflusszytometer erfassten Ereignisse nach Größe (= FSC = forward scatter) und Granularität (= SSC = side scatter) mit Extraktion der Lymphozyten und Monozyten (A). Nach Ausschluss der Dupletten (B) sowie der CD3/CD14 positiven Zellen (C) werden die B-Zellen (D) extrahiert. Es erfolgt eine weitere Unterteilung der Plasmablasten nach HLA-DR (E), eine Unterteilung aller B-Zell-Subpopulationen nach CD20 und CD27 (F) und eine Unterteilung der B-Zellen nach IgD und CD27 nach Ausschluss der Plasmablasten (G). Als letztes werden die antigenspezifischen B-Zellen – TT-Cy5, Ro52, PTX3, TT-Cy5/TT-PE, TT/Ro52 und TT/PTX3 - dargestellt (H). Die Auswertung der antigenspezifischen Zellen erfolgt dabei für alle davor bestimmten B-Zellsubpopulationen. TT = Tetanustoxoid, PTX3 = Pentraxin 3

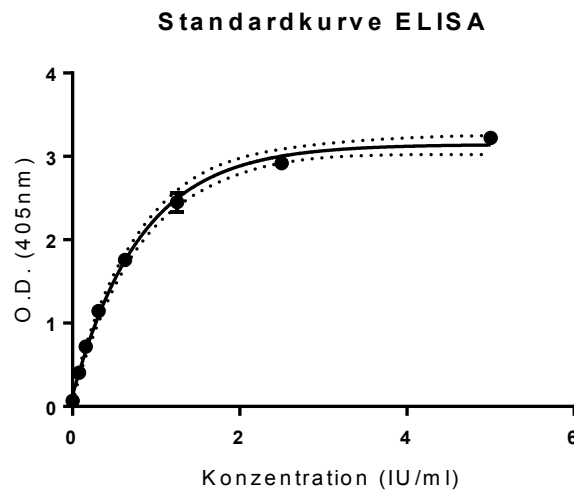


**Abbildung 2.7 Darstellung der drei ELISA-Verfahren.** Kopiert aus AMBOSS GmbH, ELISA (enzym-linked immunosorbent assay), Kapitel: Biochemische Labormethoden, abgerufen am 05/12/2020; [https://www.amboss.com/de/wissen/Biochemische\\_Labormethoden](https://www.amboss.com/de/wissen/Biochemische_Labormethoden) (64)

Alternativ kann auch hier wie beim indirekten ELISA der Nachweis der bindenden Antikörper über zwei Detektionsantikörper erfolgen. Zur quantitativen Bestimmung des Antigens/Antikörpers werden parallel zu den zu untersuchenden Proben einige Standardproben angesetzt, deren Konzentration bekannt ist. Nach Messung der optischen Dichte (O.D.) dieser Standardproben kann aus diesem Wert zusammen mit der bekannten Konzentration eine Kalibrierungskurve erstellt werden, anhand derer die Konzentrationen für die zu untersuchenden Proben abgelesen werden können (63, 65). Für den Nachweis der TT-Antikörper wurde ein indirekter ELISA nach Anleitung des Herstellers durchgeführt (66). Die Probanden-Seren, die bis zur Analyse bei  $-21^{\circ}\text{C}$  gelagert waren, wurden auf Raumtemperatur aufgetaut und anschließend verdünnt auf eine mit TT beschichtete Platte aufgetragen. Parallel dazu wurden die Standardproben angesetzt. Alle Proben wurden doppelt bestimmt. Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurde die Platte mit einer Waschlösung fünfmal gewaschen, um überschüssiges nicht bindendes Material zu entfernen. Ein mit Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierter humaner IgG-Antikörper wurde als sekundärer Detektionsantikörper hinzugegeben und die Proben wurden erneut für 45 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde 2,2'-Azino-di [3-Ethyl-Benzthiazolin-Sulfonat] (ABTS) als Substrat hinzugefügt und die Proben wurden für 30 min bei Raumtemperatur in der Dunkelheit gelagert. Es wurde eine Lösung zum Stoppen der Reaktion hinzugegeben,



bevor die optische Dichte der Proben mithilfe eines Mikroplatten-Readers bei 405 nm ausgelesen und in die entsprechende Konzentration umgerechnet wurde. Abbildung 2.8 stellt beispielhaft eine von drei erstellten Kalibrierungskurven dar. Aufgrund der Doppelbestimmungen und der für einige Proben unterschiedlich angesetzten Verdünnungsstufen wurden insgesamt drei ELISA-Platten verwendet.



**Abbildung 2.8 Darstellung der Standardkurve des TT-IgG-ELISA.** nm = Nanometer, IU = International Units, ml = Milliliter

### 2.3.7 Statistische Analyse und Datenvisualisierung

Die Auswertung der Daten, einschließlich der Statistiken und graphischen Darstellungen, erfolgte mithilfe der FlowJo Software 10, der GraphPad Prism Software 7 sowie den Microsoft-Programmen Excel und Word. Für die durchflusszytometrisch erhobenen Daten wurden die relative (%) und absolute (n, Zellen/ $\mu$ l, Zellen/ml) Häufigkeit berechnet. Der nicht-gepaarte nicht-parametrische Mann-Whitney-U Test wurde verwendet, um die entsprechenden Parameter zwischen den Gruppen HD vs. SLE, HD vs. RA und SLE vs. RA miteinander zu vergleichen. Der gepaarte nicht-parametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde verwendet, um jeden einzelnen Spender vor und nach dem TT-Block zu vergleichen. Zur Berechnung der Korrelationen wurde der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient benutzt. Statistische Signifikanz wurde in allen Untersuchungen bei einem p-Wert von  $p < 0,05$  (\*) angenommen. War der p-Wert kleiner als 0,01, erfolgte die Darstellung mit zwei (\*\*), bei p kleiner als 0,001 mit drei (\*\*\*) und bei p kleiner als 0,0001 mit vier (\*\*\*\*) Sternen. Die Ergebnisse der gesunden Spender sind

in den folgenden Graphen jeweils in grün, die der SLE-Patienten in rot und die der RA-Patienten in blau dargestellt.

## 3 Ergebnisse

Das Hauptaugenmerk dieser Dissertation lag auf der Untersuchung antigenspezifischer B-Zellen im Blut von Autoimmunerkrankten. Als repräsentative Autoimmunerkrankungen dienten der systemische Lupus erythematodes und die rheumatoide Arthritis. Als repräsentative Antigene wurden das TT-Impfantigen sowie die Autoantigene Ro52 und PTX3 ausgewählt.

### 3.1 Patientencharakteristika

Insgesamt wurden 11 SLE-Patienten (64 % weiblich), 12-RA-Patienten (davon 83 % weiblich) und 14 (93 % weiblich) gesunde Spender in die Baseline-Untersuchungen eingeschlossen. Der Altersmedian der SLE-Kohorte lag bei  $49\pm 16$  (Median $\pm$ Standardabweichung), der der RA-Kohorte bei  $61\pm 11$  und der der gesunden Spender bei  $32\pm 11$  Jahren. Der Großteil der SLE-Patienten wies eine Krankheitsaktivität von  $< 6$  (SLEDAI) auf und war somit zum Zeitpunkt der Messung klinisch inaktiv. Dennoch waren bis auf eine Patientin alle SLE-Patienten mit ANA (Normbereich Titer  $< 1:160$ ) und/oder dsDNA-AK (Normbereich  $< 20$  U/ml) serologisch aktiv. Vier der SLE-Patienten hatten zusätzlich Anti-Ro-AK. Bei den RA-Patienten lag der Median der Krankheitsaktivität bei 2,43 (DAS28). Sieben der Patienten befanden sich in klinischer Remission, vier wiesen eine moderate und ein Patient eine hohe Krankheitsaktivität auf. Zehn der Patienten waren entweder RF und/oder ACPA (Normbereich für beide AK  $< 20$  U/ml) positiv.

Von den neun Probanden der Impfstudie waren ein gesunder Proband und ein SLE-Patient männlich, alle anderen Studienteilnehmer waren weiblich. Der Altersmedian der drei geimpften SLE-Probanden lag bei  $37\pm 7$ , der der RA-Patienten bei  $57\pm 20$  und der der gesunden Spender bei  $30\pm 8$  Jahren. Bei den SLE-Patienten lag zum Zeitpunkt der Impfung kein Krankheitsschub vor, während bei den RA-Patienten eine Patientin eine milde und die anderen beiden eine moderate Krankheitsaktivität aufwiesen. Alle SLE-Patienten waren ANA und dsDNA-AK positiv, während alle RA-Patienten ACPA positiv und eine RA-Patientin auch RF positiv war.

Bis auf eine SLE-Patientin aus der Impfstudie nahmen alle Patienten beider Studien mindestens ein Immunsuppressivum ein, wobei Prednisolon unterhalb der Cushing-Schwellendosis ( $\leq 7,5$  mg) das am häufigsten eingenommene Medikament war.

Tabelle 3.1. Probandencharakteristika der Baseline-Kohorte

Parameter	HD	SLE	RA
<b>Demographische Daten</b>			
Fallzahl n	14	11	12
Geschlecht w/m, n (%)	13/1 (93/7)	7/4 (64/36)	10/2 (83/17)
Medianalter in Jahren , SD	32±11	49±16	61±11
<b>Letzte Tetanus-Impfung*</b>			
≤ 10 Jahren, n (%)	12 (86)	7 (70)	10 (91)
> 10 Jahren, n (%)	2 (14)	3 (30)	1 (9)
<b>Therapie</b>			
Prednisolon ≤ 7,5 mg, n (%)	-	6 (55)	7 (58)
> 7,5 mg, n (%)	-	3 (27)	-
HCQ, n (%)	-	3 (27)	-
AZA, n (%)	-	3 (27)	-
MMF, n (%)	-	1 (9)	-
Mycophenolat-Natrium, n (%)	-	1 (9)	-
Rituximab < 6 Monate , n (%)	-	1 (9)	-
MTX, n (%)	-	-	6 (50)
LEF, n (%)	-	-	2 (17)
Etanercept, n (%)	-	-	4 (33)
Baricitinib, n (%)	-	-	1 (8)
Tocilizumab, n (%)	-	-	2 (17)
<b>Laborparameter</b>			
Mediane BC Zahl/µl	204±80	67±114	94±91
Mediane Siglec1-MFI	328±137	488±1517	388±546
ANA, n (%)	-	10 (91)	4 (33)
ENA, n (%)	-	2 (18)	-
Anti-ds-DNA-AK, n (%)	-	10 (91)	-
Anti-Ro-AK, n (%)	-	4 (36)	-
Anti-LA-AK, n (%)	-	2 (18)	-
RF, n (%)	-	1 (9)	8 (67)
ACPA, n (%)	-	1 (9)	8 (67)
<b>Krankheitsaktivität</b>			
SLEDAI < 6, n (%)	-	10 (91)	-
≥ 6, n (%)	-	1 (9)	-
DAS28 < 2,6, n (%)	-	-	7 (58)
≥ 2,6 bis < 3,2, n (%)	-	-	-
3,2 bis < 5,1, n (%)	-	-	4 (33)
> 5,1, n (%)	-	-	1 (8)

µl = Mikroliter, ACPA = anti-citrullinierte Protein-Antikörper, ANA = antinukleäre Antikörper, AZA = Azathioprin, BC = B cell, DAS28 = Disease Activity Score for patients with rheumatoid arthritis, dsDNA-AK = Doppelstrang-DNA-Antikörper, ENA = extrahierbare nukleäre Antikörper, HCQ = Hydroxychloroquin, HD = healthy donor, LEF = Leflunomid, m = männlich, MFI = median fluorescence intensity, MMF = Mycophenolat-Mofetil, MTX = Methotrexat, n = Fallzahl, RA = rheumatoide Arthritis, RF = Rheumafaktor, SD = Standardabweichung, SLE = systemischer Lupus erythematodes, SLEDAI = Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, w = weiblich; \*Datum der letzten Tetanus-Impfung bei einer RA- und einer SLE-Patientin nicht eruebar

Tabelle 3.2. Probandencharakteristika der Impfkohorte

Proband	Alter	Geschlecht	Letzte Tetanus- Impfung	Medikation	AK-Status	Krankheits- aktivität
HD 1	30	w	Vor 11 J.	-	-	-
HD 2	40	w	Vor 11 J.	-	-	-
HD 3	25	m	Vor 9 J.	-	-	-
SLE 1	25	m	Vor 12. J.	AZA	ANA+ dsDNA-AK+	SLEDAI: < 6
SLE 2	37	w	> 20 J.	HCQ, MMF, Prednisolon 4 mg	ANA+ dsDNA-AK+	SLEDAI: < 6
SLE 3	38	w	Vor 9 J.	-	ANA+ ENA+ Anti-Ro-AK+ dsDNA-AK+	SLEDAI: < 6
RA 1	27	w	Vor ca. 25 J.	Tocilizumab	ACPA+ dsDNA-AK+	DAS28: 2,67
RA 2	65	w	Vor 8 J.	Tocilizumab, Prednisolon 5 mg	ACPA+ RF+	DAS28: 4,43
RA 3	57	w	> 10 J.	MTX, Etanercept, Prednisolon 5 mg	ACPA+	DAS28: 4,82

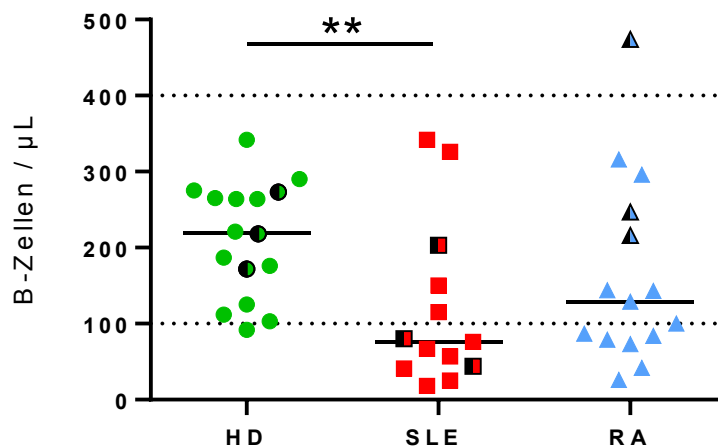
ACPA = anti-citrullinierte Protein-Antikörper, AK = Antikörper, ANA = antinukleäre Antikörper, AZA = Azathioprin, DAS28 = Disease Activity Score for patients with rheumatoid arthritis, dsDNA-AK = Doppelstrang-DNA-Antikörper, HCQ = Hydroxychloroquin, HD = healthy donor, J.= Jahre(n), m = männlich, MM = Mycophenolat-Mofetil, MTX = Methotrexat, RA = rheumatoide Arthritis, RF = Rheumafaktor, SLE = systemischer Lupus erythematosus, SLEDAI = Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, w = weiblich

Genauere Informationen zu der Medikation sowie den Probanden sind in Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 aufgelistet. Ein HD und ein SLE-Patient wurden in beide Studien integriert.

### 3.2 Veränderte B-Zellzahlen und B-Zell-Subpopulationen bei SLE- und RA-Patienten

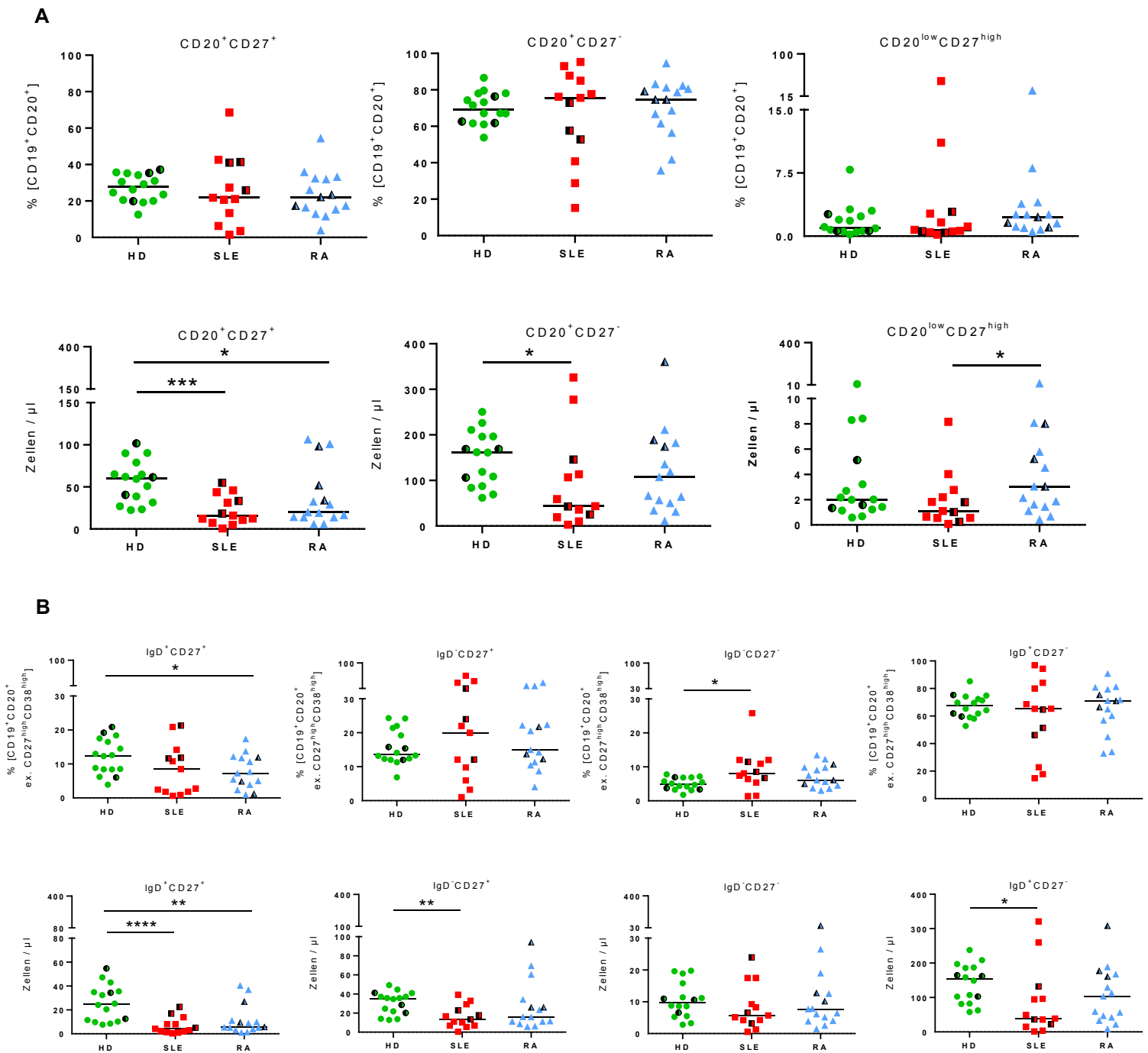
Um einen Überblick über den B-Zellstatus der drei Probandengruppen zu erhalten, wurden die absolute B-Zellzahl sowie die relative und absolute Häufigkeit der einzelnen B-Zell-Subpopulationen bestimmt. Eingeschlossen wurden alle Probanden der Baseline-

Messung sowie die Impfprobanden an Tag 0 vor der Impfung. Von den in beide Studien integrierten Spendern wurde der Tag 0-Wert erfasst. Hier konnte die bekannte Erniedrigung peripherer B-Lymphozyten bei SLE-Patienten im Vergleich zu Gesunden bestätigt werden (Abbildung 3.1) (17, 67). Während die gesunde Kohorte eine mediane B-Zellzahl von  $211 \pm 73$  B-Zellen/ $\mu\text{L}$  aufwies, lag der Wert bei den SLE- bzw. RA-Patienten bei  $76 \pm 109$  (\*\* $p < 0,01$ ) bzw.  $129 \pm 124$  ( $p = 0,08$ ) B-Zellen/ $\mu\text{L}$ .



**Abbildung 3.1 B-Lymphopenie bei SLE-Patienten gegenüber Gesunden und RA-Patienten.** Abgebildet sind die B-Zellzahlen aller Spender der Baseline-Messung (einfarbig) und die Tag 0 Messungen der geimpften Probanden (zweifarbige); Die gestrichelten Linien stellen den Referenzbereich der B-Zellzahl (100-400 Zellen/ $\mu\text{L}$ ) dar;  $n = 16$  HD, 13 SLE- und 15 RA-Patienten; \*\*:  $p < 0,01$  im Mann-Whitney-U-Test; HD = healthy donor, SLE = systemischer Lupus erythematodes, RA = rheumatoide Arthritis,  $n$  = Fallzahl,  $\mu\text{L}$  = Mikroliter

In der prozentualen Aufteilung der B-Zellen in Gedächtnis-B-Zellen (mBCs,  $\text{CD}20^+\text{CD}27^+$ ), naive B-Zellen ( $\text{CD}20^+\text{CD}27^-$ ) und Plasmablasten ( $\text{CD}20^{\text{low}}\text{CD}27^{\text{high}}$ ) zeigte sich kein Unterschied zwischen Patienten und Gesunden (Abbildung 3.2 A). Die SLE-Patientin mit dem höchsten Plasmablasten-Anteil (45,3 %) hatte drei Monate vor der Messung einen schweren SLE-Schub. Bei Betrachtung der absoluten Zahlen zeigten SLE- und RA-Patienten signifikant weniger mBCs als die Gesunden auf (Median SLE 17 Zellen/ $\mu\text{L}$ , RA 20 Zellen/ $\mu\text{L}$ , HD 60 Zellen/ $\mu\text{L}$ , SLE vs. HD \*\*\* $p < 0,001$ , RA vs. HD \* $p < 0,05$ ). Ferner hatten die SLE-Probanden signifikant weniger naive B-Zellen als die Gesunden (Median SLE 43 Zellen/ $\mu\text{L}$ , HD 161 Zellen/ $\mu\text{L}$ , \* $p < 0,05$ ) sowie signifikant weniger Plasmablasten als die RA-Patienten (Median SLE 1 Zellen/ $\mu\text{L}$ , RA 3 Zellen/ $\mu\text{L}$ , SLE vs. RA \* $p < 0,05$ ).

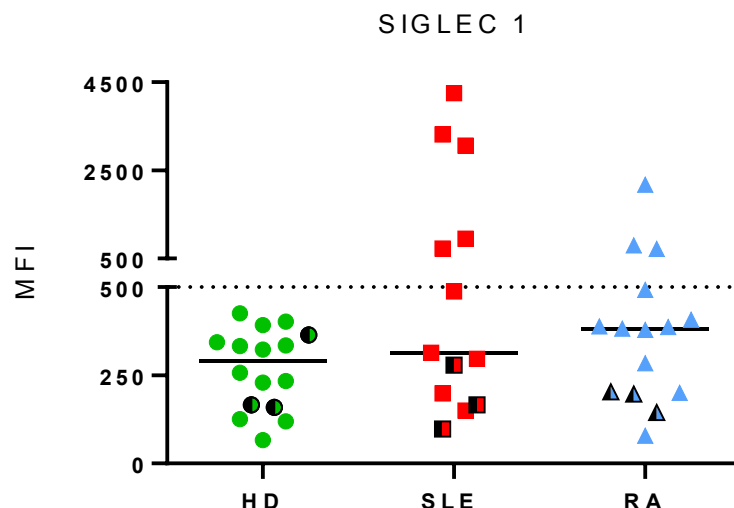


**Abbildung 3.2** Veränderte B-Zell-Subpopulationen bei SLE- und RA-Patienten gegenüber Gesunden. Abgebildet sind alle Spender der Basismessung (einfarbig) und die Tag 0 Messungen der geimpften Probanden (zweifarb); **A**: Darstellung aller Gedächtnis- ( $CD20^+CD27^+$ ) und naiven ( $CD20^+CD27^-$ ) B-Zellen sowie der Plasmablasten ( $CD20^{low}CD27^{high}$ ) in Prozent (obere Reihe) und in Zellen/ $\mu$ l (untere Reihe). **B**: Aufteilung der Gedächtnis- und naiven B-Zellen in  $IgD^-$  und  $IgD^+$  (obere Reihe in Prozent, untere Reihe in Zellen/ $\mu$ l); \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$  im Mann-Whitney-U-Test;  $n = 16$  HD, 13 SLE- und 15 RA-Patienten;  $n =$  Fallzahl, HD = healthy donor, SLE = systemischer Lupus erythematosus, RA = rheumatoide Arthritis, ex. = excluding,  $\mu$ l = Mikroliter

In der weiteren Unterteilung der Gedächtnis-B-Zellen in CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> (ohne Klassenwechsel), CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> und CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> (nach Klassenwechsel) wiesen die RA-Patienten eine relative und absolute Reduktion nicht-klassengewechselter Gedächtnis-B-Zellen im Vergleich zu den gesunden Spendern auf (Median RA 7,2 %, HD 12,4 %, \*p < 0,05; RA 6 Zellen/μl, HD 25 Zellen/μl, \*\*p < 0,01) (Abbildung 3.2 B). Die SLE-Patienten hatten absolut, jedoch nicht relativ betrachtet, ebenfalls weniger CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> (Median SLE 4 Zellen/μl, HD 25 Zellen/μl; \*\*\*\*p < 0,0001) als auch weniger CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>-Zellen (Median SLE 13 Zellen/μl, HD 35 Zellen/μl, \*\*p < 0,01) gegenüber den HD. In der sog. doppelt negativen Population (IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) zeigten die SLE-Patienten einen signifikant höheren Anteil (Median SLE 8 %, HD 5 %, \*p < 0,05) im Vergleich zu den Gesunden auf. Da sich die hier erhobenen Daten mit bereits bekannten charakteristischen Veränderungen der peripheren B-Zellhomöostase decken, können die drei Kohorten für die folgenden Ergebnis-Darstellungen als repräsentativ betrachtet werden.

### 3.3 Siglec1 (CD 169)-Expression auf Monozyten

Bei allen Probanden wurde die Siglec1-MFI, die als Marker der Typ I IFN Signatur mit der Krankheitsaktivität bei SLE- und RA-Patienten korreliert, bestimmt (4, 6).



**Abbildung 3.3 Verstärkte Siglec1 (CD169)-Expression bei SLE- und RA-Patienten gegenüber HD.** Abgebildet sind alle Spender der Baseline-Messung (einfarbig) und die Tag 0 Messungen der geimpften Probanden (zweifarbige). Die gestrichelte Linie stellt den Siglec1-MFI-Grenzwert von 500 dar; n = 16 HD, 13 SLE- und 15 RA-Patienten, MFI = median fluorescence intensity, n = Fallzahl, HD = healthy donor, SLE = systemischer Lupus erythematosus, RA = rheumatoide Arthritis; keine statistische Signifikanz zwischen HD und Patienten im Mann-Whitney-U-Test



Während die gesunden Probanden (Probanden der Baseline-Messung und Impfprobanden an Tag 0) eine Median-MFI von  $290 \pm 114$  aufwiesen, lag die Median-MFI der SLE-Patienten bei  $314 \pm 1435$  und die der RA-Patienten bei  $382 \pm 509$  (Abbildung 3.3). Der Unterschied zwischen den Gruppen war nicht signifikant.

Die Siglec1-MFI der Impfkohorte lag bei allen Probanden an Tag 0 bei unter 500, sodass alle Probanden vor Impfung Siglec1-negativ waren (siehe Kapitel 3.5.1).

### **3.4 Ergebnisse der Basis-Messung**

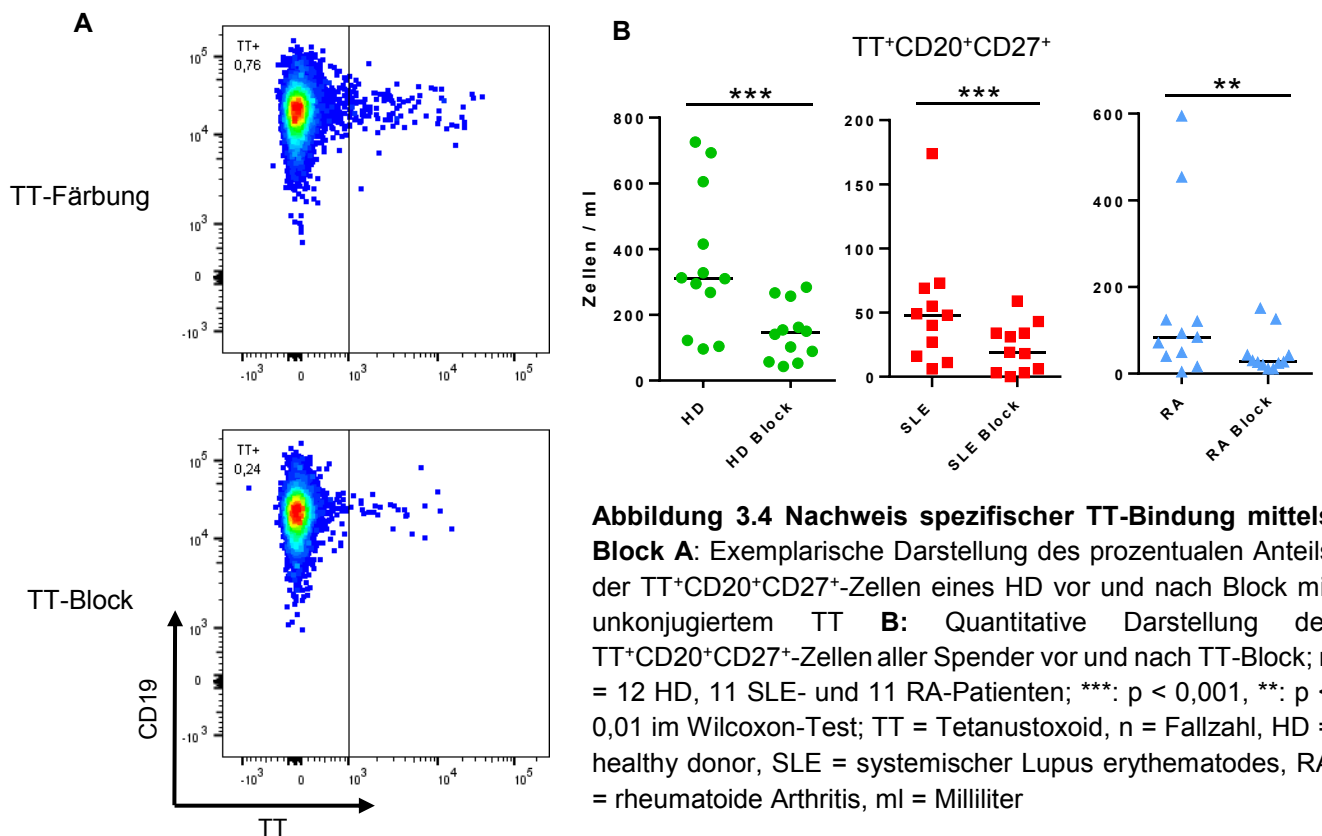
Da der APC-Cy7-Kanal durch unterschiedliche Antikörper besetzt und die Gates zur Bestimmung der antigenspezifischen Zellen in beiden Studien aufgrund der leicht voneinander abweichenden Protokolle teilweise unterschiedlich gesetzt wurden, wurden die Ergebnisse der antigenspezifischen Färbungen an Tag 0 der Impfstudie nicht in die Ergebnisse der Baseline-Messung integriert. Im Folgenden werden also nur die Ergebnisse der 14 HD, 11 SLE- und 12 RA-Patienten der Baseline-Messung betrachtet.

#### **3.4.1 Nachweis spezifischer TT-Bindung mittels Inhibitionsblock**

Zum Nachweis der spezifischen Bindung des TT an die B-Zellen wurde bei der Mehrheit der Probanden zusätzlich zur Färbung mit konjugiertem TT eine Färbung mit unkonjugiertem TT durchgeführt. Durch die Besetzung der TT-spezifischen B-Zell-Rezeptoren durch unkonjugiertes TT konnten diese kaum noch konjugiertes TT binden, sodass das Fluoreszenzsignal in der durchflusszytometrischen Analyse sehr viel schwächer ausfiel. Ein Beispiel für solch einen Block sowie die Ergebnisse der TT-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen aller Probanden vor und nach Block sind in Abbildung 3.4 dargestellt.

In allen drei Gruppen hatten die Spender in der Färbung, in der vor Hinzugabe von konjugiertem TT erst unkonjugiertes hinzugegeben wurde, signifikant weniger TT-spezifische Gedächtnis-B-Zellen in der durchflusszytometrischen Auswertung als in der Färbung, die ausschließlich konjugiertes TT enthielt. Bei den gesunden Spendern und SLE-Patienten lag der p-Wert bei  $***p < 0,001$ , während er bei den RA-Patienten bei  $**p < 0,01$  lag.

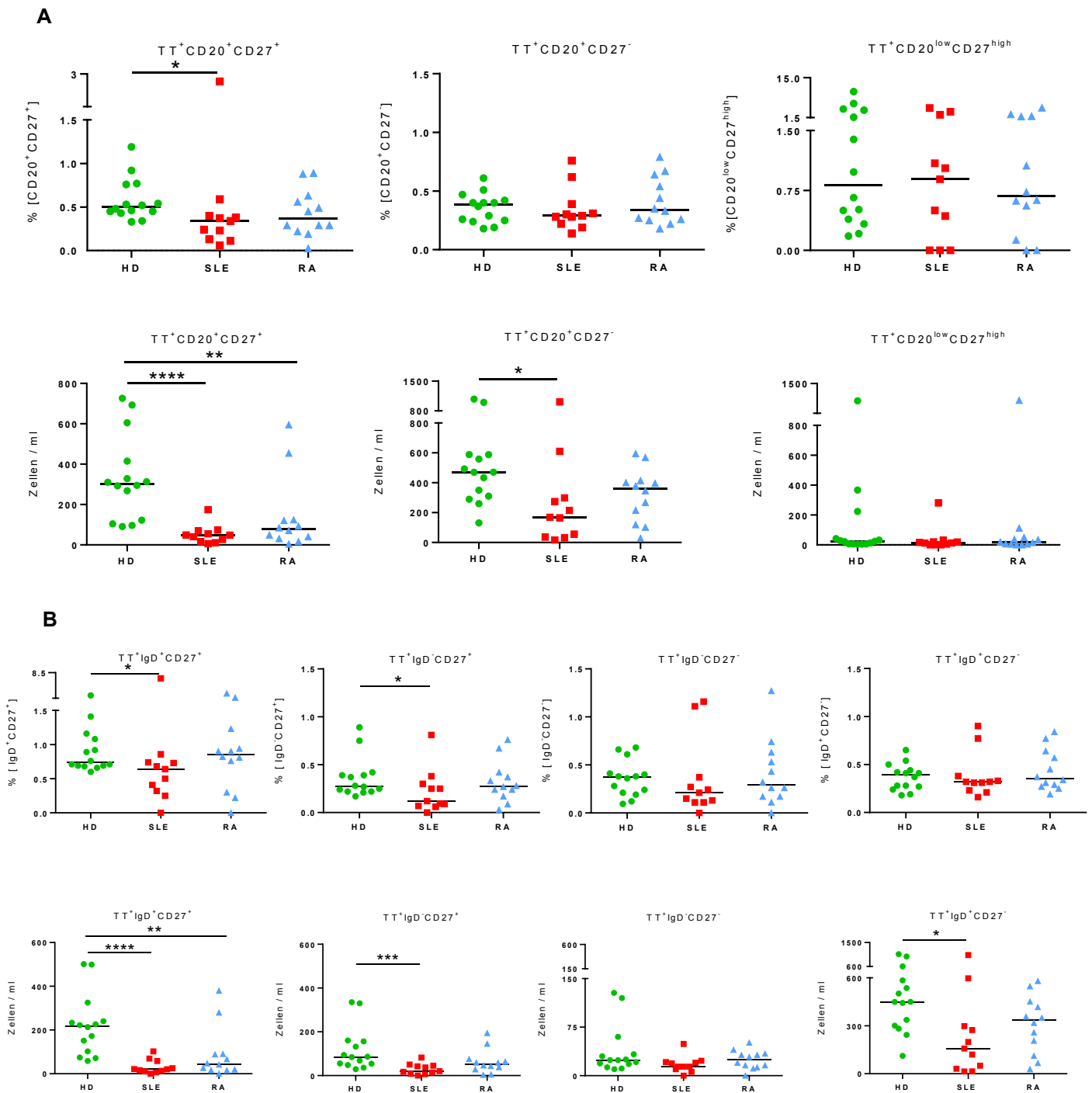
Eine detaillierte Beschreibung von  $PTX3^+$ -B-Zellen inklusive PTX3-Block bei Gesunden und SLE-Patienten ist in unserer Gruppe bereits durchgeführt bzw. etabliert worden (49).



### 3.4.2 Verminderter Nachweis von TT-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen bei SLE- und RA-Patienten

Abbildung 3.5 zeigt die Ergebnisse des Nachweises TT-spezifischer B-Zell-Subpopulationen. Die SLE-Patienten hatten sowohl relativ als auch absolut betrachtet signifikant weniger TT-spezifische Gedächtnis-B-Zellen (TT<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) als die Gesunden (Median SLE 0,34 %, HD 0,5 %, \*p < 0,05; SLE 48 Zellen/ml, HD 302 Zellen/ml, \*\*\*\*p < 0,0001). Bei den RA-Patienten fand sich diese Verringerung bei den absoluten Zahlen (RA 78 Zellen/ml, HD 302 Zellen/ml, \*\*p < 0,01).

Bei Betrachtung der verschiedenen Gedächtnis-B-Zell-Kompartimente der RA-Patienten zeigte sich, dass die Gesamterniedrigung TT-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen auf eine Erniedrigung der nicht-klassengewechselten mBCs (IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) zurückzuführen ist (Abbildung 3.5 B). Während die RA-Patienten 44 (Median) TT<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>-Zellen/ml exprimierten, waren es bei den Gesunden 218 TT<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>-Zellen/ml (\*\*p < 0,01). In den klassengewechselten Kompartimenten (IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> und IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) der RA-Patienten bestand kein Unterschied zu den Gesunden. In der SLE-Kohorte war eine Verringerung TT-spezifischer Gedächtnis B-Zellen sowohl im IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>- als auch im



**Abbildung 3.5** Veränderte TT-spezifische B-Zell-Subpopulationen bei SLE- und RA-Patienten gegenüber Gesunden. **A:** Darstellung der TT-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen ( $TT^+CD20^+CD27^+$ ), naiven B-Zellen ( $TT^+CD20^+CD27^-$ ) und Plasmablasten ( $TT^+CD20^{low}CD27^{high}$ ) in Prozent und in Zellen/ml **B:** Aufteilung der TT-spezifischen Gedächtnis- und naiven B-Zellen in  $IgD^-$  und  $IgD^+$  (obere Reihe in Prozent, untere Reihe in Zellen/ml);  $n = 14$  HD, 11 SLE, 12 RA; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$  im Mann-Whitney-U-Test; TT = Tetanustoxoid,  $n$  = Fallzahl, HD = healthy donor, SLE = systemischer Lupus erythematoses, RA = rheumatoide Arthritis, ml = Milliliter

IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>-Kompartiment zu verzeichnen. Dies galt sowohl für die relative als auch absolute Häufigkeit, wobei die Verringerung im nicht-klassengewechselten Kompartiment hinsichtlich der absoluten Zahlen deutlicher war (IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>: Median SLE 0,64 %, HD 0,73 %, \*p < 0,05, SLE 20 Zellen/ml, HD 218 Zellen/ml, \*\*\*\*p < 0,0001; IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>: Median SLE 0,12 %, HD 0,28 %, \*p < 0,05, SLE 20 Zellen/ml, HD 85 Zellen/ml, \*\*\*p < 0,001). In der sog. doppelt negativen Population (IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) fand sich wie bei den RA-Patienten kein Unterschied zu den Gesunden.

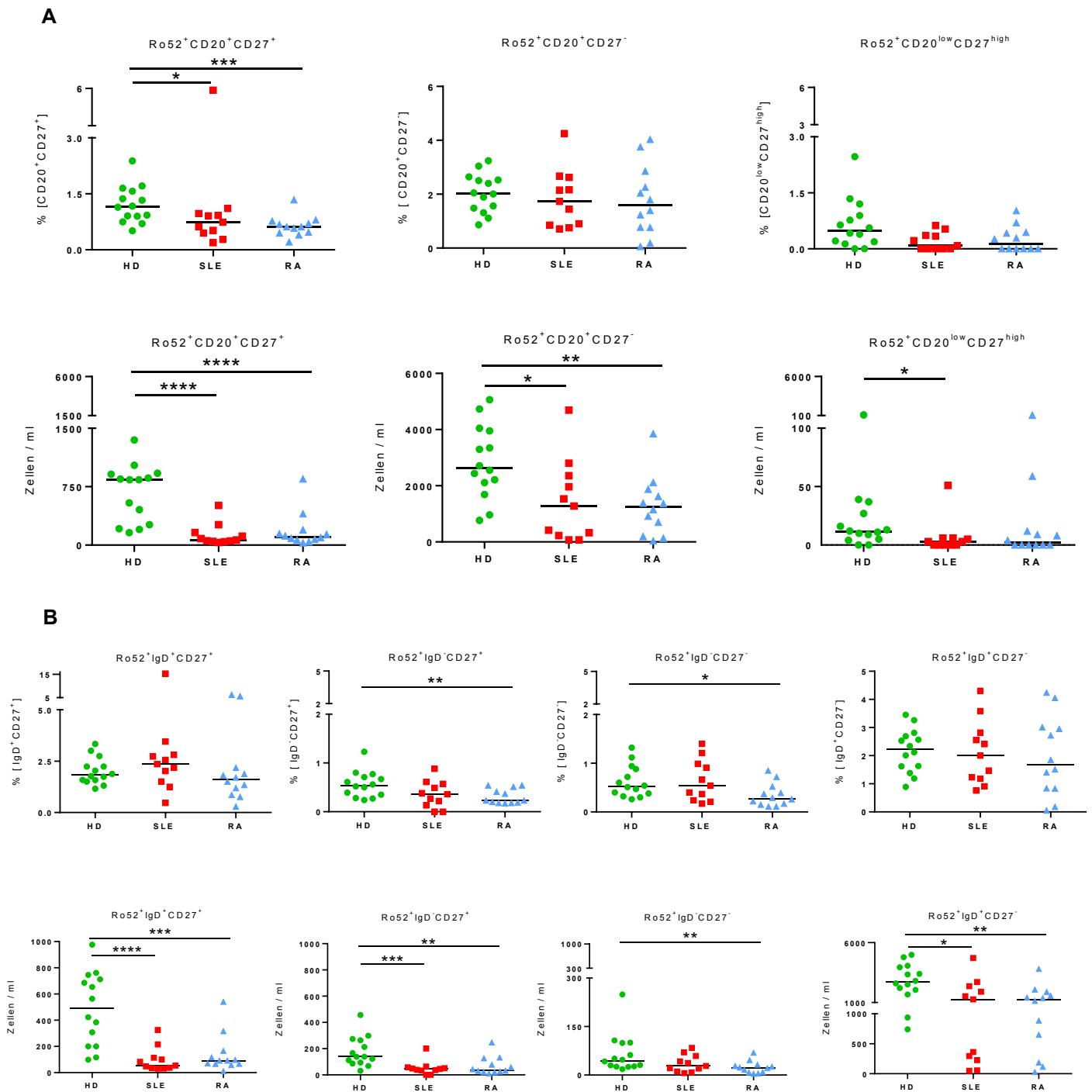
Eine weitere Verminderung TT-spezifischer Zellen gegenüber Gesunden zeigte die SLE-Kohorte bei Analyse der absoluten Zahlen naiver B-Zellen (TT<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>). Hier lag der Median bei 169 vs. 470 Zellen/ml (\*p < 0,05). In der Gruppe der TT-spezifischen Plasmablasten gab es weder einen relativen noch absoluten Unterschied zwischen Patienten und Gesunden.

Zusammenfassend zeigten beide Patientengruppen signifikant niedrigere Absolutzahlen TT-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen gegenüber Gesunden. Diese Gesamterniedrigung wurde vor allem durch eine Erniedrigung nicht-klassengewechselter Gedächtnis B-Zellen verursacht. Bei den SLE-Patienten präsentierte sich diese Erniedrigung TT-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen auch in der naiven Population.

### **3.4.3 Verminderter Nachweis Ro52-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen bei SLE- und RA-Patienten**

Analog zu den TT-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen waren die Ro52-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen (Ro52<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) bei SLE- und RA-Patienten im Vergleich zur gesunden Kohorte ebenfalls signifikant vermindert (Abbildung 3.6). Der prozentuale Median lag bei den SLE-Patienten bei 0,74 %, bei den RA-Patienten bei 0,62 % und bei den gesunden Spendern bei 1,16 % aller mBCs (SLE vs. HD \*p < 0,05, RA vs. HD \*\*\*p < 0,001). In absoluten Zahlen ergab dies einen Median von 66 Zellen/ml bei den SLE-Patienten, 107 Zellen/ml bei den RA-Patienten und 840 Zellen/ml bei den Gesunden (SLE vs. HD und RA vs. HD \*\*\*\*p < 0,0001).

In den verschiedenen Gedächtnis-B-Zell-Kompartimenten zeigte sich bei den absoluten Zahlen - genau wie bei den TT-spezifischen Zellen - der größte Unterschied zwischen Patienten und Gesunden im Kompartiment der nicht-klassengewechselten Gedächtniszellen (Ro52<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) mit 54 bzw. 91 Zellen/ml bei den SLE bzw. RA-Patienten und 494 Zellen bei den gesunden Spendern (SLE vs. HD \*\*\*\*p < 0,0001, RA



**Abbildung 3.6** Veränderte Ro52-spezifische B-Zell-Subpopulationen bei SLE- und RA-Patienten gegenüber Gesunden. **A:** Darstellung der Ro52-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen (Ro52<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), naiven B-Zellen (Ro52<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) und Plasmablasten (Ro52<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>) in Prozent und absolute Zellen/ml **B:** Aufteilung der Ro52-spezifischen Gedächtnis- und naiven B-Zellen in IgD<sup>-</sup> und IgD<sup>+</sup> (obere Reihe in Prozent, untere Reihe in Zellen/ml); n = 14 HD, 11 SLE- und 12 RA-Patienten; \*\*\*\*: p < 0,0001, \*\*\*: p < 0,001, \*\*: p < 0,01, \*: p < 0,05 im Mann-Whitney-U-Test, HD = healthy donor, SLE = systemischer Lupus erythematodes, RA = rheumatoide Arthritis, n = Fallzahl, ml = Milliliter

vs. HD  $***p < 0,001$ ). In der relativen Verteilung ergab sich hier kein Unterschied zwischen den Gruppen. Im IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>-Kompartiment hatten die RA-Patienten sowohl relativ als auch absolut betrachtet weniger Ro52-spezifische Zellen als die Gesunden (Median RA 0,23 %, HD 0,54 %,  $**p < 0,01$ , RA 38 Zellen/ml, HD 139 Zellen/ml,  $**p < 0,01$ ). Die SLE-Patienten zeigten absolut betrachtet ebenfalls verminderte Werte auf (Median SLE 45 Zellen/ml, SLE vs. HD  $***p < 0,001$ ). Bei den Ro52-spezifischen sog. doppelt negativen B-Zellen (Ro52<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) zeigten nur die RA-Patienten gegenüber den Gesunden einen Unterschied (Median RA 0,28 %, HD 0,53 %,  $*p < 0,05$ ; RA 22 Zellen/ml, HD 45 Zellen/ml,  $**p < 0,01$ ).

In der naiven B-Zell-Population hatten beide Patientengruppen absolut gesehen weniger Ro52-spezifische Zellen als die Gesunden (Median SLE 1276 Zellen/ml, RA 1257 Zellen/ml, HD 2633 Zellen/ml, SLE vs. HD  $*p < 0,05$ , RA vs. HD  $**p < 0,01$ ). Die Analyse der relativen Häufigkeit ergab keinen Unterschied.

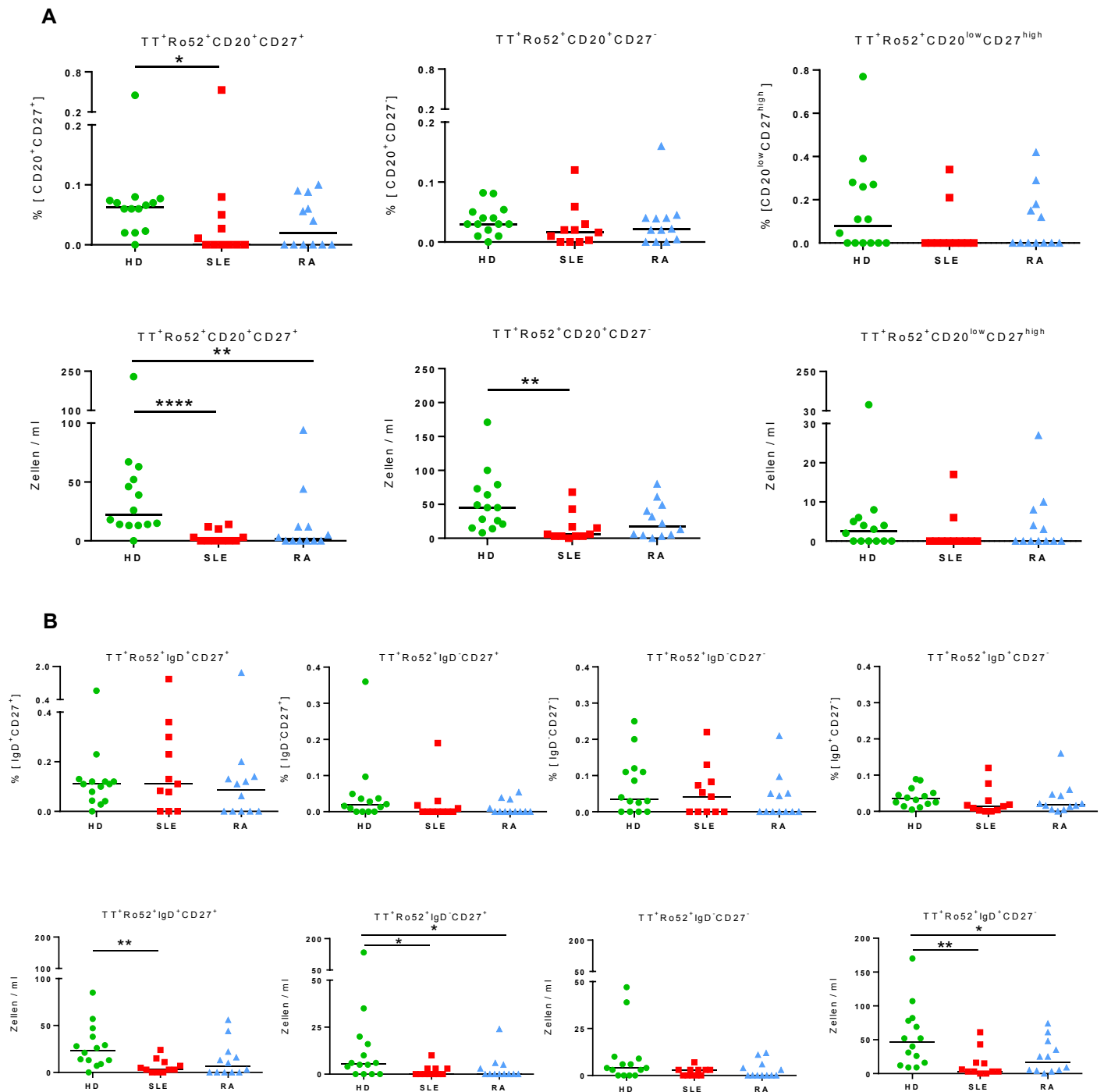
Die absolute Anzahl Ro52-spezifischer Plasmablasten (Ro52<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>) war bei den SLE-Patienten im Vergleich zu den Gesunden ebenfalls signifikant vermindert (SLE Mittelwert 3 vs. HD 12 Zellen/ml,  $*p < 0,05$ ).

Insgesamt hatten beide Patientengruppen sowohl relativ als auch absolut betrachtet signifikant weniger Ro52-spezifische Gedächtnis-B-Zellen als die Gesunden. Anders als bei den TT-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen, wo das doppelt negative Gedächtnis-B-Zell-Kompartiment keinen Unterschied zwischen Gesunden und Patienten ergab, zeigten die RA-Patienten eine relative und absolute Erniedrigung Ro52-spezifischer DN-Zellen.

#### **3.4.4 Verminderter Nachweis von TT<sup>+</sup>Ro52<sup>+</sup>Gedächtnis-B-Zellen bei SLE- und RA-Patienten**

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es, polyreaktive B-Zellen bei Gesunden vs. Autoimmunerkrankten zu analysieren. Dazu wurde exemplarisch untersucht, ob es Zellen gibt, die sowohl TT als auch Ro52 binden können und somit doppelt positiv sind (Abbildung 3.7).

Bei Analyse der Gedächtnis-B-Zellen wurde ersichtlich, dass bis auf einen alle gesunden Probanden doppelt positive Zellen (TT<sup>+</sup>Ro52<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) exprimierten. Im Gegensatz dazu waren es in der SLE-Gruppe fünf und in der RA-Gruppe sechs Probanden, die gar keine solcher Zellen produzierten (Abbildung 3.7 A links). Die mediane Anzahl doppelt positiver Gedächtnis-B-Zellen betrug bei den Gesunden 22, bei



**Abbildung 3.7** Veränderte TT<sup>+</sup>Ro52<sup>+</sup>-B-Zell-Subpopulationen bei SLE- und RA-Patienten gegenüber Gesunden. **A:** Darstellung der TT<sup>+</sup>Ro52<sup>+</sup>- Gedächtnis-B-Zellen (TT<sup>+</sup>Ro52<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), - naiven B-Zellen (TT<sup>+</sup>Ro52<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) und - Plasmablasten (TT<sup>+</sup>Ro52<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>) in Prozent und in Zellen/ml **B:** Aufteilung der TT<sup>+</sup>Ro52<sup>+</sup>-Gedächtnis- und naiven B-Zellen in IgD<sup>-</sup> und IgD<sup>+</sup> (obere Reihe in Prozent, untere Reihe in Zellen/ml); n = 14 HD, 11 SLE- und 12 RA-Patienten; \*\*\*\*: p < 0,0001, \*\*: p < 0,01, \*: p < 0,05 im Mann-Whitney-U-Test; TT = Tetanustoxoid, n = Fallzahl, HD = healthy donor, SLE = systemischer Lupus erythematodes, RA = rheumatoide Arthritis, ml = Milliliter

den SLE- Patienten 0 und bei den RA-Patienten 2 Zellen/ml (HD vs. SLE \*\*\*\* $p < 0,0001$ , HD vs. RA \*\* $p < 0,01$ ). Die Analyse der Frequenzen ergab einen signifikanten Unterschied zwischen SLE-Patienten und Gesunden (SLE 0 %, HD 0.06 %, \* $p < 0,05$ ).

Bei Aufteilung in die Populationen definiert nach IgD und CD27 zeigte sich, dass die doppelt positiven Zellen bei den Gesunden stärker von den nicht-klassengewechselten IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> als von den klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen produziert wurden (Abbildung 3.7 B). Bei Analyse der absoluten Zahlen war bei der nicht-klassengewechselten Population ein signifikanter Unterschied zwischen Gesunden und SLE-Patienten nachweisbar (SLE 3 Zellen/ml, HD 24 Zellen/ml, \*\* $p < 0,01$ ). Auch im klassengewechselten IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>-Kompartiment exprimierten die Gesunden signifikant mehr doppelt positive Zellen als die Patienten (HD 6 Zellen/ml, SLE 0 Zellen/ml, RA 0 Zellen/ml, HD vs. SLE bzw. HD vs. RA \* $p < 0,05$ ).

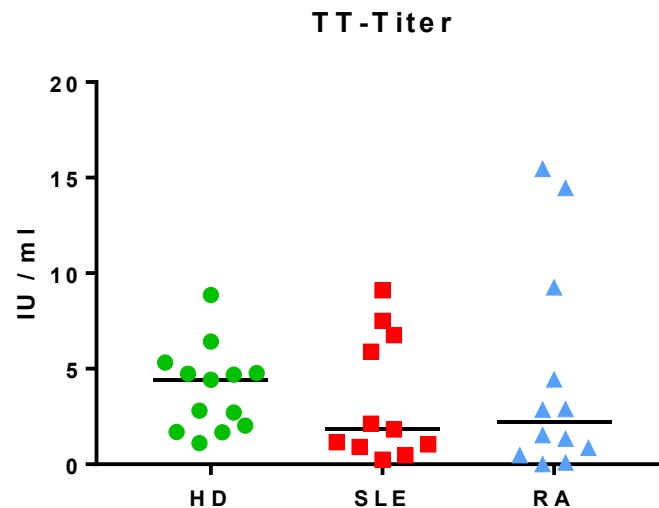
Doppelt positive naive B-Zellen (TT<sup>+</sup>Ro52<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) wurden absolut betrachtet ebenfalls stärker von Gesunden als von Patienten exprimiert (Abbildung 3.7 A mittig). Während der Unterschied zwischen Gesunden und RA-Patienten nur eine Tendenz aufzeigte (Median: 45 vs. 18 Zellen/ml,  $p = 0,0543$ ), war der Unterschied HD vs. SLE signifikant (45 vs. 6 Zellen/ml, \*\* $p < 0,01$ ). Die Analyse der Frequenzen ergab keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Innerhalb der Plasmablasten (TT<sup>+</sup>Ro52<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>, Abbildung 3.7 A rechts) gab es ebenfalls keinen Unterschied zwischen den drei Gruppen.

Zusammenfassend exprimierten die Gesunden durchschnittlich mehr doppelt positive B-Zellen als die Autoimmunerkrankten, wobei viele Patienten überhaupt keine doppelt positiven Zellen exprimierten. Der Unterschied präsentierte sich absolut betrachtet sowohl im Gedächtnis- als auch im naiven B-Zell-Kompartiment. Somit erscheint der Nachweis polyreaktiver Zellen eher eine Eigenschaft Gesunder im Gegensatz zu AID-Patienten zu sein.

### **3.4.5 Vergleichbare TT-Titer zwischen Autoimmunpatienten und Gesunden im Grundzustand**

Neben der zellulären wurde auch die humorale Immunantwort in Form von TT-IgG-AK analysiert. Die humorale Immunantwort bildet eine weitere Säule des Immunsystems und fungiert unabhängig von der zellulären (68, 69). Hier zeigte sich im Gegensatz zu den TT-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen kein signifikanter Unterschied im Nachweis der TT-IgG-AK zwischen Patienten und Gesunden (Abbildung 3.8). Der mediane TT-Titer der





**Abbildung 3.8 Kein signifikanter Unterschied im TT-Titer-Gehalt zwischen SLE- und RA-Patienten gegenüber Gesunden.** n = 13 HD, 11 SLE- und 12 RA-Patienten; kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Gesunden im Mann-Whitney-U-Test; TT = Tetanustoxoid, HD = healthy donor, SLE = systemischer Lupus erythematosus, RA = rheumatoide Arthritis, IU = International Units, ml = Milliliter

SLE-Patienten lag bei 1,83 IU/ml (International Units pro Milliliter), der der RA-Patienten bei 2,19 IU/ml und der der Gesunden bei 4,42 IU/ml (SLE vs. HD  $p = 0,4$ , RA vs. HD  $p = 0,35$ ). Alle Probanden hatten einen Titer von  $\geq 0,01$  IU/ml und waren somit laut WHO ausreichend geschützt (70), obgleich die absoluten Werte der AID-Patienten gegenüber den Gesunden etwas geringer ausfielen.

### 3.4.6 Korrelation TT-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen mit verschiedenen Parametern

Die vorangehenden Untersuchungen haben gezeigt, dass AID-Patienten signifikant weniger antigenspezifische Gedächtnis-B-Zellen gegenüber Gesunden aufweisen. Um zu überprüfen, inwieweit der Spiegel dieser Zellen durch bestimmte Faktoren beeinflusst wird, erfolgte exemplarisch eine Korrelationsanalyse TT-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen mit verschiedenen Parametern (Tabelle 3.3).

Bei Untersuchung des Alters zeigten die RA-Patienten eine negative Korrelation ( $r = -0,812$ ,  $p = 0,0021$ ). D.h. je älter ein RA-Patient war, desto weniger TT-spezifische Gedächtnis-B-Zellen wurden detektiert. Hierbei sei angemerkt, dass der Altersmedian der RA-Patienten deutlich höher lag als bei den HD und SLE-Patienten.

Betrachtete man das Datum der letzten Tetanus-Impfung, ergab sich bei den gesunden Spendern eine negative Korrelation ( $r = -0,6231$ ,  $p = 0,0198$ ): Je länger die letzte Impfung zurücklag, desto weniger TT<sup>+</sup>-mBCs wurden bei den HD nachgewiesen.

**Tabelle 3.3 Korrelationsanalyse der TT-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen (Zellen/ml).**  
Die Korrelation wurde unter Verwendung des Spearmans Rangkorrelations-Tests durchgeführt.

Parameter	HD	SLE	RA
<b>Alter</b> Jahre	n = 14 r = 0,02646 p = 0,9304	n = 11 r = 0,0411 p = 0,9078	n = 12 r = -0,812 p = 0,0021
<b>Datum der letzten Tetanus-Impfung</b> Jahre	n = 14 r = -0,6231 p = 0,0198	n = 9 r = -0,5021 p = 0,1710	n = 11 r = 0,4771 p = 0,1422
<b>B-Zellzahl</b> Zellen/ $\mu$ l	n = 14 r = 0,5941 p = 0,0276	n = 11 r = 0,3508 p = 0,2886	n = 12 r = 0,5664 p = 0,0591
<b>Gesamt-mBCs</b> Zellen/ $\mu$ l	n = 14 r = 0,767 p = 0,0020	n = 11 r = 0,6909 p = 0,0226	n = 12 r = 0,6643 p = 0,0219
<b>Ro52*mBCs</b> Zellen/ml	n = 14 r = 0,8273 p = 0,0005	n = 11 r = 0,5818 p = 0,0656	n = 12 r = 0,6014 p = 0,0428
<b>TT*Ro52*mBCs</b> Zellen/ml	n = 14 r = 0,6608 p = 0,0120	n = 11 r = 0,6064 p = 0,0524	n = 12 r = 0,4563 p = 0,1370
<b>Siglec 1</b> MFI	n = 14 r = -0,02857 p = 0,9276	n = 11 r = -0,6545 p = 0,0336	r = -0,2657 p = 0,4042
<b>ANA</b> Titer	n.b.	n = 11 r = -0,318 p = 0,3380	n.b.
<b>ds-DNA-AK (ELISA)</b> U/ml	n.b.	n = 11 r = 0,009175 p = 0,9889	n.b.
<b>TT-AK</b> IU/ml	n = 13 r = 0,1648 p = 0,5911	n = 11 r = 0,1636 p = 0,6337	n = 12 r = 0,3077 p = 0,3310
<b>Prednisolon-Dosis</b> mg	n.b.	n = 11 r = -0,3744 p = 0,2553	n = 12 r = 0,01945 p = 0,9582

negativ	P<0,005	P<0,05		P<0,05	P< 0,005	positiv
---------	---------	--------	--	--------	----------	---------

$\mu$ l = Mikroliter, ACPA = anti-citrullinierte Protein-Antikörper, AK = Antikörper, ANA= antinukleäre Antikörper, dsDNA-AK = Doppelstrang-DNA-Antikörper, ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay, HD = healthy donor, IU = international units, mBCs = memory B cells, MFI = median fluorescence intensity, mg = Milligramm, ml = Milliliter, n = Fallzahl, n.b.= nicht bestimmt, p = P-Wert, r = Spearman-Korrelationskoeffizient, RA = rheumatoide Arthritis, RF = Rheumafaktor, SLE = systemischer Lupus erythematodes, TT = Tetanustoxoid, U = Units

Die Korrelation der TT<sup>+</sup>-mBCs mit verschiedenen Laborparametern ergab unterschiedliche Ergebnisse. Während es keinen Zusammenhang zwischen der Titerhöhe der dsDNA-AK bzw. der TT-IgG-AK und dem Gehalt an TT<sup>+</sup>-mBCs gab, korrelierte die Siglec1-MFI der SLE-Patienten negativ mit den TT<sup>+</sup>-mBCs ( $r = -0,6545$ ,  $p = 0,0336$ ). Je höher der Siglec1-Wert, also die Krankheitsaktivität, war, desto weniger TT<sup>+</sup>-mBCs generierte ein SLE-Patient. Bei allen drei Gruppen gab es eine positive Korrelation zwischen der Gesamt-Gedächtnis-B-Zellzahl und der TT<sup>+</sup>-mBCs. Bei den Gesunden korrelierten zusätzlich die Gesamt-B-Zellzahl, die Anzahl an TT<sup>+</sup>Ro52<sup>+</sup>-mBCs und die Anzahl an Ro52<sup>+</sup>-mBCs positiv mit dem Nachweis an TT<sup>+</sup>-mBCs. Bei den RA-Patienten gab es ebenfalls eine leichte positive Korrelation zwischen dem Nachweis an Ro52<sup>+</sup>-mBCs und den TT<sup>+</sup>-mBCs.

Die Höhe der Prednisolon-Dosis hatte keinen Einfluss auf den Nachweis an TT<sup>+</sup>-mBCs (SLE:  $r = -0,3744$ ,  $p = 0,2553$ , RA:  $r = -0,3744$ ,  $p = 0,2553$ ).

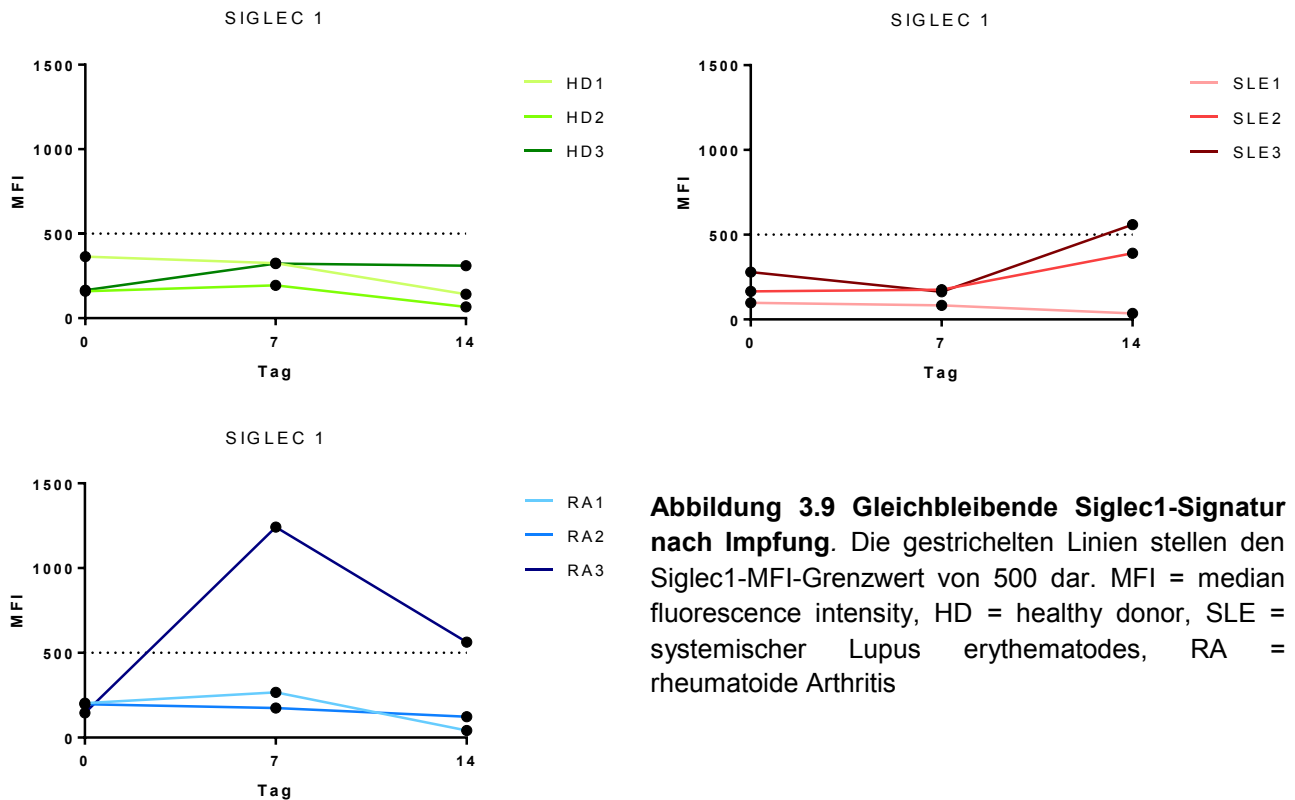
### 3.5 Ergebnisse der Impfstudie

Nach Untersuchung der antigenspezifischen B-Zellen bzw. der anderen Parameter im Steady State wurde in einem nächsten Schritt die Kinetik unter den Bedingungen einer Immunaktivierung mittels Impfung analysiert.

#### 3.5.1 Gleichbleibende Siglec1 (CD169)-Signatur nach Impfung

Keiner der sechs Patienten entwickelte innerhalb der ersten 14 Tage nach Impfung Symptome eines Krankheitsschubs oder fühlte sich subjektiv schlechter als vor der Impfung. Auch die gesunden Probanden berichteten über keine außergewöhnliche Impfreaktion.

Zur Bestimmung der Krankheitsaktivität wurde bei allen Probanden die Siglec1-MFI an Tag 0 vor sowie an Tag 7 und Tag 14 nach der Impfung bestimmt. Der Verlauf ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Alle Probanden waren vor der Impfung Siglec1-negativ (MFI < 500) und blieben außer der Patientin RA3 auch an Tag 7 und Tag 14 nach der Impfung Siglec1-negativ (bzw. war bei SLE3 an Tag 14 ein leichter Anstieg auf 559 zu verzeichnen). Bei RA3 stieg der Wert von Tag 0 zu 7 von einer MFI von 145 auf 1242 an und sank an Tag 14 ohne korrelierende Klinik bzw. Impfreaktion auf 563 ab. Insgesamt zeigte sich zwischen Patienten und Gesunden kein nennenswerter Unterschied.

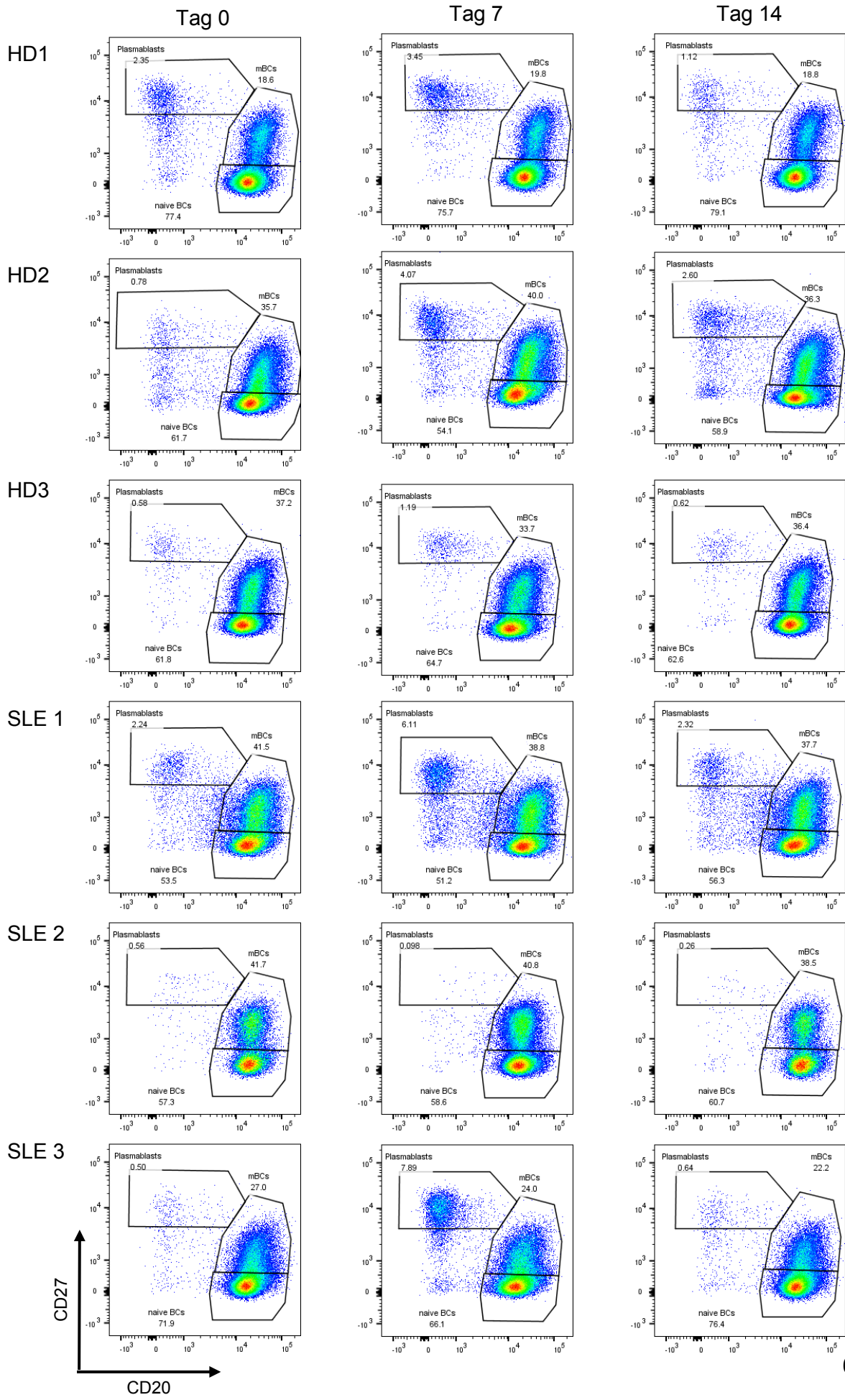


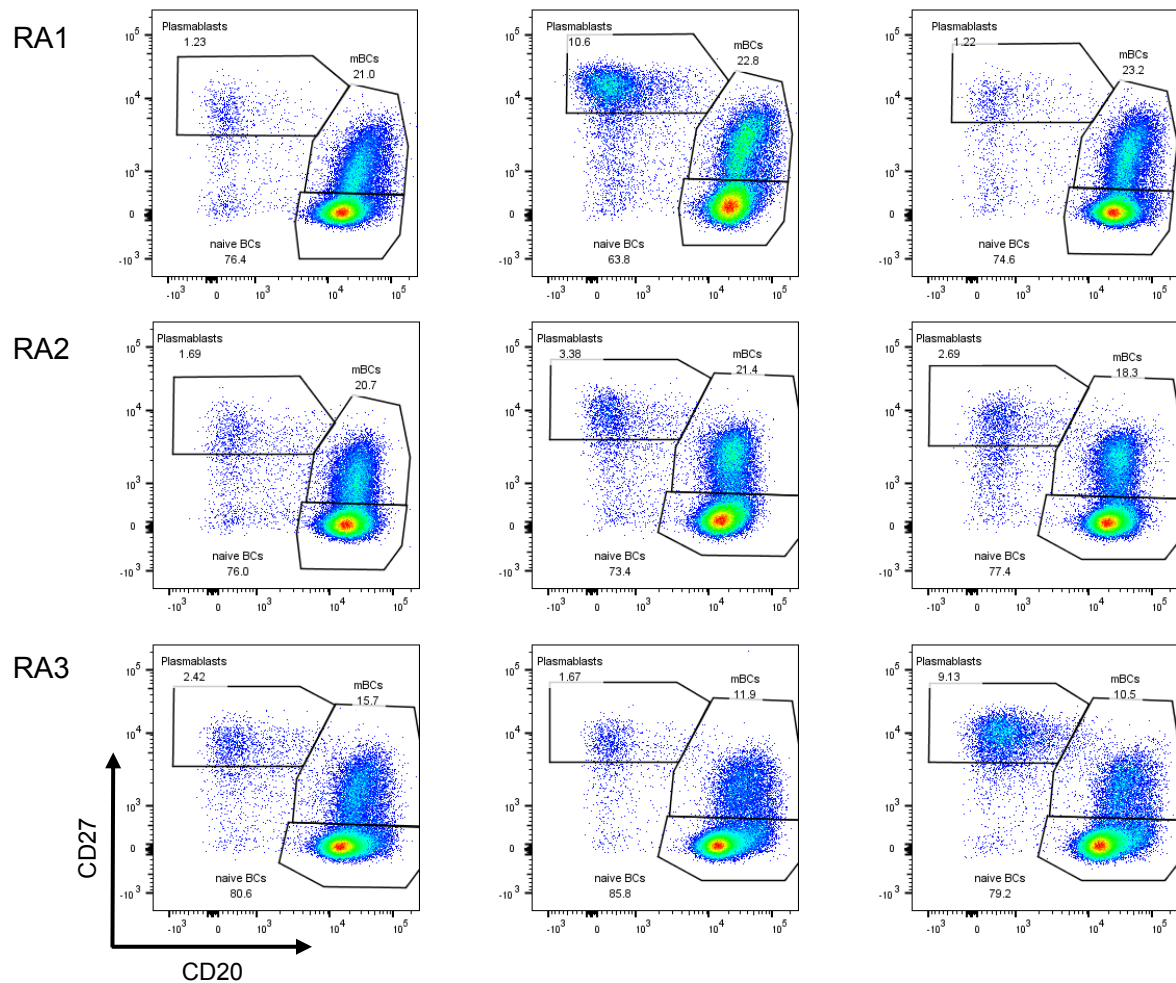
**Abbildung 3.9 Gleichbleibende Siglec1-Signatur nach Impfung.** Die gestrichelten Linien stellen den Siglec1-MFI-Grenzwert von 500 dar. MFI = median fluorescence intensity, HD = healthy donor, SLE = systemischer Lupus erythematodes, RA = rheumatoide Arthritis

### 3.5.2 Typischer Plasmablastenanstieg an Tag 7 nach Impfung

Wie eingangs dargelegt, wird nach einer Impfung ein Anstieg (antigenspezifischer) Plasmablasten ( $CD20^{low}CD27^{high}$ ) im Blut erwartet. Dieser Anstieg erreicht ca. sieben Tage nach einer Auffrischimpfung seinen Höchstwert und fällt anschließend wieder ab (28).

Bis auf die Patienten SLE2 und RA3 war dies bei allen Probanden der Fall, wie aus Abbildung 3.10 ersichtlich wird. An Tag 7 erkennt man eine definierte Population von Plasmablasten, die an Tag 14 wieder deutlich zurückgeht. Bei SLE2 war weder an Tag 0, 7 oder 14 eine Plasmablastenpopulation zu sehen. Bei RA3 kam es von Tag 0 zu Tag 7 zunächst zu einer Reduktion der Plasmablasten von 2,42 % auf 1,67 % und dann verspätet an Tag 14 zu einer verstärkten Produktion von Blasten mit 9,13 %. Dieser Verlauf scheint insofern interessant, als dass RA3 bereits in Bezug auf die Siglec1-Expression einen anderen Verlauf als die restlichen Probanden aufzeigte.

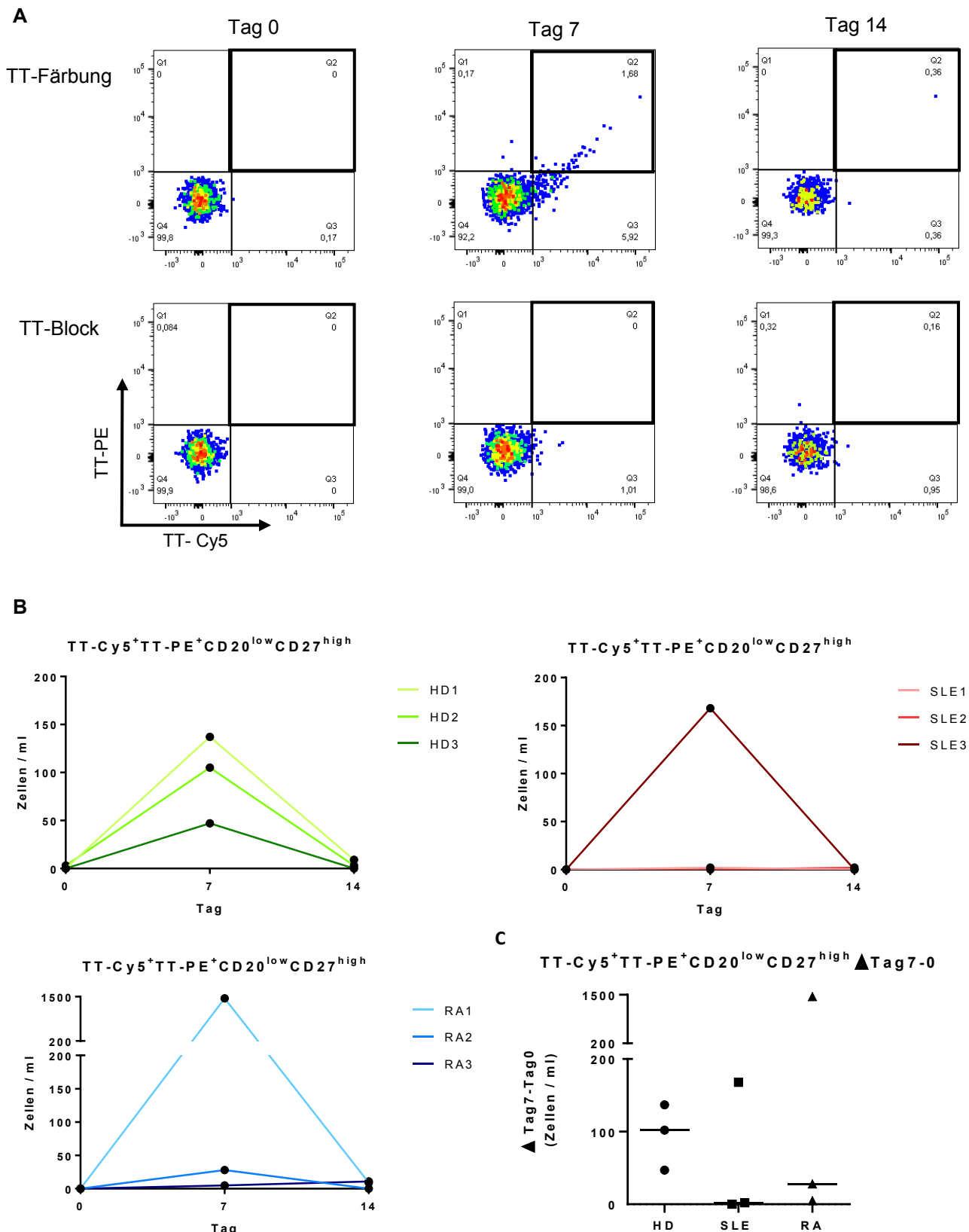




**Abbildung 3.10 Generierung von Plasmablasten an Tag 7 nach Boostrix®-Impfung im Blut.** Neben den Plasmablasten ( $CD20^{low}CD27^{high}$ ) sind die Gedächtnis-B-Zellen (mBCs,  $CD20^{+}CD27^{+}$ ) und naiven BCs ( $CD20^{+}CD27^{-}$ ) aller geimpften Probanden zu sehen; HD = healthy donor, SLE = systemischer Lupus erythematodes, RA = rheumatoide Arthritis

### 3.5.3 Generierung TT-spezifischer Plasmablasten an Tag 7 nach Impfung

Wie in Kapitel 3.5.2 bereits beschrieben, generierten fast alle Probanden an Tag 7 verstärkt Plasmablasten in Reaktion auf die TT-Impfung. Im nächsten Schritt wurden diese auf ihre Spezifität gegenüber dem TT untersucht. Um möglichst „hochspezifische“ Zellen zu identifizieren, wurde - anders als bei den Färbungen der Baseline-Messung - eine zusätzliche Färbung durchgeführt, in der neben Cy5-konjugiertem TT auch PE-konjugiertes TT enthalten war. Die Zellen, die doppelt positiv waren, also beide TT-Antigene binden konnten, galten als hochspezifisch und wurden für die weitere Auswertung herangezogen. Abbildung 3.11 A zeigt exemplarisch die Generierung doppelt positiver Plasmablasten eines gesunden Spenders.



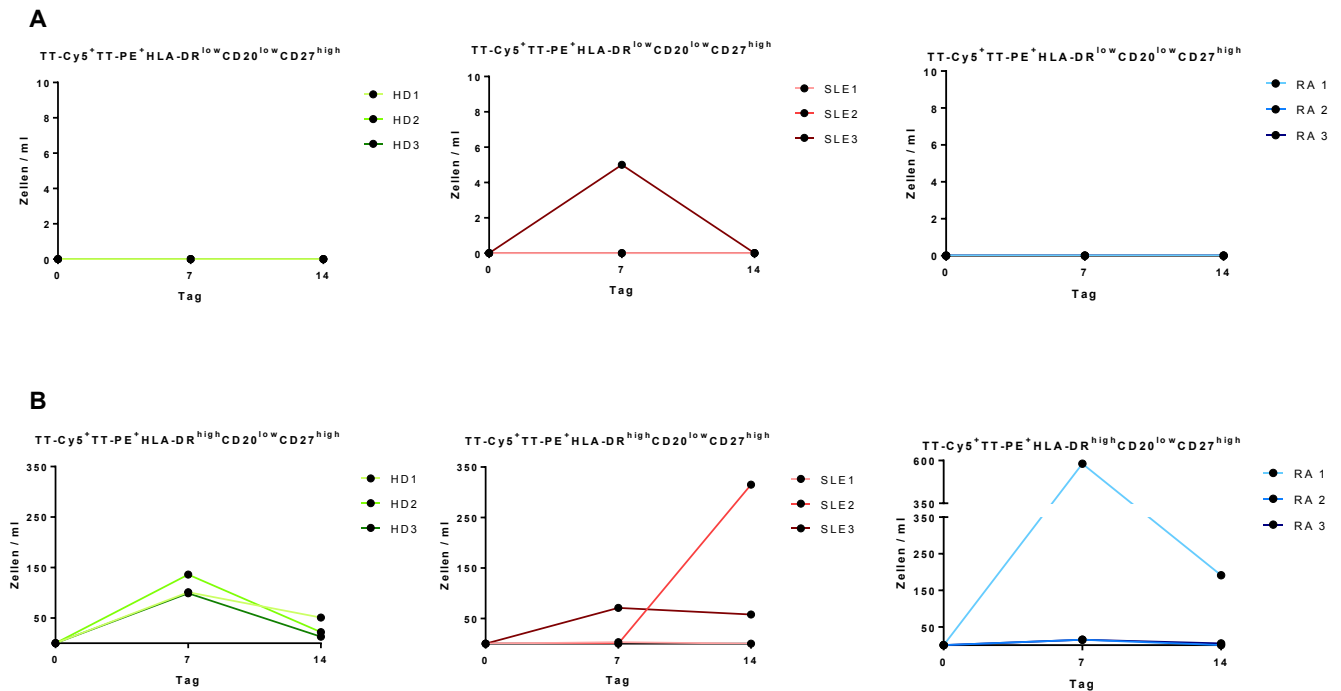
**Abbildung 3.11 Generierung TT-spezifischer Plasmablasten (TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>) nach Boostrix®-Impfung. A:** Exemplarische Darstellung der TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>-Zellen eines HD an Tag 0 vor sowie an Tag 7 und Tag 14 nach Impfung. In der oberen Reihe sind die TT-Färbungen zu sehen und unten der jeweils entsprechende Block. **B:** TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>-Level aller geimpften Probanden an Tag 0 vor sowie an Tag 7 und Tag 14 nach der Impfung. **C:** Differenz Tag 7- Tag 0 der TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>-Zellen aller geimpften Probanden; TT = Tetanustoxoid, HD = healthy donor, SLE = systemischer Lupus erythematoses, RA = rheumatoide Arthritis, ml = Milliliter,  $\Delta$  = Delta

Während an Tag 0 vor der Impfung keine doppelt positiven Zellen zu sehen sind, ist an Tag 7 eine klar abgrenzbare Population zu erkennen, die an Tag 14 wieder verschwunden ist. Der darunter abgebildete TT-Block zeigt eine Inhibition von 100 %, was die hohe Spezifität der an Tag 7 gebildeten Plasmablasten weiter belegt. Da ein Drei- bzw. Vierfachimpfstoff verwendet wurde, befinden sich unter den restlichen Plasmablasten mit hoher Wahrscheinlichkeit noch Diphtherie-, Pertussis- (und Poliomyelitis-) spezifische Plasmablasten.

In Abbildung 3.11 B sind die Ergebnisse der doppelt positiven TT-spezifischen Plasmablasten aller Probanden dargestellt. Man sieht, dass sich die HD alle ähnlich verhielten und alle TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>-Plasmablasten an Tag 7 bildeten (HD1 137, HD2 105 und HD3 47 Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>-Zellen/ml). Im Kontrast dazu zeigten die Patienten eine sehr unterschiedliche Impfreaktion. SLE3 und RA1, die umfangreich Plasmablasten nach der Impfung produzierten, generierten auch hohe Zahlen an TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>-Plasmablasten (168 bzw. 1451 TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>-Zellen/ml). Die anderen vier Patienten entwickelten trotz einer Induktion von Plasmablasten wie bei SLE1 und RA2 kaum spezifische Plasmablasten (SLE1 2, SLE2 0, RA2 28 und RA3 5 Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>-Zellen/ml).

Abbildung 3.11 C belegt die Differenz der doppelt positiven Plasmablasten  $\Delta$ Tag7-Tag0. RA3, die ihren Plasmablasten-Höchstwert an Tag 14 statt an Tag 7 entwickelte, wies an diesem Tag auch die meisten TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>-Zellen auf (11 Zellen/ml). Zur weiteren Beurteilung der Plasmablasten im aktivierten Immunzustand wurde in der Impfstudie HLA-DR als Antikörper hinzugegeben. HLA-DR ist ein Marker für frisch generierte Plasmablasten, der bei Ausreifung zur Plasmazelle herunterreguliert wird (14). Wie zu erwarten exprimierten keiner der Geimpften – bis auf SLE3 mit 5 Zellen/ml- TT-spezifischen Plasmablasten mit niedrigem HLA-DR-Gehalt (Abbildung 3.12 A). Bei Analyse der TT-spezifischen Plasmablasten mit hohem HLA-DR-Gehalt hingegen reagierten Gesunde und Patienten unterschiedlich (Abbildung 3.12 B). Bei den Gesunden stieg die Zahl dieser Zellen von Tag 0 zu Tag 7 an und sank bis Tag 14 wieder ab. SLE3 und RA1 zeigten ein ähnliches Verhalten. SLE1, RA2 und RA3, die kaum TT-spezifische Plasmablasten generierten, entwickelten auch kaum welche mit hohem HLA-DR-Gehalt. SLE2 entwickelte an Tag 14 sehr viele TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>HLA-DR<sup>high</sup>CD20<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>-Zellen, wobei es sich hierbei wahrscheinlich um ein Artefakt handelt, da die Patientin praktisch keine Plasmablasten generierte und eine einzelne positive Zelle bei Umrechnung so hohe Werte erbrachte.

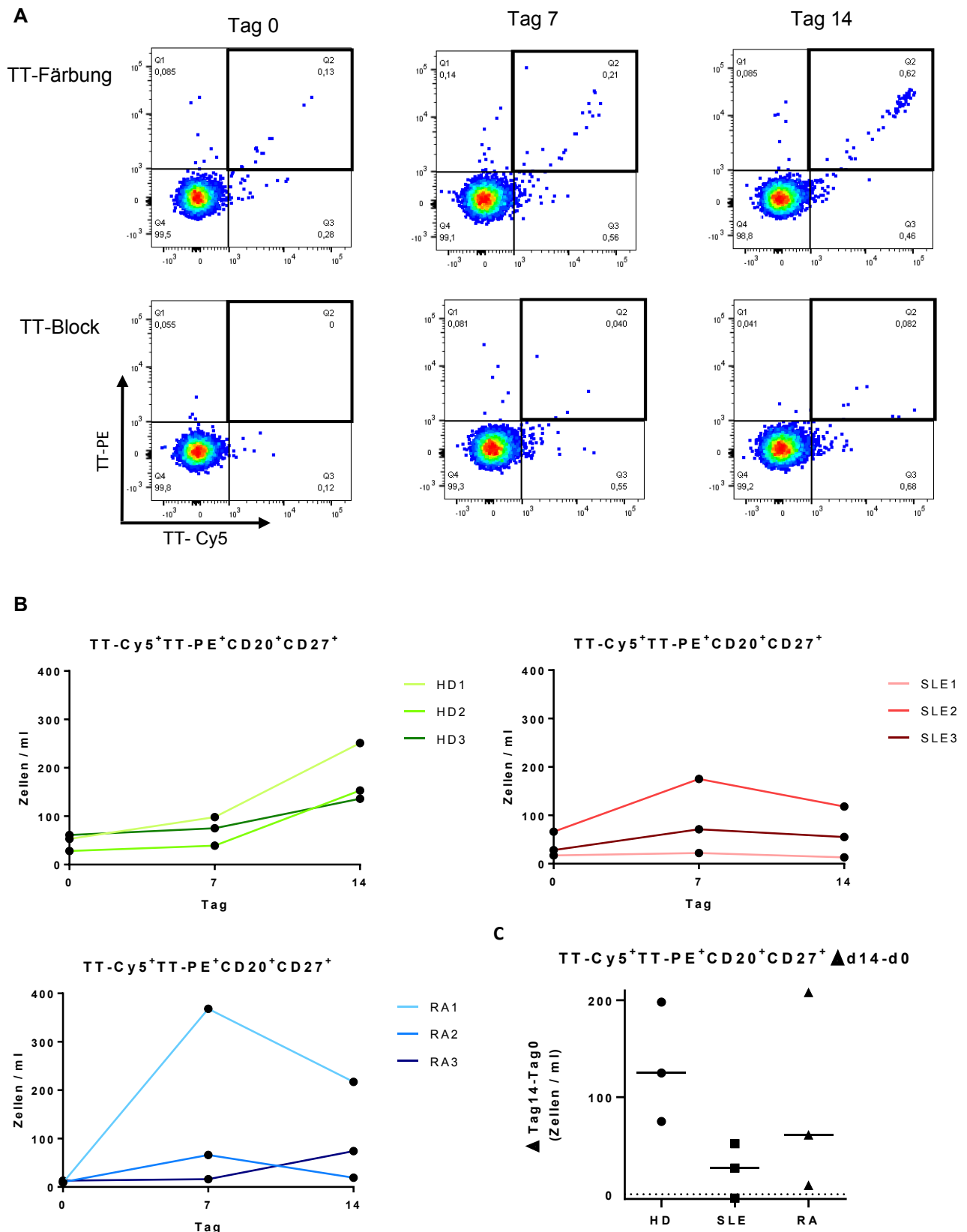




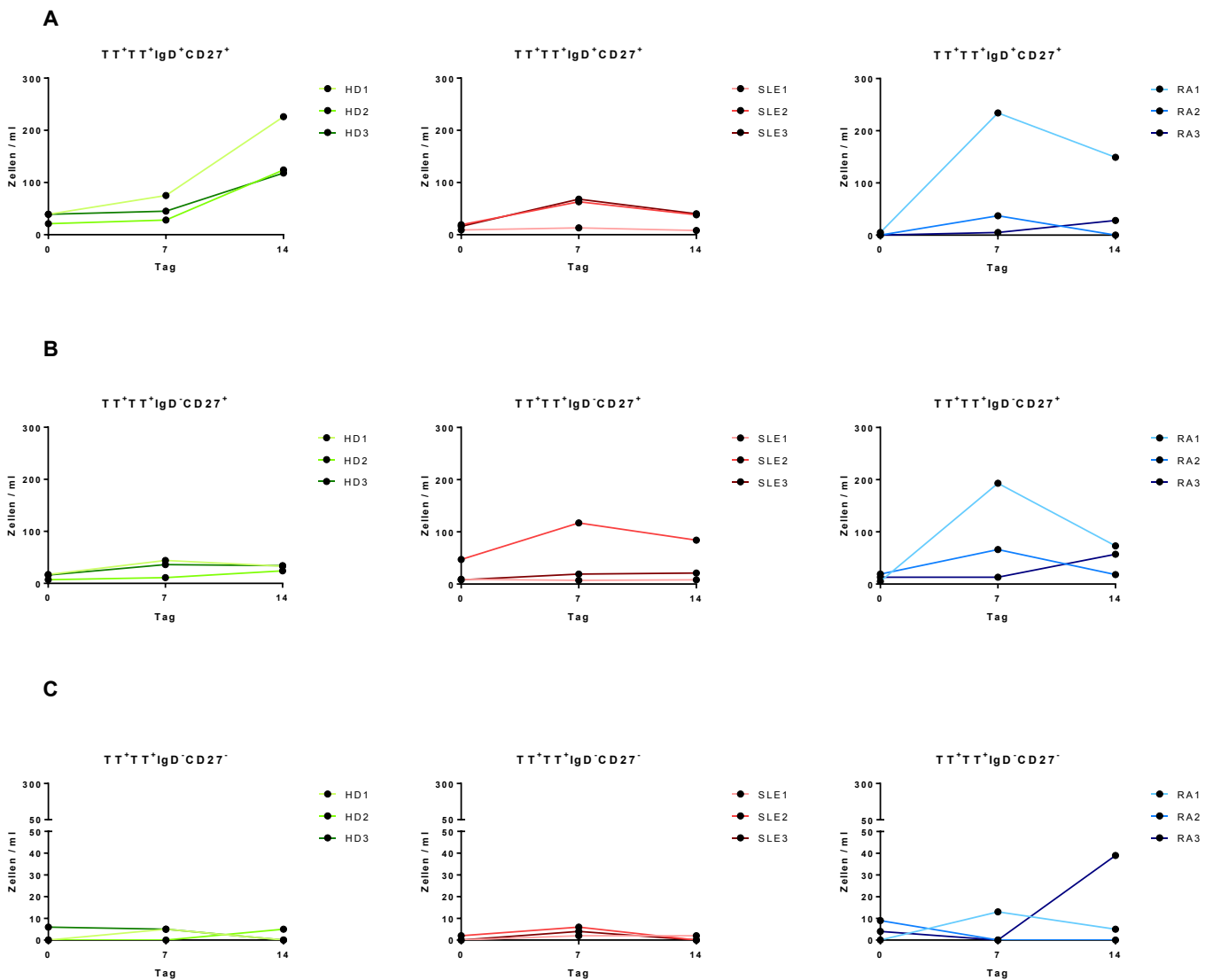
**Abbildung 3.12 Darstellung der TT-spezifischen Plasmablasten nach HLA-DR-Gehalt nach Boostrix®-Impfung.** TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low</sup>CD20<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>-Zellen (A) sowie TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>HLA-DR<sup>high</sup>CD20<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>-Zellen (B) an Tag 0 vor sowie an Tag 7 und Tag 14 nach der Boostrix®-Impfung; TT = Tetanustoxoid, HD = healthy donor, SLE = systemischer Lupus erythematodes, RA = rheumatoide Arthritis, ml = Milliliter

### 3.5.4 Generierung TT-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen an Tag 14 nach Impfung

Analog zu den Plasmablasten wurden für die Auswertung der TT-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen die doppelt positiven TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>-Zellen berücksichtigt. Abbildung 3.13 A stellt beispielhaft den Verlauf dieser doppelt positiven Gedächtnis-B-Zellen eines gesunden Spenders dar. Während an Tag 0 vor Impfung nur 0,13 % aller Gedächtnis-B-Zellen TT-Cy5- und TT-PE- positiv waren, waren es an Tag 7 nach Impfung 0,21 % und an Tag 14 0,62 %. Auch bei den anderen gesunden Probanden stieg die Anzahl TT-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen im Blut von Tag 0 über Tag 7 zu Tag 14 stetig an (Abbildung 3.13 B links oben). Die Analyse der verschiedenen Subpopulationen zeigte, dass dieser Gesamt-Anstieg vor allem auf einen Anstieg der nicht-klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen (TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) zurückzuführen war (Abbildung 3.14 A). Bei den klassengewechselten TT-spezifischen Subpopulationen IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> und IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> war hingegen nur eine sehr geringfügige Fluktuation zu verzeichnen und die Zahlen bewegten sich in einem verhältnismäßig niedrigen Zellzahlbereich (Abbildung 3.14 B und Abbildung 3.14 C).



**Abbildung 3.13 Generierung TT-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen (TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) nach Boostrix®-Impfung. A:** Exemplarische Darstellung der TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>-Zellen eines HD an Tag 0 vor sowie an Tag 7 und Tag 14 nach Impfung. In der oberen Reihe sind die TT-Färbungen zu sehen und unten der jeweils entsprechende Block. **B:** TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>-Level aller geimpften Probanden an Tag 0 vor sowie an Tag 7 und Tag 14 nach der Impfung. **C:** Differenz Tag 14- Tag 0 der TT-TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>-Zellen aller geimpften Probanden; TT = Tetanustoxoid, HD = healthy donor, SLE = systemischer Lupus erythematodes, RA = rheumatoide Arthritis, ml = Milliliter, Δ = Delta



**Abbildung 3.14 TT-spezifische Gedächtnis-B-Zell-Subpopulationen aller geimpften Probanden an Tag 0 vor sowie an Tag 7 und Tag 14 nach der Boostrix®-Impfung.** Abgebildet sind die  $TT-Cy5^+TT-PE^+IgD^+CD27^-$  (A),  $TT-Cy5^+TT-PE^+IgD^-CD27^-$  (B) und  $TT-Cy5^+TT-PE^+IgD^-CD27^-$  (C) Zellen aller Probanden; TT = Tetanustoxoid, HD = healthy donor, SLE = systemischer Lupus erythematodes, RA = rheumatoide Arthritis, ml = Milliliter

Während die TT-spezifischen  $IgD^-CD27^+$ -Zellen bei HD1 und HD3 von Tag 0 zu Tag 7 leicht anstiegen und anschließend wieder abfielen, zeigte HD2 einen leichten kontinuierlichen Anstieg (HD1: Tag 0 17, Tag 7 44, Tag 14 33 Zellen/ml; HD2: Tag 0 7, Tag 7 11 und Tag 14 24 Zellen/ml, HD3: Tag 0 16, Tag 7 36, Tag 14 34 Zellen/ml). Innerhalb der TT-spezifischen  $IgD^-CD27^-$ -Population zeigte HD1 einen leichten Anstieg bis Tag 7 mit anschließendem Abfall (Tag 0 0, Tag 7 5, Tag 14 0 Zellen/ml). Bei HD2 stieg und bei HD3 sank die Anzahl dieser Zellen kontinuierlich. Insgesamt waren die

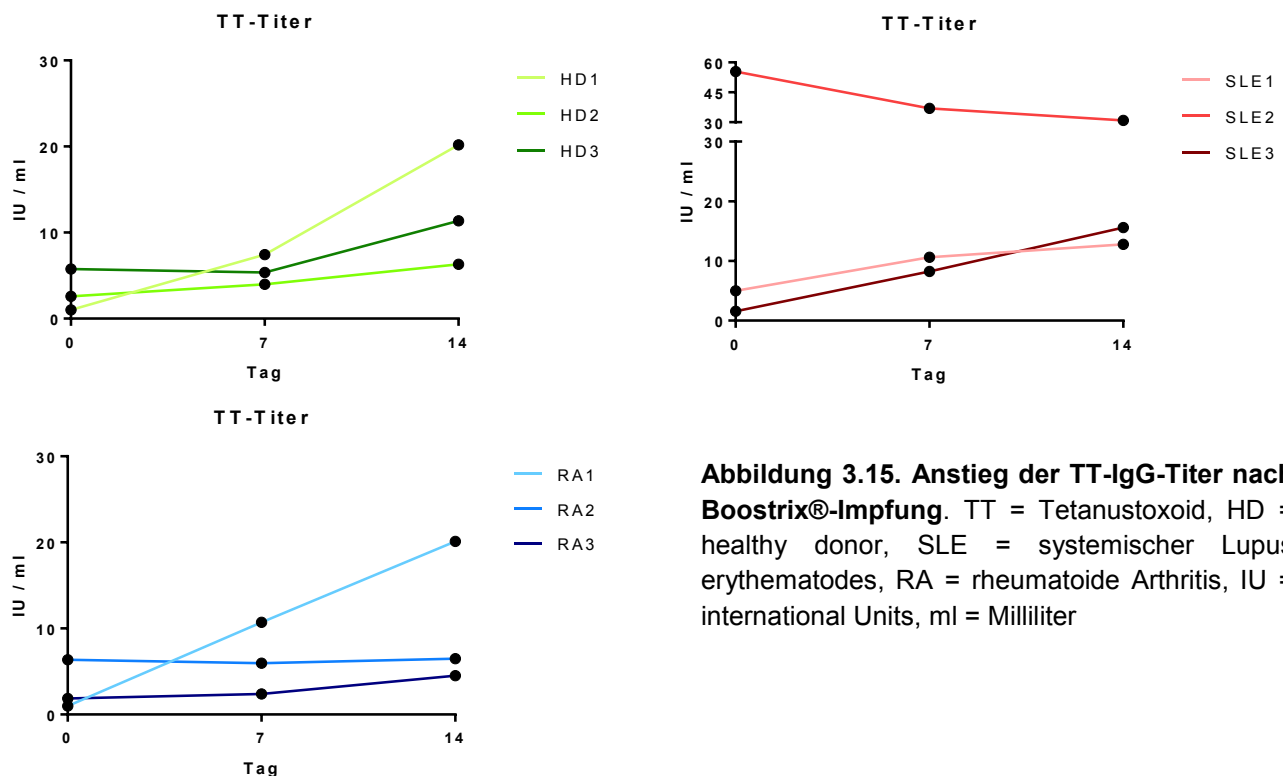
Abweichungen jedoch sehr moderat (HD2: Tag 0 0, Tag 7 0, Tag 14 5 Zellen/ml; HD3: Tag 0 6, Tag 7 5 und Tag 14 0 Zellen/ml).

Im Gegensatz zu den HD zeigten die SLE-Patienten einen etwas anderen Verlauf (Abbildung 3.13 B rechts oben). SLE1 zeigte praktisch keinen Zuwachs an TT-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen (Tag 0 17, Tag 7 22, Tag 14 13 Zellen/ml). Bei SLE2 und SLE3 stieg die Anzahl der Zellen von Tag 0 zu Tag 7 an und sank zu Tag 14 wieder ab (SLE2: Tag 0 66, Tag 7 175, Tag 14 118 Zellen/ml, SLE3: Tag 0 28, Tag 7 71, Tag 14 55 Zellen/ml). Insgesamt lag der Höchstwert der Gesamt-mBCs bei allen SLE-Patienten - anders als bei den HD - an Tag 7 statt an Tag 14. Dies bestätigte sich auch in der Aufgliederung in die verschiedenen Gedächtnis-B-Zell-Kompartimente. Hier zeigte sich in allen drei Kompartimenten der Höchstwert an Tag 7 oder es war kaum eine Fluktuation über die 14 Tage zu verzeichnen (Abbildung 3.14). SLE2, deren Impfung mindestens 20 Jahre zurücklag und die an Tag 7 nach Impfung keine spezifischen Plasmablasten generierte, hatte interessanterweise bereits vor der Impfung viele TT-spezifische mBCs. Die RA-Patienten zeigten unterschiedliche Impfverläufe. RA1 und RA2 erreichten ihren Höchstwert an TT-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen genau wie die SLE-Patienten an Tag 7 nach Impfung, wohingegen bei RA3 ein kontinuierlicher Anstieg wie bei den HD zu verzeichnen war (Abbildung 3.13 B links unten). Während die Kurve bei RA2 und RA3 jedoch verhältnismäßig flach verlief (RA2: Tag 0 10, Tag 7 66, Tag 14 19 Zellen/ml; RA3: Tag 0 13, Tag 7 16, Tag 14 74 Zellen/ml), zeigte RA1 von allen geimpften Probanden den stärksten Anstieg und Abfall an TT<sup>+</sup>-mBCs (Tag 0 9, Tag 7 368, Tag 14 217 Zellen/ml). Hierbei sei erwähnt, dass die Patientin nach Komplettierung der Grundimmunisierung vor ca. 25 Jahren keine Auffrischimpfungen im Jugendlichenalter erhielt. Die Dynamik der verschiedenen Subpopulationen entsprach bei allen RA-Patienten der der Gesamt-Gedächtnis-B-Zell-Population (Abbildung 3.14). RA3 demonstrierte als einziger Spender einen etwas stärkeren Anstieg TT-spezifischer Zellen innerhalb der sog. doppelt negativen Population (Tag 0 4, Tag 7 0, Tag 14 28 Zellen/ml). Abbildung 3.13 C zeigt den Zuwachs an TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>-Zellen in der Differenz  $\Delta$ Tag14-Tag0 aller Probanden auf. Hier zeigt sich, dass bei AID-Patienten weniger TT-spezifische Gedächtnis-B-Zellen als bei Gesunden induziert werden.

### 3.5.5 Steigende TT-Titer bei Patienten und Gesunden nach Impfung

Neben der zellulären Immunantwort wurde auch die humorale Immunantwort nach Impfung in Form der TT-IgG-Titer im Blut bestimmt. Alle Probanden wiesen an Tag 0 vor

der Impfung einen Titer von  $\geq 0.01$  IU/ml auf und hatten somit bereits vor der indizierten Auffrischimpfung einen ausreichenden Schutz gegen das Tetanustoxin. Bis auf RA2, RA3 und SLE2 zeigten die anderen sechs Probanden einen konstanten Titer-Anstieg von Tag 0 über 7 bis Tag 14 (Abbildung 3.15). RA2 und RA3 verzeichneten einen verhältnismäßig geringen Anstieg. SLE2, die gar keine (TT-spezifischen) Plasmablasten an Tag 7 generierte und an Tag 0 die höchste Anzahl an TT-Cy5<sup>+</sup>TT-PE<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>-Zellen aufzeigte, hatte an Tag 7 und Tag 14 die höchsten TT-Titer im Blut (Tag 7 36,98 IU/ml, Tag 14 30,88 IU/ml). Der TT-Titer an Tag 0 lag bei 55,42 IU/ml. Hierbei könnte es sich jedoch um ein Artefakt handeln, da die optische Dichte dieser Probe fast so hoch wie der höchste Wert der Standardkurve war. Nichtsdestotrotz deutet auch dies darauf hin, dass der Titer an Tag 0 bereits sehr hoch war.



**Abbildung 3.15. Anstieg der TT-IgG-Titer nach Boostrix®-Impfung.** TT = Tetanustoxoid, HD = healthy donor, SLE = systemischer Lupus erythematodes, RA = rheumatoide Arthritis, IU = international Units, ml = Milliliter

### 3.5.6 Keine Induktion autoantigenspezifischer B-Zellen nach TT-Impfung

Um die Auswirkung der TT-Impfung auf die Autoimmunerkrankungen - insbesondere mit Hinblick auf eine Bystander-Aktivierung - weiter zu beurteilen, wurden neben der Siglec1-MFI die antigenspezifischen Plasmablasten- und mBC-Level der Autoantigene Ro52 und PTX3 sowie die TT<sup>+</sup>Ro52<sup>+</sup> und TT<sup>+</sup>PTX3<sup>+</sup> doppelt positiven B-Zellen vor und nach

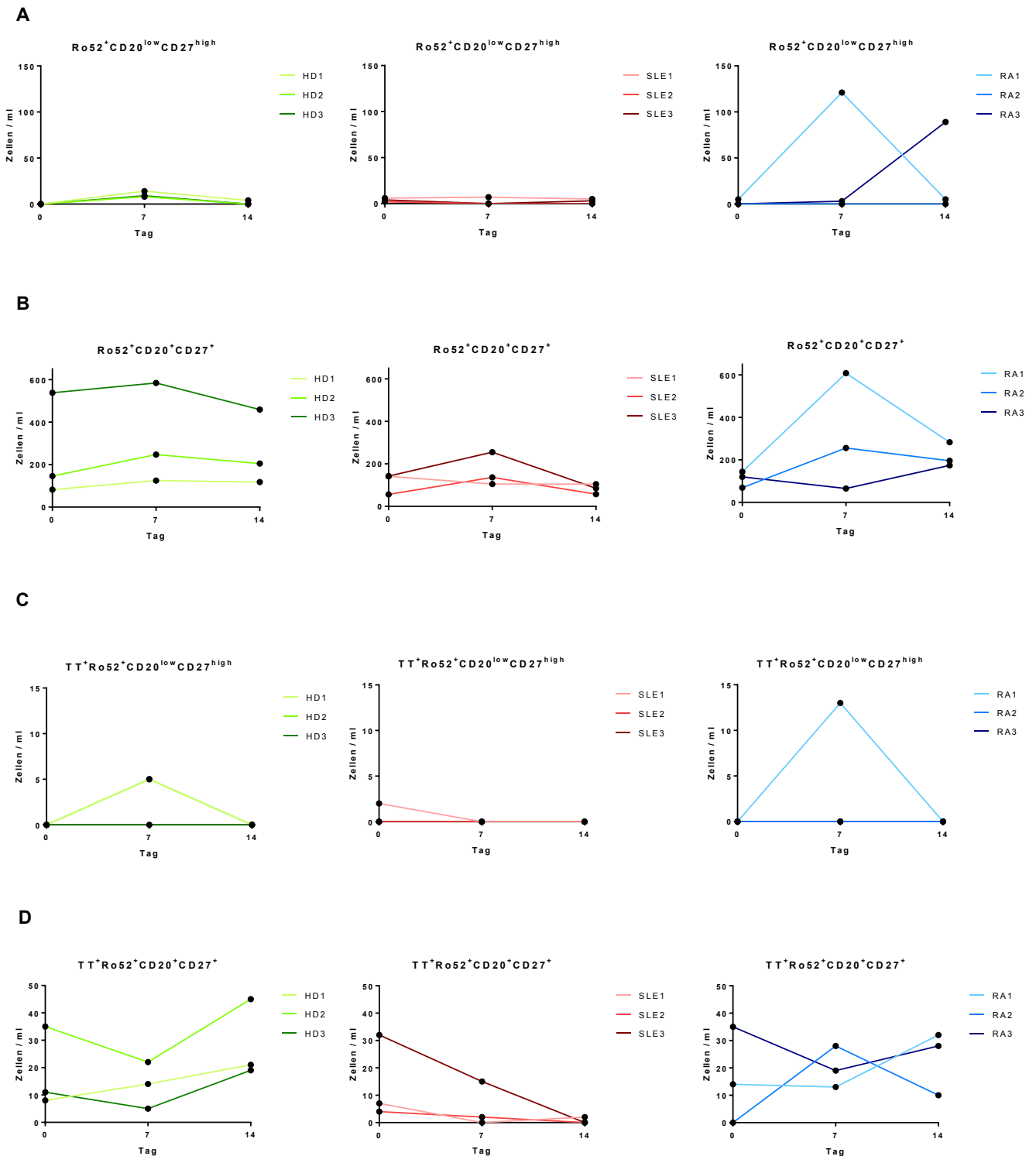
Impfung bestimmt. Da alle Probanden sowohl absolut als auch relativ betrachtet mehr Ro52- als PTX3-spezifische Zellen hatten, die Verläufe sich jedoch sehr ähnelten, wird im Folgenden repräsentativ für beide Autoantigene auf die Ro52-spezifischen Zellen fokussiert (Abbildung 3.16).

Die SLE-Patienten und RA1 wiesen bereits an Tag 0 vor der Impfung einige Ro52<sup>+</sup>-Plasmablasten auf (Abbildung 3.16 A, max. 6 Zellen/ml). Während die Anzahl der Zellen bei den SLE-Patienten über die 14 Tage der Nachbeobachtung kaum variierte, zeigte RA1 einen deutlichen Anstieg auf 121 Zellen/ml an Tag 7 mit anschließendem Abfall. Bei den HD war ebenfalls ein minimaler Anstieg (max. 14 Zellen/ml) an Tag 7 mit anschließendem Abfall zu sehen. RA3, die ihren Plasmablasten-Höchstwert verspätet an Tag 14 entwickelte, wies auch einen deutlichen Anstieg der Ro52<sup>+</sup>-Plasmablasten an diesem Tag auf. Die Werte bei RA2 blieben an allen Tagen bei 0.

In Übereinstimmung mit den Daten aus der Baseline-Messung hatten alle Probanden an Tag 0 bereits Ro52<sup>+</sup>-mBCs (Abbildung 3.16 B). Nach Impfung zeigten hier sieben der neun Probanden einen ähnlichen Verlauf: Von Tag 0 zu Tag 7 kam es zu einem Anstieg der Zellzahl mit anschließendem Abfall. Dabei hob sich RA1 insofern ab, als dass Anstieg und Abfall genau wie bei den Ro52<sup>+</sup>-Plasmablasten sehr viel steiler als bei den anderen sechs Probanden waren. RA3 verhielt sich genau invers dazu und SLE1 zeigte von Tag 0 auf Tag 7 eine Reduktion, bevor die Zellzahl konstant blieb.

Doppelt positive Plasmablasten (Abbildung 3.16 C) bildeten lediglich HD1 (5 Zellen/ml), HD2 (5 Zellen/ml) und RA1 (13 Zellen/ml) an Tag 7 aus. SLE1 hatte an Tag 0 2 TT<sup>+</sup>Ro52<sup>+</sup>-Plasmablasten/ml. Der Verlauf der doppelt positiven mBCs (TT<sup>+</sup>Ro52<sup>+</sup>mBCs, Abbildung 3.16 D) war sehr heterogen. Bei HD2, HD3, RA1 und RA3 fiel die Zahl der TT<sup>+</sup>Ro52<sup>+</sup>mBCs bis Tag 7 und stieg anschließend wieder an. Bei RA2 erhöhte sich die Anzahl der Zellen und sank dann wieder ab. Bei HD1 stiegen und bei SLE1 sanken die Zellen bis Tag 14 stetig. Bei den SLE2 und SLE3 variierte die Zellzahl kaum.

Zusammenfassend zeigte sich zwischen Patienten und Gesunden kein Unterschied in der Generation autoantigener B-Zellen nach Impfung. Es kam zwar bei allen Probanden zu einer gesteigerten Produktion anderer antigen- als nur TT-spezifischer B-Zellen und somit zu einer impfgetriggerten Bystander-Reaktion. Deren Anzahl sank jedoch bis Tag 14 fast wieder auf das Ursprungsniveau zurück bzw. bewegten sich die Zahlen in einem sehr niedrigen Bereich. Somit sind bei Gesunden als auch Patienten Kontrollmechanismen aktiv, die eine Expansion autoreaktiver Zellen nach Impfung begrenzen.



**Abbildung 3.16 Keine vermehrte Induktion von Ro52<sup>+</sup>- und TT<sup>+</sup>Ro52<sup>+</sup>- Plasmablasten (CD20<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>) und Gedächtnis-B-Zellen (CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) nach Boostrix®-Impfung.** Dargestellt sind die Ro52<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>- (A), Ro52<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>- (B), TT<sup>+</sup>Ro52<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>- (C) und TT<sup>+</sup>Ro52<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>- (D) Zellen an Tag 0 vor sowie an Tag 7 und Tag 14 nach Impfung; TT = Tetanustoxoid, HD = healthy donor, SLE = systemischer Lupus erythematodes, RA = rheumatoide Arthritis, ml = Milliliter

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden TT-, Ro52- sowie TT- und Ro52-spezifische B-Zell-Subpopulationen bei SLE- und RA-Patienten im sog. Steady State im Blut bestimmt und mit denen von Gesunden verglichen. Des Weiteren wurden SLE-Patienten, RA-Patienten und Gesunde gegen Tetanus geimpft und ihre antigenspezifische B-Zell-Impfantwort an Tag 0 vor sowie an Tag 7 und Tag 14 nach der Impfung gemessen. Neben dem TT- und Ro52-Antigen wurde hier zusätzlich das PTX3-Antigen untersucht. Parallel erfolgte bei allen Spendern eine Messung der TT-Antikörper-Titer.

Die absolute Anzahl TT- und Ro52-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen war bei SLE- und RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden im Steady State signifikant vermindert. Diese Verminderung wurde vor allem durch die nicht-klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen bedingt. Innerhalb der RA-Kohorte korrelierte die Anzahl TT-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen negativ mit dem Alter. Bei den SLE-Patienten zeigte sich eine negative Korrelation zwischen TT<sup>+</sup>-mBCs und der Siglec1-MFI. Die Analyse der TT- und Ro52-doppelt positiven Gedächtnis-B-Zellen ergab ebenfalls eine signifikant niedrigere Absolutzahl bei Patienten verglichen mit Gesunden. Demgegenüber war der Titer an TT-spezifischen Antikörpern zwischen den drei Gruppen vergleichbar.

Nach TT-Impfung entwickelte keiner der Patienten einen Krankheitsschub und es kam zu keiner nennenswerten impfgetriggerten Bystander-Reaktion gegen die beiden Kontrollantigene. Während die Gesunden alle ähnlich reagierten, variierte die Impfantwort der Patienten deutlich. So entwickelten einige Patienten nur wenige und andere übermäßig viele Plasmablasten. Bei Betrachtung der TT-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen zeigten die Patienten eine geringere Induktion als die Gesunden. Bei den SLE- und zwei der RA-Patienten zeigte sich der Höchstwert der TT<sup>+</sup>-mBCs an Tag 7 mit anschließendem Abfall, wohingegen bei den Gesunden ein konstanter Anstieg von Tag 0 zu Tag 14 nach Impfung zu verzeichnen war. Eine Analyse der einzelnen Gedächtnis-B-Zell-Kompartimente zeigte, dass dieser konstante Anstieg der Gesamt-mBCs bei den Gesunden durch einen Anstieg der nicht-klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen hervorgerufen wird. Der TT-Antikörper-Titer stieg bei acht Geimpften nach Impfung an.



Insgesamt zeigt die Studie erste Einsichten in unterschiedliche zelluläre Kinetiken nach Impfung zwischen Autoimmunpatienten und Gesunden, die Hypothesen für tiefere Untersuchungen ergeben.

## **4.2 Interpretation und Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien**

### **4.2.1 B-Zell-Subpopulationen und Siglec1-Signatur bei SLE- und RA-Patienten**

Die hier untersuchte SLE-Kohorte wies signifikant weniger periphere B-Zellen als die gesunde Kohorte auf (Abbildung 3.1). Dieses Ergebnis stimmt mit der allgemein bekannten B-Lymphopenie bei SLE-Patienten überein, die einerseits durch die Autoimmunerkrankung selbst und andererseits durch die immunsuppressive Therapie verursacht wird (17, 67). Des Weiteren zeigten die SLE-Patienten einen signifikant höheren Anteil sog. doppelt negativer (DN) B-Zellen auf, was ebenfalls bereits bekannten Beobachtungen entspricht (Abbildung 3.2) (16). Die Bedeutung dieser doppelt negativen Population ist bislang noch unklar und Gegenstand aktueller Forschung.

Im Unterschied zu diesen Übereinstimmungen konnte die bereits vielfach beschriebene Expansion von Plasmablasten bei SLE-Patienten (17) sowie die signifikant erhöhte Siglec1-Expression bei SLE- und RA-Patienten (4, 6) gegenüber Gesunden nicht bestätigt werden (Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3). Dies liegt vermutlich daran, dass beide Parameter positiv mit der Krankheitsaktivität korrelieren und die hier untersuchten Patienten jedoch größtenteils klinisch inaktiv waren bzw. nur eine milde Krankheitsaktivität aufzeigten.

In der RA-Kohorte konnte kein signifikanter Unterschied in der Gesamt-B-Zellzahl gegenüber Gesunden nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von Souto-Carneiro et al. (20) überein, wobei die Datenlage hier insgesamt sehr heterogen und begrenzt ist. Das typische verminderte Vorkommen nicht-klassengewechselter Gedächtnis-B-Zellen im Blut von RA-Patienten gegenüber Gesunden bestätigte sich (22).

Aufgrund der Übereinstimmung dieser Daten mit allgemein bekannten Charakteristika von SLE- und RA-Patienten (4, 6, 16, 17, 20) können die hier generierten Ergebnisse der antigenspezifischen B-Zellen stellvertretend für die o.g. Autoimmunerkrankungen gelten.

## **4.2.2 TT-Impfschutz bei Autoimmunpatienten und Gesunden**

### **4.2.2.1 TT-Block**

Zum Nachweis der spezifischen Bindung des TT an den BCR wurde für die Mehrheit der Spender erfolgreich ein TT-Block durchgeführt. Schaut man sich den TT-Block im Grundzustand (Abbildung 3.4) und direkt nach Impfung (Abbildung 3.11 und Abbildung 3.13) an, sieht man, dass der Block nach Impfung eine Inhibition von nahezu 100 % zur Folge hat, während im Grundzustand noch einige TT-spezifische B-Zellen nachweisbar sind. Dies zeigt, dass direkt nach einer Impfung hochspezifische Gedächtnis-B-Zellen generiert werden, deren Spezifität mit der Zeit wieder abnimmt.

### **4.2.2.2 Verminderter zellulärer Impfschutz von Autoimmunpatienten**

Während zahlreiche Studien die humorale Immunantwort gegenüber Impfantigenen bei Autoimmunpatienten untersucht haben, gibt es nur wenige Studien, die Informationen zur zellulären Immunantwort liefern. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit exemplarisch TT-spezifische B-Zellen bzw. B-Zell-Subpopulationen bei SLE- und RA-Patienten im Blut untersucht. Die Analyse wurde sowohl im Grund- als auch im aktivierten Zustand nach Impfung durchgeführt. Da vorausgegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt haben, dass (Gedächtnis-)B-Zellen von Autoimmunpatienten eine verminderte Responsivität gegenüber verschiedener Stimuli aufweisen und sich - unabhängig von der Immunsuppression - in einem sog. postaktivierten Zustand befinden (71), resultierte die Hypothese, dass sie auch geringer auf impfpräventable Antigene reagieren und folglich weniger antigenspezifische (Gedächtnis-)B-Zellen generieren könnten.

Tatsächlich hatten beide Patientengruppen im Steady State signifikant weniger TT-spezifische Gedächtnis-B-Zellen als Gesunde (Abbildung 3.5). Auch innerhalb der ersten zwei Wochen nach TT-Impfung generierten beide Patientengruppen weniger TT-spezifische Gedächtnis-B-Zellen als Gesunde, obgleich der Unterschied hier aufgrund der geringen Fallzahl an Geimpften nicht signifikant war (Abbildung 3.13). Auf den ersten Blick scheint diese absolute Reduktion antigenspezifischer Gedächtnis-B-Zellen angesichts der Tatsache, dass beide Patientengruppen auch insgesamt weniger (Gedächtnis-)B-Zellen als die Gesunden aufzeigten, plausibel. Zudem korrelierte die Anzahl TT-spezifischer mBCs mit der Anzahl der Gesamt-mBCs (Tabelle 3.3). Da Gedächtnis-B-Zellen jedoch eine Schlüsselrolle in der sekundären Immunantwort spielen, stellt sich die Frage, ob Autoimmunpatienten über einen ausreichenden

zellulären Schutz gegenüber impfpräventablen Erkrankungen wie zum Beispiel Tetanus verfügen.

Bei den RA-Patienten, die einen deutlich höheren Altersmedian als die anderen beiden Probandengruppen aufwiesen, korrelierte die Anzahl der TT<sup>+</sup>-mBCs negativ mit dem Alter der Patienten (Tabelle 3.3). Allgemein ist bekannt, dass das Immunsystem im Alter einer Immunseneszenz unterliegt und ältere Menschen daher vulnerabler gegenüber Infektionskrankheiten sind (72). Die rheumatoide Arthritis ist eine Erkrankung, die eher im höheren Alter auftritt, sodass RA-Patienten nicht nur bedingt durch die Erkrankung selbst, sondern auch durch das Lebensalter einen verminderten zellulären Schutz gegenüber impfpräventablen Antigenen aufweisen.

Bei den SLE-Patienten zeigte sich neben der absoluten auch eine relative Reduktion TT-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen im Grundzustand (Abbildung 3.5), was den Eindruck erweckt, dass die Gedächtnis-B-Zellen dieser Patienten nicht in der Lage sind, eine ausreichend protektive zelluläre Immunantwort gegenüber fremden Antigenen zu generieren. Unterstützt wird dieser Eindruck auch durch die Ergebnisse nach Impfung. Während die Anzahl TT-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen bei den Gesunden bis Tag 14 stetig anstieg, erreichten die SLE-Patienten an Tag 7 ihren Höchstwert mit anschließendem Abfall (Abbildung 3.13). Nach einer zunächst adäquat beginnenden Immunantwort schien diese nicht bis zum Ende ausgeführt werden zu können. Auch RA1 und RA2 zeigten solch einen Verlauf. RA3 verhielt sich zwar eher wie die gesunden Kontrollen, jedoch war der Anstieg von Tag 0 bis Tag 14 geringer.

Eine mögliche Erklärung für diese gestörte zelluläre Immunantwort liefern Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die eine Hyporesponsivität des BCR von Gedächtnis-B-Zellen bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen zeigten (71). Aufgrund einer chronischen *in vivo* Stimulation des BCR kann nach Antigenbindung keine adäquate Immunantwort ausgelöst werden. Die TT-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen, die nach Primärimpfung entstanden sind, reagieren nur schwach auf die erneute Antigenexposition und proliferieren und differenzieren weniger. Deutlich wird dies auch anhand der Patientin RA2: Die Patientin wies mit 474 B-Zellen/ $\mu$ l an Tag 0 die höchste B-Zellzahl aller geimpften Probanden auf, aber entwickelte verhältnismäßig wenig TT-spezifische Gedächtnis-B-Zellen nach Impfung.

Des Weiteren scheinen Typ I Interferone die Gedächtnis-B-Zellen zu beeinflussen, was an der negativen Korrelation der TT<sup>+</sup>-mBCs und der Siglec1 (CD 169)-Expression bei den SLE-Patienten deutlich wird (Tabelle 3.3). Je höher die Siglec1-Expression war, desto

weniger TT<sup>+</sup>-mBCs generierte ein SLE-Patient. Aufgrund der positiven Korrelation der IFN I-induzierten Siglec1-Expression auf Monozyten mit der Krankheitsaktivität (SLEDAI) bei SLE-Patienten würde dies zum einen bedeuten, dass klinisch aktive SLE-Patienten einen geringeren zellulären Schutz gegenüber impfpräventablen Antigenen aufweisen als klinisch inaktive SLE-Patienten. Zum anderen beweist dies indirekt den Einfluss der Typ I IFN in der Regulierung antigenspezifischer B-Zellen. Parallel durchgeführte Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten eine signifikant höhere Expression von STAT1, einem Transkriptionsfaktor, in verschiedenen B-Zell-Subpopulationen von SLE-Patienten gegenüber Gesunden beobachten, welche positiv mit der Siglec1-MFI korrelierte (73). Inwiefern die einzelnen Beobachtungen jedoch zusammenhängen, bedarf weiterer Untersuchungen. Aktuell werden die funktionellen Konsequenzen der erhöhten STAT1-Expression in unserer Forschungsgruppe analysiert.

Die gestörte zelluläre Immunität bei Autoimmunerkrankten wird auch anhand der Plasmablastenentwicklung nach Impfung deutlich. So zeigten die drei Gesunden einen recht homogenen Verlauf und entwickelten ähnlich viele TT-spezifische Plasmablasten (Abbildung 3.11), die alle ähnlich viel HLA-DR exprimierten (Abbildung 3.12). Die Patienten hingegen verhielten sich sehr heterogen. Entweder exprimierten sie deutlich mehr oder deutlich weniger TT-spezifische Plasmablasten verglichen mit den Kontrollen. Auch die HLA-DR-Expression der TT-spezifischen Plasmablasten variierte stark.

Zusammenfassend wird deutlich, dass Patienten mit Autoimmunerkrankungen eine verminderte zelluläre Aktivierung gegenüber impfpräventablen Antigenen aufweisen. Da sich über die hierfür verantwortlichen Mechanismen wie die Postaktivierung von B-Zellen jedoch nur spekulieren lässt, sind weitere Untersuchungen notwendig.

#### **4.2.2.3 Ausreichender humoraler Impfschutz von Autoimmunpatienten**

Neben der zellulären existiert die humorale Immunantwort, die vorrangig für die Produktion von Antikörpern verantwortlich ist. Diese Antikörper bilden zusammen mit den Gedächtniszellen einen wichtigen Bestandteil des immunologischen Gedächtnisses und verhindern bei Zweitkontakt mit einem Pathogen den erneuten bzw. nach Impfung überhaupt erst den Ausbruch einer Infektion (8). Die Produktion der Antikörper erfolgt durch langlebige im Knochenmark residente Plasmazellen, die unabhängig von den Gedächtniszellen fungieren (68, 69). Deutlich wird die Unabhängigkeit der zwei Systeme auch beispielhaft an Patient SLE1, der nach TT-Impfung kaum TT-spezifische

Gedächtnis-B-Zellen generierte (Abbildung 3.13), aber einen stetigen Anstieg der TT-IgG-AK aufzeigte (Abbildung 3.15).

Die Analyse der TT-IgG-Antikörper im Steady State ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und Gesunden, auch wenn der Median der Patienten etwas geringer lag (Abbildung 3.8). Nach Impfung stieg der TT-IgG-Titer aller Probanden mit Ausnahme von SLE2 an. Diese Ergebnisse stimmen mit den Erkenntnissen einer von Csuka et al. durchgeführten Studie überein, in der die Untersuchung der TT-IgG-AK von knapp 300 SLE-Patienten, 160 MG (Myasthenia gravis)- Patienten und 200 HD vergleichbare Titer zwischen den Gruppen erbrachte. Lediglich SLE-Patienten über 60 Jahren schienen in der Studie geringere TT-Titer aufzuweisen (50). In der hier durchgeführten Studie stiegen die TT-IgG-AK-Titer der ältesten zwei Probanden RA2 (65 Jahre) und RA3 (57 Jahre) nach Impfung verhältnismäßig gering an. Bei RA1 (27 Jahre) hingegen nahm der Titer stark zu. Dies verdeutlicht ebenfalls, dass das Immunsystem im Alter an Effektivität verliert bzw. die Anergie zunimmt. RA-Patienten weisen somit nicht nur einen verminderten zellulären, sondern aufgrund ihres Alters auch einen verminderten humoralen Schutz gegenüber Impfantigenen bzw. Infektionserregern auf. SLE2, die gar keine Plasmablasten nach Impfung generierte, hatte nichtsdestotrotz an allen drei Messtagen der Impfstudie die höchsten TT-IgG-AK-Titer. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der Körper aufgrund der bereits hohen vorhandenen TT-Titer keine Notwendigkeit sah, weitere TT-AK und somit auch keine Plasmablasten zu generieren. Erstaunlich ist hierbei jedoch, dass die letzte TT-Impfung der Patientin mehr als 20 Jahre zurücklag und deswegen eher niedrigere Titer erwartet wurden.

Zwei weitere Studien, die die TT-Antikörper-Titer von AID-Patienten untersuchten, ergaben ein konträres Ergebnis, d.h. einen verminderten humoralen TT-Impfschutz. Die eine Studie untersuchte jedoch nur Kinder und Jugendliche mit SLE und wies eine kleine Fallzahl auf (30 SLE-Patienten vs. 14 HD) (51). Bei der anderen Studie wurden zwar über 180 Patienten eingeschlossen, allerdings wiesen diese zehn unterschiedliche Autoimmunerkrankungen auf, welche allesamt zusammen und nicht getrennt betrachtet wurden. Des Weiteren erfolgte kein Vergleich mit einer gesunden Kohorte (52).

Kaur et al., die SLE-Patienten und Gesunde gegen Influenza impften und deren qualitative Immunantwort erfassten, beobachteten eine höhere Avidität und Neutralisierungskapazität der Antikörper der SLE-Patienten. Sie schlussfolgerten, dass SLE-Patienten sogar eine bessere humorale Immunantwort gegenüber fremden Antigenen generieren könnten als Gesunde. Das unbestrittene höhere Infektionsrisiko

von Autoimmunpatienten führen sie auf die „autoimmunen Komorbiditäten, die immunsuppressive Therapie und die krankheitsassoziierten Immunabnormalitäten wie die Leukopenie“ (74) zurück.

Insgesamt wird deutlich, dass die humorale Impfantwort bei Autoimmunerkrankten im Gegensatz zur zellulären Impfantwort intakt zu sein scheint, obgleich die Literatur teilweise widersprüchliche Ergebnisse liefert. Möglicherweise genügt der (effektivere) humorale (Impf-)schutz bei Autoimmunpatienten, um den verminderten zellulären Schutz gegen Infektionskrankheiten zu kompensieren. Daher sollten Impfungen vor dem Hintergrund des erhöhten Infektionsrisikos ein wichtiger Bestandteil in der Behandlung von Autoimmunerkrankten sein.

#### **4.2.2.4 Entwicklung der Gedächtnis-B-Zell-Subpopulationen nach Auffrischimpfung bei Gesunden**

Der physiologische Verlauf von B-Zellen nach einer Auffrischimpfung im Blut wurde bislang in zahlreichen Studien untersucht. Ca. sieben Tage nach Auffrischimpfung beobachtet man die Entstehung antigenspezifischer Plasmablasten, während antigenspezifische Gedächtnis-B-Zellen etwas zeitverzögert am Tag 14 ihren Höchstwert im Blut erreichen (28, 29). Was jedoch fehlt, sind Informationen zu den einzelnen Gedächtnis-B-Zell-Subpopulationen, sodass es ein Ziel dieser Arbeit war, diese Subpopulationen genauer zu untersuchen. Hierzu wurden TT-spezifische Zellen der IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> (vor Klassenwechsel)-, IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>- und IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> (beide nach Klassenwechsel)-Subpopulationen aller geimpften Probanden an Tag 0 vor sowie an Tag 7 und Tag 14 nach Boostrix®-Impfung bestimmt. Da man klassischerweise davon ausgeht, dass langlebige Gedächtnis-B-Zellen, die nach einer Primärimpfung entstehen, somatisch hypermutiert und klassengewechselt sind (1), war die Vermutung, dass bei erneutem Antigenkontakt durch Auffrischimpfung vor allem die klassengewechselten IgD<sup>-</sup>-mBCs proliferieren und in der Zirkulation vermehrt nachweisbar seien.

Interessanterweise war dies bei den drei gesunden Probanden nicht der Fall. Während die Anzahl nicht-klassengewechselter IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>-Zellen von Tag 0 zu Tag 14 im Blut stark anstieg, war der Anstieg im klassengewechselten IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>-Kompartiment verhältnismäßig begrenzt (Abbildung 3.14). Der stetige Anstieg der Gesamt-mBCs in den ersten 14 Tagen nach Auffrischimpfung im Blut ist also auf einen Anstieg der nicht-klassengewechselten mBCs zurückzuführen (Abbildung 3.13). Für den Ursprung dieser nicht-klassengewechselten mBCs kommen mehrere Möglichkeiten in Frage. Zum einen

könnten die IgD<sup>+</sup>-Gedächtnis-B-Zellen aus naiven B-Zellen neu generiert worden sein. Diese Option scheint jedoch fraglich, da Frölich et al. in ihren B-Zell-Analysen nach TT-Auffrischimpfung erstens eine klonale Verwandtschaft zwischen TT-spezifischen Plasmazellen und Gesamt-mBCs beobachteten und zweitens eine sehr hohe Mutationsfrequenz im Plasmazell-BCR an Tag 7 nach Impfung nachwies, welche einen Ursprung der Plasmazellen - und somit auch der mBCs - aus naiven B-Zellen unwahrscheinlich macht (28). Zum anderen könnten die IgD<sup>+</sup>-Gedächtnis-B-Zellen das Resultat proliferierender, nicht-klassengewechselter mBCs sein, die nach Primärimmunisierung entstanden sind. Schaut man sich die Anzahl TT-spezifischer Gedächtnis-B-Zell-Subpopulationen der gesunden Kohorte im Steady State im Blut an, sieht man, dass die nicht-klassengewechselten mBCs die CD27<sup>+</sup>-klassengewechselten zahlenmäßig übersteigen (Abbildung 3.5). Della Valle et al., die TT-spezifische IgM<sup>+</sup>-Gedächtnis-B-Zellen untersuchten, vermuten, dass IgM<sup>+</sup>-mBCs, die nach Primärkontakt mit einem Antigen entstehen, sehr nützlich seien, da sie bei erneutem Kontakt mit einer leicht mutierten Variante des Antigens noch die Fähigkeit zum Klassenwechsel und zur Ausbildung einer noch höheren Affinität besäßen. Bereits klassengewechselte mBCs könnten zwar schnell zu antikörperproduzierenden Plasmazellen differenzieren, jedoch seien hier kein Klassenwechsel und keine Affinitätsreifung mehr möglich (75).

Der verhältnismäßig schwache Anstieg der CD27<sup>+</sup>-klassengewechselten mBCs im Blut bei Gesunden könnte zwei Gründe haben: Entweder könnten sie bereits vollständig zu Plasmablasten bzw. Plasmazellen ausdifferenziert sein, sodass der Plasmablasten-Peak an Tag 7 indirekt auch die klassengewechselten mBCs repräsentieren könnte. Oder sie könnten nach Antigenbindung zur Proliferation und Ausdifferenzierung in die sekundären lymphatischen Organe gewandert sein, sodass sie in den ersten zwei Wochen nach Auffrischimpfung nicht im Blut nachweisbar sind. Halliley et al. impften Gesunde gegen Tetanus und analysierten ihre TT-spezifische Plasmazellantwort an Tag 0, 7 und 21 nach Impfung im Blut sowie an Tag 21 im Knochenmark. Während die Plasmazellen nach einem Anstieg an Tag 7 an Tag 21 gänzlich im Blut verschwunden waren, fand sich zu diesem Zeitpunkt eine definierte Population im Knochenmark wieder (76). Möglicherweise verhalten sich die klassengewechselten mBCs genau entgegengesetzt. Um folglich eine genaue Antwort auf all diese Fragen zu erhalten, wären B-Zell-Untersuchungen der sekundären lymphatischen Organe an Tag 0, Tag 7 und Tag 14 vor bzw. nach einer Auffrischimpfung sowie tiefergehende molekulare Analysen der variablen Immunglobulin-Segmente der einzelnen B-Zell-Subpopulationen erforderlich.

#### 4.2.3 Verminderte Anzahl Ro52-spezifischer B-Zellen bei Autoimmunpatienten

Um zu überprüfen, inwiefern sich die Immunantwort von Autoimmunerkrankten gegenüber körperfremden und körpereigenen Antigenen unterscheidet, wurden die B-Zellen zusätzlich zum TT auf ihre Antigenspezifität gegenüber dem Autoantigen Ro52 untersucht. Ro52 ist ein vorrangig in Immunzellen vorkommendes Protein, das als E3-Ubiquitin-Ligase die Übertragung des Proteins Ubiquitin auf andere Strukturen, beispielsweise auf verschiedene Interferon-Regulations-Faktoren (IRF) wie IRF3, IRF5, IRF7 oder IRF8 katalysiert (42, 43). Pathologisch vorkommende Auto-Antikörper gegen Ro52 lassen sich bei zahlreichen Autoimmunerkrankungen wie dem SLE oder dem pSS nachweisen und werden für die Diagnosestellung der Erkrankungen herangezogen (44). Bei Anti-Ro52-positiven Müttern, die ein Kind mit kongenitalem AV-Block geboren haben, konnte eine Assoziation zwischen dem Auftreten der Antikörper bei der Mutter und dem Auftreten des Herzfehlers bei den Kindern beobachtet werden (77). Insgesamt ist jedoch die pathologische Rolle der Autoantikörper als auch die pathologische und physiologische Funktion des Ro52-Proteins nicht vollständig geklärt.

In der vorliegenden Arbeit ergab die Untersuchung Ro52-spezifischer B-Zellen sowohl relativ als auch absolut signifikant weniger Ro52-spezifische Gedächtnis-B-Zellen bei SLE- und RA-Patienten gegenüber Gesunden (Abbildung 3.6). Autoimmunpatienten haben also weniger Gedächtnis-B-Zellen im Blut, die das Autoantigen Ro52 erkennen. Hierfür könnte beispielsweise ein Selektionsunterschied während des Reifungsprozesses der B-Zellen zwischen Autoimmunkranken und Gesunden ursächlich sein. Alternativ könnten die Ro52<sup>+</sup>-spezifischen B-Zellen bei Autoimmunkranken eher im Gewebe als im Blut lokalisiert sein. Oke et al. konnten z.B. ein erhöhtes Vorkommen des Ro52-Proteins in der Haut von Patienten mit kutanem Lupus erythematodes feststellen (78). Vielleicht löst diese erhöhte Expression des Proteins eine nachfolgende Migration der Ro52-spezifischen B-Zellen aus.

Espinosa et al. beobachteten eine erhöhte Expression von Ro52-mRNA in B-Zellen von SLE- und pSS-Patienten gegenüber Gesunden, welche sich auf Protein-Ebene jedoch nicht mehr nachweisen ließ. Diese Diskrepanz führten die Autoren auf einen schnelleren Abbau des Proteins zurück (43). Einige Jahre später entwickelte die gleiche Forschungsgruppe ein Ro52-Knock-Out Modell in Mäusen und beschrieb das Auftreten SLE-ähnlicher Symptome nach Kontakt der Ro52<sup>-/-</sup>-Mäuse mit einer Ohrmarke aus Metall, wohingegen die Ro52<sup>+/+</sup>-Mäuse gesund blieben (42). Um folglich einen



Zusammenhang zwischen all diesen Beobachtungen herstellen zu können, sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

#### **4.2.4 Polyreaktive B-Zellen sind eher ein Phänomen von Gesunden**

Im physiologischen Zustand werden auto- und polyreaktive Immunzellen durch Mechanismen der zentralen und peripheren Toleranz eliminiert, obgleich sich auch bei Gesunden auto- und polyreaktive Zellen in geringem Ausmaß nachweisen lassen (79). Autoimmunität ist hingegen durch Defekte der oben genannten Mechanismen gekennzeichnet (80), sodass man vermuten könnte, dass als Resultat vermehrt polyreaktive Zellen entstehen, die neben körperfremden auch körpereigene Strukturen erkennen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde exemplarisch untersucht, ob es B-Zellen gibt, die TT, ein körperfremdes Antigen, und Ro52 bzw. PTX3, zwei Autoantigene, im Sinne einer Polyreaktivität gleichzeitig binden. Während fast alle Gesunden im Steady State einige wenige TT-und-Ro52-doppelt positive B-Zellen in den verschiedenen Subpopulationen exprimierten, ließen sich bei vielen Patienten entgegen der Vermutung gar keine dieser doppelt positiven Zellen nachweisen (Abbildung 3.7). Statistische Signifikanz gegenüber den gesunden Kontrollen zeigte sich bei beiden Patientengruppen im Gedächtnis-B-Zell-Kompartiment und bei den SLE-Patienten zusätzlich im naiven B-Zell-Kompartiment. Im aktivierten Immunzustand nach Impfung stieg die Anzahl doppelt positiver Zellen bei den Kontrollen und RA-Patienten leicht an, während sie bei den SLE-Patienten sank oder sich gar nicht änderte (Abbildung 3.16). Somit scheinen polyreaktive B-Zellen eher ein Phänomen von Gesunden als von Erkrankten zu sein. Zu diesem Ergebnis kamen auch Chen et al., die CD20<sup>+</sup>-B-Zellen von Gesunden und Autoimmunerkrankten auf eine Doppelbindung mit Insulin und  $\beta$ -Galactosidase untersuchten (81). Die gesunden Probanden tendierten zu einer stärkeren prozentualen Expression von Insulin<sup>+</sup> $\beta$ -Galactosidase<sup>+</sup>B-Zellen als SLE-, RA und pSS-Patienten. Interessanterweise ergab die parallele Untersuchung von Nabelschnurblut gesunder Kinder eine noch stärkere Expression doppelt positiver B-Zellen, sodass man mutmaßen könnte, dass die Eigenschaft zur Expression von polyreaktiven Zellen im Alter nachlässt. Tatsächlich haben verschiedenste Untersuchungen der letzten Jahrzehnte das physiologische Vorkommen polyreaktiver Zellen und Antikörper nachweisen können und somit das Dogma der Klon-Selektionstheorie herausgefordert. Diese polyreaktiven B-Zellen, die auch Autoantigene erkennen können, weisen eine niedrige Affinität zu ihren

Antigenen auf und spielen vermutlich eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität (79, 82).

Im Gegensatz dazu beobachteten Yurasov et al. und Samuels et al. ein gesteigertes Vorkommen naiver B-Zellen mit polyreaktivem BCR bei SLE und RA-Patienten gegenüber Gesunden (83, 84). In beiden Untersuchungen wurde der BCR naiver B-Zellen durch Einzelzell-PCR amplifiziert, re-exprimiert und seine Reaktivität gegenüber vier verschiedenen Antigenen (ssDNA, dsDNA, Insulin, LPS) mittels ELISA gemessen. Die Bindung des Antikörper-Klons an alle vier Antigene ließ auf ein polyreaktives Verhalten schließen. Eine mögliche Erklärung dieser auf den ersten Blick diskrepant erscheinenden Ergebnisse könnte in einer unterschiedlichen Affinität des BCR zu seinen Antigenen liegen. Möglicherweise weisen die polyreaktiven BCR naiver B-Zellen von Autoimmunerkrankten eine höhere Affinität zu ihren Antigenen auf, was zu einem stärkeren Signal im ELISA geführt hat. Jedoch ist die absolute Anzahl dieser polyreaktiven naiven B-Zellen aufgrund der bei SLE- und RA vorkommenden niedrigeren Lymphozytenzahl insgesamt vermindert. Mietzner et al. konnten unter Anwendung der gleichen Methode keinen Unterschied in der Expression polyreaktiver IgG<sup>+</sup>Gedächtnis-B-Zellen zwischen SLE-Patienten und Gesunden feststellen. Dies legt nahe, dass die gestörten Prozesse, die sich im Gedächtnis-B-Zell-Kompartiment von Autoimmunerkrankten finden, unabhängig von denen im naiven Kompartiment sind (85). Während die o.g. Studien jedoch auf *in vitro* Analysen nach Re-Expression des BCRs von einzelnen B-Zellen basieren, wird durch die Methodik unserer Arbeitsgruppe der tatsächliche Status im Blut reflektiert.

#### **4.2.5 Impfungen verursachen eine limitierte Bystander-Reaktion**

Obwohl Infektionen zu den führenden Ursachen für Komplikationen bei Autoimmunpatienten zählen und dem Schutz vor impfpräventablen Infektionen durch Vakzinierung eine bedeutende Rolle zukommt, sind viele Autoimmunerkrankte nicht ausreichend geimpft. So erfüllten beispielsweise nur 65.8 % von über 500 SLE-Patienten einer deutschlandweit durchgeführten Studie die aktuellen Impfempfehlungen der STIKO für Tetanus. Als Hauptursache für den lückenhaften Impfstatus werden die Angst des Patienten vor einem impfgetriggerten Krankheitsschub sowie die Befürchtung vor Nebenwirkungen aufgeführt (31). Diese Bedenken resultieren vorrangig aus Fallberichten, in denen nach Impfung Krankheitsschübe aufgetreten sind, obgleich

mehrere größere Studien die Sicherheit von Totimpfstoffen im schubfreien Intervall bei Autoimmunpatienten beweisen konnten (31, 86, 87).

Auch in der hier durchgeführten Studie entwickelte keiner der sechs Patienten einen Krankheitsschub nach Impfung. Des Weiteren blieb die IFN I induzierte Siglec1-Expression, welche die Krankheitsaktivität bei SLE- und RA-Patienten widerspiegelt, bei allen Patienten außer bei RA3 nach Impfung nahezu unverändert (Abbildung 3.9). Dies unterstützt zum einen die Sicherheit von Impfungen bei Autoimmunerkrankten und zeigt zum anderen, dass Impfungen die IFN I-Signatur (mit Ausnahme von RA3) nicht beeinflussen.

Eine Theorie, wie Impfungen zum Ausbruch einer Autoimmunerkrankung führen können, ist die sog. Bystander-Reaktion: Neben dem zu erwartenden Anstieg antigenspezifischer Zellen gegen das geimpfte Antigen kommt es durch simultane Immunaktivierung zum gleichzeitigen Anstieg von autoreaktiven Zellen (34, 35). Um zu überprüfen, ob diese Reaktion auch zum Ausbruch eines Schubs bei bereits diagnostizierten AID-Patienten führen kann, wurden in der vorliegenden Arbeit neben den TT-spezifischen auch antigenspezifische B-Zellen mit Spezifität gegen Ro52 und PTX3 nach TT-Impfung bestimmt. Tatsächlich war bei fast allen Spendern ein Anstieg Ro52- und PTX3-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen und Plasmablasten an Tag 7 nach TT-Impfung zu verzeichnen (Abbildung 3.16). Der Anstieg war jedoch bis auf bei RA1 sehr limitiert und die Zahl der autoantigenspezifischen Zellen sank bis Tag 14 wieder fast auf das Ausgangsniveau zurück. Lediglich RA3 hob sich von den anderen Geimpften insofern ab, als dass der Anstieg der Ro52- und PTX3-spezifischen Plasmablasten erst an Tag 14 erfolgte. Da diese Patientin jedoch auch ihre Plasmablastenpopulation verspätet an Tag 14 entwickelte, ist anzunehmen, dass es im weiteren Verlauf ebenfalls zu einem Abfall der autoantigenspezifischen Plasmablasten gekommen ist. Eine leichte Bystander-Aktivierung nach TT-Impfung hat bei Gesunden und Autoimmunpatienten somit stattgefunden. Jedoch ist ihre Bedeutung als Auslöser für einen Krankheitsschub bei AID-Patienten aufgrund des geringen Anstiegs und des raschen Abfalls der autoantigenspezifischen B-Zellen eher fraglich. Es scheint eher, dass bei Gesunden und AID-Patienten Kontrollmechanismen aktiv sind, die eine Expansion autoreaktiver Zellen nach Impfung begrenzen. Bernasconi et al., die fünf Gesunde gegen TT impften, beobachteten neben dem Anstieg TT-spezifischer Plasmazellen einen gleichzeitigen Anstieg antigenspezifischer Plasmazellen gegen das Masern- und Toxoplasrose-Antigen, der im Verlauf sank (88). Sie schlussfolgerten, dass diese stattgefundenene

Bystander-Reaktion zur Aufrechterhaltung eines konstanten Antikörperspiegels dient. Genova et al., die zwölf Gesunde gegen TT impften und neben der TT-spezifischen auch die antigenspezifische Gedächtnis-T-Zell-Antwort der Antigene *Candida albicans* und Tuberkulin bestimmten, konnten ebenfalls eine Bystander-Reaktion der Kontrollantigene beobachten. Die Analyse der Antikörper ergab allerdings nur einen Anstieg der TT-spezifischen Immunglobuline (89).

Lee et al. impften Gesunde mit jeweils einem von vier verschiedenen Impfstoffen (TT, HBV, HPV und Influenza) und bestimmten anschließend die Anzahl antikörperproduzierender Zellen mit Spezifität für das geimpfte Antigen sowie der anderen drei Antigene (90). Sie konnten lediglich einen Anstieg antikörperproduzierender Zellen gegen das geimpfte Antigen, jedoch keinen gegen die drei anderen Antigene verzeichnen.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Datenlage bezüglich impfgetriggelter Bystander-Reaktionen sehr heterogen ist. Dies liegt vermutlich zum einen an den unterschiedlichen Antigenen und Zellpopulationen, die untersucht wurden, und zum anderen an der unterschiedlichen Methodik. Nichtsdestotrotz ist unsere Studie unser Kenntnis nach eine der ersten, die die Bystander-Reaktion bei Patienten mit Autoimmunerkrankung gemessen hat. Interessanterweise zeigten AID-Patienten nach TT-Impfung keinen Unterschied in der impfgetriggerten Bystander-Reaktion gegenüber Gesunden.

### **4.3 Stärken und Limitationen**

Eine Stärke der vorliegenden Arbeit ist die Verwendung von humanem Untersuchungsmaterial, wodurch die Ergebnisse der drei Kohorten als repräsentativ für alle SLE- und RA-Patienten sowie HD betrachtet werden können. Des Weiteren erfolgte die Beurteilung der Messparameter mit einem hochempfindlichen spezifischen Assay sowie in zwei verschiedenen Immunitätszuständen: im Grundzustand und im aktivierten Immunitätszustand nach TT-Impfung. Die Bindungsspezifität des TT wurde mittels Block bewiesen, wohingegen der spezifische Bindungsnachweis des Ro52-Antigens fehlt. Eine weitere Limitation ist die geringe Fallzahl der geimpften Probanden, wodurch zwar Tendenzen, aber keine statistischen Signifikanzen erreicht werden konnten. Darüber hinaus bestand die SLE-Kohorte fast ausschließlich aus klinisch inaktiven Patienten, sodass keine sicheren Aussagen zu klinisch aktiven Patienten getroffen werden können.

#### 4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend wird aus der vorliegenden Arbeit deutlich, dass Autoimmunerkrankte im Vergleich zu Gesunden einen verminderten zellulären, jedoch einen vergleichbaren bzw. möglicherweise sogar effizienteren humoralen Impfschutz gegenüber impfpräventablen Antigenen aufweisen. Eine impfgetriggerte Bystander-Reaktion der B-Zellen findet bei Gesunden und Autoimmunpatienten in vergleichbarem Maße statt, jedoch ist diese quantitativ und zeitlich begrenzt. Die Krankheitsaktivität von AID-Patienten - indirekt durch die Siglec1 (CD169)-Expression reflektiert - bleibt von einer Vakzinierung unberührt. Folglich sollten Impfungen zur Vorbeugung impfpräventabler Infektionskrankheiten als ein fester Bestandteil in die Therapieplanung von Autoimmunpatienten integriert werden.

Polyreaktive B-Zellen werden stärker von Gesunden als von AID-Patienten exprimiert und scheinen somit keine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie von Autoimmunität zu spielen. Ob die wenigen polyreaktiven B-Zellen trotzdem in den Krankheitsprozess von AID-Patienten involviert sind, bedarf weiterer Untersuchungen.

Entgegen ursprünglicher Vermutungen steigen bei Gesunden nach Impfung vor allem die nicht-klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen im Blut an. Tatsächlich geben die hier erhobenen Daten den „Status Quo“ im Blut wieder. Da die primären und sekundären lymphatischen Organe ebenfalls eine zentrale Rolle in der physiologischen und pathologischen Immunität spielen, würden Untersuchungen antigenspezifischer B-Zellen dieser Organe vor und nach Impfung wichtige ergänzende Informationen liefern. Hierzu wären murine Untersuchungen aufgrund der schwierigen Akquirierung von humanem Untersuchungsmaterial eine mögliche Option. Des Weiteren wären umfangreichere Untersuchungen klinisch aktiver SLE- und RA-Patienten interessant, um mögliche Unterschiede zu klinisch inaktiven Patienten detektieren zu können.

## Literaturverzeichnis

1. Murphy Kenneth; , Weaver Casey. Janeway Immunologie.2018. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 9. Aufl. . [cited 01/12/2020]. Available from: <https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-662-56004-4>.
2. Herold Gerd; , Mitarbeiter und. Innere Medizin 2020.2019. Köln : Gerd Herold, [cited 30/11/2020]. Available from: <https://www.degruyter.com/view/title/573400>.
3. Keikawus Arastéh Hanns-Wolf Baenkler, Christiane Bieber, Roland Brandt, Tushar Thomas Chatterjee, Thorsten Dill, Tilmann Ditting, Martin Duckert, Wolfgang Eich, Sabine Ernst, Ulrich Fischer-Rasokat, Stefan Fischli, Ralf Fleck, Dieter Fritze, Hermann Fießl, Johannes-Martin Hahn, Christian Hamm, Job Harenberg, Jürgen H. Hengstmann, Wolfgang Herzog, Jochen Hinkelbein, Thomas Hofmann, Axel Holstege, Kurt Huck, Jan Kähler, Monika Keller, Won-Keun Kim, Dietrich Klingmüller, Inger Knaevelsrud, Ralf Köster, Karl-Heinz Kuck, Christoph Liebetrau, Bernd Löwe, Nicole Loßnitzer, W. Alexander Mann, Axel Matzdorff, Thomas Müller-Tasch, Christoph A. Nienaber, Christoph Nikendei, Michael Nürnberg, Jürgen Pausch, Michael Petzsch, Michael Pfeifer, Wolfgang Rösch, Nina Sauer, Johannes Schäfer, Helmut Scherbaum, Christoph Scheurich, Brigitte Schlehofer, Michael Schmidt, Henrik Schneider, Mark Schöffauer, Joscha Schork, Andreas Schuchert, Michael Schwab, Hans-Udo Schweikert, Michael Spannagl, Heiko Stern, Hartmut Stocker, Klaus-Henning Usadel, Roland Veelken, Reinhard E. Voll, Peter Wahl, Erik Wißner, Arne Zastrow, Stefan Zeuzem, Reinhard Ziegler, Stephan Zipfel. Duale Reihe Innere Medizin.2018. Stuttgart : Thieme. 4., überarbeitete Auflage. [cited 30/11/2020]. Available from: [https://eref.thieme.de/ebooks/2263057#/ebook\\_2263057\\_SL85292937](https://eref.thieme.de/ebooks/2263057#/ebook_2263057_SL85292937).
4. Biesen R., Demir C., Barkhudarova F., Grün J. R., Steinbrich-Zöllner M., Backhaus M., Häupl T., Rudwaleit M., Riemekasten G., Radbruch A., Hiepe F., Burmester G. R., Grützkau A. Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(4):1136-45.
5. Gruber Gunter ; , Hansch Andreas. Blickdiagnosen Innere Medizin.2018. Urban & Fischer, [cited 01/12/2020]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/book/9783437240256/blickdiagnosen-innere-medizin>.
6. Xiong Y. S., Cheng Y., Lin Q. S., Wu A. L., Yu J., Li C., Sun Y., Zhong R. Q., Wu L. J. Increased expression of Siglec-1 on peripheral blood monocytes and its role in mononuclear cell reactivity to autoantigen in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2014;53(2):250-9.
7. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nature reviews Immunology*. 2017;17(5):281-94.
8. Rink Lothar; , Kruse Andrea; , Haase Hajo. Immunologie für Einsteiger.2015. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 2., neu bearb. u. aktualisierte Aufl., [cited 01/12/2020]. Available from: <https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-662-44843-4>.

9. Nutt S. L., Hodgkin P. D., Tarlinton D. M., Corcoran L. M. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(3):160-71.
10. Brooks J. F., Murphy P. R., Barber J. E. M., Wells J. W., Steptoe R. J. Peripheral Tolerance Checkpoints Imposed by Ubiquitous Antigen Expression Limit Antigen-Specific B Cell Responses under Strongly Immunogenic Conditions. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2020;205(5):1239-47.
11. Engel P., Bousmell L., Balderas R., Bensussan A., Gattei V., Horejsi V., Jin B. Q., Malavasi F., Mortari F., Schwartz-Albiez R., Stockinger H., van Zelm M. C., Zola H., Clark G. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2015;195(10):4555-63.
12. Wang K., Wei G., Liu D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Experimental hematology & oncology*. 2012;1(1):36.
13. Jackson S. M., Wilson P. C., James J. A., Capra J. D. Human B cell subsets. *Advances in immunology*. 2008;98:151-224.
14. Sanz I., Wei C., Jenks S. A., Cashman K. S., Tipton C., Woodruff M. C., Hom J., Lee F. E. Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Frontiers in immunology*. 2019;10:2458.
15. Klein U., Rajewsky K., Küppers R. 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. *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(9):1679-89.
16. Wei C., Anolik J., Cappione A., Zheng B., Pugh-Bernard A., Brooks J., Lee E. H., Milner E. C., Sanz I. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007;178(10):6624-33.
17. Odendahl M., Jacobi A., Hansen A., Feist E., Hiepe F., Burmester G. R., Lipsky P. E., Radbruch A., Dörner T. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2000;165(10):5970-9.
18. Jacobi A. M., Reiter K., Mackay M., Aranow C., Hiepe F., Radbruch A., Hansen A., Burmester G. R., Diamond B., Lipsky P. E., Dörner T. Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(6):1762-73.
19. Zhu L., Yin Z., Ju B., Zhang J., Wang Y., Lv X., Hao Z., He L. Altered frequencies of memory B cells in new-onset systemic lupus erythematosus patients. *Clinical rheumatology*. 2018;37(1):205-12.
20. Souto-Carneiro M. M., Mahadevan V., Takada K., Fritsch-Stork R., Nanki T., Brown M., Fleisher T. A., Wilson M., Goldbach-Mansky R., Lipsky P. E. Alterations in peripheral blood memory B cells in patients with active rheumatoid arthritis are dependent on the action of tumour necrosis factor. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(3):R84.

21. Adlowitz D. G., Barnard J., Biear J. N., Cistrone C., Owen T., Wang W., Palanichamy A., Ezealah E., Campbell D., Wei C., Looney R. J., Sanz I., Anolik J. H. Expansion of Activated Peripheral Blood Memory B Cells in Rheumatoid Arthritis, Impact of B Cell Depletion Therapy, and Biomarkers of Response. *PLoS one*. 2015;10(6):e0128269.
22. Hu F., Zhang W., Shi L., Liu X., Jia Y., Xu L., Zhu H., Li Y., Xu D., Lu L., Qiu X., Liu W., Qiao J., Wang Y., Li Z. Impaired CD27(+)IgD(+) B Cells With Altered Gene Signature in Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in immunology*. 2018;9:626.
23. Conigliaro P., Triggianese P., Perricone C., Chimenti M. S., Di Muzio G., Ballanti E., Guarino M. D., Kroegler B., Gigliucci G., Grelli S., Perricone R. Restoration of peripheral blood natural killer and B cell levels in patients affected by rheumatoid and psoriatic arthritis during etanercept treatment. *Clinical and experimental immunology*. 2014;177(1):234-43.
24. McComish J., Mundy J., Sullivan T., Proudman S. M., Hissaria P. Changes in peripheral blood B cell subsets at diagnosis and after treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis: correlation with clinical and laboratory parameters. *International journal of rheumatic diseases*. 2015;18(4):421-32.
25. Lübbers J., van Beers-Tas M. H., Vosslamber S., Turk S. A., de Ridder S., Mantel E., Wesseling J. G., Reijm M., van Hoogstraten I. M., Bijlsma J. W., van Schaardenburg D., Bontkes H. J., Verweij C. L. Changes in peripheral blood lymphocyte subsets during arthritis development in arthralgia patients. *Arthritis research & therapy*. 2016;18(1):205.
26. Blanchard-Rohner G., Pulickal A. S., Jol-van der Zijde C. M., Snape M. D., Pollard A. J. Appearance of peripheral blood plasma cells and memory B cells in a primary and secondary immune response in humans. *Blood*. 2009;114(24):4998-5002.
27. Giesecke C., Meyer T., Durek P., Maul J., Preiß J., Jacobs J. F. M., Thiel A., Radbruch A., Ullrich R., Dörner T. Simultaneous Presence of Non- and Highly Mutated Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)-Specific Plasmablasts Early after Primary KLH Immunization Suggests Cross-Reactive Memory B Cell Activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2018;200(12):3981-92.
28. Frölich D., Giesecke C., Mei H. E., Reiter K., Daridon C., Lipsky P. E., Dörner T. Secondary immunization generates clonally related antigen-specific plasma cells and memory B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;185(5):3103-10.
29. Wrammert J., Smith K., Miller J., Langley W. A., Kokko K., Larsen C., Zheng N. Y., Mays I., Garman L., Helms C., James J., Air G. M., Capra J. D., Ahmed R., Wilson P. C. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature*. 2008;453(7195):667-71.
30. Furer V., Rondaan C., Heijstek M. W., Agmon-Levin N., van Assen S., Bijl M., Breedveld F. C., D'Amelio R., Dougados M., Kapetanovic M. C., van Laar J. M., de Thurah A., Landewé R. B., Molto A., Müller-Ladner U., Schreiber K., Smolar L., Walker J., Warnatz K., Wulffraat N. M., Elkayam O. 2019 update of EULAR recommendations for vaccination in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. *Annals of the rheumatic diseases*. 2020;79(1):39-52.



31. Chehab G., Richter J. G., Brinks R., Fischer-Betz R., Winkler-Rohlfing B., Schneider M. Vaccination coverage in systemic lupus erythematosus-a cross-sectional analysis of the German long-term study (LuLa cohort). *Rheumatology (Oxford, England)*. 2018;57(8):1439-47.
32. Older S. A., Battafarano D. F., Enzenauer R. J., Krieg A. M. Can immunization precipitate connective tissue disease? Report of five cases of systemic lupus erythematosus and review of the literature. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 1999;29(3):131-9.
33. Maillefert J. F., Sibilia J., Toussirot E., Vignon E., Eschard J. P., Lorcerie B., Juvin R., Parchin-Geneste N., Piroth C., Wendling D., Kuntz J. L., Tavernier C., Gaudin P. Rheumatic disorders developed after hepatitis B vaccination. *Rheumatology (Oxford, England)*. 1999;38(10):978-83.
34. Vadalà M., Poddighe D., Laurino C., Palmieri B. Vaccination and autoimmune diseases: is prevention of adverse health effects on the horizon? *The EPMA journal*. 2017;8(3):295-311.
35. Wraith D. C., Goldman M., Lambert P. H. Vaccination and autoimmune disease: what is the evidence? *Lancet (London, England)*. 2003;362(9396):1659-66.
36. J.L. Jameson A.S. Fauci, D.L. Kasper [und 3 weiteren] ; deutsche Ausgabe herausgegeben von: N. Suttorp, M. Möckel, B. Siegmund, M. Dietel. *Harrisons Innere Medizin. Teil 05, Abschnitt 05, 147 Tetanus 2020*. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag. 20. aktualisierte und überarbeitete Auflage. [cited 04/12/2020]. Available from: [https://eref.thieme.de/ebooks/cs\\_11262871#/ebook\\_cs\\_11262871\\_cs3](https://eref.thieme.de/ebooks/cs_11262871#/ebook_cs_11262871_cs3).
37. Pfausler B. et al. S1-Leitlinie Tetanus.2017. Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Hrsg. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, [cited 01/12/2020]. Available from: [www.dgn.org/leitlinien](http://www.dgn.org/leitlinien).
38. Robert Koch Institut. Tetanus.2018. [cited 05/12/2020]. Available from: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Tetanus.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tetanus.html).
39. Ständige Impfkommision beim Robert Koch-Institut. Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) beim Robert Koch-Institut – 2020/2021. *Epid Bull* 2020(34):1-65. [cited 05/12/2020]. Available from: [https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/6938.5/34\\_2020\\_web.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/6938.5/34_2020_web.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
40. Lee A. Y. S. A review of the role and clinical utility of anti-Ro52/TRIM21 in systemic autoimmunity. *Rheumatology international*. 2017;37(8):1323-33.
41. Oke V., Wahren-Herlenius M. The immunobiology of Ro52 (TRIM21) in autoimmunity: a critical review. *Journal of autoimmunity*. 2012;39(1-2):77-82.
42. Espinosa A., Dardalhon V., Brauner S., Ambrosi A., Higgs R., Quintana F. J., Sjöstrand M., Eloranta M. L., J Ní Gabhann, Winqvist O., Sundelin B., Jefferies C. A., Rozell B., Kuchroo V. K., Wahren-Herlenius M. Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue inflammation and systemic autoimmunity by dysregulating the IL-23-Th17 pathway. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(8):1661-71.

43. Espinosa A., Zhou W., Ek M., Hedlund M., Brauner S., Popovic K., Horvath L., Wallerskog T., Oukka M., Nyberg F., Kuchroo V. K., Wahren-Herlenius M. The Sjogren's syndrome-associated autoantigen Ro52 is an E3 ligase that regulates proliferation and cell death. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2006;176(10):6277-85.
44. Robbins A., Hentzien M., Toquet S., Didier K., Servettaz A., Pham B. N., Giusti D. Diagnostic Utility of Separate Anti-Ro60 and Anti-Ro52/TRIM21 Antibody Detection in Autoimmune Diseases. *Frontiers in immunology*. 2019;10:444.
45. Magrini E., Mantovani A., Garlanda C. The Dual Complexity of PTX3 in Health and Disease: A Balancing Act? *Trends in molecular medicine*. 2016;22(6):497-510.
46. Shimada Y., Asanuma Y. F., Yokota K., Yoshida Y., Kajiyama H., Sato K., Akiyama Y., Mimura T. Pentraxin 3 is associated with disease activity but not atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Modern rheumatology*. 2014;24(1):78-85.
47. Hollan I., Bottazzi B., Cuccovillo I., Førre Ø T., Mikkelsen K., Saatvedt K., Almdahl S. M., Mantovani A., Meroni P. L. Increased levels of serum pentraxin 3, a novel cardiovascular biomarker, in patients with inflammatory rheumatic disease. *Arthritis care & research*. 2010;62(3):378-85.
48. Fazzini F., Peri G., Doni A., Dell'Antonio G., Dal Cin E., Bozzolo E., D'Auria F., Praderio L., Ciboddo G., Sabbadini M. G., Manfredi A. A., Mantovani A., Querini P. R. PTX3 in small-vessel vasculitides: an independent indicator of disease activity produced at sites of inflammation. *Arthritis and rheumatism*. 2001;44(12):2841-50.
49. Gatto M., Wiedemann A., Nomovi N., Reiter K., Schrezenmeier E., Rose T., Szelinski F., Lino A. C., Valentino S., Ghirardello A., Dörner T., Doria A. Circulating Pentraxin3-Specific B Cells Are Decreased in Lupus Nephritis. *Frontiers in immunology*. 2019;10:29.
50. Csuka D., Czirják L., Hóbor R., Illes Z., Bánáti M., Rajczy K., Tordai A., Füst G. Effective humoral immunity against diphtheria and tetanus in patients with systemic lupus erythematosus or myasthenia gravis. *Molecular immunology*. 2013;54(3-4):453-6.
51. Miyamoto M., Ono E., Barbosa C., Terreri M., Hilário M., Salomão R., de Moraes-Pinto M. Vaccine antibodies and T- and B-cell interaction in juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2011;20(7):736-44.
52. Marchand-Janssen C., Loulergue P., Mouthon L., Mahr A., Blanche P., Deforges L., Lebon P., Cohen P., Pagnoux C., Le Guern V., Bienvenu B., Aouba A., Guillevin L., Launay O. Patients with systemic inflammatory and autoimmune diseases are at risk of vaccine-preventable illnesses. *Rheumatology* (Oxford, England). 2011;50(6):1099-105.
53. Kashef S., Ghazizadeh F., Derakhshan A., Farjadian S., Alyasin S. Antigen-specific antibody response in juvenile-onset SLE patients following routine immunization with tetanus toxoid. *Iranian journal of immunology : IJI*. 2008;5(3):181-4.
54. Zhou X., Liu Y., Jin Y., Wang Y., Miao M., Chen J., Cheng Y., Liu Y., He J., Li Z. Immune responses after influenza vaccination in patients of primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology* (Oxford, England). 2020.

55. Lam G. K., Petri M. Assessment of systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental rheumatology*. 2005;23(5 Suppl 39):S120-32.
56. Mosca Marta, Merrill Joan T., Bombardieri Stefano. Chapter 2 - Assessment of Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus. In: Tsokos GC, Gordon C, Smolen JS, editors. *Systemic Lupus Erythematosus*. Philadelphia: Mosby; 2007. p. 19-23.
57. Anić F., Zuvčić-Butorac M., Stimac D., Novak S. New classification criteria for systemic lupus erythematosus correlate with disease activity. *Croatian medical journal*. 2014;55(5):514-9.
58. Carpenter L., Norton S., Nikiphorou E., Kiely P., Walsh D. A., Dixey J., Young A. Validation of methods for converting the original Disease Activity Score (DAS) to the DAS28. *Rheumatology international*. 2018;38(12):2297-305.
59. Fiehn C., Holle J., Iking-Konert C., Leipe J., Weseloh C., Frerix M., Alten R., Behrens F., Baerwald C., Braun J., Burkhardt H., Burmester G., Detert J., Gaubitz M., Gause A., Gromnica-Ihle E., Kellner H., Krause A., Kuipers J., Lorenz H. M., Müller-Ladner U., Nothacker M., Nüsslein H., Rubbert-Roth A., Schneider M., Schulze-Koops H., Seitz S., Sitter H., Specker C., Tony H. P., Wassenberg S., Wollenhaupt J., Krüger K. S2e-Leitlinie: Therapie der rheumatoiden Arthritis mit krankheitsmodifizierenden Medikamenten. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2018;77(2):35-53.
60. Biosciences BD. Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung.2014. [cited 08/12/2020]. Available from: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=31055>.; schriftliche Zitiergehenigung durch Frau Dr. Susanne Stöhr am 08.12.2020 eingeholt
61. Jahan-Tigh R. R., Ryan C., Obermoser G., Schwarzenberger K. Flow cytometry. *The Journal of investigative dermatology*. 2012;132(10):1-6.
62. Becton Dickinson and Company BD Biosciences. BD Multitest™ 6-Color TBNK. 2018. Becton, Dickinson and Company BD Biosciences.
63. Gan S. D., Patel K. R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of investigative dermatology*. 2013;133(9):e12.
64. GmbH AMBOSS. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (chapter: Biochemische Labormethoden)2020; [cited 05/12/2020]; [https://www.amboss.com/de/wissen/Biochemische\\_Labormethoden](https://www.amboss.com/de/wissen/Biochemische_Labormethoden).
65. Scientific Thermo Fisher. Overview of ELISA [[cited 05/12/2020]; Available from: [https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html#:~:text=ELISA%20\(enzyme%2Dlinked%20immunosorbent%20assay\)%20is%20a%20plate%2D,to%20describe%20the%20same%20technology](https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html#:~:text=ELISA%20(enzyme%2Dlinked%20immunosorbent%20assay)%20is%20a%20plate%2D,to%20describe%20the%20same%20technology).
66. International XpressBio. Human Anti-Tetanus Toxoid IgG ELISA Assay Catalog# IM-217H. [cited 06/08/2020]. Available from: [https://xpressbio.com/wp-content/uploads/2018/12/Human\\_Anti-Tetanus\\_Toxoid.pdf](https://xpressbio.com/wp-content/uploads/2018/12/Human_Anti-Tetanus_Toxoid.pdf)

67. Scheinberg M. A., Cathcart E. S. B cell and T cell lymphopenia in systemic lupus erythematosus. *Cellular immunology*. 1974;12(2):309-14.
68. Amanna I. J., Carlson N. E., Slifka M. K. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *The New England journal of medicine*. 2007;357(19):1903-15.
69. Radbruch A., Muehlinghaus G., Luger E. O., Inamine A., Smith K. G., Dörner T., Hiepe F. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(10):741-50.
70. Tetanus vaccines: WHO position paper, February 2017 - Recommendations. *Vaccine*. 2018;36(25):3573-5.
71. Weißenberg S. Y., Szelinski F., Schrezenmeier E., Stefanski A. L., Wiedemann A., Rincon-Arevalo H., Welle A., Jungmann A., Nordström K., Walter J., Imgenberg-Kreuz J., Nordmark G., Rönnblom L., Bachali P., Catalina M. D., Grammer A. C., Lipsky P. E., Lino A. C., Dörner T. Identification and Characterization of Post-activated B Cells in Systemic Autoimmune Diseases. *Frontiers in immunology*. 2019;10:2136.
72. Simon A. K., Hollander G. A., McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proceedings Biological sciences*. 2015;282(1821):20143085.
73. Aue A., Szelinski F., Weißenberg S. Y., Wiedemann A., Rose T., Lino A. C., Dörner T. Elevated STAT1 expression but not phosphorylation in lupus B cells correlates with disease activity and increased plasmablast susceptibility. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2020;59(11):3435-42.
74. Kaur K., Zheng N. Y., Smith K., Huang M., Li L., Pauli N. T., Henry Dunand C. J., Lee J. H., Morrissey M., Wu Y., Joachims M. L., Munroe M. E., Lau D., Qu X., Krammer F., Wrammert J., Palese P., Ahmed R., James J. A., Wilson P. C. High Affinity Antibodies against Influenza Characterize the Plasmablast Response in SLE Patients After Vaccination. *PloS one*. 2015;10(5):e0125618.
75. Della Valle L., Dohmen S. E., Verhagen O. J., Berkowska M. A., Vidarsson G., Ellen van der Schoot C. The majority of human memory B cells recognizing RhD and tetanus resides in IgM+ B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2014;193(3):1071-9.
76. Halliley J. L., Tipton C. M., Liesveld J., Rosenberg A. F., Darce J., Gregoretti I. V., Popova L., Kaminiski D., Fucile C. F., Albizua I., Kyu S., Chiang K. Y., Bradley K. T., Burack R., Slifka M., Hammarlund E., Wu H., Zhao L., Walsh E. E., Falsey A. R., Randall T. D., Cheung W. C., Sanz I., Lee F. E. Long-Lived Plasma Cells Are Contained within the CD19(-)CD38(hi)CD138(+) Subset in Human Bone Marrow. *Immunity*. 2015;43(1):132-45.
77. Salomonsson S., Dzikaite V., Zeffer E., Eliasson H., Ambrosi A., Bergman G., Fernlund E., Theander E., Ohman A., Rydberg A., Skogh T., Wällberg-Jonsson S., Elfving A., Fored M., Ekbohm A., Lundström U., Mellander M., Winqvist O., Sonesson S. E., Gadler F., Jonzon A., Wahren-Herlenius M. A population-based investigation of the autoantibody profile in mothers of children with atrioventricular block. *Scandinavian journal of immunology*. 2011;74(5):511-7.

78. Oke V., Vassilaki I., Espinosa A., Strandberg L., Kuchroo V. K., Nyberg F., Wahren-Herlenius M. High Ro52 expression in spontaneous and UV-induced cutaneous inflammation. *The Journal of investigative dermatology*. 2009;129(8):2000-10.
79. Zhou Z. H., Tzioufas A. G., Notkins A. L. Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells. *Journal of autoimmunity*. 2007;29(4):219-28.
80. Wang L., Wang F. S., Gershwin M. E. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of internal medicine*. 2015;278(4):369-95.
81. Chen Z. J., Wheeler C. J., Shi W., Wu A. J., Yarboro C. H., Gallagher M., Notkins A. L. Polyreactive antigen-binding B cells are the predominant cell type in the newborn B cell repertoire. *European journal of immunology*. 1998;28(3):989-94.
82. Avrameas S., Alexopoulos H., Moutsopoulos H. M. Natural Autoantibodies: An Undersung Hero of the Immune System and Autoimmune Disorders-A Point of View. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1320.
83. Yurasov S., Wardemann H., Hammersen J., Tsuiji M., Meffre E., Pascual V., Nussenzweig M. C. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(5):703-11.
84. Samuels J., Ng Y. S., Coupillaud C., Paget D., Meffre E. Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(10):1659-67.
85. Mietzner B., Tsuiji M., Scheid J., Velinzon K., Tiller T., Abraham K., Gonzalez J. B., Pascual V., Stichweh D., Wardemann H., Nussenzweig M. C. Autoreactive IgG memory antibodies in patients with systemic lupus erythematosus arise from nonreactive and polyreactive precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(28):9727-32.
86. Abu-Shakra M. Safety of vaccination of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009;18(13):1205-8.
87. O'Neill S. G., Isenberg D. A. Immunizing patients with systemic lupus erythematosus: a review of effectiveness and safety. *Lupus*. 2006;15(11):778-83.
88. Bernasconi N. L., Traggiai E., Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science (New York, NY)*. 2002;298(5601):2199-202.
89. Di Genova G., Roddick J., McNicholl F., Stevenson F. K. Vaccination of human subjects expands both specific and bystander memory T cells but antibody production remains vaccine specific. *Blood*. 2006;107(7):2806-13.
90. Lee F. E., Halliley J. L., Walsh E. E., Moscatiello A. P., Kmush B. L., Falsey A. R., Randall T. D., Kaminiski D. A., Miller R. K., Sanz I. Circulating human antibody-secreting cells during vaccinations and respiratory viral infections are characterized by high specificity and lack of bystander effect. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;186(9):5514-21.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nadja Nomovi, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung antigenspezifischer B-Zellen bei Autoimmunerkrankungen / Characterisation of antigenspecific B cells in autoimmunity“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **Curriculum vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.





## Publikationsliste

Gatto M, Wiedemann A, Nomovi N, Reiter K, Schrezenmeier E, Rose T, Szelinski F, Lino AC, Valentino S, Ghirardello A, Dörner T, Doria A. Circulating Pentraxin3-Specific B Cells Are Decreased in Lupus Nephritis. *Frontiers in immunology*. 2019;10:29.

## Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Thomas Dörner bedanken, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und mir die finanziellen Mittel und Ressourcen zur Durchführung des Projekts zur Verfügung gestellt hat. Die Betreuung war wirklich großartig und ich habe eine Menge Neues gelernt!

Karin Reiter und Annika Glenzer danke ich ganz herzlich für die exzellente Einarbeitung im Labor, die inhaltlichen Anregungen sowie die Hilfsbereitschaft bei sämtlichen Fragen.

Auch bei den restlichen Mitgliedern der AG Dörner möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mich so herzlich aufgenommen und immer für ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben. Die Zeit in der Arbeitsgruppe hat mir wirklich sehr viel Spaß bereitet! Ein besonderer Dank gilt dabei Franziska Szelinski, die stets ein offenes Ohr für mich hatte und mir mit viel Geduld bei allen IT-Fragen zur Seite stand. Auch für das gründliche Korrekturlesen meiner Arbeit möchte ich ihr sowie Dr. med. Birgit Preiß, Dr. iur. Felix Ritter und Lulu Fix ganz herzlich danken.

Ein großer Dank geht außerdem an meinen Freund Jonas Preiß, der mich stets motivierte und mir bei der Anfertigung dieser Dissertation eine große emotionale Stütze war.

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern und meinem Bruder für ihre uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg bedanken.