

Aus dem CharitéCentrum 12 für Innere Medizin und Dermatologie
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische
Immunologie

Direktor: Prof. Dr. Gerd-Rüdiger Burmester

Habilitationsschrift
Die Rolle langlebiger Plasmazellen bei
Autoimmunerkrankungen

Zur Erlangung der Lehrbefähigung im Fach Innere Medizin und
Rheumatologie

Vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Bimba Franziska Hoyer

Eingereicht: März 2015

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

1. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Andreas Schwarting, Mainz

2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Reinhold E. Schmidt, Hannover

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Das Immunsystem	4
1.1.1	Die B-Zell-Linie	5
1.1.2	Plasmazellen	6
1.2	Autoimmunität	9
1.2.1	Systemischer Lupus Erythematoses	9
1.2.2	Vaskulitiden	11
1.3	Pathogene Gedächtnis-Plasmazellen als therapeutische Herausforderung	12
2	Fragestellung	14
3	Eigene Arbeiten	15
3.1	Langlebige Autoreaktive Gedächtnis-Plasmazellen sind refraktär gegen Standardtherapie-Verfahren	15
3.2	Die Übertragung des autoreaktiven Plasmazellgedächtnisses reicht zum Auslösen einer Immunkomplex-Nephritis aus	25
3.3	Das langlebige Plasmazellgedächtnis wird über die komplette Lebenszeit weiter generiert, was eine erfolgreiche Depletion erschwert	33
3.4	Beim gesunden Menschen finden sich nach Stimulation des Immunsystems zwei Plasmazell-Populationen im Blut	47
3.5	Bei Patienten mit Takayasu Arteritis findet sich ähnliche Veränderung des Plasmazell-Kompartimentes im Blut	57
3.6	Erste <i>in vitro</i> Ergebnisse zeigen: eine spezifische Depletion von pathogenen Plasmazellen ist möglich	63
4	Diskussion	68
4.1	Gibt es ein „Window of opportunity“ für die therapeutische Plasmazell-Depletion?	68
4.2	Die Depletion des gesamten Plasmazell-Gedächtnisses als Beweis für die pathogenetisch bedeutende Rolle der Plasmazellen	69
4.3	Plasmazell-Expansion als Korrelat für eine systemische B-Zell-Hyperaktivierung – Indikation zur Plasmazell-Vorläufer-Depletion	71
4.4	Wie können wir die pathogene Zellen möglichst spezifisch depletieren?	72
5	Zusammenfassung	75
6	Literaturangaben	77
7	Danksagung	81
8	Eidesstattliche Erklärung	82

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
ANA	Anti-Nukleäre Antigene
ANCA	Anti-Neutrophilen-cytoplasmatische-Antigene
APRIL	A proliferation inducing Ligand
BAFF	B lymphocyte activating factor der TNFA Familie
BlyS	B lymphocyte stimulator
BrdU	Bromodesoxyuridin
CXCL	CX-Chemokin-Ligand
CXCR	CX-Chemokin-Rezeptor
DNA	Desoxyribunukleinsäure
dsDNA	Doppel-Strang DNA
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
LE	Lupus Erythematodes
NZB	New Zealand Black
NZB/W F1	New Zealand Black/ New Zealand White F1
NZW	New Zealand White
SLE	systemischer Lupus Erythematodes
ZNS	Zentrales Nerven System

1 Einleitung

Bei Autoimmunerkrankungen kommt es zum Toleranzbruch des Immunsystems gegenüber dem eigenen Körper oder bestimmten körpereigenen Strukturen. Dadurch kommt es zu Immunreaktionen gegen diese Strukturen. Verschiedene Zellen des Immunsystems und insbesondere des adaptiven Immunsystems spielen im Rahmen dieser Immunreaktionen eine entscheidende Rolle. Die Plasmazellen, das ausgereifte zelluläre Endstadium der B-Zell-Linie, sind über die Produktion von Autoantikörpern für die Schädigung von körpereigenen Strukturen verantwortlich. Die Folge sind Entzündungsreaktionen im Gewebe.

Antikörper-vermittelte Autoimmunerkrankungen sind heute nach wie vor eine große klinische Herausforderung. Autoimmunerkrankungen, wie die Rheumatoide Arthritis gehören zu den sehr häufigen Krankheitsbildern. Andere, wie der systemische Lupus Erythematodes (SLE), sind eher selten. Therapeutisch stellen uns diese Erkrankungen vor ein großes Problem, da die Patienten mit den vorhandenen Therapien nicht geheilt werden können und die Therapien mit Glukokortikoiden und den konventionellen Immunsuppressiva sich unspezifisch gegen alle Komponenten des Immunsystems richten. Die einzige Ausnahme sind hier bisher therapeutische Antikörper. Aber auch diese sind nicht in der Lage zwischen protektiven und pathogenen Komponenten des Immunsystems zu unterscheiden. Zudem sind bei der Mehrheit der Patienten langfristige Therapien notwendig.

1.1 Das Immunsystem

Prinzipiell wird zwischen dem adaptiven und dem natürlichen, angeborenen Immunsystem unterschieden. Das natürliche Immunsystem ist in der Lage, sehr schnell auf den Kontakt mit einem Pathogen zu reagieren. Allerdings ist diese Reaktion eher unspezifisch. Sie ist geprägt vom Einsatz der natürlichen Killerzellen und anderen Zellen wie den Phagozyten [2].

Das adaptive Immunsystem braucht etwas länger für seine Reaktion, ist aber dafür zu einer gezielten und spezifischen Antwort in der Lage. Wichtigste Komponente sind hier die B- und T-Zellen [3].

1.1.1 Die B-Zell-Linie

Eine wichtige Komponente des sogenannten adaptiven Immunsystems sind die B-Zellen. Sie können spezifisch gegen bestimmte Antigene agieren. Die B-Zelle wird im Knochenmark generiert, reift in den sekundären lymphatischen Organen wie etwa der Milz und den Lymphknoten weiter, um schlussendlich entweder - in der physiologischen Situation - wieder im Knochenmark anzukommen oder aber in einem entzündeten Organ [4]. Im Knochenmark können die B-Zellen als Gedächtnis-B-Zellen langfristig überleben und werden im Fall eines erneuten Antigen-Kontaktes schnell reaktiviert [5], oder sie reifen weiter zur Plasmazelle aus. Das Gleiche gilt für die pathologische Situation im entzündeten Organ.

Reife B-Zellen übernehmen wichtige Funktionen im Rahmen einer Immunreaktion. Sie können Antigene präsentieren und so andere zelluläre Komponenten des Immunsystems aktivieren. Zudem sind sie selbst in der Lage, Zytokine und Chemokine zu sezernieren. Hierbei handelt es sich um „Botenstoffe“, die weitere Immunreaktionen bewirken können oder aber das Überleben anderer Zellen beeinflussen können.

B-Zellen können regulatorische Funktionen übernehmen, z.B. über die Sekretion von Interleukin-10 oder Interleukin-35 [6, 7].

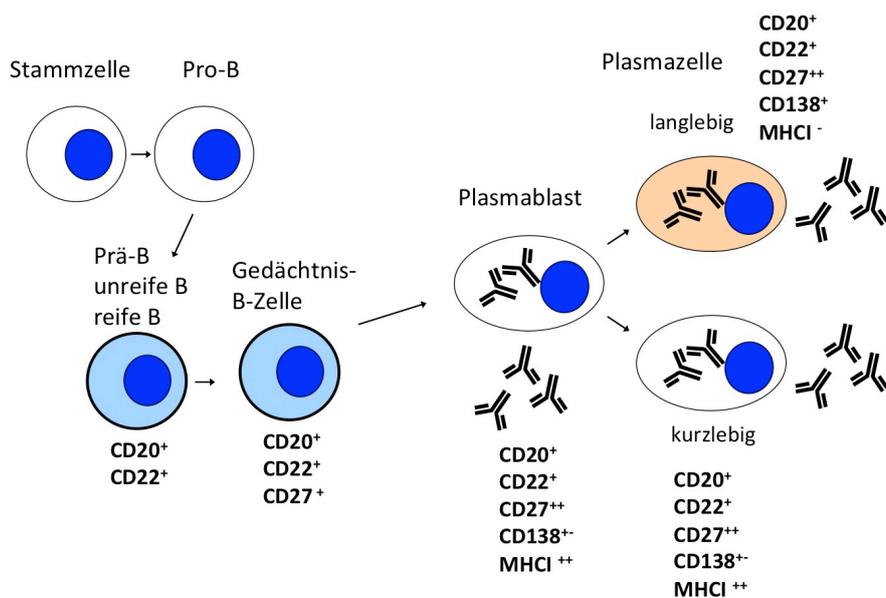


Abbildung 1: B-Zell-Entwicklung: Dargestellt sind die verschiedenen Stadien der B-Zell-Entwicklung. Zudem sind die Oberflächenmarker angegeben, die beim Menschen das entsprechende Stadium charakterisieren.

Im Laufe ihres Entwicklungsprozesses durchlaufen sie unterschiedliche Kontrollpunkte. Da es im Laufe der Entwicklung immer auch zur Entstehung von autoreaktiven B-Zellen kommt, sollen an diesen Kontrollpunkten Zellen mit einer solchen autoreaktiven Spezifität erkannt und eliminiert werden. Bei Autoimmunerkrankungen kommt es zu „Fehlern“ an den Kontrollpunkten, so dass vermehrt autoreaktive Zellen überleben können und weiter ausreifen [8].

1.1.2 Plasmazellen

Plasmazellen sind das ausdifferenzierte Endstadium der B-Zell-Linie. Bei Plasmazellen unterscheidet man Plasmablasten und Plasmazellen. Plasmablasten sind das frühere Stadium. Diese Zellen proliferieren noch, aber sie sezernieren bereits Antikörper. Plasmablasten reifen entweder weiter zur Plasmazelle aus oder sie sterben innerhalb weniger Tage [5].

Neben den kurzlebigen Plasmazellen und Plasmablasten gibt es langlebige Gedächtnis-Plasmazellen.

Manz et al. konnten 1997 erstmalig beweisen, dass im Rahmen einer Immunreaktion langlebige Plasmazellen entstehen, die im Knochenmark residieren [9]. Diese Zellen proliferieren nicht mehr, sie haben einen wenig aktivierten Phänotyp und überleben ohne erneuten Antigenkontakt über Monate bis Jahre [10, 11]. Trotzdem sezernieren sie konstant Antikörper [11]. Im Rahmen einer protektiven Immunantwort tragen sie, gemeinsam mit den Gedächtnis-B-Zellen, zum Aufrechterhalten des „Immun-Gedächtnisses“ und protektiver Antikörpertiter bei [12].

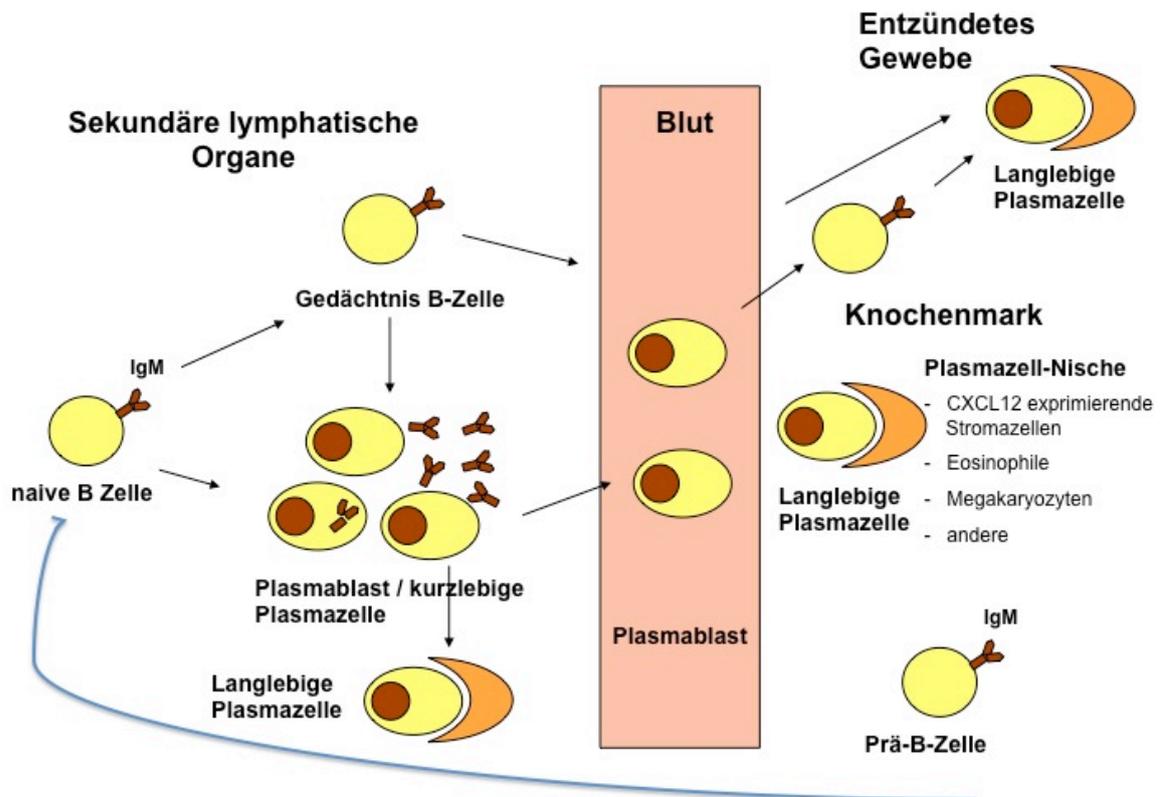


Abbildung 2: Entwicklung der B-Zelle zur kurz- oder langlebigen Plasmazelle. Sowohl im Knochenmark als auch in den sekundären lymphatischen Organen und im entzündeten Gewebe finden sich Überlebensnischen für langlebige Gedächtnis-Plasmazellen, die entweder hierhin einwandern oder bereits im Gewebe ausdifferenzieren.

Für ihr langes Überleben benötigen diese Zellen eine bestimmte Umgebung, die sogenannte „Überlebensnische“. Die Nische wird durch Zellen (z.B. Stromazellen, Eosinophile, Megakaryozyten) und Chemokine/Zytokine (z.B. APRIL, BAFF, Interleukin-6,...) gebildet [13] [14-17].

Ob es auch intrinsische Faktoren gibt, die dafür sorgen, dass die eine Plasmazelle langlebig wird und die andere nicht, ist bis heute offen [18].

Wir konnten erstmals zeigen, dass pathogene Autoantikörper sowohl von kurzlebigen Plasmazellen und langlebigen Gedächtnis-Plasmazellen generiert und sezerniert werden [1]. Sowohl in der Milz, als auch im Knochenmark, aber auch in

den entzündeten Nieren von NZB/W F1 Mäusen, einem klassischen Lupus-Mausmodell, lassen sich beide Populationen nachweisen [1, 19, 20].

Mit Hilfe von BrdU-Experimenten war es möglich zu zeigen, dass ein beträchtlicher Teil der Plasmazellen über den Untersuchungszeitraum von 12 Wochen nicht proliferiert, aber weiterhin Autoantikörper produziert [1]. Diese Zellen werden, in Abgrenzung von den kurzlebigen Plasmazellen als langlebige Gedächtnis-Plasmazellen bezeichnet.

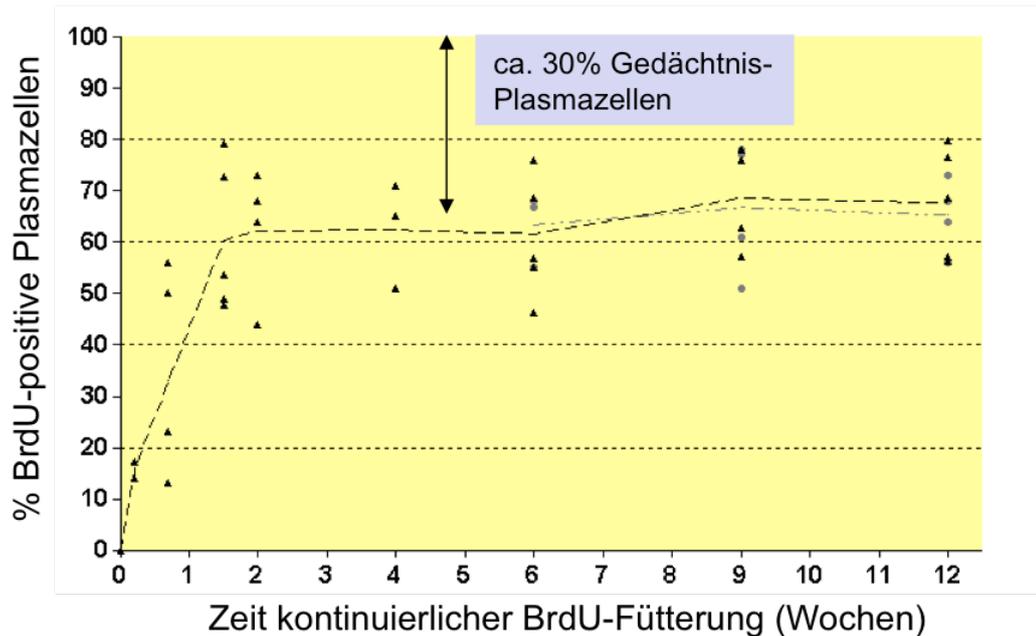
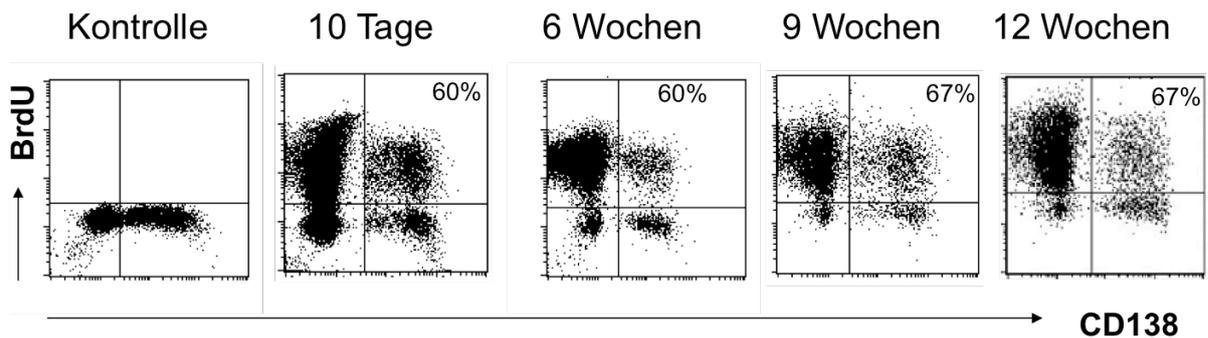


Abbildung 3: Mit Hilfe von BrdU-Experimenten können im Mausmodell Gedächtnis-Plasmazellen nachgewiesen werden. Diese Überleben für min. 12 Wochen und proliferieren nicht mehr. Im oberen Teil ist der Einbau und durchflusszytometrische Nachweis von BrdU in etwa die Hälfte der CD138-positiven Milz-Plasmazellen dargestellt. Der untere Teil zeigt die Kinetik dieses Einbaus über die untersuchten 12 Wochen. Modifiziert nach [1].

Sowohl in der Population der kurzlebigen als auch der langlebigen Zellen ließen sich DNA-spezifische, autoreaktive Plasmazellen nachweisen [1]. Beim Systemischen Lupus Erythematodes entsteht durch die deutlich erhöhte Menge proinflammatorischer Zytokine sowohl in den lymphatischen Organen als auch in den entzündeten Organen wie z.B. der Niere neue Plasmazell-Überlebensnischen [19]. Die in der Maus angewandte Methode zum Nachweis von Gedächtnis-Plasmazellen ist beim Menschen nicht umsetzbar, da das eingesetzte Thymidin-Analogon BrdU (Bromodesoxyuridin) kanzerogen ist. Dennoch gibt es beim Menschen viele indirekte Hinweise für die Existenz langlebiger Gedächtnis-Plasmazellen. So sind Impfantikörpertiter auch noch Jahre nach Antigenkontakt im Serum nachweisbar [12]. Zudem kommt es nach einer Therapie mit dem B-Zell-depletierenden Antikörper Rituximab zwar zu einem Abfall der Antikörpertiter, diese verschwinden aber nicht komplett, obwohl vorübergehend keine neuen Plasmazellen gebildet werden können [21]. Präexistente Impfantikörpertiter fallen unter dieser Therapie überhaupt nicht ab [22]. Plasmazellen selbst werden durch diesen Antikörper auf Grund der fehlenden Expression von CD20 nicht depletiert.

1.2 Autoimmunität

Wie bereits erläutert, greift sich der Körper bei Autoimmunerkrankungen selbst an. Es kommt zum Toleranzbruch. Durch das Erkennen unterschiedlicher, körpereigener Zielstrukturen kommt es zu unterschiedlichen Erkrankungen. So werden z.B. bei neurologischen Erkrankungen Strukturen der peripheren Nerven, des ZNS (Multiple Sklerose) oder die motorische Endplatte (Myasthenia gravis) als „fremd“ erkannt. Bei den rheumatologischen Erkrankungen werden zum Teil häufig vorkommende Antigene wie die DNA (Systemischer Lupus erythematodes), Gelenkstrukturen (Rheumatoide Arthritis) oder andere Proteine als Antigen erkannt. Entsprechend können unterschiedliche Organe im Rahmen der Erkrankungen betroffen sein.

1.2.1 Systemischer Lupus Erythematodes

Beim systemischen Lupus Erythematodes handelt es sich um den Prototyp einer systemischen Autoimmunerkrankung. Diese Erkrankung ist in Europa eher selten

mit einer Inzidenz von 50-70/1 Mio [23]. Sie betrifft bevorzugt junge Frauen mit einer Geschlechtsverteilung von f:m 9:1. Wenn Männer betroffen sind, kommt es häufig zu einem schweren Krankheitsverlauf. Bei der Pathogenese scheinen genetische Faktoren genauso wie Umweltfaktoren und hormonelle Faktoren eine Rolle zu spielen [24, 25].

Typisch ist die Produktion und der Nachweis von Antikörpern gegen nukleäre Antigene (ANA) und insbesondere der Nachweis von Antikörpern gegen dsDNA. Diese führen entweder direkt zu einer Organschädigung oder es kommt zur Bildung von Immunkomplexen. Im Verlauf führen letztere dann ebenfalls zu einer Organschädigung [26].

Der Nachweis von Autoantikörpern ist bereits Jahre vor dem Auftreten klinischer Symptome möglich [27]. Häufig betroffene Organe sind die Haut und die Nieren. Vom systemischen Lupus Erythematoses abzugrenzen sind Formen, die ausschließlich die Haut betreffen (kutaner LE) oder die nur wenige systemische Krankheitssymptome zusätzlich zur Hautbeteiligung zeigen (subakut kutaner LE) [28]. Hier ist teilweise ein Übergang in die systemische Form möglich. Die häufig auftretende Glomerulonephritis führt unbehandelt meist zum terminalen Nierenversagen. In den betroffenen Nieren lassen sich abgelagerte Immunkomplexe nachweisen. Auch eine Beteiligung des Herzens, des ZNS oder der Gelenke tritt häufig auf. Prinzipiell kann nahezu jedes Organ betroffen sein [29].

Aktuelle Therapieverfahren zielen entsprechend auf eine generelle Unterdrückung der Immunantwort ab. Zum Einsatz kommen beim Befall lebenswichtiger Organe standardmäßig Glukokortikoide und anti-proliferative Medikamente wie Cyclophosphamid [30]. Hierdurch kann zwar die Krankheitssymptomatik meistens unterdrückt werden, eine Heilung ist hierüber aber nicht möglich. Nach Absetzen der Therapie kommt es im Normalfall relativ schnell zu einem erneuten Schub der Erkrankung. Auch das einzige zugelassene Biologikum in der Therapie des SLE, der gegen den B-Zell-Überlebensfaktor BlyS gerichtete Antikörper Belimumab, führen nur zu einer temporären Besserung [31].

B-Zell-depletierende Therapien wie etwa der für die Rheumatoide Arthritis zugelassene Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD20 Rituximab wirken ebenfalls nicht langanhaltend und nur bei einem Teil der Patienten [32]. Die Zulassungsstudien für Rituximab beim SLE erreichten entsprechend den primären

Endpunkt nicht [33, 34]. Große Fallsammlungen zeigen allerdings, dass Rituximab auch bei Patienten mit SLE effektiv ist [35]. Auto-Antikörper titer fallen hierunter zwar deutlich, aber sie verschwinden nur bei einem Teil der Patienten. Bei protektiven Impfantikörpern ist weder unter Belimumab noch unter Rituximab eine Verminderung zu erkennen [36].

1.2.2 Vaskulitiden

Eine andere große Gruppe der rheumatologischen Erkrankungen sind die Vaskulitiden. Hierbei kommt es zu einer Entzündung der Blutgefäße. Dies führt im Verlauf, neben der meist deutlichen systemischen Entzündungsreaktion, zu einer Ektasie der Gefäße oder einem Verschluss. Entsprechend ist die Klinik gekennzeichnet durch eine Claudicatio im Bereich der Verschlüsse und im Falle einer Ektasie z.B. der Aorta, durch eine Aorteninsuffizienz [37].

Die Erkrankungen werden nach der Größe der hauptsächlich betroffenen Gefäße kategorisiert. Man unterscheidet Großgefäßvaskulitiden (Riesenzellvaskulitis, Takayasu Arteriitis), Vaskulitiden der mittelgroßen Gefäße und Kleingefäßvaskulitiden (u.a. die ANCA-assoziierten Vaskulitiden). Interessanterweise sind meist bei einem Patienten nur Gefäße einer Größenordnung betroffen [38]. Nicht bei allen Vaskulitiden ist bisher der Nachweis spezifischer Antigene gelungen. Trotzdem wird auch hier von einer Autoantikörper-vermittelten Komponente ausgegangen.

In dieser Arbeit liegt ein spezieller Fokus auf den Großgefäßvaskulitiden. Darunter werden Krankheitsbilder verstanden, bei denen vor allem die Aorta und ihre Abgänge betroffen sind. Ein typisches, wenn auch in Deutschland sehr seltenes Beispiel, ist die Takayasu-Arteriitis. Hier kommt es vor allem bei jungen Frauen zu einer Entzündung der Aorta, klassischerweise auch der Arteria subclavia. Von den häufigen Verschlüssen der Arteria subclavia ist auch der Name der Erkrankung als „Pulsless disease“ abgeleitet [39]. Die Patientinnen haben häufig eine längere Phase mit unspezifischen Entzündungszeichen („prepulsless disease phase“), bevor meist durch den Verschluss oder eine signifikante Stenose der Gefäße eine spezifische Klinik auftritt. Lange Zeit wurden diese Erkrankungen als primär T-Zell vermittelt

angesehen [40]. Aber auch bei vielen der Vaskulitiden gibt es Hinweise für eine Rolle der B-Zellen.

Für die Kleingefäßvaskulitiden wie die ANCA-assoziierten Vaskulitiden zeigt sich die unter anderem in der inzwischen erfolgten Zulassung des B-Zell-depletierenden Antikörpers Rituximab [41]. Für die anderen Vaskulitiden ist ebenfalls von einer pathogenetischen Rolle der B-Zellen auszugehen.

1.3 Pathogene Gedächtnis-Plasmazellen als therapeutische Herausforderung

Die normalerweise in der Klinik eingesetzten Immunsuppressiva, wie z.B. Cyclophosphamid, depletieren lediglich die proliferierenden B-Zellen und Plasmablasten. Die nicht mehr proliferierenden Gedächtnis-Plasmazellen werden entsprechend nicht eliminiert [42].

Im Mausmodell konnten wir zeigen, dass nach der Gabe von hochdosiertem Cyclophosphamid die Population der kurzlebigen Plasmazellen/Plasmablasten verschwindet. In der Population der überlebenden, langlebigen, BrdU negativen Gedächtnis-Plasmazellen, sind aber weiterhin autoreaktive Zellen enthalten [1].

Bislang stehen wir entsprechend vor der Herausforderung, dass wir lediglich in der Lage sind, die kurzlebigen, z.B. im Rahmen eines Erkrankungsschubes entstandenen Plasmazellen/-blasten zu depletieren. Die pathogenen Gedächtnis-Plasmazellen stellen eine große therapeutische Herausforderung dar.

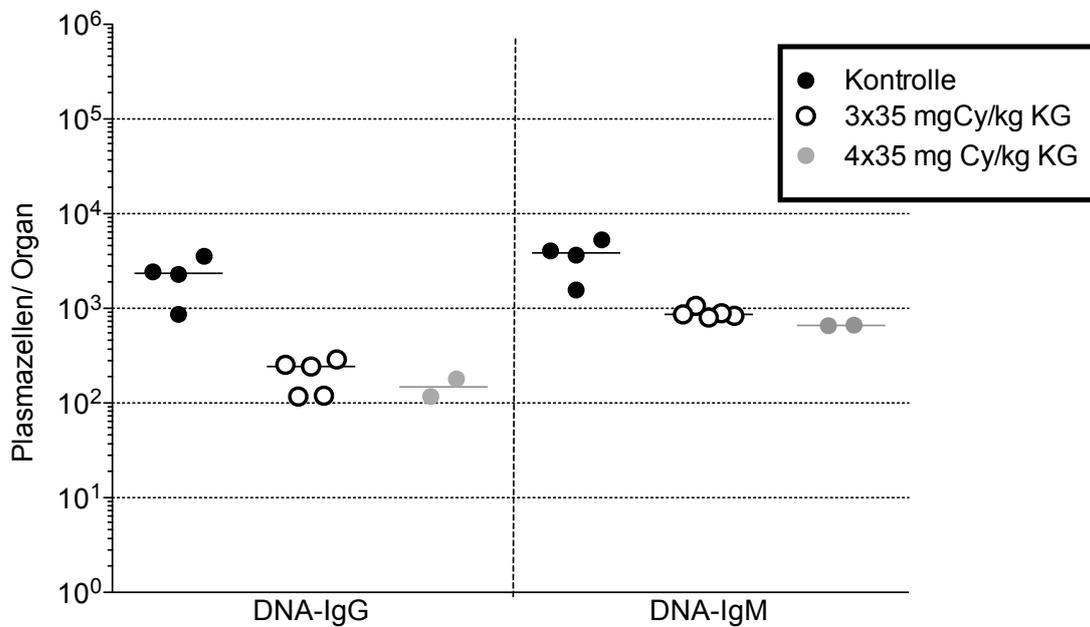
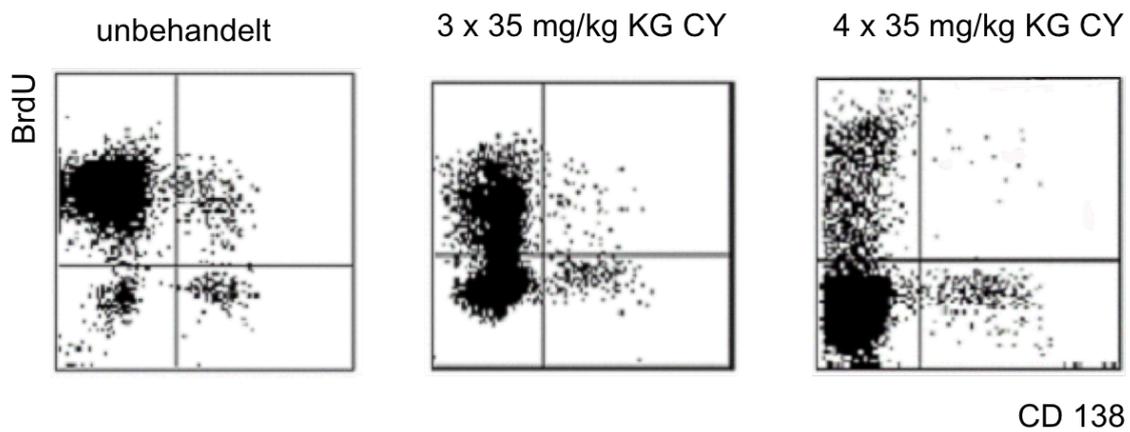


Abbildung 4: Cyclophosphamid in aufsteigenden Dosierungen depletiert ausschließlich die kurzlebigen, BrdU-positiven Plasmazellen. Dargestellt ist das Plasmazellkompartiment der Milz mit einer durchflusszytometrischen Darstellung der Oberflächenexpression von CD138 (typische für Plasmazellen) sowie der Einbau von BrdU. Ein Teil der autoreaktiven Zellen überlebt die Behandlung ebenfalls. Modifiziert nach [1].

2 Fragestellung

Wir konnten erstmals die Existenz langlebiger, autoreaktiver Gedächtnis-Plasmazellen im Mausmodell des systemischen Lupus Erythematoses beweisen. Daraus ergibt sich, dass nur ein Teil der autoreaktiven Plasmazellen durch die „normalen“ Therapieverfahren eliminiert wird.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage wie das Gedächtnis-Plasmazell-Kompartiment in der Lupus-Maus entsteht, welche pathogenetische Rolle es spielt und wie es möglicherweise eliminiert werden kann. In einem zweiten Schritt stellt sich die Frage, ob diese Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden können und inwiefern kurz- und langlebige Plasmazellen auch hier vorkommen und für Autoimmunerkrankungen wichtig sind.

Weiter stellt sich die Frage nach besseren, spezifischen Therapieverfahren, die eine selektive Elimination der autoreaktiven, pathogenen Plasmazellen ermöglichen.

3 Eigene Arbeiten

3.1 Langlebige Autoreaktive Gedächtnis-Plasmazellen sind refraktär gegen Standardtherapie-Verfahren

Mumtaz, IM*, Hoyer BF*, Panne, D, Moser K, Winter O, Cheng Q, Yoshida T, Burmester GR, Radbruch A, Manz RA, and Hiepe F. Bone marrow of NZB/W mice is the major site for plasma cells resistant to dexamethasone and cyclophosphamide: implications for the treatment of autoimmunity. *J Autoimmun* 2012; 9:180-188.

* zu gleichen Teilen beigetragen.

Originalpublikation unter <https://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2012.05.010>

In vorangegangenen Arbeiten konnten wir zeigen, dass auch im aktivierten Immunsystem, wie es im Rahmen des systemischen Lupus erythematoses vorkommt, das Plasmazellkompartiment mindestens zwei Populationen enthält: langlebige und kurzlebige Plasmazellen. Ebenso konnten wir zeigen, dass in beiden Zellpopulationen pathogene Zellen enthalten sind. Anti-proliferative Substanzen wie Cyclophosphamid, welches im klinischen Alltag bei der Lupus-Nephritis eingesetzt wird, sind nicht in der Lage, langlebige Gedächtnis-Plasmazellen zu depletieren. Dies liegt unter anderem daran, dass Cyclophosphamid lediglich gegen proliferierende Zellen gerichtet ist. Die langlebigen Gedächtnis-Plasmazellen proliferieren nicht mehr und sind von daher für Cyclophosphamid nicht erreichbar.

In dieser Arbeit zeigen wir, dass die langlebige Plasmazell-Population auch gegen Glukokortikoide, die ebenfalls im klinischen Alltag ihren Einsatz finden, sowie eine Kombination von Cyclophosphamid und Glukokortikoiden resistent ist. Auch andere Standard-Medikamente (Belimumab, Mycophenolat) sind hierzu nicht in der Lage (eigene unpublizierte Daten und [36]). Vor allem die Gedächtnis-Plasmazellen im Knochenmark sind extrem resistent. Standard-Therapieverfahren sind somit nicht in der Lage, eine Ablation des Plasmazell-Gedächtnisses zu erreichen. Langanhaltende Therapieerfolge sind also mit diesen Medikamenten nicht zu verwirklichen.

3.2 Die Übertragung des autoreaktiven Plasmazellgedächtnisses reicht zum Auslösen einer Immunkomplex-Nephritis aus

Cheng Q, Mumtaz IM, Khodadadi L, Radbruch A, Hiepe F*, **Hoyer BF***. Autoantibodies from long-lived 'memory' plasma cells of NZB/W mice drive immune complex nephritis. *Ann Rheum Dis*. 2013 Dec;72(12):2011-7. * zu gleichen Teilen beigetragen

Originalarbeit unter <https://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203827>

Auch wenn wir zeigen konnten, dass in beiden Plasmazell-Populationen autoreaktive Zellen enthalten sind, war zunächst die Frage offen, welche Rolle das langlebige Gedächtnis-Plasmazell-Kompartiment allein für die Pathogenese der Erkrankung spielt.

In dieser Studie wurden Plasmazellen aus der Milz von NZB/W F1-Mäusen, dem klassischen Lupus- Mausmodell, in Rag1^{-/-} Mäuse transferiert. Rag defiziente-Mäuse besitzen kein eigenes Immunsystem. Eine Abstoßung der Zellen oder eine Einflussnahme anderer Zellpopulationen auf die Ergebnisse konnte somit ausgeschlossen werden. In diesem Transfersystem konnten bis Woche 21 nach Transfer (letzter Untersuchungszeitpunkt) autoreaktive Antikörpertiter im Serum nachgewiesen werden und auch DNA-spezifische Zellen in den lymphatischen Organen. Bereits ab Tag 7 nach dem Transfer waren Ig-Antikörper-Spiegel und dsDNA-spezifischer Antikörper im Serum der Rezipienten-Mäuse nachweisbar. Ab 21 Wochen nach Transfer zeigten sich in der Niere der transferierten Mäuse Immunkomplexablagerungen, die mit einer Proteinurie bei den Empfängertieren korrelierte. Bis zum Zeitpunkt 28 Wochen nach Transfer überlebten lediglich 20% der transferierten Tiere gegenüber 100% der Kontrolltiere.

Mit Hilfe von BrdU-Einbau sowie einer Cyclophosphamid-Behandlung einer Empfänger-Gruppe konnten wir zeigen, dass im Verlauf ausschließlich langlebige Plasmazellen zu den nachweisbaren Autoantikörper-Titern führen. Dies heißt auch, dass die langfristig nachweisbaren Plasmazellen langlebige Gedächtnis-Plasmazellen sind. Mit diesen Daten zeigen wir, dass das autoreaktive Gedächtnis-Plasmazell-Kompartiment eine wichtige Rolle für die Entstehung der SLE-typischen Nephritis spielt und als pathogen angesehen werden muss.

3.3 Das langlebige Plasmazellgedächtnis wird über die komplette Lebenszeit weiter generiert, was eine erfolgreiche Depletion erschwert

Taddeo A., Khodadadi L., Voigt C., Mumtaz IM, Cheng Q, Moser K, Alexander T, Manz RA, Radbruch A., Hiepe F., **Hoyer BF**. Long-lived plasma cells are early and constantly generated in NZB/W mice and their therapeutic depletion requires a combined targeting of autoreactive plasma cells and their precursors. *Arthritis Research and Therapy*. 2015, **17**:39
Originalpublikation unter <https://dx.doi.org/10.1186/s13075-015-0551-3>

Nachdem wir gezeigt haben, dass die langlebigen autoreaktiven Plasmazellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des SLE spielen, war es wichtig, zu verstehen, wann sie entstehen und wie sich die Entstehung langlebiger Plasmazellen über die Lebenszeit im Mausmodell entwickelt. Gerade auch bezüglich therapeutischer Optionen im Sinne eines “window of opportunity” ist diese Kinetik von großer Bedeutung. In dieser Arbeit zeigen wir, dass das langlebige Plasmazellgedächtnis bereits in den ersten Lebenswochen der Tiere entsteht (frühester analysierter Zeitpunkt 4 Wochen). Dies ist lange vor dem Ausbruch klinischer Symptome. Zudem konnten wir hier zeigen, dass die Anzahl langlebiger Plasmazellen zwar in der Milz ab der 12. Lebenswoche ein Plateau erreicht, im Knochenmark hingegen über die komplette Lebensdauer der Tiere weiter ansteigt. Dies gilt sowohl für das gesamte langlebige Plasmazellkompartiment, als auch für die autoreaktiven Gedächtnis-Plasmazellen. Entsprechend sahen wir, dass die Fähigkeit der Milz, langlebige Plasmazellen aufzunehmen, mit dem Alter abnimmt, während diese Fähigkeit im Knochenmark konstant hoch bleibt. In der Niere steigt die Anzahl langlebiger Plasmazellen erst stark verzögert, passend zum Entzündungsprogress, an und erreicht bis zum Ende der Lebensdauer der Tiere kein Plateau.

Neubert et al. konnten zeigen, dass langlebige Gedächtnis-Plasmazellen durch eine Therapie mit dem Proteasominhibitor Bortezomib depletiert werden können. Bortezomib verhindert über die Inhibition des Proteasoms den Proteinabbau in der Zelle. In Zellen mit einer hohen Proteinsynthese wie den Plasmazellen führt dies zum Zelltod [43].

Wir zeigen hier, dass die einmalige Depletion langlebiger Plasmazellen mit dem Proteasominhibitor Bortezomib zwar zu einer Depletion der Gedächtnis-Plasmazellen führt, bereits nach 2 Wochen haben die Plasmazellen allerdings auf Grund ihrer permanenten Regeneration ihren Ausgangswert wieder erreicht.

Wird die einmalige Depletion mit Bortezomib hingegen mit einer wiederholten Depletion der Vorläuferzellen, also der B-Zellen kombiniert, so führt dies zu persistierend niedrigen Plasmazellzahlen. Im Tiermodell kombinierten wir Bortezomib mit Cyclophosphamid, im Patienten wäre die deutlich spezifischer Depletion z.B. mit dem gegen CD20 gerichteten Antikörper Rituximab oder dem gegen BLYS-gerichteten Antikörper Belimumab möglich.

3.4 Beim gesunden Menschen finden sich nach Stimulation des Immunsystems zwei Plasmazell-Populationen im Blut

Odendahl M, Mei H, **Hoyer BF**, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G, Berek C, Hiepe F, Manz R, Radbruch A, Dörner T. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood*. 2005;105(4):1614-1621.

Originalpublikation unter: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-07-2507>

Neben den ausführlichen Untersuchungen des Plasmazellkompartimentes im Tiermodell stellt sich die Frage, wie die Situation beim Menschen ist. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass beim Gesunden 7 Tage nach Tetanusimmunisierung 2 Populationen von Plasmazellen im Blut zu finden sind. Die eine Population zeigt einen sehr niedrigen Aktivierungszustand und weist somit den Phänotyp reifer Plasmazellen auf. Die zweite Population zeigt einen hohen Aktivierungszustand, unter anderem gekennzeichnet durch die hohe Expression von MHCII, und könnte kurzlebigen Plasmablasten entsprechen. Eine mögliche Erklärung für das Erscheinen dieser beiden Plasmazellpopulationen ist die These, dass durch die vermehrte Generation von Tetanus-spezifischen Plasmablasten, langlebige Gedächtnis-Plasmazellen durch den Kompetitionsdruck aus ihren Überlebensnischen disloziert werden und deswegen im Blut nachweisbar werden. Entsprechend ist nur ein Teil dieser Plasmazellen Tetanus-spezifisch. Diese Studie zeigt, dass eine im Blut nachweisbare Expansion der Plasmazellen als Korrelat einer systemischen B-Zell-Hyperaktivierung anzusehen ist.

3.5 Bei Patienten mit Takayasu Arteritis findet sich ähnliche Veränderung des Plasmazell-Kompartimentes im Blut

Hoyer, BF, Mumtaz IM, Loddenkemper K, Bruns A, Sengler C, Hermann KG, Maza S, Keitzer R, Burmester GR, Buttgereit F, Radbruch A, and F. Hiepe. Takayasu arteritis is characterised by disturbances of B cell homeostasis and responds to B cell depletion therapy with rituximab. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:(75)-79.

Originalarbeit unter <https://dx.doi.org/10.1136/ard.2011.153007>

Bei Patienten mit SLE konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass eine hohe Krankheitsaktivität mit einer Expansion der Plasmazellen/-blasten im peripheren Blut korreliert [44, 45]. Entsprechend den Daten aus der zuvor gezeigten Studie [46] wird dies als Ausdruck der systemischen B-Zell-Hyperaktivierung gewertet.

In dieser Arbeit zeigen wir, dass eine ähnliche Expansion vor allem von MHCII-positiven Plasmablasten auch bei Patienten mit der sehr seltenen Riesenzellvaskulitis Takayasu Arteritis auftritt. Auch hier korreliert die Expansion der Plasmazellen im Blut der Patienten mit der Krankheitsaktivität. Zudem zeigen wir, dass es, bei Patienten, die vorher refraktär gegenüber den unterschiedlichsten Therapien waren, mit einer B-Zell-depletierenden Therapie mit Rituximab möglich ist, die Patienten längerfristig in Remission zu bringen.

Inzwischen konnten auch Autoantikörper bei diesem Krankheitsbild nachgewiesen werden [47].

Dies zeigt, dass die B-Zellen in der Pathogenese auch dieses Krankheitsbildes eine wichtige Rolle spielen und insbesondere das Plasmazellkompartiment eine wichtige Rolle inne hat: einerseits als Biomarker für Krankheitsaktivität, andererseits als ein die Krankheit-aufrechterhaltender Faktor, unter anderem über die Produktion von Autoantikörpern.

3.6 Erste *in vitro* Ergebnisse zeigen: eine spezifische Depletion von pathogenen Plasmazellen ist möglich

Taddeo A, Gerl V, **Hoyer BF**, Chang HD, Kohler S, Schaffert H, Thiel A, Radbruch A, Hiepe F. Selection and depletion of plasma cells based on the specificity of the secreted antibody. *Eur J Immunol*. 2015 Jan;45(1):317-9.

Originalpublikation unter: <https://dx.doi.org/10.1002/eji.201444993>

Langlebige, autoreaktive Gedächtnis-Plasmazellen lassen sich bislang nur mittels immunoablativer Verfahren oder selektiv mit Proteasominhibition depletieren [43, 48, 49]. Dies hat insbesondere den Nachteil, dass auch das protektive Gedächtnis beeinträchtigt wird. Diese iatrogene Immunsuppression führt unter anderem zu einer starken Infektanfälligkeit, die für einen Großteil der Komplikationen verantwortlich ist.

Zudem führt eine längerfristige Therapie mit Proteasominhibitoren bei etwa 40% zu Therapieabbrüchen auf Grund einer relevanten Thrombozytopenie und/oder Polyneuropathie.

Das langfristige Ziel muss somit eine spezifische Depletion antigen-spezifischer Plasmazellen sein. Dadurch wäre eine isolierte Depletion ausschließlich der pathogenen Zellen möglich. Dieser Therapieansatz ließe sich zudem nicht nur auf autoimmune, Antikörper-vermittelte Krankheitsbilder anwenden sondern letzten Endes auf jedes Antikörper-vermittelte Krankheitsbild mit einem definierten Antigen.

In dieser Studie zeigen wir mit ersten *in vitro* Ergebnissen, dass eine antigen-spezifische Plasmazell-Depletion mit Hilfe der sogenannten "Matrix-Technologie" möglich ist. Die Matrix ist ein Konjugat aus einem Antikörper gegen ein Plasmazell-Oberflächenmolekül, in dieser Studie CD138, mit einem definierten Antigen (hier Ovalbumin). In einer gemischten Kultur von Plasmazellen, die Antikörper gegen Ovalbumin produzieren und Plasmazellen, die Antikörper gegen ein beliebiges andere Antigen produzieren, wird die Matrix an alle Plasmazellen gebunden, da diese alle CD138 exprimieren. Bei den Plasmazellen, die tatsächlich Antikörper gegen Ovalbumin produzieren, binden die produzierten Antikörper an die auf der Zelloberfläche gebundene Matrix. In Anwesenheit von Komplement werden also alle diejenigen Zellen in Apoptose gehen, die die an die Matrix gebundenen Antikörper

auf der Oberfläche tragen – beim Ausschluss von „Cross feeding“ innerhalb der Kultur also alle diejenigen Plasmazellen, die Antikörper gegen Ovalbumin produzieren. Die restlichen Plasmazellen tragen zwar die Matrix auf der Oberfläche, zu einer Induktion von Apoptose kommt es hier nicht. In dieser Studie zeigen wir, dass dieses Konzept *in vitro* funktioniert und die Matrix in der Lage ist, Ovalbumin-spezifische Plasmazellen zu identifizieren. Auch erste Versuche mit Plasmazellen aus einem Mausmodell für Myasthenia gravis zeigen eine effiziente Depletion von Plasmazellen, die gegen Acetylcholin-Rezeptor gerichtete Antikörper produzieren. Geplant ist diese Ergebnisse im nächsten Schritt in die Maus zu übertragen. Sollte sich diese Technologie *in vivo* als funktionell erweisen, wäre dies ein Durchbruch in der Therapie Antikörper-vermittelter Erkrankungen.

4 Diskussion

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass das langlebige autoreaktive Plasmazellgedächtnis eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen einnimmt. Langlebige Gedächtnis-Plasmazellen sind refraktär gegen alle immunsuppressiven Standardtherapieverfahren. Weder das bei schweren systemischen Autoimmunerkrankungen verwendete Cyclophosphamid und andere anti-proliferativ wirkende Immunsuppressiva wie Mycophenolsäure (unpublizierte Daten) noch die Kombination von Cyclophosphamid mit Glukokortikoiden sind in der Lage, diese nicht-proliferierenden, aber weiterhin Autoantikörper-produzierenden langlebigen Gedächtnis-Plasmazellen zu eliminieren [50].

Wie wir weiter zeigen konnten, reicht der alleinige Transfer von Plasmazellen aus der Lupus-Maus in ein Mausmodell ohne eigenes Immunsystem aus, um eine Immunkomplexnephritis in den Empfängertieren zu verursachen [51]. Zudem können langfristig stabile Autoantikörpertiter in den Empfängertieren gemessen werden. Dies beweist, dass auch ohne weitere helfende Zellen das langlebige Plasmazellgedächtnis zur Aufrechterhaltung der Erkrankung führt. Somit sind die autoreaktiven Gedächtnis-Plasmazellen als pathogen anzusehen.

4.1 Gibt es ein „Window of opportunity“ für die therapeutische Plasmazell-Depletion?

Unsere Hoffnung, dass das langlebige Plasmazellkompartiment zu einem definierten Zeitpunkt im Zusammenhang mit der Entwicklung der Erkrankung entsteht und somit ein „window of opportunity“ für seine Depletion vorhanden wäre, konnten wir in den gezeigten Daten nicht bestätigen. Insbesondere im Knochenmark der untersuchten NZB/W F1-Mäuse geht die Bildung des langlebigen Plasmazellkompartimentes über die komplette Lebensdauer der Tiere weiter [52].

Nach erfolgreicher Depletion des langlebigen Plasmazellkompartimentes mit dem Proteasom-inhibitor Bortezomib regeneriert das Plasmazellkompartiment innerhalb von 2 Wochen wieder auf die Ausgangswerte aufgrund der kontinuierlichen Neubildung von Plasmazellen infolge der genetisch determinierten B-Zell-

Hyperaktivität in den analysierten NZB/W-Mäusen. Eine rasche Regeneration des autoreaktiven Plasmazellgedächtnisses scheint deshalb auch in SLE-Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Bortezomib-Therapie weiterhin eine B-Zell-Hyperaktivität vorliegt, möglich zu sein. Ein Teil der Patienten mit SLE, die mit Bortezomib behandelt wurden, wiesen nach Beendigung der Bortezomib-Therapie sehr schnell wieder eine Expansion von zirkulierenden Plasmablasten als Ausdruck einer B-Hyperaktivität auf [48].

4.2 Die Depletion des gesamten Plasmazell-Gedächtnisses als Beweis für die pathogenetisch bedeutende Rolle der Plasmazellen

Eine Methode das langlebige Plasmazellkompartiment auch im Menschen zu eliminieren, ist die autologe Stammzelltransplantation. Nach einem Konditionierungs-Schema wird hier eine Immunablation mit hochdosiertem Cyclophosphamid und Anti-Thymozytenglobulin (ATG) durchgeführt. Neben Cyclophosphamid, welches in der Lage ist, die proliferierenden Zellen zu depletieren, ist hier ATG der entscheidende Faktor. Wie wir zeigen konnten, sind nach der Gabe von ATG auch die Plasmazellen aus dem Knochenmark depletiert [49]. Auch protektive Antikörpertiter im Blut, die nach konventioneller Immunsuppression lediglich abfallen, genauso wie vorher refraktäre Autoantikörpertiter, waren nach der Immunablation weitgehend verschwunden. Mit dieser Methode depletiert man das komplette immunologische Gedächtnis und stellt somit eine Chance dar, ein normales, tolerantes Immunsystem neu zu entwickeln. Diese Wiederherstellung eines toleranten Immunsystems erklärt die erreichten Langzeitremissionen bei den Patienten [49].

Eine zweite, selektiver auf die Plasmazellen wirkende Methode ist die Plasmazell-Depletion mit Proteasominhibitoren. Auf Grund deren Wirkungsmechanismus, über die Aktivierung der sogenannten „unfolded protein response“, sprechen Plasmazellen wegen ihrer hohen Proteinsynthese besonders gut auf Proteasominhibition an. Neben der gezielten Wirkung auf Plasmazellen wirkt Bortezomib aber auch auf andere Zellen mit einer hohen Proteinsynthese [43]. Zudem vermindert es die Zellkontakte zwischen Stromazellen und Plasmazellen. Diese sind aber für das Überleben der Plasmazellen essentiell.

Hierüber erklären sich unter anderem die Nebenwirkungen, die gerade bei längerem Einsatz von Bortezomib zu beobachten sind. Hier ist an erster Stelle die Thrombozytopenie bei etwa 30% der behandelten Patienten zu nennen. Zweite klassische Nebenwirkung ist eine Polyneuropathie bei etwa 30-40% der Patienten [53]. Beides kann zum Therapieabbruch führen und ist Dosis-limitierend. Für eine persistierende Plasmazell-Depletion wäre aber eine langfristige Bortezomib-Monotherapie nötig, wie wir zeigen konnten. Bereits in der Publikation von Neubert et al. zeigt sich die Wirksamkeit der langfristigen Therapie in der Maus [43]. Allerdings sind im Mausmodell weniger Nebenwirkungen zu beobachten als beim Patienten. Ein Unterschied zwischen Maus und Patient ist auch, dass in der Maus mit den Proteasominhibitoren eine fast komplette Plasmazellablation erreicht werden kann, während diese beim Patienten nur inkomplett ist. Dies wird durch die inkomplette Reduktion der Autoantikörpertiter widerspiegelt [48].

Hieraus lässt sich ableiten, dass eine langfristige Therapie mit Bortezomib nur eine nachrangige Lösung sein kann. Trotzdem konnten wir in einer ersten Kohorte auch im Patienten zeigen, dass die Therapie effektiv ist [48].

Auf Grund der kompletten Immunablation birgt dieses Therapieverfahren ein hohes peri-interventionelles Infektionsrisiko. Aktuell bleibt diese Therapieoption schwerst kranken Patienten, die nicht auf die immunsuppressiven Standardtherapien ansprechen, vorbehalten.

Auf der anderen Seite könnte der Einsatz bei weniger schwer erkrankten Patienten zu einer Reduktion der Therapie-assoziierten Mortalität führen.

Optimal wäre ein Therapieeinsatz, der das Gedächtnis-Plasmazell-Kompartiment komplett depletiert, natürlich genau zu dem Zeitpunkt, zu dem das langlebige autoreaktive Plasmazellkompartiment entsteht.

Wie oben allerdings bereits dargestellt, gibt es diesen einen Zeitpunkt nicht. Sowohl im Tiermodell (Taddeo et al) als auch beim Patienten lassen sich zudem die Autoantikörper bereits lange vor Beginn der klinischen Krankheitssymptome nachweisen [27]. Zum Zeitpunkt des Krankheitsausbruchs und somit dem potentiell frühesten Therapiezeitpunkt ist oftmals die Grundlage für das autoreaktive Plasmazell-Gedächtnis bereits geschaffen. Denkbar wäre allerdings ein Einsatz bei

Erkrankungen, wo sich die Entstehung des spezifischen Plasmazell-Gedächtnisses zeitlich gut eingrenzen lässt, so z.B. bei Allo-Antikörper-vermittelter humoraler Rejektion nach Organtransplantation [54].

4.3 Plasmazell-Expansion als Korrelat für eine systemische B-Zell-Hyperaktivierung – Indikation zur Plasmazell-Vorläufer-Depletion

Im weiteren Verlauf konnten wir zeigen, dass sich eine Plasmazell-Expansion im peripheren Blut, wie sie beim SLE als Zeichen der systemischen B-Zell-Hyperaktivierung beobachtet werden kann [45], auch bei gesunden Probanden an Tag 7 nach einer Tetanus-Auffrischungs-Impfung finden [46].

Nach Tetanus-Immunsierung sind die Plasmablasten im peripheren Blut zum größten Teil Tetanus-spezifisch, während die reifen Plasmazellen eine gemischte Spezifität zeigen [46]. Die reifen Plasmazellen (niedrige MHCII-Expression) zeigen einen Phänotyp typisch für Knochenmarksplasmazellen. Da der größte Teil der neugebildeten Zellen allerdings Tetanus-spezifische Plasmablasten sind, werten wir dies als Nachweis dafür, dass die Plasmablasten-Expansion die systemische B-Zell-Hyperaktivierung abbildet und im peripheren Blut nachweisbar macht.

Beim SLE konnte bereits gezeigt werden, dass diese Expansion mit der Krankheitsaktivität korreliert [44, 55]. Hier lässt sich der durchflusszytometrisch erhobene Wert als Biomarker für Krankheitsaktivität nutzen.

Neben dem SLE finden sich ähnliche Veränderungen auch bei anderen Autoimmunerkrankungen.

In der Vergangenheit gab es bereits Beschreibungen im Sjögren-Syndrom [56]. Wir und andere haben Ähnliches für die Takayasu Arteritis, andere Riesenzellarteriitiden und die ANCA-assoziierten Vaskulitiden gezeigt [57-59]. Meist korreliert diese Plasmablasten-Expansion mit dem Auftreten von Autoantikörpern. Bei einem Teil der Vaskulitiden, die bisher als T-Zell vermittelt angesehen wurden, bei denen die Patienten allerdings B-Zell-Veränderungen zeigen, wie der Takayasu Arteritis und der Riesenzellvaskulitis oder der Polymyalgia rheumatica, konnten inzwischen ebenfalls Autoantikörper nachgewiesen werden [47, 60]. Ob die „expandierten“ Plasmazellen im Blut spezifisch für diese Autoantikörper sind, muss erst noch

gezeigt werden. Auch ihre Bedeutung in der Pathogenese ist noch nicht abschließend geklärt.

In jedem Fall haben sie eine Funktion als Biomarker zur Messung der Krankheitsaktivität. Auf Grund des sehr engen zeitlichen Zusammenhangs zwischen dem Auftreten einer solchen Plasmablasten-Population im peripheren Blut und einer erhöhten Krankheitsaktivität ist allerdings auch von einer Bedeutung für die Pathogenese in der „Schub“-Entstehung auszugehen.

4.4 Wie können wir die pathogene Zellen möglichst spezifisch depletieren?

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass das langlebige, autoreaktive Plasmazellgedächtnis sowohl im Mausmodell, als auch beim Menschen eine zentrale Rolle in der Pathogenese und im Krankheitsverlauf von Autoimmunerkrankungen spielt. Therapeutisch stellen diese Zellen uns noch immer vor eine große Herausforderung. Mit Therapieoptionen wie der Proteasominhibition oder der autologen Stammzelltransplantation haben wir inzwischen Möglichkeiten, die langlebigen Plasmazellen zu depletieren.

Leider sind diese Therapieoptionen einerseits mit einer hohen Nebenwirkungsrate/Mortalität verbunden und andererseits führen sie nur zu einer vorübergehenden Plasmazell-Depletion. Sie müssten also kontinuierlich gegeben werden, was wiederum durch die Nebenwirkungen limitiert ist. Zudem werden durch die unspezifische Depletion neben den pathogenen Zellen auch die protektiven Zellen depletiert. Dies führt zu einem deutlich erhöhten Infektionsrisiko.

Eine mögliche Lösung für die Regeneration des Plasmazell-Kompartimentes mit gleichzeitiger Minimierung der Nebenwirkungen ist eine kurzzeitige Kombination der unspezifischen Plasmazell-Depletion mit einer längerfristigen spezifischen Vorläufer-Zell-Depletion, z.B. mit dem depletierenden Antikörper gegen CD20 oder anderen Substanzen, die am B-Zell-Kompartiment angreifen.

Im Mausmodell ist aktuell kein dem Rituximab vergleichbar gut wirkender Antikörper verfügbar. Die verfügbare Alternative zeigt gerade im Lupus-Mausmodell eine insuffiziente Depletion [61]. So werden hier die Marginal-Zonen-B-Zellen und die peritonealen B-Zellen nur unwesentlich reduziert. Aus diesem

Grund sind wir in den gezeigten Daten auf das unspezifisch anti-proliferativ wirkende Cyclophosphamid ausgewichen.

Erste Daten von Patienten, unter anderem aus Studien zur Therapie Allo-Antikörper vermittelter humoraler Rejektionen, sprechen aber für einen guten Effekt der Kombination von Rituximab und Bortezomib [54].

Auch eine Kombination einer spezifischen B-Zell-Depletion zusammen mit der Unterdrückung von Plasmazell-Überlebensfaktoren wäre denkbar. Hierfür spricht auch, dass nach B-Zell-Depletion diese Überlebensfaktoren, wie z.B. BLYS extrem ansteigen [62].

Langfristiges Ziel sollte aber eine spezifische Depletion der autoantigen-spezifischen Zellen sein. Mit der sogenannten Matrix-Methode zeigen wir einen ersten – noch sehr experimentellen – Ansatz. Perspektivisch soll diese Methode auch beim Patienten angewandt werden. Der Einsatz der Matrix-Technologie zur antigen-spezifischen Plasmazell-Depletion bietet sich in erster Linie für Erkrankungen mit einem definierten Autoantigen an. Hier wären Erkrankungen wie die Myasthenia gravis zu nennen [63], aber genauso die membranöse Glomerulonephritis [64] oder Hauterkrankungen wie der Pemphigus vulgaris [65]. Bei Patienten mit SLE stehen wir vor der Herausforderung multipler Autoantigene. Hier wäre für das weitere Vorgehen wichtig, einzugrenzen, welche Autoantigene in der Pathogenese die wichtigste Rolle spielen.

Möglich wäre auch ein Einsatz bei Allergien, wo das Antigen klar definiert ist. Hier konnten im Mausmodell ebenfalls langlebige Plasmazellen nachgewiesen werden [66]. Bei IgE-vermittelten Erkrankungen könnte die Matrix-Technologie allerdings an der Kapazität des IgE zur Induktion von ADCC scheitern.

Zusammenfassend wäre für alle Antikörper-vermittelten Erkrankungen eine spezifische Depletion der Antigen-spezifischen Plasmazellen ein Ansatz, wie wir unseren Patienten langfristig helfen können. Voraussetzung hierfür ist ein noch besseres Verständnis der Rolle der Plasmazellen bei unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen, ihre spezifischen Autoantigene, ihre Verteilung und Stabilität in unterschiedlichen Geweben und ihrer Überlebensnische sowie mögliche Unterschiede zwischen pathogenen und protektiven Zellen.

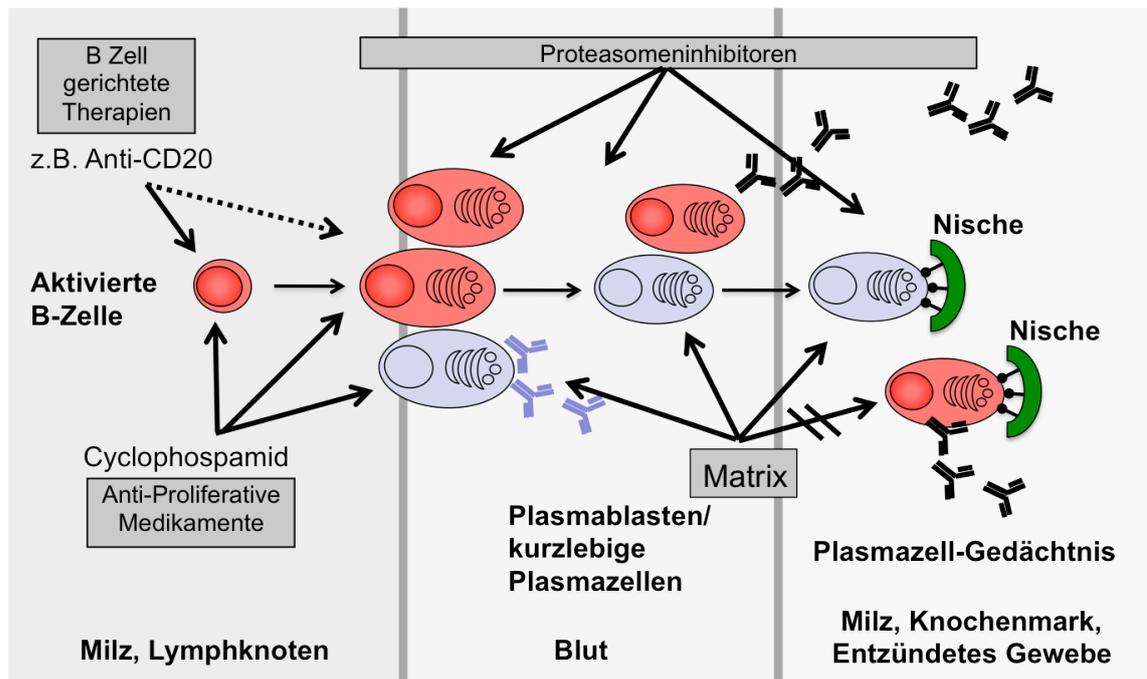


Abb 5: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Plasmazell-Depletionsverfahren. Rot und blau dargestellte Zellen entsprechen unterschiedlichen Spezifitäten der Plasmazellen. Während die Proteasominhibitoren unspezifisch alle Plasmazellen depletieren, führt die Matrix zu einer selektiven Depletion ausschließlich der „blauen“ Plasmazellen, also Zellen mit einer definierten Antigen-Spezifität.

Schlussendlich wird aber vermutlich nicht eine Therapie oder ein Ansatz alleine zielführend sein. Auch wenn wir mit den Plasmazellen allein die Erkrankung übertragen können, spielt in der Pathogenese die Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Zellpopulationen, Chemokinen, Zytokinen und pro- und anti-inflammatorischen Faktoren eine große Rolle. Es ist deshalb davon auszugehen, dass in den meisten Fällen eine Kombination, die an unterschiedlichen Stellen in das fehlgeleitete System eingreift, zur langfristigen Behandlung und Remissionsinduktion notwendig sein wird.

5 Zusammenfassung

Ein großer Teil der systemischen Autoimmunerkrankungen ist nachweislich an das Vorhandensein von Antikörpern gegen definierte Autoantigene gekoppelt. Diese Autoantikörper werden von den end-differenzierten Stadien der B-Zell-Linie, den sogenannten Plasmazellen, produziert und sezerniert.

In der Vergangenheit konnten wir gezeigt werden, dass es bei den Plasmazellen mindestens zwei Untergruppen gibt: die sogenannten kurzlebigen Plasmazellen und die langlebigen Gedächtnis-Plasmazellen. Die Gedächtnis-Plasmazellen haben eine beträchtlich längere Lebensdauer als kurzlebige Zellen (Jahre vs. Tage). Sie proliferieren nicht mehr und sezernieren kontinuierlich spezifische Antikörper.

Wir konnten erstmals zeigen, dass dies auch in einem hyperaktivierten Immunsystem, wie dies im Mausmodell des systemischen Lupus Erythematoses zu finden ist, der Fall ist. Sowohl unter den kurzlebigen als auch unter den Gedächtnis-Plasmazellen finden sich pathogene autoreaktive Zellen. Das Gedächtnis-Plasmazellkompartiment entsteht lange vor Ausbruch der klinischen Krankheitssymptome und ihre Neugeneration hält die komplette Lebenszeit an. Eine kombinierte Depletion der Plasmazellen und ihrer Vorläufer führt zu einer persistierenden Immunablation. Die Population autoreaktiver Gedächtnis-Plasmazellen stellt eine therapeutische Herausforderung dar. Standard-Immunsuppressiva sind nicht in der Lage, diese Zellen zu eliminieren. So tragen die Gedächtnis-Plasmazellen dazu bei, dass trotz massiver Immunsuppression Patienten bisher nicht geheilt werden können.

Beim Patienten mit unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen findet sich im Zusammenhang mit einem Krankheitsschub eine Expansion von kurzlebigen Plasmablasten im Blut als Korrelat für die systemische B-Zell-Hyperaktivierung. Dies ist, neben dem Nachweis von Autoantikörpern, ein Hinweis für eine Rolle der Plasmazellen in der Pathogenese der Erkrankungen.

Bisher sind wir nur zu einer unspezifischen Immunsuppression in der Lage. Mit Hilfe der Matrix-Technologie ist eine spezifische Depletion von Plasmazellen einer definierten Spezifität möglich.

Für eine Übertragung der murinen Daten in die Klinik ist ein noch besseres Verständnis der Rolle und Funktion der Plasmazellen bei unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen Voraussetzung. Dies würde einen Durchbruch in der Therapie aller chronischen Antikörper-vermittelten Erkrankungen, auch außerhalb der Rheumatologie, bedeuten.

6 Literaturangaben

1. Hoyer, B.F., et al., *Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice*. J Exp Med, 2004. **199**(11): p. 1577-84.
2. Beutler, B., *Innate immunity: an overview*. Mol Immunol, 2004. **40**(12): p. 845-59.
3. Adinolfi, M. and M.H. Lessof, *Development of humoral and cellular immunity in man*. J Med Genet, 1972. **9**(1): p. 86-91.
4. Shlomchik, M.J. and F. Weisel, *Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells*. Immunol Rev, 2012. **247**(1): p. 52-63.
5. Pieper, K., B. Grimbacher, and H. Eibel, *B-cell biology and development*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(4): p. 959-71.
6. Hilgenberg, E., et al., *Interleukin-10-producing B cells and the regulation of immunity*. Curr Top Microbiol Immunol, 2014. **380**: p. 69-92.
7. Shen, P., et al., *IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases*. Nature, 2014. **507**(7492): p. 366-70.
8. Ding, C. and J. Yan, *Regulation of autoreactive B cells: checkpoints and activation*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2007. **55**(2): p. 83-9.
9. Manz, R.A., A. Thiel, and A. Radbruch, *Lifetime of plasma cells in the bone marrow*. Nature, 1997. **388**(6638): p. 133-4.
10. Manz, R.A., et al., *Long-lived plasma cells survive independent of antigen*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **246**: p. 71-4; discussion 74-5.
11. Manz, R.A., et al., *Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen*. Int Immunol, 1998. **10**(11): p. 1703-11.
12. Amanna, I.J., N.E. Carlson, and M.K. Slifka, *Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens*. N Engl J Med, 2007. **357**(19): p. 1903-15.
13. Radbruch, A., et al., *Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 741-50.
14. Chu, V.T., et al., *Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow*. Nat Immunol, 2011. **12**(2): p. 151-9.
15. Mohr, E., et al., *Dendritic cells and monocyte/macrophages that create the IL-6/APRIL-rich lymph node microenvironments where plasmablasts mature*. J Immunol, 2009. **182**(4): p. 2113-23.
16. Moser, K., et al., *Stromal niches, plasma cell differentiation and survival*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(3): p. 265-70.
17. Winter, O., et al., *Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow*. Blood, 2010. **116**(11): p. 1867-75.
18. Nutt, S.L., et al., *The generation of antibody-secreting plasma cells*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(3): p. 160-71.
19. Cassese, G., et al., *Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(9): p. 2726-32.
20. Starke, C., et al., *High frequency of autoantibody-secreting cells and long-lived plasma cells within inflamed kidneys of NZB/W F1 lupus mice*. Eur J Immunol, 2011. **41**(7): p. 2107-12.
21. Cornec, D., et al., *Critical analysis of rituximab-induced serological changes in connective tissue diseases*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(6): p. 515-9.

22. Hiepe, F., et al., *Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation*. Nat Rev Rheumatol, 2011. **7**(3): p. 170-8.
23. Klippel, J.H., *Systemic lupus erythematosus: demographics, prognosis, and outcome*. J Rheumatol Suppl, 1997. **48**: p. 67-71.
24. Barbhuiya, M. and K.H. Costenbader, *Ultraviolet radiation and systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2014. **23**(6): p. 588-95.
25. Takvorian, S.U., J.F. Merola, and K.H. Costenbader, *Cigarette smoking, alcohol consumption and risk of systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2014. **23**(6): p. 537-44.
26. Hahn, B.H., *Antibodies to DNA*. N Engl J Med, 1998. **338**(19): p. 1359-68.
27. Eriksson, C., et al., *Autoantibodies predate the onset of systemic lupus erythematosus in northern Sweden*. Arthritis Res Ther, 2011. **13**(1): p. R30.
28. Kuhn, A. and A. Landmann, *The classification and diagnosis of cutaneous lupus erythematosus*. J Autoimmun, 2014. **48-49**: p. 14-9.
29. Cervera, R., et al., *Patterns of systemic lupus erythematosus expression in Europe*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(6): p. 621-9.
30. Ugarte-Gil, M.F. and G.S. Alarcon, *Systemic lupus erythematosus: a therapeutic challenge for the XXI century*. Clin Rheumatol, 2014. **33**(4): p. 441-50.
31. Furie, R., et al., *A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(12): p. 3918-30.
32. Lu, T.Y., et al., *A retrospective seven-year analysis of the use of B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus at University College London Hospital: the first fifty patients*. Arthritis Rheum, 2009. **61**(4): p. 482-7.
33. Merrill, J.T., et al., *Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(1): p. 222-33.
34. Rovin, B.H., et al., *Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(4): p. 1215-26.
35. Murray, E. and M. Perry, *Off-label use of rituximab in systemic lupus erythematosus: a systematic review*. Clin Rheumatol, 2010. **29**(7): p. 707-16.
36. Chatham, W.W., et al., *Effect of belimumab on vaccine antigen antibodies to influenza, pneumococcal, and tetanus vaccines in patients with systemic lupus erythematosus in the BLISS-76 trial*. J Rheumatol, 2012. **39**(8): p. 1632-40.
37. Guillevin, L. and C. Pagnoux, *[Classification of systemic vasculitides]*. Rev Prat, 2008. **58**(5): p. 480-6.
38. Jennette, J.C., et al., *2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(1): p. 1-11.
39. de Souza, A.W. and J.F. de Carvalho, *Diagnostic and classification criteria of Takayasu arteritis*. J Autoimmun, 2014. **48-49**: p. 79-83.
40. Weyand, C.M. and J.J. Goronzy, *Medium- and large-vessel vasculitis*. N Engl J Med, 2003. **349**(2): p. 160-9.
41. Stone, J.H., et al., *Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis*. N Engl J Med, 2010. **363**(3): p. 221-32.

42. Hoyer, B.F., et al., *How to cope with pathogenic long-lived plasma cells in autoimmune diseases*. Ann Rheum Dis, 2008. **67 Suppl 3**: p. iii87-9.
43. Neubert, K., et al., *The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis*. Nat Med, 2008. **14**(7): p. 748-55.
44. Jacobi, A.M., et al., *HLA-DRhigh/CD27high plasmablasts indicate active disease in patients with systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(1): p. 305-8.
45. Odendahl, M., et al., *Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5970-9.
46. Odendahl, M., et al., *Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1614-21.
47. Grosse, K., et al., *Association of ferritin antibodies with Takayasu arteritis*. Clin Rheumatol, 2014. **33**(10): p. 1523-6.
48. Alexander, T., et al., *The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and ameliorates clinical manifestations of refractory systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 2015.
49. Alexander, T., et al., *Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system*. Blood, 2009. **113**(1): p. 214-23.
50. Mumtaz, I.M., et al., *Bone marrow of NZB/W mice is the major site for plasma cells resistant to dexamethasone and cyclophosphamide: implications for the treatment of autoimmunity*. J Autoimmun, 2012. **39**(3): p. 180-8.
51. Cheng, Q., et al., *Autoantibodies from long-lived 'memory' plasma cells of NZB/W mice drive immune complex nephritis*. Ann Rheum Dis, 2013. **72**(12): p. 2011-7.
52. Taddeo, A., et al., *Long-lived plasma cells are early and constantly generated in New Zealand Black/New Zealand White F1 mice and their therapeutic depletion requires a combined targeting of autoreactive plasma cells and their precursors*. Arthritis Res Ther, 2015. **17**: p. 39.
53. Field-Smith, A., G.J. Morgan, and F.E. Davies, *Bortezomib (Velcade trade mark) in the Treatment of Multiple Myeloma*. Ther Clin Risk Manag, 2006. **2**(3): p. 271-9.
54. Duerr, M., et al., *Retrospective Cohort Study Concerning Efficacy and Safety of Bortezomib in Combination With Or Without Rituximab in Antibody Mediated Rejection in Renal Transplant Recipients (abstract)*. Am J Transplant, 2015. **15**(Suppl 3).
55. Jacobi, A.M., et al., *Correlation between circulating CD27high plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(5): p. 1332-42.
56. Hansen, A., et al., *Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(8): p. 2160-71.
57. Hoyer, B.F., et al., *Takayasu arteritis is characterised by disturbances of B cell homeostasis and responds to B cell depletion therapy with rituximab*. Ann Rheum Dis, 2012. **71**(1): p. 75-9.

58. Tsurikisawa, N., et al., *Decreases in the numbers of peripheral blood regulatory T cells, and increases in the levels of memory and activated B cells, in patients with active eosinophilic granulomatosis and polyangiitis*. J Clin Immunol, 2013. **33**(5): p. 965-76.
59. van der Geest, K.S., et al., *Disturbed B cell homeostasis in newly diagnosed giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica*. Arthritis Rheumatol, 2014. **66**(7): p. 1927-38.
60. Baerlecken, N.T., et al., *Association of ferritin autoantibodies with giant cell arteritis/polymyalgia rheumatica*. Ann Rheum Dis, 2012. **71**(6): p. 943-7.
61. Bekar, K.W., et al., *Prolonged effects of short-term anti-CD20 B cell depletion therapy in murine systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(8): p. 2443-57.
62. Carter, L.M., D.A. Isenberg, and M.R. Ehrenstein, *Elevated serum BAFF levels are associated with rising anti-double-stranded DNA antibody levels and disease flare following B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(10): p. 2672-9.
63. Kohler, S., et al., *Disturbed B cell subpopulations and increased plasma cells in myasthenia gravis patients*. J Neuroimmunol, 2013. **264**(1-2): p. 114-9.
64. Tomas, N.M., et al., *Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy*. N Engl J Med, 2014. **371**(24): p. 2277-87.
65. Ding, X., et al., *The anti-desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris sera are pathogenic*. J Invest Dermatol, 1999. **112**(5): p. 739-43.
66. Luger, E.O., et al., *Induction of long-lived allergen-specific plasma cells by mucosal allergen challenge*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(4): p. 819-26 e4.

7 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Falk Hiepe für die jahrelange sehr gute Zusammenarbeit, die kontinuierliche Förderung, die Weitergabe der Begeisterung für die Rheumatologie und insbesondere die Lupus- und Plasmazell-Forschung!

Genauso geht mein Dank an Prof. Andreas Radbruch für die bereits jahrelange Förderung und kritische Diskussion von Ideen und Daten!

Prof. Gerd Burmester möchte ich ebenfalls für seine Unterstützung und die gute klinische Ausbildung danken. Nur in einer passenden Umgebung kann innovative Forschung passieren!

Mein ganz großer Dank geht weiter an die Kollegen aus dem Labor und hier vor allem Imtiaz Mumtaz, der uns leider viel zu früh verlassen hat, Adriano Taddeo, Capucine Daridon, Henrik Mei, Laleh Khodadadi und Qingyu Cheng für die gute und produktive Zusammenarbeit und kontinuierliche kritische Diskussion!

Prof. Rudi Manz gilt ebenfalls mein großer Dank! Nicht nur dafür, dass er mich in die Laborarbeit eingeführt hat, sondern auch, dass er mich zusammen mit Prof. Falk Hiepe für die Plasmazelle begeistert hat.

Weiter gilt mein Dank auch allen anderen Kollegen aus dem Deutschen Rheumaforschungszentrum, die ebenfalls ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Natürlich geht mein Dank auch an die Kollegen aus der Klinik. Ohne sie ist eine Arbeit mit Patienten/Proben nicht möglich und das ein oder andere Mal ist auch ihr Verständnis gefragt gewesen, wenn ein Experiment mal wieder den Zeitplan durcheinander gebracht hat. Bedanken möchte ich mich weiter bei Prof. Thomas Dörner für seine ebenfalls langjährige Unterstützung.

Danken möchte ich weiterhin all unseren Patienten! Forschung ist einerseits für unsere Patienten – aber ohne sie auch nicht möglich.

Und nicht zuletzt geht mein Dank natürlich an meine Familie: meine Eltern und Geschwister, die mich immer in meiner Arbeit unterstützt und ermutigt haben, meinen Weg zu gehen! Ohne Euch wäre dies alles nicht möglich gewesen! Danke!

8 Eidesstattliche Erklärung

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

Hiermit erkläre ich, dass

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

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

.....
Datum

.....
Unterschrift