

Aus der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Anti-CD22 – vermittelte Änderung
der Expression von Adhäsionsmolekülen und des
Migrationsverhaltens von B-Lymphozyten bei SLE-
Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Daniela Blaßfeld

aus Aschersleben

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. T. Dörner
2. Prof. Dr. med. H.-P. Tony
3. Prof. Dr. H.-P. Brezinschek

Datum der Promotion: 22.03.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1. Systemischer Lupus erythematoses (SLE)	2
1.2. Die Lymphozytopoese	5
1.2.1. Entwicklungsstufen der B-Lymphozyten und deren charakteristisches Oberflächenmolekülprofil	5
1.3. Die Mechanismen der Leukozytenmigration	8
1.4. Die Therapie des systemischen Lupus erythematoses (SLE)	10
1.4.1. Konventionelle Therapeutika.....	10
1.4.2. Biopharmazeutika	11
1.5. Epratuzumab und sein Ziel-Antigen CD22	13
1.6. Zielsetzung	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Material.....	17
2.1.1. Blutproben	17
2.1.2. Zusammenstellung wichtiger Geräte.....	17
2.1.3. Verbrauchsmittel, Chemikalien und Reagenzien.....	18
2.1.4. Fluoreszenz-markierte Antikörper	19
2.2. Durchflusszytometrie und Zellsortierung	20
2.2.1. Das Prinzip der Durchflusszytometrie	20
2.3. Zellzahlbestimmung.....	21
2.3.1. Durchflusszytometrische Zellzahlbestimmung (TruCount-System).....	21
2.3.2. Zellzahlbestimmung durch das Zellzählgerät Micros 60	23
2.4. Verwendung mononukleärer Zellen aus EDTA-Vollblut	23
2.4.1. Isolierung mononukleärer Zellen für die Expressionsanalyse des CD22- Oberflächenmoleküls auf PBMCs	23
2.4.2. Isolierung mononukleärer Zellen für die <i>In vitro</i> Inkubation und die Transmigrationsexperimente mit Epratuzumab.....	24
2.5. Analyse der CD22-Expression	25
2.5.1. Durchflusszytometrische Analyse des CD22-Oberflächenmoleküls	25

2.6. Analyse der Adhäsionsmoleküle	29
2.6.1. Inkubation von PBMCs mit und ohne Epratuzumab	29
2.6.2. Durchflusszytometrische Analyse der Adhäsionsmoleküle auf B-Zellen.....	29
2.7. Das Prinzip des In vitro - Transmigrationsexperiments	30
2.7.1. Das Prinzip des <i>In vitro</i> - Transmigrationsexperiments	30
2.7.2. Durchführung des Transmigrationsexperiments und der FACS-Analyse.....	32
2.2.7. Auswertung und Statistische Analysen	34
3. Ergebnisse.....	35
3.1. Nachweis erniedrigter Lymphozytenzahlen bei SLE-Patienten	35
3.2. Nachweis der CD22-Oberflächenexpression auf B-Zellen und der spezifischen Bindung von Epratuzumab auf deren Subpopulationen	36
3.2.1. CD22-Expression auf PBMCs.....	36
3.2.2. Spezifische Bindungskapazität von Epratuzumab.....	37
3.2.3. Bindung von Epratuzumab auf differenzierten B-Zell-Subpopulationen von gesunden Probanden und SLE-Patienten	39
3.3. Einfluss von Epratuzumab auf die Expression von CD62L und β_7 -Integrin auf B-Zellen	43
3.3.1. Reduktion der CD62L-Expression auf B-Zellen nach Epratuzumab-Inkubation.....	43
3.3.2. Reduktion der β_7 -Integrin-Expression auf B-Zellen nach Epratuzumab-Inkubation..	45
3.4. Steigerung der In vitro-Migration von B-Zellen durch Epratuzumab	47
3.4.1. Erhöhte spontane Migration von B-Zellen durch Epratuzumab	47
3.4.2 Chemokin-spezifische Migration CD19 ⁺ B-Zellen unter Epratuzumab.....	51
3.4.3. Chemokin-spezifische Migration der B-Zell-Subpopulationen unter Epratuzumab ..	52
3.5. Vergleich der Effekte Epratuzumabs auf B-Zellen gesunder Probanden und auf B-Zellen von SLE-Patienten.....	59
3.5.1. Epratuzumab-Bindung	59
3.5.2. Änderung der Expressionsfrequenzen der Adhäsionsmoleküle CD62L und β_7 - Integrin durch Epratuzumab-Inkubation	60
3.5.3. Migration.....	62
4. Diskussion	68
4.1. Nachweis erniedrigter Lymphozytenzahlen bei SLE-Patienten	69
4.2. Nachweis der CD22-Oberflächenexpression und der spezifischen Bindung von Epratuzumab	69
4.2.1. CD22-Expression auf B-Zellen.....	69
4.2.2. Spezifische Bindung des Anti-CD22-Antikörpers Epratuzumab	69
4.2.3. Spezifische Bindung Epratuzumabs auf verschiedenen B-Zell-Subpopulationen	70

4.3. Reduktion der CD62L und β_7 -Integrin Expression auf B-Zellen nach Inkubation mit Epratuzumab	72
4.3.1. CD62L	72
4.3.2. β_7 -Integrin	73
4.3.3. Zusammenfassung	74
4.4. Steigerung der Migrationsfrequenzen von B-Zell-Subpopulationen unter Epratuzumab	75
4.4.1. Steigerung der spontanen Migrationsfrequenz.....	75
4.4.2. Steigerung der chemokin-spezifischen Migrationsfrequenz.....	76
4.4.3. Zusammenfassung	80
4.5. Unterschiedliche Effekte von Epratuzumab auf die B-Zellen von gesunden Personen und SLE-Patienten	82
4.5.1. Expressionsänderung der Adhäsionsmoleküle CD62L und β_7 -Integrin auf der B-Zell-Oberfläche durch Epratuzumab	82
4.5.3. Zusammenfassung	86
4.6. Schlussfolgerungen und Ausblick	88
5. Literaturverzeichnis	89
Lebenslauf	98
Publikationsliste.....	99
Danksagung.....	100
Eidesstattliche Erklärung	101

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ACR	American College of Rheumatology
ADCC	Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ANA	Anti-nukleäre Antikörper
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BAFF	B-Zellen aktivierender Faktor
BILAG	British Isles Lupus Assessment Group
BSA	bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
BCR	B-Zell-Rezeptor
CD	cluster of differentiation
CDC	Komplement-vermittelte Zytolyse
CpG	Immunstimulanz bestehend aus Guanin- und Cytosinhaltigen Oligonukleotiden
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CXCL	Chemokin, C-X-C-motif ligand
CXCR	Chemokin-Rezeptor, C-X-C-motif Rezeptor
Cy5	Indodicarbocyanin-5
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F _{ab}	fragment antigen binding
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
F _c	fragment crystallizable, kristallisierbares Fragment
FITC	Fluorescein Isothiocyanat

FSC	forward light scatter
g	Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)
GALT	darmassoziierte lymphatische Gewebe
GIT	Gastrointestinaltrakt
h	Stunde
HD	Healthy Donor, gesunder Proband
HDLA	Human leukocyte differentiation antigen, humane Leukozyten-Differenzierungs-Antigene
HEV	Hochendotheliale Venolen
Ig	Immunglobulin
IgA, IgD, IgE, IgG, IgM	Immunglobulin des Isotyps A, D, E, G oder M
IgG ₁	Immunglobulin des Isotyps G ₁
IL	Interleukin
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-basierte Aktivierungsmotive
ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-basierte Inhibierungsmotive
M	Molarität (M=mol/l)
MALT	Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
Mg	Magnesium
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min	Minute
ml	Milliliter
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK	Natürliche Killerzellen
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant (p > 0,05)
NSAR	Nicht-steroidale Anti-Rheumatika
p-Wert	Wahrscheinlichkeit, Signifikanz-Wert
PacB	Pacific Blue [®]
PBS	phosphate buffered saline
PBMC	peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PE	Phycoerythrin
PE-CY7	Phycoerythrin Cyanin 7
PerCP	Peridinin Chlorophyll-a Protein
Pro-B	Progenitor-B-Zelle
RA	Rheumatoide Arthritis
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxine substrate 1
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure

rpm	Runden pro Minute
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institut-Medium
SD	Standardabweichung
SHM	somatische Hypermutation
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
Siglec	sialic acid binding Ig-like lectins
Sm-Ak	Smith-Antigen-Antikörper
sog.	sogenannt
SSC	sideward light scatter
u. a.	unter anderem
VDJ-Rearrangement	Genumlagerung des Ag-bindenden Teils der schweren Kette des Igs
VJ-Rearrangement	Genumlagerung des Ag-bindenden Teils der leichten Kette des Igs
VLE RPMI	Very low endotoxin Roswell Park Memorial Institut-Medium
w/o	without, ohne
ZNS	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Einleitung

Die Autoimmunerkrankung systemischer Lupus erythematoses wird bisher bei schwerer Verlaufsform mit Immunsuppression bzw. zytotoxischen Substanzen behandelt. Diese zeigen allerdings zum Teil sehr starke Nebenwirkungen. Medikamente, die gezielter in Immunprozesse und deren Regulation eingreifen und zugleich weniger globale Immuneinschränkungen bedingen, befinden sich derzeit in klinischer Entwicklung. Hierunter befindet sich auch der humanisierte Anti-CD22-Antikörper Epratuzumab, der in klinischen Studien bereits vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich einer reduzierten Krankheitsaktivität bei SLE-Patienten gezeigt hat. Da das Oberflächenmolekül CD22 ein B-Zell-spezifisches Molekül ist, handelt es sich bei Epratuzumab um einen B-Zell-gerichteten Therapie-Antikörper. In ersten klinischen Studien wurde einhergehend mit einer reduzierten Krankheitsaktivität eine Reduktion CD27-negativer, vornehmlich naiver B-Zellen im peripheren Blut von SLE-Patienten nachgewiesen [1]. Dies führt zu der Frage nach dem konkreten Wirkmechanismus des Antikörpers, welcher bisher noch nicht aufgeklärt worden ist.

Zielsetzung

Diese Dissertation untersucht erstmalig die Wirkung von Epratuzumab auf die Expression und Funktionalität von Rezeptoren der B-Zell-Migration *in vitro*.

Methoden

Es erfolgte die Analyse der Expression der Adhäsionsmoleküle CD62L und β_7 -Integrin sowie der funktionellen Veränderungen in der Zellmigration gegenüber den Chemokinen CXCL12, CXCL13 und den CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 bei verschiedenen B-Zell-Subpopulationen gesunder Probanden im Vergleich zu SLE-Patienten. Die Expression des Ziel-Moleküls CD22 und der Adhäsionsmoleküle CD62L und β_7 -Integrin wurde dabei durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellmigration, sowohl Chemokin-unabhängig als auch CXCL12-, CXCL13- und CXCR3-Liganden-spezifisch, wurde mit Hilfe von *In vitro*-Transmigrationversuchen und anschließender FACS-Analyse untersucht.

Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass Epratuzumab das Zelladhäsions- und Migrationsverhalten von B-Zellen verändert. Die FACS-Analyse zeigte zudem *in vitro*

eine erhöhte Bindung Epratuzumabs auf CD27⁻ bzw. CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Zellen im Vergleich zu CD27⁺ bzw. CD27⁺ IgD⁻ Gedächtnis-B-Zellen. Nach Inkubation des Antikörpers konnte eine reduzierte Expression von CD62L und β_7 -Integrin auf CD27⁻ B-Zellen von gesunden Probanden und von SLE-Patienten festgestellt werden. Des Weiteren führte die Inkubation mit Epratuzumab bei B-Zellen gesunder Probanden zu einer erhöhten Migration gegenüber allen getesteten Chemokinen, während bei SLE-Patienten eine Steigerung nur gegenüber CXCL12 zu verzeichnen war. Die Fraktion der CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Zellen wies dabei jeweils die höchste Migrationszunahme auf. Als genereller Effekt des Antikörpers konnte außerdem eine Steigerung der Chemokin-unabhängigen Migration aller B-Zellen, sowohl bei gesunden Probanden als auch bei SLE-Patienten, nachgewiesen werden.

Der Vergleich der Antikörper-Wirkung auf die B-Zellen gesunder Probanden und SLE-Patienten zeigte deutliche Unterschiede. Die Reduktion der β_7 -Integrin-Expression nach Einwirkung von Epratuzumab war auf B-Zellen von SLE-Patienten geringer als auf B-Zellen gesunder Probanden. Des Weiteren zeigte sich gegenüber den Chemokinen CXCL13 und den CXCR3-Liganden bei Gesunden, aber nicht bei SLE-Patienten, eine Migrationszunahme der B-Zellen nach Inkubation mit Epratuzumab.

Diskussion

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass Epratuzumab die gezielte Wanderung speziell der CD27⁻ bzw. CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Zellen des peripheren Blutes beeinflusst. Die nach *In vitro*-Inkubation mit dem Antikörper beobachtete Migrationszunahme der B-Zellen könnte *in vivo* einer erhöhten Emigration dieser Zellen aus dem peripheren Blut entsprechen, während die *in vitro* beobachtete veränderte Expression der Adhäsionsmoleküle CD62L und β_7 -Integrin sich *in vivo* sowohl auf die Emigration aus dem Blut als auch auf die Entlassung der Zellen aus den Immungeweben auswirken könnte. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die *in vivo* unter Epratuzumab-Therapie beobachtete Reduktion der CD27⁻ naiven B-Zellen im peripheren Blut von SLE-Patienten.

Schlußfolgerung

Das durch Einwirkung des Antikörpers veränderte Zelladhäsions- und Migrationsverhalten zeigt mögliche Wirkmechanismen von Epratuzumab auf, die klinisch in der Behandlung von SLE-Patienten von Bedeutung sein können.

1. Einleitung

Die Erkrankung systemischer Lupus erythematoses (SLE) ist eine Autoimmunerkrankung, bei welcher die Abwehrzellen des Körpers körpereigene Strukturen als „fremd“ erkennen und eine Entzündungsreaktion auslösen. Diese Erkrankung tritt meist bereits im frühen bis mittleren Lebensalter auf [2] und zeigt einen chronischen Verlauf mit häufig auftretenden Krankheitsschüben, die viele innere Organe einschließlich der Niere und des zentralen Nervensystems (ZNS) schädigen können [3]. Die Krankheit führt somit zu starkem Leidensdruck und Lebenseinschränkungen vieler Patienten, trotz optimierter Therapiemaßnahmen treten selbst lebensbedrohliche Verläufe auf [4]. Der genaue Pathomechanismus der Entstehung und zum Erhalt der Erkrankung beträgt ist noch nicht geklärt. Da jedoch sowohl eine Korrelation des Autoantikörper-Titers mit der Krankheitsaktivität [4;5] als auch eine erhöhte Poly- und Selbstreaktivität von naiven B-Zellen bei SLE-Patienten nachgewiesen wurde [6], wird den B-Lymphozyten eine Schlüsselrolle in dieser Erkrankung zugeschrieben.

Die bisherige Therapie der Erkrankung beruhte auf entzündungshemmenden, allgemein immunsuppressiven bzw. zytotoxischen Medikamenten wie nicht steroidalen Anti-Rheumatika (NSAR), Glukokortikoide, Azathioprin und Cyclophosphamid [7]. Ein Therapieproblem stellen jedoch die eingeschränkten Anwendungsmöglichkeiten in Abhängigkeit von der Krankheitsausprägung, die auftretenden Nebenwirkungen wie eine erhöhte Infektanfälligkeit und die sich entwickelnden Toleranzen gegenüber diesen bisherigen Medikamente dar. Aus diesem Grund ist es wichtig neue spezifisch-immunmodulierende Therapieansätze zu finden, die ein gezielteres Eingreifen in die Pathogenese der Erkrankung und somit eine bessere Verträglichkeit und Wirkung erzielen und eine langfristige Medikation ermöglichen. Besonders vielversprechend sind hier Biopharmazeutika, welche gezielt in die B-Zell-Homöostase eingreifen, wie das bereits vor kurzem zugelassene Belimumab.

Epratuzumab ein weiterer Vertreter dieser Medikamentengruppe ist ein gegen das B-zellspezifische Oberflächenmolekül CD22-gerichteter Therapie-Antikörper. In einer offenen klinischen Studie wurde bereits gezeigt, dass es bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses unter Epratuzumab-Therapie zu einer deutlichen klinischen Besserung kommt, welche mit einer verminderten Konzentration von vornehmlich naiven CD27⁺ B-Zellen im peripheren Blut einhergeht [1]. Der genaue

Wirkmechanismus von Epratuzumab ist noch nicht geklärt. Eine mögliche Ursache für die beobachtete Reduktion der naiven B-Zellen stellt eine veränderte Adhäsion und Migration dieser Zellen unter dem Einfluss von Epratuzumab dar.

1.1. Systemischer Lupus erythematodes (SLE)

Die Autoimmunerkrankung systemischer Lupus erythematodes wird den Kollagenosen (Bindegewebserkrankungen) zugeordnet. Sie tritt mit einer Prävalenz von ungefähr 20-120 pro 100 000 Einwohner auf und betrifft meist Frauen im mittleren Lebensalter (♀:♂ 10:1) [2]. Die Patienten fallen häufig mit intermittierend auftretenden, unspezifischen Symptomen wie Fieber, Abgeschlagenheit sowie Muskel- und Gelenkschmerzen (Myalgie, Polyarthrit) auf. Es handelt sich um eine sehr heterogene Erkrankung, welche verschiedene Organsysteme involvieren kann [8].

Abbildung 1-1 gibt einen Überblick über die betroffene Organsysteme und ihre jeweiligen Symptome. Typische Krankheitszeichen sind Hautveränderungen (erhöhte Photosensibilität, Schmetterlingserythem), Gefäßerkrankungen (Vaskulitis, Raynaud-Syndrom), hämatologische Veränderungen (Leuko- bzw. Lymphopenie, Thrombopenie), Nierenbeteiligung (Glomerulonephritis), kardiale Beteiligung (abakterielle Endokarditis, Perikarditis), Lungenbeteiligung (Pleuritis) und neurologische Veränderungen („Buntes Bild“: kognitive Störungen, Psycho-Syndrome, Depressionen, Neuropathien) [3].

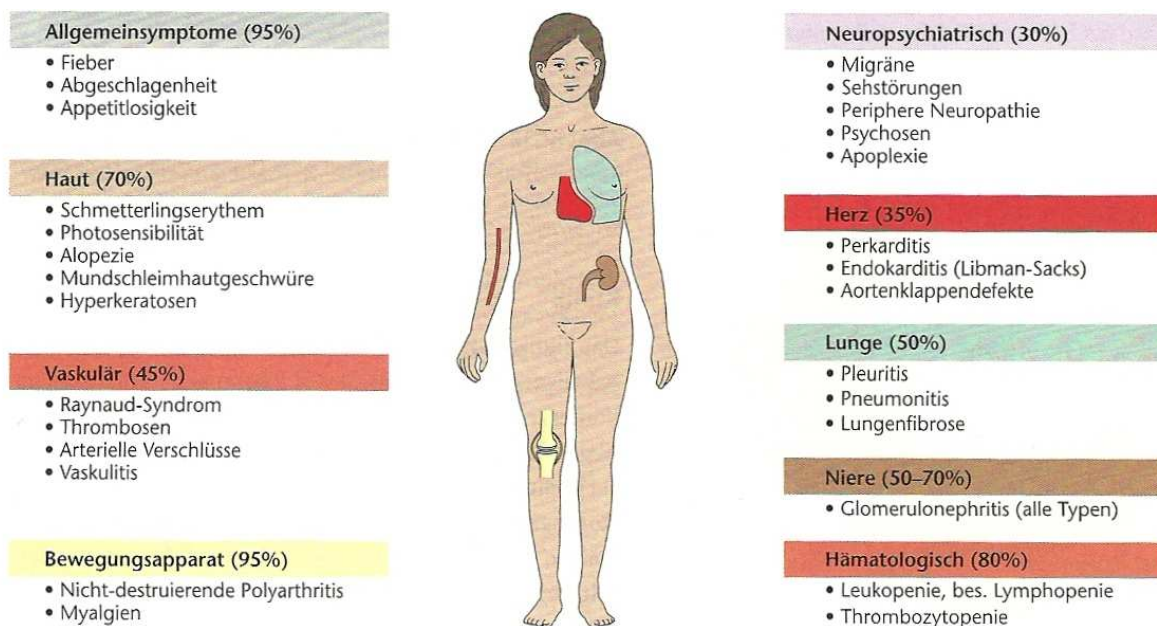


Abbildung 1-1 Organmanifestationen und mögliche Symptome bei SLE [3]

Die schubweise verlaufende Erkrankung mit stark variierender Ausprägung führt häufig zu chronischen Veränderungen verschiedener Organe. Sie weist ein signifikant erhöhtes Risiko der Mortalität und Langzeit-Morbidität auf und kann trotz optimierter Therapie lebensbedrohlich verlaufen. Die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt ca. 92%, wobei die Lupusnephritis als schwerwiegendste Komplikation gilt [4]. Die Einschätzung der Krankheitsaktivität kann zum Beispiel mit Hilfe von BILAG-Scores (*British Isles Lupus Assessment Group*) erfolgen. Die klinische Heterogenität der Erkrankung weist auf eine hohe Komplexität der Ätiologie und Pathogenese hin, welche bis heute noch nicht genau geklärt sind. Es wird vermutet, dass komplexe Interaktionen zwischen genetischen, hormonellen und immunologischen Eigenschaften sowie Umweltfaktoren die Erkrankung auslösen können [9].

Die Diagnose des SLE beruht auf der Erfüllung von mindestens 4 der 11 Diagnose-Kriterien des *American College of Rheumatology (ACR)* (Tabelle 1-1). Neben den klinischen Manifestationen dienen insbesondere Laborparameter der Diagnose der Erkrankung. Mehr als 90% der SLE-Patienten weisen Ak gegen Zellkernbestandteile, welche als anti-nukleäre Ak (ANA) bezeichnet werden, auf. Dieser Nachweis ist zwar sensitiv, aber wenig spezifisch für SLE, d.h. ANAs treten ebenfalls bei anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (RA) auf. Gegen doppelsträngige DNA (dsDNA) und Nukleosomenbestandteile gerichtete AK zeigen hingegen eine gute Spezifität für SLE und sind bei ca. 65% der SLE-Patienten positiv. Diese Auto-Ak sind meist schon 2-9 Jahre vor dem eigentlichen Krankheitsausbruch detektierbar und ihr Titer korreliert häufig mit der Krankheitsaktivität [4;5]. Ihnen wird eine Schlüsselrolle in dieser Erkrankung zugeschrieben. In Form von Ag-Ak-Komplexe lösen sie entzündliche Immunreaktionen unter Beteiligung von angeborenen Immunzellen aus, welche häufig Organschäden bedingen können. Eine signifikant erhöhte Polyreaktivität und Selbstreaktivität der reifen, naiven B-Zellen von SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden spricht dabei für eine Dysfunktion der zentralen Toleranz in der B-Zell-Entwicklung [6]. Neben der Auto-Ak-Produktion können autoreaktive B-Zellen außerdem durch Auto-Ag-Präsentation, Kostimulation von T-Zellen und Produktion verschiedener Zytokine die Pathogenese des SLE beeinflussen. In Lupus-Mausmodellen wurde bereits gezeigt, dass die reine Präsenz von autoreaktiven B-Zellen, ohne Ak-Produktion, zur Krankheitsentwicklung beiträgt [10]. Des Weiteren konnte eine Erhöhung von B-Zell-Aktivatoren wie BAFF bei SLE-Patienten

nachgewiesen werden [11]. Dies und die gehäuft auftretenden Auto-Ak untermauern eine Schlüsselrolle von B-Zellen in der Pathogenese der Erkrankung.

Tabelle 1-1 ACR-Kriterien des SLE in der revidierten Fassung von 1997 [12]

• Schmetterlingserythem
• Diskoider Lupus
• Photosensitivität
• Schleimhautulzerationen
• Arthritis (nicht erosiv)
• Serositis (z. B. Pleuritis, Perikarditis)
• Glomerulonephritis (anhaltende Proteinurie 0,5g täglich oder Zylindrurie)
• Neurologische Symptome: Krampfanfälle, Psychose
• Hämatologische Befunde: immunhämolytische Anämie (Retikulozytose), Thrombopenie (< 100 000/ μ l), Leukopenie (< 4 000/ μ l), Lymphopenie (< 1 500/ μ l)
• Immunologische Befunde: ds-DNA-AK-Nachweis, Sm-Ak-Nachweis, Antiphospholipid-Ak-Nachweis
• Erhöhter ANA-Titer bei fehlender Medikamenteneinnahme, kann zu „drug-induced SLE“ führen

Neben der bereits beschriebenen Lymphopenie zeigten Untersuchungen auffällige Unterschiede in den B-Zell-Kompartimenten des peripheren Blutes von Gesunden gegenüber SLE-Patienten. Dabei wurde eine Reduktion der absoluten Anzahl der naiven B-Zellen (CD19⁺, CD27⁻) im peripheren Blut festgestellt, wobei die absolute Anzahl der Gedächtnis-B-Zellen (CD19⁺, CD27⁺) mit gesunden Probanden vergleichbar war [12]. Besonders interessant ist hierbei der Nachweis eines gesteigerten Vorkommens von CD27⁻ IgD⁻ Gedächtnis-Zellen bei Lupus-Patienten [13]. Auch wenn noch nicht sicher gesagt werden kann, welche immunologischen Befunde primär und somit an der Krankheitsentstehung beteiligt sind und welche zu den sekundären Folgen der Erkrankung gehören [14], stützen sie die These einer zentralen pathologischen Rolle der B-Zellen und ihrer verschiedenen Reifungsstadien bei dieser Erkrankung. Aus diesem Grund wird die Entwicklung und Reifung von B-Lymphozyten im Folgenden näher erläutert.

1.2. Die Lymphozytopoese

Die Lymphozytopoese beschreibt die Entwicklung und Reifung der Lymphozyten aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Die verschiedenen Lymphozyten sind morphologisch kaum voneinander zu unterscheiden. Sie exprimieren jedoch, abhängig von ihrem Entwicklungs- und Aktivierungsstadium, verschiedene Rezeptoren und andere Moleküle auf ihrer Zelloberfläche [15]. Die Klassifizierung dieser Moleküle erfolgt zum größten Teil unter Verwendung der CD (Cluster of Differentiation)-Nomenklatur und wird in regelmäßigen Abständen auf der internationalen Konferenz der HLDA (Human Leukocyte Differentiation Antigens) ergänzt. Anhand des CD-Profiles ist eine Identifizierung bestimmter Zelltypen, ihres aktuellen Reifestadiums und ihrer Funktion möglich [16].

1.2.1. Entwicklungsstufen der B-Lymphozyten und deren charakteristisches Oberflächenmolekül-Profil

Spezifische Rezeptor-Liganden-Interaktionen mit den Stromazellen des Knochenmarks und ein spezifisches Milieu regulatorischer Zytokine und Chemokine steuern die Differenzierung der B-Lymphozyten [17]. Die erste Entwicklungsstufe der B-Zelle wird als Progenitor-B-Zelle (Pro-B) bezeichnet. Hier exprimiert die Zelle das B-Zell-spezifische Antigen CD19 auf ihrer Oberfläche, was sich während der gesamten B-Zell-Entwicklung auf der Zelloberfläche befindet und erst während der Plasmazelldifferenzierung verloren geht. Des Weiteren ist die Pro-B-Zelle durch die intrazytoplasmatische Expression des CD22-Moleküls gekennzeichnet [18] (Abbildung 1-2). Während der Herstellung des ersten Ag-spezifischen Bereichs der schweren Kette des Immunglobulins (VDJ-Rearrangement), exprimiert die Prä-B-Zelle neben dem CD19-Molekül auch CD20- und CD22-Moleküle auf ihrer Oberfläche, sowie die schwere Kette des IgM-Moleküls im Zytoplasma [19]. Nach erfolgreicher Umlagerung der Gene des zweiten Teils der Ag-Bindungsdomäne, der leichten Kette (VJ-Rearrangement), produziert der nun unreife, naive B-Lymphozyt erstmalig IgM-Moleküle und präsentiert diese membrangebunden auf seiner Zelloberfläche [17-19]. Nach Durchlaufen eines zentralen Selektionsprozess zur Eliminierung autoreaktiver Zellen gelangt der unreife, naive B-Lymphozyt, welcher auch als transitionale B-Zelle bezeichnet wird, über das Blut in die sekundären lymphatischen Organe [16;17]. Hier erhält er Überlebenssignale

von anderen Immunzellen und durchläuft einen weiteren Selektionsprozess. Der reife, naive B-Lymphozyt exprimiert neben IgM nun auch membrangebundene IgD-Moleküle und zirkuliert so lange zwischen den peripheren lymphatischen Organen und dem Blut bis er auf ein passendes Antigen stößt oder stirbt. Der Reifungsprozess wird dabei durch verschiedene Moleküle wie den *B cell activating factor* (BAFF) [20] (Synonym: Blys – *B-lymphocyte stimulator*) beeinflusst [19].

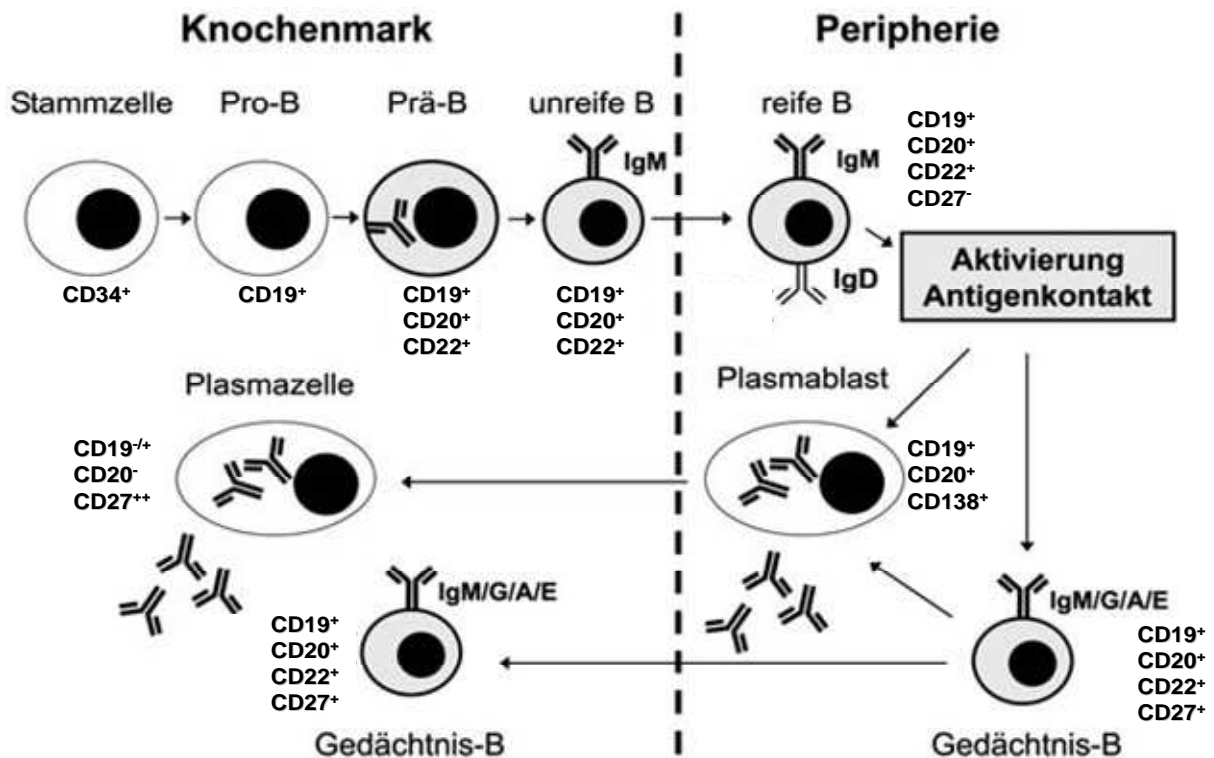


Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der B-Zell-Entwicklungsstufen und der Expression phasenspezifischer Oberflächenmoleküle [21]

Nach Aktivierung der ruhenden naiven B-Zelle durch ersten Ag-Kontakt differenzieren einige naive B-Lymphozyten zu IgM-produzierenden Plasmazellen als erste Phase der primären B-Zell-Antwort, die meisten jedoch wandern in die Lymphknoten. Hier erfolgt in den Lymphfollikeln die spezielle Reifung aktivierter B-Zellen (Keimzentrumsreaktion) [22]. Neben der starken Proliferation der B-Lymphozyten kommt es durch somatische Hypermutation (SHM), den Austausch einzelner Nukleotide im variablen Teil der Ig-Gene zur Erhöhung der Ak-Affinität. Des Weiteren wird im Rahmen der Keimzentrumsreaktion die Effektorfunktion des Antikörpers durch einen spezifischen Rekombinationsprozess, den sogenannten Klassenwechsel von IgM/ IgD zu IgG/ IgA/

IgE angepasst. Im Rahmen der Keimzentrumsreaktion entstehen Gedächtnis-B-Zellen und Plasmablasten als Vorläuferzellen hochaffiner Ak-produzierender Plasmazellen [23].

Die Oberflächenmolekülexpression wird häufig zur Differenzierung der verschiedenen Entwicklungs- und Reifungsstadien der Lymphozyten herangezogen. B-Zellen exprimieren neben den bereits erwähnten B-Zell-spezifischen Oberflächenmolekülen (CD19, CD20, CD22) auch CD27, welches häufig als Gedächtnis-B-Zell-Marker zur Abgrenzung von naiven CD27⁻ B-Zellen genutzt wird [24;25]. Eine weitere mögliche, phänotypische Klassifikation der B-Zell-Subpopulationen erfolgt durch die Kombination der Marker CD27 und IgD [26]. Hiernach exprimieren Gedächtnis-B-Zellen nach durchlaufener Keimzentrumsreaktion und Ig-Klassenwechsel kein IgD auf ihrer Oberfläche. Jedoch konnte nachgewiesen werden, dass B-Zellen, welche sowohl CD27 als auch IgD exprimieren, mutierte Gene in der variablen Ig-Region (am ehesten nach SHM) aufweisen. Für das Entstehen solcher Mutationen ist ein vorheriger Ag-Kontakt obligat, womit diese Zellen höchstwahrscheinlich ebenfalls einen Teil des Gedächtnis-B-Zell-Kompartiments darstellen [25]. Beruhend auf dieser Annahme kann die CD27⁺ Zellpopulation somit in eine CD27⁺ IgD⁺ nicht klassengewechselte und eine CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselte Gedächtnis-B-Zell-Population unterteilt werden. Dem Kompartiment der CD27⁻ B-Zellen, welches bis vor kurzem als ausschließlich naiv, das heißt Ag-unerfahren, galt, konnte eine heterogene Zusammensetzung nachgewiesen werden. Die reifen, naiven CD27⁻ B-Zellen exprimieren IgD auf ihrer Oberfläche, da sie noch keinen Ag-Kontakt hatten und damit noch kein Ig-Klassenwechsel erfolgt ist [25;27]. Unter den CD27⁻ B-Lymphozyten finden sich jedoch auch Zellen, welche kein IgD exprimieren. Diese wurden bis vor kurzem als eine Population transistionaler B-Lymphozyten betrachtet. Bei gesunden Personen stellen sie mit durchschnittlich 4-5% nur einen sehr geringen Anteil der B-Lymphozyten dar, während bei immunologischen Erkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematoses bereits eine Expansion dieser Population im Blut auf bis zu 20% beschrieben wurde [13;28]. Kürzlich konnte dieser Zellpopulation bei SLE-Patienten in genetischen Untersuchungen somatische Hypermuationen und die Expression von IgG und IgA nachgewiesen werden. Da dies typische Merkmale von Ag-erfahrenen B-Zellen sind, wird eine Zugehörigkeit dieser Zellen zum Kompartiment der Gedächtnis-B-Zellen diskutiert [13].

1.3. Grundprinzipien der Leukozytenmigration

Die Leukozytenmigration spielt in der Erkrankung des SLE und möglicherweise im Rahmen des Wirkmechanismus neuer Therapie-Antikörper wie Epratuzumab eine wichtige Rolle. Sowohl während Ihrer Reifung als auch später bei dem Aufsuchen ihres Wirkungsortes müssen die Lymphozyten verschiedene Gewebe des Körpers durchwandern. Diese erreichen sie zumeist passiv über die Blutbahn um diese dann, häufig gesteuert durch spezifische Lockstoffe und mit Hilfe von bestimmten Adhäsionsmolekülen, gezielt zu verlassen (Abbildung 1-3). Die chemischen Lockstoffe werden als Chemokine bezeichnet, binden an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche und lösen Chemotaxis, die gezielte Wanderung von Lymphozyten entlang eines Chemokin-Gradienten, aus [17]. Über 50 Chemokine wurden bereits im menschlichen Organismus identifiziert [29;30]. Abhängig von der Differenzierung und dem Aktivierungszustand der Lymphozyten ändert sich das Expressionsmuster der unterschiedlichen Chemokin-Rezeptoren (C-X-C motif receptor, CXCR) auf der Zelloberfläche, so dass mit Hilfe von Chemokinen (*C-X-C motif ligand*, CXCL) die Lymphozyten-Rekrutierung gezielt gesteuert werden kann [31].

Ein wichtiger Chemokin-Rezeptor auf der B-Zell-Oberfläche ist CXCR5. Sein Ligand CXCL13, auch als BCA-1 (*B cell-attracting chemokine 1*) bezeichnet, dirigiert die Zellen in die Follikel sekundärer lymphatischer Organe wie der Milz [32]. Verschiedene Untersuchungen weisen außerdem auf eine Rolle in der Formation ektooper lymphatischer Gewebe und der Attraktion von B-Zellen durch entzündetes Gewebe, wie die Gelenke von RA-Patienten, hin [33;34]. Der Chemokin-Rezeptor CXCR4 und sein Ligand CXCL12, auch als SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*) bezeichnet, sind ebenfalls in die B-Zell-Migration in follikuläre Strukturen involviert [35]. Außerdem konnte die Expression von CXCL12 durch Zellen in sehr verschiedenen Geweben wie dem Knochenmark, der Haut und der Niere festgestellt werden [36-38]. Ein weiterer Chemokin-Rezeptor CXCR3 bindet entzündungsassoziierte Chemokine wie CXCL9 (MIG – *monokine induced by gamma-Interferon*), CXCL10 (IP-10 – *Interferon gamma-induced protein 10*) und CXCL11 (ITAC – *Interferon-inducible T-cell alpha chemottractant*) [39].

Bei dem Prozess der Migration von der Blutbahn in das Gewebe (Abbildung 1-3) müssen die Lymphozyten das Endothel der Blutgefäße als physiologische Barriere überwinden. Hierfür benötigen sie verschiedene Adhäsionsmoleküle.

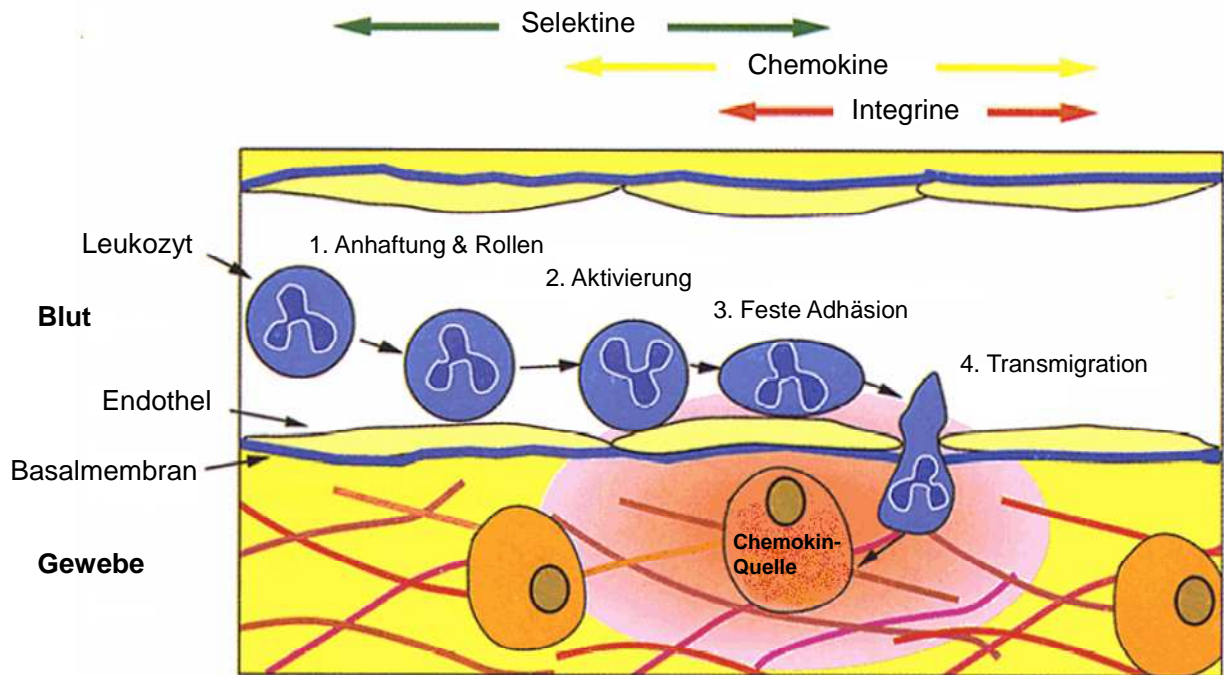


Abbildung 1-3 Prozess der transendothelialen Migration eines Leukozyten aus dem Blutstrom ins Gewebe [89]

Die Gruppe der Selektine als vaskuläre Adhäsionsmoleküle vermitteln dabei eine erste lockere Adhäsion der Lymphozyten an das Endothel und fördern das *Rolling* der Zelle entlang des Endothels vor fester Bindung der Lymphozyten und folgender Transmigration [40]. L-Selektin, auch als CD62L bezeichnet, ist auf der Mehrheit aller B-Lymphozyten während ihrer Reifung zu finden und ist in eine systemische B-Zell-aktivierung involviert [41]. CD62L vermittelt die Bindung von Lymphozyten an hochendotheliale Venolen (HEV) in peripherem lymphatischem Gewebe, lenkt aber auch Leukozyten in entzündliche Gewebe des Körpers [42;43].

Integrine induzieren eine stärkere Bindung der „rollenden“ Zellen an das Endothel und sind damit für die Diapedese und so auch für die Rezirkulation und Migration in Entzündungsherde essentiell [17;44]. Sie bestehen aus Kombinationen verschiedener α - und β -Untereinheiten, wobei die Einteilung in Subfamilien nach der β -Untereinheit erfolgt. Das β_7 -Integrin ist dabei eins der beiden Leukozyten-spezifischen Integrine und bildet mit seinem α_4 -Integrinpartner das $\alpha_4\beta_7$ -Integrin. Dieses wird von B-Zellen exprimiert und spielt eine Rolle in der Bildung sekundärer lymphatischer Strukturen bei der gezielten Migration der B-Lymphozyten in intestinale, lymphoide Gewebe und in entzündlichen Reaktionen [44-46].

1.4. Therapie des systemischen Lupus erythematoses (SLE)

Die Progredienz dieser Erkrankung, gemeinsam mit der Gefahr des Auftretens lebensbedrohlicher Komplikationen und Krankheitsfolgen, macht eine erfolgreiche Therapie besonders wichtig. Dabei konzentriert sich die Behandlung des SLE auf 3 Zielbereiche: das Management akuter Perioden mit lebensbedrohlichen Komplikationen, die Minimierung des Risikos für das Auftreten neuer Schübe und die Optimierung der Kontrolle von Begleiterkrankungen (Hypertonie, Osteoporose etc.) [47]. Hierfür wird eine Therapie basierend auf einer Kombination von entzündungshemmenden und immunsuppressiven Medikamenten eingesetzt.

1.4.1. Konventionelle Therapeutika

In Deutschland sind neben nicht-steroidalen Anti-Rheumatika (NSAR) auch Glukokortikoide, Chloroquine und Hydroxychloroquine, Cyclophosphamid, Azathioprin und seit kurzer Zeit auch Belimumab als Anti-BAFF-Antikörper offiziell für die Therapie des SLE zugelassen [7]. Es gibt jedoch neben sich entwickelnden Toleranzen und Nebenwirkungen auch eingeschränkte Anwendungsmöglichkeiten in Abhängigkeit von der Krankheitsausprägung.

Glukokortikoide gehören als potenteste entzündungshemmende und immunsuppressive Medikamente zumeist zur Basistherapie des SLE. Sie begünstigen jedoch das Auftreten schwerer Infektionen und können langfristig zur Entwicklung von Osteoporose und eines Cushing-Syndrom beitragen. Deshalb sollte die benötigte Steroiddosis durch ergänzende Therapeutika so gering wie möglich gehalten werden [48].

Die immunmodulatorisch wirkenden Anti-Malariamittel Chloroquine und Hydroxychloroquine sind gut verträglich und können in der Schwangerschaft angewendet werden [49-51]. Sie werden jedoch nur bei moderaten Krankheitsverläufen eingesetzt und gehen mit einem erhöhten Risiko für retinale Toxizität einher [52]. Zytotoxische Substanzen wie Azathioprin und Cyclophosphamid steigern besonders in Kombination mit Glukokortikoiden die Anfälligkeit für schwere Infektionen, wobei eine Cyclophosphamid-Therapie außerdem mit Unfruchtbarkeit, hämorrhagischer Zystitis und einer erhöhten gynäkologischen Malignitätsrate einhergehen kann [53;54].

Schwere unkontrollierbare Verläufe, ernste Nebenwirkungen und Therapietoleranzen führen zum Einsatz von *Off-Label*-Therapeutika. Dies sind immunmodulatorische Medikamente, welche bereits erfolgreich in anderen Erkrankungen des Immunsystems

eingesetzt werden, für die Therapie des SLE jedoch nicht zugelassen sind. Hierzu gehören die Immunsuppressiva Mycophenolat Mofetil und Ciclosporin A sowie das Zytostatikum Methotrexat. Die Anwendung dieser Medikamente im Rahmen bestimmter SLE-Manifestationen wird überdies von Rheumatologie-Experten unter Vorbehalt empfohlen [7]. Neben auftretenden Nebenwirkungen konnte jedoch nur für einen Teil des Patientenkollektivs das klinische Ansprechen auf diese Therapien nachgewiesen werden [55;56], so dass auch unter Einschluss der *Off-Label*-Therapeutika oft noch keine optimale Behandlung möglich ist.

Die heterogene Ausprägung der Erkrankung, die Glukokortikoid-Abhängigkeit, die Toxizitäten einiger therapeutischer Agenzien und die auftretenden Therapie-Resistenzen trotz des erweiterten Therapie-Regimes stellen die Patienten und ihre behandelnden Ärzte immer wieder vor neue Herausforderungen. Das größte Problem dieser Therapeutika stellt die breite immunsuppressive Wirkung dar, die nicht nur die pathogenen Entzündungsreaktionen der Erkrankung hemmt, sondern ebenfalls protektive Immunreaktionen erfasst. Damit werden neben den spezifischen Nebenwirkungen vor allem schwere, opportunistische Infektionen und die Entwicklung von Malignomen begünstigt [17]. Trotz intensiver Behandlung kommt es häufig zu einem progredienten Krankheitsverlauf. Aus diesen Gründen besteht die Notwendigkeit der Erforschung neuer zielgerichteter Behandlungsoptionen, welche neben einer effektiven, nicht toxischen, nebenwirkungsarmen Behandlung, eine Erweiterung des Therapie-Repertoires bei refraktären Krankheitsverläufen ermöglichen [57].

1.4.2. Biopharmazeutika

Biopharmazeutika (auch als Biologika bezeichnet) als neue Medikamentengruppe beruhen auf gezielter Modulation bzw. Depletion involvierter Immunzellen, insbesondere der B-Zellen in ihrer Schlüsselrolle im SLE. Auf die B-Zellen kann, direkt durch gegen Oberflächenmoleküle gerichtete, monoklonale Antikörper oder indirekt durch Veränderungen B-Zell-beeinflussender Faktoren wie den Zytokinen, Einfluss genommen werden [58].

Rituximab, ein gegen das CD20-Oberflächenmolekül auf B-Zellen gerichteter monoklonaler Antikörper (Abbildung 1-4), war das erste zugelassene Biopharmazeutikum. Nachdem es 2006 für die Therapie der rheumatoiden Arthritis (RA) zugelassen wurde, konnte für SLE-Patienten in kontrollierten Studien (EXPLORER-

Studie, LUNAR Studie) keine Überlegenheit gegenüber Standardtherapien nachgewiesen werden. Dennoch wird Rituximab *off-label* bei schweren, refraktären SLE-Verläufen angewendet, wo es in retrospektiven Studien gute klinische Ergebnisse zeigte [59;60].

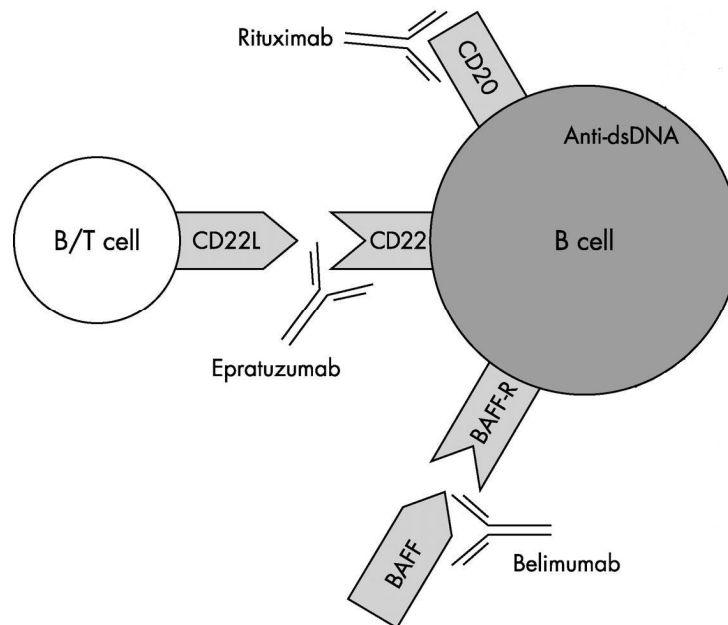


Abbildung 1-4

B-Zell-gerichtete Biopharmazeutika Rituximab, Epratuzumab und Belimumab und ihre Zielstrukturen [61].

Epratuzumab bindet an das CD22-Molekül und führt darüber unter anderem zur Inhibition der BCR-abhängigen B-Zell-Aktivierung [62].

Im Juli 2011 wurde mit Belimumab das erste Biopharmazeutikum für die Behandlung von Auto-Ak-positiven, aktiven SLE-Patienten unter Standardtherapie in Deutschland zugelassen [61]. Belimumab ist ein monoklonaler Antikörper der spezifisch lösliche BAFF-Moleküle bindet und damit deren Bindung an Rezeptoren auf der Oberfläche von B-Zellen verhindert (Abbildung 1-4). BAFF ist ein Überlebens- und Differenzierungsfaktor reifer B-Lymphozyten, dessen Rezeptorbindung zur Aktivierung und Differenzierung dieser Zellen führt [63;64]. Belimumab bewirkt somit eine reduzierte B-Zell-Überlebensrate und eine geringere Auto-Ak-Produktion und greift so gezielt in das Immunsystem ein [65]. Zwei erfolgreiche Phase III Studien (BLISS52 and BLISS76) erreichten ihre primären Endpunkte und wiesen ein gutes Nebenwirkungsprofil auf. Es wurden jeweils moderat erkrankte SLE-Patienten eingeschlossen, während Patienten mit sehr aktiver Lupus-Nephritis oder ZNS-Beteiligung ausgeschlossen waren [66]. Damit ist eine Wirksamkeit nur in einem Teil des SLE-Patienten-Kollektivs

nachgewiesen. Da nicht alle Patienten auf Belimumab ansprechen und auch unter Therapie mit anderen zugelassenen Medikamenten refraktäre Krankheitsverläufe auftreten, sind weiterhin Experimente zur Charakterisierung der Pathogenese dieser Erkrankung und zur Erforschung neuer therapeutischer Angriffspunkte nötig [67]. Andere Biopharmazeutika werden derzeit hinsichtlich ihrer gezielten Immunmodulation untersucht. Ansatzpunkte dabei sind die Modulation der B-Zellen selbst, die Inhibierung kostimulatorischer Signale zwischen B- und T-Zellen, Komplement-Inhibition und Anti-Zytokin-Therapien [68]. Auf B-Zellen abzielende Agenzien, zu denen neben Belimumab auch der Anti-CD22-Antikörper Epratuzumab (Abbildung 1-4) gehört, gelten als besonders vielversprechend [57].

1.5. Epratuzumab und sein Ziel-Antigen CD22

Epratuzumab ist ein humanisierter, monoklonaler IgG₁ Antikörper, welcher gegen das CD22-Oberflächenmolekül gerichtet ist, welches nach bisheriger Kenntnis nur auf B-Zellen exprimiert wird (Abbildung 1-2). Er wurde durch Rekombination aus einem CD22-Maus-Antikörper (mLL2) hergestellt, wodurch 90-95% des Epratuzumab-Moleküls humaner Herkunft sind, was die potentielle Immunogenität des Antikörpers minimiert [69;70]. Im Gegensatz zu dem chimären CD20-Antikörper Rituximab, welcher die zirkulierenden B-Zellen depletiert, führt Epratuzumab zur einer Reduktion der B-Zell-Zahlen im Blut um 30-45% [69;71;72]. Seine Effektivität in der SLE-Therapie wurde bereits in ersten klinischen Studien untersucht, wobei in einer randomisierten, klinischen Phase IIb Studie bereits ein deutlicher Therapievorteil unter Epratuzumab-Behandlung im Vergleich zur Placebo-Kontrollgruppe gezeigt werden konnte [73].

Vermittelt wird die Wirkung dieses Antikörpers über das CD22-Oberflächenmolekül, ein 140-kD großes, transmembranes Typ 1 Protein der Immunglobulin-Superfamilie. Es besteht aus 7 extrazellulären Ig-Domänen, einem transmembranen Teil und einem 141 Aminosäuren langen zytoplasmatischen Anteil [74]. Es ist Mitglied der Siglec-Familie (*sialic acid binding Ig-like lectins*) und bindet N-Acetylneuraminsäure-Reste von Glykoproteinen. Diese Liganden werden auf der Oberfläche verschiedener Zelltypen wie T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und Erythrozyten exprimiert [75;76] und können CD22 in *cis* auf der identischen Zelle oder in *trans* von einer benachbarten Zelle aus binden [77]. CD22 wird von B-Zellen verschiedener Reifestadien exprimiert. Die Oberflächenexpression steigt ab dem Stadium der unreifen B-Zelle mit zunehmender

Reifung an, hat ihr Maximum auf reifen, naiven B-Zellen und nimmt mit weiterer Differenzierung zur Gedächtnis-B-Zelle und Reifung zur Plasmazelle graduell ab [78;79] (Abbildung 1-2). T-Zellen und Monozyten exprimieren hingegen kein CD22 [75]. Das CD22-Molekül ist bisher zum Einen als negativ-regulatorischer Ko-Rezeptor des BCRs und zum Anderen als Adhäsionsmolekül bekannt. Als Ko-Rezeptor inhibiert es die B-Zell-Aktivierung durch den BCR über Eingriffe in intrazelluläre Signalkaskaden. Dies wird durch die Phosphorylierung von Proteinen, wie der Protein Tyrosin Phosphatase SHP-1 mittels Immunrezeptor Tyrosin-basierten inhibitorischen Motiven (ITIMs) des zytoplasmatischen CD22-Anteils umgesetzt [62] (Abbildung 1-5).

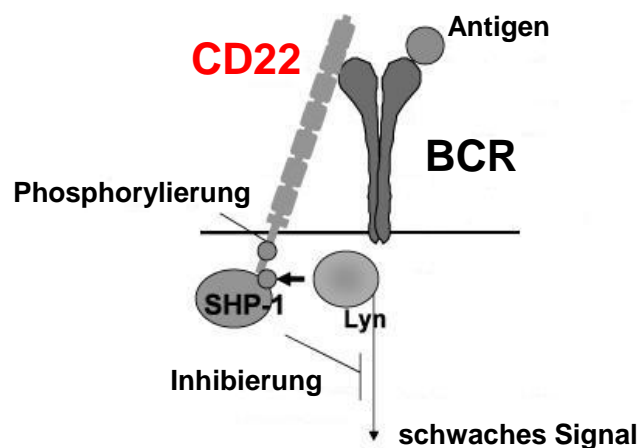


Abbildung 1-5 Darstellung des Ko-Rezeptors CD22 und seiner intrazellulär vermittelten inhibierenden Wirkung auf die Signaltransduktion des BCRs [68]

In diesem Zusammenhang vermutet man eine Rolle von CD22 in der Unterscheidung von Selbst und Fremd, was insbesondere in Autoimmunerkrankungen wie dem SLE eine wichtige Rolle spielen könnte [80;81]. Der zytoplasmatische Anteil des CD22-Moleküls beinhaltet außerdem zwei ITAMs – *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* – für welche die Initiierung positiver BCR-unabhängiger Signale und eine erhöhte Zellproliferation durch CD22-Bindung diskutiert wird [82;83].

CD22 unterstützt als Adhäsionsmolekül das Zellwanderungsverhalten von IgD⁺ B-Zellen in das Knochenmark, da das Sinusendothel dort CD22-Liganden exprimiert [77;84]. Die Beteiligung an verschiedenen immunmodulatorischen Prozessen und sein Einfluss auf die B-Zell-Aktivierung lassen das CD22-Molekül als vielversprechenden Angriffspunkt medikamentöser Therapien in immunologischen Erkrankungen wie SLE oder lymphatischen Malignitäten wie dem Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) erscheinen [72;76].

Epratuzumab wird bei der Behandlung von NHL eingesetzt und zeigte bisher ein gutes Sicherheits- und Nebenwirkungsprofil [85]. Auch in den bisher durchgeführten Studien mit SLE-Patienten wurden keine schwerwiegenden Nebenwirkungen beschrieben [86;87]. Nachdem eine initial offene und nicht randomisierte Phase II Studie eine signifikante Verbesserung des BILAG-Scores der SLE-Patienten unter Epratuzumab zeigte, mussten die zwei folgenden randomisierten, kontrollierten Phase III Studien aufgrund von fehlender Medikamentenversorgung unterbrochen werden [69;87]. Die dabei erhobenen Resultate wurden jedoch kombiniert präsentiert. Es konnte eine gute Wirksamkeit, ein Steroid-sparender Effekt sowie eine signifikante Verbesserung der Lebensqualität der Patienten gezeigt werden [88-90]. Kürzlich wurden zwei weitere Phase III Studien (EMBODY Programm) begonnen. Beide untersuchen die Wirksamkeit und Sicherheit von Epratuzumab bei der Behandlung von SLE-Patienten [91;92].

Die bereits beschriebene funktionelle Diversität des CD22-Moleküls und die klinischen Erfolge Epratuzumabs in der Behandlung von Lupus-Patienten bewirken ein erhöhtes Interesse an dem bisher unbekanntem Wirkmechanismus des Anti-CD22-Antikörpers.

In vitro konnte nachgewiesen werden, dass Epratuzumab eine moderate antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), jedoch keine Komplement-vermittelte Zytolyse (CDC) induziert. Des Weiteren moduliert Epratuzumab sowohl die Hyperaktivität als auch die Proliferation der B-Zellen von SLE-Patienten nach CpG (Immunstimulanz bestehend aus Guanin- und Cytosinhaltigen Oligonukleotiden), BCR und CD40L Stimulation *in vitro* [1;71]. Seine Bindung an die Nicht-Liganden-Domäne des CD22-Moleküls provoziert die Phosphorylierung des Moleküls [93].

In vivo zeigte sich nach Epratuzumab-Behandlung eine klinische Verbesserung mit Reduktion des BILAG-Scores um mehr als 50% und gleichzeitig eine 30%ige Reduktion der CD27⁺ B-Zellen, welche naive und transitionale B-Zellen sowie einige IgD⁺ Gedächtnis-B-Zellen einschließen [1;69]. Die Ursache der Reduktion ist bisher ungeklärt bzw. unverstanden. Da Epratuzumab nur sehr begrenzt die Fähigkeit zur Apoptose-Induktion besitzt [93], ist eine mögliche Ursache für die Reduktion der CD27⁺ B-Zellen nach Epratuzumab-Therapie eine Verschiebung ihrer Homöostase im Blut, d.h. entweder eine verstärkte Emigration aus dem Blutstrom oder eine verminderte Entlassung aus den Immungewebe. Das könnte durch eine CD22-vermittelte Modulation der Migration in verschiedene Gewebe des Körpers bedingt sein.

1.6. Zielsetzung

Die Pathogenese der Autoimmunerkrankung systemischer Lupus erythematoses beruht auf einer gestörten immunologischen Homöostase, in welcher Auto-Ak und B-Zellen eine Schlüsselrolle bescheinigt werden. Daher stellen sie einen Angriffspunkt für eine gezieltere immunologische Intervention durch neue Therapeutika dar. Ein Kandidat ist der humanisierte Anti-CD22-Antikörper Epratuzumab, welcher durch Bindung des Oberflächenmoleküls CD22 gezielt B-Zellen beeinflussen kann. Der genaue Wirkmechanismus ist bisher jedoch noch nicht bekannt. Eine Pilotstudie zur Untersuchung des *In vivo*-Effekts Epratuzumabs zeigte eine deutliche klinische Besserung bei Patienten mit SLE, welche mit einer 30%ige Reduktion der Anzahl CD27 negativer B-Zellen einherging. Die Ursache dieser Reduktion und der Wirkmechanismus von Epratuzumab sind bisher jedoch unklar.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte deshalb untersucht werden, inwiefern Epratuzumab die gezielte Migration und daran beteiligter Adhäsionsmoleküle von B-Zellen und ihren Subpopulationen *in vitro* beeinflusst. Diesbezüglich wurden aus dem peripheren Blut gewonnene mononukleäre Zellen von gesunden Probanden und SLE-Patienten isoliert und in weiteren Experimenten separat hinsichtlich folgender Aspekte untersucht:

1. Die Expression von CD62L- und β_7 -Integrin bei B-Zellen wurde durchflusszytometrisch analysiert. CD62L- und β_7 -Integrin sind wichtige am Migrationsprozess beteiligte Adhäsionsmoleküle auf der B-Zell-Oberfläche.
2. Die funktionelle Untersuchung der Migration von B-Zellen gegenüber den Chemokinen CXCL12, CXCL13 und den CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 unter Verwendung eines Transmigrations-Assays.
3. Der Vergleich der verschiedenen Effekte von Epratuzumab auf die B-Zellen von SLE-Patienten und gesunden Probanden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Blutproben

Es wurden 30ml peripher entnommenes Vollblut (EDTA- Ethylendiamintetraacetat-Blutröhrchen) von 18 gesunden Probanden (5 männlich, 13 weiblich, Alter 22-60 Jahre, arithmetisches Mittel 34,5 Jahre) und von 22 Patienten mit SLE (2 männlich, 20 weiblich, Alter 17-65 Jahre, arithmetisches Mittel 38,8 Jahre) zur Durchführung der Experimente verwendet. Das Forschungsprojekt erhielt die Zustimmung der Ethikkommission der Charité. Mit allen Probanden wurde ein Aufklärungsgespräch durchgeführt und jeder Teilnehmer gab seine schriftliche Zustimmung zu der Blutentnahme im Rahmen dieses Forschungsprojektes.

2.1.2. Zusammenstellung wichtiger Geräte

Für die Experimentdurchführung wurden folgende Geräte verwendet (Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1 Verwendete Laborausrüstung

Geräte	Bezeichnung	Firma
Brutschrank 37°C/ 5% CO ₂	CO ₂ -Inkubator Serie CB	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
diverse Pipetten		Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Gilson Abimed GmbH, Langenfeld, Deutschland
Durchflusszytometer	BD FACS Canto II Flow Cytometer	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
	BD LSR II Flow Cytometer	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Multistepper		Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann, Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Heraeus HERA safe	Heraeus Thermo Electron Cooperation, Karlsruhe, Deutschland
Trockenschrank	Typ B 5028	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vortexer	Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zellzählgerät	Micros Analyser 60 OT	Abx Diagnostics, Northampton, UK
Zentrifuge	Labofuge 400	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5415C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.3. Verbrauchsmittel, Chemikalien und Reagenzien

Epratuzumab ein monoklonaler, humanisierter Anti-CD22-Antikörper vom Typ IgG₁ (c=10mg/ml) wurde von Union Chimique Belge (UCB), Slough, Berkshire, UK zur Durchführung der Experimente zur Verfügung gestellt. Seine Konzentration wurde mit 0,2%igem PBS/BSA (Phosphat-gepufferte Salzlösung mit bovinem Serumalbumin) auf 1mg/ml eingestellt und bei 4°C aufbewahrt.

Folgende weitere Verbrauchsmittel (Tabelle 2-2 Verwendete Verbrauchsmittel), Chemokine (Tabelle 2-3) und Reagenzien (Tabelle 2-4) wurden im Rahmen der Experimente verwendet.

Tabelle 2-2 Verwendete Verbrauchsmittel

Verbrauchsmittel	Hersteller
5ml Polystyrene Round-Bottom Tube	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
10ml BD Vacutainer EDTA	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
12,5ml Combitips für Multistepper	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
15ml/ 50ml Polypropylene Conical Tube Blue Max	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
50ml Leucosep™	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
BD TruCount™ Tubes	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Disposable Filter Cell Trics 30µm	Partec GmbH, Görlitz, Deutschland
Ep T.I.P.S. Reloads 2-200µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Safe-Lock Tubes (0,5ml, 1,5ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Safe-Seal Tips premium (10µl/ 100µl/ 1000µl)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Safe-Seal Tips professional (10µl/ 100µl/ 1000µl)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Serologische Pipetten (10ml/ 25ml)	Becton Dickinson Falcon, Heidelberg, Deutschland
Transwell Permeable Supports (24 well) 6,5mm Insert, 5,0µm Polycarbonate Membrane	Corning Incorporated, New York, USA

Tabelle 2-3 Verwendete Chemokine

Chemokine	Hersteller
recombinant human CXCL12 50µg/ml	R&D System, Minneapolis, MN, USA
recombinant human CXCL13 25µg/ml	R&D System, Minneapolis, MN, USA
recombinant human CXCL9 50µg/ml	R&D System, Minneapolis, MN, USA
recombinant human CXCL10 50µg/ml	R&D System, Minneapolis, MN, USA
recombinant human CXCL11 25µg/ml	R&D System, Minneapolis, MN, USA

Tabelle 2-4 Verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Albumine Bovine Fraction V (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Aqua ad iniectabilia 10ml	Braun, Melsungen, Deutschland
BD FACS Lysing solution	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Ficoll-Paque™ Plus	GE Healthcare, München, Deutschland
Human plasma Fibronectin 1mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
PBS Dulbecco w/o Ca Mg low endotoxin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS/ 0,2% BSA	DRFZ, Berlin, Deutschland
Ultra Pure Water	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Zellkulturmedium: VLE RPMI 1640 Medium with 2 g/l NaHCO ₃ w/o L-Glutamine, very low endotoxine	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.1.4. Fluoreszenz-markierte Antikörper

Für die FACS-Analyse wurden folgende Fluoreszenz-markierte Antikörper verwendet (Tabelle 2-5).

Tabelle 2-5 Verwendete Fluoreszenz-markierte Antikörper

Fluoreszenz-markierte Antikörper (Klon)	Hersteller
Dapi (4',6-Diamidino-2-phenylindol) (5mg/ml) Vorverdünnung: 90µM	Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, USA
F _c receptor blocking – antibody (# 120-000-442)	Miltenyi biotech GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
mouse anti-human CD3 Pacific Blue (UCHT1)	BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland
mouse anti-human CD14 Pacific Blue (M5E2)	BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland
mouse anti-human CD19 PE Cy7 (SJ25C1)	BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland
mouse anti-human CD20 FITC (2H7)	BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland
mouse anti-human CD22 PE (S-HCL-1)	BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland
mouse anti-human CD27 Cy5 (2E4)	René van Lier, Academic Medical Center University of Netherlands, Niederlande
mouse anti-human CD45 PerCp (2D1)	BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland
mouse anti-human CD62 Ligand FITC (145/15)	Miltenyi biotech GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
mouse anti-human IgD FITC (IA6-2)	BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland
mouse anti-human IgD PE (IA6-2)	BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland
mouse anti-human IgG ₁ PE (X40)	BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland
rat anti-human β7-Integrin PE (FIB504)	BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland

2.2. Durchflusszytometrie und Zellsortierung

Die Methode der Durchflusszytometrie wurde im Rahmen verschiedener, nachfolgender Experimente eingesetzt. Unter Verwendung der TruCount-Methode wurde die absolute B-Zellzahl in den Vollblutproben der Probanden bzw. Patienten bestimmt. Bei frisch isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurde die Expression des Oberflächenmoleküls CD22 untersucht und die spezifische Bindung von Epratuzumab an das CD22-Molekül auf B-Zellen nachgewiesen. Außerdem wurde die Expressionsanalyse der Adhäsionsmoleküle CD62L und β_7 -Integrin auf B-Zellsubpopulationen nach 90minütiger Inkubation mit bzw. ohne Epratuzumab durchgeführt. Die Durchflusszytometrie ermöglichte insbesondere die Analyse einzelner B-Zellsubpopulationen und wurde in der Auswertung der *In vitro*-Transmigrationsexperimente eingesetzt.

2.2.1. Das Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie beruht in ihrer einfachsten Form auf der Messung von Streulicht. Die in einer Suspension vorliegenden Zellen werden dabei mittels hydrodynamischer Fokussierung perlenkettenartig angeordnet und passieren einzeln einen Laserstrahl. Dabei streuen sie abhängig von ihrer Zellgröße und Zellbeschaffenheit (z.B. Granularität) das eintreffende Licht. Das Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter*, FSC), dessen Intensität in einem Winkel von $<50^\circ$ zum Laserstrahl mittels eines Detektors ermittelt wird, gibt Auskunft über die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (*sideward light scatter*, SSC) hingegen wird in einem Winkel von 90° zum Laserstrahl gemessen und lässt Rückschlüsse auf die Granularität der Zelle zu. Dieses Prinzip wird in Abbildung 2-1 verdeutlicht. Die erweiterte Form der Durchflusszytometrie beruht auf der zusätzlichen Messung von Fluoreszenzsignalen und ermöglicht somit eine quantitative Expressionsanalyse. Dazu werden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern, welche gegen Oberflächenmoleküle gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff absorbiert monochromatisches Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge und emittiert anschließend längerwelligeres Licht (Fluoreszenz), dessen Intensität mittels eines Detektors bestimmt wird und proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers ist. Durch die gleichzeitige Färbung mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen, deren Emissionsmaxima unterschiedlich sind, sowie dem gleichzeitigen Einsatz verschiedener

Laser, dichromatischer Spiegelsysteme, optischer Filtersysteme und Detektoren wird die Expression mehrerer Moleküle einer Zelle simultan ermittelt.

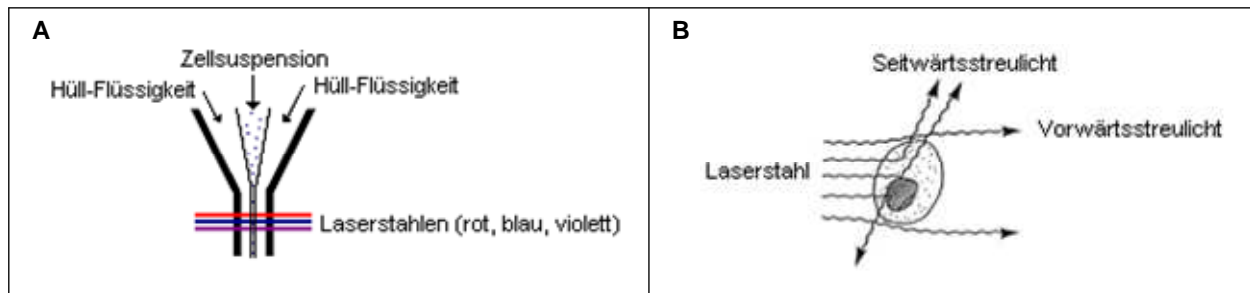


Abbildung 2-1 Darstellung der hydrodynamischen Fokussierung (A) sowie der Detektion des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts (B) bei der Durchflusszytometrie [97].

Dargestellt werden können die ermittelten Signale in sogenannten Punktdiagrammen (*dot plots*) oder Histogrammen. In den Punktdiagrammen können die verschiedenen Zellpopulationen anhand ihrer Eigenschaften mit Hilfe von *Gates* differenziert werden. Dies wird im Weiteren als „Gating-Strategie“ bezeichnet. Die Histogramme liefern Aussagen über die Fluoreszenzintensität und lassen damit Rückschlüsse auf die Dichte bzw. Intensität eines bestimmten Moleküls auf einer Zelle zu.

2.3. Zellzahlbestimmung

2.3.1. Durchflusszytometrische Zellzahlbestimmung (TruCount-System)

Zur Bestimmung der absoluten B-Zellzahl aus EDTA-Vollblut-Proben wurde das TruCount-System (BD, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Ein gefriergetrocknetes Pellet im unteren Teil des TruCount-Röhrchens enthielt eine definierte Anzahl an fluoreszenz-markierten Partikeln, welche als sog. *Beads* bezeichnet werden. Die genaue *Beads*-Anzahl war Chargen-abhängig und wurde in der abschließenden Berechnung der absoluten Zellzahlen berücksichtigt. Nach Zugabe der markierten Antikörper (Tabelle 2-6) wurden 50µl EDTA-Blut vorsichtig in das TruCount-Röhrchen pipettiert. Dies bewirkte die Freisetzung der fluoreszenz-markierten *Beads* aus dem Pellet. Nach einer Inkubationszeit von 15 Min. in Dunkelheit und bei Raumtemperatur wurden 450µl TruCount-Lyse-Lösung zur Auflösung der Erythrozyten hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen ruhte die Probe mindestens 15 Min. in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Anschließend wurden ca. 20.000 Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Tabelle 2-6 Zusammensetzung der markierten Antikörper im Rahmen der TruCount-Analyse.

Fluoreszenz-markierte Antikörper/ Reagenz	Volumenverhältnis
CD3 PacB	1:20
CD14 PacB	1:20
CD19 PeCy7	2:20
CD20 FITC	1:20
CD45 PerCp	3.5:20
Aqua dest.	11.5:20

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die Software FACS DIVA von Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) benutzt. Die aufgenommenen Ereignisse wurden in Punktdiagrammen dargestellt, um diese anhand ihrer Eigenschaften differenzieren und quantifizieren zu können. Die Abbildung 2-2 stellt dies exemplarisch dar.

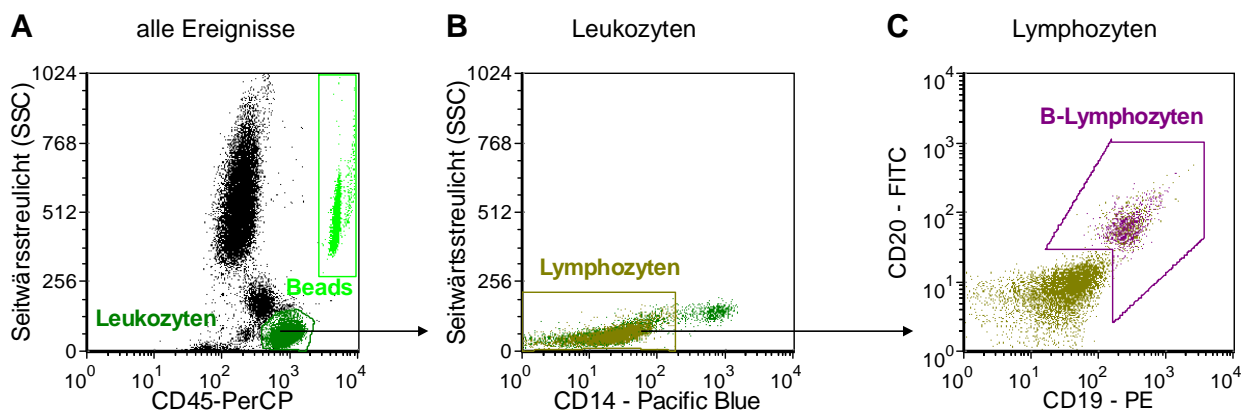


Abbildung 2-2 Gating-Strategie zur Bestimmung der absoluten B-Lymphozyten-Zahl im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse am Beispiel eines gesunden Probanden.

A Aus allen akquirierten Ereignissen wurden die $CD45^{++}$ Ereignisse erfasst. Dabei wurde die Zellpopulation der $CD45^{++}/SSC^{\text{schwach}}$ Leukozyten (dunkelgrün) und die stark fluoreszierenden Partikel (*Beads*) (hellgrün) differenziert. **B** Aus der Gruppe der Leukozyten wurden wiederum die $CD14^{-}$ Lymphozyten separiert, um aus diesen schließlich die $CD19^{+} CD20^{+}$ B-Zellen differenzieren zu können (**C**).

Die so bestimmten absoluten Zahlen der B-Zellen und der *Beads* wurden zur Berechnung der B-Lymphozyten-Konzentration im peripheren Blut der Probanden verwendet. Dies erfolgte über folgende Gleichung:

$$C = 0,02 \times \text{Beads}_{\text{gesamt}} \times \text{B-Ly}_{\text{probe}} / \text{Beads}_{\text{probe}} \quad \text{in Zellen/} \mu\text{l}$$

0,02 – Korrekturfaktor da die Probe 50 μ l beinhaltet

$\text{Beads}_{\text{gesamt}}$ – Chargen-abhängige Anzahl von Beads pro TruCount-Röhrchen

$\text{Beads}_{\text{probe}}$ – Anzahl der durchflusszytometrisch detektierten Beads

$\text{B-Ly}_{\text{probe}}$ – Anzahl der durchflusszytometrisch detektierten B-Lymphozyten

2.3.2. Zellzahlbestimmung durch das Zellzählgerät Micros 60

Das vollautomatische Zellzählgerät Micros 60 wurde zur Messung der Leukozytenzahlen nach der Zellisolierung (siehe 2.4.) verwendet, um daraus die nötige Zellverdünnung für die nachfolgenden Experimente berechnen zu können. Das Gerät nutzt das Messprinzip der elektronischen Impedanz. Nach der Verdünnung mit einer elektrolytischen Lösung passiert die Probe eine Messkapillare. Die Lösung und die Zellen besitzen unterschiedliche Leitfähigkeiten und somit auch unterschiedliche Widerstände. Auf beiden Seiten der Messkapillare befinden sich Elektroden zwischen welchen ein konstanter Strom fließt. Der elektrische Widerstand zwischen den Elektroden wird durch die Passage einer Zelle in der Messkapillare verändert, was eine Veränderung des Spannungspotentials nach sich zieht. Diese Potentialveränderung ist proportional zum Zellvolumen und ermöglicht es dem Gerät die Zelle als Erythrozyt, Thrombozyt oder Leukozyt zu differenzieren. Das Gerät errechnet die Konzentrationen verschiedener Zelltypen anhand der gemessenen Zellzahl in 10µl einer Probe.

2.4. Verwendung mononukleärer Zellen aus EDTA-Vollblut

Aus ca. 30ml Vollblut (EDTA-Röhrchen) wurden PBMCs isoliert, um die darin enthaltenen B-Zellen in weiteren Experimenten zu untersuchen. Diese Rahmenbedingungen wurden der Betrachtung aufgereinigter, isolierter B-Zellen aus zwei Gründen vorgezogen. Zum einen können die verschiedenen Zellpopulationen des Immunsystems auch im Körper ständig miteinander interagieren, so dass dieses Milieu der *in vivo* Situation ähnlicher ist. Zum anderen ist eine variable Lymphopenie ein Charakteristikum des SLE. Durch die Verwendung von PBMCs konnte deshalb sichergestellt werden, dass die Zellkonzentration auch bei SLE-Patienten für die Durchführung der Experimente ausreichend war.

2.4.1. Isolierung mononukleärer Zellen für die Expressionsanalyse des CD22-Oberflächenmoleküls auf PBMCs

Zur Isolierung der mononukleären Zellen wurden 50ml Leucosep-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit integriertem Filter verwendet. Die hinzugegebenen 15ml Ficoll passierten den Filter durch kurzzeitige Zentrifugation. 30ml EDTA-Vollblut, gegebenenfalls mit PBS verdünnt, wurden vorsichtig auf den Filter

pipettiert. Durch eine 20minütige Zentrifugation ohne Bremse bei Raumtemperatur und einer Geschwindigkeit von 1800rpm (Runden pro Minute, entspricht 400g) trennten sich die Zellpopulationen des Vollblutes entlang eines Dichtegradienten auf. Sowohl die sedimentierten Erythrozyten und Granulozyten im unteren Kompartiment als auch der Plasmaüberstand mit Thrombozyten und anderen, gelösten Bestandteilen wurden verworfen. Ein schmaler Lymphozytenring, welcher sich zwischen diesen beiden Schichten befand, wurde in ein neues 50ml Röhrchen überführt. Dieses wurde im Anschluss mit 0,2%igem PBS/BSA auf 50ml aufgefüllt und erneut 10 min. bei 1200rpm (entspricht 180g) zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die pelletierten Zellen in 500µl kaltem 0,2%igem PBS/BSA aufgenommen und über einen 30µm-Filter in ein weiteres 15ml Röhrchen überführt. Der Filter wurde anschließend mit PBS/BSA gespült und das neue Röhrchen auf 15ml aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation (1200rpm 10 Min.) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1ml kalter 0,2%iger PBS/BSA-Lösung resuspendiert. Mit Hilfe des Zellzählgerätes Micros 60 wurde die Leukozytenkonzentration bestimmt. Anschließend wurde unter Verwendung kalter 0,2%iger PBS/BSA-Lösung eine Konzentration von ca. 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

2.4.2. Isolierung mononukleärer Zellen für die *In vitro* Inkubation und die Transmigrationsexperimente mit Epratuzumab

Zur Isolierung der mononukleären Zellen für die *In vitro* Inkubation und die Transmigrationsexperimente wurde ebenfalls wie oben beschrieben vorgegangen. Der durch Zentrifugation erhaltene isolierte Lymphozytenring wurde jedoch nach Überführung in ein 50ml-Röhrchen mit RPMI-Medium auf 50ml aufgefüllt. Auch für die nachfolgenden Schritte wurde hier RPMI-Medium statt der PBS/BSA-Lösung verwendet. Die am Ende in Form eines Pellet zurückgebliebenen Zellen wurden in 1ml 0,5%igem RPMI-BSA (bovines Serumalbumin) Medium resuspendiert. Danach wurde mittels Micros 60 die Leukozytenkonzentration ermittelt. Anschließend wurden die isolierten mononukleären Zellen unter Verwendung von 0,5%igem RPMI-BSA auf eine Konzentration von $5 - 10 \times 10^6$ Zellen/ml verdünnt.

2.5. Analyse der CD22-Expression

Die Oberflächenexpression von CD22 ist eine entscheidende Voraussetzung für die spezifische Bindung und Wirksamkeit von Epratuzumab. Deshalb wurde das Expressionsmuster von CD22 auf den Zelloberflächen verschiedener Zelltypen analysiert. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde ein fluoreszenz-markierter Anti-CD22-Antikörper (Klon S-HCL-1, BD, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Um außerdem Aussagen zur spezifischen Bindung von Epratuzumab an das CD22-Molekül treffen zu können, wurde dieser Antikörper an das Fluoreszenzmolekül Phycoerythrin (PE) gekoppelt und anschließend für durchflusszytometrische Messungen verwendet. Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen über F_c -Bereiche bzw. F_c -Rezeptoren der markierten Antikörper, wurden exemplarisch F_c R-Blockierungen vor der Antikörperfärbung zugesetzt (*F_c receptor blocking – antibody* von Miltenyi Biotec GmbH). Da sich die Fluoreszenzintensitäten (*mean fluorescence intensity*, MFI) mit bzw. ohne F_c R-Blockierung nicht unterschieden, wurde von einer spezifischen Bindung der markierten Antikörper ausgegangen.

2.5.1. Durchflusszytometrische Analyse des CD22-Oberflächenmoleküls

Drei Zellproben mit je 50µl in kalter 0,2%iger PBS/BSA-Lösung isolierter PBMCs (Konzentration ca. 1×10^6 Zellen/ml) wurden exemplarisch vor der Zugabe fluoreszenz-markierter Antikörper 10 Min. mit einem F_c -Rezeptor-blockierendem Reagenz inkubiert. Die anschließend hinzugegebenen Färbe-Antikörper und ihr Volumenverhältnis sind für alle 3 Färbe-Ansätze in Tabelle 2-7 zusammengestellt. Einer Probe wurde dabei der Anti-CD22-Antikörper (Klon S-HCL-1, Heidelberg, Deutschland), der zweiten Probe der PE-gekoppelte Epratuzumab-Antikörper (DRFZ, Berlin, Deutschland) und der dritten Probe ein IgG₁-Antikörper als Kontrolle zugesetzt.

Nach Zugabe der markierten Antikörper und Vortexen der Proben, wurden diese 15 Min. bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1ml 0,2%igem PBS/BSA gewaschen (Vortexen, 5 Min. zentrifugieren bei 1200rpm, Überstand verwerfen). Das resultierende Zellpellet wurde jeweils in 300µl 0,2%igem PBS/BSA aufgenommen und nach Zugabe von 1µl DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, 90µM) erneut gevortext. Im Anschluss wurden jeweils ca. 200.000 Zellen der Probe durchflusszytometrisch analysiert.

Tabelle 2-7 Für die Analyse der CD22-Expression verwendete fluoreszenz-markierte Antikörper.
 Das F_c-Rezeptor-blockierende Reagenz (x) wurde exemplarisch vor Zugabe der Antikörper hinzugefügt.
 Ansatz 1 enthält den Anti-CD22-Antikörper (Klon S-HCL-1), Ansatz 2 enthält PE-gekoppeltes Epratuzumab und Ansatz 3 einen IgG₁-Antikörper als Isotypkontrolle.

Fluoreszenz-markierte Antikörper/ Reagenz	Volumen-verhältnis	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
Fc-Rezeptor-blockierendes Reagenz	1:50	(x)	(x)	(x)
Anti-CD22-PE (S-HCL-1)	1:50	x		
Anti-CD22-Epratuzumab-PE	1:50		x	
anti-humanes IgG ₁ -PE (Klon X40)	1:50			x
Anti-CD3-PacB	1:100	x	x	x
Anti-CD14-PacB	1:100	x	x	x
Anti-CD19-PE-Cy7	1:50	x	x	x
Anti-CD27-Cy5 (Vorverdünnung 1:10)	1:50	x	x	x
Anti-IgD-FITC	1:20	x	x	x

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung der Software FCS Express (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA). Es wurden Punktdiagramme der akquirierten Ereignisse erstellt um innerhalb dieser die Populationen der B-Zellen, T-Zellen und Monozyten zu differenzieren (Abbildung 2-3). Anschließend wurden die jeweiligen Zellpopulationen nach Färbung mit dem kommerziellen Anti-CD22-Antikörper (S-HCL-1), dem markierten Epratuzumab und dem als Kontrolle verwendeten IgG₁-Antikörper hinsichtlich ihrer CD22-Expression durch Messung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) quantitativ analysiert.

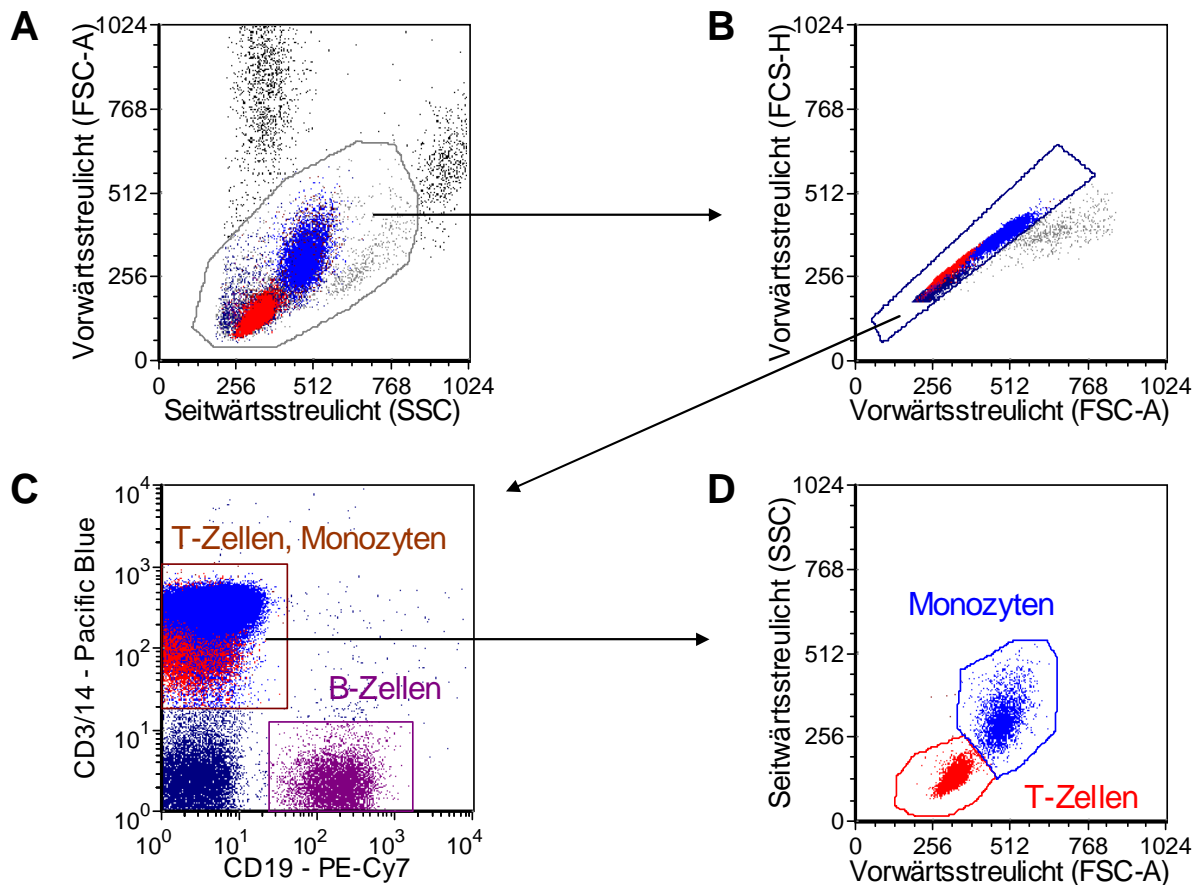


Abbildung 2-3 Gating-Strategie zur Differenzierung von B-Zellen, T-Zellen und Monozyten in der FACS-Analyse von PBMCs als Grundlage für die Ermittlung der MFI nach Inkubation mit dem Anti-CD22-Antikörper (S-HCL-1), dem IgG₁-Antikörper und dem PE-gekoppeltem Epratuzumab.

A Aus allen akquirierten Zellen werden anhand von Größe und Granularität tote Zellen und Detritus ausgeschlossen.

B Unter weiterem Ausschluss von aneinander haftenden Zellen (Doubletten) werden die CD19⁺ B-Zellen und die Gruppe der CD3⁺/CD14⁺ T-Zellen und Monozyten differenziert (**C**).

D Die letztere Population wird noch einmal in die SSC^{schwach} / FSC^{schwach} T-Zellen und die SSC⁺/FSC⁺ Monozyten unterteilt.

Um einen Einblick in die Expression der CD22-Moleküle und die spezifische Bindung von Epratuzumab auf B-Zellen und deren Subpopulationen zu bekommen, wurden die CD19⁺ B-Zellen der 2. Probe (nach Inkubation mit dem PE-markierten Epratuzumab) noch einmal in CD27⁻ und CD27⁺ B-Zellen (Abbildung 2-4 und Abbildung 2-5) differenziert. Diese Zellpopulationen wurden nachfolgend hinsichtlich ihrer MFI nach Inkubation mit markiertem Epratuzumab separat analysiert.

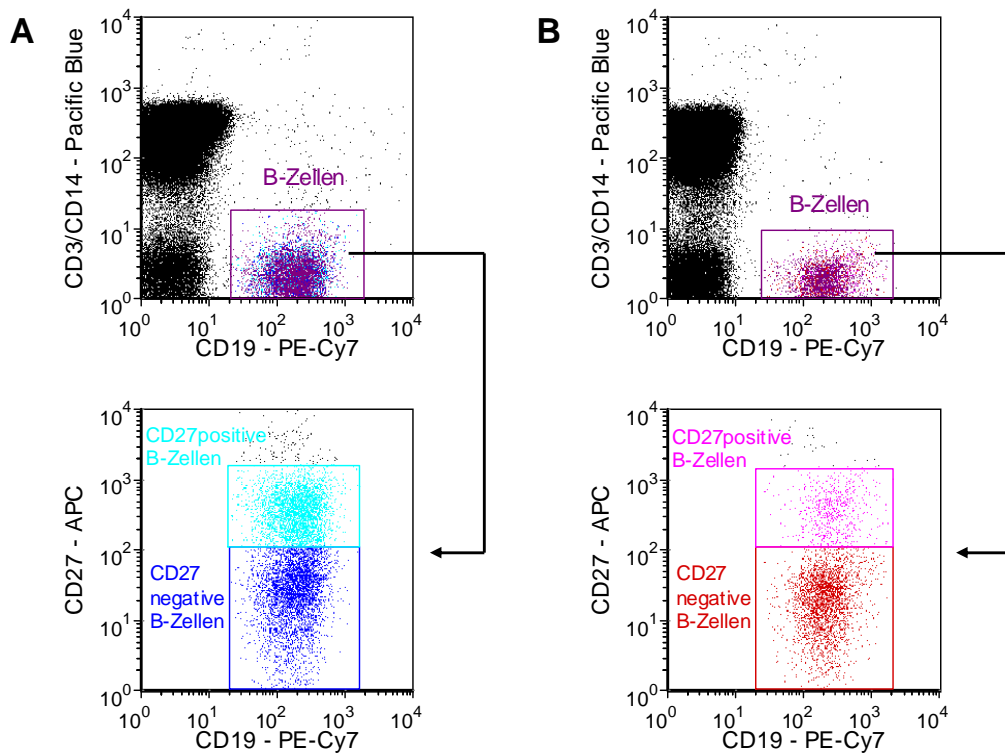


Abbildung 2-4 Gating-Strategie zur differenzierten Betrachtung der CD27⁻ und CD27⁺ B-Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse zur Untersuchung der jeweiligen Bindung von Epratuzumab. A Beispiel eines gesunden Probanden CD27⁻ B-Zellen blau, CD27⁺ B-Zellen türkis. **B** Beispiel eines SLE-Patienten CD27⁻ B-Zellen rot, CD27⁺ B-Zellen rosa.

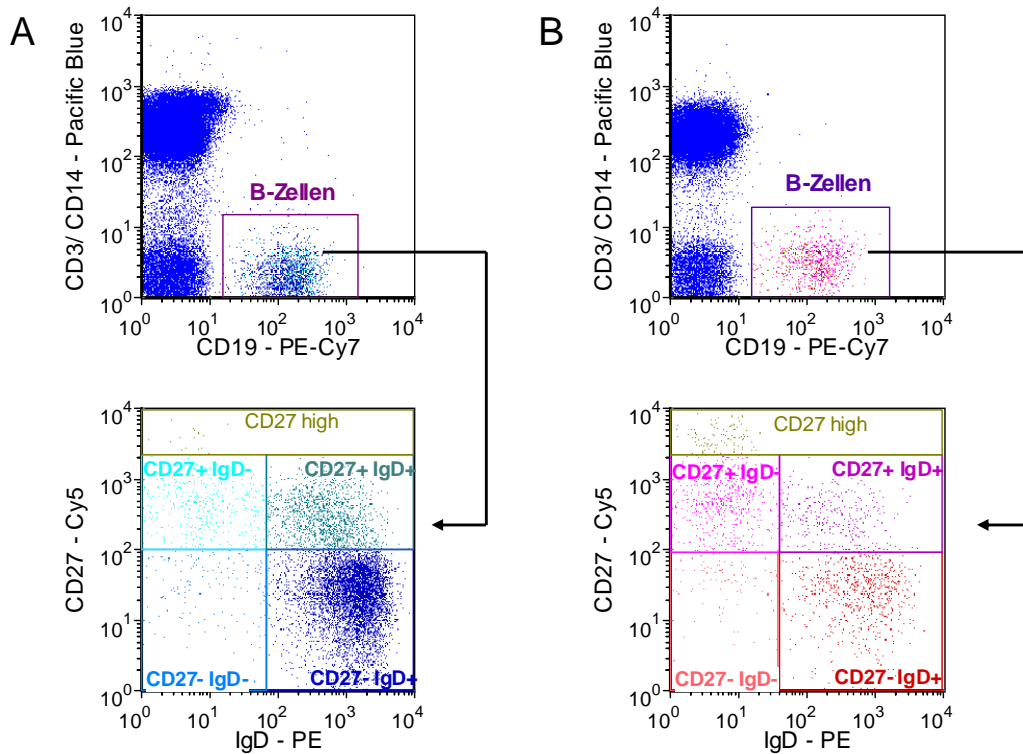


Abbildung 2-5 Darstellung der Gatingstrategie zur Trennung der vier CD19⁺ B-Zell-Subpopulationen: CD27⁻ IgD⁻, CD27⁻ IgD⁺, CD27⁺ IgD⁻, CD27⁺ IgD⁺
A Am Beispiel einer gesunden Versuchsperson **B** Am Beispiel eines SLE-Patienten

2.6. Analyse der Adhäsionsmoleküle

2.6.1. Inkubation von PBMCs mit und ohne Epratuzumab

Die aus Vollblut isolierten PBMCs wurden in 0,5%igem RPMI/BSA-Medium resuspendiert. Es wurde eine Probe mit und eine Probe ohne Epratuzumab (Endkonzentration 10µg/ml) inkubiert. Pro Inkubationsansatz wurden ca. 1–10 x10⁶ Leukozyten verwendet. Die Proben wurden für 90 Min. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden sie in FACS-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation der Proben bei 1200rpm für 6 Min. wurde der Überstand dekantiert. Die pelletierten Zellen wurden jeweils mit 2ml kaltem 0,2%igem PBS/BSA gewaschen (Vortexen, zentrifugieren 6 Min. bei 1200rpm und Überstand verwerfen).

2.6.2. Durchflusszytometrische Analyse der Adhäsionsmoleküle auf B-Zellen

Die gewonnenen Pellets wurden jeweils in 0,2%igem PBS/BSA resuspendiert. 50µl der Suspension wurde mit fluoreszenz-markierten Antikörpern inkubiert (Tabelle 2-8).

Tabelle 2-8 Zusammenstellung der für die FACS-Analyse verwendeten fluoreszenz-markierten Antikörper zur Färbung der mit und ohne Epratuzumab inkubierten PBMCs

Fluoreszenz-markierte Antikörper	Volumenverhältnis	Ansatz 1 ohne Epratuzumab	Ansatz 2 mit Epratuzumab
Anti-CD3-PacB	1:50	x	x
Anti-CD14-PacB	1:50	x	x
Anti-CD19-PE-Cy7	1:50	x	x
Anti-CD27-Cy5 (Vorverdünnung 1:10)	1:50	x	x
Anti-CD62L-FITC	1:50	x	x
Anti-β ₇ -PE	2,5:50	x	x

Nach Zugabe der markierten Antikörper wurden die beiden Ansätze für 15 Min. bei 4°C in Dunkelheit inkubiert und danach mit 2ml 0,2%iger PBS/BSA gewaschen (Vortexen, Zentrifugieren bei 1200rpm für 6 Min., Überstand verwerfen). Die erhaltenen Zellpellets wurde in 500µl 0,2%iger PBS/BSA resuspendiert um nach Zugabe von 1µl DAPI (90µM) und kurzem Vortexen durchflusszytometrisch analysiert zu werden. Es wurden jeweils 200.000 Zellen untersucht. Bei der Auswertung dieser Analyse wurden die

PBMCs erneut, wie in Abbildungen 2-2 bzw. 2-3 dargestellt, in CD27⁻ und CD27⁺ B-Zellen differenziert. Anschließend wurden die jeweiligen Zellpopulationen hinsichtlich ihrer CD62L- und β_7 -Integrin-Expression untersucht. Hier wurde die Frequenz der CD62L- bzw. β_7 -Integrin-exprimierenden Zellen nach Inkubation ohne und mit Epratuzumab ausgewertet. Diese Auswertungen wurden jeweils für die Gesamtheit aller CD19⁺ B-Zellen wie auch für die CD27⁻ und CD27⁺ B-Zell-Populationen getrennt durchgeführt.

2.7. Das Prinzip des *In vitro* - Transmigrationsexperiments

2.7.1. Das Prinzip des *In vitro* - Transmigrationsexperiments

In den Experimenten zur Untersuchung funktioneller Veränderungen durch Epratuzumab wurde der Einfluss von Epratuzumab auf die zielgerichtete Durchwanderung einer Membran durch B-Zellen entlang eines Chemokin-Gradienten erforscht. Das Prinzip dieser Versuche ist in Abbildung 2-6 schematisch dargestellt. Es wurden Transwell-Migrationsplatten verwendet, in den zwei Kompartimente durch eine poröse Membran voneinander getrennt waren. Im oberen Kompartiment befand sich zu Beginn die Zellsuspension mit bzw. ohne Epratuzumab im unteren Kompartiment ein reines bzw. Chemokin-haltiges Medium. Dadurch entstand an der Membran ein Chemokin-Gradient. Chemokine binden über spezifische Chemokin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und induzieren so Chemotaxis. Die Membran dieses *In vitro* - Transmigrationsexperiments bestand aus Polycarbonat mit Mikroporen der Größe 5 μ m und war mit Fibronectin-beschichtet. Das Glykoprotein Fibronectin bildete polymere, fibrilläre Netzwerke und diente damit der Trennung als auch im speziellen Fall der Adhäsion der Zellen. Aufgrund eines B-Zell-Durchmesser von $\geq 7\mu$ m musste im Rahmen der Migration ein aktiver Umbau des Zytoskeletts der B-Zellen erfolgen, um die Membran zu passieren. Eine Migrationszeit von 90 Min. bei 37°C und 5%CO₂ wurde in Vorexperimenten bereits als optimal ermittelt.

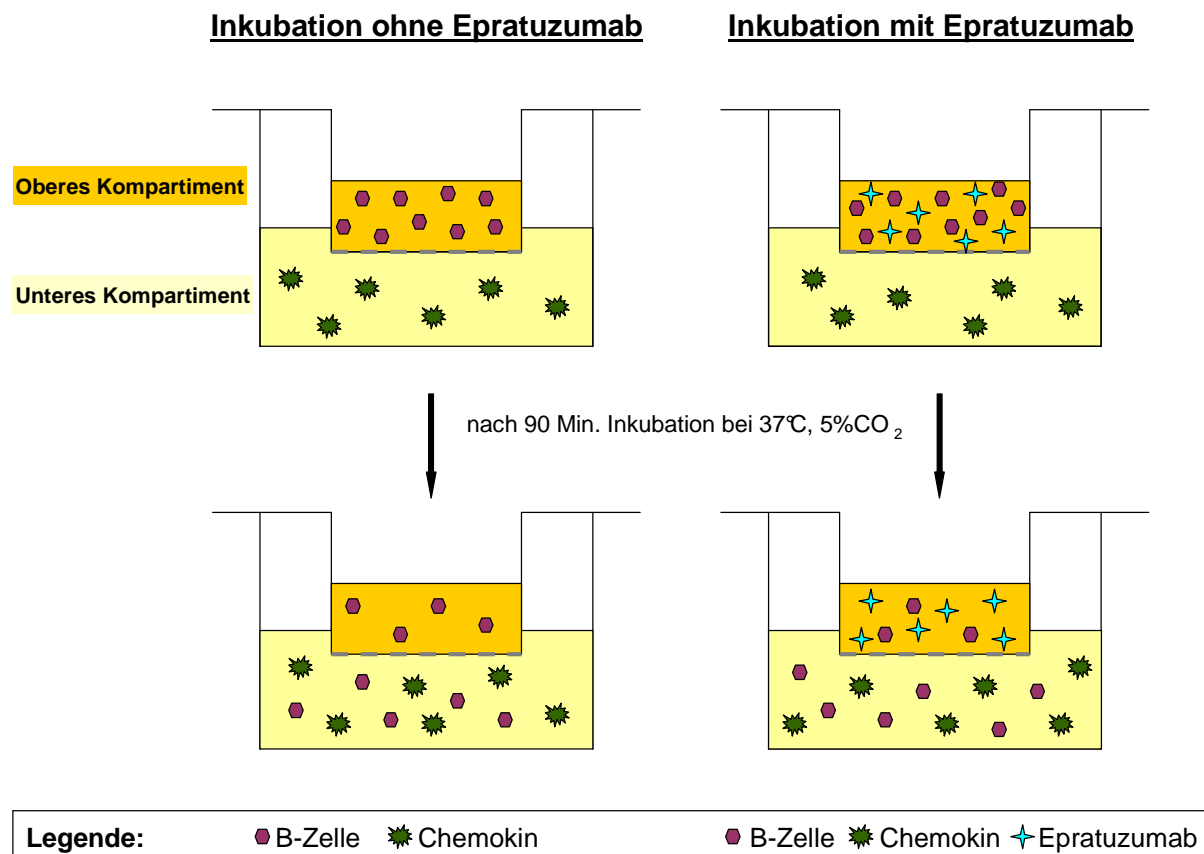


Abbildung 2-6 Schematische Darstellung des *In vitro* - Transmigrationsexperiments.

Es wurden PBMCs verwendet, in der Abbildung sind jedoch nur die untersuchten B-Zellen dargestellt. B-Zellen wurden in 0,5%igem RPMI/BSA (oberes Kompartiment) ohne bzw. mit Epratuzumab inkubiert. Die abgrenzende, poröse Membran zum hier dargestellten, Chemokin-haltigen 0,5%igem RPMI/BSA (unteres Kompartiment) ist fibronectin-beschichtet. Nach 90-minütiger Inkubation bei 37°C und 5%CO₂ befanden sich die migrierten B-Zellen im unteren Kompartiment, die nicht migrierten B-Zellen weiterhin im oberen Kompartiment.

Anschließend wurde die absolute Anzahl der B-Zellen bzw. ihrer Subpopulationen in beiden Kompartimenten durchflusszytometrisch bestimmt und zur Berechnung der Migrationsrate mit Hilfe folgender Gleichung eingesetzt.

$$\text{Migrationsfrequenz} = \frac{\text{Zellanzahl}_{\text{unten}}}{(\text{Zellanzahl}_{\text{unten}} + \text{Zellanzahl}_{\text{oben}})}$$

Zellzahl_{unten} – durchflusszytometrisch bestimmte absolute Zellzahl im unteren Kompartiment

Zellzahl_{oben} – in der FACs-Analyse bestimmte absolute Zellzahl des oberen Kompartiments

2.7.2. Durchführung des Transmigrationsexperiments und der FACS-Analyse

2.7.2.1. Vorbereitung der Transwell-Migrationsplatte, des Mediums und der mononukleären Zellen

Das Fibronektin wurde mit Aqua dest. auf eine Konzentration von 10µg/ml verdünnt, gevortext, um dann je 50µl der Suspension auf den Boden jedes Einsatzes zu übertragen, so dass die komplette Membranfläche mit Flüssigkeit bedeckt war. Die Migrationsplatte wurde für 90 Min. im Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurde die noch vorhandene Flüssigkeit vorsichtig abgenommen, um die Platte anschließend mindestens 2h im Trockenschrank bei 37°C trocknen zu lassen. In diesem Experiment wurden verschiedene Chemokine untersucht. CXCL12 als Ligand des CXC-Rezeptor-4, CXCL13 als Ligand des Chemokinrezeptors CXCR5 und die drei Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 des Chemokinrezeptors CXCR3. In Vorexperimenten der Arbeitsgruppe wurde für alle Chemokine die optimale Wirkkonzentration bestimmt und festgestellt. Um die gesamte Reaktion der Chemotaxis in entzündetes Gewebe zu erfassen, wurden die drei CXCR3-Liganden (CXCL9, CXCL10 und CXCL11) in einem gemeinsamen Versuchsansatz verwendet. Durch Zugabe der Chemokine zu jeweils 0,5%igem RPMI/BSA Medium wurden die in Tabelle 2-9 angegebenen drei Chemokinansätze vorbereitet.

Tabelle 2-9 Zusammensetzung der Chemokin-haltigen RPMI-BSA-Medien (Gesamtvolumen 600µl) für die Transwell-Migrationsexperimente

Ansatz	Chemokin	Ausgangskonzentration in µg/ml	Volumenverhältnis Chemokin/ RPMI/BSA-Medium	Endkonzentration in nM	
1	CXCL12	50	4.8 : 595.2	50	
2	CXCL13	25	61.6 : 538.4	250	
3	CXCL9	50	} : 514	250	
	CXCL10	50		31.2	300
	CXCL11	25		19.6	100

Die in 0,5%igem RPMI/BSA suspendierten, mononukleären Zellen wurde auf 2 separate Röhren verteilt. Einem Röhren wurde in einem Volumenverhältnis von 1:100 der mit gekühltem 0,2%igem PBS/BSA auf 1mg/ml vorverdünnte Antikörper Epratuzumab hinzugegeben, sodass eine Endkonzentration von 10µg/ml vorlag.

2.7.2.2. Migrationsexperiment

In die Vertiefung der Migrationsplatte (unteres Kompartiment) wurden jeweils 600µl reines 0,5%iges RPMI/BSA bzw. 600µl eines Chemokin-Ansatzes vorsichtig pipettiert. In die Einsätze (oberes Kompartiment) wurden jeweils 100µl der Zellsuspension mit bzw. ohne Epratuzumab gegeben. Das Beladungsschema der Migrationsplatte ist in Tabelle 2-10 dargestellt. Die Migrationsplatte wurde für 90 Min. im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ende der Migrationszeit wurden die Zellen der einzelnen Kompartimente geerntet. Dabei wurden die Zellsuspensionen entnommen, in FACS-Röhrchen überführt und jeweils mit dem gleichen Volumen, also die oberen Kompartimente mit 100µl, die unteren Kompartimente mit 600µl, 0,5%igem RPMI/BSA Medium gespült. Alle Proben wurden mit 0,5%igen RPMI/BSA Medium auf 1,2ml aufgefüllt und anschließend bei 1200rpm für 6 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen erneut mit 2ml kaltem 0,2%igen PBS/BSA gewaschen (Vortexen, Zentrifugieren 1200rpm 6 Min., Überstand werfen).

Tabelle 2-10 Beladungsschema der Migrationsplatte, Zellsuspension ohne (-) bzw. mit (+) Epratuzumab

Oberes Kompartiment	PBMCs +/- Epratuzumab	PBMCs +/- Epratuzumab	PBMCs +/- Epratuzumab	PBMCs +/- Epratuzumab
Unteres Kompartiment	reines RPMI/BSA Medium	Chemokin-Ansatz 1 (CXCL12)	Chemokin-Ansatz 2 (CXCL13)	Chemokin-Ansatz 3 (CXCR3-Liganden: CXCL9, CXCL10, CXCL11)

Danach wurden die in einem Restvolumen von 50µl PBS/BSA resuspendierten Zellen mit fluoreszenz-markierten Antikörpern inkubiert. Die verwendeten Antikörper sind mit ihrem jeweiligen Volumenverhältnis in Tabelle 2-11 angegeben. Während einer Inkubationszeit von 15 Min. in Dunkelheit und bei 4°C banden die Antikörper an die entsprechenden Oberflächenmoleküle. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde jeder Probe erneut 2ml 0,2%iges BSA/PBS zugegeben um sie nach dem Vortexen 6 Min. bei 1200rpm zu zentrifugieren. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 150µl (Unteres Kompartiment - migrierte Zellen) bzw. 250µl (Oberes Kompartiment - nicht migrierte Zellen) 0,2%igem PBS/BSA resuspendiert.

Tabelle 2-11 Übersicht der für die FACS-Analyse der Zellen der Transmigrationsexperimente verwendete Fluoreszenz-markierte Antikörper.

Fluoreszenz-markierte Antikörper	Volumenverhältnis
Anti-CD19 PE-CY7	1:50
Anti-CD3 PacB	1:50
Anti-CD14 PacB	1:50
Anti-CD27 CY5 (Vorverdünnung 1:10)	1:50
Anti-IgD PE	1:50

Zur Phänotypisierung der im Migrationsexperiment verwendeten PBMCs wurde die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle untersucht. Hierfür wurden die Proben nach Zugabe von 1µl DAPI (90µM) zur Färbung und zum Ausschluss toter Zellen gevortext und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden alle Zellen jeder Probe aufgenommen. Für die Auswertung der so gewonnenen Daten wurde die Software FCS Express 3 (<http://www.denovosoftware.com>, De Novo Software, Los Angeles, CA, USA) benutzt.

2.2.7. Auswertung und Statistische Analysen

Die graphische und statistische Auswertung erfolgte mittels der Software GraphPad Prism Version 4.0 und 5.0 (<http://www.graphpad.com>, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Um mit und ohne Epratuzumab behandelte Zellen eines Blutspenders vergleichen zu können, wurde der zweiseitige nicht-parametrische Wilcoxon-Test (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) verwendet. Ab einem p-Wert von <0,05 wurde der Unterschied als statistisch signifikant gewertet. Für den Vergleich der beiden Probandengruppen, gesunde Versuchspersonen und SLE-Patienten bzw. für den Vergleich verschiedener B-Zell-Subpopulationen wurde der zweiseitige, nicht-parametrische Mann-Whitney-Test verwendet. Die für die Zellpopulationen angegebenen Werte entsprechen dem arithmetischen Mittelwert und der \pm -Wert der Standardabweichung (SD).

3. Ergebnisse

In einer offenen klinischen Studie wurden erste Hinweise gesammelt, dass es bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses unter Epratuzumab-Therapie zu einer klinischen Besserung kommen kann, wobei zugleich eine verminderte Konzentration von B-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden konnte [1]. Eine mögliche Ursache hierfür ist eine veränderte Migration der Zellen unter dem Einfluss von Epratuzumab. In den Prozess der Migration von Zellen sind sowohl Adhäsionsmoleküle als auch Chemokine involviert. Um die zugrundeliegenden Aspekte näher zu untersuchen, wurde in den folgenden *In vitro*-Experimenten der Einfluss des therapeutischen Anti-CD22-Antikörpers Epratuzumab auf humane B-Zellen und deren Subpopulationen untersucht. Dabei wurde die Expression der Adhäsionsmoleküle CD62L und β_7 -Integrin, mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Um die funktionellen Veränderungen durch Epratuzumab beurteilen zu können, wurde das Migrationsverhalten in einem Transmigrations-Assay untersucht. Hierfür wurden PBMCs von gesunden Probanden und von SLE-Patienten verwendet.

3.1. Nachweis erniedrigter Lymphozytenzahlen bei SLE-Patienten

Um die Lymphopenie bei Patienten mit SLE zu evaluieren, wurde vor Durchführung aller Experimente eine Bestimmung der B-Zellzahlen der gesunden Probanden und der SLE-Patienten durchgeführt. Diese erfolgte im Rahmen der TruCount FACS Analyse, bei der B-Zellen als $CD45^+ CD19^+ CD20^+$ definiert wurden. Hier konnte eine signifikant niedrigere Anzahl der B-Lymphozyten im peripheren Blut von SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden. Während bei gesunden Probanden der arithmetische Mittelwert der B-Lymphozyten bei 280 B-Zellen/ μl ($c/\mu\text{l}$) ($\pm 68c/\mu\text{l}$, SD) lag, fanden sich bei SLE-Patienten hingegen 90 B-Zellen/ μl ($\pm 118c/\mu\text{l}$) ($p=0.0031$, Mann-Whitney-Test, HD N=8, SLE N=10) (Abbildung 3-1). Damit liegen in beiden Probandengruppen unterschiedliche immunologische Ausgangssituationen vor. Die bei SLE-Patienten beschriebene Lymphopenie wurde somit eingangs bestätigt, somit können die hier untersuchten SLE-Patienten als repräsentativ betrachtet werden. Im Folgenden werden die beiden Probandengruppen separat analysiert und anschließend verglichen.

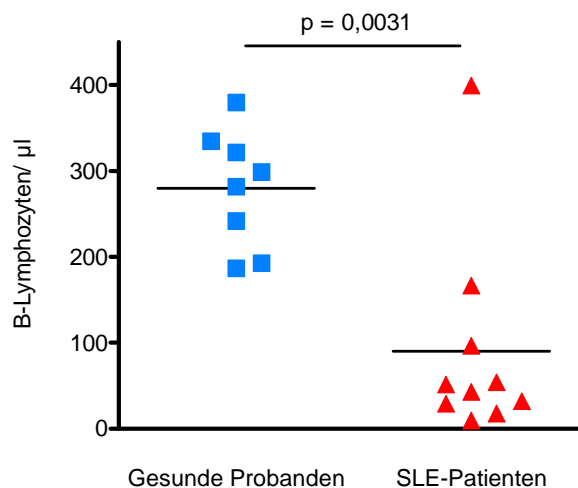


Abbildung 3-1 B-Lymphozyten-Konzentration (CD45⁺ CD19⁺ CD20⁺) gesunder Probanden (N=8) und SLE-Patienten (N=10) nach durchflusszytometrischer Analyse von Vollblut.

Die Linien entsprechen dem arithmetischen Mittelwert, es wurde der Mann-Whitney-Test verwendet.

3.2. Nachweis der CD22-Oberflächenexpression auf B-Zellen und der spezifischen Bindung von Epratuzumab auf deren Subpopulationen

Initial wurde die Expression des CD22-Oberflächenmoleküls auf PBMCs mittels markierter Antikörpern in FACS-Analysen untersucht um nachzuweisen, welche PBMCs CD22 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Hierzu wurde neben dem markiertem Epratuzumab-Antikörper ein weiterer PE-gekoppelter Anti-CD22-Antikörper (Klon S-HCL-1) als Kontrolle verwendet. Des weiteren sollte die spezifische Bindung von Epratuzumab an dieses Oberflächenmolekül auf B-Zellen und deren Subpopulationen von gesunden Probanden und SLE-Patienten untersucht werden.

3.2.1. CD22-Expression auf PBMCs

In der durchflusszytometrischen Analyse wurden CD19⁺ B-Zellen, CD3⁺ T-Zellen und CD14⁺ Monozyten gesunder Probanden hinsichtlich ihrer CD22-Expression differenziert betrachtet. Zum Nachweis der spezifischen Bindung des verwendeten Anti-CD22-Antikörpers (Klon S-HCL-1) wurde ein IgG₁-Antikörper als Isotypkontrolle mitgeführt (beide PE-gekoppelt). Zellpopulationen mit einer geringen MFI wurden als CD22-negativ (CD22⁻) eingeordnet, Zellpopulationen mit einer höheren MFI dagegen als

CD22-positiv (CD22⁺). Nach Färbung mit dem markierten Anti-CD22-Antikörper wiesen die CD19⁺ B-Lymphozyten eine wesentlich höhere CD22-MFI auf als die Vergleichspopulationen der T-Zellen und Monozyten als auch die Populationen der IgG₁-Kontrolle. Abbildung 3-2 zeigt exemplarisch die Fluoreszenzintensitäten der drei Zellpopulationen nach Färbung mit dem PE-markierten Anti-CD22- bzw. IgG₁-Antikörper. Hier betrug die MFI der gesamten Zellpopulation nach Anti-CD22-Färbung für Monozyten 7,0, für T-Zellen 3,5, während die B-Zell-Population eine deutlich höhere MFI von 624,0 aufwies. MFI-Werte der mitgeführten IgG₁-Kontrollfärbung: Monozyten 8,3, T-Zellen 4,3, B-Zellen 2,8. Ähnliche Werte lieferten Untersuchungen der PBMCs von SLE-Patienten. Damit wurde bestätigt, dass CD22 ausschließlich auf CD19⁺ B-Lymphozyten exprimiert wird.

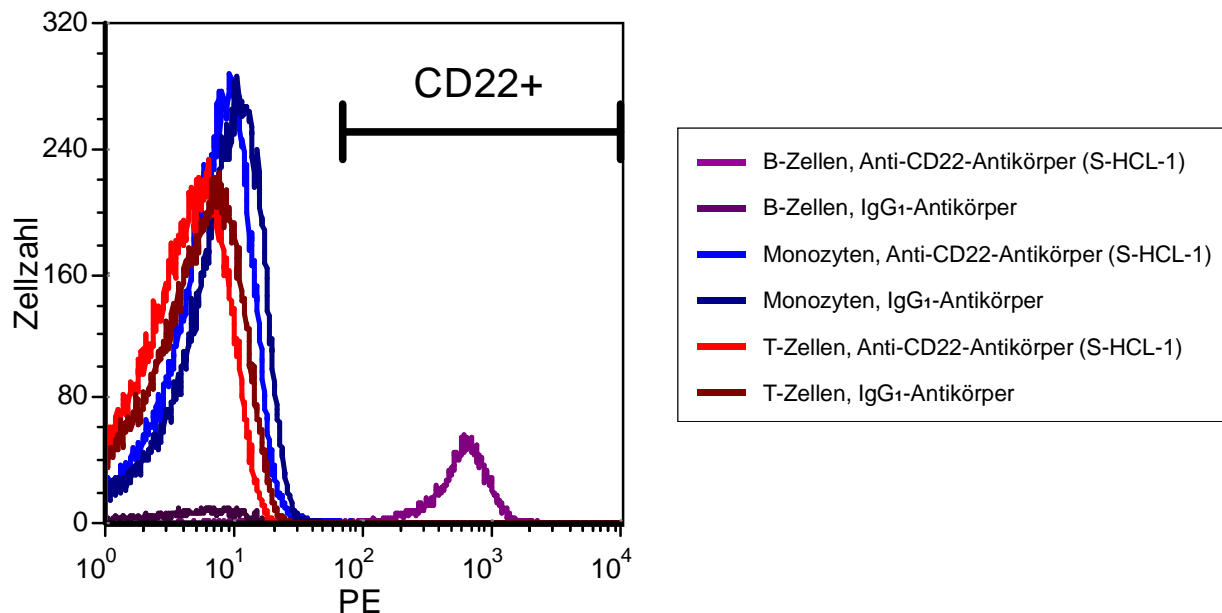


Abbildung 3-2 Nachweis der CD22-Expression auf der Oberfläche von B-Zellen, nicht aber auf T-Zellen und Monozyten. Das Histogramm zeigt eine repräsentative CD22-Färbung und Isotypkontrollfärbung von B-Zellen, Monozyten und T-Zellen einer gesunden Versuchsperson nach Färbung mit einem PE-markiertem Anti-CD22-Antikörper (S-HCL-1) im Vergleich zur Kontrollfärbung mit einem PE-markiertem IgG₁-Antikörper.

3.2.2. Spezifische Bindungskapazität von Epratuzumab

Epratuzumab, der therapeutische Anti-CD22-Antikörper ist gegen ein anderes Epitop des CD22-Moleküls gerichtet als der kommerzielle Anti-CD22-Antikörper (Klon S-HCL-1). Zur Analyse der Spezifität der Bindung von Epratuzumab an das CD22-Oberflächenmolekül von B-Zellen wurde die Epratuzumab-FACS-Färbung der Färbung

mit dem Anti-CD22-Antikörper (Klon S-HCL-1) als Positivkontrolle sowie mit einem IgG₁-Antikörper (Isotypkontrolle) als Negativkontrolle gegenübergestellt. Bei der Analyse der MFI der B-Zellen konnte sowohl nach Färbung mit dem Anti-CD22-Antikörper S-HCL-1 als auch nach Epratuzumab-Bindung eine hohe MFI nachgewiesen werden. Die Kontrollfärbung mit dem IgG₁-Antikörper hingegen zeigte sehr niedrige MFI-Werte. Im dargestellten Beispiel (Abbildung 3-3) betrug die MFI nach Färbung mit Epratuzumab 330, mit dem Anti-CD22-Antikörper (Klon S-HCL-1) 480 und mit der Isotypkontrolle 2.

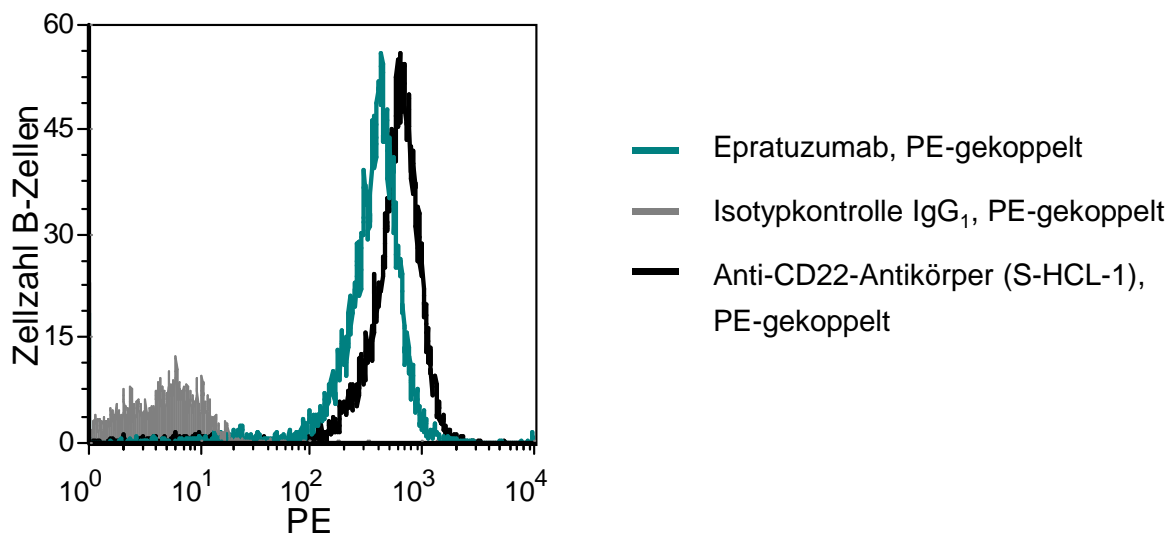


Abbildung 3-3 Exemplarische Darstellung der MFI von CD19⁺ B-Zellen eines gesunden Probanden nach Inkubationen mit dem PE-gekoppelten Antikörper Epratuzumab (blaugrün), dem Anti-CD22-Antikörper (Klon S-HCL-1) (schwarz) und einem IgG₁-Antikörper (grau) als Isotypkontrolle.

Der Anti-CD22-Antikörper Epratuzumab bindet spezifisch an das Oberflächenmolekül CD22 auf B-Zellen gesunder Probanden. Analoge Bestätigungen lieferten F_{(ab)2}⁻ und F_{ab}-Bindungsstudien des therapeutischen CD22-Antikörpers auf B-Zellen von SLE-Patienten [94]. Dies bildete die Grundlage der nachfolgenden Analysen.

3.2.3. Bindung von Epratuzumab auf differenzierten B-Zell-Subpopulationen von gesunden Probanden und SLE-Patienten

3.2.3.1 Höhere Bindung von Epratuzumab auf CD27⁻ im Vergleich zu CD27⁺ B-Zellen

Da in den folgenden Versuchen der Effekt des Therapie-Antikörpers auf B-Zellen verschiedener Reifestadien, d.h. naiven und Gedächtnis-B-Zellen untersucht werden soll, wurde zuvor die spezifische Bindung von Epratuzumab auf jenen B-Zellen von gesunden Probanden und SLE-Patienten analysiert. Dabei wurden die Populationen der CD19⁺ CD27⁻ B-Zellen (im weiteren als CD27⁻ bezeichnet) und die Gruppe der CD19⁺ CD27⁺ B-Zellen (im weiteren als CD27⁺ bezeichnet) differenziert.

Gesunde Versuchspersonen

Im Vergleich der MFI nach Färbung mit dem markierten Epratuzumab konnte für CD27⁻ B-Zellen eine signifikant höhere MFI und somit eine höhere CD22-Expression als auf CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen nachgewiesen werden ($p=0.0019$, Mann-Whitney-Test, $N=8$). Der arithmetische Mittelwert der MFI in der CD27⁻ Population beträgt 341 (± 78), während die CD27⁺ Population einen Wert von 185 (± 42) aufwies. Damit fand sich auf CD27⁻ B-Lymphozyten eine etwa 84% höhere Epratuzumab-Bindung als auf CD27⁺ B-Lymphozyten (Abbildung 3-4 A).

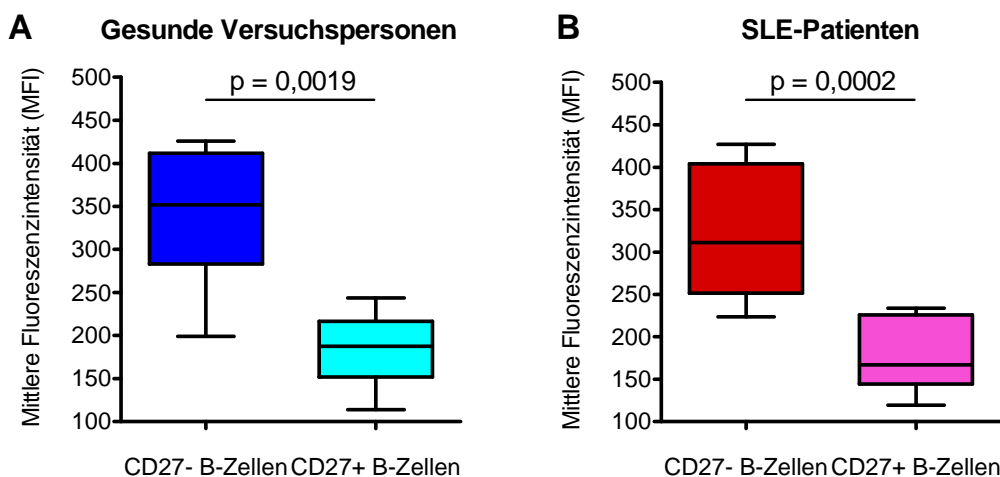


Abbildung 3-4 Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten der CD27⁻ und CD27⁺ B-Zell-Populationen nach Oberflächenfärbung mit dem markierten Anti-CD22-Antikörper Epratuzumab und anschließender FACS-Analyse. Es wurde der Mann-Whitney-Test verwendet.

A Gesunde Versuchspersonen ($p=0.0019$, $N=8$) **B** SLE-Patienten ($p=0.0002$, $N=11$)

SLE-Patienten

Die Unterschiede in der MFI dieser beiden B-Zell-Subpopulationen war bei SLE-Patienten ebenfalls signifikant ($p=0.0002$, Mann-Whitney-Test, $N=11$). Bei den $CD27^-$ B-Zellen zeigte sich im Vergleich zu den $CD27^+$ B-Zellen eine 88% höhere MFI. Der Wert der $CD27^-$ B-Zellen lag bei durchschnittlich 325 (± 74), während die $CD27^+$ B-Zellen einen MFI-Wert von 173 (± 41) aufwiesen. Abbildung 3-4 stellt die MFI-Werte beider B-Zell-Subpopulationen jeweils von SLE-Patienten und gesunden Probanden gegenüber.

Die spezifische Bindung von Epratuzumab und damit die Expression des CD22-Oberflächenmoleküls zeigte sich auf $CD27^-$ B-Zellen im Vergleich zu $CD27^+$ B-Zellen nahezu doppelt so hoch. Dies wurde sowohl bei gesunden Probanden als auch bei SLE-Patienten festgestellt.

3.2.3.2. Höchste Bindung von Epratuzumab auf $CD27^-$ IgD^+ B-Zellen nach Differenzierung der B-Zellen anhand ihrer $CD27^-$ und IgD -Expression

Um weitere Erkenntnisse über die Expression des CD22-Moleküls und die spezifische Bindung Epratuzumabs auf B-Zell-Populationen zu erhalten, wurden die bereits analysierten Zellpopulationen anhand ihrer IgD -Expression in je zwei weitere Populationen unterteilt. Demnach wurden folgende vier B-Zell-Subpopulationen differenziert: $CD27^-$ IgD^+ (naive, nicht klassengewechselte) B-Zellen; $CD27^-$ IgD^- (bislang nur bei SLE vermehrt nachgewiesene, aberrante Gedächtnis-) B-Zellen; $CD27^+$ IgD^+ (nicht klassengewechselte Gedächtnis-) B-Zellen und $CD27^+$ IgD^- (klassengewechselte Gedächtnis-) B-Zellen. Diese Subpopulationen wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Epratuzumab-Bindung analysiert.

Gesunde Versuchspersonen

Die MFI-Analyse der vier B-Zell-Subpopulationen nach Bindung des markierten Epratuzumabs zeigte, dass die $CD27^-$ IgD^+ naiven B-Zellen die höchste und die $CD27^+$ IgD^- klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen die geringste CD22-Expression aufwiesen. Die MFI der $CD27^-$ IgD^+ B-Zellen betrug 350 (± 81) und war damit signifikant höher als die MFI der beiden $CD27^+$ Gedächtnis-B-Zell-Populationen, welche für die $CD27^+$ IgD^+ nicht klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen bei 211 (± 58) ($p=0,003$, Mann-Whitney-Test, $N=8$) und für die $CD27^+$ IgD^- klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen bei 168 (± 45) ($p=0,006$) lag. Beim Vergleich der naiven $CD27^-$ IgD^+ -Population

mit den CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen (MFI 259 ±80) konnte im Mittel eine um ca. 26% geringere Epratuzumab-Bindung auf der Zelloberfläche der CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen festgestellt werden. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (ns) ($p > 0,05$).

Die CD27⁻ IgD⁻ B-Lymphozyten zeigten ausschließlich gegenüber der CD27⁺ IgD⁻ Gedächtnis-Population eine signifikant höhere MFI ($p = 0,028$). Zwischen den beiden CD27⁺-Zell-Populationen konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, wobei die CD27⁺ IgD⁺ nicht klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen eine durchschnittlich 25% höhere MFI aufwiesen als die CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselte Gedächtnis-Population. Diese Werte sind in Abbildung 3-5 dargestellt.

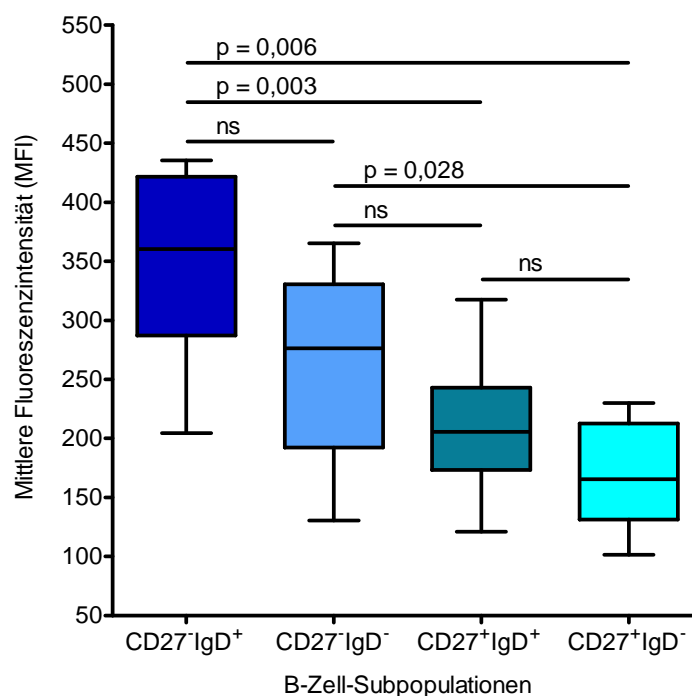


Abbildung 3-5 MFI der vier CD27^{-/+} IgD^{-/+} B-Zell-Populationen nach Inkubation mit dem markierten Anti-CD22-Antikörper Epratuzumab und anschließender FACS-Analyse.
Die Linien in den Balken entsprechen dem arithmetischen Mittelwert. Es wurde der Mann-Whitney-Test verwendet (N=8).

SLE-Patienten

Auch die MFI-Analyse der B-Zellen von SLE-Patienten zeigte, dass die CD27⁻ IgD⁺ naive B-Zell-Subpopulation mit einer durchschnittlichen MFI von 336 (±76) die höchste Epratuzumab-Bindung – und somit die höchste CD22-Dichte auf ihrer Zelloberfläche – aufwies. Damit war die MFI dieser CD27⁻ IgD⁺ B-Zellen signifikant höher als die MFI der anderen drei B-Zell-Subpopulationen. Es trat erneut die niedrigste MFI in der CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellpopulation mit einer MFI von 158 (±48) ($p = 0,001$, Mann-Whitney-Test, N=11) auf und war damit nur die Hälfte gegenüber der

CD27⁻ IgD⁺ naive B-Zellen. Die MFI der CD27⁺ IgD⁺ nicht klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen lag mit 215 (\pm 30) ähnlich hoch wie die der CD27⁻ IgD⁻ Population mit 254 (\pm 77) ($p > 0,05$), beide waren jedoch signifikant niedriger als die MFI der CD27⁻ IgD⁺ naive B-Zell-Subpopulation (CD27⁺ IgD⁺ $p = 0,002$, CD27⁻ IgD⁻ $p = 0,036$). Im Vergleich zu den CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen konnte jedoch eine signifikant höhere MFI sowohl für die CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen ($p = 0,005$) als auch für die CD27⁺ IgD⁺ nicht klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen ($p = 0,006$) nachgewiesen werden (Abbildung 3-6).

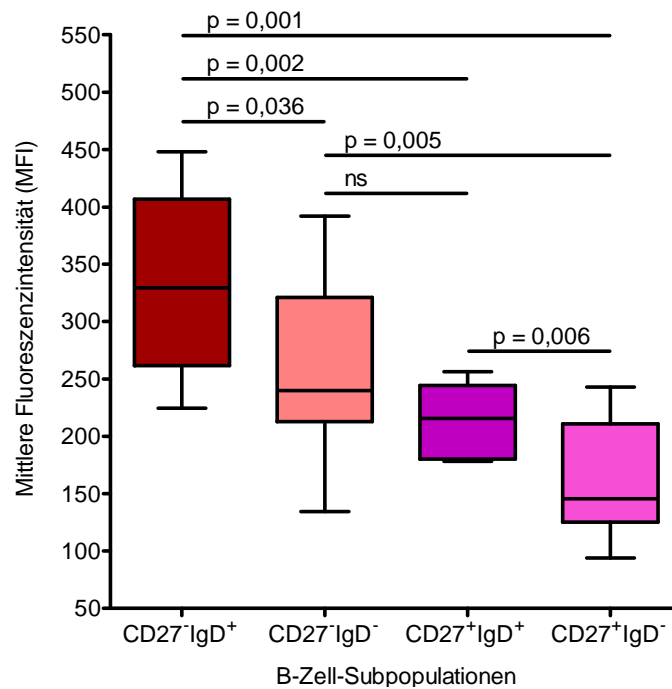


Abbildung 3-6 MFI der vier CD27^{+/+} IgD^{+/+} B-Zell-Populationen nach Inkubation mit markiertem Epratuzumab und anschließender FACS-Analyse (Mann-Whitney-Test, N=8).

Die CD27⁻ IgD⁺ naive B-Zell-Population zeigte die höchste CD22-Expression. Diese war im Vergleich zur Gruppe der CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen, welche die niedrigste MFI aufwies, mehr als doppelt so hoch. Das konnte sowohl bei gesunden Probanden als auch bei SLE-Patienten festgestellt werden. Bei den gesunden Probanden zeigte sich innerhalb der CD27⁻ und der CD27⁺ Subpopulation jeweils kein signifikanter Unterschied. Bei den SLE-Patienten hatten CD27⁻ IgD⁺ naive B-Lymphozyten eine signifikant höhere CD22-Expressionen als CD27⁻ IgD⁻ und CD27⁺ IgD⁺ B-Lymphozyten, welche wiederum jeweils eine höhere Bindung als die CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselten Gedächtnis-B-Lymphozyten aufwiesen.

3.3. Einfluss von Epratuzumab auf die Expression von CD62L und β_7 -Integrin auf B-Zellen

Im Folgenden wurde der Effekt von Epratuzumab auf die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle CD62L und β_7 -Integrin auf B-Zellen von gesunden Probanden und SLE-Patienten durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurde jeweils die Gesamtheit der CD19⁺ B-Zellen und die CD27⁻ und CD27⁺ B-Zell-Subpopulationen analysiert.

3.3.1. Reduktion der CD62L-Expression auf B-Zellen nach Epratuzumab-Inkubation

Gesunde Versuchspersonen

In der CD19⁺ B-Zellpopulation zeigte sich eine signifikante Reduktion der CD62L-Expression nach Inkubation mit Epratuzumab auf 49% ($\pm 6\%$) CD62L-exprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle nach Inkubation ohne Epratuzumab mit 70% ($\pm 9\%$) ($p=0,004$, Wilcoxon-Test N=9). Es wurde allerdings nur in der CD27⁻ B-Zell-Population eine signifikante Verringerung der CD62L-Expression in Höhe von durchschnittlich 38% nachgewiesen. Während nach Inkubation ohne Epratuzumab 74% ($\pm 12\%$) der CD27⁻ B-Zellen CD62L auf ihrer Oberfläche exprimierten, waren es mit Epratuzumab 46% ($\pm 7\%$) ($p=0,004$). Im Kompartiment der CD27⁺ B-Zellen war eine geringe Differenz der CD62L-exprimierenden Zellen erkennbar, welche jedoch nicht signifikant unterschiedlich war (ohne Epratuzumab 64% $\pm 6\%$; mit Epratuzumab 60% $\pm 7\%$) ($p>0,05$, Abbildung 3-7).

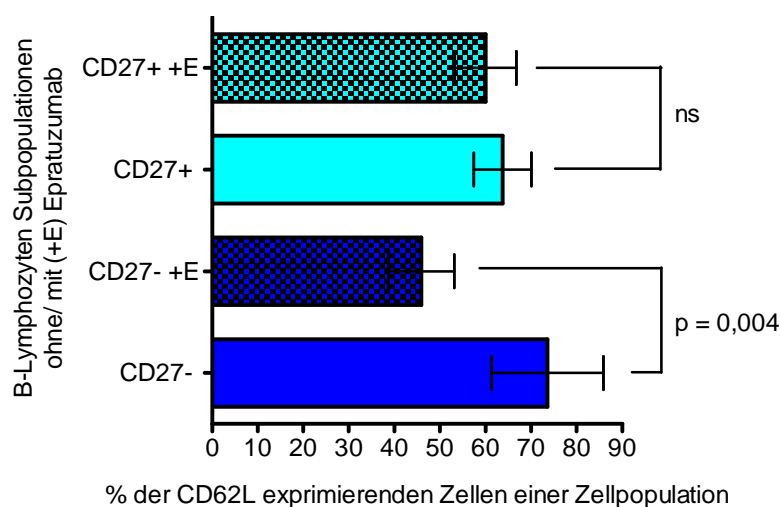


Abbildung 3-7 Frequenz der CD62L-exprimierenden Zellen innerhalb der CD27⁻ und CD27⁺ B-Zell-Subpopulationen gesunder Probanden nach Inkubation ohne bzw. mit Epratuzumab. Dargestellt sind arithmetischer Mittelwert und SD. (Wilcoxon-Test; N=9)

SLE-Patienten

Bei der Analyse der PBMCs von SLE-Patienten wurde ebenfalls eine signifikante Abnahme der Frequenz CD62L-exprimierender B-Zellen ($p=0,004$, Wilcoxon-Test $N=9$) nach Epratuzumab-Inkubation, insbesondere in der CD27⁻ Subpopulation, festgestellt. Während 58% ($\pm 19\%$) der CD27⁻ B-Lymphozyten nach Inkubation ohne Epratuzumab CD62L auf ihrer Oberfläche exprimierten, waren es mit Epratuzumab 38% ($\pm 16\%$) ($p=0,004$). Die Inkubation mit Epratuzumab führte somit zu einer Reduktion der CD62L-exprimierenden naiven B-Zellen um ca. 35%. Der Prozentsatz der CD62L-exprimierenden CD27⁺ B-Zellen blieb bei dem Vergleich mit und ohne Epratuzumab dagegen unverändert (49% $\pm 19\%$ versus 44% $\pm 15\%$ $p>0,05$) (Abbildung 3-8).

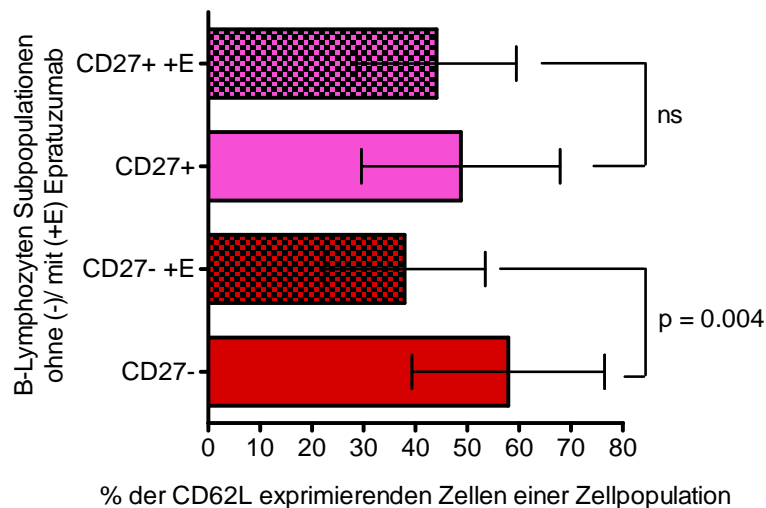


Abbildung 3-8 Frequenz CD62L-exprimierender Zellen in den CD27⁻ und CD27⁺ B-Zell-Populationen von SLE-Patienten nach Inkubation ohne bzw. mit Epratuzumab. Dargestellt sind jeweils der arithmetische Mittelwert und die SD. Es wurde der Wilcoxon-Test verwendet ($N=9$).

Die *In vitro*-Inkubation mit Epratuzumab führte zu einer Reduktion der CD62L-Expression bei CD27⁻ naiven B-Zellen jedoch nicht bei CD27⁺ Gedächtnis-B-Lymphozyten. Die Reduktion konnte sowohl bei gesunden Versuchspersonen als auch bei SLE-Patienten nachgewiesen werden und lag durchschnittlich bei 35-38%.

3.3.2. Reduktion der β_7 -Integrin-Expression auf B-Zellen nach Epratuzumab-Inkubation

Gesunde Normalpersonen

Die CD19⁺ B-Zellen von gesunden Probanden zeigten nach Inkubation mit Epratuzumab eine signifikante Reduktion des Anteils der β_7 -Integrin-exprimierenden Zellen ($p=0,009$, Wilcoxon-Test, $N=9$). Während die Frequenz der β_7 -Integrin-exprimierenden CD19⁺ B-Zellen nach Inkubation ohne Epratuzumab bei 72% ($\pm 11\%$) lag, wurden nach Inkubation mit Epratuzumab 55% ($\pm 12\%$) β_7 -Integrin-exprimierende CD19⁺ B-Zellen detektiert. Dieser Effekt war in der CD27⁻ und CD27⁺ B-Zell-Populationen unterschiedlich stark ausgeprägt. 83% ($\pm 9\%$) der CD27⁻ B-Zellen wiesen nach der Inkubation ohne Epratuzumab β_7 -Integrin auf ihrer Oberfläche auf, während es mit Epratuzumab nur 64% ($\pm 13\%$) waren ($p=0,004$). Damit war in diesem Zell-Kompartiment nach Inkubation mit Epratuzumab der Anteil β_7 -Integrin-exprimierender Zellen durchschnittlich 24% niedriger. In der Gruppe der CD27⁺ B-Zellen konnte ebenfalls eine leichte, jedoch nicht signifikante Reduktion der Frequenz β_7 -Integrin-exprimierender B-Zellen von 55% ($\pm 14\%$) auf 50% ($\pm 15\%$) beobachtet werden ($p>0,05$, Abbildung 3-9).

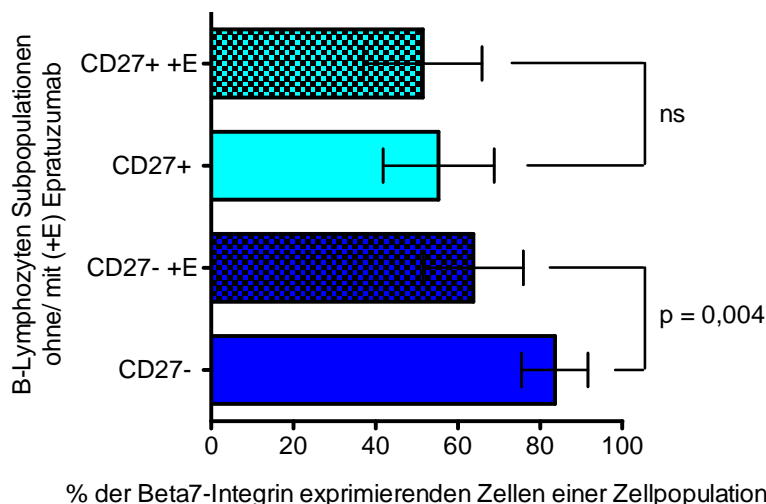


Abbildung 3-9 Frequenzen der β_7 -Integrin-exprimierenden Zellen der B-Zell-Subpopulationen von gesunden Probanden nach Inkubation ohne bzw. mit Epratuzumab. Dargestellt sind der arithmetische Mittelwert und die SD. Es wurde der Wilcoxon-Test verwendet ($N=9$).

SLE-Patienten

Die Epratuzumab-Inkubation führte in Proben von SLE-Patienten zu einer signifikanten Reduktion β_7 -Integrin-exprimierender CD19⁺ B-Zellen (ohne Epratuzumab 60% ($\pm 8\%$), mit Epratuzumab 52% ($\pm 9\%$), $p=0,004$, Wilcoxon-Test, $N=9$). Die Differenzierung in CD27⁻ und CD27⁺ Populationen zeigte, dass diese Abnahme in erster Linie erneut auf die CD27⁻ B-Zellen beschränkt war. Nach Inkubation ohne Epratuzumab wurde bei 71% ($\pm 13\%$) dieser Zellen β_7 -Integrin auf der Zelloberfläche detektiert. Die Frequenz der β_7 -Integrin-exprimierenden Zellen mit Epratuzumab betrug dagegen 60% ($\pm 14\%$) ($p=0,004$), somit lag eine durchschnittlich 16% geringere Expressionsfrequenz vor. Innerhalb der CD27⁺ B-Zellen zeigte sich keine signifikante Veränderung der β_7 -Integrin-Expressionsfrequenzen nach Epratuzumab-Inkubation (ohne 39% $\pm 11\%$; mit Epratuzumab 40% $\pm 9\%$) (Abbildung 3-10).

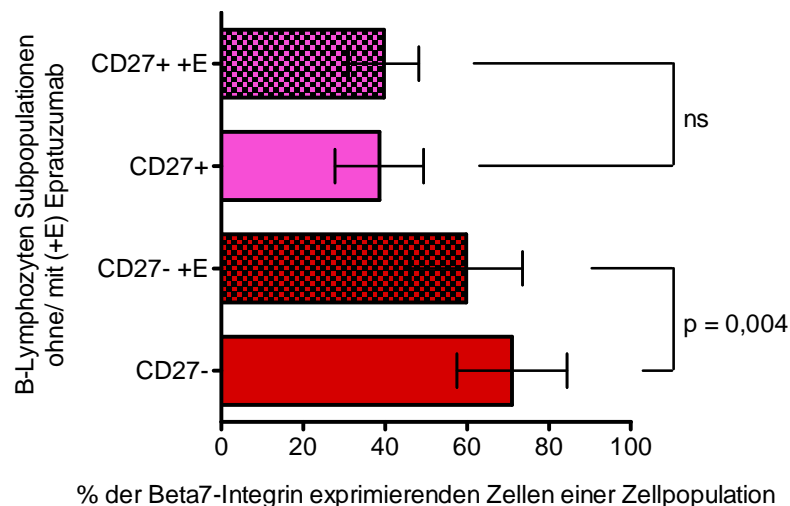


Abbildung 3-10

Frequenzen der β_7 -Integrin-positiven Zellen der jeweiligen B-Zell-Subpopulationen von SLE-Patienten nach Inkubation ohne bzw. mit Epratuzumab. Dargestellt sind der arithmetische Mittelwert und die SD. Es wurde der Wilcoxon-Test verwendet ($N=9$).

Durch die *In vitro*-Inkubation mit Epratuzumab wurde die Frequenz β_7 -Integrin-exprimierender B-Zellen bei gesunden Versuchspersonen und SLE-Patienten reduziert. In beiden Probandengruppen konnte diese Reduktion auf die Population der CD27⁻ naiven B-Zellen zurückgeführt werden und lag hier durchschnittlich bei 18-24%. Die CD27⁺ Zellpopulation zeigte unter Epratuzumab hingegen keine signifikante Veränderung an β_7 -Integrin-exprimierenden Zellen.

3.4. Steigerung der *In vitro* - Migration von B-Zellen durch Epratuzumab

Um ergänzend zur veränderten Expression von Adhäsionsmolekülen auch mögliche funktionelle Auswirkungen einer Epratuzumab-Behandlung auf B-Zellen zu untersuchen, wurden *In vitro*-Migrationsassays mit PBMCs von gesunden Probanden und SLE-Patienten durchgeführt. Hierbei wurde der Einfluss von Epratuzumab sowohl auf die spontane, d.h. Chemokin-unabhängige Zellmigration, als auch auf die gezielte Chemokin-induzierte Migration betrachtet. Dabei wurden die Chemokine CXCL12, CXCL13 und die CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 in Kombination verwendet. Es erfolgte die Analyse der Migrationsfrequenzen der gesamten CD19⁺ B-Zell-Population sowie der anhand ihrer CD27- und IgD-Expression differenzierten Subpopulationen.

3.4.1. Erhöhte spontane Migration von B-Zellen durch Epratuzumab

Um die Chemokin-spezifischen Effekte von Epratuzumab besser einordnen zu können, wurde anfänglich der Netto-Effekt von Epratuzumab auf das Migrationsverhalten der B-Zellen ohne Anwesenheit von Chemokinen (Basalmigration) untersucht. Hierfür wurden Migrationsassays in 0,5%igem RPMI-BSA Medium durchgeführt.

Gesunde Versuchspersonen

Nach Epratuzumab-Inkubation war die basale Transmigrationsrate der CD19⁺ B-Zellen von gesunden Probanden ohne Chemokin dreifach höher als ohne Epratuzumab. Die durchschnittliche Migrationsfrequenz ohne Epratuzumab betrug 1,4% ($\pm 0,9\%$), während mit Epratuzumab 4,2% ($\pm 2,3\%$) der B-Zellen spontan migrierten ($p=0,004$, Wilcoxon-Test, $N=9$, Abbildung 3-11). Der Effekt der erhöhten spontanen Migrationsrate konnte bei allen vier Subpopulationen beobachtet werden. In der Gruppe der CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Zellen war er jedoch am deutlichsten ausgeprägt ($p=0,004$). Die basale Transmigrationsrate hatte sich hier durch Epratuzumab im Durchschnitt mehr als vervierfacht. Eine ungefähre Verdopplung der Transmigrationsrate und damit auch ein signifikanter Unterschied, war sowohl in der Gruppe der CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen (ohne Epratuzumab 2,9% $\pm 1,8\%$, mit Epratuzumab 5,4% $\pm 2,8\%$, $p=0,008$) als auch bei den CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen (ohne Epratuzumab 3,0% $\pm 2,1\%$, mit Epratuzumab 5,4% $\pm 3,1\%$, $p=0,008$) zu sehen. Innerhalb der Population der

CD27⁺ IgD⁺ nicht klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen konnte ebenso eine signifikante Steigerung der basalen Transmigrationsrate von 2% ohne auf 5% mit Epratuzumab beobachtet werden ($p=0,020$) (Abbildung 3-11).

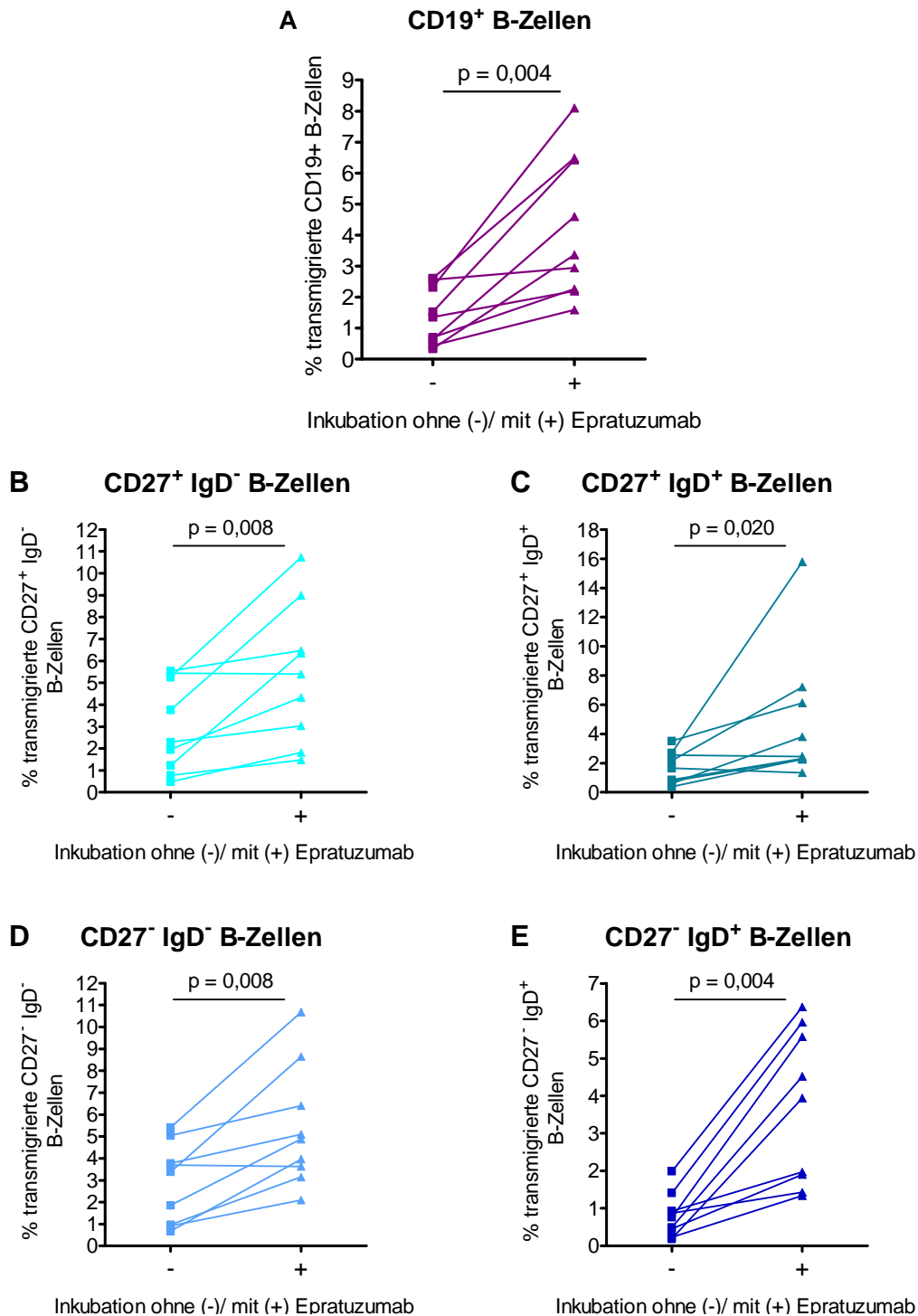


Abbildung 3-11 Basale Transmigrationsrate der B-Zellen und deren Subpopulationen von 9 gesunden Probanden nach Inkubation mit bzw. ohne Epratuzumab.
A CD19⁺ B-Zellen gesamt **B** CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen **C** CD27⁺ IgD⁺ nicht klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen **D** CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen **E** CD27⁻ IgD⁺ naive B-Zellen. Es wurde der Wilcoxon-Test verwendet.

SLE-Patienten

Die B-Zellen von SLE-Patienten zeigten ein vergleichbares Migrationsverhalten wie die gesunder Probanden. Durch die Inkubation mit Epratuzumab kam es zu einer signifikant erhöhten spontanen Transmigrationsrate. Diese war sowohl bei der gesamten CD19⁺ B-Lymphozyten-Population als auch bei den Subpopulationen nachweisbar (CD19⁺ B-Zellen $p=0,004$, Wilcoxon-Test, $N=9$) (Abbildung 3-12). Ohne Epratuzumab migrierten im Durchschnitt 1,7% ($\pm 1,0\%$) der CD19⁺ B-Zellen, während mit Epratuzumab die basale Transmigrationsrate auf 5,1% ($\pm 1,7\%$) anstieg. Auch hier war der Effekt von Epratuzumab auf die Migration in der CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Zell-Population am deutlichsten und führte zu mehr als einer Verdreifachung der durchschnittlichen Transmigrationsrate von 1,8% ($\pm 1,2\%$) auf 6,2% ($\pm 2,5\%$) ($p=0,004$). In den Gruppen der CD27⁻ IgD⁻ B-Lymphozyten und der CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen konnten analog signifikante Erhöhungen mit mehr als einer Verdoppelung der Transmigrationsrate beobachtet werden. Dabei zeigten die CD27⁻ IgD⁻ B-Lymphozyten ohne Epratuzumab eine basale Migrationsfrequenz von 2,6% ($\pm 1,2\%$), während diese mit Epratuzumab bei 5,8% ($\pm 2,6\%$) lag ($p=0,004$). In der Gruppe der CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen betrug die spontane Migrationsrate ohne Epratuzumab 1,6% ($\pm 1,0\%$), dagegen migrierten nach Epratuzumab-Inkubation 4,2% ($\pm 2,6\%$) ($p=0,004$). Die CD27⁺ IgD⁺ nicht klassengewechselten Gedächtnis-B-Lymphozyten zeigten eine geringere Erhöhung von 3,9% ($\pm 3,1\%$) auf 7,6% ($\pm 5,2\%$) unter Epratuzumab ($p=0,016$). Abbildung 3-13 fasst die Migrationsfrequenzen der jeweiligen B-Zell-Populationen zusammen.

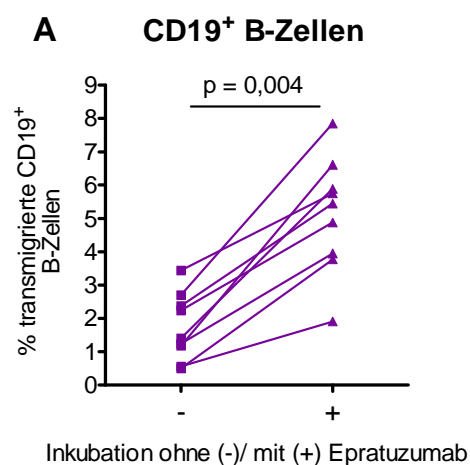


Abbildung 3-12

Basale Transmigrationsrate CD19⁺ B-Zellen von SLE-Patienten nach Inkubation ohne bzw. mit Epratuzumab. Es wurde der Wilcoxon-Test verwendet.

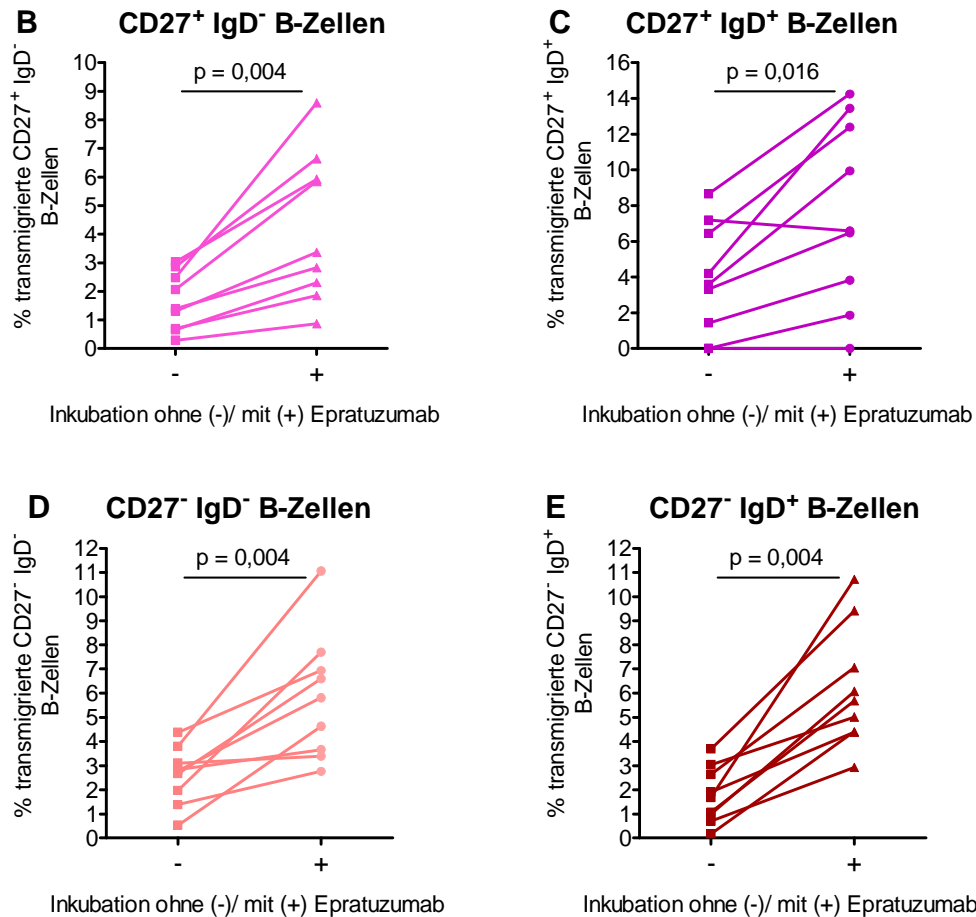


Abbildung 3-13

Basale Transmigrationsrate der B-Zell-Subpopulation von 9 SLE-Patienten nach Inkubation ohne bzw. mit Epratuzumab. (Wilcoxon-Test)

B CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen **C** CD27⁺ IgD⁺ nicht klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen **D** CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen **E** CD27⁻ IgD⁺ naive B-Zellen.

Epratuzumab führte in *In vitro*-Transmigrationsexperimenten zu einer signifikant höheren basalen, Chemokin-unabhängigen Migrationsfrequenz der CD19⁺ B-Lymphozyten. Dies trat sowohl bei Zellen gesunder Probanden als auch bei Zellen von SLE-Patienten auf. In beiden Probandengruppen waren alle B-Zell-Subpopulationen betroffen, wobei die Zunahme der Migrationsfrequenz in der Subpopulation der CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Lymphozyten mit einer Vervierfachung bzw. Verdreifachung jeweils am deutlichsten ausgeprägt war.

3.4.2 Chemokin-spezifische Migration CD19⁺ B-Zellen unter Epratuzumab

Zur Untersuchung der Chemokin-induzierten Migration wurden die Chemokine CXCL12, CXCL13 und die CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 in Kombination getestet. Da unter Epratuzumab bereits ein signifikanter Anstieg der spontanen Migrationsrate festgestellt wurde (3.4.1), wurde diese für die Analyse der Chemokin-spezifischen Migration jeweils von der Chemokin-spezifischen Migrationsrate subtrahiert. Die so berechneten Migrationfrequenzen reflektieren damit die direkte, chemokin-spezifische Migration und ermöglichen die Betrachtung des Nettoeffekts von Epratuzumab auf die Chemokin-spezifische Migrationskapazität von B-Zellen.

Gesunde Versuchspersonen

Die B-Zellen zeigten gegenüber allen Chemokinen eine signifikant höhere Migrationsfrequenz nach Inkubation mit Epratuzumab als ohne Epratuzumab (CXCL12 $p=0,020$; CXCL13 $p=0,012$; CXCR3-Liganden $p=0,020$; Wilcoxon-Test, $N=9$). Die spezifische Migrationsfrequenz gegenüber CXCL12 konnte durch Epratuzumab von 10,7% auf 19,1% fast verdoppelt werden. Gegenüber CXCL13 wurde eine Steigerung von 12,9% auf 26,0%, bei den CXCR3-Liganden von 4,7% auf 9,5% festgestellt (Abbildung 3-14 A), so dass auch hier durch Epratuzumab eine Verdopplung der spezifischen Migrationsfrequenz zu beobachten war.

SLE-Patienten

Vergleicht man die entsprechenden Migrationsfrequenzen der B-Zellen von SLE-Patienten nach Inkubation mit bzw. ohne Epratuzumab, fällt auf, dass es nur gegenüber CXCL12 zu einer signifikant höheren Migrationsrate unter Epratuzumab kam ($p=0,016$ Wilcoxon-Test, $N=8$). Diese war mit 17,7% ($\pm 7,3\%$) mehr als 70% höher als die Migrationsfrequenz der B-Zellen ohne Epratuzumab (10,3% $\pm 5,5\%$). Gegenüber CXCL13 zeichnete sich ebenfalls tendenziell eine höhere Migrationsfrequenz unter Epratuzumab ab. Die Migrationsfrequenz ohne Epratuzumab lag bei 9,5% ($\pm 5,4\%$) und stieg unter Epratuzumab auf 12,1% ($\pm 5,6\%$) an. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p>0,05$). Die Chemokin-spezifischen Migrationsfrequenzen der B-Zellen gegenüber den CXCR3-Liganden unterschieden sich nach Inkubation ohne bzw. mit Epratuzumab nicht (5,2% $\pm 3,1\%$ vs. 5,7% $\pm 2,3\%$ $p>0,05$) (Abbildung 3-14 B).

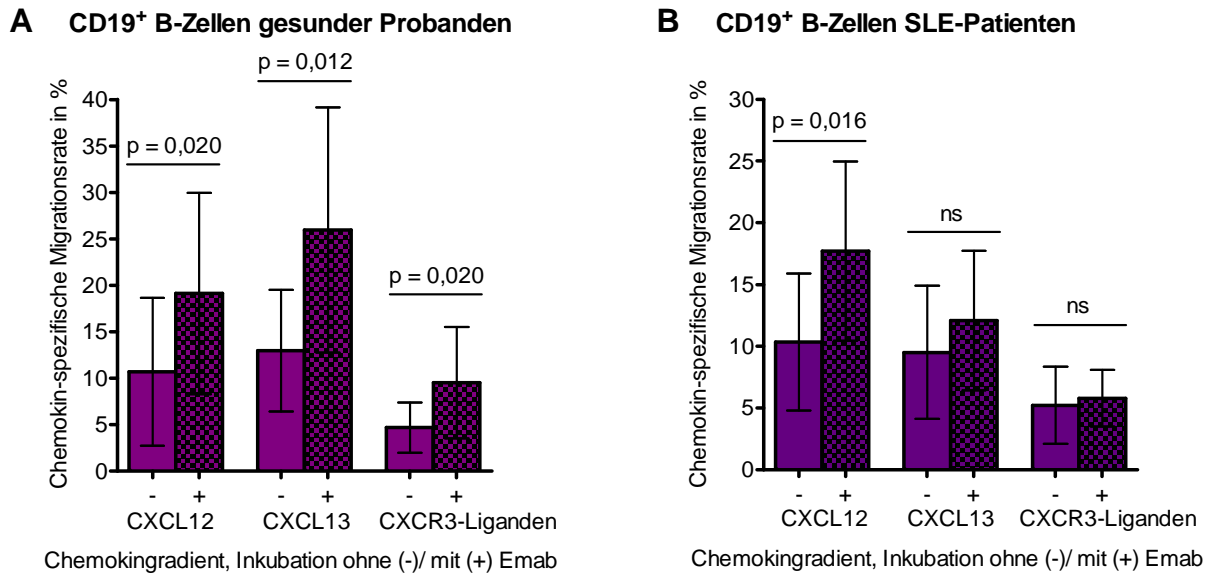


Abbildung 3-14

Spezifische Migrationsfrequenzen von CD19⁺ B-Zellen gegenüber den Chemokinen CXCL12, CXCL13 und den CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 nach Inkubation mit und ohne Epratuzumab. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die SDs dargestellt. Es wurde der Wilcoxon-Test verwendet. **A** Gesunde Probanden (N=9). **B** SLE-Patienten (N=8).

Epratuzumab führte bei CD19⁺ B-Zellen gesunder Probanden zu einer fast 100% höheren spezifischen Migrationsfrequenz gegenüber CXCL12, CXCL13 und den CXCR3-Liganden (CXCL9, CXCL10, CXCL11), während bei SLE-Patienten nur eine signifikante Steigerung der Migrationsrate der CD19⁺ B-Zellen gegenüber dem Chemokin CXCL12 in Höhe von 70% nachgewiesen werden konnte. Insgesamt konnte jedoch eine deutliche Beeinflussung der Migration nach CD22-Bindung belegt werden.

3.4.3. Chemokin-spezifische Migration der B-Zell-Subpopulationen unter Epratuzumab

Die Analyse der anhand ihrer CD27- und IgD-Expression differenzierten B-Zellen hinsichtlich ihrer chemokin-spezifischen Migration unter Epratuzumab, konnte weitere Einsichten zum differenzierten Migrationspotential dieser Subpopulationen beibringen.

3.4.3.1. CXCL12

Gesunde Versuchspersonen

Bei Betrachtung der einzelnen B-Zell-Populationen zeigte sich, dass der Effekt der signifikant erhöhten Migrationsrate gegenüber CXCL12 im Wesentlichen auf die Population der CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Zellen beschränkt war ($p=0,002$, Wilcoxon-Test, $N=9$). Die Migrationsfrequenz der CD27⁻ IgD⁺ B-Lymphozyten hat sich dabei von 10,0% ($\pm 8,4\%$) auf 21,3% ($\pm 12,7\%$) unter Epratuzumab mehr als verdoppelt. Die anderen Subpopulationen (CD27⁺ IgD⁻, CD27⁺ IgD⁺, CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen) hingegen wiesen keine substantielle Veränderung ihres Migrationsverhaltens auf (Abbildung 3-15).

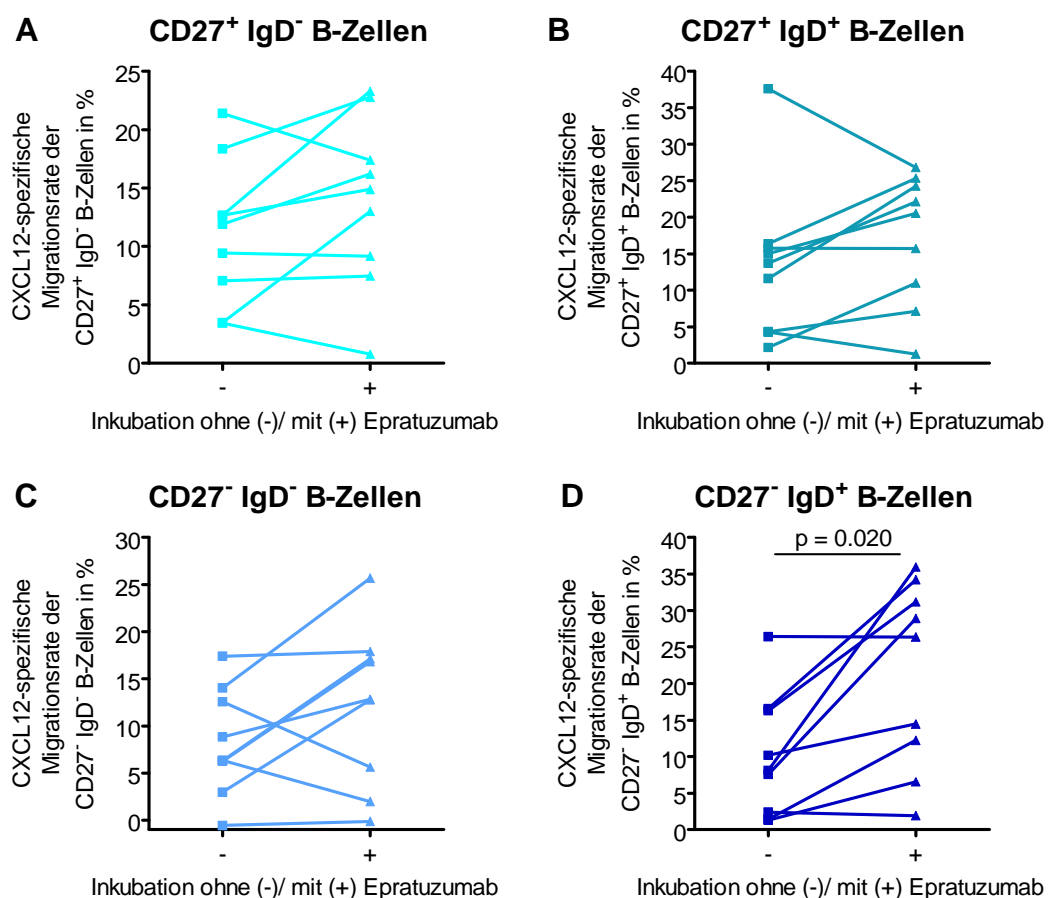


Abbildung 3-15

CXCL12-spezifische Migrationsrate der B-Zell-Subpopulationen gesunder Probanden ohne bzw. mit Epratuzumab. (Wilcoxon-Test; $N=9$).

A CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen **B** CD27⁺ IgD⁺ nicht klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen **C** CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen **D** CD27⁻ IgD⁺ naive B-Zellen.

SLE-Patienten

In der Auswertung der vier B-Zell-Subpopulationen von SLE-Patienten fand sich die signifikante Steigerung der Migrationsrate unter Epratuzumab ausschließlich innerhalb der beiden $CD27^-$ B-Lymphozyten-Populationen. Dabei sah man in der $CD27^-$ IgD^+ naiven Subpopulation eine 80%ige Steigerung der Migrationsfrequenz nach Epratuzumab-Inkubation. Die Proben ohne Antikörper wiesen eine Migrationsrate von 15,5% ($\pm 7,9\%$) auf, während diese mit Epratuzumab 28,0% ($\pm 10,0\%$) betrug ($p=0,008$ Wilcoxon-Test, $N=8$). In der Population der $CD27^-$ IgD^- B-Lymphozyten migrierten ohne den Antikörper 6,3% ($\pm 5,3\%$), mit dem Monoklonal hingegen 13,7% ($\pm 9,4\%$) ($p=0,008$). Damit kam es zu einer Verdopplung der Migrationsrate nach Epratuzumab-Inkubation. Die Migrationsraten der $CD27^+$ Gedächtnis-B-Zell-Populationen zeigten keine signifikanten Veränderungen ($p>0,05$) (Abbildung 3-16).

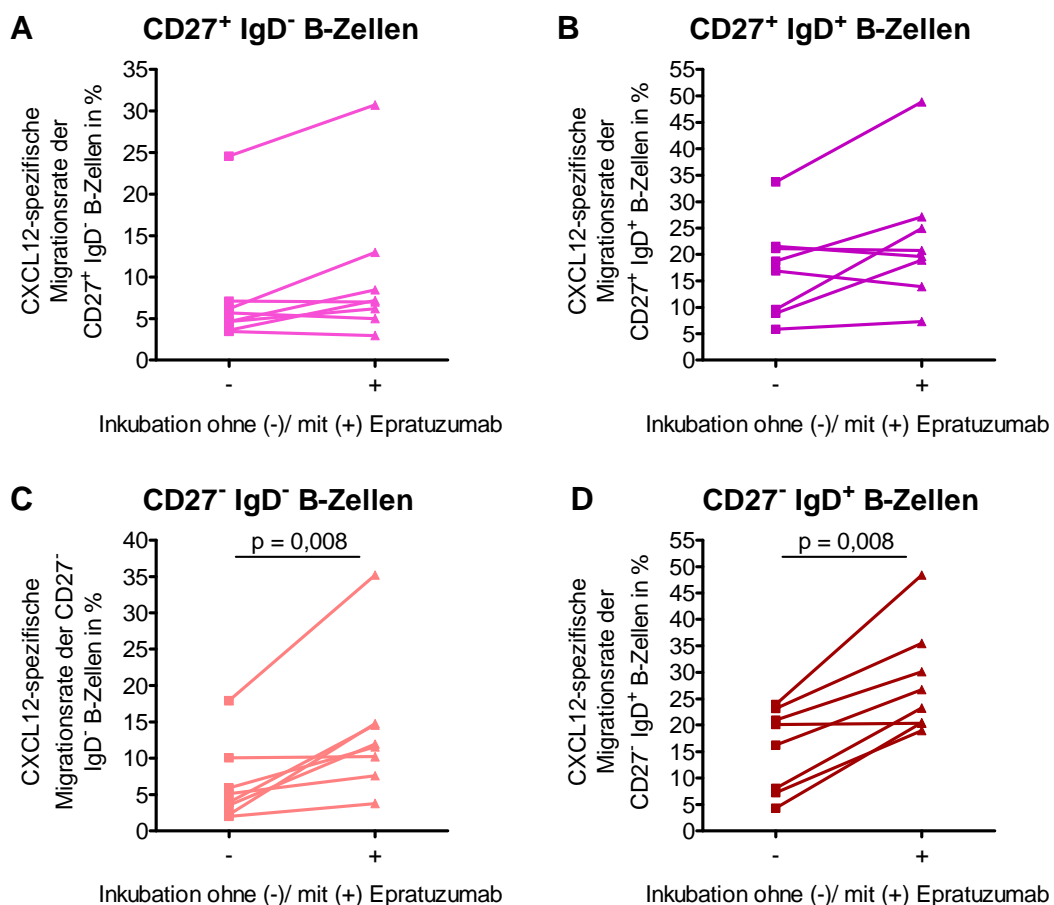


Abbildung 3-16

CXCL12-spezifische Migrationsrate der B-Zell-Subpopulationen von SLE-Patienten nach Inkubation ohne bzw. mit Epratuzumab (Wilcoxon-Test; $N=8$).
A $CD27^+$ IgD^- klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen **B** $CD27^+$ IgD^+ nicht klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen **C** $CD27^-$ IgD^- B-Zellen **D** $CD27^-$ IgD^+ naive B-Zellen.

3.4.3.2. CXCL13

Gesunde Versuchspersonen

Die Analyse der Subpopulationen ergab im Wesentlichen für CD27⁻ B-Zellen eine signifikante Zunahme der Migrationsfrequenz gegenüber dem CXCL13-Gradienten unter Epratuzumab. Während die Gruppe der CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Zellen eine Migrationszunahme von mehr als 150% unter Epratuzumab zeigte (10,5% (\pm 7,4%) auf 26,7% (\pm 14,3%), $p=0,008$ Wilcoxon-Test, $N=9$), betrug diese für CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen weniger als 50% (11,9% (\pm 4,3%) auf 17,4% (\pm 8,3%), $p=0,020$). CD27⁺ B-Lymphozyten ließen keine eindeutige Veränderung des Migrationsverhaltens unter Zugabe von Epratuzumab erkennen ($p>0,05$) (Abbildung 3-17).

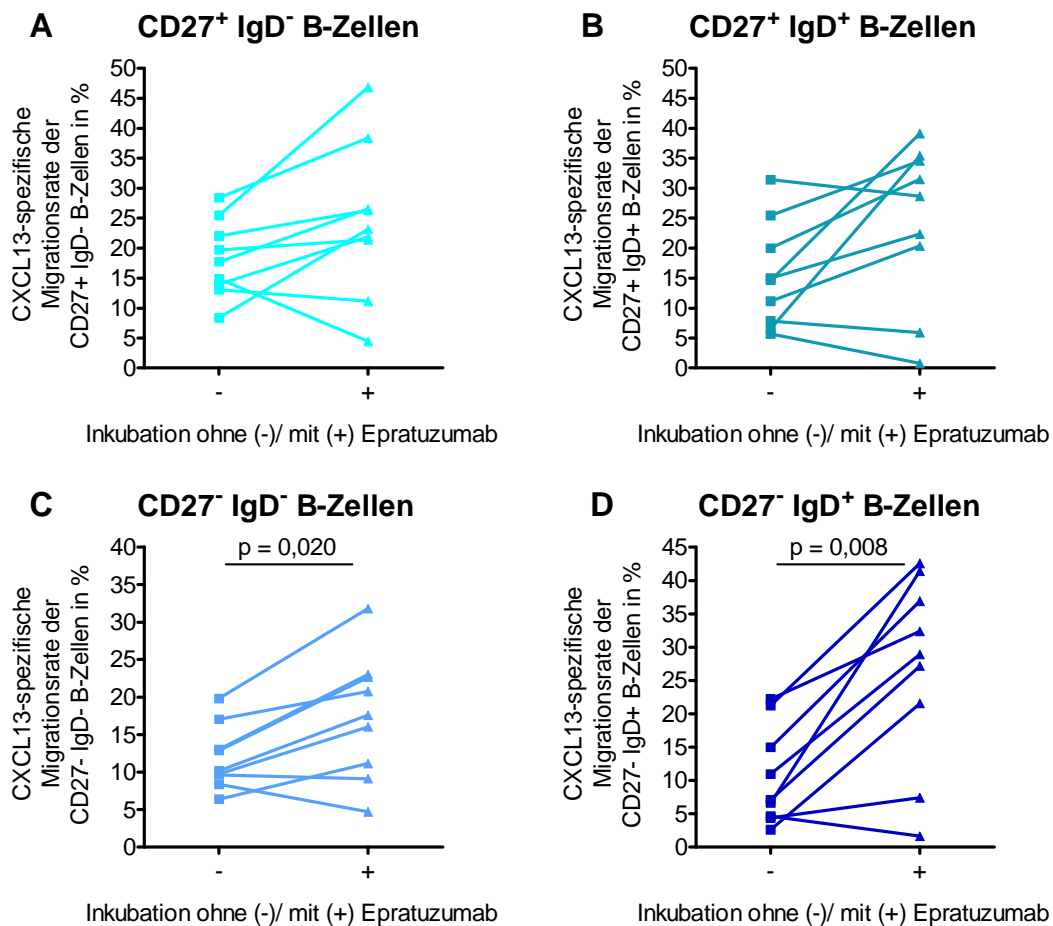


Abbildung 3-17

CXCL13-spezifische Migrationsrate der B-Zell-Subpopulationen gesunder Probanden nach Inkubation ohne bzw. mit Epratuzumab (Wilcoxon-Test; $N=9$).

A CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen **B** CD27⁺ IgD⁺ nicht klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen **C** CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen **D** CD27⁻ IgD⁺ naive B-Zellen.

SLE-Patienten

Wie bereits bei Untersuchungen der gesamten B-Zell-Population, waren auch bei individueller Betrachtung der vier differenzierten B-Zell-Subpopulationen keine Unterschiede erkennbar ($p > 0,05$, Wilcoxon Test, $N=9$). Die Migrationsfrequenzen mit und ohne Epratuzumab sind in Abbildung 3-18 zusammengefasst.

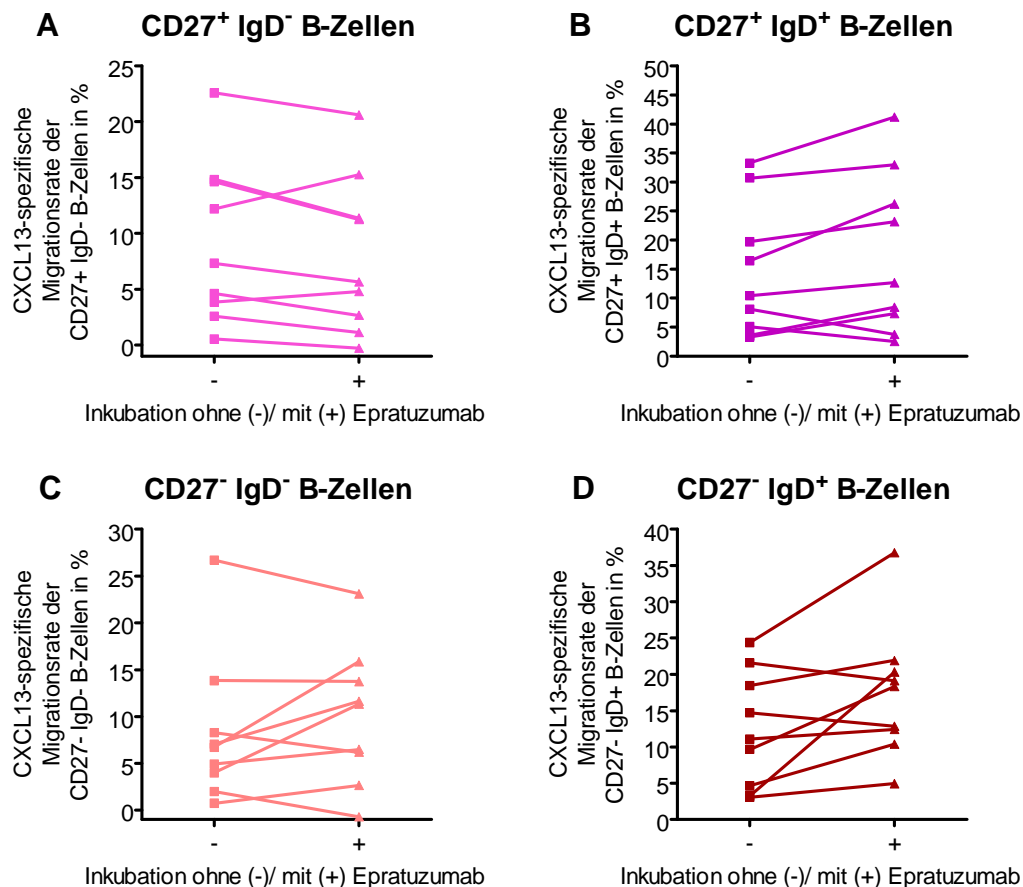


Abbildung 3-18 CXCL13-spezifische Migrationsrate der B-Zell-Subpopulationen von SLE-Patienten nach Inkubation ohne (-) bzw. mit (+) Epratuzumab (Wilcoxon-Test; $N=9$).
A CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen **B** CD27⁺ IgD⁺ nicht klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen **C** CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen **D** CD27⁻ IgD⁺ naive B-Zellen.

3.4.3.3. CXCR3-Liganden (CXCL9, CXCL10, CXCL11)Gesunde Versuchspersonen

Die differenzierte Analyse der B-Zellen unter Epratuzumab zeigte, dass die signifikante Zunahme der Migrationsrate gegenüber den CXCR3-Liganden nicht alle Populationen betraf. Erneut ließen sich die deutlichsten Effekte von Epratuzumab in der Gruppe der CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Zellen nachweisen. Hier konnte eine fast 150%ige Steigerung der

Migration von 3,3% ($\pm 2,3\%$) ohne Epratuzumab auf 8,3% ($\pm 5,6\%$) mit Epratuzumab festgestellt werden ($p=0,008$, Wilcoxon-Test, $N=9$). Interessanterweise war ebenfalls eine signifikante Migrationszunahme in der $CD27^+ IgD^+$ nicht klassengewechselten Gedächtnis-B-Zell-Population von durchschnittlich 6,5% ($\pm 4,5\%$) auf 11,1% ($\pm 8,1\%$) zu sehen ($p=0,040$). Die Population der $CD27^- IgD^-$ und der $CD27^+ IgD^-$ B-Zellen zeigten wiederum keine signifikanten Migrationsveränderungen ($p>0,05$; Abbildung 3-19).

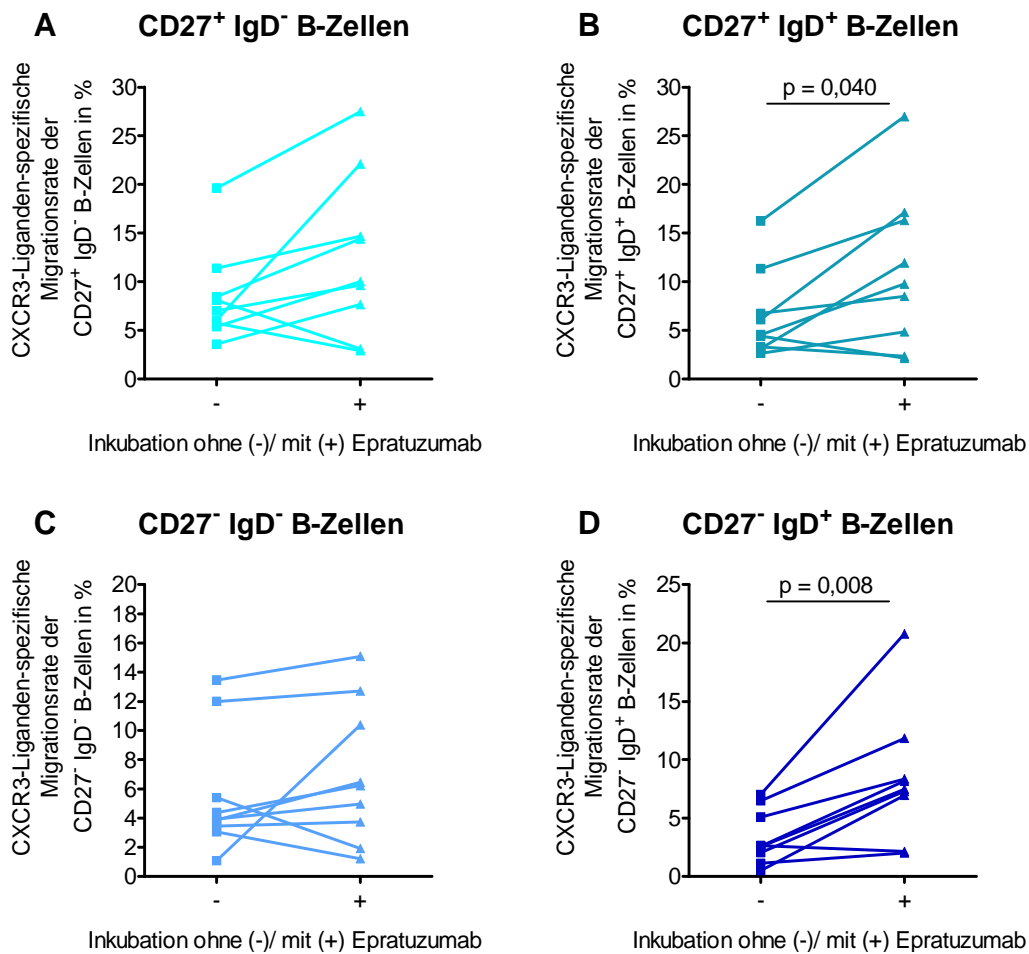


Abbildung 3-19

CXCR3-Liganden-spezifische Migrationsrate der B-Zell-Subpopulationen gesunder Probanden mit Epratuzumab gegenüber Kontrollen (Wilcoxon-Test; $N=9$). **A** $CD27^+ IgD^-$ klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen **B** $CD27^+ IgD^+$ nicht klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen **C** $CD27^- IgD^-$ B-Zellen **D** $CD27^- IgD^+$ naive B-Zellen.

SLE-Patienten

Innerhalb der B-Lymphozyten von SLE-Patienten fand sich gegenüber den CXCR3-Liganden keine veränderte Migration durch Epratuzumab-Inkubation, einschließlich der differenzierten Betrachtung einzelner Subpopulationen ($p>0,05$, Wilcoxon-Test, $N=9$) (Abbildung 3-20).

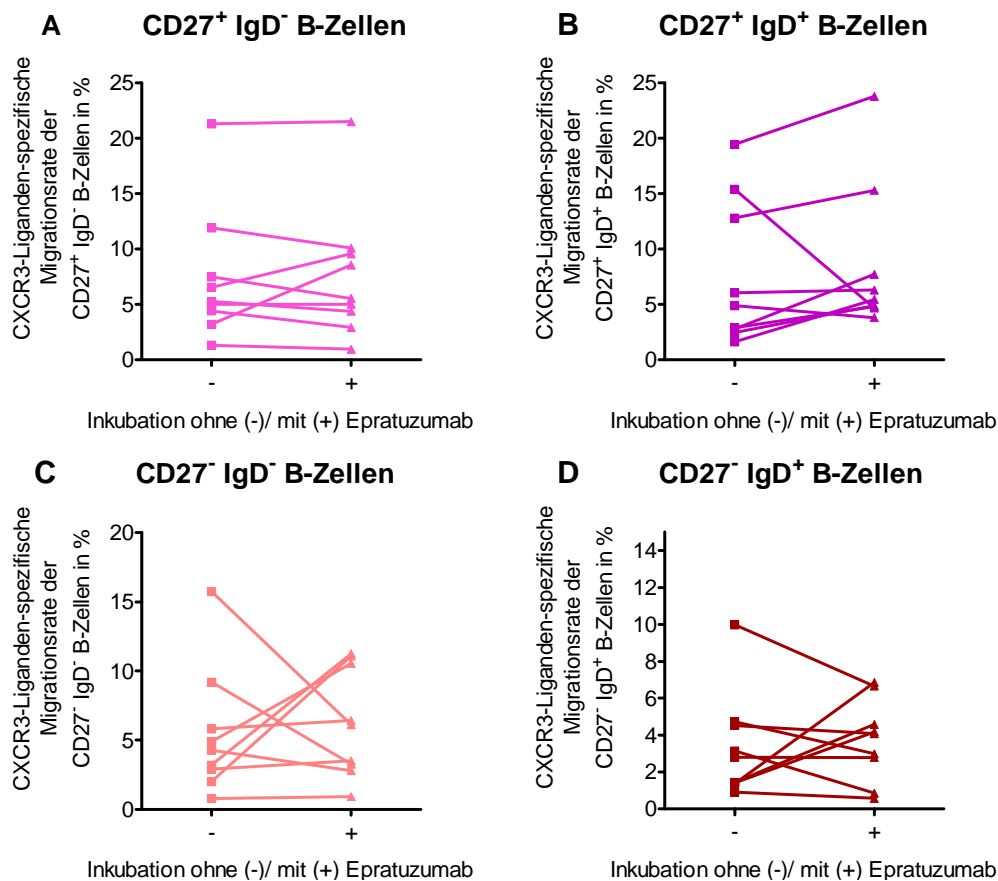


Abbildung 3-20

CXCR3-Liganden-spezifische Migrationsrate der B-Zell-Subpopulationen von SLE-Patienten (Wilcoxon-Test; N=9).

A CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen **B** CD27⁺ IgD⁺ nicht klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen **C** CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen **D** CD27⁻ IgD⁺ naive B-Zellen.

Epratuzumab führt zu einer erhöhten Chemokin-spezifischen Migration von B-Zellen. Den größten Effekt weist dessen CD22-Bindung auf CD27⁻ B-Zellen, insbesondere auf CD27⁻ IgD⁺ naive B-Lymphozyten, auf. Sowohl die Migrationsveränderungen von gesunden Probanden gegenüber allen Chemokinen (CXCL12, CXCL13 und die CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10, CXCL11), als auch die von SLE-Patienten gegenüber CXCL12 beruhten auf substantiellen Veränderungen in dieser Subpopulation. Bei SLE-Patienten konnte zusätzlich eine erhöhte Migrationsrate der CD27⁻ IgD⁻ Zellen gegenüber CXCL12 nach Epratuzumab-Inkubation nachgewiesen werden. Bei gesunden Versuchspersonen beruhte die signifikante Migrationserhöhung gegenüber CXCL13 durch den Antikörper ebenfalls zusätzlich auf CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen. Gegenüber den CXCR3-Liganden wurde bei gesunden Probanden eine erhöhte Migration der CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Zellen sowie der CD27⁻ IgD⁺ nicht klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen detektiert.

3.5. Vergleich der Effekte Epratuzumabs auf B-Zellen gesunder Probanden und auf B-Zellen von SLE-Patienten

In Experimenten zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens von B-Zellen unter Epratuzumab wurden signifikante Unterschiede bei B-Zellen von gesunden Probanden und SLE-Patienten festgestellt [1]. Aus diesem Grund wurden die in den vorangegangenen Experimenten untersuchten Effekte Epratuzumabs auf B-Zellen von gesunden Versuchspersonen und SLE-Patienten hier noch einmal hinsichtlich signifikanter Unterschiede verglichen. Dabei wurde die Bindung von Epratuzumab auf der Zelloberfläche und die Wirkung auf die Expression der Adhäsionsmoleküle CD62L und β_7 -Integrin als auch auf das Migrationsverhalten der verschiedenen B-Zell-Subpopulationen untersucht. Die Ergebnisse dieser Vergleiche sind nachfolgend dargelegt und in Übersichtstabellen zusammengefasst. Zur Berechnung der Signifikanzen wurde jeweils der Mann-Whitney-Test verwendet.

3.5.1. Epratuzumab-Bindung

Es wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Zellen gesunder Probanden und SLE-Patienten nach Inkubation mit markiertem Epratuzumab verglichen. Dabei wurden jeweils die differenzierten B-Zell-Subpopulationen beider Versuchsgruppen gegenüber gestellt. Keiner der Vergleiche der jeweiligen Zell-Populationen von gesunden Personen und von SLE-Patienten wies einen signifikanten Unterschied bezüglich der Bindung Epratuzumabs und damit der CD22-Expression auf (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1 Vergleich der MFI der B-Zell-Populationen von gesunden Probanden (HD, N=8) und SLE-Patienten (SLE, N=11) nach Inkubation mit markiertem Epratuzumab und anschließender FACS-Analyse (Mann-Whitney-Test).

	Zell-Population	p-Werte statistischer Vergleich HD vs. SLE
MFI nach Bindung des PE-gekoppeltem Epratuzumab	CD27 ⁻ B-Zellen	p > 0,05
	CD27 ⁺ B-Zellen	p > 0,05
	CD27 ⁻ IgD ⁺ B-Zellen	p > 0,05
	CD27 ⁻ IgD ⁻ B-Zellen	p > 0,05
	CD27 ⁺ IgD ⁺ B-Zellen	p > 0,05
	CD27 ⁺ IgD ⁻ B-Zellen	p > 0,05

3.5.2. Änderung der Expressionsfrequenzen der Adhäsionsmoleküle CD62L und β_7 -Integrin durch Epratuzumab-Inkubation

Ermittelt wurde der Effekt von Epratuzumab auf die Expressionsfrequenzen des jeweiligen Oberflächenmoleküls durch Berechnung folgender Differenz:

Expressionsfrequenz nach Inkubation mit Epratuzumab	–	Expressionsfrequenz nach Inkubation ohne Epratuzumab
--	---	---

Nachfolgend werden diese berechneten Differenzen der jeweiligen B-Zell-Population gesunder Versuchspersonen mit jenen der SLE-Patienten verglichen um festzustellen, ob der Effekt von Epratuzumab in den beiden Versuchsgruppen unterschiedlich war.

3.5.2.1. CD62L

In beiden Versuchsgruppen war eine Reduktion der CD62L-exprimierenden CD19⁺ B-Zellen zu verzeichnen. Diese betrug bei gesunden Probanden im Durchschnitt 21% ($\pm 9\%$), während die B-Zellen von SLE-Patienten nur eine Abnahme von 14% ($\pm 7\%$) zeigten. Es konnte kein signifikanter Unterschied bei dem Vergleich CD19⁺ B-Zellen von Gesunden und SLE-Patienten festgestellt werden. Bei Betrachtung der differenzierten CD27⁻ B-Zellen, konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Reduktion der CD62L-exprimierender Zellen von gesunden Probanden und SLE-Patienten nachgewiesen werden. In der Population der CD27⁺ B-Lymphozyten war in beiden Versuchsgruppen keine Reduktion durch Epratuzumab feststellbar und auch bei dem Vergleich des Effekts konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

3.5.2.2. β_7 -Integrin

Die β_7 -Integrin-Expression war auf der Oberfläche CD19⁺ B-Zellen nach Inkubation mit Epratuzumab signifikant reduziert. Dies betraf sowohl die Zellen gesunder Probanden als auch die von SLE-Patienten. Bei dem Vergleich dieser Reduktion konnte jedoch festgestellt werden, dass es bei Gesunden zu einer signifikant höheren Reduktion der β_7 -Integrin-exprimierenden Zellen kam als in den Proben der Patienten ($p=0,005$, Mann-Whitney-Test, $N=9$). Bei dem Vergleich der CD27⁻ und der CD27⁺ B-Zell-Populationen zeigte sich, dass der Effekt von Epratuzumab in beiden Zell-Populationen bei gesunden

Probanden signifikant höher war als bei den SLE-Patienten. In der CD27⁺ Population kam es bei Gesunden zu einer Reduktion um 20% ($\pm 7\%$), während die B-Zellen der Patienten eine Abnahme von 11% ($\pm 5\%$) aufwiesen ($p=0,019$). Die CD27⁺ B-Zellen zeigten in beiden Versuchsgruppen keine bedeutsamen Veränderungen durch Epratuzumab. Vergleicht man jedoch die Effekte miteinander kann ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p=0,017$). Während bei gesunden Probanden eine leichte Reduktion der Frequenz β_7 -Integrin-exprimierender CD27⁺ B-Zellen von 4% ($\pm 5\%$) zu verzeichnen war, kam es bei den CD27⁺ B-Zellen der Patienten sogar zu einer Zunahme um 1% ($\pm 3\%$) (Abbildung 3-21).

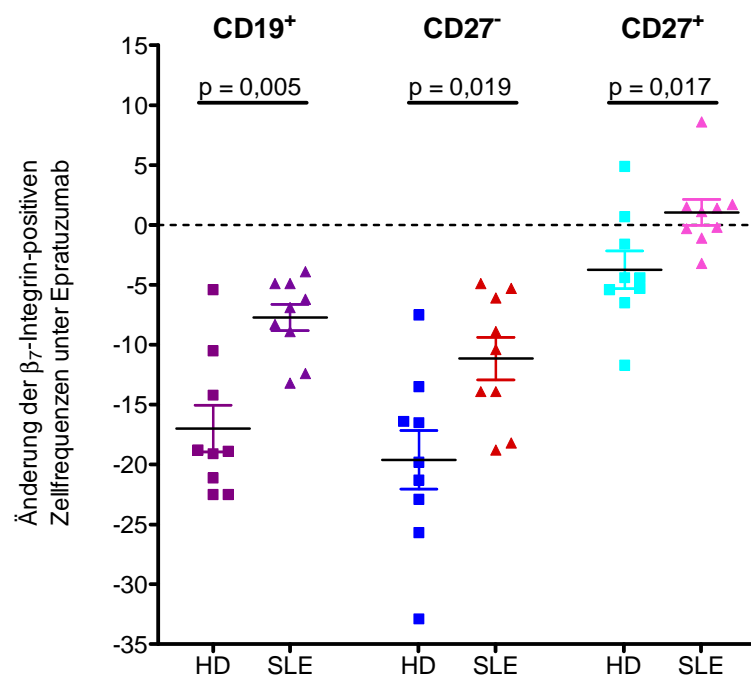


Abbildung 3-21

Änderung der β_7 -Integrin-Expressionsfrequenz durch Epratuzumab-Inkubation in der CD19⁺ B-Zell-Population und den CD27⁻ und CD27⁺ Subpopulationen gesunder Personen (HD) und SLE-Patienten (SLE) (Mann-Whitney-Test; N=9).

Der Effekt von Epratuzumab auf die CD62L-Expression auf B-Zellen unterscheidet sich nicht signifikant zwischen gesunden Probanden und SLE-Patienten. Der Effekt auf die β_7 -Integrin-Expression der B-Zellen gesunder Personen und Patienten unterscheidet sich jedoch signifikant. Es kam bei gesunden Probanden in allen B-Zell-Populationen zu einer ausgeprägteren Reduktion der β_7 -Integrin-exprimierenden Zellen.

3.5.3. Migration

In der Auswertung des Transmigrationsassays wurden jeweils die gesamten CD19⁺ B-Lymphozyten analysiert. Anschließend wurde diese Zellgruppe anhand ihrer CD27- und IgD-Expression noch einmal differenziert betrachtet. Die Migrationsraten wurden jeweils nach Inkubation mit bzw. ohne Epratuzumab bestimmt. Der Effekt Epratuzumabs auf die Migrationsrate wurde anschließend für jede Zell-Population separat mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

Migrationsfrequenz nach Inkubation mit Epratuzumab	–	Migrationsfrequenz nach Inkubation ohne Epratuzumab
---	---	--

Nachfolgend wird dieser Effekt auf die Migration der differenzierten B-Zell-Populationen gesunder Probanden und SLE-Patienten verglichen. Alle ermittelten Signifikanzen dieser Gegenüberstellungen sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst.

3.5.3.1. Spontane Migration

Sowohl die B-Zellen gesunder Probanden als auch die B-Lymphozyten von SLE-Patienten zeigten durch Epratuzumab eine Steigerung der spontanen Migrationsrate gegenüber 0,5%igem RPMI/BSA Medium. Bei dem Vergleich dieser Migrationsänderung der B-Zellen konnte sowohl für die gesamten CD19⁺ B-Zellen als auch für alle Subpopulationen kein signifikanter Unterschied zwischen den B-Zellen gesunder Probanden und den Patienten nachgewiesen werden ($p > 0,05$). Damit kann festgehalten werden, dass sich der Effekt von Epratuzumab auf die spontane Migrationsrate der B-Zellen von gesunden Probanden und von SLE-Patienten nicht unterscheidet (Tabelle 3-2).

3.5.3.2. Chemokin-induzierte Migration

Die B-Zellen gesunder Versuchspersonen zeigten unter Epratuzumab eine Migrationszunahme gegenüber allen Chemokinen (CXCL12, CXCL13, CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10, CXCL11), während diese bei den B-Zellen von SLE-Patienten auf das Chemokin CXCL12 begrenzt war. Bei dem direkten Vergleich des Effekts von Epratuzumab auf die Migrationsfrequenzen der CD19⁺ B-Zellen gesunder Probanden und SLE-Patienten zeigte sich ein signifikanter Unterschied gegenüber

CXCL13 und den CXCR3-Liganden. Während bei gesunden Probanden durch Epratuzumab-Inkubation 30% ($\pm 10\%$) mehr B-Zellen gegenüber einem CXCL13-Chemokin-Gradienten migrierten, war bei SLE-Patienten nur eine Migrationssteigerung von 3% ($\pm 5\%$) zu sehen ($p=0,038$). Gegenüber den CXCR3-Liganden migrierten bei Gesunden durch Epratuzumab-Inkubation 5% ($\pm 4\%$) mehr, während bei SLE-Patienten keine Änderung der Migrationsrate zu sehen war (1% ($\pm 3\%$)) ($p=0,030$) (Abbildung 3-22, Tabelle 3-2).

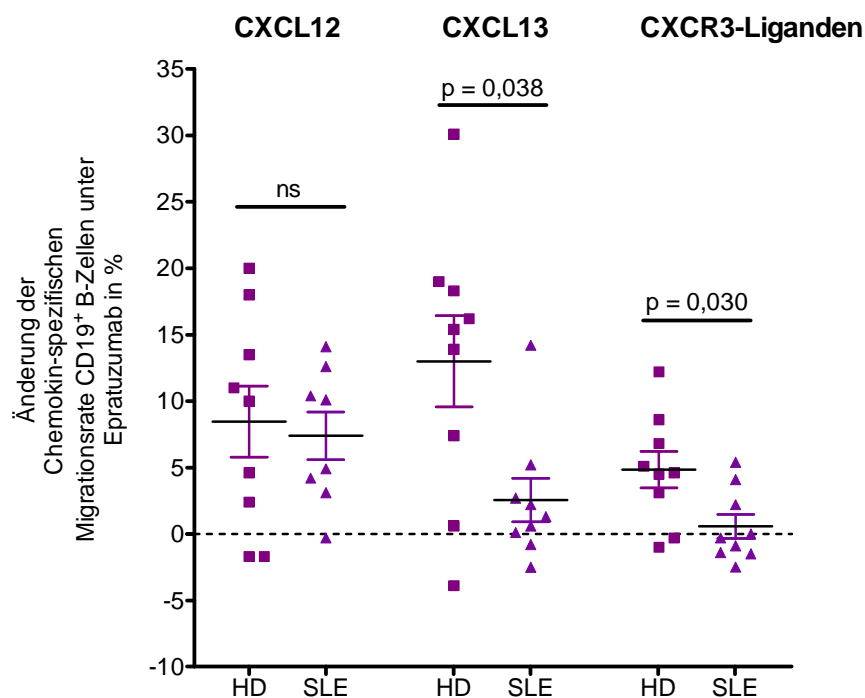


Abbildung 3-22 Änderung der Chemokin-spezifischen Migrationsrate CD19⁺ B-Zellen gesunder Probanden (HD) im Vergleich zu SLE-Patienten (SLE) durch Epratuzumab-Inkubation. Gegenüber den Chemokinen CXCL12, CXCL13 und den kombinierten CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10, CXCL11 (Mann-Whitney-Test; N=9).

CXCL12

In beiden Versuchsgruppen war durch Epratuzumab-Inkubation gegenüber einem CXCL12-Gradienten ein deutlicher Anstieg der Migrationsfrequenzen in erster Linie in der CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Zell-Populationen nachweisbar. Der Vergleich des Effektes von Epratuzumab auf die CXCL12-spezifischen Migrationsfrequenzen der anhand von CD27⁻ und IgD-Expression differenzierten B-Zell-Subpopulationen von Gesunden und Kranken zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p>0,05$ Mann-Whitney-Test, N=9) (Tabelle 3-2).

CXCL13

Der Vergleich der CD19⁺ B-Zellen (Abbildung 3-22) wies einen bedeutenden Unterschied des Effekts von Epratuzumab auf die Migrationsfrequenzen gegenüber CXCL13 auf. Anschließend wurden die einzelnen B-Zell-Subpopulationen miteinander verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass alle B-Zell-Populationen gesunder Probanden einen größeren Zuwachs der Migrationsrate unter Epratuzumab zeigten. Diese Zunahme war bei den CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Zellen gesunder Probanden mit durchschnittlich 16% ($\pm 11\%$) signifikant höher als bei SLE-Patienten (5% ($\pm 7\%$)) ($p=0,032$). Des Weiteren zeigten die CD27⁺ IgD⁻ Memory-B-Zellen einen signifikanten Unterschied ($p=0,032$). Während es hier bei den Gesunden durchschnittlich zu einer leichten Erhöhung der Migrationsfrequenz (6% $\pm 9\%$) kam, wurde bei SLE-Patienten erstaunlicherweise im Mittel sogar eine leichte Verminderung festgestellt (-1% $\pm 2\%$). In den Kompartimenten der CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen und der CD27⁺ IgD⁺ nicht klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen zeigte sich bei gesunden Probanden ein etwas höherer Migrationszuwachs, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p>0,05$) (Abbildung 3-23, Tabelle 3-2).

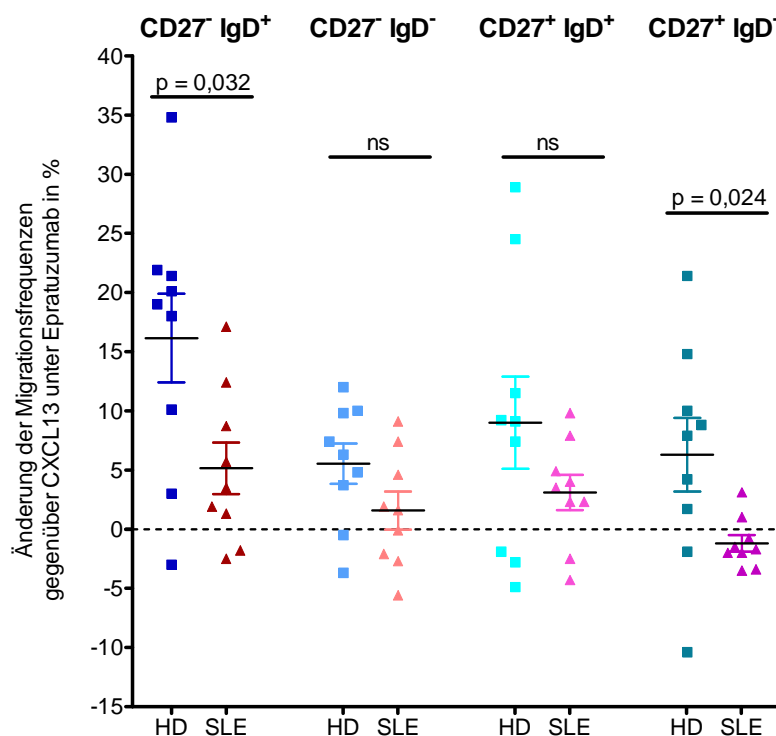


Abbildung 3-23

Änderung der CXCL13-spezifischen Migrationsrate der B-Zell-Subpopulationen gesunder Probanden (HD) im Vergleich zu SLE-Patienten (SLE) durch Epratuzumab-Inkubation (Mann-Whitney-Test; N=9). Folgende Subpopulationen wurden verglichen: CD27⁻ IgD⁺ naive B-Zellen, CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen, CD27⁺ IgD⁺ nicht klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen und CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen.

CXCR3-Liganden

Epratuzumab bewirkte gegenüber den CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 eine signifikant höhere Migrationszunahme der CD19⁺ B-Zellen gesunder Probanden als vergleichsweise bei SLE-Patienten. Nachfolgend wurden die vier differenzierten Subpopulationen von gesunden Probanden und SLE-Patienten hinsichtlich des Effektes von Epratuzumab auf die Migration verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass in der CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Zell-Population ein signifikanter Unterschied besteht ($p=0,014$). Hier kam es bei gesunden Probanden durch Epratuzumab zu einer Migrationszunahme von 6% ($\pm 4\%$), während diese Steigerung bei SLE-Patienten mit 0% ($\pm 3\%$) nicht vorhanden war. Bei Betrachtung der anderen B-Zell-Populationen war zu erkennen, dass die B-Lymphozyten der Patienten insgesamt keine Änderung der Migrationsfrequenz durch die Epratuzumab-Inkubation zeigten. Im Gegensatz dazu ließen in den Proben der Gesunden die Kompartimente der CD27⁺ B-Zellen einen leichten Zuwachs erkennen (CD27⁺ IgD⁺ 5% bzw. CD27⁺ IgD⁻ 4%). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zu den Proben der SLE-Patienten festgestellt werden ($p>0,05$) (Abbildung 3-24, Tabelle 3-2).

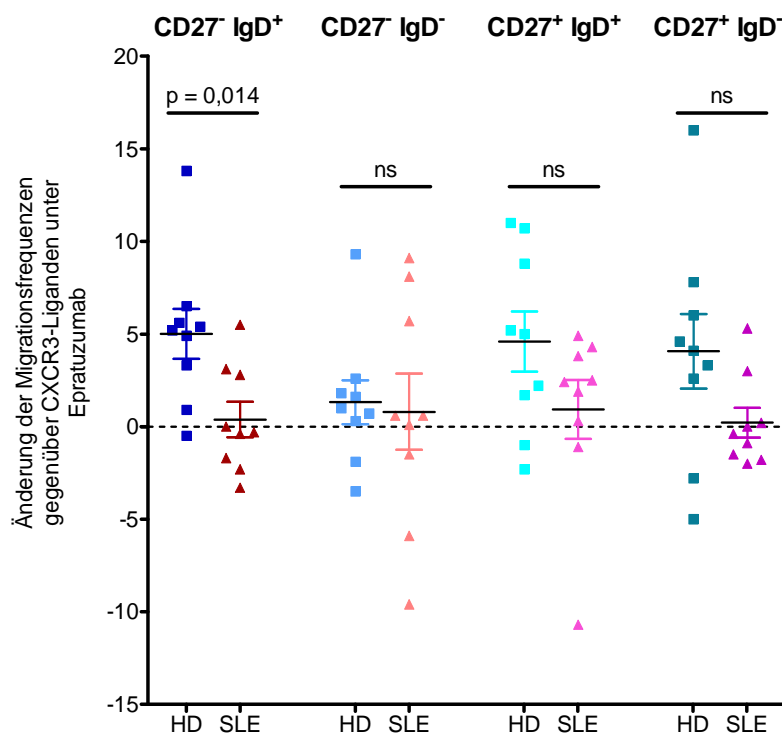


Abbildung 3-24

Durch Epratuzumab bewirkte Änderung der CXCR3-Liganden-spezifischen Migrationsrate der B-Zell-Subpopulationen gesunder Probanden (HD) im Vergleich zu SLE-Patienten (SLE) (Mann-Whitney-Test; N=9). Folgende Subpopulationen wurden verglichen: CD27⁻ IgD⁺ naive B-Zellen, CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen, CD27⁺ IgD⁺ nicht klassengewechselte B-Zellen und CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen.

Tabelle 3-2 Vergleich gesunder Probanden und SLE-Patienten hinsichtlich der Änderung der spontanen bzw. Chemokin-spezifischen Migrationsfrequenzen der differenzierten B-Zell-Populationen unter Epratuzumab (Mann-Whitney-Tests).

	Zell-Population	Migrationsfrequenzänderung unter CD22 Ligation mit Epratuzumab
Spontane Migration	CD19 ⁺ B-Zellen	p > 0,05
	CD27 ⁻ IgD ⁺ B-Zellen	p > 0,05
	CD27 ⁻ IgD ⁻ B-Zellen	p > 0,05
	CD27 ⁺ IgD ⁺ B-Zellen	p > 0,05
	CD27 ⁺ IgD ⁻ B-Zellen	p > 0,05
CXCL12-spezifische Migration	CD19 ⁺ B-Zellen	p > 0,05
	CD27 ⁻ IgD ⁺ B-Zellen	p > 0,05
	CD27 ⁻ IgD ⁻ B-Zellen	p > 0,05
	CD27 ⁺ IgD ⁺ B-Zellen	p > 0,05
	CD27 ⁺ IgD ⁻ B-Zellen	p > 0,05
CXCL13-spezifische Migration	CD19 ⁺ B-Zellen	p = 0,038 HD 13% (±10%), SLE 3% (±5%)
	CD27 ⁻ IgD ⁺ B-Zellen	p = 0,032 HD 16% (±11%), SLE 5% (±7%)
	CD27 ⁻ IgD ⁻ B-Zellen	p > 0,05
	CD27 ⁺ IgD ⁺ B-Zellen	p > 0,05
	CD27 ⁺ IgD ⁻ B-Zellen	p = 0,024 HD 6% (±9%), SLE -1% (±2%)
CXCR3-Liganden-spezifische Migration	CD19 ⁺ B-Zellen	p = 0,030 HD 5% (±4%), SLE 1% (±3%)
	CD27 ⁻ IgD ⁺ B-Zellen	p = 0,014 HD 5% (±4%), SLE 0% (±3%)
	CD27 ⁻ IgD ⁻ B-Zellen	p > 0,05
	CD27 ⁺ IgD ⁺ B-Zellen	p > 0,05
	CD27 ⁺ IgD ⁻ B-Zellen	p > 0,05

Die Steigerung der spontanen Migrationsfrequenz aller B-Zell-Populationen nach Bindung des Anti-CD22-Antikörpers zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den B-Zellen gesunder Probanden und SLE-Patienten. Ebenso unterschied sich die CXCL12-spezifische Migrationszunahme unter Epratuzumab in den B-Zell-Populationen beider Gruppen nicht signifikant. Gegenüber CXCL13 war nur eine Zunahme der Migrationsfrequenz bei B-Zellen gesunder Probanden zu sehen. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied, welcher lediglich die CD27⁻ IgD⁺ und die CD27⁺ IgD⁻ Populationen betraf. Das heißt die naiven und die klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen gesunder Probanden zeigten unter Epratuzumab einen deutlich höheren Zuwachs der CXCL13-spezifischen Migrationsfrequenz als die der SLE-Patienten. Gegenüber den CXCR3-Liganden kam es nur in den Proben gesunder Probanden zu einem signifikanten Migrationsanstieg unter Epratuzumab. Diese Zunahme war signifikant höher als die der B-Lymphozyten von SLE-Patienten, wobei bei differenzierter Betrachtung nur die CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Zellen gesunder Probanden eine signifikant höhere Steigerung der Migrationsfrequenz durch die Epratuzumab-Inkubation aufwiesen.

4. Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen belegen, dass der CD22-Antikörper Epratuzumab *in vitro* sowohl die Expression der Adhäsionsmoleküle CD62L und β_7 -Integrin auf der B-Zell-Oberfläche als auch die Migration entlang definierter Chemokin-Gradienten beeinflusst.

Epratuzumab bewirkte sowohl bei Gesunden als auch bei SLE-Patienten eine signifikante Reduktion beider Adhäsionsmoleküle, welche in erster Linie die Population der CD27⁻ B-Lymphozyten betraf. Diese hatte zugleich eine höhere CD22-Expression. Des Weiteren konnte ebenfalls in beiden Gruppen eine signifikante Steigerung der spontanen Chemokin-unabhängigen Migration aller B-Zell-Subpopulationen beobachtet werden. Die Zunahme der Chemokin-spezifischen Migration durch Epratuzumab unterschied sich jedoch in den Probandengruppen. Während bei gesunden Probanden eine Steigerung der Migrationsfrequenz gegenüber allen Chemokinen (CXCL12, CXCL13, CXCR3-Liganden) durch Epratuzumab nachgewiesen werden konnte, zeigten die B-Zellen der SLE-Patienten nur eine erhöhte Migrationsrate gegenüber CXCL12. In jedem Fall waren jedoch vorrangig die naiven CD27⁻ IgD⁺ B-Zellen betroffen, die zugleich die effizienteste Epratuzumab-Bindung aufwiesen. Dies unterstützt die These, dass die beobachteten Effekte auf einer direkten Wirkung des Anti-CD22-Antikörpers Epratuzumab mit zunehmender bzw. hoher Bindung, wie sie für CD27⁻ bzw. CD27⁻ IgD⁺ B-Zellen belegt werden konnte, beruhen.

Der Vergleich der Effekte Epratuzumabs auf die B-Zellen gesunder Probanden und SLE-Patienten konnte eine signifikant höhere Reduktion der β_7 -Integrin-Expression auf B-Zellen von gesunden Probanden verzeichnen, während sich der Effekt auf die CD62L-Expression in den beiden Gruppen nicht unterschied.

Auch die Auswirkung auf die spontane Migration der B-Zellen und die CXCL12-spezifische Migration kann in beiden Probandengruppen als vergleichbar angesehen werden. Die Chemokin-spezifische Migration gegenüber CXCL13 und den CXCR3-Liganden zeigte hingegen Unterschiede. Die B-Zellen gesunder Probanden zeigten hier unter Epratuzumab eine deutlich höhere Migrationszunahme gegenüber diesen Chemokingradienten, während die B-Zellen von SLE-Patienten keine signifikante Veränderung beobachten ließen.

4.1. Nachweis erniedrigter Lymphozytenzahlen bei SLE-Patienten

In der durchflusszytometrischen Analyse konnte eine signifikant geringere Anzahl an B-Zellen in den Blutproben von SLE-Patienten im Vergleich zu Kontrollen gesunder Probanden nachgewiesen werden (Abbildung 3-1). Dieses Ergebnis bestätigte die für diese Krankheit beschriebene Lymphopenie, welche neben den T-Zellen auch die Population der B-Lymphozyten betrifft [12;95]. Damit können die hier analysierten SLE-Patienten als repräsentativ für Patienten mit dieser Erkrankung betrachtet werden und ihre Ergebnisse somit vergleichend den Analyseergebnissen der B-Zellen gesunder Probanden gegenübergestellt werden. Des Weiteren ist die hier belegte Lymphopenie ein Ausdruck der im SLE deutlich veränderten Immunhomöostase.

4.2. Nachweis der CD22-Oberflächenexpression und der spezifischen Bindung von Epratuzumab

Die CD22-Expression auf der Zelloberfläche und die spezifische Bindung von Epratuzumab sind die Grundvoraussetzungen für die CD22-vermittelte Wirkung dieses Therapie-Antikörpers und wurden aus diesem Grund initial untersucht.

4.2.1. CD22-Expression auf B-Zellen

Die Untersuchung der CD22-Expression auf PBMCs durch den Anti-CD22-Antikörper (Klon S-HCL-1) und FACS-Analyse bestätigten die B-Zell-spezifische Expression dieses Oberflächenmoleküls [78;96]. Das konnte sowohl bei gesunden Probanden (Abbildung 3-2) als auch bei SLE-Patienten gezeigt werden. Somit wurden B-Zellen als spezifische Ziel-Zellpopulation der Behandlung mit Epratuzumab bestätigt.

4.2.2. Spezifische Bindung des Anti-CD22-Antikörpers Epratuzumab

Die spezifische Bindung von Epratuzumab wurde durch Färbungen der PBMCs mit markiertem Epratuzumab, mit einem Anti-CD22-Antikörper (S-HCL-1) als Positivkontrolle sowie einem IgG₁-Antikörper als Isotypkontrolle überprüft. Ein mit der Positivkontrolle vergleichbares Signal nach Epratuzumab-Bindung und ein fehlendes Signal in der Negativkontrolle bestätigten die CD22-Spezifität von Epratuzumab

(Abbildung 3-3). Die unwesentlich geringere Signalstärke des markierten Epratuzumabs im Vergleich zur Positivkontrolle kann auf die Kopplung der Anti-CD22-Antikörper an unterschiedliche Mengen des Farbstoffes PE oder eine abweichende Affinität der Antikörper gegenüber CD22 zurückzuführen sein. Ein weiterer Grund könnte die Bindung an verschiedene Epitope des CD22-Moleküls sein. Der Anti-CD22-Antikörper Klon S-HCL-1 bindet an die erste Ig-Domäne des CD22-Moleküls [74], während Epratuzumab an die dritte Ig-Domäne und damit an eine Nicht-Liganden-Bindungs-Domäne bindet [87;93]. Diese könnte dem markierten Epratuzumab somit schwieriger zugänglich sein, was in einer etwas geringeren Bindungskapazität resultieren könnte.

4.2.3. Spezifische Bindung Epratuzumabs auf verschiedenen B-Zell-Subpopulationen

Da das CD22-Molekül im Rahmen der B-Zell-Reifung unterschiedlich stark exprimiert wird [78;79], wurde die Bindung Epratuzumabs auf der Oberfläche verschiedener B-Zell-Subpopulationen separat analysiert. Die B-Lymphozyten wurden anhand ihrer CD27-Expression in CD27⁻ B-Zellen, die vornehmlich aus naiven, transitionalen und wenigen aberranten Gedächtnis-B-Zellen bestehen, und CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen differenziert [25]. Es konnte bei gesunden Probanden und bei SLE-Patienten eine deutlich höhere Bindungskapazität Epratuzumabs auf CD27⁻ B-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3-4, Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6). Demzufolge weisen diese Zellen eine höhere CD22-Expression auf ihrer Oberfläche auf. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Untersuchung von 12 SLE-Patienten im Rahmen einer offenen, klinischen Studie vor Therapiebeginn mit Epratuzumab überein [1]. Auf molekularer Ebene konnte dies außerdem für gesunde Probanden bestätigt werden. Dabei wurde eine stärkere CD22 mRNA-Expression bei CD27⁻ B-Zellen im Vergleich zu CD27⁺ B-Zellen festgestellt (Platform ID: GPL570, accession no. [GEO:GSE17186]; Human B cell subsets) [94].

Die heterogene Zusammensetzung der CD27⁻ B-Zell-Population wird seit geraumer Zeit intensiv diskutiert. Vor Kurzem konnte gezeigt werden, dass CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen von SLE-Patienten und gesunden Probanden genotypische, phänotypische und funktionelle Eigenschaften von Gedächtnis-B-Zellen aufweisen [13;15]. Außerdem wurde bei Lupus-Patienten eine Assoziation der CD27⁻ IgD⁻ B-Zell-Frequenz mit der Krankheitsaktivität und einer renaler Organbeteiligung festgestellt [13;97]. Aus diesen

Gründen wurden die CD27⁻ und die CD27⁺ Subpopulationen folgend anhand ihrer IgD-Expression in je zwei weitere B-Zell-Populationen differenziert, um anschließend eine detailliertere Analyse der Epratuzumab-Bindungskapazität und damit der CD22-Expression auf diesen Subpopulationen durchzuführen. Die Gruppe der naiven CD27⁻ IgD⁺ B-Zellen zeigte sowohl bei Gesunden als auch bei SLE-Patienten die ausgeprägteste Epratuzumab-Bindung, während die CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen die jeweils geringste Bindung aufwiesen. Gesunde Probanden wiesen innerhalb der beiden CD27⁻ und der beiden CD27⁺ Subpopulationen keine signifikanten Unterschiede auf. Bei SLE-Patienten zeigten jeweils die IgD⁺ B-Zellen eine signifikant höhere Epratuzumab-Bindung als die zugehörigen IgD⁻ Subpopulationen. In der Literatur ist bisher beschrieben worden, dass die höchste CD22-Expression auf reifen, naiven B-Zellen nachgewiesen werden kann [78;79]. Da diese vor dem ersten Ag-Kontakt IgD-Moleküle (bzw. IgD und IgM) jedoch keine CD27-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, stimmen die Ergebnisse der FACS-Analyse hier mit dieser Aussage überein. Mit voranschreitender Reifung der B-Zelle, u. A. zur CD27-exprimierenden Gedächtnis-B-Zelle, nimmt die CD22-Expression ab [78;79]. Auch das spiegelt sich in den Ergebnissen unserer FACS-Analysen nach Epratuzumab-Bindung mit geringeren Signalintensitäten in den CD27-exprimierenden Zellpopulationen wieder. Die CD27⁺ IgD⁺ Zellen stellen dabei noch nicht klassengewechselte Gedächtniszellen dar, während die CD27⁺ IgD⁻ Zellen zu den reiferen, klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen gehören [25]. Die geringere Epratuzumab-Bindung auf CD27⁺ IgD⁻ Zellen stützt somit ebenfalls die Hypothese der abnehmenden CD22-Expression mit zunehmender Reifung zu Gedächtnis-B-Zellen bzw. Ag-Erfahrung mit folgendem Klassenwechsel. Die Population der CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen weisen in den hier durchgeführten FACS-Analysen eine vergleichsweise ähnlich hohe Epratuzumab-Bindung zu den nicht klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen (CD27⁺ IgD⁺) auf. Dieses Ergebnis stützt die kürzliche Klassifizierung der CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen als Gedächtnis-B-Zellen [13;15].

4.3. Reduktion der CD62L und β_7 -Integrin Expression auf B-Zellen nach Inkubation mit Epratuzumab

Adhäsionsmoleküle wie CD62L und β_7 -Integrin beeinflussen das Wanderungsverhalten von Immunzellen wie den B-Lymphozyten. Um zu untersuchen, ob es unter Epratuzumab zu einer veränderten Expression der Adhäsionsmoleküle auf B-Lymphozyten kommt, welche ein verändertes Wanderungsverhalten der B-Zellen nach sich ziehen könnten, wurden diese beiden Oberflächenmoleküle analysiert.

4.3.1. CD62L

CD62L ist am Zellwanderungsverhalten von B-Zellen in periphere lymphatische Gewebe via HEV (*high endothelial venules*) und in entzündliches Gewebe beteiligt [41-43]. *In vitro* konnte unter Epratuzumab eine signifikante Reduktion des CD62L-Oberflächenmoleküls auf CD27⁻ B-Zellen sowohl von gesunden Probanden als auch von SLE-Patienten festgestellt werden, während in der CD27⁺ B-Zell-Population kein Effekt durch Epratuzumab erkennbar war (Abbildung 3-7 und Abbildung 3-8).

Die Frequenz der CD62L-exprimierenden Zellen bei CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen des peripheren Blutes war sowohl bei gesunden Probanden als auch bei SLE-Patienten unabhängig von Epratuzumab geringer als bei den jeweiligen CD27⁻ B-Zellen (Abbildung 3-7 und Abbildung 3-8). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung kann die Abscherung von CD62L (sog. *shedding*) als Reaktion auf eine Lymphozyten-Aktivierung [41] im Rahmen des Reifungsprozesses darstellen. Insgesamt könnte die Ausgangssituation der geringeren CD62L-Expression auf CD27⁺ B-Zellen zur Folge haben, dass Epratuzumab auf diesen Zellen keine weitere Reduktion bewirken kann. Außerdem zeigt Epratuzumab eine signifikant geringere Bindung auf CD27⁺ B-Zellen (Abbildung 3-4), so dass ein schwächerer Effekt von Epratuzumab auf diese B-Zell-Population auch auf einer geringeren CD22-Moleküldichte beruhen könnte.

Da CD62L im Rahmen des Migrationsprozesses durch die Vermittlung der ersten Adhäsion zu einer Verlangsamung der im Blutstrom befindlichen Zellen dient, ist es als essentieller Faktor zur Initiierung der leukozytären Migration in lymphatische Organe und entzündete Gewebe zu verstehen [40]. Die beobachtete Reduktion der CD62L-Expression auf CD27⁻ B-Zellen könnte somit *in vivo* eine Störung des *rollings* der Zellen am Endothel der Blutgefäße und somit die Emigration der Zellen in die bzw. aus der Blutzirkulation erschweren. In Untersuchungen von CD62L-defizienten Mäusen wurde

eine bedeutsame Inhibierung der Lymphozyten-Rekrutierung in Entzündungsherde nachgewiesen. Die Rekrutierung in die Milz war jedoch erhöht [98;99]. Die durch Epratuzumab implizierte Reduktion der CD62L-Expression könnte somit einen erhöhten Verbleib der Zellen in der Milz zur Folge haben, was eine möglich Erklärung für die klinisch beobachtete verminderte B-Zell-Konzentration im Blut wäre und durch eine reduzierte Einwanderung in entzündetes Gewebe außerdem zur Reduktion der Krankheitsaktivität beitragen könnte. Bei Untersuchungen von B-Zell-Lymphom-Zellen wurde jedoch eine reduzierte CD62L-Expression in Zusammenhang mit einer erhöhten Anzahl von Lymphozyten in der Zirkulation gebracht [100]. Dies könnte durch die prinzipiell höhere B-Zell-Proliferation dieser Erkrankung oder aber durch die insgesamt reduzierte Zellemigration aus dem Blutstrom bedingt sein, was den Einfluss weiterer Faktoren auf die CD62L-vermittelte Adhäsion mit folgender Migration impliziert.

Die biologischen Konsequenzen einer reduzierten CD62L-Expression auf der Zelloberfläche humaner B-Zellen wurde *in vivo* noch nicht explizit untersucht. Dennoch deuten bisherige Erkenntnisse daraufhin, dass eine Reduktion der CD62L-Expression auf B-Zellen potentiell reduzierend auf die Induktion als auch auf die Unterhaltung einer Entzündungsreaktion wirkt.

4.3.2. β_7 -Integrin

β_7 -Integrin initiiert das Zellwanderungsverhalten von B-Zellen vor allem in mukosale Immungewebe und spielt außerdem eine Rolle in der Migration in entzündliche Gewebe [44;45]. Auch bei diesem Adhäsionsmolekül konnte *in vitro* durch Epratuzumab eine bedeutsame Reduktion der β_7 -Integrin-Expression auf der Oberfläche von CD27⁻ B-Lymphozyten von gesunden Versuchspersonen und SLE-Patienten beobachtet werden. Erneut zeigte das Kompartiment der CD27⁺ B-Zellen beider Versuchsgruppen keine signifikanten Veränderungen durch Epratuzumab (Abbildung 3-9 und Abbildung 3-10).

Die β_7 -Integrin-Expression auf CD27⁺ B-Zellen sowohl bei Gesunden als auch bei Patienten ist bereits ohne Epratuzumab-Einwirkung geringer als auf den CD27⁻ B-Lymphozyten (Abbildung 3-9 und Abbildung 3-10), was eine mögliche Erklärung für den nicht signifikanten Effekt von Epratuzumab auf die CD27⁺ B-Zellen sein könnte. Eine zweite mögliche Ursache wäre wiederum die bereits im vorherigen Kapitel beschriebene geringere Epratuzumab-Bindung auf CD27⁺ B-Zellen (Abbildung 3-4), welche einen geringeren Effekt zur Folge haben könnte.

Da β_7 -Integrin neben der Migration im GIT außerdem in die Migration in entzündliche Gewebe involviert ist [44], kann spekuliert werden, dass eine reduzierte β_7 -Integrin-Expression eine verminderte Rekrutierung der Lymphozyten in entzündlichen Läsionen und in die lymphatischen Gewebe des GIT zur Folge hat. In β_7 -Integrin-defizienten Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass die Bildung des GALT (*gut-associated lymphoid tissue*) hier stark vermindert ist [44]. Des Weiteren zeigten Neri et. al in *In vivo*-Experimenten für β_7 -Integrin-negative Multiples-Myelom-Zellen ein signifikant längeres Vorhandensein in der Zirkulation, was am ehesten einer reduzierten Adhäsion und nachfolgend reduzierter Migration in die lymphatischen Organe geschuldet ist [101]. Dies würde die Annahme einer reduzierten Lymphozyten-Rekrutierung durch eine geringere β_7 -Integrin-Expression stützen, wodurch sowohl die Reifung weiterer autoreaktiver B-Zellen als die Unterhaltung der Entzündungsreaktion verringert sein könnte. Die reduzierte β_7 -Integrin-Expression würde jedoch nicht die klinisch unter Epratuzumab beobachteten reduzierten CD27⁺ B-Zellen erklären, so dass das Zusammenspiel verschiedener am Migrationsprozess beteiligter Faktoren zu vermuten ist. Für genauere Aussagen bzgl. der Konsequenzen der reduzierten β_7 -Integrin-Expression auf B-Zellen von gesunden Probanden und Lupus-Patienten sollten weitere gezielte Untersuchungen durchgeführt werden.

4.3.3. Zusammenfassung

Insgesamt betraf die Reduktion der beiden Adhäsionsmoleküle CD62L und β_7 -Integrin durch Epratuzumab in erster Linie die CD27⁺ B-Lymphozyten. Gemeinsam mit der nachgewiesenen signifikant höheren Epratuzumab-Bindung auf der Zelloberfläche der CD27⁺ B-Zellen spricht dies für einen spezifischen Effekt von Epratuzumab in Abhängigkeit vom Ausmaß der Bindung. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass Epratuzumab grundsätzlich eine Reduktion der Adhäsionsmolekül-Expression auf B-Zellen bewirken kann, was jedoch im Widerspruch steht zu der ebenfalls unter Epratuzumab auf B-Zellen von SLE-Patienten beschriebenen Expressionszunahme von β_1 -Integrin [94]. Damit ergibt sich die Frage, ob die Regulation der Adhäsionsmoleküle CD62L und β_7 -Integrin bzw. die Wirkung von Epratuzumab auf deren Expression intrazellulär gekoppelt sein könnte. Dies sollte in weiterführenden Experimenten mit Hinblick auf die CD22-Rezeptor-vermittelten Signalkaskaden untersucht werden.

4.4. Steigerung der Migrationsfrequenzen von B-Zell-Subpopulationen unter Epratuzumab

Zur Betrachtung der Effekte von Epratuzumab auf funktionelle Eigenschaften der B-Zellen wurden *In vitro*-Transmigrationsexperimente durchgeführt. Hierbei konnte bereits eine erhöhte chemokin-unabhängige spontane Migration über Fibronectin-beschichtete Membranen festgestellt werden, welche zu gleichen Maßen bei allen B-Zell-Subpopulationen gesunder Probanden und SLE-Patienten zu sehen war. Die chemokin-spezifischen Migrationsänderungen unter Epratuzumab waren jedoch bei den beiden Versuchsgruppen sehr unterschiedlich. Während die B-Zellen gesunder Probanden eine erhöhte Migrationsfrequenz gegenüber CXCL12, CXCL13 und den CXCR3-Liganden (CXCL9, CXCL10, CXCL11) aufwiesen, zeigten die B-Zellen der Patienten nur eine signifikante Migrationssteigerung gegenüber CXCL12. Die separate Analyse der Subpopulationen zeigte außerdem, dass die größte Migrationszunahme jeweils im Kompartiment der CD27⁻ IgD⁺ B-Lymphozyten zu verzeichnen war. Dies stand in Übereinstimmung mit der erhöhten CD22-Expression als auch mit den Veränderungen der Adhäsionsmoleküle CD62L und β_7 -Integrin auf der CD27⁻ B-Zell-Population und unterstützt eine Abhängigkeit der Effekte vom CD22-Expressionsprofil.

4.4.1. Steigerung der spontanen Migrationsfrequenz

Die B-Lymphozyten sowohl von gesunden Spendern als auch von SLE-Patienten reagierten *in vitro* auf Epratuzumab mit einer deutlich erhöhten chemokin-unabhängigen Transmigration über eine Fibronectin-beschichtete poröse Membran (Abbildung 3-11, Abbildung 3-12 und Abbildung 3-13). Da dies bei allen B-Zell-Subpopulationen beobachtet werden konnte, lässt sich vermuten, dass es sich um einen generellen Effekt der Epratuzumab-Bindung handelt, welcher nicht von der Quantität des gebundenen Epratuzumab bzw. dem Level der CD22-Expression abhängig zu sein scheint.

Als mögliche Ursache für die Migrationssteigerung unter Epratuzumab könnte eine erhöhte Zelloberflächen-Expression des Adhäsionsmoleküls β_1 -Integrin, eines Rezeptors des Fibronectins, spekuliert werden. Eine solche konnte für SLE-Patienten bereits nachgewiesen werden [94]. Eine temporäre Hochregulation des β_1 -Integrins wurde außerdem bereits im Zusammenhang mit einer Reduktion der CD62L-Expression

beschrieben, was mit den hier vorangegangenen Ergebnissen konform ist [41], was jedoch in erster Linie lediglich die Migrationszunahme der CD27⁻ B-Zellen erklären würde. Neben einer veränderten Expression von Adhäsionsmolekülen, wäre auch ein Einfluss der Epratuzumab-Bindung auf intrazelluläre Signalkaskaden, mit Einfluss auf die Aktin-Polymerisation, als Ursache der erhöhten Migration denkbar. Die Regulation von am Migrationsprozess beteiligten Filamenten über phosphorylierte Kinasen ist für Neutrophile bereits kürzlich nachgewiesen worden [102]. Obwohl CD22 in erster Linie als inhibitorischer Ko-Rezeptor des BCRs bekannt ist, konnten ebenso zytoplasmatische ITAM-Anteile sowie die Rekrutierung aktivierender Zellsignale und Enzyme wie der Phosphoinositol-3 Kinase nachgewiesen werden [77]. Die Phosphoinositol-3 Kinase spielt, unter Anderem vermittelt über RAC1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) eine wichtige Rolle in der Regulierung der Aktin-Polymerisierung und der Zellmigration [103;104]. Dieses Enzym könnte somit eine Schlüsselposition und eine mögliche Verbindung der CD22-vermittelten intrazellulären Signalkaskade und der *in vitro* beobachteten Veränderung der Zellmotilität im Rahmen der Migration darstellen. Die experimentelle Überprüfung dieser Idee sollte durch weiterführende Untersuchungen auf molekularer Ebene erfolgen.

4.4.2. Steigerung der Chemokin-spezifischen Migrationsfrequenz

Wie in Abbildung 3-14 erkennbar, bewirkt Epratuzumab unterschiedliche Veränderungen der chemokin-spezifischen Migrationsfrequenzen CD19⁺ B-Zellen von gesunden Versuchspersonen als auch SLE-Patienten. Während bei den CD19⁺ B-Zellen gesunder Probanden eine signifikante Migrationssteigerung gegenüber CXCL12, CXCL13 und den CXCR3-Liganden (CXCL9, CXCL10, CXCL11) beobachtet werden konnte, zeigten die CD19⁺ B-Lymphozyten der SLE-Patienten lediglich eine signifikante Migrationszunahme gegenüber CXCL12. Im Weiteren wurden die CD27^{-/+} und IgD^{-/+} B-Zell-Subpopulationen separat hinsichtlich der Migrationsveränderung durch Epratuzumab analysiert, wobei festgestellt werden konnte, dass der größte Effekt von Epratuzumab jeweils auf das Kompartiment der CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Lymphozyten zu beobachten war. Somit konnte auch durch diese Subanalyse eine präferentielle Wirkung von Epratuzumab auf naive, transitionale und wenige aberrante Gedächtnis-B-Zellen in Übereinstimmung mit den obigen Ergebnissen zu CD27⁻ B-Zellen dokumentiert werden.

CXCL12

Bei gesunden Probanden kam es gegenüber CXCL12 durch Epratuzumab nur im Kompartiment der CD27⁻ IgD⁺ B-Zellen zu einer signifikanten Migrationssteigerung, während bei den SLE-Patienten sowohl die CD27⁻ IgD⁺ als auch die CD27⁻ IgD⁻ B-Lymphozyten betroffen waren (Abbildung 3-15 und Abbildung 3-16).

CXCL12 gilt als homöostatisches Chemokin und wurde in lymphatischen Organen, wie beispielsweise der Milz bzw. dem Knochenmark, nachgewiesen [32;105]. *In vitro* zeigt die Mehrheit aller B-Zellen gesunder Probanden eine hohe Expression des CXCL12-bindenden Chemokin-Rezeptors CXCR4 [39], wobei eine signifikant höhere CXCR4-Expression auf CD27⁻ B-Zellen im Vergleich zu CD27⁺ B-Zellen nachgewiesen werden konnte [106]. Dies wäre ein möglicherweise beeinflussender Faktor für die hier *in vitro* beobachtete Migrationssteigerung der CD27⁻ aber nicht der CD27⁺ B-Zellen nach Epratuzumab-Inkubation. Da Epratuzumab außerdem vornehmlich auf CD27⁻ B-Zellen bindet (Abbildung 3-4), könnte die erhöhte Migration dieser Zellpopulation ebenfalls durch einen ausgeprägteren Effekt des Therapie-Antikörpers auf diese Zellen bedingt sein oder auf einem Synergismus des CXCR4-Expressionsprofils und der Menge der gebundenen Epratuzumab-Moleküle beruhen.

CXCL12 wird neben der Milz auch im Knochenmark produziert, wo es zum Einen eine kritische Rolle bei der Retention von Vorläufer-Lymphozyten spielt und zum Anderen Antikörper-sezernierende Plasmazellen aus der Peripherie anlockt [105;107]. Wenn diese Attraktion bzw. Retention ebenfalls auf CD27⁻ B-Zellen von Lupus-Patienten wirkt, könnte es so unter Epratuzumab zur Navigation dieser Zellen in das Knochenmark kommen. Diese zweite Hypothese spekuliert damit, dass die CD27⁻ B-Zellen von Lupus-Patienten so nicht mehr in der Lage sind in sekundären lymphatischen Organen vollkommen zu differenzieren, womit möglicherweise die Anzahl neu entstehender autoreaktiver B-Zellen verringert wird und so die Stärke bzw. Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion reduziert werden könnte.

CD27⁻ IgD⁻ B-Lymphozyten stellen bei SLE-Patienten im Vergleich zu Gesunden einen expandierten Teil innerhalb der B-Zell-Population im peripheren Blut dar und zeigen eine Korrelation mit erhöhten Auto-Antikörper-Titern und Nierenbeteiligung [13]. Die Entstehung dieser aberranten Gedächtnis-B-Zellen und ihre genaue Funktion sind noch ungeklärt [13], ihnen wird jedoch bereits eine wichtige Rolle in der Pathologie des SLE zugeschrieben. In diesem Zusammenhang könnte eine erhöhte Migration dieser Subpopulation gegenüber CXCL12 zu einer geringeren Frequenz dieser Zellen in der

Blutzirkulation führen und somit mit einer geringeren Krankheitsaktivität und einer Verbesserung der Lupus-Nephritis einhergehen. Dies sollte allerdings in klinischen Studien gezielt analysiert werden.

Ob der migrationssteigernde Effekt von Epratuzumab auf CD27⁻ Zellen durch eine Hochregulation des CXCR4 vermittelt wird und diese Migrationszunahme auch *in vivo* auftritt, ist bisher noch ungeklärt. In jedem Fall würde eine durch CXCL12-vermittelte erhöhte Emigration der CD27⁻ B-Zellen aus der peripheren Blutzirkulation, die reduzierte Anzahl der CD27⁻ B-Zellen im peripheren Blut von SLE-Patienten nach Epratuzumab-Therapie [1] erklären. Das Ziel dieser Emigration bleibt somit bis auf weiteres spekulativ und sollte in folgenden *In vivo*-Experimenten oder durch Gewebeproben von Patienten unter Epratuzumab-Therapie untersucht werden.

CXCL13

In den durchgeführten *In vitro*-Migrationsexperimenten kam es unter Epratuzumab gegenüber einem CXCL13-Chemokingradient zu einer Migrationssteigerung der B-Zellen von gesunden Probanden, während die B-Zellen von SLE-Patienten unbeeinflusst blieben. Dabei konnte der größte Effekt auf die CD27⁻ IgD⁺ B-Zellen und eine ebenfalls bedeutsame Migrationszunahme in der Population der CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen gesunder Probanden beobachtet werden (Abbildung 3-17 und Abbildung 3-18).

CXCL13 ist ein weiteres Chemokin, welches in B-Zellzonen der Lymphfollikel in sekundär lymphatischen Organen exprimiert wird [32] und somit für naive B-Zellen für das Durchlaufen einer Keimzentrumreaktion eine wichtige Rolle spielt. Die Mehrheit aller B-Lymphozyten exprimiert den Chemokin-Rezeptor CXCR5, wobei mit fortschreitender Differenzierung eine Reduktion der Fraktion der CXCR5⁺ B-Zellen zu beobachten ist [39]. Nanki et al. statuieren hingegen, dass sich die Expression von CXCR5 zwischen CD27⁻ und CD27⁺ nicht wesentlich unterscheidet [106]. Damit ist ein reifungsabhängiges Expressionsprofil des CXCR5 auf den B-Zell-Populationen als Ursache der spezifischen Migrationszunahme der CD27⁻ B-Zellen fraglich. Ein stärkerer Effekt Epratuzumabs auf die naiven B-Zellen, vermittelt durch eine höhere Epratuzumab-Bindung, könnte jedoch diese spezifische Migrationszunahme der CD27⁻ B-Zellen zur Folge haben. Interessanterweise steigert Epratuzumab bei gesunden Probanden nicht nur die Migration der naiven CD27⁻ IgD⁺ B-Zellen gegenüber CXCL13, sondern ebenfalls die der CD27⁻ IgD⁻ B-Zellen. Damit stellt sich die Frage, ob die CD27⁻ IgD⁻ Gedächtnis-B-Zellen, die eine geringere Mutationsfrequenz im Vergleich zu CD27⁺

Gedächtnis-B-Zellen besitzen [13], eventuell weitere Keimzentrumsreaktionen zur Affinitätsreifung benötigen und somit auf eine CXCL13-vermittelte Migration in Lymphfollikel enthaltene Gewebe angewiesen sind.

Eine erhöhte Migration gegenüber einem CXCL13-Chemokin-Gradienten könnte somit die Reifung naiver B-Zellen bzw. eine erhöhte Affinitätsreifung der CD27⁻ IgD⁻ Gedächtnis-B-Zellen in gesunden Probanden unterstützen bzw. beschleunigen.

Da bei den B-Zellen von SLE-Patienten kein migrationssteigernder Effekt Epratuzumabs auftrat, stellt sich die Frage, ob ein Teil der CXCR5-exprimierenden B-Zellen in den SLE-Patienten bereits die Blutzirkulation verlassen hat und damit zu der für Lupus typischen Lymphopenie beiträgt. Bei RA-Patienten wiesen bereits einige Untersuchungen auf eine Rolle der CXCL13/ CXCR5-Systems in der Formation ektoper lymphatischer Gewebe und der Attraktion von B-Zellen in entzündetes Gewebe hin [33;34]. Hier könnten Analysen neu diagnostizierter Lupus-Patienten oder Gewebeproben von Patienten im entzündlichen Schub Aufschluss geben.

CXCR3-Liganden (CXCL9, CXCL10, CXCL11)

Die Zunahme der CXCR3-Liganden induzierte Migration der B-Zellen unter Epratuzumab konnte ebenfalls nur bei B-Lymphozyten von gesunden Probanden festgestellt werden. Die Migration der B-Zellen von Lupus-Patienten gegenüber CXCL9, CXCL10 und CXCL11 blieb hingegen von Epratuzumab unbeeinflusst. Die Analyse der Migrationsänderung einzelner B-Zell-Subpopulationen der gesunden Versuchspersonen verzeichnete erneut den größten Effekt Epratuzumabs bei den CD27⁻ IgD⁺ B-Zellen, während überraschenderweise zusätzlich eine bedeutsame Migrationszunahme in der CD27⁺ IgD⁺ B-Zell-Population detektiert werden konnte (Abbildung 3-19 und Abbildung 3-20).

Die CXCR3-Liganden gehören zu den proinflammatorischen Chemokinen [39]. Während im Vergleich zu B-Zell-malignen Erkrankungen nur für einen geringen Teil der B-Zellen im peripheren Blut gesunder Probanden die Expression von CXCR3 nachgewiesen werden konnte [108], zeigten Henneken et al., dass die Mehrheit der B-Zellen zwar CXCR3 exprimieren, jedoch nur bei einem geringer Anteil der Zellen die CXCR3-Expression auf einem signifikant hohem Expressionsniveau liegt. Die Ergebnisse dieser Analysen legen nahe, dass die CXCR3-Expression nach der Differenzierung hoch reguliert wird, da die Frequenz der B-Zellen mit hoher CXCR3-Expression von naiven zu Gedächtnis-B-Zellen zu nimmt [39]. Eine erhöhte CXCR3-

Expression mit zunehmender Differenzierung als Ursache der hier *in vitro* beobachteten Migrationszunahme von naiven CD27⁻ IgD⁺ B-Zellen und der CD27⁺ IgD⁺ nicht klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen stellt somit einen scheinbaren Widerspruch dar. *In vitro*-Chemotaxis-Experimente zeigten jedoch, dass auch B-Zellen mit niedriger CXCR3-Expression gegenüber dem Chemokin CXCL10 funktionell reagieren [39], so dass die Höhe des CXCR3-Expressionslevels und die Unterschiede in den verschiedenen Reifungsstadien demnach keinen Einfluss auf die Migration zu haben scheinen. Damit scheidet das CXCR3-Expressionsprofil der Zellen als Grund für die unterschiedliche Steigerung der Migration aus. Im Vergleich dazu scheint die Annahme, dass die durch Epratuzumab *in vitro* beobachtete Migrationszunahme, mit größtem Effekt in der CD27⁻ IgD⁺ B-Zell-Subpopulation, in der Höhe der Epratuzumab-Bindung begründet liegt (Abbildung 3-5), wahrscheinlicher.

Die unter Epratuzumab erhöhte Migration gegenüber den CXCR3-Liganden bei Gesunden legt insgesamt nahe, dass Epratuzumab zu einer möglichen Aktivierung und Rekrutierung der B-Zellen in Entzündungen als Einsatzort beiträgt. Dass diese Migrationszunahme bei SLE-Patienten nicht zu beobachten war, könnte daran liegen, dass die chronische Entzündung bei Lupus bereits eine Emigration CXCR3-exprimierender B-Zellen in betroffene Organe bewirkt hat. Eine Anreicherung CXCR3-exprimierender T-Zellen in der Niere von Lupus-Patienten ist bereits nachgewiesen worden [109]. Insgesamt deutet die bei SLE-Patienten durch Epratuzumab unveränderte Migration gegenüber CXCR3-Liganden daraufhin, dass der Antikörper die gezielte Migration von B-Zellen in Entzündungsherde offenbar nicht fördert.

4.4.3. Zusammenfassung

Die unter Epratuzumab in allen B-Zell-Subpopulationen beobachtete Migrationszunahme spricht für eine generelle Aktivierung der B-Zellen nach Bindung dieses Therapie-Antikörpers. Die genauen molekularen Mechanismen, die den mit der Migration verbundenen Umbau des Zell-Zytoskeletts bspw. nach Aktivierung intrazellulärer Kinasen bewirken, müssen jedoch erst noch genauer untersucht werden. Eine Veränderung des Expressionsprofils verschiedener Adhäsionsmoleküle wie dem β_1 -Integrin, ein Fibronektin-Rezeptor, ist als eine Ursache ebenfalls nicht auszuschließen.

Die Veränderung der chemokin-spezifischen Migrationsfrequenzen der B-Zell-Populationen gesunder Probanden und SLE-Patienten durch Epratuzumab unterschieden sich für die drei Chemokine deutlich. Dies spricht zum Einen für einen spezifischen Effekt von Epratuzumab und unterstützt zum Anderen die Ausgangsthese, dass unterschiedliche immunologische Präkonditionierungen der B-Zellen von Lupus-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden zu abweichenden Effekten Epratuzumabs führen können.

Die signifikante Migrationssteigerung der B-Zellen gesunder Personen gegenüber CXCL12, CXCL13 und den CXCR3-Liganden und die Migrationszunahme der B-Zellen von SLE-Patienten gegenüber CXCL12 betraf in erster Linie die naiven CD27⁻ IgD⁺ B-Zellen und liegt am ehesten begründet in der höchsten Epratuzumab-Bindung dieser Subpopulation. Das ebenfalls als Ursache diskutierte Expressionsprofil der Chemokin-Rezeptoren, würde für CXCR4 und CXCR5 zutreffen, da die Expression dieser Rezeptoren mit steigender Differenzierung der Zellen abnimmt. Bei CXCR3 wurde hingegen festgestellt, dass die Expressionsstärke keinen Einfluss auf die funktionelle Migration gegenüber CXCL10 hat und somit die reifungsabhängige CXCR3-Expression die unterschiedliche Migrationszunahme der B-Zell-Populationen nicht erklärt.

Die bei B-Zellen von SLE-Patienten beobachtete Migrationszunahme der CD27⁻ B-Zellen gegenüber CXCL12 unterstützt sowohl die Hypothese der Emigration in lymphatische Organe als auch die Hypothese der Retention der naiven B-Zellen beispielsweise im Knochenmark als Ursache für die unter Epratuzumab-Therapie beobachteten Reduktion dieser B-Zellen im peripheren Blut. Wobei eine Retention der Zellen dort eine reduzierte Differenzierung der vornehmlich naiven Zellen nach sich ziehen könnte und somit möglicherweise die Krankheitsaktivität reduziert. Diese Annahme sollte in weiteren Versuchen, wie bspw. immunhistochemischen Färbungen von Knochenmarksproben oder Phänotypisierung der dort enthaltenen B-Zellen nach Epratuzumab-Therapie, überprüft werden.

4.5. Unterschiedliche Effekte von Epratuzumab auf die B-Zellen von gesunden Personen und SLE-Patienten

Der Vergleich der Effekte von Epratuzumab auf die Migration und die Adhäsionsmolekül-Expression von B-Zellen gesunder Probanden und SLE-Patienten sollte zugleich Unterschiede zwischen Patienten und Gesunden identifizieren. Als Ausgangssituation wurde die CD22-Expression bzw. die Epratuzumab-Bindung der verschiedenen Subpopulationen verglichen, wobei sich in keiner Zellpopulation signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen ergaben. Das impliziert, dass die SLE-typische Hyperaktivität des Immunsystems der Patienten, die CD22-Expression nicht direkt beeinflusst und stimmt mit Untersuchungen anderer Gruppen überein [110].

4.5.1. Expressionsänderung der Adhäsionsmoleküle CD62L und β_7 -Integrin auf der B-Zell-Oberfläche durch Epratuzumab

Änderung der CD62L-Expression

Epratuzumab bewirkte in beiden Versuchsgruppen eine Reduktion der CD62L-Expression auf CD27⁻ B-Zellen, wohingegen die Expression auf CD27⁺ B-Zellen unbeeinflusst blieb. Der Vergleich der Veränderung der CD62L-Expression durch Epratuzumab auf der Oberfläche der B-Zellen von gesunden Versuchspersonen und SLE-Patienten zeigte keine signifikanten Unterschiede. Bereits die Ausgangssituation der CD62L-Expression auf B-Zellen gesunder Personen im Vergleich zu SLE-Patienten zeigte keinen signifikanten Unterschied, welches mit den Ergebnissen von Rodriguez-Bayona et. al konform ist [110]. Dies deutet darauf hin, dass die hyperaktive immunologische Konditionierung beim SLE die CD62L-Expression der B-Zellen und die Wirkung von Epratuzumab nicht beeinflusst.

Änderung der β_7 -Integrin-Expression

Die unter Epratuzumab beobachtete Veränderung der β_7 -Integrin-Expression auf der B-Zell-Oberfläche unterschied sich für alle B-Zellpopulationen hingegen signifikant zwischen Gesunden und Patienten. Die B-Zellen gesunder Probanden zeigten eine ausgeprägtere Reduktion der β_7 -Integrin-Expression auf ihrer Oberfläche als die B-Zellen der SLE-Patienten. Dies könnte darin begründet liegen, dass die β_7 -Integrin

Expression auf Lupus-B-Zellen bereits unabhängig von dem Epratuzumab-Einfluss als niedriger nachgewiesen werden konnte (Vergleich Abschnitt 3.3.2. Anteil β_7 -Integrin-exprimierender CD19⁺ B-Zellen gesunde Probanden 72.3% ($\pm 10.7\%$), SLE-Patienten 59.7% (± 8.4)) und Epratuzumab somit nur eine geringere Reduktion bei den CD19⁺ B-Zellen von SLE-Patienten bewirken konnte.

β_7 -Integrin ist als Adhäsionsmolekül an dem Zellwanderungsverhalten von B-Zellen vor allem in mukosale immunologisch aktive Gewebe des Gastrointestinaltraktes beteiligt [44]. Trotzdem bei SLE-Patienten häufig eine Involvierung des GIT beobachtet werden kann [111], wird die Rolle mukosaler Immunaktivierung in SLE-Patienten weiterhin debattiert. Gemeinsame genetische Prädispositionen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [112], gastrointestinale Symptome sowie erhöhte Marker einer LPS-abhängigen Aktivierung des GALT [113], unterstützen die These einer persistierenden, erhöhten Aktivierung der mukosalen Immunität in der Lupus-Erkrankung. Damit stellt sich die Frage, ob die Lymphopenie dieser Erkrankung [12;95] mit einer erhöhten β_7 -Integrin-vermittelten Emigration der B-Zellen in das GALT einhergeht, was eine reduzierte Frequenz β_7 -Integrin-exprimierender B-Zellen im peripheren Blut zur Folge haben könnte. In diesem Falle wäre eine mögliche Schlußfolgerung, dass Epratuzumab mit seiner Reduktion der β_7 -Integrin-Expression auf B-Zellen, deren Emigration in lymphatische Gewebe des GIT verringert. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wäre dabei ein stärkerer Effekt, das heißt eine größere Reduktion der β_7 -Integrin-vermittelten Emigration, bei Gesunden als bei Lupus-Patienten zu erwarten.

4.5.2. Migrationsveränderungen unter Epratuzumab

Spontane Migrationänderung

Es konnte kein Unterschied hinsichtlich der durch Epratuzumab beobachteten Steigerung der spontanen chemokin-unabhängigen Migration aller B-Zell-Subpopulationen zwischen gesunden Probanden und SLE-Patienten festgestellt werden. Das spricht dafür, dass es sich um einen generellen Effekt des Anti-CD22-Therapie-Antikörpers handelt, welcher nicht durch die immunologische Hyperaktivität in SLE-Patienten beeinflusst scheint. Ob dieser Effekt durch eine CD22-vermittelte, erhöhte Aktivierung der Zellen bzw. spezieller Signalkaskaden verursacht wird oder damit einhergeht, muss jedoch in weiteren Experimenten untersucht werden.

Chemokin-spezifische Migrationsänderung

CXCL12

Sowohl bei Betrachtung der gesamten CD19⁺ B-Zell-Population, als auch bei den einzelnen Subpopulationen konnten keine signifikanten Unterschiede in der durch Epratuzumab beobachteten Migrationszunahme gegenüber CXCL12 bei gesunden Versuchspersonen im Vergleich zu SLE-Patienten festgestellt werden. Aussagen zu der Expression von CXCR4, dem CXCL12-bindende Chemokin-Rezeptor, auf der Oberfläche von SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden sind widersprüchlich. Während Henneken et al. eine reduzierte Expression auf B-Zellen von SLE-Patienten beschreiben [39], belegen Rodriguez-Bayona et al. eine erhöhte CXCR4-Expression auf CD27⁺ B-Zellen von SLE-Patienten [110]. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass sich das CXCR4-Expressionsprofil in Abhängigkeit von der Erkrankungsaktivität verändert und damit widersprüchliche Berichte erklärt. Die funktionelle Reaktivität der B-Zellen gegenüber CXCL12 und der Einfluss Epratuzumabs auf diese scheinen jedoch durch den Zustand der chronischen Aktivität im SLE nicht wesentlich verändert.

CXCL13

Gegenüber dem CXCL13-Gradienten konnte bei gesunden Personen ein signifikant höherer Migrationszuwachs unter Epratuzumab beobachtet werden. Dieser beruhte zum größten Teil auf der CD27⁻ IgD⁺ B-Zell-Population. Ein signifikanter Unterschied konnte zudem für die CD27⁺ IgD⁻ Gedächtnis-B-Zell-Population festgestellt werden, welche bei gesunden Probanden eine leichte Migrationszunahme verzeichnete, während es bei den SLE-Patienten zu keiner Veränderung bzw. sogar durchschnittlich zu einer leichten Abnahme der Migrationsfrequenz durch Epratuzumab kam.

Eine auf B-Zellen von SLE-Patienten reduzierte Expression des CXCL13-Rezeptors CXCR5 [39] könnte eine mögliche Ursache für die hier beobachteten Unterschiede darstellen. Andere Untersuchungen kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass die Expression des CXCR5 auf B-Zellen von SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen ähnlich ist [114], womit ein bei SLE-Patienten verändertes Expressionsmuster als Ursache für den signifikanten Unterschied nicht eindeutig belegt werden kann. Ein anderer Grund für den geringeren Migrationszuwachs bei SLE-Patienten könnte sein, dass die auf CXCL13 reagierenden B-Zellen bereits die periphere Blutbahn verlassen

haben. Erhöhte oder zusätzliche CXCL13-Chemokin-Gradienten in entzündeten Geweben von Lupus-Patienten wären als Ursache hierfür denkbar.

Im Lupus-Mausmodell konnte mit voranschreitender Krankheit eine erhöhte Expression vom CXCL13 in der Niere festgestellt werden, welche mit der Ansammlung von Entzündungszellen dort in Verbindung gebracht wurde [115]. Auch in SLE-Patienten wurde eine erhöhte CXCL13-Konzentration beschrieben, welche mit der Krankheitsaktivität korrelierte und bei Nierenbeteiligung noch zusätzlich erhöht war [116;117]. Somit wäre ein verändertes Chemokin-Umfeld in der Lupus-Erkrankung eine plausible Erklärung für die auch unter Epratuzumab gleichbleibenden, geringen Migrationsfrequenzen gegenüber CXCL13. Epratuzumab würde somit die Emigration der B-Zellen vom peripheren Blut in die entzündeten Läsionen und vor allem in die Niere bei SLE nicht zusätzlich fördern und könnte zusammen mit der *in vitro* reduzierten Adhäsionsmolekül-Expression *in vivo* vielleicht sogar zu einer Reduktion der Wanderung in die entzündeten Areale beitragen.

CXCR3-Liganden

Die B-Zellen gesunder Probanden zeigten gegenüber den CXCR3-Liganden eine signifikant höhere Zunahme der Migrationsfrequenz durch Epratuzumab, während diese bei den B-Zellen von Lupus-Patienten unbeeinflusst blieb. Bei der separaten Betrachtung der B-Zell-Subpopulationen konnte festgestellt werden, dass dieser signifikante Unterschied nur auf die CD27⁻ IgD⁺ B-Zellpopulation zurückzuführen ist.

Wie bereits ausführlich in Abschnitt 4.4.2. dargelegt, scheint das Level der CXCR3-Expression auf verschiedenen B-Zell-Subpopulationen nicht der Grund für die verschiedenen Migrationsfrequenzen gegenüber den CXCR3-Liganden zu sein. Somit würde auch das auf B-Zellen von SLE-Patienten beschriebene erhöhte CXCR3-Expressionslevel [114] die Migrationsfrequenz wahrscheinlich nicht beeinflussen. Jedoch wurde bei SLE-Patienten eine erhöhte CXCL10 Konzentration beschrieben, welche u. a. auch als mit der Krankheitsaktivität und einer geringeren Lymphozyten-Anzahl im Blut korrelierend beschrieben wurde [118;119]. Dies wäre eine mögliche Ursache für eine erhöhte Emigration CXCR3-exprimierender B-Zellen aus der Blutzirkulation und würde die geringe und durch Epratuzumab unveränderte Migration gegenüber dem CXCR3-Liganden-Gradienten der hier untersuchten B-Zellen des peripheren Blutes von SLE-Patienten erklären.

4.5.3. Zusammenfassung

Der Vergleich des Epratuzumab-Effekts auf B-Zellen gesunder Probanden und SLE-Patienten zeigte keine wesentlichen Differenzen in der CD22-Expression der Subpopulationen und in der Veränderung der CD62L-Expression.

Die Reduktion der β_7 -Integrin-Expression auf allen B-Zell-Populationen durch Epratuzumab war bei Gesunden jedoch deutlich höher als bei SLE-Patienten. Die insgesamt geringere β_7 -Integrin-Expression auf B-Zellen von SLE-Patienten spricht dabei für eine veränderte Immunhomöostase im Lupus, die möglicherweise das GALT involviert. Die Emigration der B-Zellen in das GALT könnte somit, wenn auch in geringerem Ausmaß als bei Gesunden, durch Epratuzumab reduziert werden und somit zur Besserung gastrointestinaler Symptome beitragen.

Die Änderung der spontanen Migration durch Epratuzumab verhielt sich in beiden Gruppen ähnlich, was nahelegt, dass der Einfluss Epratuzumabs auf die β_1 -Integrin-Expression bzw. die intrazelluläre Regulation des Zytoskeletts von dem CD22-Expression-Level unabhängig ist und nicht durch die veränderte Immunhomöostase im Lupus beeinflusst wird.

Auch die CXCL12-spezifische Migrationsänderung durch Epratuzumab zeigte in den beiden Versuchsgruppen keine Unterschiede. Das lässt vermuten, dass diese Chemokin-Achse trotz chronischer Immunaktivierung im SLE nicht verändert ist.

Die Migrationsänderung gegenüber CXCL13 und CXCR3-Liganden war hingegen signifikant unterschiedlich, wobei es bei den SLE-Patienten zu einem deutlich geringeren bis gar keinem Effekt durch Epratuzumab kam. In erster Linie waren die CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Zellen betroffen. Die Ursache hierfür liegt am ehesten in erhöhten Leveln der Chemokine CXCL13 und CXCL10 in SLE-Patienten begründet, welche möglicherweise eine Emigration CXCR5- bzw. CXCR3-exprimierender B-Zellen aus dem peripheren Blut nach sich ziehen. Da Epratuzumab bei SLE-Patienten hier zu keiner Migrationszunahme führt, kann davon ausgegangen werden, dass eine Epratuzumab-Therapie eine verstärkte CXCL13- und CXCL10- vermittelte Emigration der B-Zellen von SLE-Patienten nicht fördert.

Diese verschieden stark ausgeprägten Veränderungen der B-Zellen von SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden durch die *In vitro*-Inkubation mit Epratuzumab zeigen den Einfluss der im Lupus veränderten chronisch bzw. schubweise aktiven Immunhomöostase auf die Wirkung spezifischer Immunsystem-modulierender

Medikamente wie Epratuzumab. Die umfassendere Wirkung auf B-Zellen gesunder Probanden führt zu der Frage, ob die via Epratuzumab erreichte gezielte Immunmodulation in anderen immunologischen Erkrankungen eventuell ebenfalls einsetzbar ist und dort auch andere Effekte als die hier bei SLE-Patienten beobachteten, zeigt.

4.6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die reduzierte CD62L- und β_7 -Integrin-Expression sowie die gesteigerte Migration gegenüber CXCL12, CXCL13 und den CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10, CXCL11 unterstützen die Annahme, dass Epratuzumab die gezielte Migration bzw. Retention speziell der CD27⁻ bzw. CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Zellen des peripheren Blut beeinflusst. Des Weiteren scheint Epratuzumab die Chemokin-unabhängige Migration, am ehesten durch den Eingriff in intrazelluläre Regulation der Zytoskelett-Formation, zu erhöhen. Die Daten weisen auf bestimmte Wirkprinzipien des Antikörpers hin, jedoch sind zur Bestätigung weitere Untersuchungen auf der Ebene intrazellulärer Signalkaskaden oder hinsichtlich Veränderungen des Zytoskeletts nötig.

Allerdings bekräftigen die Untersuchungen durch den unterschiedlichen Effekt von Epratuzumab auf die B-Zellen gesunder Probanden und SLE-Patienten das Vorliegen einer veränderten Immunhomöostase im systemischen Lupus erythematoses und den Einfluss dieser Immunhomöostase auf die potentielle Wirkung gezielt immunmodulatorischer Medikamente. Neben weiteren molekularen Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Epratuzumab werden die Ergebnisse der derzeit noch laufenden Phase III-Studien zur Wirksamkeit und Sicherheit von Epratuzumab bei SLE mit Spannung erwartet. Die hier vorgelegten Daten tragen zum besseren Verständnis der Wirkung eines nicht-depletierenden Antikörpers gegen ein B-Zell-spezifisches Molekül (CD22) bei und legen nahe, dass auch die Beeinflussung von „immunorganisatorischen Funktionen“ wie Migration und Adhäsion wertvolle Therapieziele sind. Im Gegensatz zur B-Zell-Depletion bei SLE mit einer *per se* hohen Infektionsrate könnte ein solcher Zugang mit Wirksamkeit und akzeptabler Sicherheit überzeugen.

5. Literaturverzeichnis

1. Jacobi AM, Goldenberg DM, Hiepe F, Radbruch A, Burmester GR, Dorner T. Differential effects of epratuzumab on peripheral blood B cells of patients with systemic lupus erythematosus versus normal controls. *Ann.Rheum.Dis.* 2008; **67**:450-457.
2. Gabriel SE, Michaud K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Res.Ther.* 2009; **11**:229.
3. Renz-Polster H, Krautzig S. *Basislehrbuch Innere Medizin, Fourth Edition, München: Elsevier GmbH Urban und Fischer Verlag, 2008.*
4. Cervera R, Khamashta MA, Font J et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients
54. *Medicine (Baltimore)* 2003; **82**:299-308.
5. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus
3. *N.Engl.J.Med.* 2003; **349**:1526-1533.
6. Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J et al. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus
3. *J.Exp.Med.* 2005; **201**:703-711.
7. Aringer M, Burkhardt H, Burmester G et al. Current state of evidence on 'off-label' therapeutic options for systemic lupus erythematosus, including biological immunosuppressive agents, in Germany, Austria and Switzerland - a consensus report. *Lupus* 2012; **21**:386-401.
8. Bertsias G, Ioannidis JP, Boletis J et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. *Ann.Rheum.Dis.* 2008; **67**:195-205.
9. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J.Clin.Pathol.* 2003; **56**:481-490.
10. Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J.Exp.Med.* 1999; **189**:1639-1648.
11. Stohl W. Systemic lupus erythematosus: a blissless disease of too much BLYS (B lymphocyte stimulator) protein
20. *Curr.Opin.Rheumatol.* 2002; **14**:522-528.

12. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A et al. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus
1. *J.Immunol.* 2000; **165**:5970-5979.
13. Wei C, Anolik J, Cappione A et al. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus
15. *J.Immunol.* 2007; **178**:6624-6633.
14. Lipsky PE, Dorner T. The red wolf remains a wily foe. *Nat.Rev.Rheumatol.* 2010; **6**:307-308.
15. Jackson SM, Wilson PC, James JA, Capra JD. Human B cell subsets
4. *Adv.Immunol.* 2008; **98**:151-224.
16. Zola H. Human leukocyte differentiation antigens as therapeutic targets: the CD molecules and CD antibodies
9. *Expert.Opin.Biol.Ther.* 2001; **1**:375-383.
17. Janeway CA, Murphy K, Travers P, Walport M. *Immunologie*, 7. Edition, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2009.
18. Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester GR. *Taschenatlas der Immunologie*, 2. Edition, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2007.
19. Vale AM, Schroeder HW, Jr. Clinical consequences of defects in B-cell development
1. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2010; **125**:778-787.
20. Mackay F, Browning JL. BAFF: a fundamental survival factor for B cells
36. *Nat.Rev.Immunol.* 2002; **2**:465-475.
21. Hiepe F, Dorner T. [Autoantibodies and antibody-secreting cells]
8. *Z.Rheumatol.* 2005; **64**:389-395.
22. Carter RH. B cells in health and disease
3. *Mayo Clin.Proc.* 2006; **81**:377-384.
23. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics
3. *Immunity.* 2007; **27**:190-202.
24. Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Komiyama A. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol.Today* 2000; **21**:204-206.
25. Klein U, Rajewsky K, Kuppers 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
4. *J.Exp.Med.* 1998; **188**:1679-1689.

26. Sanz I, Wei C, Lee FE, Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells
1. *Semin.Immunol.* 2008; **20**:67-82.
27. Agematsu K. [Molecules involved in characteristics of naive/memory B cells]
11. *Nihon Rinsho Meneki.Gakkai Kaishi* 2004; **27**:309-314.
28. Anolik JH, Barnard J, Cappione A et al. Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004; **50**:3580-3590.
29. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu.Rev.Immunol.* 2004; **22**:891-928.
30. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000; **12**:121-127.
31. Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol.Today* 2000; **21**:418-420.
32. Forster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 1996; **87**:1037-1047.
33. Shi K, Hayashida K, Kaneko M et al. Lymphoid chemokine B cell-attracting chemokine-1 (CXCL13) is expressed in germinal center of ectopic lymphoid follicles within the synovium of chronic arthritis patients. *J.Immunol.* 2001; **166**:650-655.
34. Takemura S, Braun A, Crowson C et al. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J.Immunol.* 2001; **167**:1072-1080.
35. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat.Immunol.* 2001; **2**:123-128.
36. Pablos JL, Amara A, Bouloc A et al. Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *Am.J.Pathol.* 1999; **155**:1577-1586.
37. Ponomaryov T, Peled A, Petit I et al. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J.Clin.Invest* 2000; **106**:1331-1339.
38. Togel F, Isaac J, Hu Z, Weiss K, Westenfelder C. Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR4-positive cells to the kidney after ischemic injury. *Kidney Int.* 2005; **67**:1772-1784.
39. Henneken M, Dorner T, Burmester GR, Berek C. Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res.Ther.* 2005; **7**:R1001-R1013.

40. Hogg N. Roll, roll, roll your leucocyte gently down the vein... *Immunol.Today* 1992; **13**:113-115.
41. Rainer TH. L-selectin in health and disease. *Resuscitation* 2002; **52**:127-141.
42. Picker LJ, Butcher EC. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu.Rev.Immunol.* 1992; **10**:561-591.
43. Smith CW. Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 1993; **71**:76-87.
44. Gofu G, Rivera-Nieves J, Ley K. Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr.Mol.Med.* 2009; **9**:836-850.
45. Binion DG, West GA, Ina K, Ziats NP, Emancipator SN, Fiocchi C. Enhanced leukocyte binding by intestinal microvascular endothelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1997; **112**:1895-1907.
46. Butcher EC, Williams M, Youngman K, Rott L, Briskin M. Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv.Immunol.* 1999; **72**:209-253.
47. Manson JJ, Rahman A. Systemic lupus erythematosus. *Orphanet.J.Rare.Dis.* 2006; **1**:6.
48. Ruiz-Irastorza G, Danza A, Khamashta M. *Glucocorticoid use and abuse in SLE. Rheumatology.(Oxford)* 2012.
49. Levy RA, Vilela VS, Cataldo MJ et al. Hydroxychloroquine (HCQ) in lupus pregnancy: double-blind and placebo-controlled study. *Lupus* 2001; **10**:401-404.
50. Rolain JM, Colson P, Raoult D. Recycling of chloroquine and its hydroxyl analogue to face bacterial, fungal and viral infections in the 21st century. *Int.J.Antimicrob.Agents* 2007; **30**:297-308.
51. Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Pijoan JI et al. Effect of antimalarials on thrombosis and survival in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2006; **15**:577-583.
52. Leecharoen S, Wangkaew S, Louthrenoo W. Ocular side effects of chloroquine in patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and scleroderma. *J.Med.Assoc.Thai.* 2007; **90**:52-58.
53. Kang I, Park SH. Infectious complications in SLE after immunosuppressive therapies. *Curr.Opin.Rheumatol.* 2003; **15**:528-534.
54. Petri M. Cyclophosphamide: new approaches for systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004; **13**:366-371.
55. Griffiths B, Emery P, Ryan V et al. The BILAG multi-centre open randomized controlled trial comparing ciclosporin vs azathioprine in patients with severe SLE. *Rheumatology.(Oxford)* 2010; **49**:723-732.

56. Kipen Y, Littlejohn GO, Morand EF. Methotrexate use in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1997; **6**:385-389.
57. Mok MY. The immunological basis of B-cell therapy in systemic lupus erythematosus
1. *Int.J.Rheum.Dis.* 2010; **13**:3-11.
58. Dorner T, Radbruch A, Burmester GR. B-cell-directed therapies for autoimmune disease
3. *Nat.Rev.Rheumatol.* 2009; **5**:433-441.
59. Dorner T, Kinnman N, Tak PP. Targeting B cells in immune-mediated inflammatory disease: a comprehensive review of mechanisms of action and identification of biomarkers
1. *Pharmacol.Ther.* 2010; **125**:464-475.
60. Ramos-Casals M, Soto MJ, Cuadrado MJ, Khamashta MA. Rituximab in systemic lupus erythematosus: A systematic review of off-label use in 188 cases
5. *Lupus* 2009; **18**:767-776.
61. US Food and Drug Administration. FDA approves Benlysta to treat lupus. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm246489.htm>. 2011. Ref Type: Electronic Citation
62. Doody GM, Justement LB, Delibrias CC et al. A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science* 1995; **269**:242-244.
63. Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin.Immunol.* 2006; **18**:263-275.
64. Schneider P, Mackay F, Steiner V et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth
29. *J.Exp.Med.* 1999; **189**:1747-1756.
65. Furie R, Stohl W, Ginzler EM et al. Biologic activity and safety of belimumab, a neutralizing anti-B-lymphocyte stimulator (BLyS) monoclonal antibody: a phase I trial in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res.Ther.* 2008; **10**:R109.
66. Chiche L, Jourde N, Thomas G et al. New treatment options for lupus - a focus on belimumab. *Ther.Clin.Risk Manag.* 2012; **8**:33-43.
67. Stohl W, Hilbert DM. The discovery and development of belimumab: the anti-BLyS-lupus connection. *Nat.Biotechnol.* 2012; **30**:69-77.
68. Murdaca G, Colombo BM, Puppo F. Emerging biological drugs: a new therapeutic approach for Systemic Lupus Erythematosus. An update upon efficacy and adverse events. *Autoimmun.Rev.* 2011; **11**:56-60.
69. Dorner T, Kaufmann J, Wegener WA, Teoh N, Goldenberg DM, Burmester GR. Initial clinical trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) for

- immunotherapy of systemic lupus erythematosus. Arthritis Res.Ther. 2006; 8:R74.*
70. Leung SO, Goldenberg DM, Dion AS et al. Construction and characterization of a humanized, internalizing, B-cell (CD22)-specific, leukemia/lymphoma antibody, LL2. *Mol.Immunol.* 1995; **32**:1413-1427.
 71. Carnahan J, Stein R, Qu Z et al. Epratuzumab, a CD22-targeting recombinant humanized antibody with a different mode of action from rituximab. *Mol.Immunol.* 2007; **44**:1331-1341.
 72. Goldenberg DM. Epratuzumab in the therapy of oncological and immunological diseases. *Expert.Rev.Anticancer Ther.* 2006; **6**:1341-1353.
 73. Kalunian K, Wallace D, Petri M et al. Bilag-measured improvement in moderately and severely affected body systems in patients with systemic lupus erythematosus (sle) by epratuzumab: results from emblem, a phase iib study. *EULAR Meeting 2010, Roma 2010, SAT0197 2010.*
 74. Engel P, Wagner N, Miller AS, Tedder TF. Identification of the ligand-binding domains of CD22, a member of the immunoglobulin superfamily that uniquely binds a sialic acid-dependent ligand. *J.Exp.Med.* 1995; **181**:1581-1586.
 75. Engel P, Nojima Y, Rothstein D et al. The same epitope on CD22 of B lymphocytes mediates the adhesion of erythrocytes, T and B lymphocytes, neutrophils, and monocytes. *J.Immunol.* 1993; **150**:4719-4732.
 76. Tedder TF, Poe JC, Haas KM. CD22: a multifunctional receptor that regulates B lymphocyte survival and signal transduction
12. *Adv.Immunol.* 2005; **88**:1-50.
 77. Walker JA, Smith KG. CD22: an inhibitory enigma
8. *Immunology* 2008; **123**:314-325.
 78. Dorken B, Moldenhauer G, Pezzutto A et al. HD39 (B3), a B lineage-restricted antigen whose cell surface expression is limited to resting and activated human B lymphocytes. *J.Immunol.* 1986; **136**:4470-4479.
 79. Schwartz-Albiez R, Dorken B, Monner DA, Moldenhauer G. CD22 antigen: biosynthesis, glycosylation and surface expression of a B lymphocyte protein involved in B cell activation and adhesion. *Int.Immunol.* 1991; **3**:623-633.
 80. Duong BH, Tian H, Ota T et al. Decoration of T-independent antigen with ligands for CD22 and Siglec-G can suppress immunity and induce B cell tolerance in vivo. *J.Exp.Med.* 2010; **207**:173-187.
 81. Lanoue A, Batista FD, Stewart M, Neuberger MS. Interaction of CD22 with alpha2,6-linked sialoglycoconjugates: innate recognition of self to dampen B cell autoreactivity? *Eur.J.Immunol.* 2002; **32**:348-355.

82. Sato S, Tuscano JM, Inaoki M, Tedder TF. CD22 negatively and positively regulates signal transduction through the B lymphocyte antigen receptor. *Semin.Immunol.* 1998; **10**:287-297.
83. Tuscano JM, Riva A, Toscano SN, Tedder TF, Kehrl JH. CD22 cross-linking generates B-cell antigen receptor-independent signals that activate the JNK/SAPK signaling cascade. *Blood* 1999; **94**:1382-1392.
84. Nitschke L, Floyd H, Ferguson DJ, Crocker PR. Identification of CD22 ligands on bone marrow sinusoidal endothelium implicated in CD22-dependent homing of recirculating B cells. *J.Exp.Med.* 1999; **189**:1513-1518.
85. Leonard JP, Goldenberg DM. Preclinical and clinical evaluation of epratuzumab (anti-CD22 IgG) in B-cell malignancies. *Oncogene* 2007; **26**:3704-3713.
86. Dorner T, Goldenberg DM. Targeting CD22 as a strategy for treating systemic autoimmune diseases. *Ther.Clin.Risk Manag.* 2007; **3**:953-959.
87. Traczewski P, Rudnicka L. Treatment of systemic lupus erythematosus with epratuzumab. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 2011; **71**:175-182.
88. Petri M, Hobbs K, Gordon C, Strand V, Wallace D, Kelley L, Wegener W, Barry A, and Hopkin J. Randomized controlled trials (RCTS) of epratuzumab (anti-CD22mAb targeting B-cells) reveal clinically meaningful improvements in patients (pts) with moderate/ severe SLE flares (OP-0016). *Ann.Rheum.Dis.* 67 (Suppl. II): 53. 2008. Ref Type: Abstract
89. Strand V, Gordon C, Kalunian K, Coteur G, Barry A, Keininger D, Wegener W, and Petri M. Randomized controlled trials (RCTS) of epratuzumab (anti-CD22mAb targeting B-cells) reveal clinically meaningful improvements in health related quality of life (HRQOL) in SLE patients (pts) with high disease activity and low baseline self-report measures (THU0239). *Ann.Rheum.Dis.* 67 (Supl. II): 212. 2008. Ref Type: Abstract
90. Wallace D, Hobbs K, Houssiau F, Strand V, Tak P, Wegener W, Kelley L, and Barry A. Randomized controlled trials (RCTS) of epratuzumab (anti-CD22mAb targeting B-cells) reveal clinically meaningful reductions in corticosteroid (CS) use with favorable safety profile in moderate and severe flaring SLE patients (THU0238). *Ann.Rheum.Dis.* 67 (Suppl. II): 212. 2008. Ref Type: Abstract
91. An Open-Label Re-treatment Trial for Patients Previously Randomized Into the SL0003 and SL0004, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Multi-center Studies of Epratuzumab in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. (NCT00383513). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00383513> . 9-2-2012. Ref Type: Electronic Citation
92. A Phase 3, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Multicenter Study of the Efficacy and Safety of Four 12-week Treatment Cycles (48Weeks Total) of Epratuzumab in Systemic Lupus Erythematosus Subjects with Moderate to Severe Disease. (NCT01262365). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01262365> . 9-3-2012. Ref Type: Electronic Citation

93. Carnahan J, Wang P, Kendall R et al. Epratuzumab, a humanized monoclonal antibody targeting CD22: characterization of in vitro properties
15. *Clin.Cancer Res.* 2003; **9**:3982S-3990S.
94. Daridon C, Blassfeld D, Reiter K et al. Epratuzumab targeting of CD22 affects adhesion molecule expression and migration of B-cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res.Ther.* 2010; **12**:R204.
95. Messner RP, Lindstrom FD, Williams RC, Jr. Peripheral blood lymphocyte cell surface markers during the course of systemic lupus erythematosus. *J.Clin.Invest* 1973; **52**:3046-3056.
96. Wilson GL, Fox CH, Fauci AS, Kehrl JH. cDNA cloning of the B cell membrane protein CD22: a mediator of B-B cell interactions. *J.Exp.Med.* 1991; **173**:137-146.
97. Dorner T, Jacobi AM, Lee J, Lipsky PE. Abnormalities of B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *J.Immunol.Methods* 2011; **363**:187-197.
98. Arbones ML, Ord DC, Ley K et al. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity.* 1994; **1**:247-260.
99. Tedder TF, Steeber DA, Pizcueta P. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J.Exp.Med.* 1995; **181**:2259-2264.
100. Gu B, Dao LP, Wiley J. Impaired transendothelial migration of B-CLL lymphocytes: a defect linked to low L-selectin expression. *Leuk.Lymphoma* 2001; **42**:5-12.
101. Neri P, Ren L, Azab AK et al. Integrin beta7-mediated regulation of multiple myeloma cell adhesion, migration, and invasion. *Blood* 2011; **117**:6202-6213.
102. Liu X, Ma B, Malik AB et al. Bidirectional regulation of neutrophil migration by mitogen-activated protein kinases. *Nat.Immunol.* 2012; **13**:457-464.
103. Lai Y, Shen Y, Liu XH, Zhang Y, Zeng Y, Liu YF. Interleukin-8 induces the endothelial cell migration through the activation of phosphoinositide 3-kinase-Rac1/RhoA pathway. *Int.J.Biol.Sci.* 2011; **7**:782-791.
104. Weiger MC, Parent CA. Phosphoinositides in chemotaxis. *Subcell.Biochem.* 2012; **59**:217-254.
105. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J.Exp.Med.* 1996; **184**:1101-1109.
106. Nanki T, Takada K, Komano Y et al. Chemokine receptor expression and functional effects of chemokines on B cells: implication in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.Ther.* 2009; **11**:R149.
107. Cyster JG. Homing of antibody secreting cells. *Immunol.Rev.* 2003; **194**:48-60.

108. Jones D, Benjamin RJ, Shahsafaei A, Dorfman DM. The chemokine receptor CXCR3 is expressed in a subset of B-cell lymphomas and is a marker of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000; **95**:627-632.
109. Enghard P, Humrich JY, Rudolph B et al. CXCR3+CD4+ T cells are enriched in inflamed kidneys and urine and provide a new biomarker for acute nephritis flares in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum.* 2009; **60**:199-206.
110. Rodriguez-Bayona B, Ramos-Amaya A, Perez-Venegas JJ, Rodriguez C, Brieva JA. Decreased frequency and activated phenotype of blood CD27 IgD IgM B lymphocytes is a permanent abnormality in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res.Ther.* 2010; **12**:R108.
111. Sultan SM, Ioannou Y, Isenberg DA. A review of gastrointestinal manifestations of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology.(Oxford)* 1999; **38**:917-932.
112. Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* 2011; **60**:1739-1753.
113. Egerer K, Feist E, Rohr U, Pruss A, Burmester GR, Dorner T. Increased serum soluble CD14, ICAM-1 and E-selectin correlate with disease activity and prognosis in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2000; **9**:614-621.
114. Watanabe T, Suzuki J, Mitsuo A et al. Striking alteration of some populations of T/B cells in systemic lupus erythematosus: relationship to expression of CD62L or some chemokine receptors
24. *Lupus* 2008; **17**:26-33.
115. Ishikawa S, Sato T, Abe M et al. Aberrant high expression of B lymphocyte chemokine (BLC/CXCL13) by C11b+CD11c+ dendritic cells in murine lupus and preferential chemotaxis of B1 cells towards BLC. *J.Exp.Med.* 2001; **193**:1393-1402.
116. Ezzat M, El-Gammasy T, Shaheen K, Shokr E. Elevated production of serum B-cell-attracting chemokine-1 (BCA-1/CXCL13) is correlated with childhood-onset lupus disease activity, severity, and renal involvement. *Lupus* 2011; **20**:845-854.
117. Schiffer L, Kumpers P, Valos-Misslitz AM et al. B-cell-attracting chemokine CXCL13 as a marker of disease activity and renal involvement in systemic lupus erythematosus (SLE). *Nephrol.Dial.Transplant.* 2009; **24**:3708-3712.
118. Hrycek E, Franek A, Blaszczyk E, Dworak J, Hrycek A. Serum levels of selected chemokines in systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatol.Int.* 2012.
119. Narumi S, Takeuchi T, Kobayashi Y, Konishi K. Serum levels of ifn-inducible PROTEIN-10 relating to the activity of systemic lupus erythematosus. *Cytokine* 2000; **12**:1561-1565.

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Blassfeld D*, Daridon C*, Reiter K, Mei H, Giesecke C, Goldenberg D, Hansen A, Hostmann A, Frölich D, Dörner T. *Epratuzmab targeting of CD22 affects adhesion molecule expression and migration of B-cells in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Research & Therapie 2010; 12:R204

Blaßfeld D*, Frölich D*, Reiter K, Giesecke C, Daridon C, Mei H, Burmester G, Goldenberg D, Salama A, Dörner T. *The anti-CD74 humanized monoclonal antibody, milatuzumab, which targets the invariant chain of MHC II complexes, alters B-cell proliferation, migration, and adhesion molecule expression*. Arthritis Research & Therapie 2012; 14:R54

*gleichwertiger Beitrag

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Dörner für die Überlassung dieses spannenden Themas, die hervorragende Betreuung und ständige Unterstützung sowohl wissenschaftlich als auch persönlich bedanken. Die fachlichen Dialoge und die Ermutigungen wie auch die Freiheiten, die mir während der Erstellung der Arbeit gegeben wurden, trugen enorm zu der Entstehung dieser Dissertation bei.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Capucine Daridon und Herrn Dr. rer. nat. Henrik Mei, die mir durch anregende wissenschaftliche Diskussionen und konstruktive Kritik in jeder Phase dieser Arbeit weitergeholfen haben und immer ein offenes Ohr für neue Gedanken hatten. Natürlich möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Dr. Mei noch einmal gesondert für das Korrekturlesen der Arbeit und das sehr hilfreiche Feedback bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dörner, die mich sehr herzlich aufgenommen haben und immer unterstützend zur Seite standen. Mein besonderer Dank gehört dabei Frau Karin Reiter und Frau Dipl. Ing. Daniela Frölich für die praktische Einführung in die Durchflusszytometrie sowie die Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten. Vielen Dank für die vielen fröhlichen, gemeinsamen Stunden auch ausserhalb der Arbeitsräume.

Ein großes Dankeschön auch an Leona Probst und Anne Paschke für die emotionale Unterstützung und natürlich auch für viele hilfreiche Ratschläge und Rückmeldungen während der Erstellung der Arbeit.

Nicht zuletzt gilt mein spezieller Dank natürlich meiner Familie und ganz besonders meiner Mutter, die mir das Studium in dieser Form überhaupt erst ermöglicht hat, immer hinter mir stand und mir auch „den Kopf zurechtgerückt hat“, wenn es nötig war.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Daniela Blaßfeld, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Anti-CD22-vermittelte Änderung der Expression von Adhäsionsmolekülen und des Migrationsverhaltens von B-Lymphozyten bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 24. September 2012