

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**Untersuchung des Einflusses von Rituximab auf das
Leichtkettenrepertoire bei Rheumatoider Arthritis in CD19+CD27+ B-
Gedächtniszellen**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Michael Ferschl
aus Eltmann

Würzburg, August 2015

Referent: Prof. Dr. H.-P. Tony
Korreferentin: Prof. Dr. M. Prelog

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Januar 2016

Der Promovend ist Arzt

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Rheumatoide Arthritis.....	1
1.2.	B-Zellen	4
1.2.1.	B-Zellen als Träger der humoralen Immunität.....	4
1.2.2.	Entstehung der Immunglobulinvielfalt	7
1.2.3.	B-Zell-Entwicklung	8
1.2.3.1.	B-Zell-Entwicklung im Knochenmark	8
1.2.3.2.	B-Zell-Entwicklung außerhalb des Knochenmarks	9
1.2.4.	Sekundäre V(D)J-Rekombination und Autoimmunität	12
1.2.5.	B-Zellen und Rheumatoide Arthritis	13
1.3.	Rituximab	16
1.3.1.	Rituximab und Rheumatoide Arthritis.....	16
1.3.2.	B-Zell-Depletion durch Rituximab	19
1.4.	Fragestellungen	20
2.	Material und Methoden	22
2.1.	Patient	22
2.2.	Sortierung von Einzelzellen.....	22
2.2.1.	Vorbereitung der Zellen.....	22
2.2.2.	Einzelzellsortierung	23
2.3.	Synthese von cDNA	24
2.4.	DNA-Amplifikation mittels Nested-PCR	25
2.4.1.	Nested-PCR der Kappa-Leichtketten-Rearrangements	25
2.4.1.1.	Primer.....	25
2.4.1.2.	Externe Amplifikation der Kappa-Rearrangements	26
2.4.1.3.	Interne Amplifikation der Kappa-Rearrangements	27
2.4.2.	Nested-PCR der Lambda-Leichtketten-Rearrangements	28
2.4.2.1.	Primer.....	28
2.4.2.2.	Externe Amplifikation der Lambda-Rearrangements	29
2.4.2.3.	Interne Amplifikation der Lambda-Rearrangements	30
2.5.	DNA-Gewinnung aus Agarosegel und Darstellung der PCR-Produkte	31
2.5.1.	Analytisches Gel	31

2.5.2.	Präparatives Gel und Aufreinigung der Produkte.....	31
2.6.	Sequenzierung	32
2.6.1.	Reaktionskomponenten	32
2.6.2.	Zyklusparameter	33
2.6.3.	Aufreinigung	33
2.6.4.	Isopropanolfällung	33
2.7.	Auswertung der Sequenzen.....	34
2.7.1.	Software	34
2.7.2.	Analyse der Sequenzen	34
2.8.	Statistische Analyse	37
2.9.	Verbrauchsmaterial und Geräte	37
3.	Ergebnisse	40
3.1.	Klinische Daten	40
3.2.	Analyse des V κ - und J κ -Genrepertoires der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen	41
3.2.1.	Häufigkeitsverteilung innerhalb der V κ -Familie.....	41
3.2.2.	Häufigkeitsverteilung der einzelnen V κ -Gensegmente	42
3.2.3.	Häufigkeitsverteilung innerhalb der J κ -Familie	44
3.2.4.	Häufigkeitsverteilung der einzelnen J κ -Gensegmente.....	45
3.2.5.	CDR3-Länge	46
3.2.6.	Genmutationsrate.....	46
3.2.7.	Mutationen in RGYW- und WRCY-Motiven	46
3.2.8.	Mutationen in CD- und Frameworkregionen	47
3.2.9.	Mutationen in einzelnen CD- und Frameworkregionen.....	47
3.2.10.	R/S Ratio in CD- und Frameworkregionen.....	49
3.2.11.	Häufigkeitsverteilung der V κ -Gensegmente auf die Upstream- und Downstream-Kassette	49
3.2.12.	Mutationen in J κ 1-4 und J κ 5-Rearrangements.....	49
3.3.	Analyse des V λ - und J λ -Genrepertoires der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen	50
3.3.1.	Häufigkeitsverteilung innerhalb der V λ -Familie.....	50

3.3.2.	Häufigkeitsverteilung der einzelnen V λ -Gensegmente	51
3.3.3.	Häufigkeitsverteilung innerhalb der J λ -Familie	52
3.3.4.	Häufigkeitsverteilung der einzelnen J λ -Gensegmente.....	53
3.3.5.	CDR3-Länge	54
3.3.6.	Genmutationsrate.....	54
3.3.7.	Mutationen in RGYW- und WRCY-Motiven	55
3.3.8.	Mutationen in CD- und Frameworkregionen	56
3.3.9.	Mutationen in einzelnen CD- und Frameworkregionen.....	56
3.3.10.	R/S Ratio in CD- und Frameworkregionen.....	57
3.3.11.	Häufigkeitsverteilung der V λ -Gensegmente auf die V λ -Cluster A, B und C.....	57
3.3.12.	Häufigkeitsverteilung der V λ -Gensegmente auf die V λ -Cluster A und B+C.....	58
3.3.13.	Mutationen in J λ 1-5 und J λ 7-Rearrangements.....	59
4.	Diskussion	61
4.1.	Gibt es Veränderungen des Kappa- und Lambda-Leichtketten- repertoires der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen nach B-Zell- Depletion durch Rituximab?	62
4.2.	Gibt es Veränderungen in dem Mutationsmuster des Kappa- und Lambda-Leichtkettenrepertoires der CD19+CD27+ B-Gedächtnis- zellen nach B-Zell-Depletion durch Rituximab?	65
4.3.	Gibt es Anzeichen für Rezeptor Revision im Kappa- und Lambda- Leichtkettenrepertoire der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen vor und nach B-Zell-Depletion durch Rituximab?.....	68
5.	Zusammenfassung.....	72
6.	Abkürzungen.....	75
7.	Literatur	79

1. Einleitung

1.1. Rheumatoide Arthritis

In Deutschland leidet etwa jeder dritte Erwachsene über 20 Jahren und jeder zweite Erwachsene über 40 Jahren an chronischen Gelenkschmerzen. Eine der häufigsten Ursachen dieser Schmerzen ist mit einer Prävalenz von 0.5% bis 0.8% der erwachsenen Bevölkerung die Rheumatoide Arthritis. Frauen sind insgesamt zwei- bis viermal häufiger betroffen als Männer.¹

Die Rheumatoide Arthritis ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung, die schubweise progredient verläuft. Durch Synovialitis kommt es zu Arthritis, Bursitis und Tendovaginitis. Meist besteht initial ein symmetrischer Befall der kleinen Gelenke an Händen und Füßen, insbesondere der Metacarpophalangealgelenke und proximalen Interphalangealgelenke. Die chronische Entzündungsreaktion führt zu Pannusbildung, progredienter Knorpelzerstörung und Knochenerosionen. Die dadurch verursachten klinischen Symptome reichen von Schmerzen, Gelenkdeformation und funktioneller Beeinträchtigung bis hin zur Invalidität. Außerdem können neben unspezifischen Allgemeinsymptomen wie Abgeschlagenheit, nächtlichem Schwitzen und Myalgien auch Rheumaknoten, Nagelveränderungen sowie fakultative extraartikuläre Organmanifestationen auftreten. Die systemischen Auswirkungen der Rheumatoiden Arthritis umfassen unter anderem kardiovaskuläre, hämatologische, pulmonale, psychologische und skelettale Erkrankungen. Durch die Rheumatoide Arthritis werden jährlich erhebliche sozioökonomische Kosten verursacht.²⁻⁵

Unbehandelt verläuft die Rheumatoide Arthritis rasch progredient. Noch vor 25 Jahren wurde die Diagnose erst nach durchschnittlich zwei Jahren gestellt. Der Grundsatz der konventionellen Therapie war die „Behandlungspyramide“. Die konventionelle Therapie der Rheumatoiden Arthritis bestand darin, dass die therapeutischen Maßnahmen im Krankheitsverlauf entsprechend den klinischen Symptomen intensiviert wurden.⁶ Hierbei wurde bis in die fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung nur ein DMARD (engl. disease modifying antirheumatic

drug) eingesetzt. In den 1960er und 1970er Jahren waren die einzigen vorhandenen DMARDs Gold und Penicillamin.⁷ Das konventionelle Therapieregime war unzufriedenstellend. Trotz der Therapie mit einem DMARD führte die Rheumatoide Arthritis weiterhin häufig zu Invalidität, chronischen Schmerzen und Frühberentung. Auch die Mortalität lag bei 20% innerhalb von 10 Jahren nach Krankheitsbeginn.⁸

In den 1980er Jahren wurde Methotrexat (MTX) als neues DMARD entdeckt. Methotrexat vermochte die Knochenerrosionen hinauszuzögern und diese sogar zu verhindern.⁹ In verschiedenen Studien wurde nun der frühzeitige und aggressive Einsatz von Methotrexat innerhalb der ersten Monate nach Diagnosestellung untersucht. Es konnte eine signifikante Reduktion der beschriebenen Auswirkungen der chronischen Entzündungsreaktion festgestellt werden.¹⁰⁻¹³ Daraufhin wurden die Therapieempfehlungen für die Rheumatoide Arthritis grundlegend überarbeitet und angepasst. Methotrexat wurde zum First-Line-DMARD der Rheumatoiden Arthritis.⁷

Durch eine gemeinsame Arbeitsgruppe des American College of Rheumatology (ACR) und der European League Against Rheumatism (EULAR) wurde 2010 schließlich ein neuer Ansatz zur Klassifikation der Rheumatoiden Arthritis entwickelt. Hierbei wurde der Focus auf die Erkennung der Symptome in frühen Stadien der Erkrankung gelegt, die mit einem erosivem Krankheitsverlauf oder einer Krankheitspersistenz verbunden sind. Die Kriterien umfassen das Auftreten von Synovitis in mindestens einem Gelenk in Abwesenheit einer anderen Diagnose, welche die Beschwerden besser erklärt, sowie das Erreichen von 6/10 Punkten in vier Kategorien: Anzahl und Ort der involvierten Gelenke (0-5 Punkte), positive Serologie (0-3 Punkte), erhöhte Akute-Phase-Antwort (0-1 Punkt) und Symptombdauer (zwei Level mit 0-1 Punkten).

Durch diese neue Klassifikation wurde eine frühere Diagnosestellung und der frühere Beginn einer effektiven krankheitssupprimierenden Therapie ermöglicht.¹⁴ Das Ziel der Therapie ist eine klinische Remission der Erkrankung zu erreichen, oder zumindest eine Reduktion der Krankheitsaktivität.^{15, 16}

Da eine Methotrexat-Monotherapie nur bei einem kleinen Teil der Patienten effektiv ist, wird diese heute durch zielgerichtete Therapieverfahren mit

monoklonalen Antikörpern ergänzt. Diese stellen einen weiteren bedeutenden Fortschritt in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis dar.

In den aktuellen Therapieleitlinien der EULAR von 2013 wird als First-Line-Therapie ein konventionelles synthetisches DMARD, vorzugsweise Methotrexat, in Kombination mit Glukokortikoiden empfohlen. Wenn das Therapieziel nicht innerhalb von sechs Monaten erreicht werden kann oder sich nach drei Monaten kein Ansprechen auf die First-Line-Therapie zeigt, erfolgt der Ausbau der Therapie mit einem biologischen DMARD oder einem anderen konventionellen synthetischen DMARD (Sulfasalazin, Leflunomid).

Aktuell verfügbare biologische DMARDs (sog. Biologika) sind TNF-Inhibitoren (Adalimumab, Certolizumab Pegol, Etanercept, Golimumab, Infliximab), der T-Zell-Kostimmulationsinhibitor Abatacept, der IL6-Rezeptor-Blocker Tocilizumab und Rituximab. Rituximab wird nur unter gewissen Umständen, insbesondere bei einem unzureichenden Ansprechen auf eine TNF-Inhibitor-Therapie oder bei Kontraindikationen für andere Biologika als First-Line-Biologikum gegeben. Wenn die First-Line-Therapie mit einem biologischen DMARD versagt, kann ein anderes biologisches DMARD eingesetzt werden. Darüber hinaus wird in den Empfehlungen Tofacitinib, ein synthetisches DMARD, aufgeführt, welches auf Janus Kinasen (JAKs) abzielt.¹⁷

1.2. B-Zellen

1.2.1. B-Zellen als Träger der humoralen Immunität

Das Immunsystem dient der Erkennung und Elimination körperfremder potentiell pathologischer Erreger bei der gleichzeitigen Gewährleistung von Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen. Es besteht aus dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem.

Im gesunden Körper besteht ein Gleichgewicht zwischen der Verhinderung einer Autoimmunerkrankung und der Aufrechterhaltung der Immunkompetenz. Bei Autoimmunerkrankungen kommt dieses Gleichgewicht durch Störung einzelner Toleranzmechanismen aus der Balance. Hierdurch werden Effektorfunktionen ausgelöst und es kommt zum Auftreten von Autoimmunphänomenen. Sind diese Ursache einer Gewebeschädigung, spricht man von einer Autoimmunerkrankung.^{18, 19}

Die angeborenen Abwehrsysteme beruhen auf unveränderlichen Rezeptoren (z.B. Toll-like Rezeptoren), die allgemein vorkommende Merkmale von Krankheitserregern erkennen können. Die Gene der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems werden als funktionsfähige Gene weitervererbt. Sie können schnell und unspezifisch auf körperfremde, potentiell pathogene Erreger reagieren. Sie sind jedoch nicht in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln. Die spezifische Reaktion auf einen Krankheitserreger und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses zur besseren Reaktion auf eine erneute Infektion sind die einzigartigen Merkmale des adaptiven Immunsystems.²⁰

B-Zellen machen zusammen mit den T-Zellen die wesentlichen Elemente des adaptiven Immunsystems aus. T-Zellen sind an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt, während B-Zellen durch die Produktion von Antikörpern die Träger der humoralen Immunantwort sind.²¹

Antikörper sind aus zwei leichten und zwei schweren Polypeptidketten bestehende, Y-förmige tetramere Proteine, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Sie sind die sezernierte Form des B-Zell-Rezeptors. Jeder Antikörper hat zwei identische Antigenbindungsstellen, die sogenannten variablen Regionen

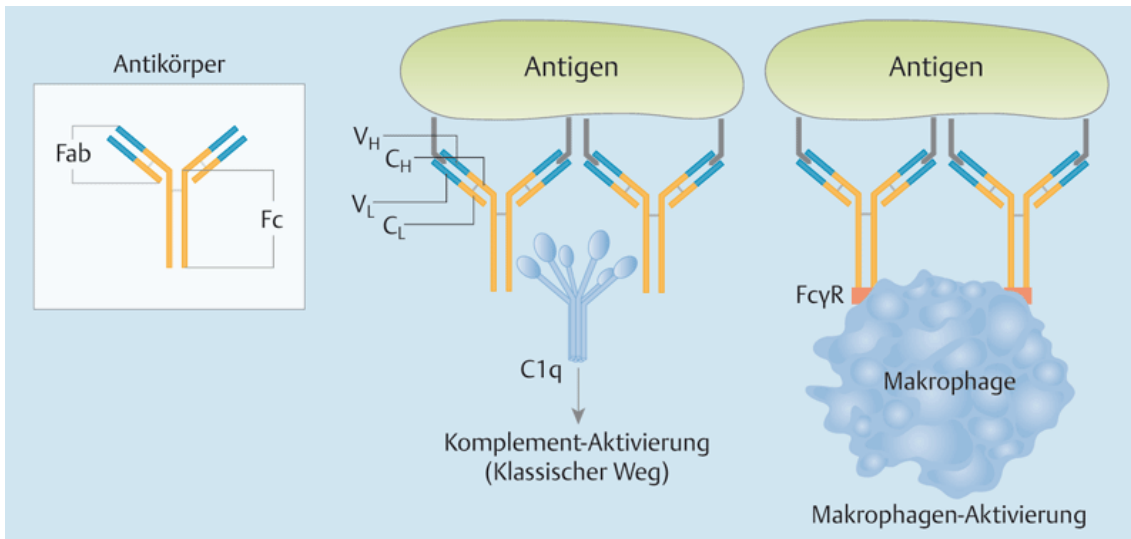


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Antikörperaufbaus und der Effektorfunktionen²²

des Antikörpers (V-Regionen), auch Fab-Segment genannt. Ihre Aufgabe ist einerseits die Antigenbindung und andererseits die Wechselwirkung mit Rezeptormolekülen und Zellen. Neben den V-Regionen besteht ein Antikörper aus einer konstanten Region, dem sogenannten Fc-Teil, der für antikörpervermittelte Effektorfunktionen von großer Bedeutung ist (siehe auch Abb. 1).²² Es gibt fünf verschiedene Klassen von Antikörpern: IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. Die Klassen (Isotypen) und damit die Effektorfunktionen des Antikörpers werden durch die schweren Ketten festgelegt. Insgesamt gibt es drei Gruppen von Immunglobulinketten: Die schweren Ketten mit fünf Isotypen (μ , δ , γ , α und ϵ) und zwei gleichwertige Typen von leichten Ketten (κ und λ). Ein Immunglobulin hat entweder nur λ - oder nur κ -Leichtketten. Das Verhältnis von κ zu λ beträgt etwa 2:1.²³

Die V-Gensegmente lassen sich in Familien einteilen, deren Mitglieder mindestens 80% der DNA-Sequenz gemeinsam haben. Die V-Gensegmente der schweren Kette (V_H) und der κ -Leichtkette (V_κ) bestehen aus sieben Familien, die der λ -Leichtkette (V_λ) aus zehn Familien.^{24, 25} Die Immunglobulinsegmente, die jede dieser V-Ketten kodieren, liegen in drei

Clustern, dem Kappa Locus, dem Lambda Locus und dem Locus für die schwere Kette, vor.

Der Kappa Locus der leichten Kette befindet sich auf Chromosom 2 (2q11.2).²⁶ Hinter einer Gruppe von 40 V_{κ} -Gensegmenten liegt eine Gruppe von 5 J_{κ} -Gensegmenten und dahinter ein einzelnes C_{κ} -Gen. Der V_{κ} -Locus lässt sich in zwei Kassetten unterteilen. Die eine Kasette liegt proximal zu den 5 J_{κ} -Gensegmenten (Downstream-Kasette), die andere liegt distal zu diesen (Upstream-Kasette). Der Abstand der Upstream-Kasette von den nächsten J_{κ} -Genen beträgt etwa 1500 bis 2000 kb. Die Upstream-Kasette und die Downstream-Kasette liegen zueinander invertiert mit gegenläufiger 5'3'-Polarität.²⁷

Der Lambda Locus der leichten Kette liegt auf Chromosom 22 (22q11.2). Insgesamt gibt es 30 V_{λ} -Teilgene, die in zehn V_{λ} -Familien eingeteilt werden. Die V_{λ} -Familien sind in drei Clustern angeordnet: Cluster A ($V_{\lambda}2$ und 3), Cluster B ($V_{\lambda}1, 5, 7$ und 9) und Cluster C ($V_{\lambda}4, 6, 8$ und 10), an die sich vier J_{λ} -Gensegmente, jedes verbunden mit einem C_{λ} -Gen, anschließen. Cluster A liegt am proximalsten, Cluster C am distalsten mit 600kb Distanz zu den nächsten J_{λ} -Genen.^{24, 25}

Der Locus der schweren Kette liegt auf Chromosom 14 (14q32.33) und ähnelt in der Organisation der des Kappa-Locus mit separaten Gruppen von V_{H-} , D_{H-} und J_{H-} -Gensegmenten sowie von C_{H-} -Genen. Ein wesentlicher Unterschied besteht jedoch in dem Vorkommen von verschiedenen C-Regionen, die hintereinander angeordnet sind und jeweils einem anderen Isotyp entsprechen. Die schweren Ketten können aus 65 V_{H-} , 27 D_{H-} , und sechs J_{H-} -Teilgenen zusammengesetzt werden.^{23, 28}

Die Sequenzvariabilität der variablen Region ist nicht gleichmäßig verteilt, sondern konzentriert sich in bestimmten Abschnitten, den sogenannten hypervariablen Regionen. In der Tertiärstruktur des Antikörpers bilden die hypervariablen Regionen die Antigenbindungsstelle, deren Oberflächenstruktur sich zum Antigen komplementär verhält. Daher bezeichnet man sie auch als komplementaritätbestimmende Regionen (complementarity determining regions; CDR 1-3).²³ Durch B-Zellen können Antikörper sezerniert werden und/oder als

membranständiges Oberflächenmolekül exprimiert werden. Bei Expressierung an der Oberfläche der B-Zellen erfolgt durch Assoziation mit dem Heterodimer Ig α /Ig β die Ausbildung des B-Zell-Rezeptors.²⁹

1.2.2. Entstehung der Immunglobulinvielfalt

Für die Erzeugung der Immunglobulinvielfalt sind vier grundlegende Mechanismen verantwortlich. Zum einen wird das Immunglobulin durch eine zufällige Rekombination von V-, J- und im Falle der schweren Kette D-Gensegmenten gebildet. Dieser Mechanismus wird V(D)J-Rekombination genannt. Die hierdurch entstehende kombinatorische Diversivität ist für einen großen Teil der Vielfalt der variablen Regionen der leichten und schweren Kette verantwortlich.³⁰

Außerdem entsteht an den Verknüpfungsstellen zwischen verschiedenen Gensegmenten durch Addition und Deletion einzelner Nukleotide während des Rekombinationsvorganges zusätzlich eine junktionale Vielfalt.³¹

Ein dritter Mechanismus besteht darin, dass sich verschiedene variable Regionen der schweren und der leichten Kette in unterschiedlichen Kombinationen paarweise zusammenlagern, um die Antigenbindungsstelle im Immunglobulinmolekül zu bilden. Somit ist dieser Mechanismus auch kombinatorischen Ursprungs.

Nimmt man nur die beiden kombinatorischen Mechanismen, dann können allein durch diese schon $1,9 \times 10^6$ verschiedene Antikörpermoleküle entstehen. Zusammen mit der junktionalen Vielfalt entsteht somit ein von naiven B-Zellen exprimiertes Rezeptorrepertoire von etwa 10^{11} . Die Gene müssen jeweils erfolgreich umgeordnet werden, damit die Zelle in den nächsten Entwicklungsschritt eintreten kann. Ein solches Rearrangement wird produktiv genannt. Insgesamt ist nur etwa ein Drittel der Rearrangements produktiv.²³

Zusätzlich zu diesen drei Mechanismen, welche in naiven B-Zellen des Knochenmarks ablaufen, gilt die somatische Hypermutation als ein weiterer wichtiger Mechanismus, der zur Entstehung der Immunglobulinvielfalt beiträgt. Diese erfolgt im Keimzentrum in reifen, aktivierten B-Zellen. Hierbei kommt es durch Akkumulation von Punktmutationen (Nukleotidtausch) an bestimmten

Stellen der variablen Regionen des Immunglobulins zu Änderungen der Polypeptidsequenz des Antikörpers.^{32, 33}

1.2.3. B-Zell-Entwicklung

1.2.3.1. B-Zell-Entwicklung im Knochenmark

Im Knochenmark entwickeln sich B-Zellen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen. Die Prä-Pro-B-Zelle ist die früheste Zelle, die der B-Zelllinie zugeordnet wird. In diesem Differenzierungsstadium liegen die Immunglobulingene noch als Gensegmentgruppen in Keimbahnkonfiguration vor.³⁴

Die nächste Stufe in der Differenzierungsreihe stellen die Pro-B-Zellen dar. In den Pro-B-Zellen findet die Rekombination der schweren Ketten statt.

Zunächst erfolgt in den frühen Pro-B-Zellen die Umordnung der D- und J_H-Gensegmente. Anschließend erfolgt in den späten Pro-B-Zellen die Verknüpfung von V_H und DJ_H. Im Falle einer produktiven Rekombination wird hierdurch die membrangebundene schwere μ -Kette gebildet, wodurch das Stadium der Prä-B-Zelle erreicht wird.^{35, 36}

Die großen Prä-BI-Zellen (CD20-) exprimieren die schwere μ -Kette zusammen mit einem Ersatz für die leichte Kette in Form eines Prä-B-Zell-Rezeptors auf der Zelloberfläche. Durch den Prä-B-Zell-Rezeptor wird die Proliferation und mehrmalige Zellteilung der großen Prä-BI-Zellen ausgelöst. Die Prä-BI-Zellen entwickeln sich schließlich zu den kleinen Prä-BII-Zellen (CD20+). Diese exprimieren keinen Prä-B-Zell-Rezeptor mehr und verfügen nur noch über intrazelluläre schwere μ -Ketten.^{35, 37, 38}

In den kleinen Prä-BII-Zellen erfolgt nun die VJ-Rekombination der leichten Kette. Nach dem erfolgreichen Umlagern der V_L- und J_L-Gensegmente geht die Prä-BII-Zelle ins Stadium einer unreifen (immature) B-Zelle über. Diese exprimiert nun ein IgM-Rezeptormolekül auf der Oberfläche. Die unreifen B-Zellen verlassen schließlich das Knochenmark und werden als Transitionalzellen bezeichnet (siehe Abb. 2).^{35, 39, 40}

1.2.3.2. B-Zell-Entwicklung außerhalb des Knochenmarks

Die Transitionalzellen entwickeln sich in der Peripherie über verschiedene Entwicklungsstufen weiter. Reife B-Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass bei ihnen durch alternatives Spleißen auch IgD-Rezeptoren gebildet werden. Zudem wird das bei unreifen B-Zellen noch exprimierte CD10 in reifen B-Zellen herunterreguliert. CD19 wird in allen B-Zell-Stadien exprimiert. Bis zu ihrem ersten Antigenkontakt werden die reifen B-Zellen als naive B-Zellen bezeichnet.^{35, 41, 42}

In den sekundären lymphatischen Organen, wie Milz und Lymphknoten, sowie im peripheren Blut finden sich vor allem naive, folliculäre IgM- und IgD-positive B-Zellen (mature naive) und Marginalzone(MZ)-B-Zellen. MZ-B-Zellen werden nach ihrer anatomischen Lokalisation in der Marginalzone eines Lymphknotens benannt und stellen im Mausmodell eine sessile B-Zell-Subpopulation dar. Sie bilden eine erste Abwehr, hauptsächlich gegen T-Zell-unabhängige Antigene (siehe Abb. 2).⁴³

Als T-Zell-unabhängige Antigene kommen vor allem im Blut befindliche bakterielle und virale Antigene infrage. MZ-B-Zellen haben die Fähigkeit stark auf antigene und polyklonale Aktivatoren zu reagieren, wodurch sie eine entscheidende Rolle in der frühen Antwort auf pathogene Keime in der Blutbahn spielen. Hierdurch wird die Lücke zur langsameren adaptiven Antikörperantwort geschlossen, welche hauptsächlich durch die mehr proliferativen folliculären B-Zellen erfolgt.^{43, 44}

Während der T-Zell-unabhängigen Aktivierung der B-Zellen erfolgt allein durch eine Kreuzvernetzung der B-Zell-Rezeptoren die B-Zell-Aktivierung, B-Zell-Vermehrung und Ig-M-Antikörperbildung. Ein Immunglobulinklassenwechsel und die Ausbildung von B-Gedächtniszellen unterbleiben.⁴³

Die T-Zell-abhängige Aktivierung von B-Zellen führt nach dem Antigenkontakt naiver B-Zellen mit einem T-Zell-abhängigen Antigen in den Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe zur Teilung der aktivierten B-Zellen (Zentroblasten) in vielfache Zellklone. Diese klonale Expansion wird durch eine somatische Hypermutation begleitet.

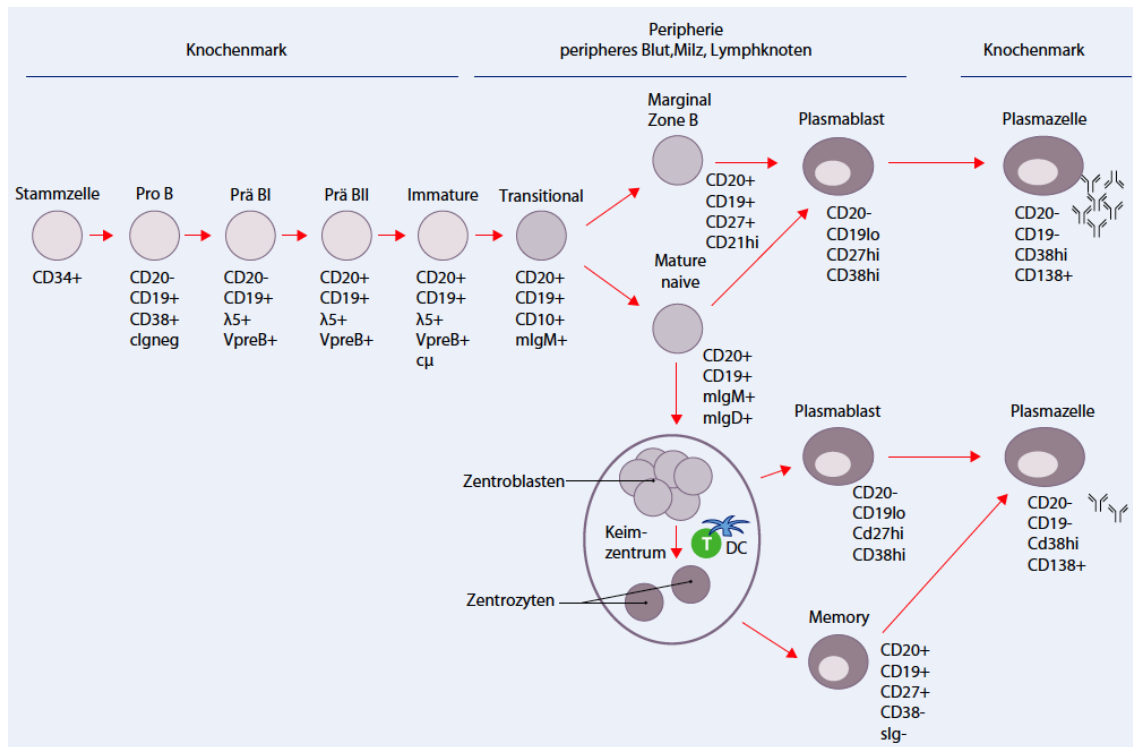


Abbildung 2: Vereinfachtes Schema der B-Zell-Entwicklung mit einer Auswahl der exprimierten Oberflächenmoleküle⁴¹

Bei der somatischen Hypermutation verändert sich durch die Akkumulation von Punktmutationen an bestimmten Stellen der variablen Regionen des Immunglobulins die Polypeptidsequenz der leichten und schweren Immunglobulinketten.^{32, 33}

Die Verteilung der Mutationen während der somatischen Hypermutation geschieht nicht zufällig, sondern durch Bevorzugung bestimmter Bereiche, welche man Hotspots nennt. Sie bestehen aus kurzen Motiven mit vier Nukleotiden und werden als RGYW und dazu komplementär verlaufend WRCY bezeichnet (R für Adenin oder Guanin, Y für Cytosin oder Thymin, W für Adenin oder Thymin, G für Guanin und C für Cytosin).^{45, 46} Punktmutationen, welche die Aminosäuresequenz und damit die Proteinstruktur ändern, werden Austauschmutationen (replacement mutations, R) genannt. Findet eine solche Punktmutation jedoch innerhalb eines Basentriplets statt, welche zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz führt, so liegt eine stille Mutation (silent

mutation, S) vor. Stille Mutationen sind über die gesamte variable Region verteilt.⁴⁷⁻⁴⁹

Nach dem Ende des Zellzyklus migrieren die B-Zellen als Zentrozyten in einen Bereich mit follikulären dendritischen Zellen, welche auf ihrer Oberfläche Antigen präsentieren. Zentrozyten, die durch somatische Hypermutation einen B-Zell-Rezeptor mit größerer Affinität für das Antigen besitzen, werden nun vorwiegend selektiert. Dieses Phänomen bezeichnet man als Affinitätsreifung. Hierdurch kommt es zur Ausbildung von B-Zellen mit hochaffinen B-Zell-Rezeptoren mit der Fähigkeit zur Bildung hochaffiner Antikörper.⁵⁰

Anfangs exprimiert jede B-Zelle nur IgM und IgD als Antigenrezeptoren. Der erste Antikörper einer Immunantwort ist daher auch immer IgM. Um Antikörper ausbilden zu können, die bei gleicher Antigenspezifität verschiedene Effektorfunktionen besitzen, wird ein Isotypwechsel vorgenommen. Hierbei wird die C μ -Region des Immunglobulins durch die C-Region einer anderen schweren Kette (δ , γ , α oder ϵ) ersetzt. Somit können die spezifischen Nachkommen einer einzelnen B-Zelle nun auch Antikörper der Klassen IgG, IgA und IgE exprimieren.⁵¹

Nach dem Isotypwechsel verlassen die Zentrozyten das Keimzentrum als langlebige B-Gedächtniszellen (memory B cells) oder als frühe Plasmazellen.^{52, 53} Die frühen Plasmazellen migrieren in das Knochenmark und in die Nischen der sekundären lymphatischen Organe. Dort erfolgt eine Differenzierung zu langlebigen Plasmazellen, die hochaffine Immunglobuline synthetisieren und freisetzen. Diese terminal differenzierten Plasmazellen zirkulieren nicht mehr und haben die B-Zell-spezifischen Antigene CD20 und CD19 herunterreguliert.⁵⁴⁻⁵⁸

Die B-Gedächtniszellen rezirkulieren durch die sekundären lymphatischen Organe. Durch die Expression des Markers CD27 können B-Gedächtniszellen (CD27+) von naiven B-Zellen unterschieden werden (CD27-) (siehe Abb. 2).⁵⁹

1.2.4. Sekundäre V(D)J-Rekombination und Autoimmunität

Durch die ungerichteten molekularen Mechanismen zur Generierung von Immunglobulinvielfalt kommt es gleichzeitig auch zur Entstehung von autoreaktiven Immunglobulinen. Ein autoreaktiver Rezeptor wird von bis zu 75% aller unreifen B-Zellen des Knochenmarks exprimiert. Mit der Differenzierung zu reifen peripheren B-Zellen verringert sich jedoch der Anteil an autoreaktiven B-Zellen.¹⁸ Als der dominierende Mechanismus zur Aufrechterhaltung zentraler B-Zell-Toleranz wurde das „Rezeptor Editing“ identifiziert.⁶⁰ Hierbei kommt es zum Austausch eines autoreaktiven Rearrangements durch Rekombination weiter distal liegender Gensegmente. Rezeptor Editing wurde im transgenen Mausmodell anhand von B-Zellen, die ein autoreaktives Immunglobulin produzieren, untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass durch Rezeptor Editing ein neues Immunglobulin entstehen kann, welches nicht mehr für einen autoreaktiven Rezeptor kodiert.⁶¹⁻⁶³ Hierdurch kann die drohende Apoptose der autoreaktiven B-Zelle verhindert werden.^{64, 65} Nach Schätzungen werden bis zu 25% aller Immunglobuline durch eine solche sekundäre V(D)J-Rekombination gebildet.⁶⁶

Außerhalb des Knochenmarks kann es auch zu einer sekundären V(D)J-Rekombination in reifen B-Zellen kommen. Dieses Phänomen wird als „Rezeptor Revision“ bezeichnet.⁶⁷ Es wird angenommen, dass unregulierte oder aberrante Rezeptor Revision zu der Entstehung autoreaktiver Immunglobuline beitragen kann.^{60, 68} Hinweise für eine aberrante Rezeptor Revision außerhalb sekundärer lymphatischer Organe fanden sich bei Patienten mit Systemischem Lupus Erythematoses. Es konnte in B-Zellen die gehäufte Verwendung von distalen V_K- und J_K-Gensegmenten als Anzeichen einer vermehrten sekundären V(D)J-Rekombination gefunden werden.^{69, 70}

Auch bei der Rheumatoiden Arthritis fanden sich in Studien Hinweise auf eine aberrante Rezeptor Revision. So wurden in den B-Zellen des Synovialgewebes Anzeichen einer aktiven Rezeptor Revision gefunden.^{71, 72} Im Blut dieser Patienten fanden sich vermehrt B-Zellen, die nach sekundärer V(D)J-Rekombination ein Immunglobulin und einen Prä-B-Zell-Rezeptor exprimierten.⁷³⁻⁷⁶

1.2.5. B-Zellen und Rheumatoide Arthritis

In den 1940er Jahren wurde durch die Entdeckung des Rheumafaktors und des gehäuftten Vorkommens von Plasmazellen und aktivierten B-Lymphozyten in der Synovia von Patienten mit Rheumatoider Arthritis die Bedeutung von B-Zellen in der Pathogenese dieser Autoimmunerkrankung erstmals erkannt.⁷⁷ Nachdem sich jedoch gezeigt hatte, dass der Rheumafaktor nur eine geringe Sensitivität und Spezifität aufweist, ließ der Forschungsdrang für B-Zellen und von ihnen produzierte Autoantikörper nach. Der Fokus wanderte zu anderen Komponenten des Immunsystems wie T-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und Fibroblasten.⁷⁸

Das erneute Interesse für die Rolle der B-Zellen in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis wurde durch die Entdeckung von Autoantikörpern gegen zyklische citrullinierte Peptide (anti-CCP) ausgelöst.⁷⁹ Es zeigte sich, dass die Produktion von Rheumafaktoren und anderen Autoantikörpern, wie anti-CCP, direkt oder als Immunkomplex zu einer synovialen Entzündungsreaktion und Gewebeschädigung führen können.⁸⁰⁻⁸²

Darüber hinaus besitzen B-Zellen die Möglichkeit die Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis durch weitere Mechanismen zu beeinflussen. B-Zellen können als Antigen präsentierende Zellen agieren und dadurch das Immunsystem modulieren. Über MHC-II-Moleküle werden Autoantigene präsentiert und es kommt zu einer Heraufregulierung von kostimulatorischen Molekülen (CD80/B7.1, CD86/B7.2). Hierdurch kann es zu einer T-Zell-Aktivierung kommen, wobei die membranständigen, autoreaktiven Immunglobuline die Rezeptoren zur Antigenbindung bilden.⁸³⁻⁸⁸

B-Zellen können außerdem die Entzündungsreaktion beeinflussen, indem sie proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-(IL)-6, TNF- α und Lymphotoxin- β , produzieren.⁸⁹⁻⁹¹ Zudem können B-Zellen Chemokine produzieren, welche die Migration und die Funktion von dendritischen Zellen und CD4+ T-Zellen modulieren (vergleiche Abb. 3).^{92, 93}

Es konnte gezeigt werden, dass Rheumafaktor produzierende B-Zellen besonders effektiv Immunkomplexe für T-Zellen präsentieren können.⁹⁴ Zudem kann durch den Rheumafaktor die B-Zell-Aktivierung gefördert werden, wodurch

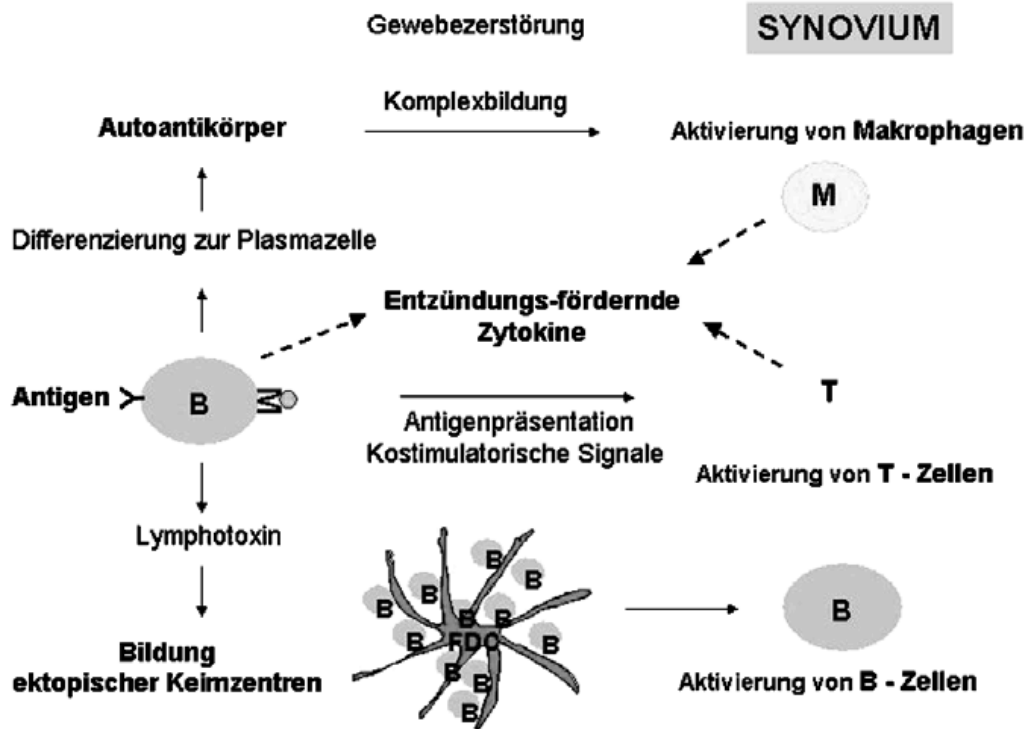


Abbildung 3: Schematische Darstellung der verschiedenen Funktionen von B-Zellen in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis¹⁰⁶

wiederum die Produktion des Rheumafaktors aufrechterhalten wird. Zusammen mit der Immunkomplex vermittelnden Komplementaktivierung könnte dies zur Unterhaltung der lokalen Entzündungsreaktion und somit zur Gewebeerstörung beitragen.⁸²

Bei bis zu 40% der Patienten mit Rheumatoider Arthritis konnten ektopische lymphatische Strukturen nachgewiesen werden. Diese können von kleineren Ansammlungen an T- und B-Zellen bis zu ausgeprägten follikelartigen, keimzentrumsähnlichen Strukturen reichen, die in engem Kontakt mit der Synovialmembran stehen. In diesen Aggregationen werden von verschiedenen Zelltypen Lymphotoxine und B-Zell-spezifische Chemokine wie CXCL13, CXCL12 und CCL19 produziert. Diese fördern die Migration von B-Zellen, die Akkumulation im Gewebe und die Bildung von Keimzentren innerhalb der Synovia.⁹⁵ Ein höheres Grundlevel an CXCL13 scheint mit einer niedrigeren Effektivität der durch Rituximab induzierten peripheren B-Zell-Depletion und

einer schnelleren Regeneration der B-Zellen nach Depletion assoziiert zu sein.⁹⁶

Der erfolgreiche Einsatz B-Zell-gerichteter Therapieverfahren hat entscheidend zum wachsenden Verständnis bezüglich der zentralen Rolle der B-Zellen in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beigetragen.⁹⁷⁻¹⁰¹

Insbesondere der erfolgreiche klinische Einsatz des B-Zell-depletierenden Anti-CD20-Antikörpers Rituximab bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis stellte einen entscheidenden Durchbruch in der Therapie von Autoimmunerkrankungen dar.¹⁰² Neue, gegen B-Zellen gerichtete Therapieansätze zeigen in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis, aber auch in der Therapie von anderen Autoimmunerkrankungen, wie Kollagenosen, systemischen Vaskulitiden oder der Multiplen Sklerose Erfolg.^{97, 103-105}

Neben Rituximab befinden sich weitere technisch modifizierte Anti-CD20-Antikörper in der klinischen Entwicklung, wie zum Beispiel Ocrelizumab (humanisierter Antikörper)¹⁰⁷, Ofatumumab (humaner Antikörper)¹⁰⁸ oder TRU015, ein sogenanntes SMIP¹⁰⁹ (small modular immuno-pharmaceutical), welches nach Bindung an das CD20-Antigen zu einer dosisabhängigen B-Zell-Depletion führt. Neben einer besseren CD20-Bindung erhofft man sich durch die Anti-CD20-Antikörper der zweiten Generation eine reduzierte Antigenität.⁴¹ Zusätzlich werden auch neue Strategien in der B-Zell-gerichteten Therapie der Rheumatoiden Arthritis verfolgt. Diese beinhalten zum einen ein direktes Targeting weiterer B-Zell-Oberflächenmarker wie CD19, CD20 und CD22 sowie zum anderen ein indirektes Targeting, beispielsweise durch eine Blockade von Zytokinen und Wachstumsfaktoren.¹¹⁰⁻¹¹³

1.3. Rituximab

1.3.1. Rituximab und Rheumatoide Arthritis

Der anti-CD20 Antikörper Rituximab (MabThera®, Rituxan®) war das erste B-Zell-spezifische Therapeutikum, das für die Behandlung von Patienten mit Rheumatoider Arthritis zugelassen wurde. Rituximab ist ein gentechnisch produzierter chimärer, monoklonaler anti-CD20 Antikörper. Er besteht aus einer murinen variablen Region, welche an humanes Immunglobulin G gekoppelt ist (vergleiche Abb. 4).¹¹⁵

Durch die selektive Bindung von Rituximab an das CD20-Antigen auf der B-Zelle wird eine B-Zell-Depletion ausgelöst, von deren Wirkung die frühen Vorläufer-B-Zellen im Knochenmark (Prä-BI) und die terminal differenzierten Plasmazellen aufgrund der fehlenden CD20-Expression ausgespart bleiben.^{116, 117}

Die Erstzulassung für Rituximab erfolgte 1997 für die Therapie rezidivierender oder therapierefraktärer niedrig maligner Non-Hodgkin Lymphome. Zwischen 1999 und 2002 wurden erste Fallberichte und kleinere Studien bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis publiziert.¹¹⁸⁻¹²⁰

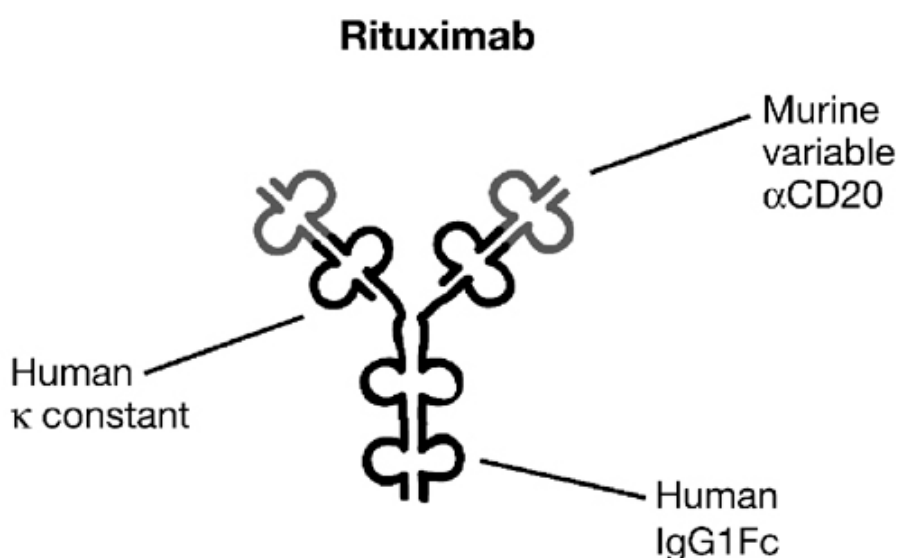


Abbildung 4: Die chimärische Struktur von Rituximab¹¹⁴

Im Jahr 2004 wurde schließlich die erste randomisierte, doppelblinde Phase-IIa-Studie zum Einsatz von Rituximab bei Rheumatoider Arthritis publiziert.¹⁰² Rituximab wurde in einer Dosierung von zweimal 1000 mg i.v. im Abstand von zwei Wochen in Kombination mit Methotrexat eingesetzt und erwies sich als effektiv.

Die Zulassung erfolgte im Jahr 2006 in Kombination mit Methotrexat für die Behandlung von Patienten mit mäßiger bis schwerer Rheumatoider Arthritis und ungenügendem Ansprechen oder Intoleranz auf mindestens einen TNF-Inhibitor. Bestehen Kontraindikationen für eine TNF-Inhibitor-Therapie, darf Rituximab auch primär eingesetzt werden.¹²¹ Die Zulassung basierte auf den Ergebnissen der REFLEX-Studie, einer randomisierten, doppelblinden Phase-III-Studie.¹²²

Bei Patienten mit inadäquatem Ansprechen auf eine TNF-Inhibitor-Therapie zeigte sich die zweimalige Gabe von 1000 mg Rituximab im Abstand von zwei Wochen in Kombination mit Methotrexat einer Behandlung mit Placebo in allen klinischen Parametern überlegen. Durch radiologische Daten konnte belegt werden, dass Rituximab in der Lage ist, die Gelenkzerstörung effektiv zu hemmen. Diese Ergebnisse wurden inzwischen durch weitere Studien bestätigt.^{102, 116, 122-127}

In der DANCER-Studie, einer randomisierten, doppelblinden Phase-IIb-Studie, wurden unterschiedliche Rituximab-Dosierungen und die Rolle der Glukokortikoide evaluiert. Rituximab wurde in zwei verschiedenen Dosierungen (500 oder 1000 mg) zweimal als intravenöse Infusion an Tag eins und Tag 15 in Kombination mit Methotrexat gegeben und mit der Gabe von Placebo und Methotrexat verglichen. In der Gruppe mit Gabe von 1000 mg Rituximab fand sich häufiger eine nahezu vollständige klinische Remission als in der Gruppe mit Gabe von 500 mg Rituximab.¹²⁴

Die Verträglichkeit von Rituximab wird insgesamt als relativ günstig eingeschätzt. Bei bis zu 35% der Patienten wurden als häufigste Nebenwirkung insbesondere bei der Erstgabe von Rituximab Infusionsreaktionen beobachtet. Die Rate an Infusionsreaktionen konnte durch eine Prämedikation mit Steroiden um 30% gesenkt werden. In randomisierten Studien zeigte sich die Rate an

schweren Infektionen im Vergleich zum Placebo leichtgradig erhöht. Insgesamt liegt der Anteil an schweren Infektionen aber in einem vergleichbaren Bereich mit anderen Biologika. Am häufigsten wurden Infektionen des oberen Respirationstraktes, Nasopharyngitiden, Sinusitiden, Bronchitiden und Harnwegsinfektionen beobachtet.^{122, 124, 128}

Es wurde auch untersucht, ob es vorteilhaft ist bei dem Versagen der primären TNF-Inhibitor-Therapie auf Rituximab zu wechseln oder einen zweiten TNF-Inhibitor zu geben. Gemäß den Daten einer Beobachtungsstudie erscheint es bei unzureichendem Ansprechen der primären TNF-Inhibitor-Therapie nach acht bis 16 Wochen effektiver, das Therapieregime auf Rituximab zu ändern, anstatt mit einem zweiten TNF-Inhibitor weiterzufahren.¹²⁹

In der IMAGE-Studie wurde der Einsatz von Rituximab mit Methotrexat bei Patienten mit Methotrexat-naiver Rheumatoider Arthritis untersucht. Hier konnte bei Patienten mit schlechter Prognose eine signifikante Verbesserung der Krankheitsremission, eine Prävention von Gelenkschäden und eine Verbesserung funktioneller Fähigkeiten im Vergleich zur Standardtherapie mit Methotrexat erzielt werden.¹³⁰

Zudem konnte in der GERINSIS-Studie gezeigt werden, dass bei Patienten mit Methotrexat Intoleranz eine Rituximab-Monotherapie oder Rituximab in Kombination mit Leflunomid als suffizienter Ersatz dienen kann.¹³¹

Nach der ersten Therapie mit Rituximab sollte eine Wiederbehandlung nach etwa sechs bis zwölf Monaten erwogen werden. Als Kriterien für eine Wiederbehandlung gelten eine Restaktivität (DAS-28 $\geq 3,2$) nach primärem Ansprechen auf die Therapie und/oder eine erneute klinische Verschlechterung. Die Entscheidung zur Wiederbehandlung sollte sich an der Krankheitsaktivität und nicht am Verlauf der peripheren B-Zellzahl orientieren. Während der Therapiepause ist eine genaue Beobachtung des Patienten erforderlich, um einen erneuten Schub der Erkrankung zwischen den Therapiezyklen zu vermeiden.^{81, 121, 132, 133}

Bisher liegen Daten zur Wiederbehandlung für bis zu 17 Behandlungen über einen Zeitraum von bis zu 9,5 Jahren vor. Sie zeigen bei weiterhin guter

Verträglichkeit eine anhaltende und teilweise sogar verbesserte Effektivität von Rituximab.^{116, 128, 131, 134, 135}

1.3.2. B-Zell-Depletion durch Rituximab

Die durch Rituximab induzierte CD20+ B-Zell-Depletion dauert in der Regel sechs bis neun Monate an. Die Pro-B-Zellen und Prä-BI-Zellen sowie die terminalen Plasmazellen werden dabei ausgespart, da sie CD20 nicht auf ihrer Oberfläche exprimieren.^{116, 117}

Die B-Zell-Depletion durch Rituximab wird durch verschiedene Mechanismen vermittelt. Daten aus der Untersuchung von Lymphomzellen zeigen, dass der Hauptmechanismus der durch Rituximab induzierten B-Zell-Depletion über die komplement- und antikörperabhängige Zytotoxizität vermittelt wird. Bei der komplementabhängigen Zytotoxizität kommt es durch die Bindung an das Komplementprotein C1q zur Zerstörung der Zellmembran und zur Lyse der Zelle. Hingegen wird die antikörperabhängige Zytotoxizität über Fcγ-Rezeptoren vermittelt und führt zu konsekutiver Membranschädigung.

Fcγ-Rezeptoren finden sich auf der Oberfläche von Granulozyten, Makrophagen, zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killer-Zellen.¹³⁷

Außerdem trägt Apoptose, welche nach Bindung von Rituximab an das CD20-Antigen auf den B-Zellen direkt vermittelt wird, zur B-Zell-Depletion bei (siehe Abb. 5).¹³⁸

Im peripheren Blut führt Rituximab zu einer Depletion der CD20+ B-Zellen auf weniger als fünf B-Zellen pro Mikroliter.¹³⁹ Etwa sechs bis neun Monate nach Rituximabinfusion sind gewöhnlich keine CD20+ B-Zellen mehr im Blut nachweisbar.¹¹⁷ Teilweise können erst nach über zwei Jahren wieder CD20+ B-Zellen im Blut nachgewiesen werden.¹⁴⁰

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die B-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut nach der CD20+ B-Zell-Depletion nach einem bestimmten Muster regenerieren. Die CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen regenerieren am langsamsten und verzögert.¹¹⁷

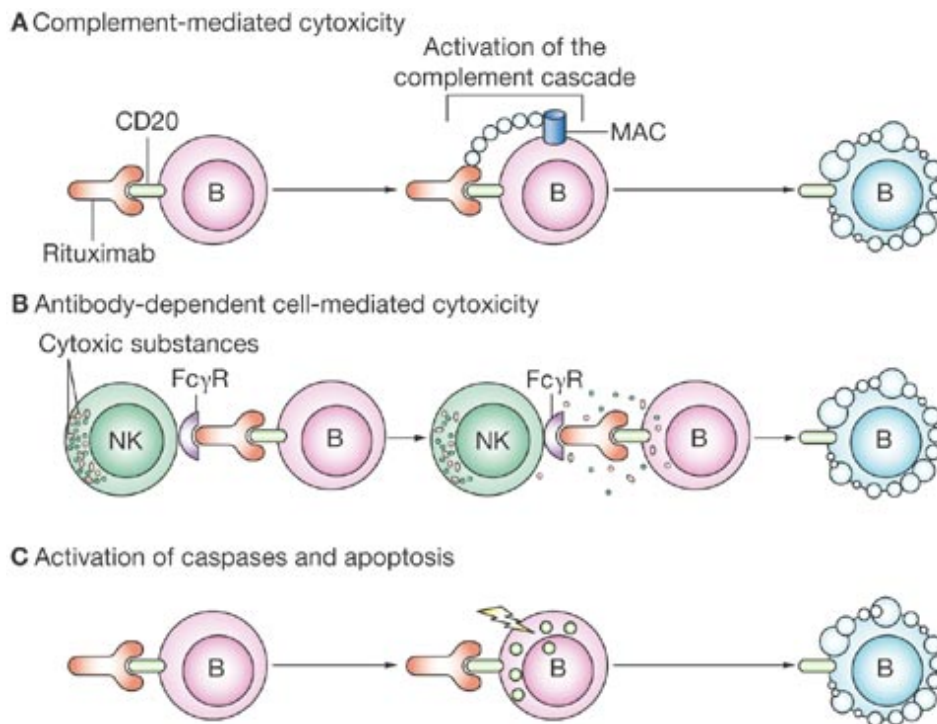


Abbildung 5: Übersicht über die unterschiedlichen Wirkmechanismen von Rituximab¹³⁶

Hingegen zeigt sich im synovialen Kompartiment sowie in den sekundären lymphatischen Organen nach Rituximabgabe nur eine unvollständige und zeitlich verzögerte B-Zell-Depletion.¹⁴¹

Auch im Tiermodell zeigten sich vor allem die Keimzentrum-B-Zellen und die MZ-B-Zellen relativ resistent gegenüber Anti-CD20-Antikörpern. Somit scheinen Lokalisation und Milieufaktoren für die Suszeptibilität gegenüber Anti-CD20-Antikörpern eine entscheidende Rolle zu spielen.¹⁴²

1.4. Fragestellungen

Bei der Analyse der V_H -Genrepertoires nach B-Zell-Depletion durch Rituximab konnten umfassende Veränderungen identifiziert werden.¹⁴³

Das Leichtkettenrepertoire ist im Vergleich zum V_H -Genom durch seine Genstruktur komplexer organisiert und schwieriger zu analysieren. Hierzu lagen bisher keine Untersuchungen vor. In dieser Arbeit soll der Einfluss von Rituximab auf das Kappa- und Lambda-Leichtkettenrepertoire in CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen des peripheren Blutes bei einer Patientin mit aktiver Rheumatoider Arthritis vor und nach der B-Zell-Depletion durch Rituximab untersucht werden, um mögliche Veränderungen im regenerierten CD19+CD27+ B-Gedächtniszellrepertoire zu identifizieren. Hierzu wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Gibt es Veränderungen des Kappa- und Lambda-Leichtkettenrepertoires der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen nach B-Zell-Depletion durch Rituximab?
Kommt es zu einer polyklonalen Neubildung des Leichtkettenrepertoires?
Stellt sich die Nutzung der Gensegmente wie bei einem Gesunden dar oder ist sie restringiert?
2. Gibt es Veränderungen in dem Mutationsmuster des Kappa- und Lambda-Leichtkettenrepertoires der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen nach B-Zell-Depletion durch Rituximab?
3. Gibt es Anzeichen für Rezeptor Revision im Kappa- und Lambda-Leichtkettenrepertoire der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen vor und nach B-Zell-Depletion durch Rituximab?

Es wurden zwei Untersuchungszeitpunkte gewählt. Der erste Zeitpunkt lag unmittelbar vor der Rituximabgabe, der zweite Zeitpunkt lag in der Regenerations-phase sieben Monate nach B-Zell-Depletion.

2. Material und Methoden

2.1. Patient

Die 35-jährige Patientin gab ihr Einverständnis zu dem Protokoll der Studie, welches in der Ethikkommission der Universität Würzburg beraten (Bearbeitungsnummer 2/08) und gemäß der Deklaration von Helsinki verfasst wurde. Die Diagnose aktive Rheumatoide Arthritis wurde nach den Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) gestellt.¹⁴⁴ Die Patientin war Rheumafaktor positiv und sprach nicht auf die Standardtherapie mit DMARDs an. Vor der zweimaligen Gabe von 1000 mg Rituximab im Abstand von zwei Wochen erfolgte die Therapie mit Methotrexat. Während der Studie wurden außer Methotrexat und Rituximab (MabThera[®]) keine weiteren antiinflammatorisch oder immunsuppressiv wirkenden Arzneimittel gegeben. Die Krankheitsaktivität wurde mit dem Disease Activity Score (DAS-28), der Messung der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und durch das Bestimmen des CRP-Wertes erfasst.

2.2. Sortierung von Einzelzellen

2.2.1. Vorbereitung der Zellen

Es wurden mononukleare Zellen des peripheren Blutes (sog. peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) verwendet. Zu deren Isolierung aus venösen Blut wurden 10 ml EDTA-Blut mit 10 ml NaCl 0,9% verdünnt, über 20 ml Ficoll-Paque[®] geschichtet und anschließend bei 2290 rpm unter Raumtemperatur für 25 Minuten zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurden die Blutbestandteile nach ihrer Dichte aufgetrennt. Aufgrund ihrer größeren Dichte reicherten sich die mononukleären Zellen in einer schmalen, ringförmigen Schicht zwischen Ficoll-Paque[®] und Blutplasma an, während Erythrozyten, Thrombozyten, polymorphkernige Leukozyten und tote Zellen durch das Ficoll-Paque[®] hindurch zentrifugiert wurden. Als nächstes konnte der Überstand abpipettiert und die mit

mononuklären Zellen angereicherte Schicht mit einer Pasteurpipette vorsichtig isoliert werden.

Anschließend wurden die CD19+ und CD27+ Oberflächenantigene der B-Gedächtniszelle mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern APC+ und PE angefärbt. Zu 1×10^7 PBMCs wurden jeweils 50 µl jedes Antikörpers gegeben und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde der Mix zweimal mit 10 ml RPMI Kulturmedium, bestehend aus 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS), 1% Penicillin-Streptomycin und 1% L-Glutamin, gewaschen und jeweils bei 1500 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das angefärbte Zellpellet in einem RPMI-Zellkulturmedium mit 50% RPMI und 40% FCS resuspendiert und über Miltenyi-Säulen mit einem Porendurchmesser von 30 µm gefiltert. Abschließend wurden die Zellen bei -80° C aufbewahrt.

2.2.2. Einzelzellsortierung

Zunächst wurden 3 ml des Lyse-Puffers aus DTT, Rinderserum-Albumin (BSA, bovine serum albumine), 10%-igem Triton, RNAsin, Oligo dT15 Primer und destilliertem Wasser hergestellt und pro Well einer 96-Well-Platte je 30 µl des Lyse-Puffers pipettiert (siehe auch Tab. 1).

Mit einem FACS DiVa Einzelzellsortierer wurde nun automatisch je Well eine CD19+CD27+ B-Gedächtniszelle auf eine 96-Well-Platte sortiert.

Komponenten	Konzentration	Volumen für 100 Wells	Endkonzentration pro Well (= 30 µl)
DTT	100 mM/ µl	150 µl	5 mM/ Well
RNAsen	40 U/ µl	50 µl	20 U/ Well
BSA	10 µg/ µl	5 µl	0,5 µg/ Well
Oligo dT15	800 ng/ µl	100 µl	400 ng/ Well
Triton	10%-ig	300 µl	1%-ig
RNAse freies H ₂ O	---	2445 µl	---

Tabelle 1: Komponenten des Lyse-Puffers

Der Zellsortierer erkennt die B-Gedächtniszellen aufgrund der durchgeführten Anfärbung seiner Oberflächenproteine CD19+ und CD27+ mit den spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern APC+ und PE. Nach dem Abschluss des Sortiervorganges wurde die 96-Well-Platte kurz zentrifugiert.

2.3. Synthese von cDNA

Als cDNA (complementary DNA) wird eine DNA bezeichnet, die mittels des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) aus RNA synthetisiert wird. Hierzu wurde zunächst der Upper Reaction Mix (URM), bestehend aus RT-PCR Puffer, Nucleotiden, reverser Transkriptase und destilliertem Wasser hergestellt (siehe Tab. 2). Nun wurden jeweils 20 µl URM zu der herunterzentrifugierten 96-Well-Platte mit je einer B-Zelle pro Well gegeben. Der RT-PCR Puffer führte zum Zerreißen der Zellmembran und zur Freisetzung der mRNA. Die freigesetzte mRNA wurde für eine Stunde bei 50° C inkubiert, wodurch der erste cDNA-Strang aus mRNA durch die im Upper Reaction Mix enthaltene Reverse Transkriptase synthetisiert wurde. Anschließend wurde die 96-Well-Platte bis zur weiteren Amplifikation bei 4° C im Kühlschrank eingelagert.

Komponenten	Konzentration	Volumen für 100 Wells	Endkonzentration pro Well (= 30 µl)
RT-PCR Puffer	5x	400 µl	1x
dNTPs	je 10 mM/ µl	40 µl	0,2 mM/ µl
Reverse Transkriptase	20 U/ µl	100 µl	20 U/ µl
RNAse freies H ₂ O	---	1460 µl	---

Tabelle 2: Komponenten des Upper Reaction Mix

2.4. DNA-Amplifikation mittels Nested-PCR

Bei der Nested-PCR wird in einem ersten Schritt ein bestimmtes DNA-Fragment, dessen Sequenzlänge größer ist als die Länge des gewünschten Endprodukts, mittels PCR vervielfältigt. Die hierbei eingesetzten Primer werden auch als externe Primer bezeichnet. In einem zweiten Schritt werden anschließend die DNA-Produkte aus der ersten PCR einer weiteren PCR unterzogen. Diesmal wird ein anderes Primerpaar, sogenannte interne Primer, eingesetzt. Diese lagern sich an eine Stelle innerhalb der Sequenz der DNA-Produkte aus der ersten Reaktion an. Die hieraus gewonnenen Fragmente sind das gewünschte Endprodukt. Die Nested-PCR hat zum Vorteil, dass einerseits fehlerhafte Sequenzen der ersten PCR aussortiert werden und auch kleinste Mengen an Template nachgewiesen werden können.

2.4.1. Nested-PCR der Kappa-Leichtketten-Rearrangements

Das Template wurde unter einem Laborabzug in den PCR-Ansatz pipettiert. Dies erfolgte in einem anderen Raum, um Kontamination zu vermeiden. Für die Amplifikation der Immunglobulingene wurden jeweils 5 µl cDNA zum PCR-Ansatz pipettiert.

2.4.1.1. Primer

Als externe Primer wurden eingesetzt:

M267-ExVk1,2-17: GCT CAG CTC CTG GGG CT,
M268-ExVk3-17: GGA A(AG)C CCC AGC (AGT)CA GC,
M269-ExVk4,5-19: CT(GC) TT(GC) CT(CT) TGG ATC TCT G,
M270-EXVk6,7-17: CT(GC) CTG CTC TGG G(CT)T CC,

M271-ExJk2-19: ACG TTT GAT CTC CAG CTT G,
M272-ExJk5-2: CTT ACG TTT AAT CTC CAG TC.

Als interne (nested) Primer wurden eingesetzt:

M273-IntVk1-21: CAT CCA G(AT)T GAC CCA GTC TCC,
M274-IntVk2-23: TCC AGT GGG GAT ATT GTG ATG AC,

M275-IntVk3-23: GTC T(GT)T GTC TCC AGG GGA AAG AG,
M276-IntVk4-22: GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT C,
M277-IntVk5-22: GGG CAG AAA CGA CAC TCA CGC A,
M278-IntVk6-23: TCC AGG GGT GAA ATT GTG (AC)TG AC,
M279-IntVk7-22: GCT GCA ATG GGG ACA TTG TGC T,

M280-IntJk2-21: CAG CTT GGT CCC CTG GCC AAA,
M281-IntJk5-20: CCA GTC GTG TCC CTT GGC CG.

Die verwendeten Primer besitzen eine 5'- nach 3'-Sequenz. Die externen Primer binden an das 5'-Ende der Führungssequenz, die internen (nested) Primer binden an das 5'-Ende der Frameworkregion 1. Sie wurden bereits in verschiedenen Publikationen beschrieben.^{145, 146}

2.4.1.2. Externe Amplifikation der Kappa-Rearrangements

Für die externe Amplifikation der Kappa-Rearrangements wurden zunächst zwei Reaktionsansätze hergestellt, die sich für eine Platte folgendermaßen zusammensetzten:

Der Lower Reaction Mix (LRM) für Kappa-Rearrangements der externen Amplifikation bestand aus:

- 1100 µl H₂O,
- 1120 µl MgCl₂ (25 mM),
- 160 µl dNTPs (je 10 mM),
- 40 µl des jeweiligen externen Vk-Primers (100 µM),
- 40 µl des jeweiligen externen Jk-Primers (100 µM).

Der Upper Reaction Mix (URM) für Kappa-Rearrangements der externen Amplifikation bestand aus:

- 4150 µl H₂O,
- 800 µl des 10x Puffer II und
- 50 µl der AmpliTaq DNA Polymerase (5U/µl).

Anschließend wurden 25 µl des jeweiligen LMR und 50 µl des jeweilige URM auf eine neue 96-Well-Platte pipettiert und je Well 5 µl cDNA dazugegeben.

2.4.1.3. Interne Amplifikation der Kappa-Rearrangements

Für die interne Amplifikation der Kappa-Rearrangements wurde ein Lower Reaction Mix und ein Upper Reaction Mix hergestellt, mit der nachfolgenden Zusammensetzung für jeweils eine Platte:

Der LRM für Kappa-Rearrangements der internen Amplifikation bestand aus:

- 1100 µl H₂O,
- 1120 µl MgCl₂ (25 mM),
- 160 µl dNTPs (je 10 mM),
- 40 µl des jeweiligen internen Vκ-Primers (100 µM),
- 40 µl des jeweiligen internen Jκ-Primers (100 µM).

Der URM für Kappa-Rearrangements der internen Amplifikation bestand aus:

- 4150 µl H₂O,
- 800 µl des 10x Puffer II und
- 50 µl der AmpliTaq DNA Polymerase (5U/µl).

Anschließend wurden je Well 5 µl des Produktes der externen PCR als Template dazugegeben. Die internen und externen PCR-Amplifikationen wurden mit dem Gene Amp PCR System 2400 durchgeführt. Das verwendete Amplifikationsprogramm bestand jeweils aus 36 Zyklen:

Ein Zyklus mit

- 7 min Denaturierung bei 95° C,
- 1 min Annealing bei 56° C,
- 1 min 30 s Elongation bei 72° C; anschließend

34 Zyklen mit

- 1 min Denaturierung bei 94° C,
- 30 s Annealing bei 56° C,
- 1 min 30 s Elongation bei 72° C und

ein Zyklus mit

- 1 min Denaturierung bei 94° C,
- 30 s Annealing bei 56° C,
- 5 min Elongation bei 72° C.

Die Produkte der Kappa-Amplifikation wurden anschließend bei 4° C im Kühlschrank gelagert.

2.4.2. Nested-PCR der Lambda-Leichtketten-Rearrangements

2.4.2.1. Primer

Es wurden folgende externe Primer verwendet:

M282-ExVI1-17: CCT GGG CCC AGT CTG TG,
M283-ExVI2-18: CTC CTC A(GC)(CT) CTC CTC ACT,
M284-ExVI3-18: TC(CT) TAT G(AT)G CTG AC(AT) CAG,
M285-ExVI4-17: C(AT)G C(CT)T GTG CTG ACT CA,
M286-ExVI5,9-17: CCC TCT C(GC)C AG(GC) CTG TG,
M287-ExVI6-19: TCT TGG GCC AAT TTT ATG C,
M288-ExVI7,8-19: ATT C(CT)C AG(AG) CTG TGG TGA C,
M289-ExVI10-17: CAG TGG TCC AGG CAG GG,

M290-ExJ1-17: AGG ACG GT(GC) A(GC)C T(GT)G GT.

Als interne Primer wurden verwendet:

M291-IntVI1-21: CCA GTC TGT G(CT)T GAC (GT)CA GCC,
M292-IntVI2.1-20: CAG TCT GCC CTG ACT CAG CC,
M293-IntVI2.2-21: GTG TC(CT) (AG)GG (GT)CT CCT GGA CAG,
M294-IntVI3.1-22: TGA CTC AGG ACC CTG CTG TGT C,
M295-IntVI3.2-22: TGA C(AT)C AGC CAC (CT)CT C(AG)G TGT C,
M296-IntVI4.1-20: TCT GCC TCT GC(CT) TCC CTG GG,
M297-IntVI4.2-20: TCT GCA TCT GCC TTG CTG GG,
M298-IntVI5,9-20: CAG (GC)CT GTG CTG ACT CAG CC,
M299-IntVI6-23: CCA ATT TTA TGC TGA CTC AGC CC,
M300-IntVI7,8-19: CTG TGG TGA C(CT)C AGG AGC C,
M301-IntVI10-19: CAG GCA GGG C(AT)G ACT CAG C,

M302-IntJI1-21: GGT (GC)AC CTT GGT (GC)CC A(GC)T (GT)CC,
M303-IntJI2,3-21: GGT CAG CT(GT) GGT (GC)CC TCC (GT)CC.

Die verwendeten Primer besitzen eine 5'- nach 3'-Sequenz. Die externen Primer binden an das 5'-Ende der Führungssequenz, die internen (nested) Primer binden an das 5'-Ende der Frameworkregion 1.

2.4.2.2. Externe Amplifikation der Lamda-Rearrangements

Für die externe Amplifikation der Lamda-Rearrangements wurden zunächst zwei Reaktionsansätze hergestellt, die sich für eine Platte folgendermaßen zusammensetzten:

Der Lower Reaction Mix für Lambda-Rearrangements der externen Amplifikation bestand aus:

- 1340 µl H₂O,
- 640 µl MgCl₂ (25 mM),
- 160 µl dNTPs (je 10 mM),
- 40 µl des jeweiligen externen Vλ-Primers (100 µM) und
- 40 µl des jeweiligen Jλ-Primers (100 µM).

Der Upper Reaction Mix der Lambda-Rearrangements der externen Amplifikation bestand aus:

- 4150 µl H₂O,
- 800 µl des 10x Puffer II und
- 50 µl der AmpliTaq DNA Polymerase (5U/µl).

Anschließend wurden 25 µl des jeweiligen LMR und 50 µl des jeweilige URM auf eine neue 96-Well-Platte pipettiert und je Well 5 µl cDNA dazugegeben.

2.4.2.3. Interne Amplifikation der Lambda-Rearrangements

Für die interne Amplifikation der Lambda-Rearrangements wurde ein Lower Reaction Mix und ein Upper Reaction Mix hergestellt, mit der nachfolgenden Zusammensetzung für jeweils eine Platte:

Der LRM für Lambda-Rearrangements der internen Amplifikation bestand aus:

- 1580 μl H_2O ,
- 640 μl MgCl_2 (25 mM),
- 160 μl dNTPs (je 10 mM),
- 40 μl des jeweiligen internen $\text{V}\lambda$ Primers (100 μM),
- 40 μl des jeweiligen internen $\text{J}\lambda$ Primers (100 μM).

Der URM für Lambda-Rearrangements der internen Amplifikation bestand aus:

- 4150 μl H_2O ,
- 800 μl des 10x Puffer II und
- 50 μl der AmpliTaq DNA Polymerase (5U/ μl).

Anschließend wurden in einem anderen Raum je Well 5 μl des Produktes der externen PCR als Template dazugegeben. Die internen und externen PCR-Amplifikationen wurden mit dem Gene Amp PCR System 2400 durchgeführt. Das verwendete Amplifikationsprogramm bestand jeweils aus 36 Zyklen:

Ein Zyklus mit

- 7 min Denaturierung bei 95° C,
- 1 min Annealing bei 56° C,
- 1 min 30 s Elongation bei 72° C; anschließend

34 Zyklen mit

- 1 min Denaturierung bei 94° C,
- 30 s Annealing bei 56° C,
- 1 min 30 s Elongation bei 72° C und

ein Zyklus mit

- 1 min Denaturierung bei 94° C,
- 30 s Annealing bei 56° C,
- 5 min Elongation bei 72° C.

Die Produkte der Lambda-Amplifikation wurden anschließend bei 4° C im Kühlschrank gelagert.

2.5. DNA-Gewinnung aus Agarosegel und Darstellung der PCR-Produkte

2.5.1. Analytisches Gel

Um die PCR-Produkte analytisch zu trennen, wurde die Gelelektrophorese eingesetzt. Zur Herstellung des 1,5%-igen Agarosegels wurden 150 bis 200 ml 1x TAE Puffer mit Agarose vermischt. Bei 150 ml TAE Puffer wurden dementsprechend 2,25 g Agarose verwendet. Danach wurde die Mixtur bis zum vollständigen Lösen der Agarose für fünf bis zehn Minuten in der Mikrowelle erhitzt. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Anschließend wurden die Agarosegele in eine Gelkammer gegossen. Direkt nach dem Gießen der Gele wurden Käbme in das Gel eingetaucht, um Geltaschen zu bilden. Nach Abkühlung der Gele wurden die Gelkammern mit 1x TAE aufgefüllt.

Währenddessen wurden je Well einer 96-Well-Platte 2 µl Loading Dye mit 10 µl des PCR-Produkts vermischt und 10 µl dieses Gemisches in die entstandenen Geltaschen pipettiert. Außerdem wurde bei jeder Elektrophorese in einer der äußeren Geltaschen 5 µl eines DNA-Größenstandards gegeben, um später die Größenverhältnisse der aufgetrennten DNA besser abschätzen zu können. Zur Durchführung der Elektrophorese wurde anschließend für etwa 40 bis 60 Minuten eine Gleichspannung von 90 bis 120 V an die Gelkammer angelegt. Die durch Ethidiumbromid positiv gefärbten Banden (ca. 350 bp) wurden unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht und fotografiert. Während des gesamten Prozesses wurden die Richtlinien zum Umgang mit Ethidiumbromid streng eingehalten.

2.5.2. Präparatives Gel und Aufreinigung der Produkte

Die PCR-Produkte, die bei der analytischen Trennung positive Banden aufwiesen, wurden anhand des Größenstandards identifiziert und mit einem Skalpell aus dem Gel extrahiert.

Anschließend wurden die in den Gelstücken enthaltenen DNA-Produkte mit dem MinElute Gel Extraction Kit aufgereinigt. Zunächst wurden zu der Agarose drei Gelvolumen einer Pufferlösung (Buffer QG) gegeben und bei 50°C für zehn Minuten mit zwei- bis dreiminütigen Vortexen inkubiert. Daraufhin wurde ein Gelvolumen 100%-iges Isopropanol zugegeben. Im nächsten Schritt wurde die Probe auf eine MinElute Säule aufgebracht und eine Minute zentrifugiert. Dabei absorbierte die DNA in die in den Säulen enthaltene Kieselsäuremembran unter hochprozentiger Salzsättigung. Gegebenenfalls vorhandene Verunreinigungen liefen durch die Säule und wurden entfernt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Anschließend wurden die Säulen mit 750 µl Pufferlösung (Buffer PE) gewaschen und nach fünf Minuten für eine Minute herunterzentrifugiert. Das durchgeflossene Volumen wurde entfernt und nochmals für eine Minute herunterzentrifugiert. So wurden Kontaminationen effektiv beseitigt. Abschließend wurde 10 µl Pufferlösung (Buffer EB) hinzugegeben und nach einer Minute nochmals eine Minute lang zentrifugiert. Das Ergebnis waren gereinigte, hochkonzentrierte DNA-Fragmente in 10 µl Eluat. Alle Zentrifugationsschritte wurden mit 13.000 rpm durchgeführt.

2.6. Sequenzierung

Die aus dem Gel extrahierten DNA-Produkte der V_{κ}/J_{κ} - und V_{λ}/J_{λ} -Familien wurden nun mit dem ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit weiter amplifiziert.

2.6.1. Reaktionskomponenten

Der Mastermix des Reaktionsansatzes für die Sequenzier-PCR bestand aus folgenden Komponenten:

- 4 µl ABI Prism® BigDye™ Terminator,
- 0,5 µl Primer (10 pmol/ µl),
- 0,5 µl Pellet Paint Blue und
- 12 µl destilliertes Wasser.

Diesem Mastermix wurden nun noch etwa 3 µl gereinigtes PCR-Produkt zugefügt. Für die Sequenzier-PCR wurden 5' (V) interne Primer der jeweiligen V_K- und V_λ-Familie verwendet.

2.6.2. Zyklusparameter

Die Sequenzier-PCR wurde mit einem Thermozykler durchgeführt. Das verwendete Programm bestand aus einer Denaturierung bei 95°C für drei Minuten, gefolgt von 25 Zyklen Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden, Annealing bei 50°C für eine Minute und Elongation bei 60°C für drei Minuten. Abschließend erfolgte eine Elongation bei 72°C für fünf Minuten.

2.6.3. Aufreinigung

Für die Aufreinigung der Produkte wurden AutoSeq G-50 Säulen verwendet. Zunächst wurde das Kunstharz der Säulen durch kurzes Vortexen resuspendiert und die Säulen eine Minute lang zentrifugiert (2000 x g). Danach wurden 20 µl PCR-Produkt auf den Filter der Säule aufgetragen und eine Minute zentrifugiert (2000 x g). Hierdurch wurde das überschüssige Big Dye™ entfernt.

2.6.4. Isopropanolfällung

Das Produkt wurde nochmals mit 80 µl des 75%-igen Isopropanol gereinigt. Nach einer Inkubationsdauer von 15 Minuten bei Raumtemperatur, wurden die Proben bei Maximalgeschwindigkeit (14000 rpm) 20 Minuten lang zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets mit 250 µl 75%-igem Isopropanol gewaschen. Danach wurden die Säulen wiederum bei Maximalgeschwindigkeit zehn Minuten lang zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurden die Pellets zwei Minuten auf einem Heizblock bei 37° C getrocknet und anschließend in 20 µl HIDI Formamid suspendiert. Anschließend wurde die DNA denaturiert, indem die Proben drei Minuten bei 95° C inkubiert und unmittelbar danach zwei Minuten auf Eis gestellt wurden. Die Sequenzierung wurde mit einem ABI PRISM 310™ durchgeführt.

2.7. Auswertung der Sequenzen

2.7.1. Software

Die Analyse der Gensequenzen erfolgte mit dem Programm JOINSOLVER[®] (<http://joinsolver.niams.nih.gov/index.html>). Es handelt sich hierbei um ein im Internet frei verfügbares Programm zur Analyse von menschlichen Immunglobulin-V(D)J-Rekombinationen.

JOINSOLVER[®] wurde gemeinschaftlich vom amerikanischen National Institute of Health, vom National Institute of Arthritis and Muskuloskeletal and Skin Diseases (NIAMS) und dem Center for Information Technology (CIT) entwickelt.

2.7.2. Analyse der Sequenzen

Die durch die Sequenzierung erhaltenen produktiven V_{κ}/J_{κ} - und V_{λ}/J_{λ} -Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms DNASTAR (Version 4.0) mit den bekannten Keimbahngenen in der IMGT-Datenbank verglichen. Das Segment mit der größten Homologie wurde für die weitere Auswertung berücksichtigt. Sequenzen außerhalb des Leserasters und nicht produktive Sequenzen mit einem Stopcodon wurden von der Analyse ausgeschlossen. Zusätzliche Nukleotide wurden als N-Nukleotide bezeichnet, wenn sie zufällig eingefügt waren. Rearrangements, die Pseudogene enthielten, wurden als nicht produktiv eingestuft.

Im untersuchten Repertoire fanden sich vor Therapie insgesamt 22 produktive V_{λ}/J_{λ} -Gensequenzen und keine nicht produktiven V_{λ}/J_{λ} -Gensequenzen, sowie 21 produktive V_{κ}/J_{κ} -Gensequenzen und sieben nicht produktive V_{κ}/J_{κ} -Gensequenzen. Nach Therapie fanden sich insgesamt 57 produktive V_{λ}/J_{λ} -Gensequenzen und eine nicht produktive V_{λ}/J_{λ} -Gensequenz, sowie 63 produktive V_{κ}/J_{κ} -Gensequenzen und fünf nicht produktive V_{κ}/J_{κ} -Gensequenzen. Für die weitere Analyse waren nur die produktiven Sequenzen der variablen Leichtketten relevant.

Es wurden folgende Parameter im Genrepertoire der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen zu den beiden Untersuchungszeitpunkten (vor und nach Rituximabtherapie) analysiert:

Häufigkeitsverteilung der V_{κ} -/ J_{κ} - und V_{λ} -/ J_{λ} -Familien und der einzelnen V_{κ} -/ J_{κ} - und V_{λ} -/ J_{λ} -Gensegmente:

Die leichten Ketten der Immunglobuline bestehen aus sequenziell angeordneten V- und J-Gensegmenten und sind entweder vom Typ κ oder λ . Es wurde die Häufigkeitsverteilung der V_{κ} -/ J_{κ} - und V_{λ} -/ J_{λ} -Familien, sowie die Verteilung der einzelnen V_{κ} -/ J_{κ} - und V_{λ} -/ J_{λ} -Gensegmente zu den beiden Untersuchungszeitpunkten analysiert.

Mutationsrate der V_{κ} - und V_{λ} -Rearrangements:

Zur Bestimmung der Mutationsrate der V_{κ} - und V_{λ} -Rearrangements der leichten Ketten wurden die Mutationszahl der jeweiligen V-Leichtketten durch die Anzahl der Nukleotide in der jeweiligen V-Leichtkette geteilt und mit 100 multipliziert.

CDR3-Länge der V_{κ} - und V_{λ} -Rearrangements:

Es wurde der Mittelwert der CDR3-Längen der V_{κ} - und V_{λ} -Leichtketten-Rearrangements vor und nach B-Zell-Depletion verglichen.

Mutationen und Mutationsraten in den CDR (1 und 2) und Frameworkregionen (1, 2, 3) der V_{κ} - und V_{λ} -Rearrangements:

Zunächst wurde der Anteil an Mutationen bestimmt, der in den CD-Regionen 1 und 2, sowie in den Frameworkregionen 1-3 lag. Anschließend wurden die entsprechenden Mutationsraten gesondert analysiert und verglichen.

Mutationen in RGYW- und WRCY-Motiven der V_{κ} - und V_{λ} -Rearrangements:

Es wurde der Anteil an Mutationen bestimmt, die in den jeweiligen RGYW- und WRCY-Hotspots liegen.

Verhältnis von Austauschmutationen zu stillen Mutationen (R/S Ratio) der V_{κ} - und V_{λ} -Rearrangements:

In den CD- und Frameworkregionen wurden die Austauschmutationen und stillen Mutationen bestimmt und aus den erhaltenen Werten das Verhältnis Austauschmutationen zu stille Mutationen berechnet.

Häufigkeitsverteilung der V_{κ} -Gensegmente auf die Upstream- und Downstream-Kassette:

Es wurde die Häufigkeitsverteilung der V_{κ} -Gensegmente auf die Upstream- und die Downstream-Kassette bestimmt.

Häufigkeitsverteilung der V_{λ} -Gensegmente auf die V_{λ} -Cluster A, B und C:

Analog zur Untersuchung der Häufigkeitsverteilung von V_{κ} -Gensegmenten auf die Upstream- und Downstream-Kassette wurde die Häufigkeitsverteilung von V_{λ} -Gensegmenten auf die V_{λ} -Cluster A, B und C untersucht.

Vergleich der Mutationsraten von $J_{\kappa}1-4$ mit $J_{\kappa}5$ -Rearrangements:

Es wurden die Mutationsraten für $J_{\kappa}5$ und $J_{\kappa}1-4$ bestimmt und miteinander verglichen.

Vergleich der Mutationsraten von $J_{\lambda}1-5$ mit $J_{\lambda}7$ -Rearrangements:

Analog zum J_{κ} -Repertoire wurden die Mutationsraten für $J_{\lambda}1-5$ und $J_{\lambda}7$ bestimmt und miteinander verglichen.

2.8. Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurde die GraphPad Software (<http://www.graphpad.com>, San Diego, CA, USA) verwendet. Der Vergleich des V_{κ} -/ J_{κ} - und V_{λ} -/ J_{λ} -Genrepertoires vor und nach der Therapie mit Rituximab wurde mit dem zweiseitigen Fisher's Exact Test durchgeführt. Die Mutationsraten in V_{κ} - und V_{λ} -Leichtketten, RGWY- und WRCY-Mutationen, Mutationen in FR1, 2, 3 und in CDR1, 2 und das R/S-Mutationsverhältnis wurden mit dem Chi-Square-Test verglichen. Die CDR3-Längen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests verglichen. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

2.9. Verbrauchsmaterial und Geräte

Pufferlösungen:

TAE Elektrophorese Puffer (50x):

242 g TrisBase, 57,1 ml Essigsäure 100%, 37,2 g EDTA und 1l dH₂O.

Loading Dye (6x):

0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylol Cyanol und 30% Glycerin in dH₂O.

TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA):

100 μ l EDTA 0,5 M (pH 8,0), 500 μ l Tris 1M und 50 ml dH₂O.

Agarosegel:

1,5% Agarose UltraPure, 1x TAE und 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid.

Medien und Reagenzien:

10x Puffer II (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)

Agarose UltraPure (Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland)

AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)

Bromphenolblau (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Desoxynukleotidtriphosphate, dNTPs (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Destilliertes Wasser, dH₂O (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Dithiothreitol, DTT (Roche-Boehringer, Mannheim, Deutschland)
DNA-Größenstandard (GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure 100% (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol 100% (Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande)
Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Ethyldiamintetraacetessigsäure, EDTA (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Fetales Kälberserum, FCS (GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland)
Glycerin (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Hank's Balanced Salt Solution, HBSS (Gibco BRL, Karlsruhe Deutschland)
Hi-Di Formamid (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
Isopropanol 100% (Merck, Darmstadt, Deutschland)
L-Glutamin (Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland)
Magnesiumchlorid, MgCl₂ (Promega, Mannheim, Deutschland)
Oligo dT15 (Promega, Madison, USA)
PCR Primer (GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland)
Pellet Paint Blue (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Penicillin-Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland)
Rinderserumalbumin, BSA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
RNAse (Promega, Madison, USA)
RPMI-Zellkulturmedium (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
TrisBase (Serva, Heidelberg, Deutschland)
Triton X-100 (Serva, Heidelberg, Deutschland)
Trypanblau (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Materialien und Geräte:

96-Loch-PCR-Platten (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)
ABI Prism[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit
(Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)
AutoSeq G-50 Säulen (GE Healthcare, München, Deutschland)
FACSDiVa Einzelzellsortierer (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, USA)
Ficoll-Paque[®] (GE Healthcare, München, Deutschland)

Gelkammern (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)
Genetic Analyzer Puffer (Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland)
Miltenyi-Säulen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)
MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
Pop-6 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
Sequenzierer ABI PRISM 310TM (Perkon Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)
Titan One Tube RTPCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
Zentrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 5804R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Daten

Zur Kontrolle der Krankheitsaktivität wurden der Disease Activity Score 28 (DAS-28), der CRP-Wert, sowie die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) bestimmt. Der DAS-28 dient der quantitativen Beurteilung des Krankheitszustandes. In den DAS-28 fließen die Anzahl der druckschmerzhaften Gelenke (SJC, 0-28), die Anzahl der geschwollenen Gelenke (TJC, 0-28), die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und die subjektiven Einschätzungen der Krankheitsaktivität durch den Patienten (VAS-Score) ein. Ein DAS-28-Wert größer als 5,1 spricht für eine hohe Krankheitsaktivität, ein Wert von 3,2 bis 5,1 steht für eine mittlere und ein Wert unter 3,2 spricht für eine niedrige Krankheitsaktivität.¹⁴⁷

Die untersuchte Patientin zeigte vor Therapie eine hohe Krankheitsaktivität (5,8), sechs Monate nach Therapie eine mäßige Krankheitsaktivität (4,53) und sieben Monate nach Therapie, dem Untersuchungszeitpunkt in der Regenerationsphase, erneut eine hohe Krankheitsaktivität (5,51).

Eine Erhöhung der Blutsenkungsgeschwindigkeit (Normwert für eine Frau unter 50 Jahren <20 mm/h) zeigte eine vorliegende Entzündung oder vermehrten Gewebszerfall. Betrachtet man die BSG zu den beiden Untersuchungszeitpunkten getrennt vom DAS-28, so lag der Wert vor Therapie bei 33 mm/h und sieben Monate nach Therapie bei 38 mm/h und damit wieder über dem Ausgangswert.

CRP (C-reaktives Peptid, Normbereich < 5mg/dl) ist ein Akute-Phase-Protein, welches bei entzündlichen Prozessen im Körper ansteigt. Der CRP-Spiegel lag vor Therapie bei 8,71 mg/dl. Nach Therapie stieg er wieder langsam an (nach sechs Monaten 3,08 mg/dl, nach sieben Monaten 5,42 mg/dl) und erreichte nach acht Monaten wieder annähernd den Ausgangswert von 7,42 mg/dl (siehe auch Tab. 3).

Außerdem wurde der Rheumafaktor bestimmt. Der Rheumafaktor ist ein Autoantikörper gegen den Fc-Teil des menschlichen IgG. Der Rheumafaktor

kann zur Prognose für den Krankheitsverlauf dienen, jedoch ist er nicht geeignet, die Krankheitsaktivität zu beurteilen. Der Rheumafaktor lag vor Therapie bei 229 U/ml. Sechs Monate nach Therapie lag er bei 94,9 U/ml, nach acht Monaten bei 131 U/ml und nach neun Monaten bei 146 U/ml.

Zeitpunkt	DAS-28	SJC	TJC	BSG (mm/h)	CRP (mg/l)
vor RTX Therapie	5,8	15	11	33	8,71
nach RTX Therapie	5,51	12	7	38	5,42

Tabelle 3: Übersicht klinischer Parameter zur Messung der Krankheitsaktivität

3.2. Analyse des V κ - und J κ -Genrepertoires der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen

In der nun folgenden Analyse soll das Ig-Leichtketten-Repertoire der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen vor Therapie und sieben Monate nach Therapie mit Rituximab näher untersucht werden, um die durch Rituximab induzierten molekularen Veränderungen des regenerierten CD19+CD27+ B-Zell-Pools zu identifizieren.

3.2.1. Häufigkeitsverteilung innerhalb der V κ -Familie

Es wurde zunächst die Häufigkeitsverteilung der einzelnen V κ -Familienmitglieder innerhalb des V κ -Repertoires der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen untersucht. Das Genrepertoire vor der B-Zell-Depletion bestand hauptsächlich aus Gensegmenten der V κ 1-Familie (62%), gefolgt von fast gleichen Anteilen an Gensegmenten der V κ 3- (19%) und V κ 2- (14%) Familien. V κ 4 war auf niedrigerem Level vorhanden. Es wurden keine Gene der V κ 5- und V κ 6-Leichtketten innerhalb der untersuchten Immunglobulinsequenzen der V κ -Familie gefunden.

Auch nach einem leichten Abfall des Anteils während der Regenerationsphase (62% versus 57%, $p=0,8009$) blieb die $V_{\kappa}1$ -Familie überrepräsentiert. Der Anteil der $V_{\kappa}3$ -Familie fiel leicht ab (19% versus 16%, $p=0,7500$), wohingegen der Anteil von $V_{\kappa}2$ (14% versus 21%, $p=0,7419$) leicht anstieg (vergleiche Abb. 6). $V_{\kappa}4$ blieb nahezu unverändert (5%, versus 6%, $p=1,0000$). All diese Veränderungen waren nicht statistisch signifikant. Unter 84 analysierten V_{κ} -Gensegmenten fanden sich keine Mitglieder der $V_{\kappa}5$ - und $V_{\kappa}6$ -Familie, weder vor noch nach B-Zell-Depletion.

Insgesamt exprimierten somit die Gensegmente der V_{κ} -Familie in ähnlicher Verteilung im $CD19+CD27+$ B-Zell-Repertoire vor und nach B-Zell-Depletion.

CD19+CD27+ B-Zellen, V_{κ} -Familie, Verteilung (%)

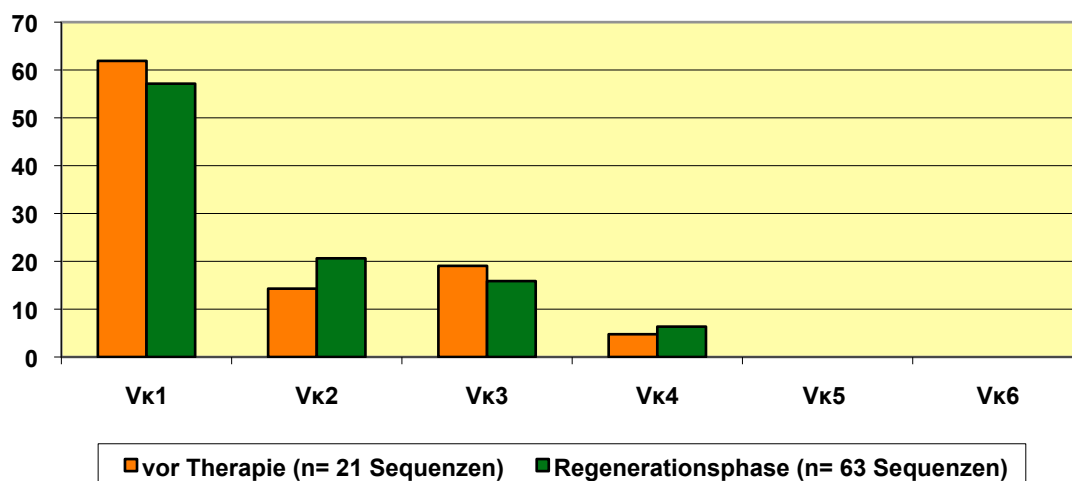


Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung innerhalb der V_{κ} -Familie

3.2.2. Häufigkeitsverteilung der einzelnen V_{κ} -Gensegmente

Bei der Analyse der Häufigkeitsverteilung der einzelnen V_{κ} -Gensegmente im Genrepertoire der $CD19+CD27+$ B-Gedächtniszellen konnte ein breites Spektrum an Ausprägungen der V_{κ} -Gensegmente beobachtet werden (vergleiche Abb. 7). Vor und nach Therapie waren $V_{\kappa}1-5.03$ (24% versus 29%, $p=0,7824$) und $V_{\kappa}1-39.01$ (14% versus 17%, $p=1,0000$) am stärksten präsent.

Nach Therapie wurden beide Gensegmente hochreguliert. Die Veränderungen waren nicht statistisch signifikant.

Die V_{κ} -Gensegmente $V_{\kappa}1-9.01$ (14% versus 0%, $p=0,0140$) und das $V_{\kappa}1-33.01$ (5% versus 0%, $p=0,2500$) konnten nur vor Therapie nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu fanden sich die V_{κ} -Gensegmente $V_{\kappa}1-17.01$ (0% versus 8%, $p=0,3247$), $V_{\kappa}1-6.01$ (0% versus 2%, $p=1,0000$), $V_{\kappa}2-24.01$ und $V_{\kappa}2-30.01$ nur nach der B-Zell-Depletion im Genrepertoire. Die Veränderungen waren nicht statistisch signifikant.

Des Weiteren konnten die V_{κ} -Gensegmente $V_{\kappa}1-5.01$ (5% versus 2%, $p=0,4398$), $V_{\kappa}3-15.01$ (10% versus 3%, $p=0,2591$), $V_{\kappa}3-11.01$ (5% versus 5%, $p=1,0000$), $V_{\kappa}3-20.01$ (5% versus 8%, $p=1,0000$) und $V_{\kappa}4-1.01$ (5% versus 6%, $p=1,0000$) detektiert werden. Deren Anteile am Repertoire zeigten keine signifikante Veränderung.

Insgesamt zeigten somit auch die einzelnen Gensegmente der V_{κ} -Familie zu den zwei Untersuchungszeitpunkten ein ähnliches Verteilungsmuster.

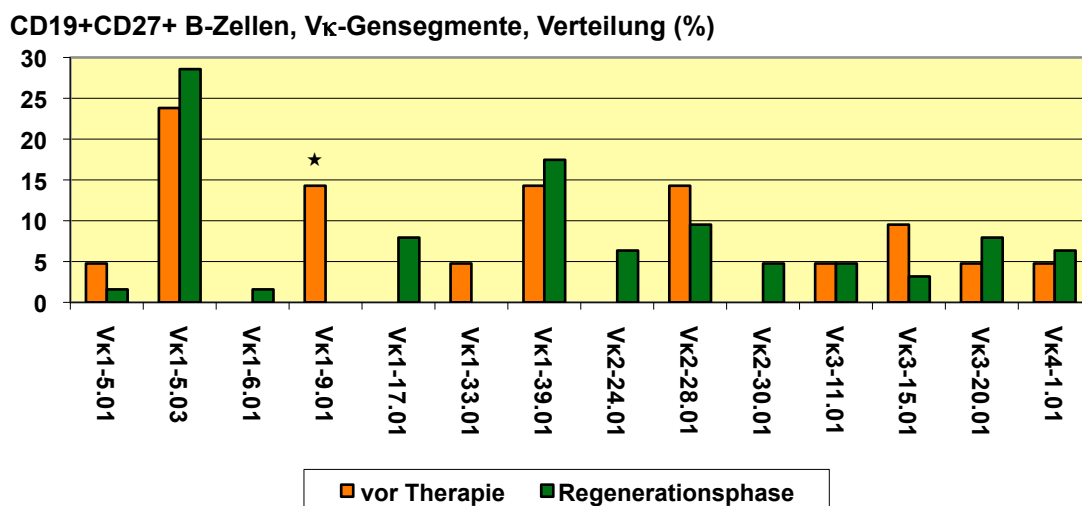


Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung der einzelnen V_{κ} -Gensegmente; * $p < 0,05$

3.2.3. Häufigkeitsverteilung innerhalb der J κ -Familie

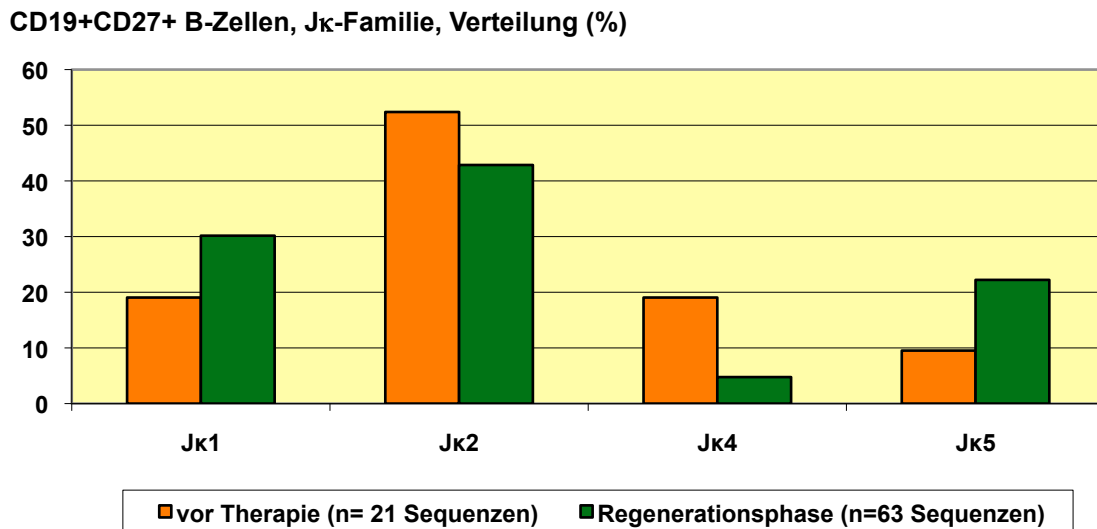


Abbildung 8: Häufigkeitsverteilung innerhalb der J κ -Familie

Bei der Analyse der Häufigkeitsverteilung des J κ -Genrepertoires der CD19+CD27+ B-Zellen vor und nach Rituximabtherapie wurden Gensegmente der J κ -Familien 1, 2, 4 und 5 detektiert (siehe Abb. 8). Die vorherrschende Gruppe war vor und nach B-Zell-Depletion J κ 2 (52,38% vor versus 42,86% nach Therapie, $p=0,4051$). Vor Therapie folgten J κ 1 und J κ 4 mit jeweils 19,05%. Nach Therapie war J κ 1 die am zweithäufigsten detektierte Familie mit 30,26% ($p=0,4051$). Der Anteil von J κ 4 nahm um 4,76% ($p=0,0620$) ab. J κ 5 machte nach Therapie hingegen einen größeren Anteil des Repertoires aus (9,52% versus 22,22%, $p=0,3358$). Die Veränderungen in der Häufigkeitsverteilung des J κ -Genrepertoires waren nicht statistisch signifikant. Insgesamt exprimierten somit im CD19+CD27+ B-Zell-Repertoire auch die J κ -Gensegmente in ähnlicher Verteilung vor und nach B-Zell-Depletion.

3.2.4. Häufigkeitsverteilung der einzelnen J κ -Gensegmente

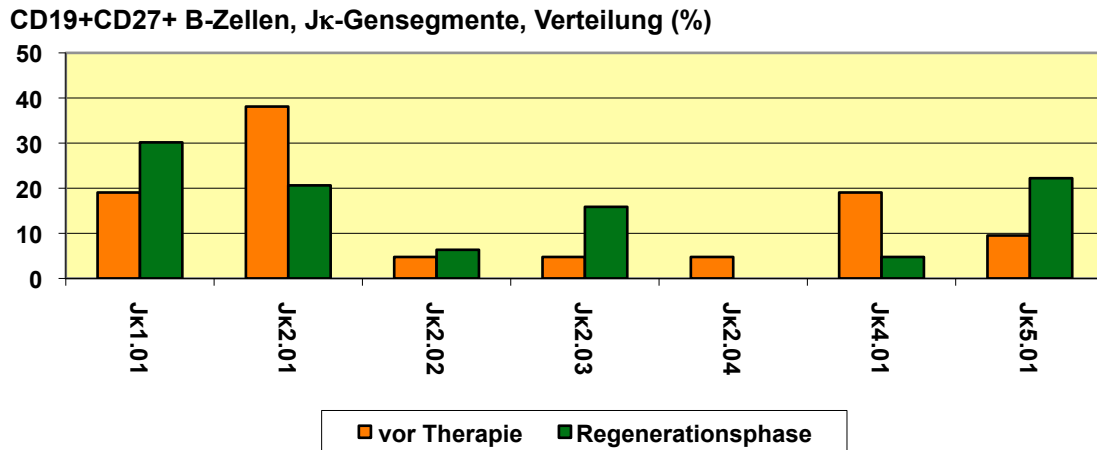


Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der einzelnen J κ -Gensegmente

Bei der Analyse der Häufigkeitsverteilung der einzelnen J κ -Gensegmente der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen zu den beiden Untersuchungszeitpunkten fand sich nur in der J κ 2-Familie eine Aufgliederung in mehrere einzelne Gensegmente: J κ 2.01, J κ 2.02, J κ 2.03 und J κ 2.04, wobei J κ 2.04 als einziges Gensegment nur in der Regenerationsphase in geringem Ausmaß detektiert wurde (4,76%, $p=0,2500$). Die J κ -Familien 1, 4 und 5 wurden jeweils nur durch ein einzelnes Gensegment repräsentiert (siehe auch Abb. 9).

Das vorherrschende Gensegment in der J κ -Familie vor Rituximabtherapie war J κ 2.01 mit 38,1% Anteil am J κ -Repertoire (respektive 20,63% nach Therapie, $p=0,1462$). Es folgten J κ 1.01 und J κ 4.01 mit jeweils 19,05%. Nach Therapie stieg der Anteil an J κ 1.01 und es war das vorherrschende Gensegment in der J κ -Familie (30,16%, $p=0,4051$). Es folgte J κ 5.01 mit 22,22% (respektive 9,52% vor Therapie, $p=0,3358$). J κ 2.01 wurde nur noch am dritthäufigsten exprimiert. J κ 2.03 machte nach Therapie im Vergleich zu dem niedrigen Anteil vor Therapie (4,76%) einen deutlich größeren Anteil des Repertoires aus (15,87%, $p=0,2768$). J κ 2.02 wurde vor und nach Therapie in nur geringem Anteil

detektiert (4,76% versus 6,35%, $p=1,0000$). Alle Veränderungen waren nicht statistisch signifikant.

Die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Gensegmente der J κ -Familie im CD19+CD27+ B-Zell-Repertoire war somit vor und nach B-Zell-Depletion ähnlich.

3.2.5. CDR3-Länge

Die CDR3-Länge innerhalb der V κ -Rearrangements der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen wurde vor und nach Rituximabtherapie verglichen. Durch die CD20+ B-Zell-Depletion wurden die CDR3-Längen nicht signifikant verändert ($27,29 \pm 1,31$ vor Therapie und $27,29 \pm 3,35$ in der Regenerationsphase, $p=0,8729$) (siehe auch Übersicht, Tab. 4).

3.2.6. Genmutationsrate

Bei der Analyse der Mutationsrate des V κ -Repertoires der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen konnten verschiedene spezifische Veränderungen im Mutationsmuster vor und nach Rituximabgabe gefunden werden. Erwartungsgemäß waren annähernd alle Sequenzen mutiert. Die Bandbreite an Mutationen reichte von 0 bis 15 je V κ -Sequenz vor Therapie. Die Gesamtmutationsrate betrug 2,29% vor Therapie (siehe auch Tab. 4).

Durch die B-Zell-Depletion wurden tiefgreifende Veränderungen des neugebildeten V κ -Repertoires der CD19+CD27+ B-Zellen induziert. Dies zeigte sich in einer während der Regenerationsphase auf 4,65% ($p<0,0001$) angestiegenen Mutationsrate. Das neugebildete V κ -Repertoire umfasste zwischen 0 und 29 Mutationen je V κ -Sequenz.

3.2.7. Mutationen in RGYW- und WRCY-Motiven

Analysen der Mutationen in RGYW- und WRCY-Hotspots des V κ -Repertoires der CD19+CD27+ B-Zellen vor und nach Rituximabtherapie zeigten eine signifikante Reduktion der Mutationsrate in diesen Abschnitten während der Regenerationsphase. Im Gegensatz zu dem Ausgangswert der Mutationsrate

vor Therapie von 70,8% lag der Wert in der Regenerationsphase bei 58,4% ($p < 0,0001$) (siehe auch Übersicht, Tab. 4).

3.2.8. Mutationen in CD- und Frameworkregionen

Die Untersuchung der Mutationen in den CD- (CDR1, 2) und Frameworkregionen (FR1, 2, 3) des V_{κ} -Repertoires der CD19+CD27+ B-Zellen zeigte, dass 63% der Mutationen vor Therapie in den Frameworkregionen und 37% in den CD-Regionen lagen. In der Regenerationsphase befanden sich hingegen 85% der Mutationen in den Frameworkregionen ($p = 0,2831$) und 35% in den CD-Regionen ($p = 0,1913$). Diese Veränderungen waren nicht statistisch signifikant (siehe auch Übersicht, Tab. 4).

Somit ist der Anteil an Mutationen in den CD- und Frameworkregionen im V_{κ} -Repertoire der CD19+CD27+ B-Zellen durch die B-Zell-Depletion nicht wesentlich verändert worden.

CD19+CD27+ B-Zellen V_{κ} -Genrepertoire	vor Therapie (n= 21 Sequenzen)	Regenerationsphase (n= 63 Sequenzen)
CDR3 Länge +/- SD	27,29 ± 1,31	27,29 ± 3,35
Mutationsrate	2,29%	4,65%*
FR Mutationen	62,83%	85,35%
CDR Mutationen	37,17%	34,79%
R/S Mutationen: FR	1,84	1,30**
R/S Mutationen: CDR	6,00	3,12*
RGYW-/ WRCY-Mutationen	70,80%	58,42%*

Tabelle 4: Übersicht über das Mutationsmuster des V_{κ} -Genrepertoires der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen vor Therapie mit Rituximab und in der Regenerationsphase (7 Wochen nach Rituximabgabe); ** $p < 0,0005$, * $p < 0,0001$

3.2.9. Mutationen in einzelnen CD- und Frameworkregionen

CD19+CD27+ B-Zellen, V κ -Repertoire, Mutationsraten CDR und FR, (%)

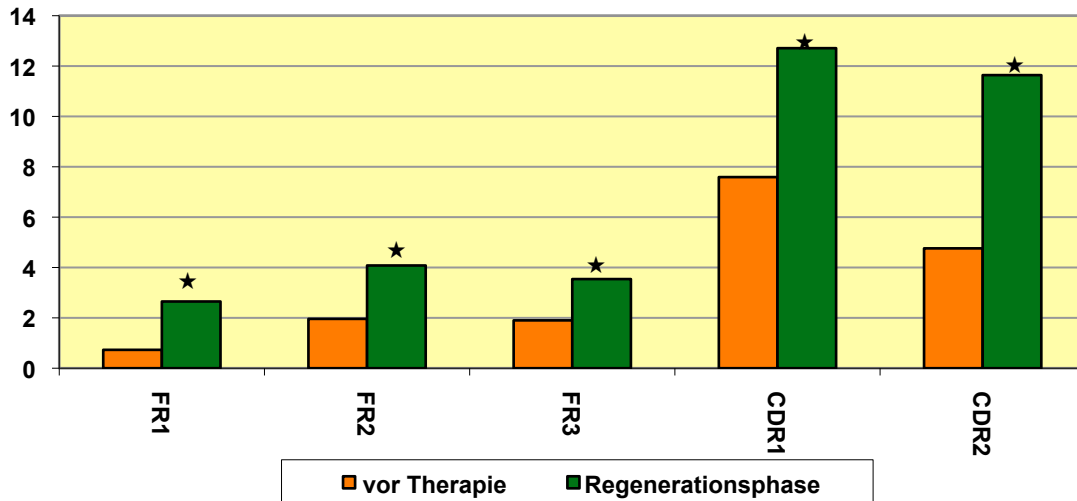


Abbildung 10: Mutationsraten in den einzelnen CD- und Frameworkregionen des V κ -Repertoires; \star $p < 0.0001$

Die Auswertung der Anzahl an Mutationen in den einzelnen CD- (CDR1, 2) und Frameworkregionen (FR 1, 2, 3) des V κ -Repertoires der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen zeigte einen Anstieg der Mutationsraten in den beiden CD-Regionen (CDR1, 2) sowie in allen 3 Framework-Regionen (FR 1, 2, 3) in der Regenerationsphase nach Rituximabgabe. Insgesamt zeigte CDR1 die höchste Mutationsrate (7,6% vor Therapie versus 12,7% in der Regenerationsphase ($p < 0,0001$), gefolgt von CDR2 (4,8% vor Therapie versus 11,6% in der Regenerationsphase, $p < 0,0001$).

Die Mutationsraten in den einzelnen Frameworkregionen wurden ebenfalls nach oben reguliert. Allerdings bewegten sie sich insgesamt auf einem niedrigeren Niveau und lagen zu den beiden gemessenen Zeitpunkten in allen Frameworkregionen unter 5%. Im Einzelnen betrug die Mutationsrate in der Frameworkregion 1 vor Depletion 0,7% und in der Regenerationsphase 2,7% ($p < 0,0001$).

In der Frameworkregion 2 betrug die Mutationsrate vor Depletion 2,0% und in der Regenerationsphase 4,1% ($p < 0,0001$) und in der Frameworkregion 3 vor Depletion 1,9% und in der Regenerationsphase 3,5% ($p < 0,0001$).

Alle Veränderungen der Mutationsraten in den einzelnen CD- und Frameworkregionen der V_{κ} -Rearrangements der CD19+CD27+ B-Zellen vor und nach Rituximabtherapie waren statistisch signifikant (siehe Abb. 10).

3.2.10. R/S Ratio in CD- und Frameworkregionen

Das Verhältnis von Austauschmutationen (R) zu stillen Mutationen (S) in den Frameworkregionen 1 bis 3 des V_{κ} -Repertoires der CD19+CD27+ B-Zellen nahm in der Regenerationsphase im Vergleich zum Ausgangsstatus vor Therapie signifikant ab (1,84 vor Therapie versus 1,30 in der Regenerationsphase, $p = 0,0002$). Auch der Wert der R/S Ratio in den CD-Regionen 1 und 2 (6 vor Therapie versus 3,12 nach Therapie, $p < 0,0001$) war signifikant verringert. Somit lagen nach der B-Zell-Depletion verhältnismäßig mehr S-Mutationen als R-Mutationen vor (siehe auch Übersicht, Tab.4).

3.2.11. Häufigkeitsverteilung der V_{κ} -Gensegmente auf die Upstream- und Downstream-Kassette

In dem untersuchten V_{κ} -Repertoire der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen konnten weder vor noch nach Therapie mit Rituximab V_{κ} -Gene der Upstream-Kassette (J_{κ} -distal) detektiert werden. Alle gefundenen V_{κ} -Gensequenzen konnten nur der Downstream-Kassette (J_{κ} -proximal) zugeordnet werden. Somit war anhand der untersuchten Daten kein Vergleich zwischen V_{κ} -Gensegmenten der Downstream- und der Upstream-Kassette möglich.

3.2.12. Mutationen in $J_{\kappa}1-4$ und $J_{\kappa}5$ -Rearrangements

Es wurden die Mutationsraten von $J_{\kappa}1-4$ mit $J_{\kappa}5$ -Rearrangements des CD19+CD27+ B-Zell-Repertoires vor und nach Rituximabtherapie verglichen. Hier zeigte sich, dass vor Therapie die Mutationsrate in $J_{\kappa}5$ -Rearrangements signifikant niedriger war als in $J_{\kappa}1-4$ ($J_{\kappa}1-4$ 2,53% versus $J_{\kappa}5$ 0,14%, $p < 0,005$).

Auch nach Therapie war die Mutationsrate in J κ 5 signifikant niedriger (J κ 1-4 4,99% versus J κ 5 3,44%, $p < 0,0001$) (siehe Abb. 11).

CD19+CD27+ B-Zellen, Mutationsraten J κ 1-4 und J κ 5 (%)

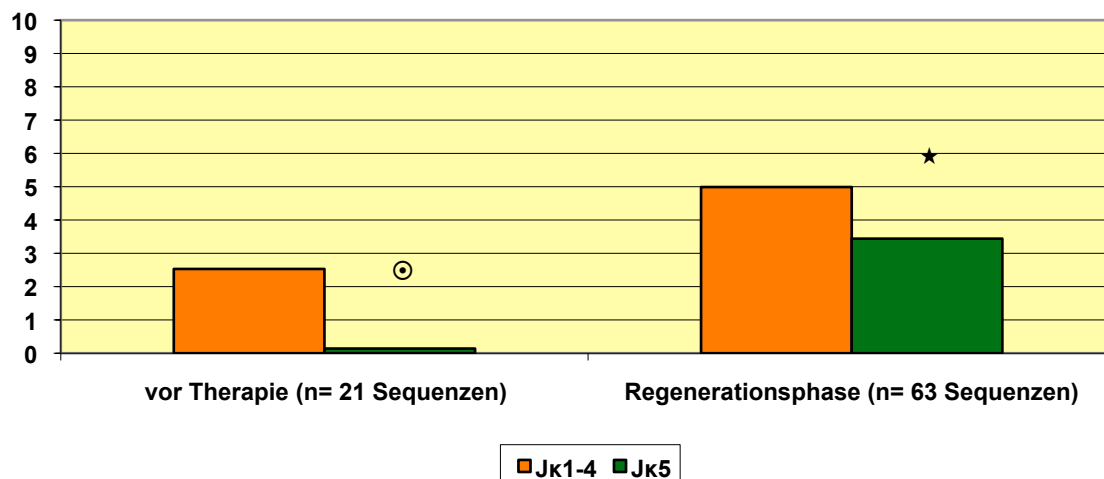


Abbildung 11: Vergleich der Mutationsraten von J κ 1-4 und J κ 5-Rearrangements; ★ $p < 0,0001$, ⊙ $p < 0,005$

3.3. Analyse des V λ - und J λ -Genrepertoires der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen

3.3.1. Häufigkeitsverteilung innerhalb der V λ -Familie

Das V λ -Genrepertoire der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen bestand vor und nach Rituximabtherapie hauptsächlich aus Gensegmenten der V λ 2-Familie (59% versus 46%, $p = 0,3232$) jeweils gefolgt von V λ 1 (23% versus 33%, $p = 0,4234$). Zusammen bildeten V λ 1 und V λ 2 somit ungefähr 80% des Repertoires (82% vor Therapie versus 79% in der Regenerationsphase). Durch die B-Zell-Depletion kam es zu keiner signifikanten Veränderung des Anteils der V λ 1- und V λ 2-Familie am V λ -Genrepertoire. An dritter Stelle folgte die V λ 3-Familie mit einem Anteil von 5% vor Therapie und 14% in der Regenerationsphase ($p = 0,4317$).

Die V λ 4- (0% versus 2% , p=1,0000) , V λ 6- (9% versus 2%, p=0,1860), V λ 7- (5% versus 2%, p=0,4820) und V λ 9-Familien (0% versus 2%, p=1,0000) waren jeweils vor und nach Therapie in weniger als 10% vertreten. Die V λ -Familien V λ 5, V λ 8 und V λ 10 waren nicht im Repertoire vertreten. Es fand sich keine statistisch signifikante Modulation der Verteilung der V λ -Familien im CD19+CD27+ B-Zell-Repertoire nach B-Zell-Depletion (siehe Abb. 12).

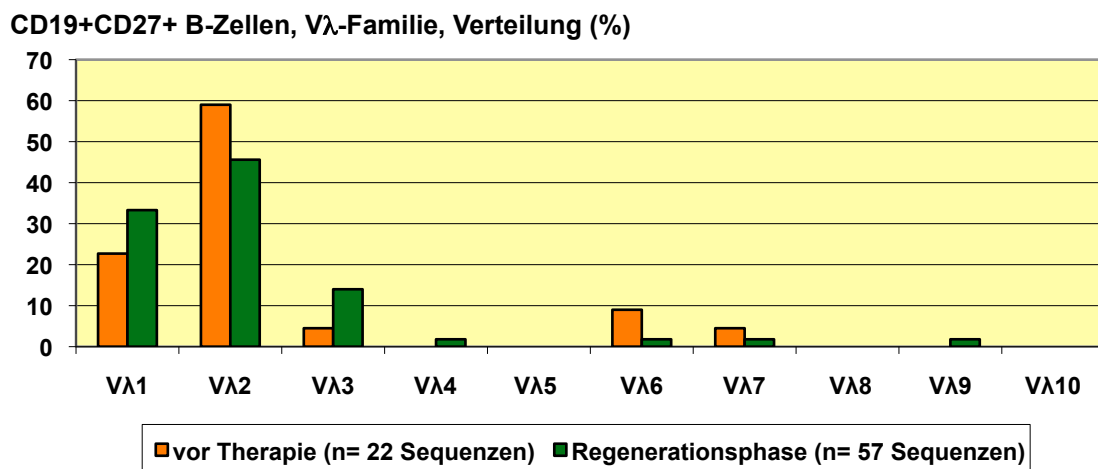


Abbildung 12: Häufigkeitsverteilung innerhalb der V λ -Familie

3.3.2. Häufigkeitsverteilung der einzelnen V λ -Gensegmente

Bei der Untersuchung der individuellen Gensegmente der V λ -Familien der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen vor und nach Rituximabtherapie fand sich ein polyklonal diverses Genrepertoire. So hatten vor Therapie die Gensegmente V λ 2-23.01 (13,6% versus 5,3%, p=0,0633) und V λ 1-40.01 (13,6% versus 1,8%, p=0,3403) mit 13,6% jeweils den größten Anteil am Repertoire. Nach der B-Zell-Depletion war der Anteil von V λ 1-44.01 (4,5% versus 12,3%, p=0,4315) mit 12,3% am größten. Die übrigen Anteile der einzelnen V λ -Gensegmente am V λ -Genrepertoire lagen vor Therapie und in der Regenerationsphase jeweils unter 10%.

Die Gensegmente V λ 1-51.01 , V λ 3-1.01, V λ 3-19.01, V λ 3-25.01, V λ 4-69.01 und V λ 9-49.03 wurden nur in der Regenerationsphase nachgewiesen, allerdings in niedriger Menge. Die Veränderungen waren statistisch nicht signifikant.

Insgesamt zeigten somit die einzelnen Gensegmente der V λ -Familie im CD19+CD27+ B-Zell-Repertoire eine ähnliche Verteilung vor und nach B-Zell-Depletion (siehe Abb. 13).

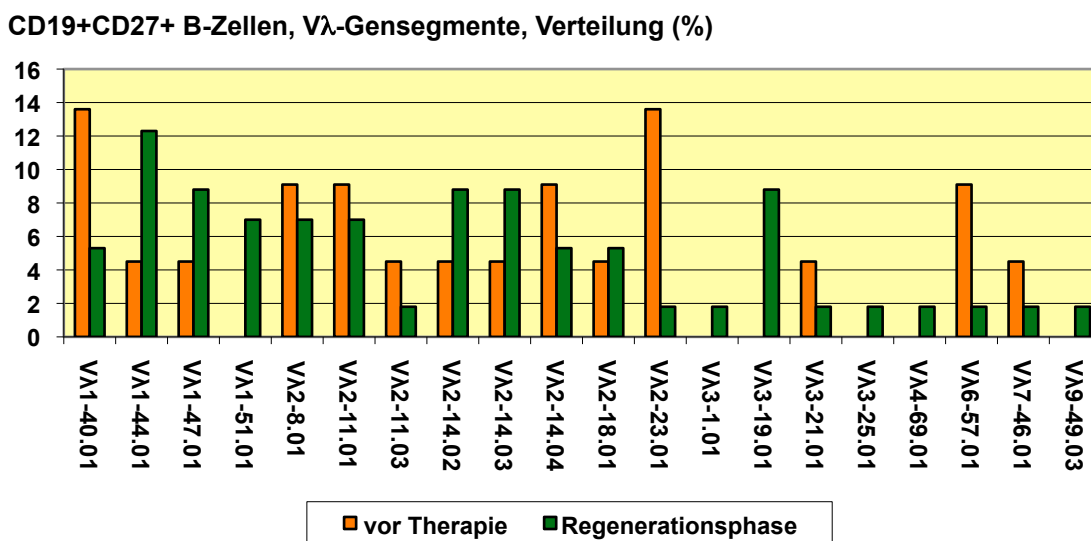


Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung der einzelnen V λ -Gensegmente

3.3.3. Häufigkeitsverteilung innerhalb der J λ -Familie

Bei der Analyse des J λ -Genrepertoires der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen fand sich vor und nach Therapie mit Rituximab J λ 2 als vorherrschende Familie (36,63% vor versus 38,6% nach Therapie, p=1,0000). Darauf folgten vor Therapie J λ 1 und J λ 3 mit jeweils 27,27%. J λ 5 wurde nur nach Therapie in geringem Ausmaß detektiert. Nach Therapie nahm der Anteil an J λ 1 (19,3%, p=0,5429) und J λ 3 (17,54%, p=0,3600) ab, wohingegen J λ 2 und J λ 7 (von 9,9% auf 22,81%, p=0,1174) zunahmen. Die Familien J λ 4 und J λ 6 waren nicht im Repertoire vertreten. Die Veränderungen im J λ -Genrepertoire waren nicht signifikant (siehe auch Abb. 14).

Insgesamt exprimierten somit die Gensegmente der J λ -Familie in ähnlicher Verteilung im CD19+CD27+ B-Zell-Repertoire vor und nach B-Zell-Depletion.

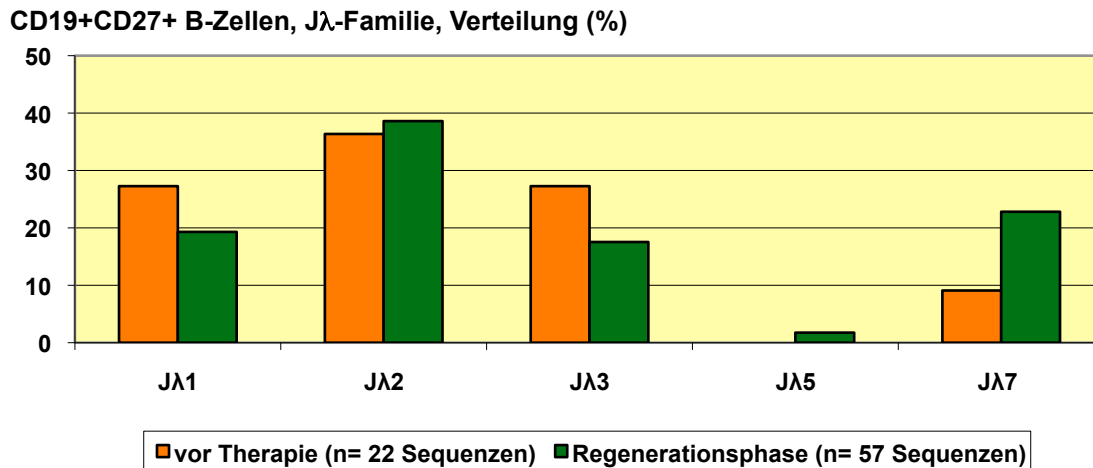


Abbildung14: Häufigkeitsverteilung innerhalb der J λ -Familie

3.3.4. Häufigkeitsverteilung der einzelnen J λ -Gensegmente

Bei der Häufigkeitsverteilung der einzelnen J λ -Gensegmente der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen vor und nach Rituximabtherapie war bis auf die J λ 7-Familie mit J λ 7.01 und J λ 7.02 jeweils nur ein Gensegment pro J λ -Familie im Repertoire vertreten. Vor Therapie wurde J λ 1.01 am häufigsten detektiert (13,6% versus 5,3% nach Therapie, $p=0,5429$). Nach Therapie war der Anteil an J λ 2.01 mit 12,3% (versus 4,5% vor Therapie, $p=1,0000$) am größten. Weiterhin wurde auch ein höherer Anteil an J λ 3.02 nach Therapie gemessen (4,5% vor Therapie versus 8,8% nach Therapie, $p=0,3600$). J λ 5.01 war nur nach Therapie im Repertoire zu verzeichnen (0% vor Therapie versus 7% nach Therapie, $p=1,0000$). Es fand sich keine signifikante Veränderung in der Häufigkeitsverteilung der einzelnen J λ -Gensegmente (siehe Abb. 15).

Somit exprimierten die einzelnen Gensegmente der J λ -Familie der CD19+CD27+ B-Zellen in ähnlicher Verteilung vor und nach B-Zell-Depletion.

CD19+CD27+ B-Zellen, J λ -Gensegmente, Verteilung (%)

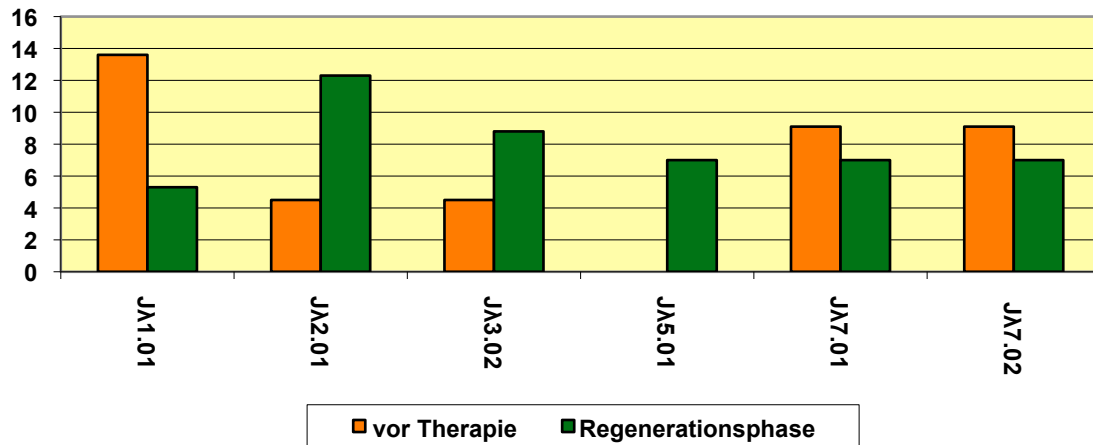


Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung der einzelnen J λ -Gensegmente

3.3.5. CDR3-Länge

Es wurde die CDR3-Länge innerhalb der V λ -Rearrangements der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen vor und nach Rituximabtherapie verglichen. Die CDR3-Länge wurde, wie auch schon im V κ -Genrepertoire, nicht signifikant von der B-Zell-Depletion beeinflusst ($31,5 \pm 2,74$ vor Therapie versus $31,32 \pm 3,21$ in der Regenerationsphase, $p=0,9283$) (siehe Übersicht, Tab. 6).

3.3.6. Genmutationsrate

Bei der detaillierten Analyse der Mutationsraten des V λ -Repertoires der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen konnten umfassende Veränderungen beobachtet werden.

Die Genmutationsrate zeigte im V λ -Repertoire, wie schon im V κ -Repertoire, ebenfalls einen signifikanten Anstieg. Vor Therapie lag sie bei 2,99% und in der Regenerationsphase bei 4,72% ($p<0,0001$). Im Vergleich zum V κ -Repertoire lagen die Mutationsraten von V κ und V λ zu den beiden gemessenen Zeitpunkten in vergleichbarem Größenbereich (vor Depletion V λ 2,99%, V κ 2,29%; Regenerationsphase V λ 4,72%, V κ 4,65%). Wie im V κ -Repertoire waren nahezu alle V λ -Sequenzen in der Regenerationsphase mutiert. Die Bandbreite an Mutationen betrug vor B-Zell-Depletion 0 bis 16 Mutationen je

untersuchter Sequenz und in der Regenerationsphase 0 bis 36 Mutationen (siehe auch Tab. 6).

3.3.7. Mutationen in RGYW- und WRCY-Motiven

Die Analyse der Mutationen in den RGYW- und WRCY-Hotspots im $V\lambda$ -Genrepertoire der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen zeigte im Gegensatz zu den Ergebnissen des $V\kappa$ -Repertoires keine signifikante Veränderung (55,6% vor Therapie versus 54,9% in der Regenerationsphase, $p=0,6605$) (siehe auch Übersicht, Tab. 6).

CD19+CD27+ B-Zellen $V\lambda$ -Genrepertoire	vor Therapie (n= 22 Sequenzen)	Regenerationsphase (n= 57 Sequenzen)
CDR3 Länge +/- SD	31,5 ± 2,74	31,32 ± 3,21
Mutationsrate	2,99%	4,72%*
FR Mutationen	71,88%	66,16%**
CDR Mutationen	28,13%	33,84%**
R/S Mutationen: FR	1,56	1,62
R/S Mutationen: CDR	6,5	4,21***
RGYW-/ WRCY-Mutationen	55,63%	54,86%

Tabelle 6: Übersicht über das Mutationsmuster des $V\lambda$ -Genrepertoires der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen vor Therapie mit Rituximab und in der Regenerationsphase (7 Wochen nach Therapie); *** $p<0,01$, ** $p<0,005$, * $p<0,0001$

3.3.8. Mutationen in den CD- und Frameworkregionen

Die Analyse der Mutationen in den CD- (CDR1 und 2) und Frameworkregionen (FR1, 2, 3) der $V\lambda$ -Rearrangements der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen ergab, dass 72% der Mutationen vor Therapie in den Frameworkregionen und 28% in den CD-Regionen lagen. In der Regenerationsphase entfielen hingegen 66% der Mutationen auf die Frameworkregionen ($p < 0,005$) und 34% auf die CD-Regionen ($p < 0,005$). Die Veränderungen waren statistisch signifikant.

Somit kam es insgesamt zu einer Abnahme des Anteils an Mutationen in den Frameworkregionen und einer Zunahme an Mutationen in den CD-Regionen der $V\lambda$ -Rearrangements der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen, wobei weiterhin der überwiegende Anteil an Mutationen in den Frameworkregionen lag (siehe Tab. 6).

3.3.9. Mutationen in einzelnen CD- und Frameworkregionen

Bei der Analyse der Mutationen in den einzelnen CD- und Frameworkregionen des $V\lambda$ -Genrepertoires der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen zeigte sich, wie auch schon im $V\kappa$ -Repertoire, durchweg ein Anstieg der Mutationsraten in der Regenerationsphase. Diese Veränderungen waren statistisch signifikant. Wie im $V\kappa$ -Repertoire lagen die Mutationsraten in den CD-Regionen (1 und 2) höher als in den Frameworkregionen (1, 2, 3).

Insgesamt zeigte diesmal CDR2 die höchste Mutationsrate mit 9,6% vor Therapie und 14,8% in der Regenerationsphase ($p < 0,0001$). CDR1 folgte mit 4,5% vor Therapie und einem signifikanten Anstieg auf 10,2% in der Regenerationsphase ($p < 0,0001$).

Bei Betrachtung der Mutationsraten in den einzelnen Frameworkregionen zeigte FR2 die höchste Mutationsrate (3,5% vor versus 6,2% nach Depletion, $p < 0,0001$), gefolgt von FR3 (2,4% vor versus 3,1% nach Depletion, $p < 0,001$) und FR1 (1,7% vor und 2,2% nach Depletion, $p < 0,05$). Die Reihenfolge der einzelnen CD- und Frameworkregionen in Bezug auf die Größe der Mutationsrate blieb somit jeweils vor und nach B-Zell-Depletion gleich (vergleiche Abb. 16).

CD19+CD27+ B-Zellen, V λ -Repertoire, Mutationsraten CDR und FR (%)

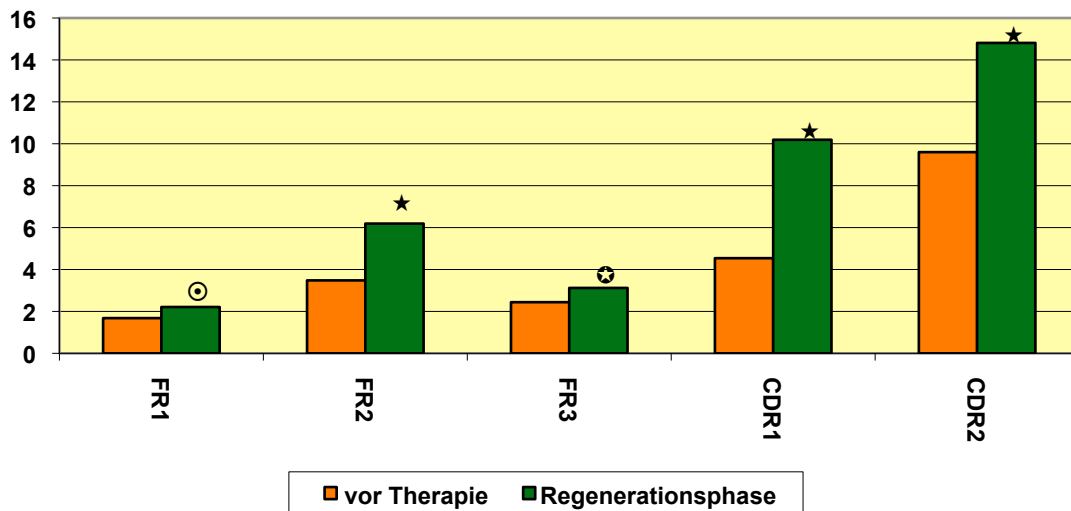


Abbildung 16: Analyse der Mutationsrate in den einzelnen CDR und Frameworkregionen des V λ -Repertoires; ★ p<0,0001, ★⊙ p=0,001, ⊙ p<0,05

3.3.10. R/S Ratio in CD- und Frameworkregionen

Wie schon im V κ -Repertoire konnten auch im V λ -Repertoire der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen signifikante Veränderungen der R/S-Mutationen in den CD-Regionen detektiert werden. Nach B-Zell-Depletion zeigte sich eine Abnahme der R/S-Mutationen in den CD-Regionen (6,5 vor Therapie versus 4,21 in der Regenerationsphase, p<0,01). Die R/S Ratio in den Frameworkregionen blieb vor und nach Therapie annähernd gleich. (1,56 vor Therapie versus 1,62 in der Regenerationsphase, p=0,6788) (siehe auch Übersicht, Tab. 6).

3.3.11. Häufigkeitsverteilung der V λ -Gensegmente auf die V λ -Cluster A, B und C

Das V λ -Repertoire der CD19+CD27+ B-Zellen lässt sich in die Cluster A, B und C einteilen. Abbildung 17 gibt eine Übersicht über die Zuordnung der einzelnen V λ -Gensegmente zu dem jeweiligen Cluster. Hier zeigte sich vor und nach B-Zell-Depletion eine vergleichbare Häufigkeitsverteilung auf Cluster A, B und C.

CD19+CD27+ B-Zellen, V λ -Gensegmente, Verteilung auf V λ -Cluster (%)

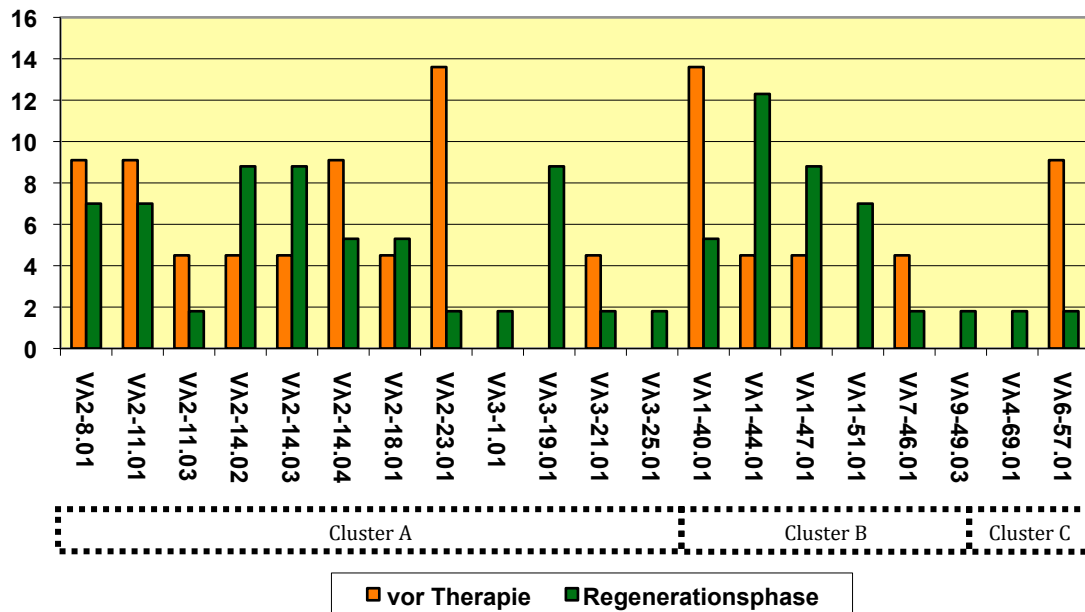


Abbildung 17: Übersicht der Zuordnung der einzelnen V λ -Gensegmente zu den V λ -Clustern A, B und C

3.3.12. Häufigkeitsverteilung der V λ -Gensegmente auf die V λ -Cluster A und B+C

Ein vermehrtes Vorkommen von distal-J λ -liegenden V λ -Gensegmenten (Cluster B+C) wird als Anzeichen von Rezeptor Revision angesehen. Es wurde daher die Häufigkeitsverteilung der V λ -Gensegmente auf die Cluster A (proximal J λ) und die beiden Cluster B+C (distal J λ) vor und nach Rituximabtherapie analysiert, um mögliche Veränderungen zu detektieren. V λ -Gensegmente des Cluster A waren jeweils vorwiegend im Repertoire vertreten, eine signifikante Änderung der Häufigkeitsverteilung lag nicht vor (siehe Abb. 18).

Somit fand sich eine ähnliche Verteilung der V λ -Gene auf Cluster A und Cluster B+C vor und nach B-Zell-Depletion (p=0,3909).

CD19+CD27+ B-Zellen, V λ -Gensegmente, Verteilung Cluster A und B+C (%)

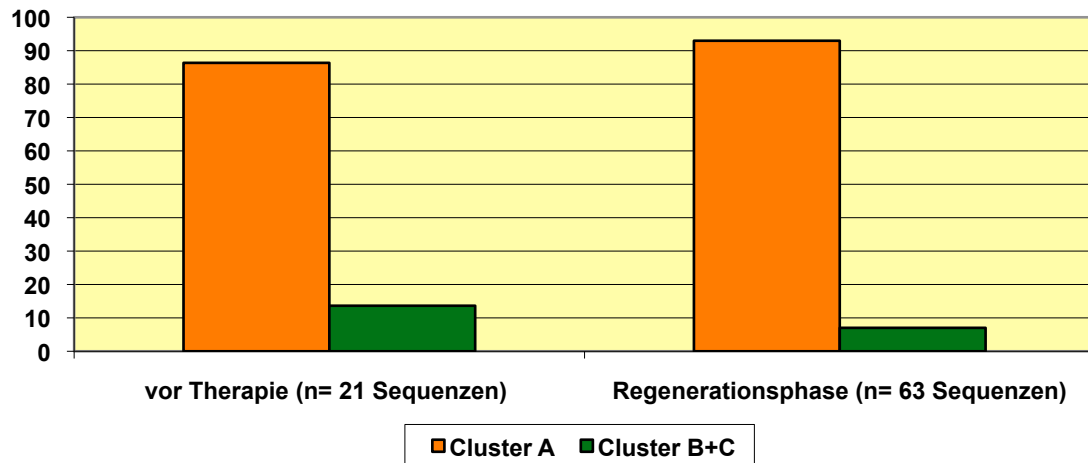


Abbildung 18: Vergleich der Häufigkeitsverteilung der V λ -Gensegmente auf Cluster A und Cluster B+C

3.3.13. Mutationen in J λ 1-5 und J λ 7-Rearrangements

Es wurden nun die Mutationsraten von J λ 1-5-Rearrangements mit J λ 7-Rearrangements des CD19+CD27+ B-Zell-Repertoires vor und nach Rituximabgabe verglichen. Es zeigte sich jedoch weder vor Therapie (2,91% J λ 1-3 versus 3,62% J λ 7, $p=0,3792$) noch nach Therapie (4,63% J λ 1-3 versus 5,10% J λ 7, $p=0,1800$) ein signifikanter Unterschied in der Mutationsrate der J λ 1-5 und J λ 7-Gensegmente (siehe auch Abb. 19).

CD19+CD27+ B-Zellen, Mutationsraten J λ 1-5 und J λ 7 (%)

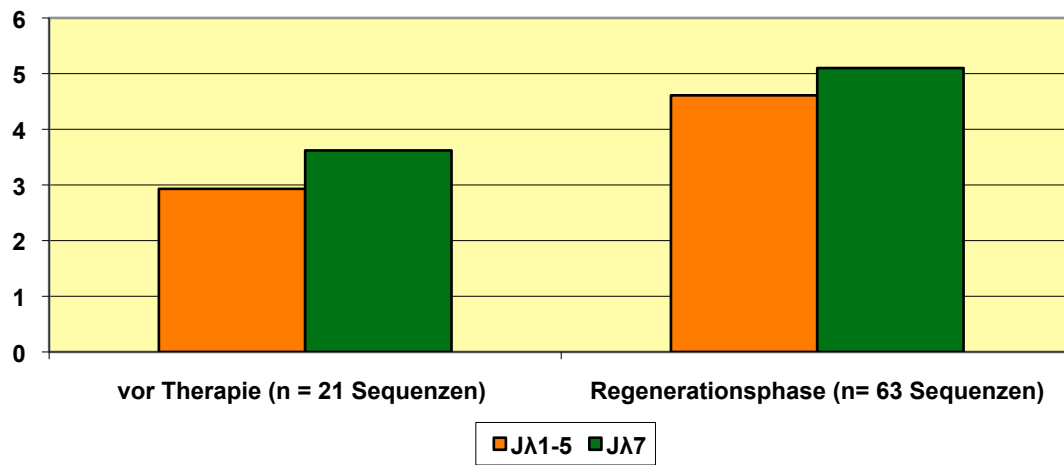


Abbildung 19: Vergleich der Mutationsraten in J λ 1-5 und J λ 7-Rearrangements

4. Diskussion

In den letzten Jahren gewannen B-Zellen aufgrund ihrer zentralen Rolle in der Pathogenese von Autoimmunprozessen als therapeutisches Ziel in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen immer mehr an Bedeutung. Neben der Sekretion von Autoantikörpern und proinflammatorischen Zytokinen beeinflussen B-Zellen das Immunsystem durch die Präsentation von Antigenen und die Aktivierung dendritischer Zellen und T-Zellen.^{83, 139} Deshalb wurden verschiedene B-Zell-gerichtete Therapieverfahren entwickelt, welche auf direktes oder indirektes Targeting von B-Zellen abzielen.

Der erste Vertreter B-Zell gerichteter Medikamente war der monoklonale Anti-CD20-Antikörper Rituximab (Mabthera®). Rituximab hat sich seit der Zulassung im Jahr 2006 für die Therapie der Rheumatoiden Arthritis und auch bei der Therapie von verschiedenen anderen Autoimmunerkrankungen etabliert. So ist Rituximab seit April 2013 auch zur Therapie bei schwerer, aktiver Granulomatose mit Polyangiitis (Morbus Wegener) für den europäischen Markt zugelassen.^{103, 148}

Durch die selektive Bindung von Rituximab an das CD20-Antigen der B-Zellen kommt es zu einer passageren, in der Regel sechs bis neun Monate anhaltenden peripheren B-Zell-Depletion.¹¹⁷ Die frühen Vorläuferzellen der B-Zellen im Knochenmark und die terminal differenzierten Plasmazellen werden aufgrund ihrer fehlenden CD20-Expression von der B-Zell-Depletion ausgespart.^{116, 117} Ein Ziel der durch Rituximab induzierten CD20+ B-Zell-Depletion ist es, durch sukzessive B-Zell-Regeneration aus Pro-B-Zellen ein neues B-Zell-Repertoire zu bilden, welches möglicherweise nicht mehr autoimmun geprägt ist.

B-Gedächtniszellen bilden das immunologische Gedächtnis und liefern somit einen entscheidenden Beitrag zur humoralen und protektiven Immunität. Durch autoreaktive B-Gedächtniszellen wird jedoch auch die Autoimmunität aufrechterhalten. Darauf basiert die Hypothese, dass durch die B-Zell-Depletion von CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen auch ein Rückgang der B-Zell-abhängigen Autoimmunprozesse erreicht werden kann.⁸¹

Bisher konnte gezeigt werden, dass die B-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut nach der antiCD20 B-Zell-Depletion nach einem bestimmten Muster regenerieren. Nach ein bis zwei Jahren kommt es bei der Mehrzahl der Patienten zu einer numerischen Normalisierung der Anzahl an B-Zellen. Die CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen regenerieren sich jedoch langsamer und verzögert.¹¹⁷ Pre-switch B-Gedächtniszellen sind selbst nach sieben Jahren nicht normalisiert, Post-switch B-Gedächtniszellen normalisieren sich erst nach einigen Jahren.¹⁴⁹

Darüberhinaus fanden sich Hinweise, dass Rituximab einen Einfluss auf molekulare Prägungen (Imprints) in der Ausbildung des Immunglobulinrezeptors der schweren Kette mit umfassenden Veränderungen des V_H-Genrepertoires hat.¹⁴³ Bisher wurden die molekularen Effekte im V_L-Genrepertoire nach Rituximabgabe noch nicht im Detail untersucht. In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss von Rituximab auf das Kappa- und Lambda-Leichtkettengenrepertoire der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen bei einer Patientin mit aktiver Rheumatoider Arthritis vor und nach B-Zell-Depletion durch Rituximab untersucht, um mögliche Veränderungen im regenerierten CD19+CD27+ B-Zell-Repertoire zu detektieren.

4.1. Gibt es Veränderungen des Kappa- und Lambda-Leichtkettenrepertoires der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen nach B-Zell-Depletion durch Rituximab?

Nur Zellen mit einem positiven V(D)J-Rearrangement können ein funktionsfähiges Immunglobulin auf ihrer Oberfläche exprimieren und sind dadurch den zellulären Selektionseinflüssen ausgesetzt. Bei einem unproduktiven Rearrangement kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters bei der Rekombination der Gensegmente. Dadurch wird kein funktionsfähiges Immunglobulin auf der Zelloberfläche exprimiert. Die Veränderungen im unproduktiven Genrepertoire auf zellulärer Ebene kommen daher eher durch molekulare Mechanismen und weniger durch Selektionsmechanismen zustande. Somit eignet sich das unproduktive

Genrepertoire weniger zur Untersuchung von Selektionsmechanismen und wurde in dieser Arbeit nicht analysiert.^{145, 150-152}

Zunächst wurde nach Einzelzellsortierung und anschließender Einzelzell-PCR die Verwendung verschiedener produktiver V_{κ} -/ J_{κ} - und V_{λ} -/ J_{λ} -Gensegmente in der CD19+CD27+ B-Zell-Subpopulation des peripheren Blutes vor und nach Rituximabgabe untersucht. Die Häufigkeitsverteilung der einzelnen V_{κ} -Gensegmente des CD19+CD27+ B-Zell-Repertoires zeigte ein diverses, polyklonales Genrepertoire. $V_{\kappa}1$ -Familienmitglieder waren mit einem Anteil von 62% vor und 57% nach der Therapie mit Rituximab dominant exprimiert. Eine prädominante Expression von $V_{\kappa}1$ -Genen bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis wurde bereits beschrieben. Hierbei wurde die Synovia eines Patienten mit Rheumatoider Arthritis im Vergleich zu einem gesunden Donor untersucht.¹⁵³

Darüber hinaus ergab die Analyse der Gensegmente, dass einzelne Gensegmente nur nach Therapie exprimiert wurden. Insgesamt zeigt das regenerierte B-Zell-Repertoire jedoch eine vergleichbar diverse Nutzung der V_{κ} -Gene vor und nach Rituximabgabe.

Gene der $V_{\kappa}6$ - und $V_{\kappa}7$ -Familie wurden im untersuchten Genrepertoire zu beiden Zeitpunkten nicht detektiert. $V_{\kappa}7$ kann einem einzelnen Gensegment (B1) zugeordnet werden. B1 wird als Pseudogen angesehen. Als Pseudogene werden DNA-Abschnitte bezeichnet, die strukturell Genen ähneln, aber nicht für ein funktionelles Protein kodieren.¹⁵⁴ Das Pseudogen B1 fand sich nicht in den analysierten Sequenzen.

Bei Patienten mit Systemischem Lupus Erythematodes konnte das Gen B3, ein Mitglied der $V_{\kappa}4$ -Familie, als überexprimiert nachgewiesen werden.⁶⁹ Es wurde mit dem Kodieren für Autoantikörper in Verbindung gebracht⁷⁴ und es war in dem untersuchten V_{κ} -Repertoire nicht nachweisbar. Dies könnte die Hypothese bestätigen, dass bei unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen unterschiedliche Gene, die für Autoantikörper kodieren, nachweisbar sind.

Die Nutzung der V_{κ} -Gensegmente im Gesunden entspricht einem polyklonalen Repertoire.¹⁵⁵ Dementsprechend wäre ein restringiert repopulierendes

Repertoire nach der CD20+ B-Zelldepletion durch Rituximab ein mögliches Zeichen einer Reduktion der Immunkompetenz und der antiinfektiven Antwort.

Das Genrepertoire der hier untersuchten Patientin zeigte ein polyklonales Repertoire mit einer breiten Verwendung von variablen Genen der V κ -Familien, wie es auch bei Gesunden beschrieben wird. Es findet sich somit kein Hinweis für ein restringiertes Repertoire.

Die Analyse der J κ -Gensegmente des Kappa-Genrepertoires der untersuchten CD19+CD27+ B-Zellen zeigte eine ähnliche Verteilung der J κ -Gensegmente vor und nach Therapie mit dem vorherrschenden Vorkommen von J κ 2 zu beiden Zeitpunkten, gefolgt von J κ 1 und J κ 4 vor Therapie und J κ 1 nach Therapie. Eine Prädominanz von J κ 2 und J κ 1 wurde bereits in mehreren Studien über Autoimmunerkrankungen beschrieben. Zum einen in autoreaktiven B-Zellen von Patienten mit Systemischem Lupus Erythematosus, in neonatalen B-Zellen sowie auch in Patienten mit Juveniler Rheumatoider Arthritis.^{19, 156, 157}

Das prädominante Vorkommen von J κ 1- und J κ 2-Gensegmenten bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen könnte einerseits das Ergebnis der bevorzugten Verwendung während der V(D)J-Rekombination sein. Andererseits könnte es auch das Ergebnis einer positiven Selektion auf zellulärer Ebene aufgrund einer bevorzugten Bindung an den B-Zell-Rezeptor sein. Die beobachtete prädominante Verwendung von J κ 2-Gensegmenten in neonatalen B-Zellen war gleichermaßen in produktiven und nichtproduktiven Rearrangements aufgetreten. Das würde eher für eine vorrangige Verwendung auf molekularer Ebene als auf zellulärer Ebene sprechen.

J κ 5 gilt als ein wichtiger Indikator für Rezeptor Revision. Bei der Analyse des V κ -Repertoires konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von J κ 5 vor und nach Depletion festgestellt werden.

Bei der Analyse des V λ -Genrepertoires der CD19+CD27+ B-Zellen wurden die Beobachtungen des V κ -Genrepertoires weitestgehend bestätigt. Es fand sich ebenfalls ein polyklonales Genrepertoire in der Regenerationsphase. Hier wurden die Leichtkettenfamilien V λ 1 und V λ 2 vorwiegend exprimiert. Die

Analyse der $V\lambda$ -Gensegmente zeigte ebenfalls, dass einige Gensegmente nur nach Therapie exprimiert wurden.

Die Analyse der $J\lambda$ -Gene des $V\lambda$ -/ $J\lambda$ -Repertoires der untersuchten $CD19+CD27+$ B-Zellen zeigte eine vergleichbare Verteilung der $J\lambda$ -Gene vor und nach Therapie mit dem vorherrschenden Vorkommen von $J\lambda 2$.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gefundenen Daten im untersuchten $CD19+CD27+$ B-Zell-Repertoire für die Neubildung eines diversen, polyklonalen $V\kappa$ -/ $J\kappa$ - und $V\lambda$ -/ $J\lambda$ -Genrepertoires nach der durch Rituximab induzierten B-Zell-Depletion sprechen. Es ergaben sich keine Hinweise, dass eine Therapie mit Rituximab zu einer Restriktion im repopulierenden Repertoire führt.

4.2. Gibt es Veränderungen in dem Mutationsmuster des Kappa- und Lambda-Leichtkettenrepertoires der $CD19+CD27+$ B-Gedächtniszellen nach B-Zell-Depletion durch Rituximab?

Nach Analyse der Häufigkeitsverteilungen wurden die Mutationsraten des $V\kappa$ - und $V\lambda$ -Leichtkettenrepertoires der $CD19+CD27+$ B-Gedächtniszellen analysiert, um durch die anti-CD20 B-Zell-Depletion induzierte Veränderungen des $V\kappa$ - und $V\lambda$ -Genrepertoires zu identifizieren. Es zeigte sich, dass die Mutationsraten in der Regenerationsphase nach Therapie im Vergleich zu den Ausgangswerten vor Therapie für $V\kappa$ und $V\lambda$ angestiegen waren (vor Depletion $V\lambda$ 2,99%, $V\kappa$ 2,29%; Regenerationsphase $V\lambda$ 4,72%, $V\kappa$ 4,65%).

Durch das Vorkommen von polyklonalen und hochmutierten Sequenzen in der Regenerationsphase wird die Hypothese, dass bei der durch Rituximab vermittelten B-Zell-Depletion eine Modulation der leichten und schweren Immunoglobulinkette stattfindet, gestützt. Diese Erkenntnisse decken sich mit publizierten Erkenntnissen bei der Analyse des Mutationsmusters von Immunoglobulin V_H4 -Genen in einer Gruppe von mit Rituximab therapierten Patienten.¹⁴³

Die hochmutierten Zellen, welche in der frühen Regenerationsphase nach B-Zell-Depletion auftraten, könnten einerseits aus einem neugeschaffenen B-Zell-

Pool stammen, in welchem eine schnelle und intensive somatische Hypermutation stattfand. Andererseits könnten die mutierten Zellen aus einem Pool von Plasmablasten stammen, die in einer geschützten Nische nicht durch Rituximab depletiert wurden.^{158, 159} Solche Nischen finden sich beispielsweise im synovialen Kompartiment sowie in den sekundären lymphatischen Organen.¹⁴¹

Um die Verteilung der Mutationen genauer zu analysieren, untersuchten wir als nächstes die Verteilung auf RGYW- und WRCY-Hotspots. In den RGYW- und WRCY-DNA-Motiven finden bei gesunden Individuen bevorzugt T-Zell-abhängige somatische Hypermutationen statt.^{46, 146} Auch in einer Studie über einen X-linked-hyper-IgM-Patienten zeigte sich, dass RGYW-/WRCY-Motive bevorzugte Ziele von somatischer Hypermutation während der T-Zell-abhängigen B-Zellreifung im Keimzentrum sind.¹⁶⁰

Die V_{κ} -Familie zeigte eine verminderte Verteilung der Mutationen auf RGYW-/WRCY-Motive nach Rituximabgabe (70,8% vor Therapie, 58,4% in der Regenerationsphase). In der V_{λ} -Familie konnte keine signifikante Modulation während der Regenerationsphase beobachtet werden. Eine erniedrigte Verteilung auf die RGYW-/WRCY-Motive deckt sich mit vorhergehenden Beobachtungen im Ig- V_{H3} - und Ig- V_{H4} -Mutationsverhalten in unserem Labor.¹⁴³

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Affinitätsreifung oder die Selektion in antigenpräsentierenden Zellen vor und nach B-Zell-Depletion unterschiedlich abläuft.

Als nächstes wurde die Verteilung der Mutationen auf die komplementaritätsbestimmenden, hypervariablen Regionen (CDR1 und 2) und die zwischen ihnen liegenden Frameworkregionen (FR1-3) analysiert. Sowohl im V_{λ} - als auch im V_{κ} -Repertoire zeigte sich ein Anstieg der Mutationsrate in den CD-Regionen CDR1 und 2 sowie in den einzelnen Frameworkregionen FR1, 2 und 3 nach B-Zell-Depletion.

In der Analyse des V_{κ} -Genepertoires zeigte CDR1 zu beiden Untersuchungszeitpunkten die höchste Mutationsrate (7,6% versus 12,7%), gefolgt von CDR2 (4,8% versus 11,6%). Im V_{λ} -Genrepertoire zeigte CDR2 zu beiden Untersuchungszeitpunkten die höchste Mutationsrate (9,6% versus

14,8%), gefolgt von CDR1 (4,5% versus 10,2%). Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis auf signifikante Veränderungen in dem regenerierten $V\lambda$ - und $V\kappa$ -Genrepertoire der CD19+CD27+ B-Zellen durch die B-Zell-Depletion sein.

Daher erfolgte nun die Analyse des Verhältnisses von Austauschmutationen zu stillen Mutationen (R/S) in den hypervariablen Regionen (CDRs) des $V\lambda$ - und $V\kappa$ -Repertoires. Durch somatische Hypermutation kommt es hauptsächlich zu Punktmutationen, welche entweder Austauschmutationen (R) oder stille Mutationen (S) darstellen. Durch die Bestimmung des Verhältnisses von R- zu S-Mutationen (R/S Ratio) kann die Antigenselektion in Immunglobulingenen evaluiert werden.¹⁶¹ Um die strukturelle Integrität zu wahren und die Funktion des Immunglobulinmoleküls zu erhalten, scheinen hingegen in den Frameworkregionen höhere S-Mutationsraten und ein Mangel an R-Mutationen vorzuliegen.¹⁶²

Eine positive Selektion an Austauschmutationen (R) wurde in Analysen des V_H - und V_L -Genrepertoires in gesunden Individuen beschrieben.^{45, 163, 164} Es wurde jedoch auch schon ein Vorkommen von negativer Selektion von Austauschmutationen bei Autoimmunität beschrieben.^{165, 166} In vorausgehenden Studien in unserem Labor bezüglich der R/S Ratio bei der Analyse von V_H -Ketten vor und nach Therapie mit Rituximab konnte eine positive Selektion von Austauschmutationen gefunden werden.¹⁴³

Die R/S Ratio in den CD-Regionen zeigte während der Regenerationsphase in $V\kappa$ und $V\lambda$ eine signifikante Abnahme (R/S CDR in $V\lambda$: 6,5 versus 4,21, R/S CDR in $V\kappa$: 1,84 versus 1). Somit fand sich in dem untersuchten $V\kappa$ - und $V\lambda$ -Leichtkettengenrepertoire der CD19+CD27+ B-Zell-Subpopulation eine negative Selektion von Austauschmutationen. Die Reduktion der R/S Ratio in den CD-Regionen könnte auch auf eine niedrigere Affinität von potentiellen autoreaktiven Klonen, die während der B-Zell-Regeneration zirkulieren, hinweisen.

Neben der V(D)J-Rekombination wird die Immunglobulinspezifität vor allem durch die komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR1-3) determiniert. In der CD-Region 3 der leichten Kette ist die Schnittstelle zwischen V und J lokalisiert, durch die es zu junktionaler Vielfalt kommt. CDR3 ist entscheidend

an der Antigenbindung beteiligt.¹⁶⁷ Bei gesunden Menschen scheint die CDR3-Länge annähernd gleich zu sein.¹⁵² Bei Autoimmunität scheint die CDR3-Länge verändert zu sein. Diese Alteration entsteht wahrscheinlich durch molekulare Mechanismen, wie N- oder P-Addition und somatische Hypermutation. Bei Rheumatoider Arthritis konnte in autoreaktiven B-Zell-Populationen eine längere durchschnittliche CD-Region 3 nachgewiesen werden.^{73, 168}

Nun wurde der Einfluss der Rituximab-Therapie auf die CDR3-Länge untersucht. Es fand sich jedoch keine signifikante Veränderung der CDR3-Länge nach Rituximabgabe in dem untersuchten V_L -Repertoire der CD19+CD27+ B-Zellen. Dies deckt sich mit dem Ergebnis der Analyse des V_H -Repertoires nach Therapie mit Rituximab in vorhergehenden Studien in unserem Labor.¹⁴³

4.3. Gibt es Anzeichen für Rezeptor Revision im Kappa- und Lambda-Leichtkettenrepertoire der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen vor und nach B-Zell-Depletion durch Rituximab?

In einer Studie über die Verwendung der Gensegmente des Kappa-Lokus nach aktiver sekundärer V(D)J-Rekombination konnte die vermehrte Verwendung von J_K distalen V_K -Segmenten (Segmente der Upstream- V_K -Kassette) und V_K distalen J_K -Segmenten identifiziert werden.⁶² Somit könnte die vermehrte Verwendung von distalen V_K - und J_K -Segmenten auch bei der Analyse des Kappa-Leichtkettenrepertoires einen Hinweis auf vermehrt abgelaufene sekundäre V(D)J-Rekombination liefern. Eine solche Tendenz wurde in den B-Zellen des peripheren Blutes eines Patienten mit Systemischem Lupus Erythematosus beobachtet.⁶⁹ Hier zeigte sich im produktiven Repertoire eine vermehrte Verwendung von V_K -Segmenten der Upstream- V_K -Kassette und eine vermehrte Verwendung der V_K distalen J_K -Segmente im Vergleich zu gesunden Individuen. Da die Rearrangements dieser Segmente weniger häufig mutiert waren als die Rearrangements weiter proximal gelegener V_K - und J_K -Segmente, wurde angenommen, dass sich die sekundäre V(D)J-Rekombination bei diesem Patienten nach der somatischen Hypermutation in reifen, peripheren

B-Zellen vollzog. Somit wurde die Hypothese aufgestellt, dass B-Zellen des peripheren Blutes bei diesen Erkrankten eine vermehrte sekundäre V(D)J-Rekombination durchführen. Dieser Mechanismus wird als Rezeptor Revision bezeichnet. Er findet bei Gesunden vor allem in den Keimzentren statt.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Rezeptor Revision wurde inzwischen wiederholt mit der Entstehung von autoreaktiven Immunglobulinen in Verbindung gebracht.^{68, 70, 172, 173} Hinweise für Rezeptor Revision konnten auch bei der Untersuchung des V_κ-/J_κ-Repertoires im peripheren Blut von Patienten mit frühkindlicher oligoarthrikulärer Arthritis (EOPA) gefunden werden.¹⁹

In dem untersuchten V_κ-Repertoire der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen konnten vor und nach Therapie mit Rituximab ausschließlich V_κ-Gene der Downstream-V_κ-Kassette (J_κ proximal) identifiziert werden. Gensegmente der Upstream-V_κ-Kassette (J_κ distal) fanden sich nicht im Genrepertoire.

In weiterführenden Studien in unserem Labor wurde das CD19+CD27- B-Zell-Repertoire der hier analysierten Patientin, sowie das CD19+CD27- und CD19+CD27+ Repertoire einer weiteren Patientin ergänzend untersucht und die Immunglobulinsequenzen beider Patienten gepoolt. Die nun gewonnenen Daten zeigten, dass die Sequenzen von V_κ-Genen der Upstream-V_κ-Kassette nach Therapie im Vergleich zu denen der Downstream-V_κ-Kassette signifikant erniedrigt waren. Diese Daten scheinen darauf hinzuweisen, dass Imprints von Rezeptor Revision schon vor der Rituximabtherapie nachweisbar waren und therapieinduzierte Veränderungen eine potentielle defekte Rezeptor Revision in Patienten mit Rheumatoider Arthritis nicht unterstützen. Die Daten lassen vermuten, dass Rituximab die B-Zell-Homöostase normalisiert, indem es die Imprints der Rezeptor Revision reduziert, welche vor Therapie aktiv gewesen sind.¹⁷⁴

J_κ5 ist unter den J_κ-Genen das am weitesten distal in Richtung V_κ gelegene J_κ-Gensegment und kann somit auch als ein Indikator für Rezeptor Revision gelten. Es konnte jedoch bei der Analyse der V_κ-Repertoires kein signifikanter Unterschied in der Expression von J_κ5 vor und nach Depletion festgestellt werden.

Um weitere Hinweise auf die Beeinflussung der Rezeptor Revision durch Rituximab zu erhalten, wurde nun die Mutationsrate von J κ 5 (distal zu V κ) mit J κ 1-4 (proximal zu V κ) jeweils vor Therapie und in der Regenerationsphase miteinander verglichen. Hier zeigte sich, dass vor und nach Therapie die Mutationsrate in J κ 5-Gensegmenten im Vergleich zu J κ 1-4-Gensegmenten signifikant niedriger war (vor Therapie J κ 1-4 2,53% versus J κ 5 0,14%; nach Therapie J κ 1-4 4,99% versus J κ 5 3,44%).

In dem untersuchten CD19+CD27+ B-Zell-Repertoire lassen sich somit Anzeichen für Rezeptor Revision am Kappa-Lokus vor und nach Therapie finden. Darüber hinaus ist es wahrscheinlich, dass die Rezeptor Revision in den sekundären lymphatischen Organen nach der Initiation von somatischer Hypermutation stattgefunden hat, was aufgrund der geringeren Anzahl an Mutationen mit J κ 5 vermutet werden kann.

Es wurden nun analog zum J κ -Repertoire die Mutationsraten der V λ -/J λ -Rearrangements bezüglich Anzeichen für Rezeptor Revision untersucht. Hierzu wurden J λ 7-Gene (distal V λ) mit J λ 1-5-Genen (proximal V λ) verglichen. J λ 7 ist innerhalb der J λ -Familie das am weitesten distal in Richtung V λ gelegene Segment. Sowohl vor als auch nach Therapie fanden sich keine signifikanten Veränderungen. Ein möglicher Grund für die fehlende Modulation im V λ -/J λ -Repertoire ist, dass die Rezeptor Revision für V λ zentral stattfindet.

Anschließend wurden die V λ -Gensegmente nach ihrer Lage bezüglich J λ untersucht. Die V λ -Gensegmente können in drei Cluster (A, B und C) eingeteilt werden.²⁵ Cluster A liegt relativ zu den J λ -Gensegmenten am proximalsten, Cluster C am distalsten. Cluster B liegt zwischen Cluster A und C. Eine gestiegene Verwendung von Cluster C V λ -Genen wird als Anzeichen für eine vermehrte Rezeptor Revision in V λ -Rearrangements angesehen.¹⁶⁴

Zunächst wurde die Verteilung auf die drei einzelnen Cluster und anschließend die Verteilung auf Cluster A (proximal J λ) und Cluster B+C (distal J λ) verglichen. Die Verteilung der V λ -Gene auf die drei Cluster, sowie auf Cluster A und Cluster B+C war vor und nach Therapie vergleichbar. Signifikante Veränderungen zeigten sich nicht. Es konnten im Gegensatz zu den

Ergebnissen aus einer anderen Studie an einem Patienten mit Systemischem Lupus Erythematosus keine vermehrte Verwendung von Cluster C V λ -Gensegmenten gefunden werden.¹⁷⁵

Somit erscheint es als wahrscheinlich, dass die grundlegenden molekularen Mechanismen, welche die Rekombination und die Selektion von V λ -Leichtketten-Rearrangements steuern, durch die CD20+ B-Zell-Depletion nicht verändert wurden. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass ein funktionsfähiges Repertoire entsteht, das keine durch Rituximab ausgelöste Restriktion für die Infektabwehr aufweist.

5. Zusammenfassung

B-Zellen haben in den letzten Jahren als therapeutisches Ziel in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen aufgrund ihrer zentralen Rolle in der Pathogenese von Autoimmunprozessen immer mehr an Bedeutung gewonnen. Deshalb wurden verschiedene B-Zell-gerichtete Therapieverfahren entwickelt, welche auf direktes oder indirektes Targeting von B-Zellen abzielen. Der erste Vertreter B-Zell gerichteter Medikamente war der monoklonale Anti-CD20-Antikörper Rituximab (Mabthera®), welcher 2006 zur Behandlung der Rheumatoiden Arthritis zugelassen wurde. Rituximab induziert eine passagere, sechs bis neun Monate anhaltende B-Zell-Depletion. Ein Ziel der durch Rituximab induzierten B-Zell-Depletion ist, durch sukzessive B-Zell-Regeneration aus Pro-B-Zellen ein neues B-Zell-Repertoire zu bilden, welches möglicherweise nicht mehr autoimmun geprägt ist.

In Untersuchungen des V_H -Genrepertoires von Patienten mit Rheumatoider Arthritis fanden sich umfassende Veränderungen des Genrepertoires. Bisher wurden die molekularen Effekte im V_L -Genrepertoire nach Rituximabgabe jedoch noch nicht im Detail untersucht.

In dieser Arbeit sollte das Regenerationsmuster nach Rituximabtherapie von Immunglobulin Kappa- und Lamda-Leichtkettengenrearrangements der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen bei einer 35-jährigen Patientin mit aktiver Rheumatoider Arthritis analysiert werden. Hierzu wurden zwei Untersuchungszeitpunkte gewählt: Einmal kurz vor Rituximabgabe und einmal in der Regenerationsphase nach sieben Monaten.

Nach Einzelzellsortierung, Einzelzell-PCR und Sequenzierung der produktiven Sequenzen des CD19+CD27+ B-Zell-Repertoires wurde zunächst die Verwendung verschiedener produktiver V_K -/ J_K - und V_λ -/ J_λ -Gensegmente in der CD19+CD27+ B-Zell-Subpopulation des peripheren Blutes vor und nach Rituximabgabe untersucht. Die Häufigkeitsverteilung der einzelnen V_K - und J_K -Gensegmente des CD19+CD27+ B-Zell-Repertoires zeigte ein diverses, polyklonales Genrepertoire mit einer vergleichbaren Nutzung der V_K -Gene vor und nach Rituximabgabe und der prädominanten Expression von V_K1 -Genen

und J κ 1- und J κ 2-Genen. Die Prädominanz dieser Gene wurde auch schon in anderen Studien mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Bei der Analyse des V λ - und J λ -Genrepertoires der CD19+CD27+ B-Zellen fand sich ebenfalls ein diverses, polyklonales Genrepertoire. Hier wurden die Leichtkettenfamilien V λ 1 und V λ 2 sowie J λ 2 zu beiden Zeitpunkten vorwiegend exprimiert.

Die gefundenen Daten im untersuchten CD19+CD27+ B-Zell-Repertoire sprechen somit für die Neubildung eines diversen, polyklonalen V κ -/J κ - und V λ -/J λ -Genrepertoires nach der durch Rituximab induzierten B-Zell-Depletion, wie es auch bei Gesunden beschrieben wird. Es finden sich keine Hinweise für ein restringiert repopulierendes Repertoire.

Als nächstes wurde das Mutationsmuster des Kappa- und Lambda-Leichtkettenrepertoires der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen untersucht. Es zeigten sich substantielle Veränderungen durch eine erhöhte Mutationsrate in der nach B-Zell-Depletion neu erscheinenden CD19+CD27+ B-Zell-Population im V κ - und V λ -Repertoire. Die detaillierte Analyse der Mutationsverteilung auf RGYW- und WRCY-Hotspots im V κ - und V λ -Repertoire zeigten im V κ -Repertoire eine erniedrigte Verteilung der Mutationen auf RGYW/WRCY-Motive nach Rituximabgabe. Somit lässt sich vermuten, dass die Affinitätsreifung oder die Selektion in Antigen-präsentierenden Zellen vor und nach B-Zell-Depletion unterschiedlich abläuft.

Die Analyse der Verteilung der Mutationen auf die CD- und Frameworkregionen zeigte im V κ - und im V λ -Repertoire einen Anstieg der Mutationsrate in CDR1 und 2 nach B-Zell-Depletion, was auf Veränderungen in dem regenerierten V λ - und V κ -Genrepertoire nach B-Zell-Depletion hinweist.

Die R/S Ratio in den CD-Regionen des V λ - und V κ -Repertoires zeigte eine negative Selektion von Austauschmutationen. Eine negative Selektion von Austauschmutationen wurde bereits mit Autoimmunität in Verbindung gebracht. Es fand sich kein Einfluss der B-Zell-Depletion auf die durchschnittliche CDR3-Länge.

Rezeptor Revision wird als wichtiger Regulator der Autoimmunität angesehen und wurde als reduziert bei der Rheumatoiden Arthritis beschrieben. In der

aktuellen Untersuchung der CD19+CD27+ B-Gedächtniszellen fanden sich zu beiden Untersuchungszeitpunkten nur V κ -Gensegmente der Downstream-Kassette im Repertoire. In den distalen J κ -Genen (J κ 5) fand sich zu beiden Untersuchungszeitpunkten eine niedrigere Mutationsrate als in den proximalen J κ -Genen (J κ 1-4). Somit konnten Anzeichen für Rezeptor Revision am Kappa-Lokus vor und nach B-Zell-Depletion gefunden werden. Bei der Analyse des Lambda-Repertoires auf Anzeichen für Rezeptor Revision wurden die Mutationsraten von distalen J λ -Gensegmenten (J λ 7) mit proximalen J λ -Gensegmenten (J λ 1-5) und die Verteilung der V λ -Gensegmente auf proximale Cluster (A) und distale Cluster (B+C) verglichen. Es fanden sich keine Anzeichen für Rezeptor Revision am Lambda-Lokus zu beiden Untersuchungszeitpunkten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gefundenen Daten im untersuchten CD19+CD27+ B-Zell-Repertoire für die Neubildung eines diversen, polyklonalen V κ -/J κ - und V λ -/J λ -Genrepertoires nach der durch Rituximab induzierten B-Zell-Depletion sprechen. Es zeigten sich substantielle Veränderungen durch eine erhöhte Mutationsrate in der nach B-Zell-Depletion neu erscheinenden CD19+CD27+ B-Zellpopulation im V κ - und V λ -Repertoire. Die weitere detaillierte Analyse der Mutationen spricht dafür, dass bei der durch Rituximab vermittelten B-Zell-Depletion eine Modulation der leichten Immunoglobulinkette stattfindet. Durch eine erniedrigte Verteilung der Mutationen auf RGYW-/WRCY-Motive nach Rituximabgabe lässt sich zudem vermuten, dass die Affinitätsreifung oder die Selektion in Antigen-präsentierenden Zellen vor und nach B-Zell-Depletion unterschiedlich abläuft. Des Weiteren fanden sich vor und nach B-Zell-Depletion auch Anzeichen für Rezeptor Revision, allerdings lediglich am Kappa-Lokus.

6. Abkürzungen

A	Adenin
Abb	Abbildung
ACR	American College of Rheumatology
ANA	Antinukleäre Antikörper
APC	Allophycocyanin
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
BZR	B-Zell-Rezeptor
C	Cytosin
CCL/CXCL	Chemokinligand
CCP	Cyclisches citrulliniertes Peptid
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
CDR	Complementarity determining region
C _H	Konstante Region der schweren Kette
CIT	Center of Information Technology
C _L	Konstante Region der leichten Kette
C-Region	Constant Region (konstante Region)
D-Segment	Diversity Segment
DAS	Disease Activity Score
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMARD	Disease modifying antirheumatic drug
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA Moleküle
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiaminteraacetatessigsäure
EOPA	Early onset pauciarticular arthritis
ETBR	Ethidiumbromid
EULAR	European League Against Rheumatism

FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FR	Framework Region
g	Gramm
G	Guanosin
HBSS	Hank's balanced salt solution
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Ig _H	Schwere Kette des Immunglobulins
Ig _L	Leichte Kette des Immunglobulins
Igα/Igβ	Signaltransduktionseinheit des B-Zell-Rezeptors
IL	Interleukin
IMGT	International Immunogenetics Information System
JAK	Janus Kinase
J-Segment	Joining Segment
J _H	Joining Region der schweren Kette
J _L	Joining Region der leichten Kette
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LRM	Lower Reaction Mix
M	Mol
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MTX	Methotrexat
MZ	Marginalzone
NaCl	Natriumchlorid

NaOH	Natriumhydroxid
NIAMS	National Institute of Arthritis and Muskuloskeletal and Skin Disease
N-Nukleotid	Non-templated Nukleotid
NSAID	Non-steroidal antiinflammatory drugs
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
preBZR	Prä-B-Zell-Rezeptor
R	Purin
R-Mutationen	Replacement (Austausch-) Mutationen
RNA	Ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
RPMI Medium	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Reverse Transkriptase
RTX	Rituximab
S-Mutationen	Silent (stille) Mutationen
sek	Sekunde
SJC	Swollen Joint Count
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SMIP	Small modular immuno-pharmaceutical
T	Thymin
Treg	regulatorische T-Zellen
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TJC	Tender Joint Count
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Unit
URM	Upper Reaction Mix
UV	Ultraviolett

V	Volt
V-Segment	Variables Segment
VAS	Visuelle Analogskala
V _C	Konstante Region der schweren Kette
V _H	Variable Region der schweren Kette
V _L	Variable Region der leichten Kette
V _κ	Variable Region der Kappa-Leichtkette
V _λ	Variable Region der Lambda-Leichtkette
W	Adenin oder Thymin
Y	Pyrimidin
κ	Kappa-Leichtketten-Lokus
λ	Lambda-Leichtketten-Lokus
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μmol	Mikromol

7. Literatur

1. Westhoff G, Schneider M, Raspe H, Zeidler H, Runge C, Volmer T, et al. Advance and unmet need of health care for patients with rheumatoid arthritis in the German population--results from the German Rheumatoid Arthritis Population Survey (GRAPS). *Rheumatology (Oxford)*. 2009 Jun;48(6):650-7.
2. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):356-61.
3. Scheinecker C, Redlich K, Smolen JS. Cytokines as therapeutic targets: advances and limitations. *Immunity*. 2008 Apr;28(4):440-4.
4. Siegel J. Comparative effectiveness of treatments for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*. 2008 Jan 15;148(2):162-3.
5. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med*. 2007 Feb;13(2):156-63.
6. Schneider M, Kruger K. Rheumatoid arthritis--early diagnosis and disease management. *Dtsch Arztebl Int*. 2013 Jul;110(27-28):477-84.
7. Pincus T, Yazici Y, Sokka T, Aletaha D, Smolen JS. Methotrexate as the "anchor drug" for the treatment of early rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2003 Sep-Oct;21(5 Suppl 31):S179-85.
8. Scott DL, Symmons DP, Coulton BL, Popert AJ. Long-term outcome of treating rheumatoid arthritis: results after 20 years. *Lancet*. 1987 May 16;1(8542):1108-11.
9. Kyttaris VC. Kinase inhibitors: a new class of antirheumatic drugs. *Drug Des Devel Ther*. 2012;6:245-50.
10. Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, van Zeben D, Kerstens PJ, Hazes JM, et al. Comparison of treatment strategies in early rheumatoid arthritis: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2007 Mar 20;146(6):406-15.
11. Puolakka K, Kautiainen H, Mottonen T, Hannonen P, Korpela M, Julkunen H, et al. Impact of initial aggressive drug treatment with a combination of disease-modifying antirheumatic drugs on the development of work disability in early

- rheumatoid arthritis: a five-year randomized followup trial. *Arthritis Rheum.* 2004 Jan;50(1):55-62.
12. Verstappen SM, Jacobs JW, Bijlsma JW, Heurkens AH, van Booma-Frankfort C, Borg EJ, et al. Five-year followup of rheumatoid arthritis patients after early treatment with disease-modifying antirheumatic drugs versus treatment according to the pyramid approach in the first year. *Arthritis Rheum.* 2003 Jul;48(7):1797-807.
 13. van der Heijde D. Long-term effects of early treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007 May;3(5):258-9.
 14. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010 Sep;62(9):2569-81.
 15. Combe B, Landewe R, Lukas C, Bolosiu HD, Breedveld F, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of early arthritis: report of a task force of the European Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis.* 2007 Jan;66(1):34-45.
 16. Saag KG, Teng GG, Patkar NM, Anuntiyo J, Finney C, Curtis JR, et al. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008 Jun 15;59(6):762-84.
 17. Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis.* 2014 Mar;73(3):492-509.
 18. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science.* 2003 Sep 5;301(5638):1374-7.
 19. Morbach H, Richl P, Faber C, Singh SK, Girschick HJ. The kappa immunoglobulin light chain repertoire of peripheral blood B cells in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Mol Immunol.* 2008 Aug;45(14):3840-6.

20. Janeway CA, Jr. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 19;98(13):7461-8.
21. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S33-40.
22. Kamradt T, Ferrari-Kuhne K. [Adaptive immunity]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2011 Aug;136(33):1678-83.
23. Murphy KP, Janeway C, Travers P, Walport M, Mowat A, Weaver C. *Janeway's immunobiology*. 8th ed. New York, N.Y. ; London: Garland Science; 2012.
24. Kawasaki K, Minoshima S, Nakato E, Shibuya K, Shintani A, Asakawa S, et al. Evolutionary dynamics of the human immunoglobulin kappa locus and the germline repertoire of the V kappa genes. *Eur J Immunol*. 2001 Apr;31(4):1017-28.
25. Frippiat JP, Williams SC, Tomlinson IM, Cook GP, Cherif D, Le Paslier D, et al. Organization of the human immunoglobulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2. *Hum Mol Genet*. 1995 Jun;4(6):983-91.
26. Adolph S, Hameister H, Zimmer FJ, Zachau HG. The VK genes on human chromosome 22 are located at 22q11. *Nucleic Acids Res*. 1988 Jul 11;16(13):6241.
27. Weichhold GM, Ohnheiser R, Zachau HG. The human immunoglobulin kappa locus consists of two copies that are organized in opposite polarity. *Genomics*. 1993 May;16(2):503-11.
28. McBride OW, Battey J, Hollis GF, Swan DC, Siebenlist U, Leder P. Localization of human variable and constant region immunoglobulin heavy chain genes on subtelomeric band q32 of chromosome 14. *Nucleic Acids Res*. 1982 Dec 20;10(24):8155-70.
29. Grimaldi CM, Hicks R, Diamond B. B cell selection and susceptibility to autoimmunity. *J Immunol*. 2005 Feb 15;174(4):1775-81.
30. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983 Apr 14;302(5909):575-81.
31. Schatz DG, Oettinger MA, Schlissel MS. V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol*. 1992;10:359-83.

32. Berek C, Griffiths GM, Milstein C. Molecular events during maturation of the immune response to oxazolone. *Nature*. 1985 Aug 1-7;316(6027):412-8.
33. Jacob J, Przylepa J, Miller C, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. III. The kinetics of V region mutation and selection in germinal center B cells. *J Exp Med*. 1993 Oct 1;178(4):1293-307.
34. Meffre E, Casellas R, Nussenzweig MC. Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol*. 2000 Nov;1(5):379-85.
35. Ghia P, ten Boekel E, Rolink AG, Melchers F. B-cell development: a comparison between mouse and man. *Immunol Today*. 1998 Oct;19(10):480-5.
36. Alt FW, Yancopoulos GD, Blackwell TK, Wood C, Thomas E, Boss M, et al. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J*. 1984 Jun;3(6):1209-19.
37. Melchers F. The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nat Rev Immunol*. 2005 Jul;5(7):578-84.
38. Desiderio S. The B cell antigen receptor in B-cell development. *Curr Opin Immunol*. 1994 Apr;6(2):248-56.
39. Grawunder U, Leu TM, Schatz DG, Werner A, Rolink AG, Melchers F, et al. Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity*. 1995 Nov;3(5):601-8.
40. Grawunder U, Winkler TH, Melchers F. Regulation of recombination activating gene expression during lymphocyte development. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;217:31-43.
41. Roll P, Tony HP. [B-cell-targeted therapy in the treatment of autoimmune diseases]. *Z Rheumatol*. 2009 May;68(3):255-9.
42. Chung JB, Silverman M, Monroe JG. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol*. 2003 Jun;24(6):343-9.
43. Lopes-Carvalho T, Kearney JF. Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol Rev*. 2004 Feb;197:192-205.
44. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):1570-80.

45. Foster SJ, Dorner T, Lipsky PE. Somatic hypermutation of V κ J κ rearrangements: targeting of RGYW motifs on both DNA strands and preferential selection of mutated codons within RGYW motifs. *Eur J Immunol.* 1999 Dec;29(12):4011-21.
46. Dorner T, Foster SJ, Farner NL, Lipsky PE. Somatic hypermutation of human immunoglobulin heavy chain genes: targeting of RGYW motifs on both DNA strands. *Eur J Immunol.* 1998 Oct;28(10):3384-96.
47. Neuberger MS, Milstein C. Somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol.* 1995 Apr;7(2):248-54.
48. Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:165-96.
49. Odegard VH, Schatz DG. Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol.* 2006 Aug;6(8):573-83.
50. Berek C, Berger A, Apel M. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell.* 1991 Dec 20;67(6):1121-9.
51. Chaudhuri J, Alt FW. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol.* 2004 Jul;4(7):541-52.
52. McHeyzer-Williams MG. B cells as effectors. *Curr Opin Immunol.* 2003 Jun;15(3):354-61.
53. McHeyzer-Williams LJ, Driver DJ, McHeyzer-Williams MG. Germinal center reaction. *Curr Opin Hematol.* 2001 Jan;8(1):52-9.
54. Cassese G, Arce S, Hauser AE, Lehnert K, Moewes B, Mostarac M, et al. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol.* 2003 Aug 15;171(4):1684-90.
55. Cassese G, Lindenau S, de Boer B, Arce S, Hauser A, Riemekasten G, et al. Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. *Eur J Immunol.* 2001 Sep;31(9):2726-32.
56. Hauser AE, Debes GF, Arce S, Cassese G, Hamann A, Radbruch A, et al. Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J Immunol.* 2002 Aug 1;169(3):1277-82.

57. Hauser AE, Muehlinghaus G, Manz RA, Cassese G, Arce S, Debes GF, et al. Long-lived plasma cells in immunity and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Apr;987:266-9.
58. Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:367-86.
59. Agematsu K. Memory B cells and CD27. *Histol Histopathol.* 2000 Apr;15(2):573-6.
60. Halverson R, Torres RM, Pelanda R. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat Immunol.* 2004 Jun;5(6):645-50.
61. Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med.* 1993 Apr 1;177(4):999-1008.
62. Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med.* 1993 Apr 1;177(4):1009-20.
63. Radic MZ, Erikson J, Litwin S, Weigert M. B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J Exp Med.* 1993 Apr 1;177(4):1165-73.
64. Sandel PC, Gendelman M, Kelsoe G, Monroe JG. Definition of a novel cellular constituent of the bone marrow that regulates the response of immature B cells to B cell antigen receptor engagement. *J Immunol.* 2001 May 15;166(10):5935-44.
65. Sandel PC, Monroe JG. Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity.* 1999 Mar;10(3):289-99.
66. Casellas R, Shih TA, Kleinewietfeld M, Rakonjac J, Nemazee D, Rajewsky K, et al. Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science.* 2001 Feb 23;291(5508):1541-4.
67. Nemazee D, Weigert M. Revising B cell receptors. *J Exp Med.* 2000 Jun 5;191(11):1813-7.
68. Verkoczy LK, Martensson AS, Nemazee D. The scope of receptor editing and its association with autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2004 Dec;16(6):808-14.

69. Dorner T, Foster SJ, Farner NL, Lipsky PE. Immunoglobulin kappa chain receptor editing in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1998 Aug 15;102(4):688-94.
70. Girschick HJ, Grammer AC, Nanki T, Vazquez E, Lipsky PE. Expression of recombination activating genes 1 and 2 in peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2002 May;46(5):1255-63.
71. Itoh K, Meffre E, Albesiano E, Farber A, Dines D, Stein P, et al. Immunoglobulin heavy chain variable region gene replacement As a mechanism for receptor revision in rheumatoid arthritis synovial tissue B lymphocytes. *J Exp Med.* 2000 Oct 16;192(8):1151-64.
72. Zhang Z, Wu X, Limbaugh BH, Bridges SL, Jr. Expression of recombination-activating genes and terminal deoxynucleotidyl transferase and secondary rearrangement of immunoglobulin kappa light chains in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 2001 Oct;44(10):2275-84.
73. Meffre E, Schaefer A, Wardemann H, Wilson P, Davis E, Nussenzweig MC. Surrogate light chain expressing human peripheral B cells produce self-reactive antibodies. *J Exp Med.* 2004 Jan 5;199(1):145-50.
74. Meffre E, Davis E, Schiff C, Cunningham-Rundles C, Ivashkiv LB, Staudt LM, et al. Circulating human B cells that express surrogate light chains and edited receptors. *Nat Immunol.* 2000 Sep;1(3):207-13.
75. Meffre E, Chiorazzi M, Nussenzweig MC. Circulating human B cells that express surrogate light chains display a unique antibody repertoire. *J Immunol.* 2001 Aug 15;167(4):2151-6.
76. Samuels J, Ng YS, Coupillaud C, Paget D, Meffre E. Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med.* 2005 May 16;201(10):1659-67.
77. Fox DA, Gizinski A, Morgan R, Lundy SK. Cell-cell interactions in rheumatoid arthritis synovium. *Rheum Dis Clin North Am.* 2010 May;36(2):311-23.
78. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2012 Jul;51 Suppl 5:v3-11.

79. Klareskog L, Malmstrom V, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Semin Immunol*. 2011 Apr;23(2):92-8.
80. Hahn BH. Antibodies to DNA. *N Engl J Med*. 1998 May 7;338(19):1359-68.
81. Roll P, Tony HP. [Anti-CD20 therapy in rheumatoid arthritis]. *Z Rheumatol*. 2009 Jul;68(5):370-9.
82. Edwards JC, Cambridge G, Abrahams VM. Do self-perpetuating B lymphocytes drive human autoimmune disease? *Immunology*. 1999 Jun;97(2):188-96.
83. Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol*. 2001 Oct 15;167(8):4710-8.
84. Sato T, Ishikawa S, Akadegawa K, Ito T, Yurino H, Kitabatake M, et al. Aberrant B1 cell migration into the thymus results in activation of CD4 T cells through its potent antigen-presenting activity in the development of murine lupus. *Eur J Immunol*. 2004 Dec;34(12):3346-58.
85. Silveira PA, Dombrowsky J, Johnson E, Chapman HD, Nemazee D, Serreze DV. B cell selection defects underlie the development of diabetogenic APCs in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 2004 Apr 15;172(8):5086-94.
86. Silveira PA, Johnson E, Chapman HD, Bui T, Tisch RM, Serreze DV. The preferential ability of B lymphocytes to act as diabetogenic APC in NOD mice depends on expression of self-antigen-specific immunoglobulin receptors. *Eur J Immunol*. 2002 Dec;32(12):3657-66.
87. Aarvak T, Natvig JB. Cell-cell interactions in synovitis: antigen presenting cells and T cell interaction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2001;3(1):13-7.
88. Lanzavecchia A. Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 1990;8:773-93.
89. Weyand CM, Goronzy JJ, Takemura S, Kurtin PJ. Cell-cell interactions in synovitis. Interactions between T cells and B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2000;2(6):457-63.
90. Weyand CM, Seyler TM, Goronzy JJ. B cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Res Ther*. 2005;7 Suppl 3:S9-12.

91. Lund FE, Garvy BA, Randall TD, Harris DP. Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease. *Curr Dir Autoimmun.* 2005;8:25-54.
92. Takemura S, Braun A, Crowson C, Kurtin PJ, Cofield RH, O'Fallon WM, et al. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol.* 2001 Jul 15;167(2):1072-80.
93. Kaser A, Dunzendorfer S, Offner FA, Ludwiczek O, Enrich B, Koch RO, et al. B lymphocyte-derived IL-16 attracts dendritic cells and Th cells. *J Immunol.* 2000 Sep 1;165(5):2474-80.
94. Roosnek E, Lanzavecchia A. Efficient and selective presentation of antigen-antibody complexes by rheumatoid factor B cells. *J Exp Med.* 1991 Feb 1;173(2):487-9.
95. Corsiero E, Bombardieri M, Manzo A, Bugatti S, Uguccioni M, Pitzalis C. Role of lymphoid chemokines in the development of functional ectopic lymphoid structures in rheumatic autoimmune diseases. *Immunol Lett.* 2012 Jul 30;145(1-2):62-7.
96. Rosengren S, Wei N, Kalunian KC, Kavanaugh A, Boyle DL. CXCL13: a novel biomarker of B-cell return following rituximab treatment and synovitis in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2011 Mar;50(3):603-10.
97. Sanz I, Lee FE. B cells as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol.* 2010 Jun;6(6):326-37.
98. Martinez-Gamboa L, Mei H, Loddenkemper C, Ballmer B, Hansen A, Lipsky PE, et al. Role of the spleen in peripheral memory B-cell homeostasis in patients with autoimmune thrombocytopenia purpura. *Clin Immunol.* 2009 Feb;130(2):199-212.
99. Edwards JC, Cambridge G. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* 2006 May;6(5):394-403.
100. Dorner T, Radbruch A, Burmester GR. B-cell-directed therapies for autoimmune disease. *Nat Rev Rheumatol.* 2009 Aug;5(8):433-41.
101. Scher JU. B-cell therapies for rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2012;70(3):200-3.

102. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2004 Jun 17;350(25):2572-81.
103. Jones RB, Tervaert JW, Hauser T, Luqmani R, Morgan MD, Peh CA, et al. Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis. *N Engl J Med.* 2010 Jul 15;363(3):211-20.
104. Avshovich N, Boulman N, Slobodin G, Zeina AR, Rosner I, Rozenbaum M. Refractory Wegener's granulomatosis: effect of rituximab on granulomatous bilateral orbital involvement. *Isr Med Assoc J.* 2009 Sep;11(9):566-8.
105. Palanichamy A, Jahn S, Nickles D, Derstine M, Abounasr A, Hauser SL, et al. Rituximab Efficiently Depletes Increased CD20-Expressing T Cells in Multiple Sclerosis Patients. *J Immunol.* 2014 Jun 13.
106. Berek C. [Do B cells play an important role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis?]. *Z Rheumatol.* 2005 Sep;64(6):383-8.
107. Genovese MC, Kaine JL, Lowenstein MB, Del Giudice J, Baldassare A, Schechtman J, et al. Ocrelizumab, a humanized anti-CD20 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: a phase I/II randomized, blinded, placebo-controlled, dose-ranging study. *Arthritis Rheum.* 2008 Sep;58(9):2652-61.
108. Ostergaard M, Baslund B, Rigby W, Rojkovich B, Jorgensen C, Dawes PT, et al. Ofatumumab, a human anti-CD20 monoclonal antibody, for treatment of rheumatoid arthritis with an inadequate response to one or more disease-modifying antirheumatic drugs: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase I/II study. *Arthritis Rheum.* 2010 Aug;62(8):2227-38.
109. Rubbert-Roth A. TRU-015, a fusion protein derived from an anti-CD20 antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Mol Ther.* 2010 Feb;12(1):115-23.
110. Dorner T, Goldenberg DM. Targeting CD22 as a strategy for treating systemic autoimmune diseases. *Ther Clin Risk Manag.* 2007 Oct;3(5):953-9.
111. Stohl W, Merrill JT, McKay JD, Lisse JR, Zhong ZJ, Freimuth WW, et al. Efficacy and safety of belimumab in patients with rheumatoid arthritis: a phase

- II, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging Study. *J Rheumatol*. 2013 May;40(5):579-89.
112. Lin WY, Gong Q, Seshasayee D, Lin Z, Ou Q, Ye S, et al. Anti-BR3 antibodies: a new class of B-cell immunotherapy combining cellular depletion and survival blockade. *Blood*. 2007 Dec 1;110(12):3959-67.
 113. Tak PP, Thurlings RM, Rossier C, Nestorov I, Dimic A, Mircetic V, et al. Atacicept in patients with rheumatoid arthritis: results of a multicenter, phase Ib, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating, single- and repeated-dose study. *Arthritis Rheum*. 2008 Jan;58(1):61-72.
 114. Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*. 2003 Oct 20;22(47):7359-68.
 115. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1994 Jan 15;83(2):435-45.
 116. Keystone E, Fleischmann R, Emery P, Furst DE, van Vollenhoven R, Bathon J, et al. Safety and efficacy of additional courses of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis: an open-label extension analysis. *Arthritis Rheum*. 2007 Dec;56(12):3896-908.
 117. Roll P, Palanichamy A, Kneitz C, Dorner T, Tony HP. Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006 Aug;54(8):2377-86.
 118. De Vita S, Zaja F, Sacco S, De Candia A, Fanin R, Ferraccioli G. Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogenetic role of B cells. *Arthritis Rheum*. 2002 Aug;46(8):2029-33.
 119. Edwards JC, Cambridge G. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology (Oxford)*. 2001 Feb;40(2):205-11.
 120. Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G. Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion. *Ann Rheum Dis*. 2002 Oct;61(10):883-8.

121. Furst DE, Keystone EC, Kirkham B, Kavanaugh A, Fleischmann R, Mease P, et al. Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases, 2008. *Ann Rheum Dis.* 2008 Dec;67 Suppl 3:iii2-25.
122. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum.* 2006 Sep;54(9):2793-806.
123. Emery P, Deodhar A, Rigby WF, Isaacs JD, Combe B, Racewicz AJ, et al. Efficacy and safety of different doses and retreatment of rituximab: a randomised, placebo-controlled trial in patients who are biological naive with active rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate (Study Evaluating Rituximab's Efficacy in MTX iNadequate rEsponders (SERENE)). *Ann Rheum Dis.* 2010 Sep;69(9):1629-35.
124. Emery P, Fleischmann R, Filipowicz-Sosnowska A, Schechtman J, Szczepanski L, Kavanaugh A, et al. The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum.* 2006 May;54(5):1390-400.
125. Mease PJ, Cohen S, Gaylis NB, Chubick A, Kaell AT, Greenwald M, et al. Efficacy and safety of retreatment in patients with rheumatoid arthritis with previous inadequate response to tumor necrosis factor inhibitors: results from the SUNRISE trial. *J Rheumatol.* 2010 May;37(5):917-27.
126. Rubbert-Roth A, Tak PP, Zerbini C, Tremblay JL, Carreno L, Armstrong G, et al. Efficacy and safety of various repeat treatment dosing regimens of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis: results of a Phase III randomized study (MIRROR). *Rheumatology (Oxford).* 2010 Sep;49(9):1683-93.
127. Tak PP, Rigby WF, Rubbert-Roth A, Peterfy CG, van Vollenhoven RF, Stohl W, et al. Inhibition of joint damage and improved clinical outcomes with rituximab plus methotrexate in early active rheumatoid arthritis: the IMAGE trial. *Ann Rheum Dis.* 2011 Jan;70(1):39-46.

128. van Vollenhoven RF, Emery P, Bingham CO, 3rd, Keystone EC, Fleischmann RM, Furst DE, et al. Long-term safety of rituximab in rheumatoid arthritis: 9.5-year follow-up of the global clinical trial programme with a focus on adverse events of interest in RA patients. *Ann Rheum Dis.* 2013 Sep 1;72(9):1496-502.
129. Finckh A, Ciurea A, Brulhart L, Kyburz D, Moller B, Dehler S, et al. B cell depletion may be more effective than switching to an alternative anti-tumor necrosis factor agent in rheumatoid arthritis patients with inadequate response to anti-tumor necrosis factor agents. *Arthritis Rheum.* 2007 May;56(5):1417-23.
130. Tak PP, Rigby W, Rubbert-Roth A, Peterfy C, van Vollenhoven RF, Stohl W, et al. Sustained inhibition of progressive joint damage with rituximab plus methotrexate in early active rheumatoid arthritis: 2-year results from the randomised controlled trial IMAGE. *Ann Rheum Dis.* 2012 Mar;71(3):351-7.
131. Wendler J, Burmester GR, Sorensen H, Krause A, Richter C, Tony HP, et al. Rituximab in patients with rheumatoid arthritis in routine practice (GERINIS): 6-year results from a prospective, multicentre, non-interventional study in 2,484 patients. *Arthritis Res Ther.* 2014 Mar 26;16(2):R80.
132. Buch MH, Smolen JS, Betteridge N, Breedveld FC, Burmester G, Dorner T, et al. Updated consensus statement on the use of rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011 Jun;70(6):909-20.
133. Breedveld F, Agarwal S, Yin M, Ren S, Li NF, Shaw TM, et al. Rituximab pharmacokinetics in patients with rheumatoid arthritis: B-cell levels do not correlate with clinical response. *J Clin Pharmacol.* 2007 Sep;47(9):1119-28.
134. Keystone EC, Cohen SB, Emery P, Kremer JM, Dougados M, Loveless JE, et al. Multiple courses of rituximab produce sustained clinical and radiographic efficacy and safety in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to 1 or more tumor necrosis factor inhibitors: 5-year data from the REFLEX study. *J Rheumatol.* 2012 Dec;39(12):2238-46.
135. van Vollenhoven RF, Emery P, Bingham CO, 3rd, Keystone EC, Fleischmann R, Furst DE, et al. Longterm safety of patients receiving rituximab in rheumatoid arthritis clinical trials. *J Rheumatol.* 2010 Mar;37(3):558-67.
136. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Monoclonal antibody and intravenous immunoglobulin therapy for rheumatic diseases:

- rationale and mechanisms of action. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007 May;3(5):262-72.
137. Manches O, Lui G, Chaperot L, Gressin R, Molens JP, Jacob MC, et al. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2003 Feb 1;101(3):949-54.
 138. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood*. 1998 Mar 1;91(5):1644-52.
 139. Silverman GJ, Weisman S. Rituximab therapy and autoimmune disorders: prospects for anti-B cell therapy. *Arthritis Rheum*. 2003 Jun;48(6):1484-92.
 140. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun*. 2005;8:140-74.
 141. Thurlings RM, Vos K, Wijbrandts CA, Zwinderman AH, Gerlag DM, Tak PP. Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response. *Ann Rheum Dis*. 2008 Jul;67(7):917-25.
 142. Gong Q, Ou Q, Ye S, Lee WP, Cornelius J, Diehl L, et al. Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J Immunol*. 2005 Jan 15;174(2):817-26.
 143. Palanichamy A, Roll P, Theiss R, Dorner T, Tony HP. Modulation of molecular imprints in the antigen-experienced B cell repertoire by rituximab. *Arthritis Rheum*. 2008 Dec;58(12):3665-74.
 144. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988 Mar;31(3):315-24.
 145. Brezinschek HP, Foster SJ, Dorner T, Brezinschek RI, Lipsky PE. Pairing of variable heavy and variable kappa chains in individual naive and memory B cells. *J Immunol*. 1998 May 15;160(10):4762-7.
 146. Farner NL, Dorner T, Lipsky PE. Molecular mechanisms and selection influence the generation of the human V lambda J lambda repertoire. *J Immunol*. 1999 Feb 15;162(4):2137-45.
 147. Fransen J, van Riel PL. The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. *Clin Exp Rheumatol*. 2005 Sep-Oct;23(5 Suppl 39):S93-9.

148. Stone JH, Merkel PA, Spiera R, Seo P, Langford CA, Hoffman GS, et al. Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med*. 2010 Jul 15;363(3):221-32.
149. Roll P, Mahmood Z, Muhammad K, Feuchtenberger M, Dorner T, Tony HP. Long-term repopulation of peripheral B-cell subsets after single and repeated rituximab infusions in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2015 May-Jun;33(3):347-53.
150. Dorner T, Brezinschek HP, Brezinschek RI, Foster SJ, Domiati-Saad R, Lipsky PE. Analysis of the frequency and pattern of somatic mutations within nonproductively rearranged human variable heavy chain genes. *J Immunol*. 1997 Mar 15;158(6):2779-89.
151. Dorner T, Brezinschek HP, Foster SJ, Brezinschek RI, Farner NL, Lipsky PE. Delineation of selective influences shaping the mutated expressed human Ig heavy chain repertoire. *J Immunol*. 1998 Mar 15;160(6):2831-41.
152. Foster SJ, Brezinschek HP, Brezinschek RI, Lipsky PE. Molecular mechanisms and selective influences that shape the kappa gene repertoire of IgM+ B cells. *J Clin Invest*. 1997 Apr 1;99(7):1614-27.
153. Pyon HS, Ha-Lee YM, Song GG, Sohn J. Analysis of Ig kappa light chain gene variable regions expressed in the rheumatoid synovial B cells. *Scand J Immunol*. 2001 May;53(5):503-9.
154. Lorenz W, Schable KF, Thiebe R, Stavnezer J, Zachau HG. The J kappa proximal region of the human K locus contains three uncommon V kappa genes which are arranged in opposite transcriptional polarities. *Mol Immunol*. 1988 May;25(5):479-84.
155. Huber C, Schable KF, Huber E, Klein R, Meindl A, Thiebe R, et al. The V kappa genes of the L regions and the repertoire of V kappa gene sequences in the human germ line. *Eur J Immunol*. 1993 Nov;23(11):2868-75.
156. Girschick HJ, Lipsky PE. The kappa gene repertoire of human neonatal B cells. *Mol Immunol*. 2002 Jun;38(15):1113-27.
157. Yurasov S, Tiller T, Tsuiji M, Velinzon K, Pascual V, Wardemann H, et al. Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. *J Exp Med*. 2006 Oct 2;203(10):2255-61.

158. Hoyer BF, Moser K, Hauser AE, Peddinghaus A, Voigt C, Eilat D, et al. Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice. *J Exp Med*. 2004 Jun 7;199(11):1577-84.
159. Mei HE, Frolich D, Giesecke C, Loddenkemper C, Reiter K, Schmidt S, et al. Steady-state generation of mucosal IgA+ plasmablasts is not abrogated by B-cell depletion therapy with rituximab. *Blood*. 2010 Dec 9;116(24):5181-90.
160. Brezinschek HP, Dorner T, Monson NL, Brezinschek RI, Lipsky PE. The influence of CD40-CD154 interactions on the expressed human V(H) repertoire: analysis of V(H) genes expressed by individual B cells of a patient with X-linked hyper-IgM syndrome. *Int Immunol*. 2000 Jun;12(6):767-75.
161. Messmer BT, Albesiano E, Messmer D, Chiorazzi N. The pattern and distribution of immunoglobulin VH gene mutations in chronic lymphocytic leukemia B cells are consistent with the canonical somatic hypermutation process. *Blood*. 2004 May 1;103(9):3490-5.
162. Lossos IS, Tibshirani R, Narasimhan B, Levy R. The inference of antigen selection on Ig genes. *J Immunol*. 2000 Nov 1;165(9):5122-6.
163. Dorner T, Foster SJ, Brezinschek HP, Lipsky PE. Analysis of the targeting of the hypermutational machinery and the impact of subsequent selection on the distribution of nucleotide changes in human VHDJH rearrangements. *Immunol Rev*. 1998 Apr;162:161-71.
164. Lee J, Monson NL, Lipsky PE. The V lambda J lambda repertoire in human fetal spleen: evidence for positive selection and extensive receptor editing. *J Immunol*. 2000 Dec 1;165(11):6322-33.
165. Stott DI, Hiepe F, Hummel M, Steinhauser G, Berek C. Antigen-driven clonal proliferation of B cells within the target tissue of an autoimmune disease. The salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *J Clin Invest*. 1998 Sep 1;102(5):938-46.
166. Randen I, Mellbye OJ, Forre O, Natvig JB. The identification of germinal centres and follicular dendritic cell networks in rheumatoid synovial tissue. *Scand J Immunol*. 1995 May;41(5):481-6.

167. Wellmann U, Letz M, Herrmann M, Angermuller S, Kalden JR, Winkler TH. The evolution of human anti-double-stranded DNA autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 28;102(26):9258-63.
168. Lee SK, Song CH, Kim JB, Chwae YJ, Choi IH, Bridges SL, Jr., et al. Enhanced expression of immunoglobulin kappa light chains with unusually long CDR3 regions in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1998 Jun;25(6):1067-71.
169. Meffre E, Papavasiliou F, Cohen P, de Bouteiller O, Bell D, Karasuyama H, et al. Antigen receptor engagement turns off the V(D)J recombination machinery in human tonsil B cells. *J Exp Med*. 1998 Aug 17;188(4):765-72.
170. Giachino C, Padovan E, Lanzavecchia A. Re-expression of RAG-1 and RAG-2 genes and evidence for secondary rearrangements in human germinal center B lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1998 Nov;28(11):3506-13.
171. Girschick HJ, Grammer AC, Nanki T, Mayo M, Lipsky PE. RAG1 and RAG2 expression by B cell subsets from human tonsil and peripheral blood. *J Immunol*. 2001 Jan 1;166(1):377-86.
172. Klonowski KD, Monestier M. Heavy chain revision in MRL mice: a potential mechanism for the development of autoreactive B cell precursors. *J Immunol*. 2000 Oct 15;165(8):4487-93.
173. Klonowski KD, Monestier M. Ig heavy-chain gene revision: leaping towards autoimmunity. *Trends Immunol*. 2001 Jul;22(7):400-5.
174. Palanichamy A, Muhammad K, Roll P, Kleinert S, Dorner T, Tony HP. Rituximab therapy leads to reduced imprints of receptor revision in immunoglobulin kappa and lambda light chains. *J Rheumatol*. 2012 Jun;39(6):1130-8.
175. Dorner T, Farner NL, Lipsky PE. Ig lambda and heavy chain gene usage in early untreated systemic lupus erythematosus suggests intensive B cell stimulation. *J Immunol*. 1999 Jul 15;163(2):1027-36.

Danksagung

In besonderer Weise möchte ich zu aller erst Herrn Prof. Dr. Tony für die Stellung des Themas und die Unterstützung während der Laborarbeit und des Verfassens der Arbeit danken.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. rer. nat. A. Palanichamy für die Betreuung der Laborarbeit und seine Unterstützung bei allen fachlichen Fragestellungen. Außerdem danke ich Herrn Dr. rer. nat. K. Muhammad für die beratende Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Dem Direktor der Medizinischen Klinik II Herrn Prof. Dr. H. Einsele danke ich für das Überlassen der Laborräumlichkeiten seines Hauses zur Durchführung der Experimente.

Mein Dank gilt auch Herrn Christian Linden für die Hilfestellung bei der durchflusszytometrischen Zellsortierung im Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg. Dem Lehrstuhlinhaber dieses Institutes, Herrn Prof. Dr. T. Hünig, danke ich für die Möglichkeit der Benutzung der Durchflusszytometer seines Hauses.

Frau Dr. P. Roll danke ich für die Bereitstellung der klinischen Daten.

Frau Prof. Dr. Prelog danke ich sehr für die Übernahme des Koreferates.

Außerdem danke ich den technischen Assistentinnen des Rheumatologischen Labors für die Unterstützung während der experimentellen Phase dieser Arbeit: Frau A. Koss-Kinzinger, Frau I. Kuntzsch, Frau H. Pototzky und insbesondere Frau K. Zehe.

Herzlicher Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern Gabriele und Maximilian Ferschl, meinen Geschwistern Karolin, Christian und Johannes Ferschl, meiner Freundin Susanne Lehmann und meinen Freunden für die stete Unterstützung.

Lebenslauf

Name: Michael Ferschl

Schulische Ausbildung:

1989-1993	Grundschule, Eltmann
1993-2002	Gymnasium, Bamberg
2002	Abitur

Universitäre Ausbildung:

2003-2009	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
2005	Ärztliche Vorprüfung
2009	Ärztliche Prüfung
12/2009	Approbation als Arzt