

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**Modulation des genetischen Imprint der Immunglobulinrezeptoren  
durch passagere B- Zelldepletion mit anti- CD20 Antikörpern bei  
Rheumatoider Arthritis**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Regina Theiß

aus Kist

**Würzburg, Juni 2008**

**Referent** : Prof. Dr. H.-P. Tony

**Koreferent** : Prof. Dr. S. Gattenlöhner

**Dekan:** Prof. Dr. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung** :30.01.2009

**Die Promovendin ist Ärztin**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Einführung.....	1
1.2	Die Entstehung der Vielfalt der Immunglobuline .....	2
1.2.1	VDJ- Rekombination und junktionale Diversität .....	2
1.2.2	Die somatische Hypermutation .....	5
1.3	B- Zell- Entwicklung- und Differenzierung .....	7
1.3.1	Die B- Zellentwicklung im Knochenmark.....	7
1.3.2	Positive und negative Selektion von B- Zellen .....	8
1.3.3	Terminale B- Zelldifferenzierung in den sekundären lymphatischen Organen – Die Keimzentrumsreaktion .....	9
1.4	Die Rheumatoide Arthritis .....	11
1.5	Die Rolle von B- Zellen in der Pathogenese und Therapie der .....	13
	Rheumatoiden Arthritis.....	13
1.6	Die B- Zell gerichtete Therapie der Rheumatoiden Arthritis .....	14
1.6.1	Der anti- CD20 Antikörper Rituximab .....	15
1.6.2	Das CD20 Antigen .....	16
1.6.3	Die anti- CD20 vermittelte B-Zelldepletion .....	16
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit.....	18
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
2.1	Patienten.....	19
2.2	Isolierung von PBMCs mittels Ficoll-Gradient .....	20
2.3	DNA- Isolierung.....	21
2.4	DNA-Amplifikation durch die Polymerasekettenreaktion .....	21
2.4.1	Oligonucleotide .....	22

2.4.2	Nested- PCR von genomischer DNA .....	22
2.5	Agarosegel-Elektrophorese.....	24
2.6	Aufreinigung von DNA.....	25
2.7	Subklonierung der V <sub>H4</sub> - Gensegmente .....	25
2.7.1	Polishing.....	26
2.7.2	Ligation.....	26
2.7.3	Herstellung des Nährmediums/der Agarplatten.....	27
2.7.4	Transformation .....	27
2.8	Gewinnung der Plasmid DNA.....	28
2.9	Isolierung der Plasmid DNA .....	28
2.10	DNA- Sequenzierung .....	28
2.10.1	Reaktionskomponenten.....	28
2.10.2	Reaktionsparameter .....	29
2.10.3	Aufreinigung und Präparierung der PCR Produkte für die.....	29
	Sequenzierung .....	29
2.11	Analyse der Sequenzen .....	30
2.12	Statistik.....	32
2.13	Verbrauchsmaterial .....	32
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
3.1	Klinische Daten .....	34
3.2	Analyse der Häufigkeitsverteilung der verwendeten V <sub>H4</sub> Gensegmente .....	35
3.3	Vergleich des prozentualen Anteils an niedrig mutierten und.....	37
	hochmutierten Sequenzen .....	37
3.4	Analyse der Genmutationsrate.....	38
3.4.1	Vergleich der Gesamtmutationsrate.....	38

3.4.2	Vergleich der Mutationsraten der einzelnen V <sub>H4</sub> - Gene.....	39
3.5	Analyse der Mutationsverteilung in hochmutierten Sequenzen.....	42
3.5.1	Vergleich des Anteils an Mutationen in RGYW/ WRCY DNA-Motiven .....	42
3.5.2	Analyse des Verhältnisses von Replacement- zu Silent-Mutationen in den CDR Regionen .....	43
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>45</b>
4.1	Die Therapie- induzierte Modulation des V <sub>H4</sub> - Repertoires .....	46
4.2	Die Mutationsanalyse der V <sub>H4</sub> -Gene.....	47
4.3	Die Therapie- induzierte qualitative Modulation der Plasmazellen .....	50
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>53</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungen</b> .....	<b>57</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>58</b>
	<b>Danksagung</b>	
	<b>Lebenslauf</b>	

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung

In der Zeit um 1960 wurde mit durchschlagenden Erkenntnissen in der immunologischen Forschung wie der Aufklärung der Struktur von Antikörpern durch Rodney Porter [44] und der Differenzierung und Beschreibung der B- und T- Lymphozyten und der Entdeckung ihrer jeweiligen Funktionen durch Jacques Miller [45] der Grundstein für die heutige Forschung in der Immunologie gelegt, die sich vorrangig mit den medizinischen und klinischen Aspekten der Immunantwort, insbesondere ihrer Fehlregulation, befasst. Eine adäquate Immunantwort setzt die Unterscheidung zwischen Eigen- und Fremdartigen voraus. Dazu durchlaufen B- und T- Zellen eine zentrale und periphere Toleranzentwicklung. Für T- Zellen vollzieht sich die zentrale Toleranzentwicklung im Thymus. Dort wird durch negative Selektion verhindert, dass T- Zellen mit einer hohen Affinität für Eigenantigene aus dem Thymus in die Peripherie entlassen werden. Für B- Zellen findet die zentrale Toleranzentwicklung im Knochenmark statt. Dort werden Rezeptoren mit einer hohen Affinität für Eigenantigene ausgetauscht, bevor die B- Zelle in die Peripherie auswandert. Da jedoch in der Körperperipherie weitere Antigenepitope vorkommen, bemüht sich der Körper auch um eine periphere Toleranz. Diese entsteht durch immunologische Mechanismen, welche in der Lage sind, voll ausgereifte Lymphozyten zu inaktivieren. Dies kann durch die Induktion eines anergischen Stadiums oder durch Apoptose erfolgen oder auch durch die Unterdrückung einer Immunreaktion durch den Einsatz regulatorischer dendritischer Zellen und regulatorischer T- Zellen [51]. Ist diese Selbsttoleranz jedoch aus dem Gleichgewicht geraten, so sind die Weichen für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen gestellt. Da bisher über deren Pathogenese und Verlauf immer noch recht wenig bekannt ist und derzeit lediglich symptomatische Therapieoptionen existieren, kommt in der heutigen Forschung der Entwicklung neuer Therapiestrategien für

Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis eine zentrale Bedeutung zu.

## **1.2 Die Entstehung der Vielfalt der Immunglobuline**

Das Immunglobulinrepertoire des Menschen umfasst etwa  $10^7$  bis  $10^{14}$  Antikörpermoleküle [46]. Dadurch ist das Immunsystem in der Lage, nahezu jedes Antigen spezifisch zu erkennen. Um die Antikörperdiversität zu gewährleisten, wird während der B- Zell- Entwicklung das variable Segment des Immunglobulins durch Genumlagerung beziehungsweise durch Rekombination und anschließende leicht variable Wiederverknüpfung, d.h. durch die sogenannte junktionale Vielfalt spezifisch verändert. In reifen B-Zellen trägt darüber hinaus die somatische Hypermutation weiter zur Antikörpervielfalt bei.

### **1.2.1 VDJ- Rekombination und junktionale Diversität**

Bei der VDJ- Rekombination erfolgt eine zufällige Kombination der VDJ- Gensegmente, welche für die variable Region kodieren. Dadurch ergibt sich eine enorme Zahl an möglichen VDJ- Segmenten. Für die leichten Ketten der Antikörper stehen im Fall der  $\kappa$ - Leichtketten circa  $40V_{\kappa}$  - und  $5J_{\kappa}$  - Teilgene und im Fall der  $\lambda$ -Leichtketten etwa  $30 V_{\lambda}$  und  $4J_{\lambda}$  - Teilgene zur Verfügung. Bei den schweren Antikörperketten existieren  $65 V_H$ - und  $27D$ - und  $6J_H$ - Teilgene. Folglich ergeben sich bei den Leichtketten  $40 \cdot 5 = 200$  mögliche  $\kappa$ - Ketten und  $120$  verschiedene  $\lambda$ - Ketten. Bei den schweren Ketten gibt es  $65 \cdot 27 \cdot 6 = 10530$  verschiedene Möglichkeiten. Da die Antigenbindungsstelle von den variablen Regionen der leichten und schweren Ketten gemeinsam gebildet wird, wobei jede der möglichen leichten Ketten mit jeder der möglichen schweren Ketten kombiniert werden kann, ergeben sich letztendlich allein durch die VDJ- Rekombination bereits  $320 \cdot 1053 = 3,4 \cdot 10^6$

unterschiedliche Immunglobulin- Moleküle aus nur 177 Teilgenen. Voraussetzung der VDJ- Rekombination ist, dass das Rearrangement am korrekten Genlocus stattfindet. Dies ist im Fall der schweren Kette der lange Arm von Chromosom 14 (14q32.33). Der  $\kappa$ - Locus der leichten Kette liegt auf Chromosom 2 und der  $\lambda$ - Locus der leichten Kette auf Chromosom 22 [47,48,49]. Die Umlagerung der V-, D- und J- Gensegmente wird durch eine Rekombinationssignalsequenz (RSS) gesteuert, welche die DNA-Sequenzen flankiert. Diese RSS bestehen aus einem Heptamer mit sieben Nucleotiden in fester Anordnung (5´CACAGTG 3´), welches immer direkt auf das kodierend V-Gensegment folgt. Daran schließt sich ein 12 oder 23 Basenpaare langer sogenannter Spacer, ein Abstandshalter, an, auf den ein Block von neun Nucleotiden (Nonamer) in fester Anordnung folgt (5´ACAAAACC 3´). Zu einer Rekombination kommt es nur zwischen Gensegmenten, die auf demselben Chromosom liegen. Der Rekombinationsprozess folgt normalerweise der 12/23- Regel, d.h., eine Rekombination kann nur zwischen Gensegmenten stattfinden, von denen eines von einem 12 bp langen Spacer, das andere von einem 23 bp langen Spacer flankiert wird [50]. Dadurch können für die schwere Kette ein  $V_H$ - Gensegment mit einem D- Gensegment und ein D- Gensegment mit einem  $J_H$ - Gensegment verbunden werden, während eine direkte Verknüpfung von einem  $V_H$ - Gensegment mit einem  $J_H$ - Gensegment nicht möglich ist, da  $V_H$  und  $J_H$ - Gensegmente von 23 bp langen Spacern und D- Gensegmente auf beiden Seiten von 12 bp langen Spacern flankiert werden [51] (siehe Abbildung 1).



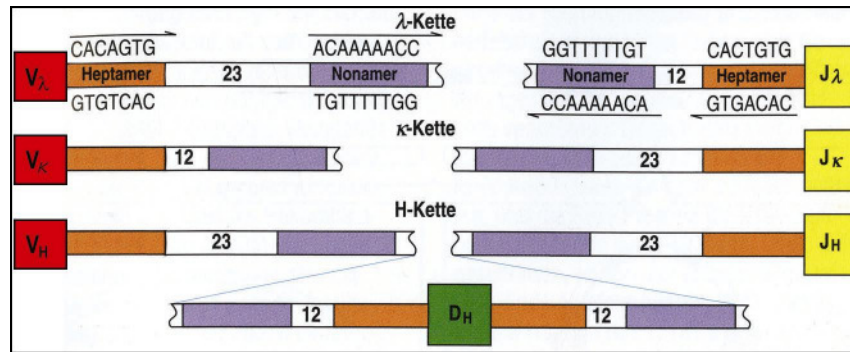


Abbildung 1: Rekombinationsprozess zwischen Gensegmenten, die auf demselben Chromosom liegen, nach der 12/23 Regel [53]

Der Prozess der VDJ- Rekombination wird von einem Komplex aus verschiedenen Enzymen bewerkstelligt, der auch als VDJ- Rekombinase bezeichnet wird. Die RAG-1 und RAG-2 Proteine sind die beiden wichtigsten Enzyme der VDJ- Rekombinase [52], da diese die RSS spezifisch erkennen und durch ihre Endonucleaseaktivität die DNA am 5' Ende der Heptamersequenz präzise schneiden. Die jeweils übriggebliebenen freien 3'OH-Gruppen am anderen Ende der Heptamer-Sequenzen werden durch Phosphodiesterbindungen auf dem jeweils anderem Strang hydrolysiert. Dadurch wird das Ende der Doppelstrang-DNA zu einer Haarnadelstruktur verknüpft, die aus der kodierenden Region des Gensegments besteht. Auf diese Weise kommt es gleichzeitig zu einem Doppelstrangbruch an den beiden Enden der Heptamersequenzen und die beiden RSS werden exakt zu einer Signalverknüpfungssequenz verbunden. Danach werden die Haarnadeln durch einen Einzelstrangbruch an zufälligen Stellen aufgespalten, was wiederum durch die RAG-Proteine erfolgt [51,52]. Anschließend können durch die Tdt (Terminale Desoxynucleotidyl Transferase) Nucleotide hinzugefügt oder durch die Exonuclease entfernt werden. Die zugefügten Nucleotide werden als P- und N- Nucleotide bezeichnet. P- Nucleotide umfassen palindromische Sequenzen, die vom komplementären Strang stammen. N- Nucleotide sind nicht in der DNA-Matrix kodiert. Deshalb steht N auch für nontemplated. Man findet diese N- Nucleotide vor allem an den V- D und D- J- Verknüpfungsstellen des

rearrangierten Gens für die schwere Kette. Durch den Einbau solcher N- und P- Nucleotide wird häufig das Leseraster der kodierenden Sequenz unterbrochen. Solche Rasterverschiebungen führen in der Regel zu einem funktionslosen Protein. Daher werden solche DNA- Umlagerungen auch als unproduktive Rearrangements bezeichnet. Da etwa zwei von drei Umordnungen unproduktiv sind, können viele B- Lymphozyten keine funktionsfähigen Immunglobuline erzeugen. Die junktionale Vielfalt entsteht somit nur unter Inkaufnahme eines hohen Maßes an unproduktiver Rekombination [51]. Am Ende der VDJ- Rekombination verknüpfen DNA-Ligasen, wie die DNA Ligase IV, die beiden bearbeiteten Enden zu einer zusammenhängenden doppelsträngigen DNA mit dem rearrangierten Gensegment [51,53]. Auf diese Weise entsteht an den Verbindungsstellen zwischen den verschiedenen Gensegmenten eine junktionale Vielfalt, welche die Antikörperdiversität noch weiter steigert, indem die Vielfalt in der dritten hypervariablen Region erhöht wird. Von den drei hypervariablen Schleifen in den Proteinketten der Antikörper werden zwei innerhalb des V- Gensegments codiert. Die dritte hypervariable Schleife (HVR) bzw. CDR3-Region liegt im Bereich der Verbindungsstelle zwischen dem V- und dem J- Gensegment und wird bei der schweren Kette zum Teil vom D- Segment kodiert [51].

### **1.2.2 Die somatische Hypermutation**

Die somatische Hypermutation, auch Affinitätsreifung genannt, bewirkt eine weitere Diversifizierung der Antikörpermoleküle. Sie findet nicht wie die VDJ- Rekombination in den primär lymphatischen Organen, sondern antigenabhängig durch spezifische Interaktion von B- und T- Zellen über kostimulatorische Signale von CD40 und CD154/CD40 Ligand [54] in den Keimzentren der sekundär lymphatischen Organe statt [55].

Das Prinzip der somatischen Hypermutation besteht in der Einfügung von Punktmutationen im Bereich der hypervariablen Regionen (V-Region) [56], und zwar etwa  $10^{-3}$  pro Basenpaar und Zellteilung; d.h. bei jeder zweiten B-Zellteilung kommt es zu einer Punktmutation [57,58,63]. Die Punktmutationen folgen jedoch keinem zufälligen Verteilungsmuster, sondern treten gezielt in bestimmten DNA- Motiven, den sogenannten "Hotspots" auf, in denen 50 bis 60% aller Mutationen gefunden werden [57]. Diese "Hotspots" sind kurze DNA- Motive von vier oder fünf Nucleotiden Länge, die mittlerweile als RGYW oder WRCY bezeichnet werden, wobei WRCY komplementär zu RGYW ist. Das R steht dabei für Adenin oder Guanin, das Y für Cytosin oder Thymin, das W für Adenin oder Thymin, G für Guanin und C für Cytosin [59]. Durch das Einfügen von Punktmutationen in die variablen Regionen der rearrangierten Gensegmente werden veränderte Immunglobuline an der Oberfläche von B- Zellen exprimiert. Diejenigen mit der höchsten Affinität für das Antigen werden positiv selektiert. Punktmutationen, die zu keiner veränderten Aminosäuresequenz führen, sogenannte stille Mutationen oder Silent- Mutationen, verteilen sich zufällig über die gesamte variable Region [51].

Produktive Austauschmutationen beziehungsweise Replacement-Mutationen, die zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen, treten bevorzugt in den CDR- Regionen auf, weil diese für die Antigenbindungsstelle kodieren und entsprechend Antigene selektiert werden. Daher können Mutationen in den CDR- Regionen zu einer verbesserten Antigenbindungsfähigkeit des Immunglobulins führen [55,60]. Replacement- Mutationen in den Framework- Regionen, die für das Antikörpergerüst kodieren, scheinen hingegen die Antikörperstruktur zu gefährden und unterliegen deshalb eher der negativen Selektion [60]. Der Mechanismus der somatischen Hypermutation ist noch weitgehend unbekannt. Neuere Untersuchungen haben jedoch ergeben, dass für eine Mutation sogenannte Enhancer notwendig sind, DNA- Sequenzen, welche die Transkription von Immunglobulingenen in B- Zellen verstärken, sowie

einen Transkriptionspromotor. Außerdem hat man entdeckt, dass ein Mangel an dem Enzym AID (activation induced cytidine deaminase), die Anhäufung von somatischen Hypermutationen verhindert [51,61, 62].

### **1.3 B- Zell- Entwicklung- und Differenzierung**

Die B- Zell- Entwicklung erfolgt beim Menschen zunächst in der fetalen Leber und nach der Geburt dann im Knochenmark. Dort durchläuft eine lymphopoetische pluripotente Stammzelle unter dem Einfluss verschiedenartigster Wachstumsfaktoren wie Interleukin-2, Interleukin-7 und c-Kit eine genau definierte Abfolge von Entwicklungsstadien, bis aus ihr schließlich eine reife B- Zelle entsteht. Die weitere Differenzierung der reifen B- Zellen findet dann antigenabhängig in den Keimzentren der peripheren lymphatischen Organe (Lymphknoten, Milz) statt [51].

#### **1.3.1 Die B- Zellentwicklung im Knochenmark**

Die einzelnen Entwicklungsstadien der B- Zellen lassen sich durch stadienspezifisch exprimierte Oberflächenmoleküle sowie durch das Stadium der Rekombination ihrer Immunglobulingene für die leichte und die schwere Kette gut voneinander abgrenzen.

Der Pan- B- Zell Marker CD19 wird in allen B- Zell Stadien exprimiert [64]. Das erste Stadium der B- Zell- Linie sind die Pro- B- Zellen. In den CD19<sup>+</sup> CD10<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> frühen Pro- B- Zellen werden zuerst die D- und J<sub>H</sub>- Gensegmente umgeordnet, in den CD19<sup>+</sup> CD10<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> und CD34<sup>+</sup> späten Pro- B- Zellen erfolgt dann mit der Verknüpfung von V<sub>H</sub> mit DJ<sub>H</sub> die vollständige Rekombination der variablen Region der schweren Kette [65]. Ist diese Umordnung produktiv, führt dies dann zur Expression einer intakten

schweren  $\mu$ - Kette. Danach folgt das nächste entscheidende Entwicklungsstadium der  $CD40^+CD10^+CD19^+CD20^+$  Prä- B-Zellen [65]. Die großen Prä- B- Zellen bilden durch Expression einer  $\mu$ - Kette zusammen mit einem Ersatz für die leichte Kette (surrogate light chain- SLC) [66] den Prä- B- Zell- Rezeptor [67]. Das Erscheinen des Prä- B- Zell- Rezeptors auf der Zelloberfläche induziert die Proliferation und aktive Teilung der großen Prä- B- Zellen, so dass diese sich im folgenden Stadium zu kleinen Prä- B- Zellen entwickeln, in denen die Rekombination der  $V_L$ - und  $J_L$ - Gensegmente für die leichte Kette erfolgt. Mit dem Abschluss der  $V_L$  und  $J_L$ - Gensegment-Umordnung werden im letzten Entwicklungsschritt, der noch antigenunabhängig im Knochenmark erfolgt, die unreifen B- Zellen gebildet, die IgM auf ihrer Oberfläche exprimieren [65,51]. Dieses Stadium ist außerdem durch die noch persistierende Expression von CD10 charakterisiert, welches in reifen B- Zellen herunterreguliert wird [65].

### 1.3.2 Positive und negative Selektion von B- Zellen

Nach der Expression des ersten Rezeptors (IgM) hängt das weitere Schicksal der B- Lymphozyten von der Spezifität dieses Antigenrezeptors ab. So werden diejenigen B- Zellen mit stark autoreaktiven Rezeptoren negativ selektiert, um auf diese Weise Autoimmunreaktionen zu verhindern. Die negative Selektion derjenigen B- Lymphozyten mit autoreaktivem Potential kann durch unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Zum einen können diese Zellen klonal deletiert werden [68,72], was zunächst am naheliegendsten erscheint. Das Immunsystem hat allerdings mit einem weiteren Mechanismus, dem sogenannten Rezeptor- Editing eine intelligente Lösung gefunden, autoreaktive B- Zellen vor dem Zelltod zu retten, indem durch weitere Genumordnungen der leichten Kette der alte autoreaktive Rezeptor durch einen neuen ersetzt werden kann [69,70]. Des Weiteren können autoreaktive B- Lymphozyten in den Zustand der sogenannten Anergie [71,72] versetzt werden, in dem sie nicht auf Antigene reagieren,

aber auch nicht in Apoptose gehen. Die positiv selektierten unreifen B- Zellen wandern aus dem Knochenmark in die Peripherie aus, um dort zu reifen B- Zellen auszudifferenzieren [51].

### **1.3.3 Terminale B- Zelldifferenzierung in den sekundären lymphatischen Organen— Keimzentrumsreaktion**

Die reifen B- Zellen, die außer IgM noch IgD exprimieren, werden bis zu ihrem ersten Antigenkontakt als naive B- Zellen bezeichnet. Sie kreisen durch die peripheren lymphatischen Organe, wo sie auf das entsprechende Fremdantigen stoßen und dadurch aktiviert werden können [51]. Solange noch kein Antigenkontakt erfolgt ist, liegen alle Lymphfollikel als Primärfollikel vor. Bei Antigenkontakt bilden sich unter dem Zusammenwirken von B- Zellen, follikulären dendritischen Zellen (FDCs), T- Helferzellen, Makrophagen und Retikulumzellen die sogenannten Keimzentren aus. Der Primärfollikel ist nun zum Sekundärfollikel geworden [73], der aus dem in der Mitte gelegenen Keimzentrum und einem schmalen Lymphozytensaum, der sogenannten Mantelzone, besteht [74]. Das Keimzentrum ist aus einer basal gelegenen dunklen Zone und einer apikal gelegenen hellen Zone aufgebaut. In der dunklen Zone entwickeln sich die aktivierten und proliferierenden B- Zellen zu Centroblasten (siehe Abbildungen 2 und 3).

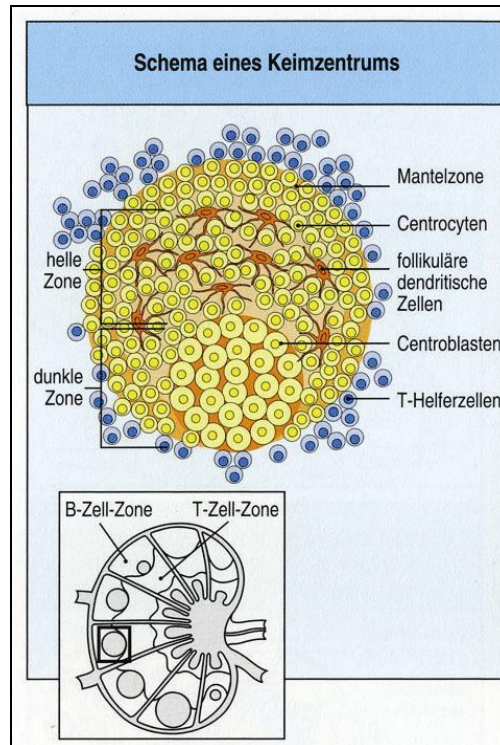


Abbildung 2: Schema eines Keimzentrums [51]

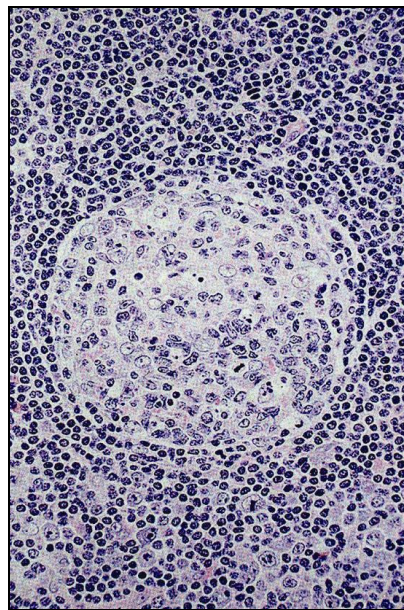


Abbildung 3: Histologischer Schnitt durch ein Keimzentrum [74]

Der Begriff dunkle Zone leitet sich von den dicht gedrängten und daher dunkel erscheinenden Zellen her. Die dunkle Zone ist auch der Ort, an dem die somatische Hypermutation stattfindet [76,77]. Sobald die Centroblasten ihre Teilungsrate verringern, werden sie Centrocyten genannt; d.h. jeder

Centrocyt eines Keimzentrums lässt sich auf einen Centroblasten zurückführen. Dies bezeichnet man auch als klonale Expansion. Die Centrocyten wandern dann in die helle Zone aus, in der zeitgleich eine Proliferation follikulärer dendritischer Zellen (FDCs) stattfindet, die ihnen Antigene präsentieren [78]. Centrocyten ohne geeigneten Rezeptor gehen in Apoptose. Die Centrocyten mit hoher Affinität zum Antigen werden positiv selektiert, indem sie von den sich am Rand der hellen Zone des Keimzentrums befindenden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, denen sie die Antigene als MHC II- Peptid- Komplexe präsentieren, ein Überlebenssignal erhalten [79]. Dieses Signal wird durch die spezifische Interaktion von B- und T-Zellen über die Bindung von CD40 an CD154/CD40 Ligand abgegeben [75]. Die Centrocyten entwickeln sich entweder zu Plasmablasten und weiter zu Plasmazellen oder zu Memory- B- Zellen [73]. Im weiteren Verlauf der Keimzentrumsreaktion konkurrieren immer mehr von den Plasmazellen produzierten Antikörpern mit den Centrocyten um die Antigenbindungsstellen der FDCs, so dass einerseits die Antigenaffinität immer weiter steigt, andererseits auf diese Weise auch immer weniger Plasmazellen entstehen [51].

### **1.4 Die Rheumatoide Arthritis**

Die Rheumatoide Arthritis ist eine chronische Autoimmunerkrankung, die durch eine Entzündung von Synovialgewebe charakterisiert ist. Sie manifestiert sich somit primär im Bereich der Gelenke, kann aber auch von verschiedenen extraartikulären Symptomen begleitet werden [10]. Unbehandelt ist die Rheumatoide Arthritis durch einen rasch progredienten mit einer erhöhten Mortalität einhergehenden Verlauf gekennzeichnet [11].

Die Rheumatoide Arthritis hat weltweit etwa eine Prävalenz von 1% und ist somit die häufigste rheumatische Erkrankung [12]. Frauen erkranken 2-4 mal häufiger [12]. Die Krankheitsmanifestation beginnt gewöhnlich im Erwachsenenalter zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr [12] und betrifft somit größtenteils die erwerbstätige Bevölkerung. Daher ist die Therapie der



Rheumatoiden Arthritis auch aus sozioökonomischer Sicht von Bedeutung, da mit dem Einsatz der in der Therapie etablierten DMARDS (=disease modifying antirheumatic drugs) wie Methotrexat und Leflunomid nur 2 % der Patienten eine klinische Remission für mehr als 3 Jahre erfahren. Zudem können mehr als 50 % der Patienten nach einem 5-jährigen Krankheitsverlauf nicht mehr in ihrem Beruf tätig sein [13]. Des Weiteren belaufen sich die jährlichen Behandlungskosten pro Patient auf etwa 50.000 € [14]. Diese bislang unzureichenden Behandlungsmodalitäten, die allenfalls symptomatisch wirksam sind, aber noch jeglichen kurativen Ansatz entbehren, führen in jüngster Zeit zu einer Intensivierung der Erforschung der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis. Mit dem Einsatz von biotechnologisch hergestellten Medikamenten, sogenannten "Biologicals" wie TNF- $\alpha$  - Blockern und Interleukin-1 Antagonisten zur Behandlung der Rheumatoiden Arthritis stehen bereits moderne und wirksame Therapieverfahren zur Verfügung, die eine hohe Ansprechrate zeigen, die sogar bei 50% der Patienten zu einer klinischen Remission führt [16,17]. Dennoch sprechen etwa 30-40 % der Patienten auf eine Therapie mit TNF- $\alpha$ -Blockern wie Etanercept und Infliximab [18] als auch auf eine Interleukin -1 Blockade [19,20] nicht an oder verspüren eine nachlassende Wirksamkeit. Daher werden derzeit verschiedene neuartige Biologicals in klinischen Studien getestet, von denen man sich größere Behandlungserfolge in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis verspricht. Diesen neuen Biologicals liegen verschiedenste Wirkungsmechanismen zugrunde, welche die Entzündungskaskade unterbrechen und dadurch eine Verringerung der Krankheitsaktivität herbeiführen sollen. So wird über ein CTLA4Ig Fusionsprotein (Abatacept) eine Blockade der T- Zell Kostimulation erzielt, mit einem gegen den Interleukin-6 Rezeptor gerichteten Antikörper eine Blockade des Interleukin-6 Signalwegs erreicht und Interleukin-15 über einen monoklonalen Antikörper neutralisiert. Darüber hinaus steht mit dem Anti-CD20 Antikörper Rituximab eine gegen B-Zellen gerichtete Therapie zur Verfügung [28].

## **1.5 Die Rolle von B- Zellen in der Pathogenese und Therapie der Rheumatoiden Arthritis**

Die Rheumatoide Arthritis wurde in den letzten 20 Jahren als eine in erster Linie T- Zell- vermittelte Autoimmunerkrankung angesehen [15]. Nach jahrelanger Forschung über die Rolle der T- Lymphozyten in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis [2], richtet sich der Fokus nun mehr und mehr auf den Einfluss von B- Zellen [3].

So geht die Rolle der B- Lymphozyten in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis nach neueren Erkenntnissen weit über die Produktion von Auto-Antikörpern wie Rheumafaktoren [4] und anti- CCP Antikörpern [5] hinaus (siehe Abbildung 4). Denn B- Zellen sezernieren zudem verschiedene proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , Lymphotoxin sowie Interleukin 6 und Interleukin 10 [6,7]. Außerdem stimulieren sie direkt autoaggressive T- Lymphozyten [8]. Weiterhin wurden im Synovialgewebe Infiltrate mit B- Lymphozyten gefunden, die keimzentrumsähnliche Strukturen bilden [21] sowie B- Zellen, die Aggregate mit T- Zellen formen [22]. Dörner et al. konnten eine gesteigerte Mutationsaktivität dieser B- Zellen sowie Abnormalitäten in deren positiver und negativer Selektion beobachten [23].

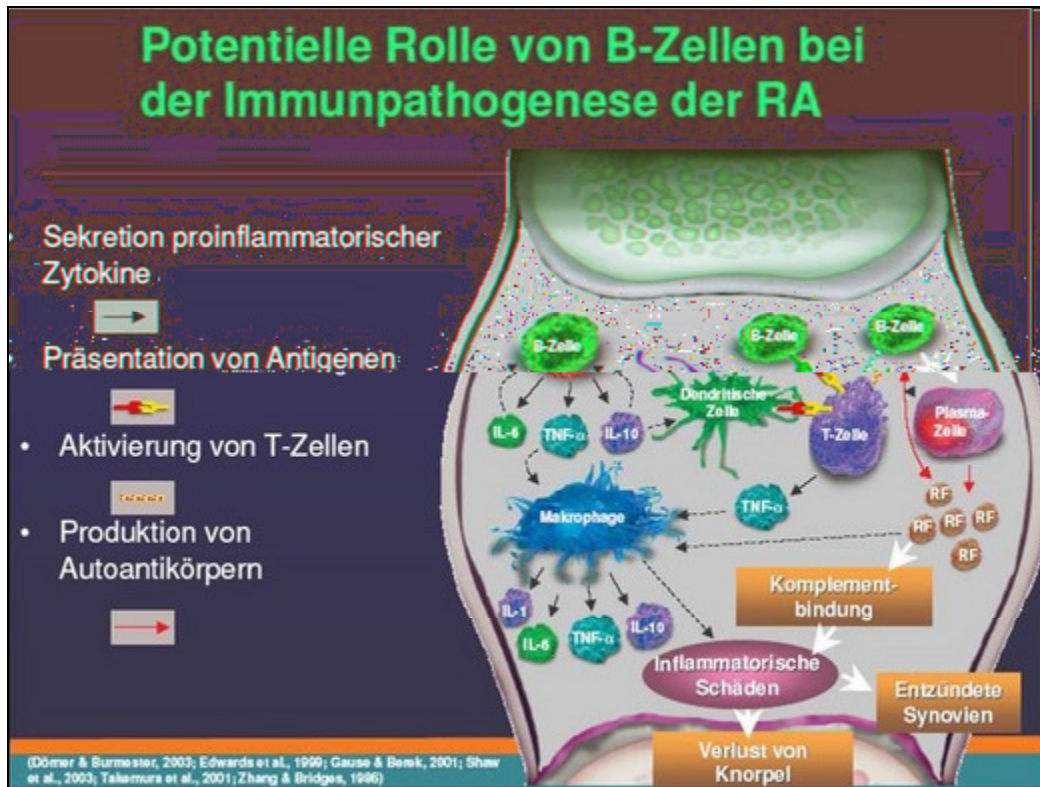


Abbildung 4: Die derzeitigen Vorstellungen zur Rolle der B-Zelle bei der Krankheitsentstehung und -ausbreitung einer Rheumatoiden Arthritis.

Quelle: T. Dörner, Neues Therapieziel B-Zelle - das innovative Wirkprinzip von MabThera. Einführungs-Pressekonferenz, Frankfurt/Main, 18. Juli 2006

Darüber hinaus wird das Wechselspiel der sich auf den B- Zellen befindlichen Oberflächenrezeptoren CD5, CD19, CD22 und FcγRIIB als Schlüsselmechanismus zwischen Immunität und Autoimmunität angesehen [9].

## 1.6 Die B- Zell gerichtete Therapie der Rheumatoiden Arthritis

In verschiedenen klinischen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass Patienten mit therapierefraktärer Rheumatoider Arthritis von einer B-Zell gerichteten Therapie mit Rituximab durch einen deutlichen klinischen Benefit profitieren [24,25,26,27].

Durch die positiven Resultate der großen internationalen Phase III-Studie REFLEX [28] ist der B- Zell gerichtete Antikörper Rituximab (MabThera<sup>®</sup>) seit Juli 2006 europaweit zur Therapie der Rheumatoiden Arthritis zugelassen. Die Zulassung von MabThera<sup>®</sup> wurde speziell zur Therapie von erwachsenen Patienten mit schwerer aktiver Rheumatoider Arthritis erteilt, die auf andere antirheumatisch wirksame Medikamente, inklusive eines oder mehrerer TNF- $\alpha$  Blocker nicht oder nur unzureichend angesprochen beziehungsweise diese nicht vertragen haben [29].

### **1.6.1 Der anti- CD20 Antikörper Rituximab**

Rituximab (MabThera<sup>®</sup>) ist ein gentechnisch hergestellter, chimärer monoklonaler anti-CD20 Antikörper, der aus einer humanen IgG<sub>1</sub> kappa konstanten Region besteht. Die variable Region stammt aus dem murinen anti-CD20-Antikörper-Fragment IDEC-2B8 und bindet mit hoher Affinität an B-Zellen, welche das CD20 Antigen exprimieren [30]. In verschiedenen Studien konnten bereits in vitro die Mechanismen, durch welche Rituximab selektiv B- Zellen depletiert, nachgewiesen werden, und zwar durch eine antikörperabhängig vermittelte Toxizität, eine komplement-vermittelte Toxizität, sowie durch die Inhibierung der Zellproliferation und durch die direkte Induktion der B- Zell Apoptose [31,32]. Doch auch in vivo konnte man inzwischen eine komplement-vermittelte Toxizität sowie eine Aktivierung von Kinasen, Phospholipasen und Kaspasen sowie darüber hinaus eine Herunterregulierung von Interleukin-10 nachweisen [33,34].

### 1.6.2 Das CD20 Antigen

Das CD20 Antigen ist als spezifischer B- Zell Marker in den meisten B- Zell Stadien präsent. Von hämatopoetischen Stammzellen, Pro- B- Zellen und Plasmazellen wird dieser Marker allerdings nicht exprimiert (siehe Abbildung 5).

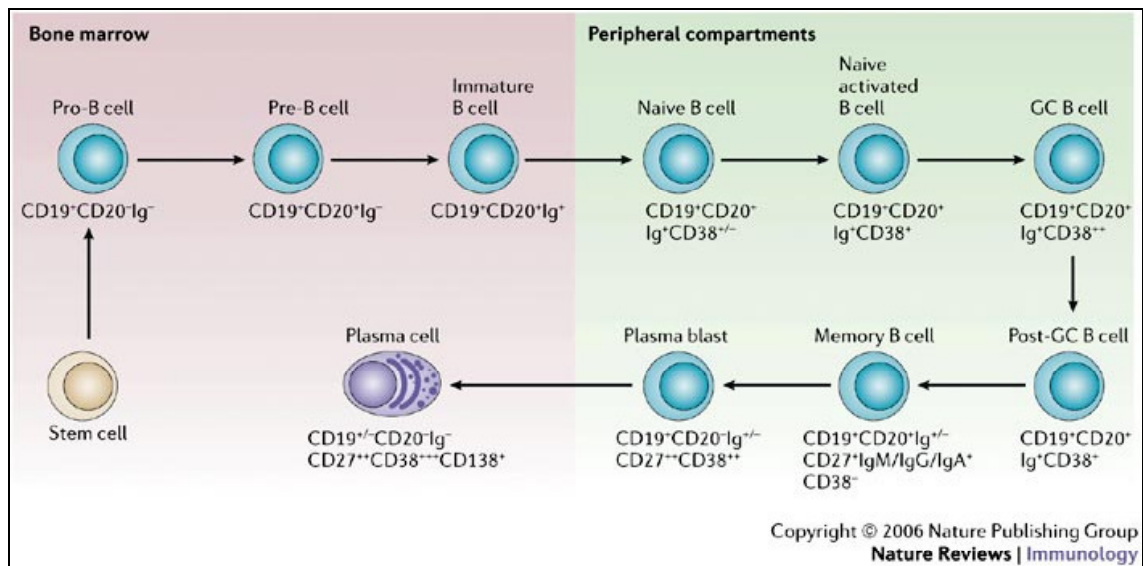


Abbildung 5: Die während der verschiedenen B-Zellstadien exprimierten Oberflächenmarker

### 1.6.3 Die anti- CD20 vermittelte B-Zelldepletion

Durch die gezielte Ausschaltung aller CD20-positiven B- Zellen werden sämtliche Mechanismen der Entzündungsentstehung unterbrochen, so dass durch MabThera<sup>®</sup> die Entzündung und im Zuge dessen die Gewebsschädigung aufgehalten wird.

Rituximab wird bei der Rheumatoiden Arthritis zweimal im 14- tägigen Abstand in einer Dosierung von jeweils 1000 mg verabreicht [35]. Der Anti-CD20 Antikörper führt zu einer Depletion CD20 positiver B- Zellen auf weniger als 5 B- Zellen/ $\mu$ l [38] im peripheren Blut, wo sich etwa 5% aller B-

Zellen befinden. Nach der Infusion von Rituximab sind die CD20 positiven B-Lymphozyten dann gewöhnlich für 6-9 Monate nicht mehr im Blutbild nachzuweisen [35]. Bei manchen Patienten hält die B-Zelldepletion sogar über zwei Jahre an [39]. Klinische Daten weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Effektivität der B-Zelldepletion und dem klinischen Benefit hin [40]. In der Rheumatoiden Arthritis wird unter der Rituximab Therapie regelmäßig eine vollständige Depletion beobachtet [41,42], während bei anderen Autoimmunerkrankungen, insbesondere bei SLE, bei manchen Patienten keine komplette Depletion festgestellt werden konnte [43]. Da die Therapie außer einer leichten Abnahme von IgM keine wesentlichen Auswirkungen auf die Serum- Immunglobulinwerte hat [36,37], ist unter der Therapie mit Rituximab das Risiko für das Auftreten opportunistischer Infektionen gering, wie sich auch in der REFLEX- Studie herausstellte [28].

### **1.7 Zielsetzung dieser Arbeit**

Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe Rheumatologie/ klinische Immunologie der medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg konnten bereits Hinweise auf eine möglicherweise durch Rituximab induzierte Modulation im genetischen Repertoire der Immunglobuline geben. Daher war das Ziel dieser Arbeit, das Immunglobulingen- Repertoire von drei an Rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten auf durch die B- Zell depletive Therapie induzierte Veränderungen zu untersuchen. Dabei fokussierte man sich nun ausschließlich auf die variablen Schwereketten- Gene der Familie V<sub>H4</sub>, da diese zum einen die zweitgrößte Familie darstellt und zum anderen bereits Publikationen über eine mögliche Assoziation bestimmter V<sub>H4</sub>- Gene mit Autoimmunerkrankungen erschienen sind. Das Augenmerk wurde insbesondere auf die Mutationsmaschinerie in der B- Zell Regenerationsphase nach der anti-CD20 vermittelten Therapie gerichtet, zum einen in Bezug auf die Mutationshäufigkeit und zum anderen hinsichtlich der Verteilung der Mutationen auf bestimmte Regionen der DNA, wie den RGYW/WRCY DNA- Motiven und den CDR- Regionen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Im Rahmen einer Therapiestudie mit MabThera<sup>®</sup>/Methotrexat versus Placebo/Methotrexat wurde das V<sub>H</sub>4 Genrepertoire von drei Patienten mit Rheumatoider Arthritis der Rheumatologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg hinsichtlich der Mutationsrate, der Mutationsverteilung und der Häufigkeitsverteilung der einzelnen V<sub>H</sub>4-Gene jeweils vor und nach der Therapie mit Rituximab (MabThera<sup>®</sup>, Hoffmann La Roche, Grenzach-Whylen Germany) zu insgesamt drei verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Um eine durch die Rituximab Therapie induzierte Änderung im Genrepertoire besser erfassen zu können, wurden während der B- Zell Regenerationsphase zwei verschiedene Zeitpunkte gewählt, die etwa ein bis drei Monate auseinander lagen. Der erste Zeitpunkt nach der MabThera<sup>®</sup> Therapie bezieht sich auf die frühe Regenerationsphase. Er wurde bei einem B- Zell Anteil von 1,5 bis 2,0 % im peripheren Blut gewählt, d.h. fünf bis sieben Monate nach Beginn der Rituximab Therapie, da hier der frühest mögliche molekularbiologische Nachweis der V<sub>H</sub>4-Gene erfolgen konnte. Der zweite Zeitpunkt repräsentiert die späte Regenerationsphase bei einem B- Zell Anteil von 2,0% bis 2,5%.

Die Diagnose Rheumatoide Arthritis wurde bei allen drei Patienten nach den Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) gestellt.

Die Patienten erhielten während der MabThera<sup>®</sup> Therapiestudie außer Methotrexat keine weiteren antiinflammatorisch oder immunsuppressiv wirksamen Medikamente. Außerdem wurde die B- Zell- Regeneration zu einem Zeitpunkt untersucht, zu dem noch keine weitere Therapieumstellung notwendig war.



Patient A (weiblich, 49 Jahre) erhielt während der Therapiestudie außer Rituximab keine weitere Medikation. Sowohl Patient B (weiblich, 66 Jahre) als auch Patient C (weiblich, 45 Jahre) erhielten während der MabThera<sup>®</sup>-Therapiestudie jeweils zusätzlich einmal wöchentlich 15 mg Methotrexat. Alle drei Patienten traten nach Abgabe ihrer Einverständniserklärung mit Genehmigung der lokalen Ethikkommission in die Studie ein. Insgesamt wurden jedem Patienten zwei Infusionen MabThera<sup>®</sup> im 14-tägigen Abstand in einer Dosierung von 1000 mg verabreicht.

Die Krankheitsaktivität wurde unter der Therapie mit Hilfe des DAS-28-Score sowie der Bestimmung des CRP- Spiegels und der Rheumafaktoren kontrolliert.

### **2.2 Isolierung von PBMCs mittels Ficoll-Gradient**

Mononukleäre Zellen (sog. Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) wurden durch eine Dichtezentrifugation mit Hilfe eines Ficoll-Paque<sup>®</sup> Plus Gradienten (Pharmacia Biotech) aus 20 ml Venenblut isoliert, indem 10 ml EDTA- Blut mit 10 ml NaCl 0,9% verdünnt und über 20 ml Ficoll-Paque<sup>®</sup> Plus geschichtet wurden, mit nachfolgender Zentrifugation bei 2290 rpm ohne Bremse bei Raumtemperatur für 25 Minuten. Die Dichtezentrifugation beruht auf einer unterschiedlichen Dichte von Zellen. Ficoll hat mit 1,077 eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten, aber eine kleinere Dichte als Granulozyten und Erythrozyten. Somit wurden Erythrozyten, Thrombozyten, polymorphkernige Leukozyten und tote Zellen durch das Ficoll-Paque hindurch zentrifugiert, während die mononukleären Zellen sich in einer Schicht zwischen Ficoll und Plasma zu einem schmalen Ring anreicherten, welcher nach Entfernen des Überstandes mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen wurde. Im Anschluss wurden die PBMCs zweimal in dem Kulturmedium RPMI gewaschen, welches 1% FCS (hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum), 1% Penicillin-Streptomycin und 1%

L-Glutamin enthielt und jeweils bei 1500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet in einem Einfriermedium (50% RPMI, 40% FCS) resuspendiert. Danach wurde tropfenweise DMSO(10%) zugesetzt und die Suspension in ein auf Eis stehendes Kryoröhrchen pipettiert und dann bis zur weiteren Verarbeitung sprich DNA-Isolierung bei -80 °C aufbewahrt. Ein Teil der Zellen wurde für die FACS-Analyse nach Färbung mit Trypanblau (1:10) in der Neubauer-Kammer gezählt. Die durchschnittliche Ausbeute betrug  $3 \times 10^7$  PBMCs bei 20 ml EDTA- Venenblut.

### 2.3 DNA- Isolierung

Die genomische DNA wurde mit Hilfe des QIAmp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit (Quiagen) aus  $5 \times 10^6$  PBMCs isoliert. Anschließend wurde die isolierte DNA spektralphotometrisch vermessen, um sie auf die für die PCR notwendige Konzentration von 50 ng/μl einstellen zu können. Die DNA Konzentration betrug immer 100-300 ng/μl. Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde folgende für die DNA allgemeine Formel verwendet:

$$\begin{aligned} \text{Abs } 1,0_{260\text{nm}} &= 50\mu\text{g /ml} \\ &= 50\text{ng /}\mu\text{l} \end{aligned}$$

Die DNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C aufbewahrt.

### 2.4 DNA-Amplifikation durch die Polymerasekettenreaktion

Um jegliche Kontamination zu vermeiden, wurde das Template stets in einem anderen Raum in den PCR -Ansatz pipettiert. Zudem wurde jeder Ansatz unter einer Flow pipettiert. Für die Amplifikation der Immunglobulin Gene wurden stets 5μl genomische DNA zum PCR- Ansatz hinzugegeben.

### 2.4.1 Oligonucleotide

Die zur Amplifizierung der verschiedenen VDJ Rearrangements geeigneten Primer wurden bereits in mehreren Publikationen beschrieben. (Brezinschek,1995; Foster, 1997; Farner,1999). Alle verwendeten Primer wurden von MWG hergestellt, wobei die Primersequenzen in Richtung 5` nach 3` angegeben wurden. Die IUB Codes der Primer Sequenzen entsprachen folgenden Basen: S= C,G; B=G,T,C; Y=C,T.

External Primer:

M176-Ex V<sub>H</sub>4 E-20: ATG AAA CAC CTG TGG TTC TT

M179-Ex J<sub>H</sub>1,2,4,5 E-21: TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT

M180-Ex J<sub>H</sub>3 E-20: TAC CTG AAG AGA CGG TGA CC

M181-Ex J<sub>H</sub>6 E-19: ACC TGA GGA GAC GGT GAC C

Internal(nested) Primer:

M185-Int V<sub>H</sub>4 N-27: GGT GCA GCT GCA GGA GTS GGG CSC AGG

M188-Int J<sub>H</sub>1,3,4,5 N-25: CGA CGG TGA CCA GGG TBC CYT GGC C

M189-Int J<sub>H</sub>2 N-25: CGA CAG TGA CCA GGG TGC CAC GGC C

M190-Int J<sub>H</sub>6 N-24: CGA CGG TGA CCG TGG TCC CTT GCC

Die V<sub>H</sub>4E und V<sub>H</sub>4N Primer hybridisierten an die Leader- Sequenz und an die Framework Region 1 der V<sub>H</sub>4- Gene.

### 2.4.2 Nested- PCR von genomischer DNA

Bei der nested (verschachtelten) PCR wird ein bereits vervielfältigtes DNA-Fragment ein weiteres Mal vermehrt (siehe Abbildung 6). Dieser Vorgang erfolgt mit einem Primerpaar, das innerhalb des in der ersten Reaktion verwendeten angeordnet ist. Auf diese Weise ist es zum einen möglich, sogar geringste Mengen an Template nachzuweisen und zum anderen, fehlerhafte Amplifikationen der ersten PCR auszusondern.

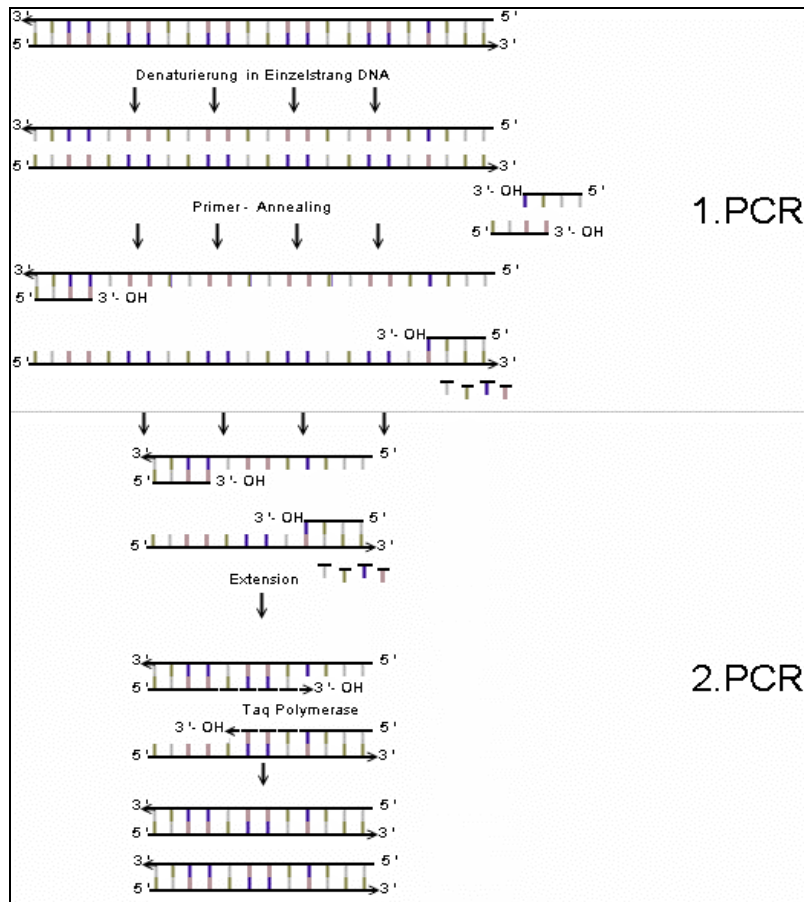


Abbildung 6: Nested PCR

Für die erste PCR wurden 80 µl eines Ansatzes verwendet, der sich folgendermaßen zusammensetzte:

Mastermix I:

5,4 µl H<sub>2</sub>O

1,6 µl Desoxynucleosid-Triphosphat (sog. dNTPs, 10 mM, Peqlab)

5 µl V<sub>H4</sub> - 5` External Primer (10 µM)

5 µl J<sub>H-</sub> Mix – 3` External Primer (10 µM)

8 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Applied Biosystems)

Mastermix II:

8 µl 10x Puffer II (Applied Biosystems)

0,5 µl Ampli Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (Applied Biosystems)

41,5 µl dH<sub>2</sub>O

25 µl vom Mastermix I, 50 µl vom Mastermix II und 5µl Template (50 ng/µl) wurden in ein PCR-Tube pipettiert und in die PCR Maschine gestellt.

Die PCR wurde mit einer Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) PCR Maschine unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

1 Zyklus Denaturierung bei 95 °C für 5 Minuten,  
Annealing bei 50 °C für 1 Minute,  
Extension bei 72 °C für 1 Minute, gefolgt von

35 Zyklen Denaturierung bei 94 °C für 1 Minute,  
Annealing bei 50 °C für 30 Sekunden,  
Extension bei 72 °C für 1 Minute und zuletzt eine  
Extension bei 72 °C für 5 Minuten.

Die 2. PCR erfolgte nach dem gleichen Prinzip, mit dem Unterschied dass, statt der genomischen DNA das Produkt der 1. PCR als Template und V<sub>H</sub>4-5` Internal Primer und J<sub>H</sub>- 3` Internal Primer hinzugegeben wurden. Außerdem erfolgte die Amplifikation mit einer Annealing Temperatur von 65 °C und 30 Zyklen statt 35.

## **2.5 Agarosegel-Elektrophorese**

Zur präparativen und analytischen Auftrennung der PCR Produkte wurde die Gelelektrophorese mit 1,5%igen Agarosegelen eingesetzt. Zur Herstellung der Gele wurden jeweils die entsprechenden Mengen Agarose (Ultra pure Agarose, GIBCO,BRL) und 1xTAE Puffer miteinander vermischt. Dieses Gemisch wurde etwa 5 Minuten lang in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Daraufhin wurde Ethidiumbromid (0,5 µg/ml, Sigma) als Interkalationsfarbstoff hinzugegeben und die Agarosegele mittels geeigneter Vorrichtung gegossen.

Um Taschen für die später einzubringenden PCR Produkte zu erzeugen, wurden direkt nach dem Gießen Kämme in das Gel eingetaucht. Als optischer Marker für die Gelpassage wurden den 80 µl PCR Produkten jeweils 16 µl Bromphenolblau hinzugefügt. Um die Größenverhältnisse der aufgetrennten DNA abschätzen zu können, wurden jeder Gelelektrophorese 5 µl eines DNA-Größenstandards (GIBCO,BRL) beigefügt. Für die Elektrophorese wurden Gelkammern (Pharmacia Biotech) mit 1x TAE gefüllt. Nach dem Einpipettieren der zu trennenden DNA-Fragmente in die vorgefertigten Taschen wurde für etwa 40 bis 60 Minuten eine Gleichspannung von 90-120 V an die Gelkammern angelegt, um die Trennung im elektrischen Feld zu erreichen.

### **2.6 Aufreinigung von DNA**

Nach der Agarosegelelektrophorese wurden die anhand des DNA-Größenstandards (Amersham Biosciences) identifizierten Banden der Größe 350 bp unter UV Licht der Wellenlänge 254 nm mit einem Spatel aus dem Gel ausgeschnitten und die in Form von Gelstückchen erhaltenen DNA-Fragmente aufgereinigt. Dies erfolgte mit dem Min Elute Gel Extraction Kit (Quiagen), wobei die DNA in 11 µl EB- Puffer eluiert wurde. Das somit erhaltene Elutionsvolumen betrug dann 10 µl. Die Aufreinigung wurde jeweils nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.7 Subklonierung der V<sub>H</sub>4- Gensegmente**

Für die Subklonierung wurde der Zero Blunt- PCR Cloning Kit (Invitrogen, Life Technologies) verwendet. In diesem Prozess werden geglättete PCR-Fragmente mit einem geringen Anteil nicht rekombinanter VDJ-Rearrangements in einen Vektor ligiert. Dieser Vektor erlaubt die direkte Selektion positiver Rekombinationen via Spaltung des Gens ccdB, welches

zu E.coli gehört. Das Gen *ccdB*, welches zum Entstehen negativer Rekombinationen führt, fusioniert normalerweise mit dem *LacZ $\alpha$*  Peptidfragment des Vektors. Durch die Ligation des geglätteten PCR-Produktes wird die Expression der *LacZ $\alpha$ - ccdB* Genfusion unterbunden und somit das Wachstum von nur positiven Rekombinationen erreicht. Der Vektor enthält zusätzlich Kanamycin und Zeocin resistente Gene für die Selektion positiver Rekombinationen bei der Transformation in Kompetente Zellen (E.coli).

### **2.7.1 Polishing**

Um für die Ligation geeignete DNA Fragmente zu erhalten, wurden die aufgereinigten PCR Produkte unter Verwendung des PCR Polishing Kit (Stratagene) aufgereinigt und geglättet, indem von der Ampli Taq DNA Polymerase erzeugte 3' Überhänge entfernt wurden.

Der Ansatz für die Polishing Reaktion bestand aus:

- 10  $\mu$ l aufgereinigtem PCR Produkt
- 1,3  $\mu$ l 10x Polishing Puffer
- 1  $\mu$ l dNTP Mix (10mM)
- 1  $\mu$ l Pfu DNA Polymerase (2,5 U/l)

Die Polishing Reaktion erfolgte im Wasserbad bei 72 °C und 30 Minuten Dauer.

### **2.7.2 Ligation**

Für den Ligationsansatz wurde ein Volumen von 10  $\mu$ l gewählt, in welchem 1  $\mu$ l (25 ng) linearisierte Plasmidvektor-DNA, 3,5  $\mu$ l Polishing Reaktionsprodukt, 1  $\mu$ l T<sub>4</sub> DNA Ligase (4 U/ $\mu$ l) sowie 1  $\mu$ l Ligationspuffer und

3,5 µl H<sub>2</sub>O enthalten waren. Die Ligationsreaktion erfolgte bei 16 °C für eine Stunde.

### **2.7.3 Herstellung des Nährmediums/der Agarplatten**

Für die Zubereitung der Agarplatten wurden 10 g LB Agar in 500 ml Ampuwa® gelöst und anschließend autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C wurde Kanamycin (50 µg/ml) hinzugefügt und in sterile Petrischalen gegossen. Die gebrauchsfertigen Agar-Platten wurden maximal 3-4 Tage bei 4 °C aufbewahrt. Zur Herstellung des Nährmediums wurden 16 g LB Medium in 500 ml Ampuwa® gelöst und anschließend autoklaviert. Das Selektionsmedium wurde durch die Zugabe von Kanamycin (50 µg/ml) kurz vor Gebrauch hergestellt.

### **2.7.4 Transformation**

Die Transformation wurde gemäß der Anleitung des Subklonierungs-Kits (Invitrogen) durchgeführt. Die zur Transformation verwendeten, bei -80 °C aufbewahrten One Shot TOP 10 kompetenten Zellen (E.coli) wurden auf Eis aufgetaut und in diese dann vorsichtig 5µl der ligierten DNA pipettiert. Kompetente Zellen sind sehr sensitiv gegenüber Temperaturveränderungen. Außerdem kann durch Pipettieren eine mechanische Lyse der kompetenten Zellen verursacht werden. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis wurde der Transformationsansatz bei 42 °C für exakt 45 Sekunden einem Hitzeschock unterzogen mit sofortigem Abkühlen auf Eis für 2 Minuten. Direkt im Anschluss wurde der Transformationsansatz nach Zugabe von 250 µl SOC Medium unter Schütteln bei 225 rpm und 37 °C für eine Stunde inkubiert. Danach wurden 80 µl des Transformationsansatzes auf LB Agarplatten, welche 50 µg/ml Kanamycin enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.



## **2.8 Gewinnung der Plasmid DNA**

Eine definierte Anzahl (30 oder 40) der auf den LB Agarplatten gewachsenen Kanamycin resistenten Klone wurden mit je einem sterilen Holzstäbchen (Fackelmann) angestochen und in jeweils 2 ml 50 µg/ml Kanamycin enthaltendem LB Medium für 12 bis 15 Stunden in einem Schüttelinkubator bei 225 rpm und 37 °C kultiviert.

## **2.9 Isolierung der Plasmid DNA**

Zur Isolierung der Plasmid DNA wurde der Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System Kit (Promega) verwendet. Hierbei erfolgte jeweils nach alkalischer Lyse der Bakterien die Plasmid DNA Isolierung über Ionenaustauschersäulen nach dem Herstellerprotokoll und nachfolgend ihre Elution mit nukleasefreiem H<sub>2</sub>O. Anschließend wurde die Plasmid DNA für die Sequenzierreaktion spektralphotometrisch vermessen.

## **2.10 DNA- Sequenzierung**

Die Sequenzierreaktionen wurden unter Verwendung des ABI PRISM<sup>®</sup> Big Dye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) durchgeführt.

### **2.10.1 Reaktionskomponenten**

Der Reaktionsansatz für die Sequenzier- PCR setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

4,0 µl	ABI PRISM® Big Dye™ Terminator
0,5 µl	Sequenzierprimer (10pmol/µl)
0,5µl	Pellet Paint Blue (Novogene)
2-7µl	DNA
ad 20,5 µl	dH <sub>2</sub> O

Für die Sequenzier- PCR von der Plasmid DNA wurden M13 Forward und M13 Reverse Universalprimer verwendet.

Sequenzen der Primer:

M13F(-20): 5`- GTA AAA CGA CGC CCA G - 3`

M13 Reverse: 5`- CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3`

### **2.10.2 Reaktionsparameter**

Die Reaktionsparameter für die Sequenzier- PCR waren: Eine initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 Minuten, gefolgt von 25 Zyklen Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden, Annealing bei 50 °C für 1 Minute, Elongation bei 60 °C für 3 Minuten und am Ende einer Elongation bei 72 °C für 5 Minuten.

### **2.10.3 Aufreinigung und Präparierung der PCR Produkte für die Sequenzierung**

Zu je 20 µl PCR Produkt wurden 80 µl 75%iger Isopropanol gegeben, wobei die Single- Cell PCR Produkte jeweils vor dem Zusatz von Isopropanol durch eine Auto Seq G-50 Säule (Amersham Biosciences) gelaufen sind, um überschüssigen Big Dye™ zu entfernen. Danach wurden die Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 20 Minuten mit maximaler Geschwindigkeit(14000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Pellets mit 250 µl 75%igem Isopropanol gewaschen. Im Anschluss wurde 8 Minuten mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Pellets 2 Minuten auf

einem Heizblock bei 37 °C getrocknet und daraufhin in 20 µl HID1 Formamid (Applied Biosystems) gelöst. Anschließend wurde die DNA denaturiert, indem die Proben 3 Minuten inkubiert und unmittelbar danach 2 Minuten auf Eis gestellt wurden. Die Sequenzierung der DNA erfolgte in einem ABI PRISM 310™ (Applied Biosystems).

### 2.11 Analyse der Sequenzen

Die  $V_{H4}$ - Gensequenzen wurden mittels Joinsolver Server (<http://joinsolver.niams.gov/>), einem Web-basierten Software Programm zur Analyse der VDJ- Rekombinationen und der Mutationen in den VDJ-Sequenzen folgendermaßen untersucht:

Die durch die Sequenzierung erhaltenen  $V_H D J_H$  –Sequenzen wurden mit Hilfe des Computerprogramms "DNASTAR" Version 4.0 mit den bekannten Keimbahngenen verglichen. Das Segment mit der größten Homologie wurde für die weitere Auswertung verwendet.

Für die Sequenz-Analyse waren folgende Parameter relevant:

- V-Segment
- D-Segment
- J-Segment
- CDR3-Region
- Gesamtmutationsrate
- Mutationen in den Framework-Regionen
- Mutationen in den CDR- Regionen
- Mutationen in den Hot Spots (RGYW/WRCY- Bereich)
- R/S Quotient

Mit dem R/S Quotienten ist das Verhältnis von Replacement- zu Silent-Mutationen gemeint, wobei erstere durch den Austausch einer Base innerhalb eines Triplets entsteht. Dies hat dann während der Proteinbiosynthese zur Folge, dass eine andere als die ursprünglich vorgesehene Aminosäure angelagert wird. Findet eine solche Punktmutation jedoch innerhalb eines Basentriplets statt, welche zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz führt, so liegt eine Silent-Mutation vor. In dieser Arbeit wurde der R/S Quotient getrennt für die Framework - und CDR- Regionen zu den verschiedenen Therapiezeitpunkten erstellt. Insgesamt wurden 486 Sequenzen analysiert, wobei ausschließlich die produktiven Sequenzen zur weiteren Auswertung herangezogen wurden.

Ein Rearrangement wurde als produktiv bezeichnet, wenn die  $V_HDJ_H$  Verbindungsstelle bis ins  $J_H$  Segment im Leseraster blieb; war dies nicht der Fall, so wurde die Sequenz als nicht-produktiv eingeordnet. An der Verbindungsstelle wurden Sequenzen, die im verbindenden Kodon noch Nukleotide der Keimbahn aufwiesen als "keimbahnkodiert" (germline) bezeichnet. Rearrangements, die Pseudogene verwendeten, wurden von vorneherein als nicht produktiv eingestuft. Zusätzliche Nukleotide wurden als N-(Non-templated) Nukleotide bezeichnet, wenn sie zufällig eingefügt waren.

Insgesamt wurden 486 Sequenzen analysiert:

Patient A: 112 produktiv, 33 nicht-produktiv

Patient B: 149 produktiv, 41 nicht-produktiv

Patient C: 115 produktiv, 36 nicht-produktiv

Für die weitere Auswertung waren nur die 376 produktiven Sequenzen von Relevanz (siehe Tabelle 1).

	Zeitpunkt vor Therapie	Frühe Regenerationsphase	Späte Regenerationsphase
Patient A	60	52	37
Patient B	41	35	36
Patient C	36	40	39

Tabelle 1: Anzahl der produktiven Sequenzen zu den drei verschiedenen Zeitpunkten

### 2.12 Statistik

Die statistischen Analysen erfolgten mit der GraphPad Software: <http://www.graphpad.com/>. Zum Vergleich der Mutationsraten wurde der Chi Square Test angewandt, zur Analyse von Unterschieden im Anteil der einzelnen Gensegmente der Fisher`s Test. Zur Analyse der Unterschiede in den RGYW/WRCY DNA Motiven und in den Framework- und CDR-Regionen wurde der Chi-Square-Goodness-of-fit- Test herangezogen. Werte mit  $p \leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

### 2.13 Verbrauchsmaterial

#### Medien und Reagenzien

Ficoll Paque<sup>®</sup> (Pharmacia Biotech)

Trypanblau (Merck)

HBSS (Gibco BRL)

RPMI (Sigma)

Penicillin- Streptomycin (Biochrom AG)

L- Glutamin (Gibco BRL)

LB Medium (Gibco BRL)

LB Agar (Gibco BRL)

Kanamycin (USB Corporation)

Ethanol 100% (J.T. Baker)  
Isopropanol 100% (Merck)  
HIDI Formamid

### **Pufferlösungen**

TAE Elektrophorese Puffer (50x)      242 g Tris Base (SERVA)  
57,1 ml Essigsäure 100% (Roth)  
37,2 g EDTA (Roth)  
ad 1l dH<sub>2</sub>O

6x Loading Dye                              0,25% Bromphenolblau  
0,25% Xylen Cyanol  
30% Glycerol in dH<sub>2</sub>O

TE ( 10 mM Tris, 1mM EDTA)              100 µl EDTA 0,5 M pH 8,0  
500 µl Tris 1 M  
ad 50 ml dH<sub>2</sub>O

### **Agarosegel**

1,5% Agarose UltraPure (Gibco BRL)  
1xTAE  
0,5µg/ml Ethidiumbromid

### **Sequenzierer**

Genetic Analyzer Puffer (Gibco BRL)  
Pop-6-Gel (Applied Biosystems)

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Klinische Daten

Wie in Tabelle 2 dargestellt, wurde bei den drei Patienten die Krankheitsaktivität unter der Therapie mit Hilfe des DAS28 Scores sowie der Bestimmung des CRP- Spiegels und der Rheumafaktoren kontrolliert.

Patient	Zeitpunkt	Alter	DAS28	CRP(mg/dl)	RF(U/ml)
Patient A	vor Therapie	49	4,95	0,66	42,3
	FRP		6,42	3,59	39,6
	SRP		4,96	0,29	33,4
Patient B	vor Therapie	66	5,98	1,83	195
	FRP		4,65	0,65	n.d.
	SRP		4,37	0,66	130
Patient C	vor Therapie	45	6,00	0,29	81,7
	FRP		3,32	0,26	67,9
	SRP		5,69	0,52	45,2

Tabelle 2: Klinischer Verlauf der drei Patienten

Der DAS28 zeigt, dass die Patienten B und C in der frühen Regenerationsphase von einem deutlichen Rückgang der Krankheitsaktivität profitierten. Bei Patient A wurde dagegen ein deutlich geringeres klinisches Ansprechen auf die Mabthera<sup>®</sup> Therapie beobachtet. Daher wurde bei Patient A in der frühen Regenerationsphase eine Basistherapie mit Azulfidine begonnen. Es bestand aber in der späten Regenerationsphase trotzdem weiterhin eine mäßige Aktivität der Rheumatoiden Arthritis. Die Rheumafaktoren waren bei allen drei Patienten nach der Therapie rückläufig. Der CRP- Spiegel war in der frühen Regenerationsphase bei den Patienten B

und C niedriger, bei Patient A höher als vor der Therapie, was auch mit dem klinischen Ansprechen der Patienten korreliert.

#### **3.2 Analyse der Häufigkeitsverteilung der verwendeten V<sub>H4</sub> Gensegmente**

Die Analyse der Häufigkeitsverteilung der verwendeten V<sub>H4</sub>-Gensegmente ergab insgesamt keine signifikanten Veränderungen (siehe Abbildungen 7,8,9). Bei allen drei Patienten wurde zu den jeweiligen analysierten Zeitpunkten ein polyklonal diverses Genrepertoire gefunden. Das Repertoire beschränkte sich jeweils auf folgende sechs bis acht Gensegmente: V<sub>H4</sub>-04, V<sub>H4</sub>-30, V<sub>H4</sub>-31, V<sub>H4</sub>-34, V<sub>H4</sub>-39, V<sub>H4</sub>-59 und V<sub>H4</sub>-61.

Insgesamt waren die Gene V<sub>H4</sub>-34, V<sub>H4</sub>-39 und V<sub>H4</sub>-59 am häufigsten vertreten.

In der frühen Regenerationsphase wurde bei Patient A ein Rückgang von V<sub>H4</sub>-34 (26,7% versus 20,7%,  $p=0,5128$ ) und V<sub>H4</sub>-39 (23,3% versus 15,1%,  $p=0,3433$ ) beobachtet. In der späten Regenerationsphase kam es dann zu einem erneuten Anstieg von V<sub>H4</sub>-34 (20,7% versus 24,3%,  $p=1,0000$ ) und V<sub>H4</sub>-39 (15,1% versus 21,6%,  $p=0,5763$ ). Bei Patient B war das Gen V<sub>H4</sub>-34 zu den verschiedenen analysierten Zeitpunkten mit einem Anteil von circa 20,0% etwa gleich häufig vertreten. Bei Patient C kam es in der frühen Regenerationsphase zu einer weiteren leichten Zunahme von V<sub>H4</sub>-34 (38,9% versus 47,5%,  $p=0,4936$ ), die aber in der späten Regenerationsphase bereits wieder zurückging (47,5% versus 43,6%,  $p=0,8224$ ). Außerdem war sowohl in der frühen als auch in der späten Regenerationsphase eine konstante Abnahme von V<sub>H4</sub>-39 zu verzeichnen (12,5% versus 30,6% mit  $p=0,0893$  und 12,5% versus 10,3% mit  $p=1,0000$ ).



VH4- Genrepertoire von Patient A

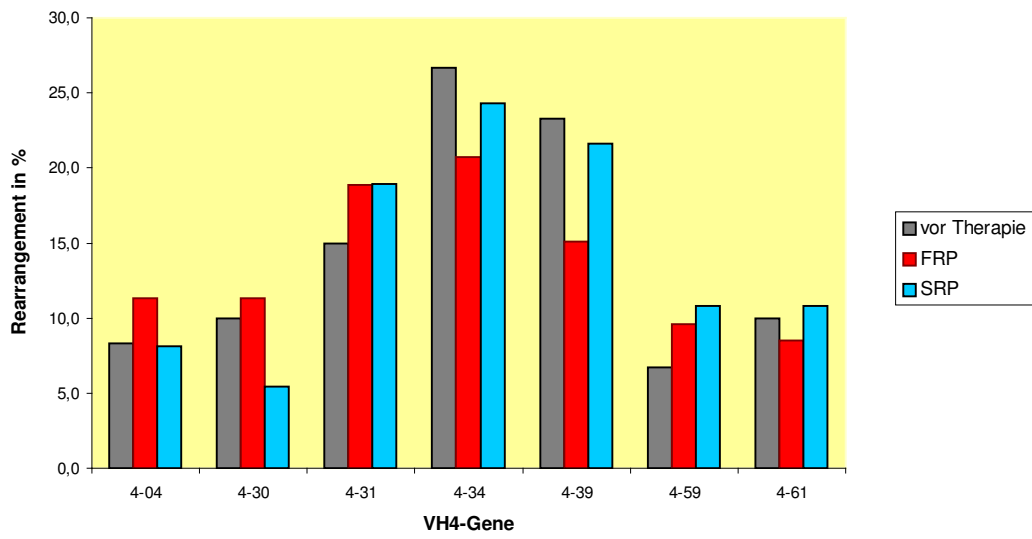


Abbildung 7: VH4-Genverteilung im peripheren Blut zu den verschiedenen Zeitpunkten

VH4 Genrepertoire von Patient B

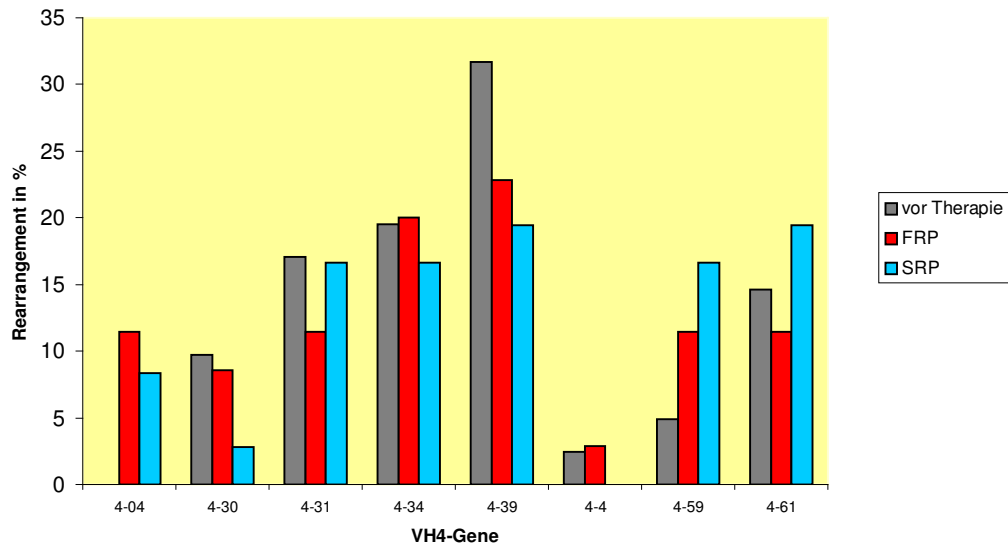


Abbildung 8: VH4-Genverteilung im peripheren Blut zu den verschiedenen Zeitpunkten

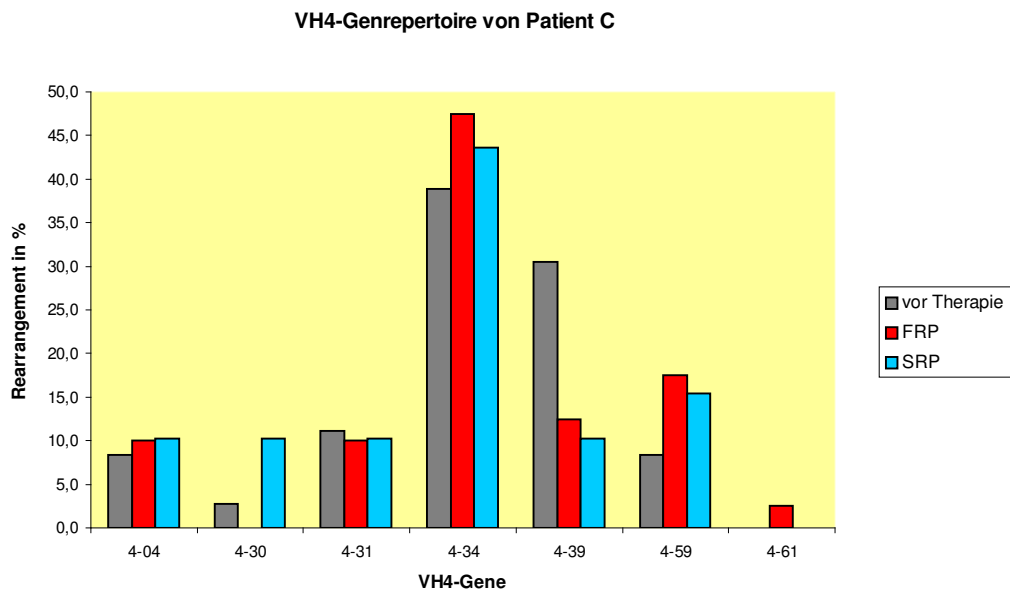


Abbildung 9: V<sub>H4</sub>-Genverteilung im peripheren Blut zu den verschiedenen Zeitpunkten

### 3.3 Vergleich des prozentualen Anteils an niedrig mutierten und hochmutierten Sequenzen

Betrachtet man die Mutationsverteilung hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens hochmutierter Sequenzen mit mehr als neun Mutationen versus niedrig mutierter Sequenzen mit einer bis neun Mutationen, lässt sich feststellen, dass in der frühen Regenerationsphase bei allen drei Patienten der Anteil an hochmutierten Sequenzen stark zunahm ( $p < 0,0001$ ) und im Vergleich dazu der Anteil an niedrig mutierten Sequenzen dementsprechend stark zurückging (siehe Tabelle 3). Während der späten Regenerationsphase sank der Anteil an hoch mutierten Sequenzen dann etwa um die Hälfte ab, so dass insgesamt wiederum eine Annäherung an die Mutationsverteilung vor der Therapie zu erkennen war (siehe Tabelle 3).

<b>MUTATIONSVERTEILUNG</b>	<b>Vor Therapie</b>	<b>FRP<sup>1</sup></b>	<b>SRP<sup>2</sup></b>
<b>Patient A</b>			
1-9 Mutationen (%)	82°	25°	65
>9 Mutationen (%)	18*	75*	35
<b>Patient B</b>			
1-9 Mutationen (%)	95	60	72
>9 Mutationen (%)	5*	40*	28
<b>Patient C</b>			
1-9 Mutationen (%)	94	48	79
>9 Mutationen (%)	6*	53*	21

**Tabelle 3: Mutationsverteilung vor und nach Therapie**

<sup>1</sup> P < 0.0001, °P < 0,0027, <sup>1</sup>frühe Regenerationsphase, <sup>2</sup>späte Regenerationsphase

### 3.4 Analyse der Genmutationsrate

#### 3.4.1 Vergleich der Gesamtmutationsrate

In Abbildung 9 sind die Gesamtmutationsraten der drei Patienten zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Vergleicht man die Gesamtmutationsrate vor Therapie mit der frühen Regenerationsphase, so fällt auf, dass diese bei allen drei Patienten hoch signifikant anstieg: 3,16 versus 1,59, 2,63 versus 1,29 und 2,20 versus 1,19. In der späten Regenerationsphase ging die Gesamtmutationsrate bei den drei Patienten wieder signifikant zurück.

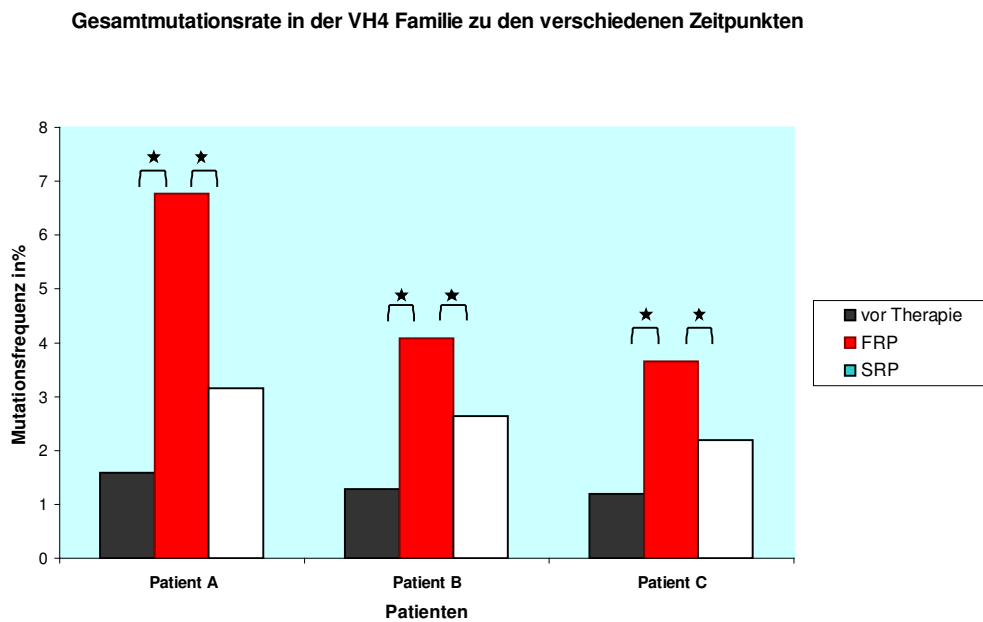


Abbildung 10: Gesamtmutationsrate zu den verschiedenen Zeitpunkten mit \* $p < 0,0001$

### 3.4.2 Vergleich der Mutationsraten der einzelnen $V_{H4}$ - Gene

In der frühen Regenerationsphase nahm bei den Patienten A und B die Anzahl an Punktmutationen in jedem einzelnen  $V_{H4}$ -Gen signifikant zu (siehe Abbildungen 11 und 12), wobei bei Patient A  $V_{H4}$ -59 mit 9,7% versus 1,6% ( $p < 0,0001$ ) am stärksten mutiert war. Die übrigen  $V_{H4}$ -Gene wiesen bei Patient A zum ersten Zeitpunkt nach Therapie eine Mutationsrate von etwa 6,0% auf:  $V_{H4}$ -04 5,0% versus 0,9% ( $p < 0,0001$ ),  $V_{H4}$ -30 7,6% versus 2,0% ( $p < 0,0001$ ),  $V_{H4}$ -31 5,6% versus 1,9% ( $p < 0,0001$ ),  $V_{H4}$ -34 5,5% versus 2,0% ( $p < 0,0001$ ),  $V_{H4}$ -39 6,2% versus 1,6% ( $p < 0,0001$ ) und  $V_{H4}$ -61 7,0% versus 1,2% ( $p < 0,0001$ ) (siehe Abbildung 11).

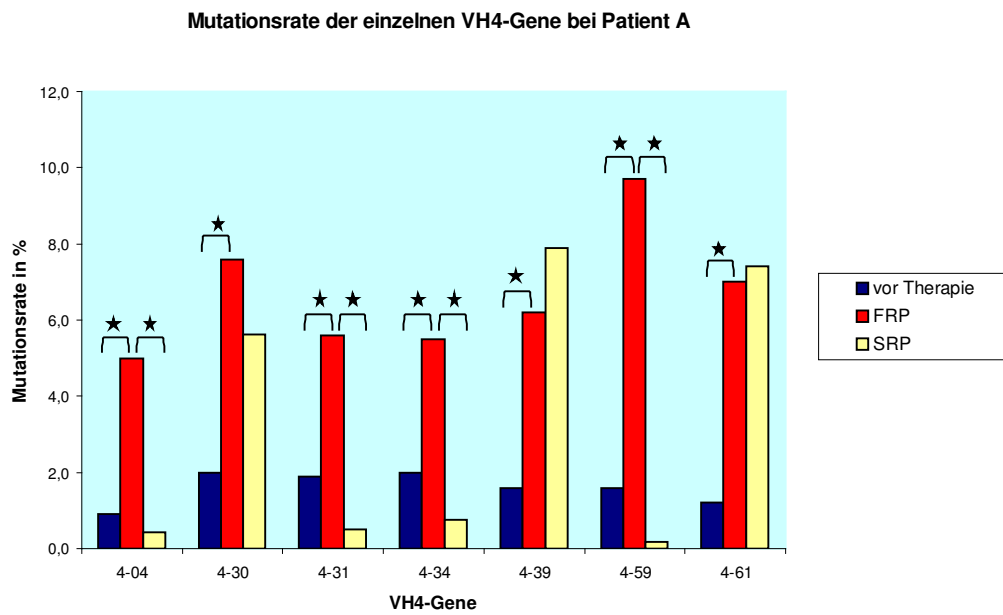


Abbildung 11: Mutationsrate der einzelnen VH4- Gene bei Patient A mit \* $p < 0,0001$

Bei Patient B waren  $V_{H4-4}$  (10,2% versus 3,3%,  $p < 0,0001$ ),  $V_{H4-59}$  (7,8% versus 1,8%,  $p < 0,0001$ ) und  $V_{H4-61}$  (9,2% versus 1,6%,  $p < 0,0001$ ) in der frühen Regenerationsphase am höchsten mutiert. Bei den  $V_{H4}$ -Genen  $V_{H4-04}$ ,  $V_{H4-30}$ ,  $V_{H4-31}$ ,  $V_{H4-34}$  und  $V_{H4-39}$  stieg die Mutationsfrequenz signifikant auf 2,0% bis 4,0% an. Während der späten Regenerationsphase wurde bei Patient B dann eine konstante Abnahme der Mutationsrate beobachtet, die ebenfalls signifikant war (siehe Abbildung 12).

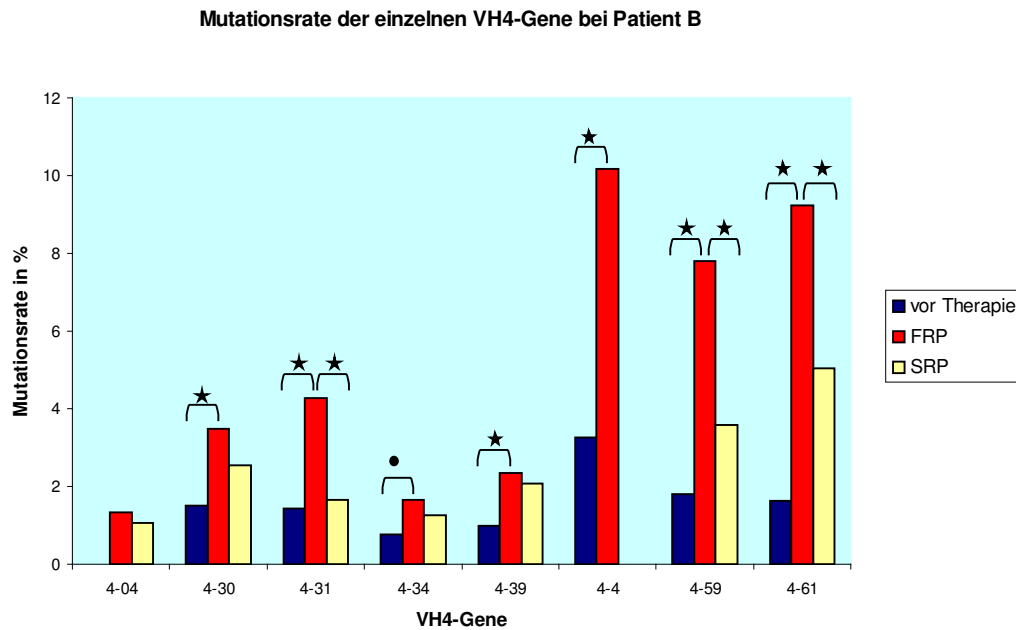


Abbildung 12: Mutationsrate der einzelnen  $V_{H4}$  Gene bei Patient B mit  $p < 0,0001$ ,  $\bullet p = 0,0082$

Die Ergebnisse hinsichtlich der Mutationsrate der einzelnen  $V_{H4}$ -Gene wichen bei Patient C deutlich von denen der anderen beiden Patienten ab (siehe Abbildung 13). Das Phänomen, das bei den Patienten A und B beobachtet wurde, nämlich, dass in der frühen Regenerationsphase die Mutationsrate in jedem einzelnen  $V_{H4}$ -Gen signifikant anstieg, konnte bei Patient C lediglich bei den  $V_{H4}$ -Genen  $V_{H4}$ -31 mit 5,9% versus 1,5% ( $p < 0,0001$ ) und  $V_{H4}$ -34 mit 5,0% versus 0,9% ( $p < 0,0001$ ) gefunden werden. In der späten Regenerationsphase ging die Mutationsrate der Gene  $V_{H4}$ -31,  $V_{H4}$ -34 und  $V_{H4}$ -59 wieder signifikant zurück.

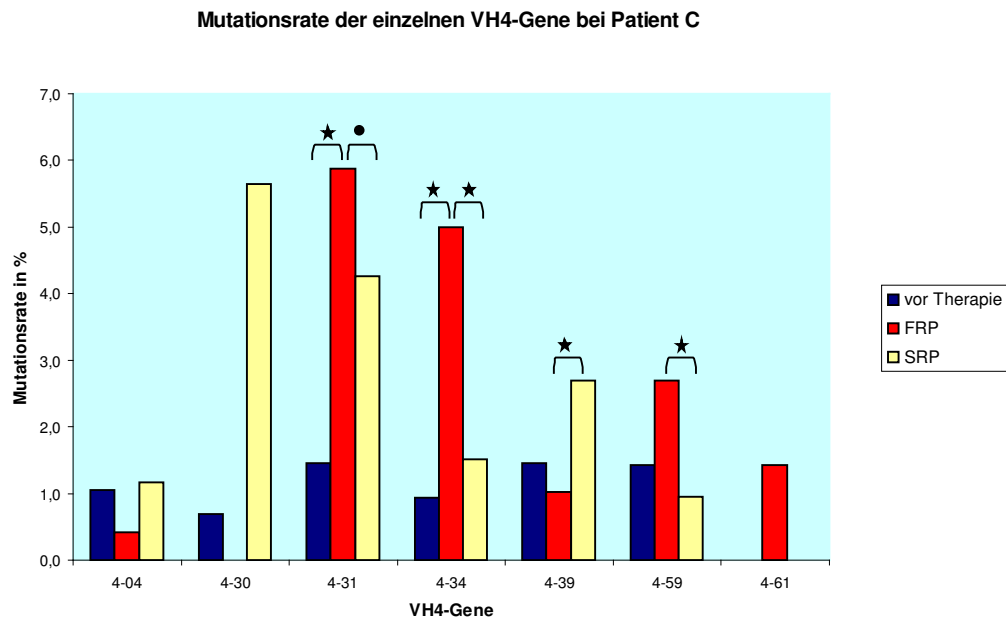


Abbildung 13: Mutationsrate der einzelnen  $V_{H4}$  Gene bei Patient C mit \* $p < 0,0001$ , • $p = 0,0092$

### 3.5 Analyse der Mutationsverteilung in hochmutierten Sequenzen

Für die weitere Analyse der Mutationsverteilung waren nur die hochmutierten Sequenzen relevant.

#### 3.5.1 Vergleich des Anteils an Mutationen in RGYW/ WRCY DNA-Motiven

Die Patienten A und C zeigten gegenüber dem Zeitpunkt vor Therapie in der frühen Regenerationsphase eine signifikante Zunahme an Mutationen in RGYW/ WRCY DNA-Motiven, mit 57,8% versus 41,9% ( $p = 0,0013$ ) bei Patient A und mit 54,6% versus 37,3% ( $p = 0,0013$ ) bei Patient C, welche auch während der späten Regenerationsphase noch persistierte. Bei Patient B hingegen war der Anstieg der Mutationsrate in den RGYW/WRCY DNA-Motiven mit 59,7% versus 53,0% im Vergleich zu den Patienten A und C

geringer und daher nicht signifikant. Allerdings wies Patient B bereits vor Therapie einen deutlich höheren Anteil an Mutationen in RGYW/ WRCY Motiven auf als die Patienten A und C (siehe Abbildung 14).

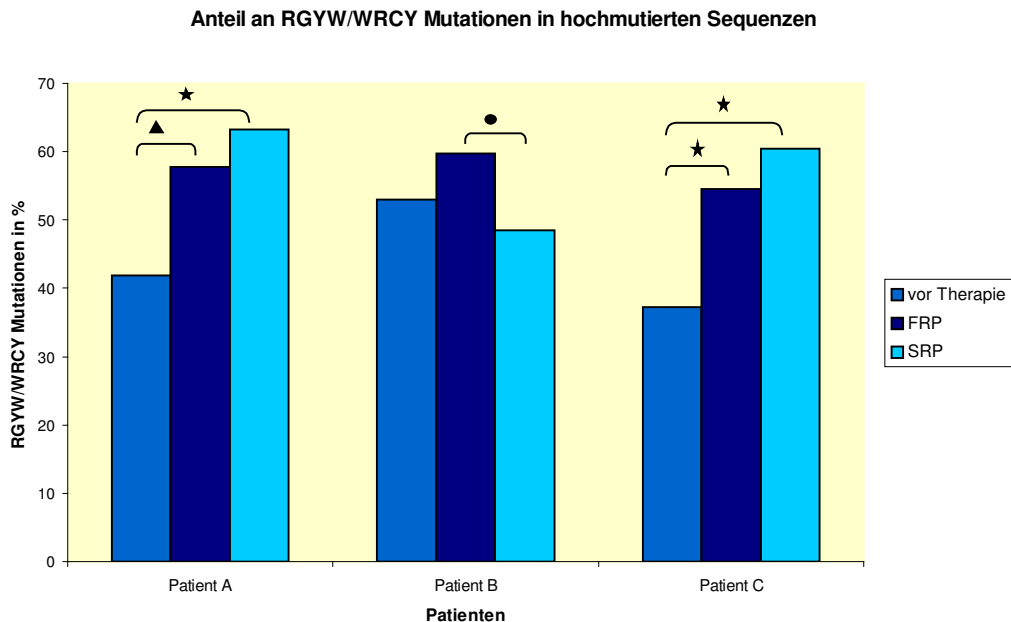


Abbildung 14: Anteil an RGYW/WRCY Mutationen mit ▲ $p=0,0012$ , \* $p<0,0001$ , • $p=0,0163$

### 3.5.2 Analyse des Verhältnisses von Replacement- zu Silent-Mutationen in den CDR Regionen

Bei Patient A war zu den verschiedenen Zeitpunkten eine stetige und signifikante Zunahme der R/S Ratio zu verzeichnen: 1,29 vor Therapie gegenüber 2,55 in der frühen Regenerationsphase ( $p=0,0013$ ), 2,55 versus 3,88 in der späten Regenerationsphase ( $p=0,0455$ ) und 1,29 vor Therapie gegenüber 3,88 in der späten Regenerationsphase ( $p<0,0001$ ). Bei Patient C wurde ebenso wie bei Patient A eine stetige Zunahme des R/S Verhältnisses beobachtet. Zu signifikanten Veränderungen kam es sowohl zum ersten Zeitpunkt nach Therapie mit 3,27 versus 1,25 zum Zeitpunkt vor Therapie ( $p<0,0001$ ), als auch während der späten Regenerationsphase mit 3,67



### 3. Ergebnisse

versus 1,25 zu dem Zeitpunkt vor der Therapie ( $p < 0,0001$ ) (siehe Abbildung 15). Bei Patient B fand sich ebenfalls eine Zunahme der R/S Ratio, allerdings erst während der späten Regenerationsphase.

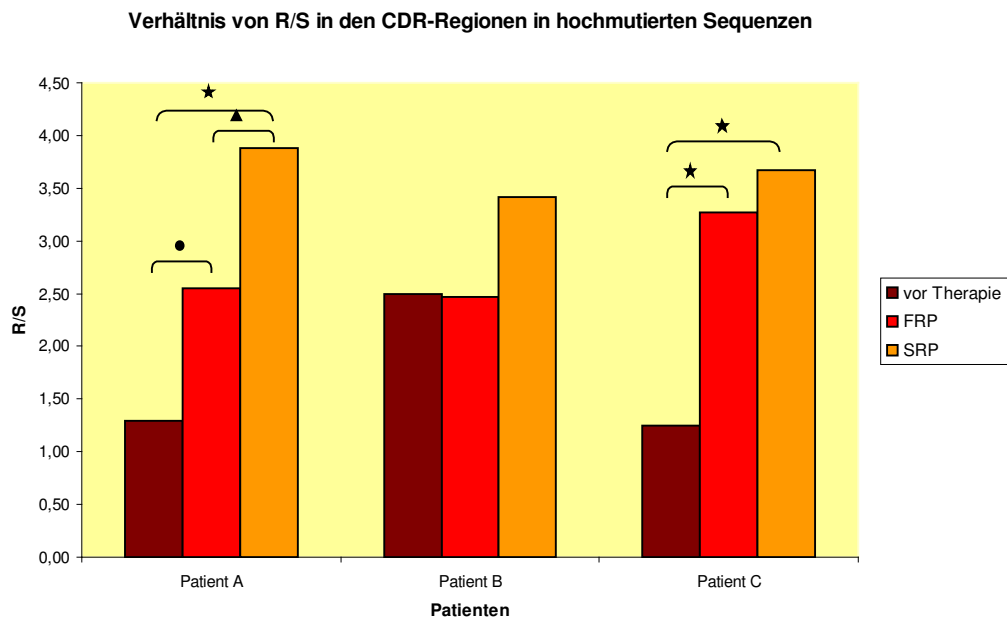


Abbildung 15: Verhältnis von R/S in den CDR-Regionen mit  $\wedge p = 0,0455$ ,  $* p < 0,0001$ ,  $\bullet p = 0,0013$

## 4. Diskussion

Die zentrale Rolle von B- Zellen in der Pathogenese und Therapie von Autoimmunerkrankungen hat in den letzten Jahren zu unterschiedlichen therapeutischen Ansätzen geführt, B- Zellen direkt oder indirekt zu targetieren. Ein Beispiel hierfür stellt der monoklonale anti- CD20 Antikörper Rituximab (Mabthera®) dar, der seit Juli 2006 zur Therapie der Rheumatoiden Arthritis zugelassen ist. Nach Gabe von Rituximab kommt es zu einer passageren, in der Regel sechs bis neun Monate anhaltenden B- Zelldepletion.

Die Anwendung einer B- Zell depletiven Therapie bei Autoimmunerkrankungen verfolgt hauptsächlich zwei Ziele: Zunächst soll durch B-Zelldepletion die proentzündliche Rolle der B- Zellen im Autoimmungeschehen ausgeschaltet werden und dadurch ein temporärer Stillstand in der Progression der Krankheit erreicht werden. Darüber hinaus ist aber auch vorstellbar, durch die Rituximab Therapie ein „reset“ des B- Zellpools zu erreichen mit Regeneration eines neuen B- Zell Repertoires, das nicht autoimmun geprägt ist.

Mann kann davon ausgehen, dass die B- Zell Regeneration nach Rituximabtherapie auf dem Pro B- Zell Stadium beginnt, da diese nicht das Oberflächenantigen CD20 exprimieren und somit nicht direkt depletiert werden. Im Pro B- Zell Stadium beginnen die Immunglobulinrezeptor Gene mit dem Rearrangement der Gene für die schwere Kette. Daher erscheint die Hypothese sinnvoll, dass nach einer anti- CD20 targetierten B- Zelldepletion die Immunglobulinen Rearrangements und Mutationsmechanismen in einer Art und Weise stattfinden, in der eine autoimmune Prägung noch nicht stattgefunden hat.

Die anti- CD20 vermittelte B- Zelldepletion stellt zwar ein vielversprechendes Therapieverfahren in der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis dar, derzeit ist allerdings noch wenig über das Regenerationsverhalten von B- Zellen nach Therapie mit Rituximab bekannt. Daher sollte in der Arbeit die Regenerationsphase insbesondere hinsichtlich der Modulation des Mutationsmusters des B- Zellrezeptors untersucht werden. Dazu wurde die Modulation des Immunglobulinrezeptor- Repertoires durch die anti- CD20 vermittelte B- Zelldepletion am Beispiel der V<sub>H4</sub>- Familie analysiert.

#### **4.1 Die Therapie- induzierte Modulation des V<sub>H4</sub>- Repertoires**

Zunächst wurde durch eine Längsschnittanalyse des V<sub>H4</sub>- Repertoires von drei mit Rituximab behandelten Patienten (A-C) untersucht, ob die B- Zelldepletion eine Modulation der regenerierenden B- Zellen induziert. Die Analyse erfolgte zu drei Zeitpunkten: Unmittelbar vor der Therapie, in der frühen Regenerationsphase und in der späten Regenerationsphase.

Neben der Regeneration eines polyklonalen Genrepertoires, welches eine mit dem Zeitpunkt vor der Therapie vergleichbare Gensegmentverteilung zeigte, beobachteten wir eine diskrete Modulation einzelner V<sub>H4</sub>- Gene. Wir untersuchten die Präsenz der Mini Gene V<sub>H4</sub>-34 und V<sub>H4</sub>-39, welche in der Fachliteratur bereits in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen gebracht worden sind [90,22]. Vor allem konnte das Mini Gen V<sub>H4</sub>-34 bereits wiederholt in Korrelation mit der Krankheitsaktivität bei SLE nachgewiesen werden [80,85,86]. Vor der Therapie stellten wir bei den drei Patienten eine Überexpression dieser Mini Gene fest. Das vor der Mabthera<sup>®</sup>- Therapie bei allen drei Patienten beobachtete bevorzugte Auftreten von V<sub>H4</sub>-39 stimmt mit dem von Berek *et al.* publizierten häufigen Auftreten von V<sub>H4</sub>-39 bei Rheumatoider Arthritis überein [22].

Auf die B- Zelldepletion folgte bei den drei Patienten ein signifikanter Rückgang des relativen Anteils der V<sub>H</sub>4-39 Gene und bei Patient A auch der V<sub>H</sub>4-34 Gene. Zudem konnte im Rahmen einer anderen in unserem Labor durchgeführten Studie bei einem an Rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten während der frühen Regenerationsphase eine reduzierte Verwendung der V<sub>H</sub>4-34 Gene nach Rituximab Therapie beobachtet werden [91].

Unsere Daten sprechen somit für eine Rituximab- induzierte Modulation dieser Gensegmente, welche möglicherweise in die Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis involviert sein könnten. Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen ist eine anti- CD20 vermittelte Modulation des B- Zell Repertoires nachgewiesen worden. Beim SLE wurde eine große Fraktion von anti- DNA Antikörpern gefunden, welche den 9G4 Idiotyp exprimieren. Die autoreaktiven B- Zellen mit diesem 9G4 Idiotyp zeigten eine Überexpression von V<sub>H</sub>4-34, welche hauptsächlich im Plasmazell-Kompartiment vertreten war [92]. Die B- Zelldepletion mit Rituximab führte im regenerierenden Immunglobulin- Repertoire zu einer Herunterregulierung der 9G4 exprimierenden anti-ds DNA Antikörper. Demnach scheint die B- Zell depletive Therapie mit Rituximab dazu imstande zu sein, das regenerierende B- Zell Repertoire in verschiedenen Autoimmunerkrankungen zu modulieren.

#### **4.2 Die Mutationsanalyse der V<sub>H</sub>4-Gene**

Das Hauptziel dieser Studie war, prospektiv das Mutationsmuster des Ig- Rezeptors nach der B- Zelldepletion in den regenerierenden B- Zellen zu untersuchen. Hierfür wurde eine der größeren V<sub>H</sub>- Familien, die V<sub>H</sub>4- Familie, hinsichtlich ihres Mutationsmusters analysiert. Es erfolgte eine detaillierte Analyse jedes einzelnen V<sub>H</sub>4- Gens zu den drei Zeitpunkten, die bereits genannt worden sind

Zuerst fiel uns in der frühen Regenerationsphase gegenüber dem Zeitpunkt vor der Therapie ein signifikanter Anstieg der Gesamtmutationsrate auf, den wir bei jedem einzelnen der drei Patienten beobachten konnten (3,16 versus 1,59, 2,63 versus 1,29 und 2,20 versus 1,19).

Daher führten wir eine Analyse der Mutationsverteilung in den einzelnen V<sub>H</sub>4-Genen durch. Diese Untersuchung legte offen, dass der periphere B-Zellpool aus zwei verschiedenen Populationen besteht, nämlich einer niedrig mutierten und einer hochmutierten B- Zellpopulation.

Rearrangements mit weniger als neun Mutationen wurden als niedrig mutiert definiert, diejenigen mit neun oder mehr Mutationen als hochmutiert. Vor der Therapie war der Anteil der Ig- Rearrangements mit neun oder mehr Mutationen gering (18%, 5% und 6%). Während der frühen Regenerationsphase wurde bei allen drei Patienten ein deutlich gesteigener Anteil an hochmutierten Ig- Rearrangements nachgewiesen (75%, 40% und 53%). Dies erklärt den starken Anstieg der Gesamtmutationsrate.

Durch eine von einem Mitarbeiter durchgeführte Immunophänotypisierung wurden die hochmutierten Sequenzen als CD38<sup>hi</sup>, IgD<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup> Plasmazellen [87,88] identifiziert .Die frühe Regenerationsphase ist somit durch ein Überwiegen hochmutierter Plasmazellen charakterisiert (siehe Tabelle 4), welche nicht direkt durch die Therapie targetiert werden, da sie nicht den Oberflächenmarker CD20 exprimieren [93].

<b>MUTATIONSVERTEILUNG</b>	<b>Vor Therapie</b>	<b>FRP</b>	<b>SRP</b>
<b>Patient A</b>			
B-Zellen mit >9 Mutationen (%)	18	75	35
Anteil an Plasmazellen (%)	17	75	27
<b>Patient B</b>			
>9 Mutationen (%)	5	40	28
Anteil an Plasmazellen (%)	11	39	33
<b>Patient C</b>			
>9 Mutationen (%)	6	53	21
Anteil an Plasmazellen (%)	14	49	16

Tabelle 4: Anteil an Plasmazellen (CD38hi,IgD-,CD19+,CD27+,CD20-) und hochmutierten Sequenzen

Interessanterweise findet man während der Phase der B- Zelldepletion keine Plasmazellen im peripheren Blut, sondern erst während der frühen Regenerationsphase. Bislang gibt es nur Spekulationen darüber, dass die Plasmazellen sich während der B- Zelldepletion in andere Nischen, zum Beispiel in das Knochenmark oder in sekundäre lymphatische Organe wie Lymphknoten und Milz zurückziehen und während der frühen Regenerationsphase im peripheren Blut rezirkulieren. Kürzlich wurde in einer Studie von Hoyer *et al.* [94] die Hypothese aufgestellt, dass sich langlebige Plasmazellen zusätzliche Nischen wie die Nieren oder inflammatorisches Gewebe zum Überleben suchen. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass diese früh zirkulierenden Plasmazellen neu generierte Zellen sind, in denen in kurzer Zeit intensive somatische Hypermutationen stattgefunden haben, so dass sie sehr rasch zu Plasmazellen ausdifferenziert sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CD20 negative Plasmazellen in der Phase der B- Zelldepletion auch vermindert rezirkulieren und zum Zeitpunkt der beginnenden peripheren B- Zellrepopulation mit als erste B-

Zellen in der Peripherie erscheinen und zu diesem Zeitpunkt relativ den größten Anteil der peripheren B- Zellen ausmachen. Es ist unklar, ob es sich dabei um undepletierte, langlebige Plasmazellen oder neu generierte Zellen handelt.

### **4.3 Die Therapie- induzierte qualitative Modulation der Plasmazellen**

Im weiteren Verlauf unserer Studie stellten wir die Hypothese auf, dass wahrscheinlich auch die hochmutierten Plasmazellen durch Rituximab moduliert werden, obwohl sie als CD20 negative Zellen nicht direkt durch die Therapie targetiert werden.

Um diese Behauptung zu stützen, untersuchten wir die hochmutierten Ig-Rearrangements auf Rituximab- induzierte Veränderungen. Zu diesem Zweck analysierten wir speziell die Motive auf den Plasmazell- Ig-Sequenzen, innerhalb derer die Mutationen lokalisiert sind. Diese Motive werden als "Hotspots" bezeichnet. Diese Hotspots sind RGYW/WRCY DNA Motive, in denen bei gesunden Individuen bevorzugt T- Zell abhängige somatische Hypermutationen stattfinden [59,95].

Dementsprechend findet man bei autoimmunen B- Zellen ein vermindertes Targeting an Mutationen in RGYW/WRCY Motiven. Brezinschek *et al.* konnten zum Beispiel durch eine Analyse der schweren Kette des Ig-Rezeptors von Hyper- IgM Kindern, bei denen die klassische CD40-CD40L Interaktion beeinträchtigt ist, ein reduziertes Targeting an Mutationen in RGYW/WRCY Motiven nachweisen. Damit zeigten sie indirekt, dass Mutationen in den RGYW/WRCY Hotspot Motiven in kritischer Weise von T-Zell- B- Zell Interaktionen abhängig sind [96]. Inzwischen gibt es in der Literatur vermehrt Hinweise darauf, dass bei Autoimmunität häufiger T- Zell unabhängige Mutationen außerhalb von Keimzentren stattfinden, was sich in einem reduzierten Targeting von Mutationen in RGYW/WRCY Motiven

widerspiegelt [97,98]. Diese T- Zell unabhängigen Mutationen finden laut Wiliam *et al.* möglicherweise in der Marginalzone statt [97].

In unserer Studie stellten wir fest, dass vor der Therapie relativ wenige Mutationen in den RGYW/WRCY DNA Motiven auftraten, während in der frühen Regenerationsphase bei den Patienten A und C ein vermehrtes Targeting an Mutationen in RGYW/WRCY Motiven nachgewiesen wurde (58% versus 42% bei Patient A, und 55% versus 37% bei Patient C). Bei Patient B war der Anteil an Mutationen in RGYW/WRCY Motiven bereits vor Therapie vergleichsweise hoch (53%), so dass es hier zu keinem signifikanten Anstieg kam (60% versus 53% bei Patient B). Unsere Ergebnisse unterstützen somit die Annahme, dass bei aktiver Rheumatoider Arthritis mehr T- Zell unabhängige Mutationen in den Plasmazellen stattgefunden haben. Die Phase nach der B- Zelldepletion war im hochmutierten B- Zellpool durch erhöhtes Targeting von Mutationen in den RGYW/WRCY Motiven geprägt. Dies spricht für einen Repertoire Shift zu mehr T- Zell abhängigen B- Zell Mutationen– ein Zustand, wie er bei gesunden Individuen beobachtet wird.

Um die Hypothese einer Rituximab- induzierten qualitativen Modulation des Plasmazellkompartimentes weiter zu untermauern, untersuchten wir die Plasmazellen auch hinsichtlich Selektion im aktiven B- Zellrepertoire mit Einfluss auf die Antigenbindungskapazität. Diese kann indirekt über die R/S Ratio in den CDR- Regionen bestimmt werden. T- Zell abhängige Keimzentrumsreaktionen führen zu einer positiven Selektion des Antikörperrepertoires und weisen dabei einen höheren Anteil an Replacement- Mutationen in den CDR- Regionen auf. Ein niedriger R/S Quotient, der durch eine höhere Anzahl an Silent- Mutationen zustande kommt, gibt Hinweise darauf, dass die Mutationen eher auf T- Zell unabhängigem Wege induziert worden sind.



In der Literatur ist bereits wiederholt über niedrige R/S Ratios in den CDR-Regionen sowie über negative Selektion von Replacement- Mutationen bei Autoimmunität berichtet worden [99,100]. Zudem wurde bereits mehrfach eine positive Selektion von Replacement- Mutationen und eine Elimination von Silent- Mutationen bei Gesunden beschrieben [59,60,101].

Daher untersuchten wir prospektiv die R/S Ratio in den CDR- Regionen der hochmutierten Ig- Rearrangements auf Rituximab- induzierte qualitative Veränderungen.

Vor der Rituximab Therapie war die R/S Ratio bei den drei Patienten relativ niedrig (1,30, 2,50, 1,30). In der frühen Regenerationsphase wurde dann zumindest bei den Patienten A und C eine signifikante Zunahme der R/S Ratio beobachtet (2,60, 2,50, 3,30). Bei Patient B war der R/S Quotient bereits vor Therapie vergleichsweise hoch (2,50), so dass es hier zu keinem weiteren signifikanten Anstieg kam. Darüber hinaus nahm die R/S Ratio in der späten Regenerationsphase gegenüber der frühen Regenerationsphase bei allen drei Patienten noch weiter zu (3,90, 3,40 und 3,70 ).

Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass durch eine passagere B-Zelldepletion mit dem anti- CD20 Antikörper Rituximab auch der Pool hochmutierter peripherer Plasmazellen moduliert wird und das genetische Imprinting des B- Zell Rezeptors hin zu einem Zustand, wie man ihn bei Gesunden findet, geändert wird.

## 5. Zusammenfassung

Die zentrale Rolle von B- Zellen in der Pathogenese und Therapie von Autoimmunerkrankungen hat in den letzten Jahren zu unterschiedlichen therapeutischen Ansätzen geführt, B- Zellen direkt oder indirekt zu targetieren.

Der bisher effektivste Ansatz stellt der monoklonale anti- CD20 Antikörper Rituximab (Mabthera®) dar, der seit Juli 2006 zur Therapie der aktiven Rheumatoiden Arthritis zugelassen ist. Nach Gabe von Rituximab kommt es zu einer passageren, in der Regel sechs bis neun Monate anhaltenden peripheren B- Zelldepletion.

Die anti- CD20 vermittelte B- Zelldepletion stellt zwar ein vielversprechendes Therapieverfahren in der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis dar, derzeit ist allerdings noch wenig über das Regenerationsverhalten von B- Zellen nach Therapie mit Rituximab bekannt. Daher wurde in dieser Arbeit die B-Zellrepopulation insbesondere hinsichtlich der Modulation des Mutationsmusters des B- Zellrezeptors untersucht. Dazu wurde die V<sub>H</sub>4-Familie des Immunglobulinrezeptors- prospektiv vor und nach anti- CD20 vermittelter B- Zelldepletion analysiert.

Bei drei Patienten (A-C) wurden die Ig-V<sub>H</sub>4 Gene aus genomischer DNA peripherer B- Zellen amplifiziert, subkloniert und sequenziert. Die Analyse erfolgte zu drei verschiedenen Zeitpunkten: unmittelbar vor der B- Zell depletiven Therapie und zu zwei weiteren Zeitpunkten während der Regenerationsphase. Der erste Zeitpunkt nach der Therapie bezieht sich auf den frühesten Zeitpunkt nach der Phase der B- Zelldepletion, zu dem wieder eine signifikante Menge peripherer B- Zellen nachweisbar war. Dieser wurde durch das Auftreten von einem B- Zell Anteil von 1,0 bis 1,3% im peripheren Blut definiert. Dies wurde in der Regel fünf bis sieben Monate nach Beginn der Rituximab Therapie erreicht. Der zweite Zeitpunkt nach der Therapie

repräsentiert die späte Regenerationsphase und wurde etwa drei Monate später gewählt, bei einem B- Zell Anteil von 1,5 bis 2,0%.

Insgesamt wurden 376 produktive Sequenzen ausgewertet. Bei den drei Patienten wurde jeweils ein polyklonales V<sub>H</sub>4 Repertoire regeneriert, das wie bereits vor der Depletion durch sechs bis sieben Mini Gene aus der V<sub>H</sub>4-Familie: V<sub>H</sub>4-04, V<sub>H</sub>4-30, V<sub>H</sub>4-31, V<sub>H</sub>4-34, V<sub>H</sub>4-39, V<sub>H</sub>4-59, V<sub>H</sub>4-61 zusammengesetzt war.

Die B- Zell depletive Therapie bewirkte verschiedene Veränderungen, zum einen in Bezug auf die Mutationshäufigkeit und die Verwendung einzelner V<sub>H</sub>4- Gene, zum anderen hinsichtlich der Verteilung der Mutationen in RGYW/WRCY Hotspot Motiven. Mini Gene wie V<sub>H</sub>4-34 und V<sub>H</sub>4-39, die in Verbindung mit Autoimmunität stehen, waren vor Einleitung der Therapie relativ überexprimiert. Die Behandlung mit Rituximab führte bei allen drei Patienten zu einer Veränderung des Repertoires der regenerierenden B-Zellen mit einer reduzierten Benutzung der V<sub>H</sub>4-39 Gene, außerdem bei Patient A zusätzlich der V<sub>H</sub>4-34 Gene.

Tief greifende Veränderungen fanden sich während der frühen Regenerationsphase durch den Nachweis einer rezirkulierenden Population hochmutierter B- Zellen, die in einer durchgeführten Immunophänotypisierung als CD38<sup>hi</sup>, IgD<sup>-</sup>, CD27<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> CD20<sup>-</sup> Plasmazellen identifiziert wurden.

Da Plasmazellen kein CD20 Molekül exprimieren, werden sie durch eine anti-CD20 vermittelte Therapie nicht direkt eliminiert. Sie zirkulieren während der Phase der B- Zelldepletion aber auch nicht im peripheren Blut. Interessanterweise sind sie in der frühen Regenerationsphase in der Peripherie als erste mit hohem relativem Anteil nachweisbar. Daher wurde untersucht, ob auch Plasmazellen durch die Therapie moduliert werden, obwohl sie durch Rituximab nicht direkt targetiert werden. Hierfür wurden die

Sequenzen mit hochmutiertem Ig- Rezeptor (>9 Mutationen/Sequenz) im Verlauf einer detaillierten Analyse zugeführt. Dabei wurde insbesondere das Mutationsmuster in RGYW/WRCY Hotspot Motiven und in den CDR-Regionen untersucht.

Die Analyse der Mutationshäufigkeit in RGYW/WRCY Hotspot Motiven erlaubt eine Abschätzung, in wieweit die somatische Hypermutation der B-Zellen durch T- Zell abhängige Differenzierung erfolgte. Die als Plasmazellen identifizierten hochmutierten Sequenzen zeigten vor der Therapie Charakteristika einer aktiven Erkrankung mit einem verminderten Targeting der RGYW/WRCY Motive. Dagegen zeigte sich in den rezirkulierenden Plasmazellen während der frühen Regenerationsphase ein zunehmendes Targeting der RGYW/WRCY Motive. Dies spricht für einen Repertoire Shift zu mehr T- Zell abhängigen B- Zell Mutationen. Ein Zustand, wie er bei Gesunden beobachtet wird.

Um die Hypothese einer Rituximab- induzierten Modulation des Plasmazellkompartimentes weiter zu untermauern, wurde der R/S Quotient, d.h. das Verhältnis von Silent zu Replacement Mutationen in den hypervariablen Regionen (CDRs) der hochmutierten Plasmazell-Ig Sequenzen bestimmt.

Die Affinität des Plasmazell Ig-Rezeptors bezüglich Antigenbindung und Selektion kann indirekt über die Analyse der R/S Ratio der CDR- Regionen analysiert werden. T- Zell abhängige Keimzentrumsreaktionen mit positiver Antigenselektion sind durch einen höheren Anteil an Replacement Mutationen in den CDRs gekennzeichnet.

Interessanterweise fanden sich in der Regenerationsphase signifikant erhöhte R/S Ratios in den rezirkulierenden Plasmazellen. In der späten Regenerationsphase war darüber hinaus eine weitere Zunahme des R/S Verhältnisses zu verzeichnen.

Die signifikante Zunahme an Replacement Mutationen in den CDR-Regionen, welche sich in einer Zunahme des R/S Verhältnisses widerspiegelt, kann als Entwicklung des Ig- Repertoires durch positive Antigenselektion interpretiert werden und weist somit eine Rituximab-induzierte Veränderung auf, wie man sie sonst bei gesunden Individuen findet.

Zusammenfassend zeigt unsere Studie, dass die transiente anti- CD20 vermittelte B- Zelldepletion auch zu einer indirekten Modulation des Plasmazellkompartimentes führt. Insbesondere werden postrekombinatorische Imprints des B- Zell Rezeptors, wie somatische Hypermutation und Antigen Selektion, verändert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Autoimmunität bei der Rheumatoiden Arthritis eine Rolle spielen. Zusätzlich kann die Modulation des genetischen Imprints der Ig Rezeptoren bei der Rheumatoiden Arthritis eventuell als möglicher Biomarker entwickelt werden, um ein Ansprechen auf die Therapie vorherzusagen. Dies bedarf weiterer Untersuchungen, um tiefer greifende Einblicke in Prozesse zu erlangen, die durch zukünftige Therapien beeinflussbar werden.

## 6. Abkürzungen

CRP	C- reaktives Protein
DAS28	Disease Activity Score
FRP	Frühe Regenerationsphase
SRP	Späte Regenerationsphase
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
PBMCS	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
Rpm	Rotations per minute
RPMI- Medium	Roswell Park Memorial Institute- Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
TAE	Tris- Acetat- EDTA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
LB- Medium	Luria Bertani- Medium
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
DNA	Desoxyribonucleinsäure
cDNA	Komplementäre Desoxyribonucleinsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
bp	Basenpaare
V <sub>H</sub>	(V-) Variables Segment der schweren Kette
D	(D-) Diversity Segment
J <sub>H</sub>	(J-) Joining Segment der schweren Kette
Ig	Immunglobulin
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Complementary Determining Region
FR	Framework Region
R/S	Verhältnis von Replacement- zu Silent- Mutationen

## 7. Literaturverzeichnis

1. Looney, R. J.; Anolik, J.; Sanz, I. B cells as therapeutic targets for rheumatic diseases. *Current opinion in rheumatology* **2004**, *16* (3) 180–185.
2. Mosmann, T. R.; Sad, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today* **1996**, *17* (3) 138–146.
3. Brezinschek, H. P.; Brickmann, K.; Yazdani-Biuki, B.; Dorner, T.; Graninger, W. B.; Brezinschek, R. I. Treatment of rheumatoid arthritis in the 21st century: targeting B-lymphocytes. *Wiener medizinische Wochenschrift* **2006**, *156* (1-2) 61–67. doi:10.1007/s10354-005-0241-x.
4. Silverman, G. J.; Carson, D. A. Roles of B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* **2003**, *5 Suppl 4*S1-6. doi:10.1186/ar1010.
5. Schellekens, G. A.; Visser, H.; de Jong, B. A.; van den Hoogen, F. H.; Hazes, J. M.; Breedveld, F. C.; van Venrooij, W. J. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis and rheumatism* **2000**, *43* (1) 155–163. doi:10.1002/1529-0131(200001)43:1<155::AID-ANR20>3.0.CO;2-3.
6. Duddy, M. E.; Alter, A.; Bar-Or, A. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *Journal of immunology* **2004**, *172* (6) 3422–3427.
7. Kotzin, B. L. The role of B cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* **2005**, *73*14-8; discussion 29-30.
8. Takemura, S.; Klimiuk, P. A.; Braun, A.; Goronzy, J. J.; Weyand, C. M. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *Journal of immunology* **2001**, *167* (8) 4710–4718.
9. Porakishvili, N.; Mageed, R.; Jamin, C.; Pers, J. O.; Kulikova, N.; Renaudineau, Y.; Lydyard, P. M.; Youinou, P. Recent progress in the

- understanding of B-cell functions in autoimmunity. *Scandinavian journal of immunology* **2001**, 54 (1-2) 30–38.
10. Arend, W. P. The pathophysiology and treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **1997**, 40 (4) 595–597. doi:10.1002/1529-0131(199704)40:4<595::AID-ART1>3.0.CO;2-O.
11. Fleischmann, R. M. Is there a need for new therapies for rheumatoid arthritis? *The Journal of rheumatology* **2005**, 733-7; discussion 29-30.
12. Lee, D. M.; Weinblatt, M. E. Rheumatoid arthritis. *Lancet* **2001**, 358 (9285) 903–911.
13. Deutsches Ärzteblatt, Jg. 98, Heft 16, 20.April 2001, S.1059
14. Rat, A. C.; Boissier, M. C. Rheumatoid arthritis: direct and indirect costs. *Joint, bone, spine* **2004**, 71 (6) 518–524. doi:10.1016/j.jbspin.2004.01.003.
15. Janossy, G.; Panayi, G.; Duke, O.; Bofill, M.; Poulter, L. W.; Goldstein, G. Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet* **1981**, 2 (8251) 839–842.
16. Olsen, N. J.; Stein, C. M. New drugs for rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine* **2004**, 350 (21) 2167–2179. doi:10.1056/NEJMra032906.
17. Goldblatt, F.; Isenberg, D. A. New therapies for rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental immunology* **2005**, 140 (2) 195–204. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02744.x.
18. Solau-Gervais, E.; Laxenaire, N.; Cortet, B.; Dubucquoi, S.; Duquesnoy, B.; Flipo, R. M. Lack of efficacy of a third tumour necrosis factor alpha antagonist after failure of a soluble receptor and a monoclonal antibody. *Rheumatology* **2006**, 45 (9) 1121–1124. doi:10.1093/rheumatology/kel054.



19. Schiff, M. H. Lack of response to anakinra in rheumatoid arthritis following failure of tumor necrosis factor alpha blockade: comment on the article by Buch et al. *Arthritis and rheumatism* **2005**, *52* (1) 364-5; author reply 365. doi:10.1002/art.20769.
20. den, Broeder A A.; Jong, E. de; Franssen, M. J.; Jeurissen, M. E.; Flendrie, M.; van, denHoogen F H. Observational study on efficacy, safety, and drug survival of anakinra in rheumatoid arthritis patients in clinical practice. *Annals of the rheumatic diseases* **2006**, *65* (6) 760–762. doi:10.1136/ard.2004.033662.
21. Yamanishi, Y.; Firestein, G. S. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of synoviocytes. *Rheumatic diseases clinics of North America* **2001**, *27* (2) 355–371.
22. Kim, H. J.; Berek, C. B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis research* **2000**, *2* (2) 126–131.
23. Dorner, T.; Burmester, G. R. The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic targets. *Current opinion in rheumatology* **2003**, *15* (3) 246–252.
24. Kneitz, C.; Wilhelm, M.; Tony, H. P. Effective B cell depletion with rituximab in the treatment of autoimmune diseases. *Immunobiology* **2002**, *206* (5) 519–527.
25. Kneitz, C.; Wilhelm, M.; Tony, H. P. Improvement of refractory rheumatoid arthritis after depletion of B cells. *Scandinavian journal of rheumatology* **2004**, *33* (2) 82–86.
26. Edwards, J. C.; Szczepanski, L.; Szechinski, J.; Filipowicz-Sosnowska, A.; Emery, P.; Close, D. R.; Stevens, R. M.; Shaw, T. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine* **2004**, *350* (25) 2572–2581. doi:10.1056/NEJMoa032534.

27. Emery, P.; Fleischmann, R.; Filipowicz-Sosnowska, A.; Schechtman, J.; Szczepanski, L.; Kavanaugh, A.; Racewicz, A. J.; van, Vollenhoven R F.; Li, N. F.; Agarwal, S.; 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 and rheumatism* **2006**, *54* (5) 1390–1400. doi:10.1002/art.21778.
28. Cohen, S. B.; Emery, P.; Greenwald, M. W.; Dougados, M.; Furie, R. A.; Genovese, M. C.; Keystone, E. C.; Loveless, J. E.; Burmester, G. R.; Cravets, M. W.; 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 and rheumatism* **2006**, *54* (9) 2793–2806. doi:10.1002/art.22025.
29. Roche- Pressemeldung am 18.07.2006 unter [www.roche.com](http://www.roche.com)
30. Grillo-Lopez, A. J. Rituximab: an insider's historical perspective. *Seminars in oncology* **2000**, *27* (6 Suppl 12) 9–16.
31. Golay, J.; Zaffaroni, L.; Vaccari, T.; Lazzari, M.; Borleri, G. M.; Bernasconi, S.; Tedesco, F.; Rambaldi, A.; Introna, M. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood* **2000**, *95* (12) 3900–3908.
32. Manches, O.; Lui, G.; Chaperot, L.; Gressin, R.; Molens, J. P.; Jacob, M. C.; Sotto, J. J.; Leroux, D.; Bensa, J. C.; Plumas, J.; et al. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* **2003**, *101* (3) 949–954. doi:10.1182/blood-2002-02-0469.
33. Johnson, P.; Glennie, M. The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells. *Seminars in oncology* **2003**, *30* (1 Suppl 2) 3–8. doi:10.1053/sonc.2003.50025.

34. Chambers, S. A.; Isenberg, D. Anti-B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases. *Lupus* **2005**, *14* (3) 210–214.
35. Roll P.; Palanichamy, A.; Kneitz, C.; Dorner, T.; Tony, H. P. Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **2006**, *54* (8) 2377–2386. doi:10.1002/art.22019.
36. Leandro, M. J.; Cambridge, G.; Edwards, J. C.; Ehrenstein, M. R.; Isenberg, D. A. B-cell depletion in the treatment of patients with systemic lupus erythematosus: a longitudinal analysis of 24 patients. *Rheumatology* **2005**, *44* (12) 1542–1545. doi:10.1093/rheumatology/kei080.
37. Looney, R. J.; Anolik, J. H.; Campbell, D.; Felgar, R. E.; Young, F.; Arend, L. J.; Sloand, J. A.; Rosenblatt, J.; Sanz, I. B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis and rheumatism* **2004**, *50* (8) 2580–2589. doi:10.1002/art.20430.
38. Silverman, G. J.; Weisman, S. Rituximab therapy and autoimmune disorders: prospects for anti-B cell therapy. *Arthritis and rheumatism* **2003**, *48* (6) 1484–1492. doi:10.1002/art.10947.
39. Cragg, M. S.; Walshe, C. A.; Ivanov, A. O.; Glennie, M. J. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Current directions in autoimmunity* **2005**, 8140–174. doi:10.1159/000082102.
40. Anolik, J. H.; Campbell, D.; Felgar, R. E.; Young, F.; Sanz, I.; Rosenblatt, J.; Looney, R. J. The relationship of FcγRIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* **2003**, *48* (2) 455–459. doi:10.1002/art.10764.
41. Edwards, J. C.; Szczepanski, L.; Szechinski, J.; Filipowicz-Sosnowska, A.; Emery, P.; Close, D. R.; Stevens, R. M.; Shaw, T. Efficacy of B-cell-targeted

- therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine* **2004**, *350* (25) 2572–2581. doi:10.1056/NEJMoa032534.
42. Vita, S. de; Zaja, F.; Sacco, S.; Candia, A. de; 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 and rheumatism* **2002**, *46* (8) 2029–2033. doi:10.1002/art.10467.
43. Anolik, J. H.; Barnard, J.; Cappione, A.; Pugh-Bernard, A. E.; Felgar, R. E.; Looney, R. J.; Sanz, I. Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* **2004**, *50* (11) 3580–3590. doi:10.1002/art.20592.
44. Porter, R. R. Lecture for the Nobel Prize for physiology or medicine 1972: Structural studies of immunoglobulins. 1972. *Scandinavian journal of immunology* **1991**, *34* (4) 381–389.
45. Miller, J. F. A scientific odyssey: unravelling the secrets of the thymus. *The Medical journal of Australia* **2005**, *183* (11-12) 582–584.
46. Tonegawa, S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **1983**, *302* (5909) 575–581.
47. Lefranc, M. P. Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes. *Experimental and clinical immunogenetics* **2001**, *18* (2) 100–116.
48. Lefranc, M. P. Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes. *Experimental and clinical immunogenetics* **2001**, *18* (3) 161–174.
49. Lefranc, M. P. Nomenclature of the human immunoglobulin lambda (IGL) genes. *Experimental and clinical immunogenetics* **2001**, *18* (4) 242–254.
50. Zhang, Z.; Burrows, P. D.; Cooper, M. D. The molecular basis and biological significance of VH replacement. *Immunological reviews* **2004**, *197* 231–242.

51. Janeway jr., C.A., Travers, P., Walport M., Shlomchik, M.J., *Immunologie*. 5. a. ed. 2002: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
52. Oettinger, M. A.; Schatz, D. G.; Gorka, C.; Baltimore, D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* **1990**, *248* (4962) 1517–1523.
53. Grawunder, U.; Zimmer, D.; Kulesza, P.; Lieber, M. R. Requirement for an interaction of XRCC4 with DNA ligase IV for wild-type V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in vivo. *The Journal of biological chemistry* **1998**, *273* (38) 24708–24714.
54. Nishioka, Y.; Lipsky, P. E. The role of CD40-CD40 ligand interaction in human T cell-B cell collaboration. *Journal of immunology* **1994**, *153* (3) 1027–1036.
55. Klein, U.; Goossens, T.; Fischer, M.; Kanzler, H.; Braeuninger, A.; Rajewsky, K.; Kuppers, R. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunological reviews* **1998**, *162* 261–280.
56. Bross, L.; Muramatsu, M.; Kinoshita, K.; Honjo, T.; Jacobs, H. DNA double-strand breaks: prior to but not sufficient in targeting hypermutation. *The Journal of experimental medicine* **2002**, *195* (9) 1187–1192.
57. Neuberger, M. S.; Milstein, C. Somatic hypermutation. *Current opinion in immunology* **1995**, *7* (2) 248–254.
58. Honjo, T.; Kinoshita, K.; Muramatsu, M. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annual review of immunology* **2002**, *20* 165–196. doi:10.1146/annurev.immunol.20.090501.112049.
59. Dorner, T.; Foster, S. J.; Farner, N. L.; Lipsky, P. E. Somatic hypermutation of human immunoglobulin heavy chain genes: targeting of RGYW motifs on

- both DNA strands. *European journal of immunology* **1998**, 28 (10) 3384–3396.
60. Dorner, T.; Foster, S. J.; Brezinschek, H. P.; Lipsky, P. E. Analysis of the targeting of the hypermutational machinery and the impact of subsequent selection on the distribution of nucleotide changes in human VHDJH rearrangements. *Immunological reviews* **1998**, 162161–171.
61. Inlay, M. A.; Gao, H. H.; Odegard, V. H.; Lin, T.; Schatz, D. G.; Xu, Y. Roles of the Ig kappa light chain intronic and 3' enhancers in Igk somatic hypermutation. *Journal of immunology* **2006**, 177 (2) 1146–1151.
62. Komori, A.; Xu, Z.; Wu, X.; Zan, H.; Casali, P. Biased dA/dT somatic hypermutation as regulated by the heavy chain intronic iEmu enhancer and 3'Ealpha enhancers in human lymphoblastoid B cells. *Molecular immunology* **2006**, 43 (11) 1817–1826. doi:10.1016/j.molimm.2005.10.018.
63. Odegard, V. H.; Schatz, D. G. Targeting of somatic hypermutation. *Nature reviews* **2006**, 6 (8) 573–583. doi:10.1038/nri1896.
64. Loken, M. R.; Shah, V. O.; Dattilio, K. L.; Civin, C. I. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* **1987**, 70 (5) 1316–1324.
65. Ghia, P.; Boekel, E. ten; Rolink, A. G.; Melchers, F. B-cell development: a comparison between mouse and man. *Immunology today* **1998**, 19 (10) 480–485.
66. Melchers, F.; Karasuyama, H.; Haasner, D.; Bauer, S.; Kudo, A.; Sakaguchi, N.; Jameson, B.; Rolink, A. The surrogate light chain in B-cell development. *Immunology today* **1993**, 14 (2) 60–68.
67. Desiderio, S. The B cell antigen receptor in B-cell development. *Current opinion in immunology* **1994**, 6 (2) 248–256.

68. Hartley, S. B.; Cooke, M. P.; Fulcher, D. A.; Harris, A. W.; Cory, S.; Basten, A.; Goodnow, C. C. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* **1993**, *72* (3) 325–335.
69. Gay, D.; Saunders, T.; Camper, S.; Weigert, M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *The Journal of experimental medicine* **1993**, *177* (4) 999–1008.
70. Tze, L. E.; Baness, E. A.; Hippen, K. L.; Behrens, T. W. Ig light chain receptor editing in anergic B cells. *Journal of immunology* **2000**, *165* (12) 6796–6802.
71. Nossal, G. J.; Pike, B. L. Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1980**, *77* (3) 1602–1606.
72. Goodnow, C. C.; Crosbie, J.; Adelstein, S.; Lavoie, T. B.; Smith-Gill, S. J.; Mason, D. Y.; Jorgensen, H.; Brink, R. A.; Pritchard-Briscoe, H.; Loughnan, M.; et al. Clonal silencing of self-reactive B lymphocytes in a transgenic mouse model. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **1989**, *54 Pt 2* 907–920..
73. MacLennan, I. C. Germinal centers. *Annual review of immunology* **1994**, *12* 117–139. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.001001.
74. Grundmann, Allgemeine Pathologie 10. Auflage (2004)
75. Nishioka, Y.; Lipsky, P. E. The role of CD40-CD40 ligand interaction in human T cell-B cell collaboration. *Journal of immunology* **1994**, *153* (3) 1027–1036.
76. Pascual, V.; Liu, Y. J.; Magalski, A.; Bouteiller, O. de; Banchereau, J.; Capra, J. D. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *The Journal of experimental medicine* **1994**, *180* (1) 329–339.

77. Kuppers, R.; Zhao, M.; Hansmann, M. L.; Rajewsky, K. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *The EMBO journal* **1993**, *12* (13) 4955–4967.
78. MacLennan, I. C. Somatic mutation. From the dark zone to the light. *Current biology* **1994**, *4* (1) 70–72.
79. Kelsoe, G. Life and death in germinal centers (redux). *Immunity* **1996**, *4* (2) 107–111.
80. van, Vollenhoven R F.; Bieber, M. M.; Powell, M. J.; Gupta, P. K.; Bhat, N. M.; Richards, K. L.; Albano, S. A.; Teng, N. N. VH4-34 encoded antibodies in systemic lupus erythematosus: a specific diagnostic marker that correlates with clinical disease characteristics. *The Journal of rheumatology* **1999**, *26* (8) 1727–1733.
81. Pascual, V.; Victor, K.; Spellerberg, M.; Hamblin, T. J.; Stevenson, F. K.; Capra, J. D. VH restriction among human cold agglutinins. The VH4-21 gene segment is required to encode anti-I and anti-i specificities. *Journal of immunology* **1992**, *149* (7) 2337–2344.
82. Pascual, V.; Randen, I.; Thompson, K.; Sioud, M.; Forre, O.; Natvig, J.; Capra, J. D. The complete nucleotide sequences of the heavy chain variable regions of six monospecific rheumatoid factors derived from Epstein-Barr virus-transformed B cells isolated from the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. Further evidence that some autoantibodies are unmutated copies of germ line genes. *The Journal of clinical investigation* **1990**, *86* (4) 1320–1328.
83. Brezinschek, H. P.; Brezinschek, R. I.; Lipsky, P. E. Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *Journal of immunology* **1995**, *155* (1) 190–202.



84. Brezinschek, H. P.; Foster, S. J.; Brezinschek, R. I.; Dorner, T.; Domiati-Saad, R.; Lipsky, P. E. Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *The Journal of clinical investigation* **1997**, *99* (10) 2488–2501.
85. Isenberg, D.; Spellerberg, M.; Williams, W.; Griffiths, M.; Stevenson, F. Identification of the 9G4 idiotope in systemic lupus erythematosus. *British journal of rheumatology* **1993**, *32* (10) 876–882.
86. Stevenson, F. K.; Longhurst, C.; Chapman, C. J.; Ehrenstein, M.; Spellerberg, M. B.; Hamblin, T. J.; Ravirajan, C. T.; Latchman, D.; Isenberg, D. Utilization of the VH4-21 gene segment by anti-DNA antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of autoimmunity* **1993**, *6* (6) 809–825. doi:10.1006/jaut.1993.1066.
87. Bohnhorst, J. O.; Bjorgan, M. B.; Thoen, J. E.; Natvig, J. B.; Thompson, K. M. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjogren's syndrome. *Journal of immunology* **2001**, *167* (7) 3610–3618.
88. Grimaitre, M.; Werner-Favre, C.; Kindler, V.; Zubler, R. H. Human naive B cells cultured with EL-4 T cells mimic a germinal center-related B cell stage before generating plasma cells. Concordant changes in Bcl-2 protein and messenger RNA levels. *European journal of immunology* **1997**, *27* (1) 199–205.
89. Manz, R. A.; Arce, S.; Cassese, G.; Hauser, A. E.; Hiepe, F.; Radbruch, A. Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Current opinion in immunology* **2002**, *14* (4) 517–5

90. Dorner, T.; Lipsky, P. E. Immunoglobulin variable-region gene usage in systemic autoimmune diseases. *Arthritis and rheumatism* **2001**, *44* (12) 2715–2727.
91. Rouziere, A. S.; Kneitz, C.; Palanichamy, A.; Dorner, T.; Tony, H. P. Regeneration of the immunoglobulin heavy-chain repertoire after transient B-cell depletion with an anti-CD20 antibody. *Arthritis research & therapy* **2005**, *7* (4) R714-24. doi:10.1186/ar1731.
92. Cappione, A. 3rd; Anolik, J. H.; Pugh-Bernard, A.; Barnard, J.; Dutcher, P.; Silverman, G.; Sanz, I. Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation* **2005**, *115* (11) 3205–3216. doi:10.1172/JCI24179.
93. Eisenberg, R.; Looney, R. J. The therapeutic potential of anti-CD20 "what do B-cells do?". *Clinical immunology* **2005**, *117* (3) 207–213. doi:10.1016/j.clim.2005.08.006.
94. Hoyer, B. F.; Moser, K.; Hauser, A. E.; Peddinghaus, A.; Voigt, C.; Eilat, D.; Radbruch, A.; Hiepe, F.; Manz, R. A. Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice. *The Journal of experimental medicine* **2004**, *199* (11) 1577–1584. doi:10.1084/jem.20040168.
95. Farner, N. L.; Dorner, T.; Lipsky, P. E. Molecular mechanisms and selection influence the generation of the human V lambda J lambda repertoire. *Journal of immunology* **1999**, *162* (4) 2137–2145.
96. Brezinschek, H. P.; Dorner, T.; Monson, N. L.; Brezinschek, R. I.; Lipsky, P. E. 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. *International immunology* **2000**, *12* (6) 767–775.

97. William, J.; Euler, C.; Christensen, S.; Shlomchik, M. J. Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science* **2002**, *297* (5589) 2066–2070. doi:10.1126/science.1073924.
98. Fagarasan, S.; Honjo, T. T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science* **2000**, *290* (5489) 89–92.
99. Randen, I.; Mellbye, O. J.; Forre, O.; Natvig, J. B. The identification of germinal centres and follicular dendritic cell networks in rheumatoid synovial tissue. *Scandinavian journal of immunology* **1995**, *41* (5) 481–486.
100. Stott, D. I.; 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. *The Journal of clinical investigation* **1998**, *102* (5) 938–946.
101. Monson, N. L.; Dorner, T.; Lipsky, P. E. Targeting and selection of mutations in human V $\lambda$  rearrangements. *European journal of immunology* **2000**, *30*(6)1597–1600

## **Danksagung**

Allen voran danke ich Herrn Professor Dr. med. H.- P. Tony für die Überlassung des Themas und die gewährte Möglichkeit, die Arbeit an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II anzufertigen. Darüber hinaus möchte ich mich aber auch für die wertvollen Hilfestellungen, die inhaltlichen Anregungen, die regelmäßige Beratung sowie für die allzeit gute Zusammenarbeit bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. A. Palanichamy für die kompetente Betreuung der Laborarbeit und seine hilfreiche Unterstützung bei allen fachlichen Fragestellungen.

Frau K. Zehe danke ich für die Einweisung in die labortechnischen Methoden und das angenehme Arbeitsklima.

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

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Freunden und meiner Familie für ihre fortwährende Aufmunterung und Unterstützung.

Herrn Professor Dr. H.-P. Tony und Herrn Professor Dr. S. Gattenlöhner danke ich für die Erstellung der Referate.

## **Danksagung**

Allen voran danke ich Herrn Professor Dr. med. H.- P. Tony für die Überlassung des Themas und die gewährte Möglichkeit, die Arbeit an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II anzufertigen. Darüber hinaus möchte ich mich aber auch für die wertvollen Hilfestellungen, die inhaltlichen Anregungen, die regelmäßige Beratung sowie für die allzeit gute Zusammenarbeit bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. A. Palanichamy für die kompetente Betreuung der Laborarbeit und seine hilfreiche Unterstützung bei allen fachlichen Fragestellungen.

Frau K. Zehe danke ich für die Einweisung in die labortechnischen Methoden und das angenehme Arbeitsklima.

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

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Freunden und meiner Familie für ihre fortwährende Aufmunterung und Unterstützung.

Herrn Professor Dr. H.-P. Tony und Herrn Professor Dr. S. Gattenlöhner danke ich für die Erstellung der Referate.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Regina Roswitha Theiß  
Geburtsdatum 09.07.1978  
Geburtsort Würzburg  
Familienstand ledig

## Schulbildung

1985-1989 Grundschule in Kist  
1989-1998 Mozart-Gymnasium in Würzburg  
06/1998 Abschluss:Abitur

## Beruflicher Werdegang

09/1998-02/2001 Ausbildung zur Pharmazeutisch-technischen Assistentin an der PTA-Lehranstalt und an der Storchen Apotheke in Würzburg  
04/2001-09/2001 PTA- Anstellung in der Luitpold Apotheke in Würzburg  
10/2001-06/2008 Studium der Humanmedizin an der Julius Maximilians- Universität in Würzburg  
08/2003 Bestandene Ärztliche Vorprüfung  
06/2008 Bestandene Ärztliche Prüfung  
06/2008 Erteilung der Approbation

## Dissertation

Modulation des genetischen Imprint der Immunglobulinrezeptoren durch passagere B- Zelledepletion mit anti- CD20 Antikörpern bei Rheumatoider Arthritis

## Famulaturen

03/2004 Teilnahme am kardiovaskulären Praktikum der Rhön-Klinikum AG in Bad Neustadt/Saale (4 Wochen)  
09/2004 Anästhesie und Intensivmedizin, Herz-und Gefäßklinik in Bad Neustadt/Saale (4 Wochen)  
08/2005 Dermatologie, Praxis Drs. Frank, Schubert und Beck-Bohlen in Würzburg (2 Wochen)  
09/2005 Allgemeinmedizin, Praxis Dr. Weber in Bad Mergentheim (2 Wochen)  
03/2006 Innere Medizin Hämatologie und Rheumatologie an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg

## Praktisches Jahr

02/2007-06/2007 Chirurgie, Leopoldina Krankenhaus Schweinfurt  
06/2007-10/2007 Innere Medizin, Abteilungen Kardiologie und Gastroenterologie Klinikum Aschaffenburg  
10/2007-01/2008 Anästhesie, Kantonsspital Bruderholz, Schweiz