

Aus dem Institut für Klinische Neuroimmunologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. R. Hohlfeld

**Molekulargenetische Analyse des B-Zell-Repertoires  
in Thymus und Blut von Myasthenia gravis Patienten**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Matthias Nikolaus Witt

aus München

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. Hohlfeld

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H. Lochmüller  
Prof. Dr. med. Th. Brocker

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. N. Goebels

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2007

## Inhaltsverzeichnis

|  | <b>Seite</b> |
|--|--------------|
| <b>1. Zusammenfassung</b>  | <b>6</b>     |
| <b>2. Einleitung</b>   | <b>8</b>     |
| <b>2.1. Immunologische Grundlagen</b>  | <b>8</b>     |
| 2.1.1. Zellulärer Aufbau des Immunsystems  | 8            |
| 2.1.2. Aufbau von Immunglobulinen und Diversität des Immunglobulin-Repertoires   | 8            |
| 2.1.3. Antigen-spezifische Immunantwort bei B- und T-Lymphozyten   | 12           |
| 2.1.4. Selbsttoleranz und Autoimmunität  | 13           |
| <b>2.2. Myasthenia gravis</b>  | <b>15</b>    |
| 2.2.1. Definition und klinische Aspekte  | 15           |
| 2.2.2. Zentrale Rolle des Thymus in der Immunpathogenese der Myasthenie  | 19           |
| 2.2.3. Antikörper und antigene Epitope der MG  | 22           |
| <b>2.3. CD19 und CD138 als Oberflächenmarker von B-Zellen und Plasmazellen</b>   | <b>24</b>    |
| <b>2.4. CDR3-Spektratyping klonal expandierter T-Zellen von Myositis-, Multiple Sklerose- und MG-Patienten</b>                 | <b>25</b>    |
| <b>2.5. Fragestellung der Arbeit</b>   | <b>27</b>    |
| <b>3. Material und Methoden</b>  | <b>28</b>    |
| 3.1. Ablauf der Experimente und verwendete Methoden  | 28           |
| 3.2. Verwendete Gewebe und Charakterisierung von Patienten und Kontrollen  | 28           |
| 3.3. Isolation von Thymozyten- und Blutlymphozyten mittels der Lymphoprep®-Dichtezentrifugations-Methode                       | 30           |
| 3.4. Selektion von CD19 <sup>+</sup> und CD138 <sup>+</sup> Lymphozyten aus Thymusgewebe und Blut mittels DynaBead™-Separation | 31           |
| 3.5. Gesamt-RNA-Isolation mit TRIZOL-LS®   | 33           |
| 3.6. Synthese komplementärer DNA (cDNA) durch Reverse Transkription  | 34           |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.7. VH- und JH-Familien spezifische Polymerasekettenreaktion (PCR)   | 34        |
| 3.8. Fragment-Analyse Fluoreszenz-markierter CDR3-Produkte durch CDR3-Spektratyping   | 36        |
| 3.9. Sequenzierung der CDR3-Region  | 38        |
| 3.10. PCR mit Klon-spezifischen Primern   | 40        |
| <b>4. Ergebnisse</b>  | <b>42</b> |
| <b>4.1. CDR3-Spektratyping-Analysen von CD19+Thymozyten</b>   | <b>42</b> |
| 4.1.1. Anzahl und Anteil der amplifizierten CDR3-Fragmente bei Patienten und Kontrollen im Verhältnis zur Gesamtzahl der analysierten CDR3-Fragmente  | 42        |
| 4.1.2. Mono-, oligo- und polyklonale CDR3-spezifische VH-JH- und VH-IgG-C-Produkte aus CD19+Thymozyten von Patienten und Kontrollen   | 43        |
| 4.1.3. Die heterogene VH-JH- und VH-IgG-C-Zugehörigkeit klonal expandierter CDR3-Fragmente der CD19+Thymozyten der Patientengruppe  | 48        |
| <b>4.2. CDR3-Spektratyping-Analysen von CD138+Thymozyten</b>  | <b>50</b> |
| 4.2.1. Anzahl und Anteil der amplifizierten CDR3-Fragmente bei Patienten und Kontrollen im Verhältnis zur Gesamtzahl der analysierten CDR3-Fragmente  | 50        |
| 4.2.2. Mono-, oligo- und polyklonale CDR3-spezifische VH-JH- und VH-IgG-C-Produkte aus CD138+Thymozyten von Patienten und Kontrollen  | 52        |
| 4.2.3. Die heterogene VH-JH- und VH-IgG-C-Zugehörigkeit klonal expandierter CDR3-Fragmente der CD138+Thymozyten der Patientengruppe   | 56        |
| <b>4.3. Vergleich zwischen klonal expandierten CD19+Thymozyten und klonal expandierten CD138+Thymozyten mittels CDR3-Spektratyping und Sequenzierung der CDR3-Region</b>  | <b>58</b> |
| <b>4.4. Kompartimentvergleich zwischen klonal expandierten CD138+Thymozyten und klonal expandierten CD138+Blutlymphozyten mittels CDR3-Spektratyping, Sequenzierung der CDR3-Region und PCR mit Klon-spezifischen Primern</b> | <b>63</b> |



|   |            |
|---|------------|
| <b>5. Diskussion</b>                          | <b>71</b>  |
| <b>6. Literaturverzeichnis</b>                | <b>80</b>  |
| <b>7. Abkürzungen</b>                         | <b>97</b>  |
| <b>8. Danksagung</b>                          | <b>99</b>  |
| <b>9. Anhang</b>                              | <b>100</b> |
| 9.1. CDR3-Spektratypings von CD19+Thymozyten  | 100        |
| 9.2. CDR3-Spektratypings von CD19+ Kontrollen | 102        |
| 9.3. CDR3-Spektratypings von CD138+Thymozyten | 104        |
| 9.4. CDR3-Spektratyping von CD138+Kontrollen  | 106        |
| 9.5. Verwendete Primer-Sequenzen              | 108        |
| 9.5.1. Konventionelle Primer                  | 108        |
| 9.5.2. Klonspezifische Primer                 | 108        |
| <b>10. Lebenslauf</b>                         | <b>109</b> |

## 1. Zusammenfassung

Die Myasthenia gravis (MG) ist eine Autoimmunerkrankung, die mit einer charakteristischen Belastungs-induzierten Muskelschwäche einhergeht. Bei der MG reguliert der Thymus entscheidende Mechanismen der Selbsttoleranz und Autoimmunität und enthält zudem das Autoantigen der MG in der Form von Acetylcholin-Rezeptor-exprimierenden myoiden Zellen. Die Produktion der Anti-AChR-Antikörper findet vermutlich im hyperplastischen Thymus der MG-Patienten in Keimzentren durch Anti-AChR-Antikörper sezernierende Plasmazellen statt. Im Thymus findet sich somit die komplette immunologische Maschinerie, die für die Initiierung und die Aufrechterhaltung einer Autoimmunreaktion wie bei der MG nötig ist.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal das B-Zell-Repertoire im Thymus von MG-Patienten und gesunden Kontrollpersonen analysiert. In jeweils zwei verschiedenen B-Zell-Populationen wurde hierzu mittels CDR3-Spektratyping der natürliche Längenpolymorphismus der für die Antigenerkennung entscheidenden CDR3-Region der Immunglobulinschwerkettengene charakterisiert. Bei CD19+ und CD138+ Thymozyten-Subpopulationen der Patientengruppe konnten im Gegensatz zur Kontrollgruppe mehr klonal expandierte B-Zell-Populationen mit variabler Verwendung von VH- und JH-Genen nachgewiesen werden. Im Vergleich zwischen CD19+Thymozyten und CD138+Thymozyten der Patientengruppe konnte darüber hinaus interessanterweise keine verwandten B-Zell-Klone gefunden werden. Beim Vergleich der Kompartimente CD138+Plasmazellen aus dem Thymus und CD138+Plasmazellen aus dem peripheren Blut des gleichen Patienten konnte indirekt ein einziger identischer, in beiden Kompartimenten nachweisbarer B-Zell-Klon identifiziert werden. Angesichts dieser Heterogenität mit Nachweis verschiedener B-Zell-Klone kann über eine bei der MG im Thymus auf B-Zell-Ebene ausgeprägte somatische Hypermutation und klonale Selektion insbesondere bei CD19+Zellen spekuliert werden. Der Nachweis eines identischen CD138+B-Zell-Klons in Thymus- und Blutkompartiment könnte dagegen auf eine Persistenz von CD138+Zellen hinweisen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind konsistent mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen und sprechen für eine persistierende, bei der MG durch das Autoantigen AChR vermittelte, Antigen-induzierte Immunreaktion in den Keimzentren des Thymus von MG-Patienten. In weiterführenden Experimenten ist die rekombinante Expression der schweren und leichten Kette von Immunglobulinen klonal expandierter CD19+ oder CD138+Thymozyten von Myasthenie-Patienten denkbar. Mit Hilfe dieser rekombinanten Antikörper könnte einerseits die pathogenetische Relevanz expandierter

B-Zellpopulationen bei der MG nachgewiesen und andererseits die molekulare Feinspezifität der Antikörperantwort im Thymus von MG-Patienten charakterisiert werden. Die Identifikation dieser pathogenetischen relevanten B-Zellpopulationen wäre somit ein Schritt in Richtung einer spezifischen Immuntherapie bei der Myasthenia gravis.

## **2. Einleitung**

### **2.1. Immunologische Grundlagen**

#### **2.1.1. Zellulärer Aufbau des Immunsystems**

Es werden ein angeborenes und ein erworbenes sowie ein humorales und ein zelluläres Immunsystem unterschieden (Levinson W und Jawetz E, 2000). Das zelluläre Immunsystem besteht aus B- und T-Lymphozyten sowie polymorphonukleären Leukozyten (PMC) mit ihren verschiedenen Differenzierungen in unterschiedliche Gewebe- und Blutmakrophagen sowie Monozyten. B-Lymphozyten entstehen und reifen im Knochenmark, T-Lymphozyten migrieren nach ihrer Genese im Knochenmark zur weiteren Reifung in den Thymus. B-Zellen können sich im Rahmen einer Immunantwort zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen differenzieren. T-Lymphozyten lassen sich in zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten und CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen mit den Subpopulationen der Th1- und Th2-Zellen einteilen. B- und T-Lymphozyten zeichnen sich im Gegensatz zu den anderen Zellen des Immunsystems durch die Eigenschaft aus, eine adaptierte, antigen-spezifische Immunreaktion vermitteln zu können (Janeway C und Travers P, 1999). Voraussetzung hierfür sind antigen-spezifische Rezeptoren an der Oberfläche von B- und T-Lymphozyten, die eine spezifische Interaktion mit dem Antigen ermöglichen. T- und B-Zell-Rezeptoren (TCR und BCR) ähneln in Aufbau und Struktur Antikörpern.

#### **2.1.2. Aufbau von Immunglobulinen und Diversität des Immunglobulin-Repertoires**

B-Zellen sezernieren nach Aktivierung durch den membranständigen BCR oder durch T-Helfer-Zellen als wichtigen Bestandteil der adaptiven Immunität antigen-spezifische Immunglobuline (Ig). Die Grundstruktur eines Ig ist Y-förmig und besteht aus zwei leichten und zwei schweren Polypeptidketten, die durch nicht-kovalente Bindung und Disulfid-Brücken aneinander gebunden sind (Han W et al., 1995). Innerhalb von schwerer und leichter Kette eines Ig lassen sich konstante (C) und variable (V) Regionen unterscheiden, wobei letztere an der Antigenerkennung entscheidend beteiligt sind. Für die schwere Kette existieren je nach C-Region 5 Ig-Isotypen, für die leichte Kette existieren je nach C-Region 2 Isotypen, wobei eine B-Zelle immer nur die schwere und leichte Kette einer einzigen Spezifität

generiert. Initial produziert eine B-Zelle zunächst IgM, erst im Laufe der Immunreaktion entstehen durch eine prolongierte Antigen-Exposition in Lymphknoten und Milz ein durch T-Zellen vermittelter Isotypen-Switch mit Generierung von Gedächtnis-B-zellen mit IgA-, IgG-, IgM- und IgE-Isotyp.

Funktionell werden zwei Abschnitte eines Ig unterschieden: Der Fab-Teil befindet sich an den Armen des Y und enthält die Antigen-Bindungsstelle. Der Fc-Teil am Stamm des Y ist verantwortlich für Effektorfunktionen des Ig, wie Makrophagen- oder Komplement-Aktivierung. Innerhalb der V-Region von schwerer und leichter Kette finden sich 3 Regionen mit auffällig hypervariablen Peptidsequenzen. Strukturanalysen konnten zeigen, dass diese Bereiche entscheidend an der spezifischen Antigen-Erkennung beteiligt sind, weshalb sie auch als „complementarity determining region“ (CDR) eines Ig bezeichnet werden. CDR3 weist im Vergleich zu CDR1 und CDR2 die meisten Mutationen der Peptidkette auf (Gilliland L et al., 1996).

Diese Hypervariabilität eines Ig auf Proteinebene wird durch vier prinzipielle Prozesse auf molekulargenetischer Ebene generiert, die die Grundlage für die Diversität des menschlichen Antikörper-Repertoires darstellen: (1) verschiedene Ig-Gene, die in verschiedenen Gensegmenten angeordnet sind, mit (2) somatischer Rekombination der Ig-Gensegmente während der B-Zell-Reifung, (3) junktionale Diversifikation an der Schnittstelle der verschiedenen rekombinierten Ig-Gensegmente und (4) somatische Hypermutationen in der ausgereiften B-Zelle nach Antigen-Kontakt (Lansford R et al., 1995).

Die Peptidketten eines Ig werden nicht, wie früher in einer „Keimbahn“-Theorie vermutet, durch ein einziges Gen kodiert, sondern durch verschiedene Ig-Gen-Segmente. Für die leichte bzw. schwere Ig-Kette gibt es zwei respektive drei Gensegmente, die als V-, J- und D- Gen-Segmente bezeichnet werden (Tonegawa S et al., 1983). Innerhalb eines jeden Gen-Segmentes gibt es eine unterschiedliche Anzahl funktioneller V-, J- und D-Gene, die mit Ig-Genen der jeweils anderen Gensegmente nach dem Prinzip eines Zahlenschlosses im Rahmen eines als somatische Rekombination bezeichneten Prozesses frei kombiniert werden können (vgl. Abb. 2.1, Wang Y et al, 2003).

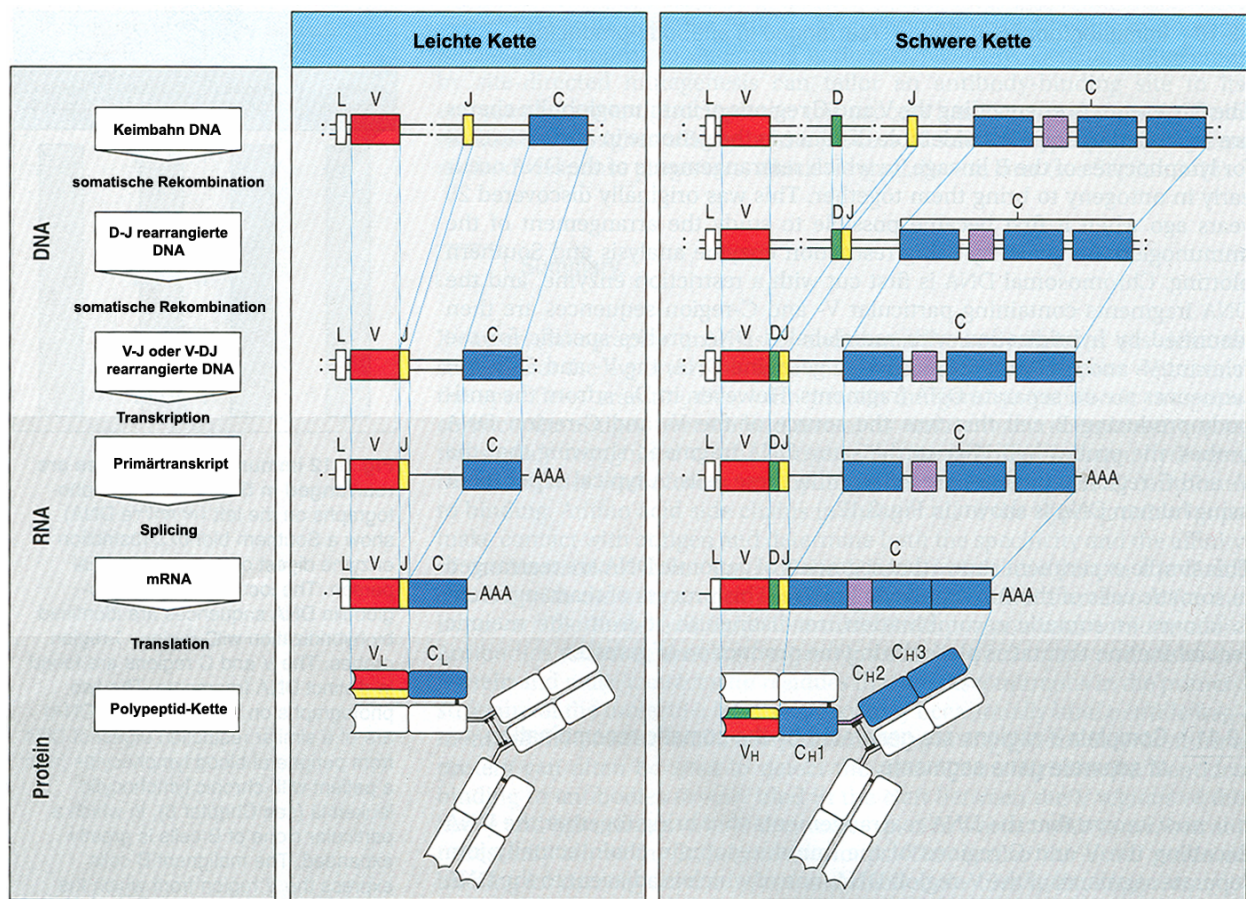


Abb. 2.1.: Prinzip der somatischen Rekombination am Beispiel der schweren und leichten Immunglobulinkette: die V-Region der schweren Kette setzt sich durch drei Gensegmente zusammen. Zunächst lagern sich D- und J-Gene aneinander, dann wird das V<sub>H</sub>-Exon durch das V-Gen komplettiert (modifiziert nach Janeway und Travers, 1999).

Besonders in der variablen CDR3-Region kommt es zudem zu einer so genannten junktionalen Diversifikation (Gauss G et al., 1996). Die CDR3-Region wird auf molekulargenetischer Ebene durch die Schnittstelle aus V- und J- Gen-Segment gebildet. Im Rahmen der beschriebenen somatischen Rekombination kommt es durch eine unpräzise Verknüpfung der Gensegmente hier zu einer zufälligen Addition oder Deletion von Nukleotiden. Die Anzahl der Nukleotide ist dabei zufällig und führt nicht selten über eine Verschiebung des Leserahmens zu einem Ausschuss unfunktionaler Antikörper, bei einer sinnvollen Gensequenz werden aber durch die junktionale Diversifikation weitere Antikörperspezifitäten möglich (Agard E et al, 2000).

Während die bisher beschriebenen Diversifizierungs-Vorgänge während der B-Zell-Reifung im Knochenmark stattfinden, wird durch eine somatische Hypermutation eine Diversifizierung der Immunglobulin-Gene in sekundären Lymphorganen auch nach erfolgtem

Gen-Rearrangement möglich. Dabei kommt es nach Aktivierung der B-Zelle durch Antigen-Kontakt zu einer hohen Rate von Punktmutationen in den V-Genen von schwerer und leichter Kette. In der Folge werden mutierte Ig-Moleküle exprimiert, die unter Umständen sogar eine bessere Antigen-Bindung aufweisen, als das Primärmolekül, was als Affinitätsreifung bezeichnet wird. Besonders zahlreiche Punktmutationen finden sich im Bereich der V-Abschnitte, die u.a. die CDR-Regionen kodieren (Wabl M et al., 1999).

Durch diese Mechanismen ergibt sich eine geschätzte Anzahl von  $10^{11}$  möglichen Immunglobulin-Molekülen mit unterschiedlicher Antigen-spezifität (Radic M et al., 1994). Diese bilden das Antikörper-Reservoir des Menschen und liegen bei Antigenexposition bereits als präformierter Rezeptor einer spezifischen B-Zelle vor. Nach Aktivierung der B-Zelle kommt es durch klonale Selektion zu einer monoklonalen Proliferation der antigen-spezifischen B-Zelle (vgl. Abb. 2.2).

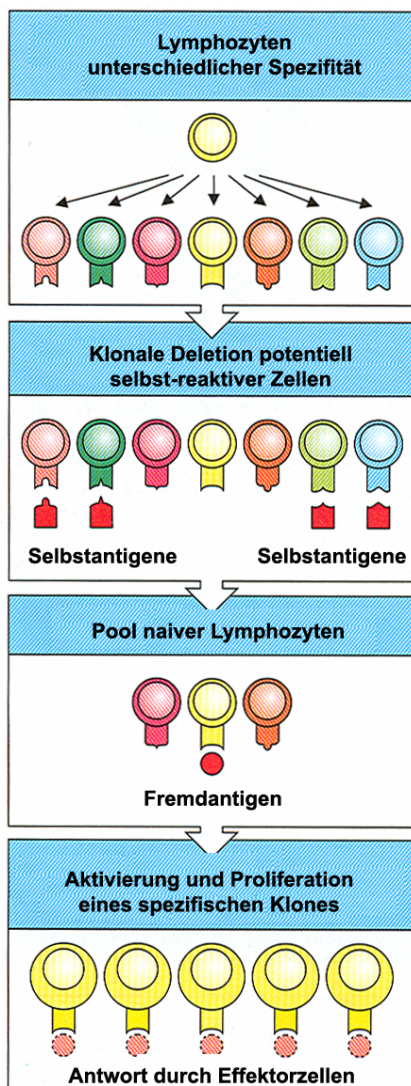


Abb. 2.2.: Hypothese der klonalen Selektion: Durch eine Interaktion mit einem Antigen wird ein spezifischer Lymphozyt aktiviert. Es kommt zu einer klonalen Vermehrung dieser Zelle mit spezifischer Antigen-Erkennung durch die Tochterzellen (modifiziert aus Janeway und Travers, 1999).



### 2.1.3. Antigen-spezifische Immunantwort bei B- und T-Lymphozyten

Zu Beginn einer Antigen-spezifischen Immunantwort steht die Antigen-Erkennung durch B- oder T-Lymphozyten. Von zentraler Bedeutung sind dabei die T-Lymphozyten sowie der Mechanismus der so genannten MHC-restringenten Antigen-Erkennung. Anders als B-Zellen erkennen T-Lymphozyten keine kompletten Antigene, sondern lediglich kurze Peptidbausteine von Antigenen (Fremont D et al., 1996). Diese werden entweder von professionellen antigen-präsentierenden Zellen (APC) oder von infizierten Zellen prozessiert und im Kontext mit MHC-I- oder MHC-II-Molekülen präsentiert (Morrison L et al., 1986).

MHC-I wird ubiquitär auf praktisch jeder Zelle exprimiert. Die Antigenpräsentation über MHC-I ist Voraussetzung für die Aktivierung cytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Über MHC-I präsentierte Antigene stammen von intrazellulären Pathogenen, z.B. Viren ab, und bedeuten eine Infektion der Zelle, die durch eine Aktivierung cytotoxischer T-Zellen mit dem Pathogen zerstört wird (Song R et al., 1996).

MHC-II-Moleküle hingegen finden sich v. a. auf professionellen APC wie B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen verschiedener Gewebe. Über TNF $\alpha$  kann MHC-II auch auf anderen Zellen exprimiert werden. Über MHC-II prozessierte Antigene wurden zuvor durch APC phagozytiert und werden nun exklusiv T-Helfer-Zellen präsentiert, über die es zu entscheidenden Regulationen der Immunantwort kommt (Murthy V et al., 1997).

Die Aktivierung von T-Helferzellen führt im Falle einer Differenzierung in Th1-Zellen zu einer weiterhin v. a. Zell-vermittelten Immunreaktion u. a. mit Makrophagenaktivierung, bei einer Differenzierung in Th2-Zellen dagegen kommt es über eine bevorzugte Aktivierung von B-Lymphozyten mit konsekutiver Antikörperproduktion zu einer bevorzugt humoralen Immunantwort (Crane I et al., 2005). Über Th2-Zellen wird auch das so genannte Isotypen-Switching der Immunglobuline vermittelt. Die genauen Mechanismen der Th-Differenzierung sind noch unklar, durch Pathogene induzierte Interleukine (IL), v.a. IL-12 und IL-4, sowie die Peptidsequenz des Peptid:MHC-Komplexes scheinen aber einen Einfluss zu haben (Kamogawa Y et 1993).

Neben der MHC-restringenten Antigen-Erkennung sind zur Aktivierung von T-Zellen auch kostimulatorische Signale nötig, ohne die es nicht zu einer T-Zellaktivierung kommt (Liu Y et al., 1992). Am besten charakterisiert ist der so genannte B7-Komplex, bestehend aus CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), der nur auf APC exprimiert wird und wichtig für die Selbsttoleranz gegenüber autoreaktiven T-Zellen ist (Acuto O et al., 2003). Fehlende Stimulation mit Ko-



Signalen führt nicht nur zu keiner T-Zell-Aktivierung, sondern sogar zu Anergy, d. h. einer aktiven Inaktivierung der T-Zelle (Schwartz R et al., 1996).

B-Lymphozyten sind für eine effiziente Antikörperproduktion in der Regel von der beschriebenen Aktivierung durch Th2-Zellen abhängig. Prinzipiell ist aber auch eine direkte Aktivierung der B-Zellen über den BCR möglich, z. B. durch extrazelluläre Pathogene (Mond J et al., 1995). Über Vermittlung des BCR ist sowohl eine Signalvermittlung nach intrazellulär mit folgender Antikörperproduktion als auch eine Phagozytose des Antigens mit Prozessierung und Präsentation über MHC-II möglich. Die Antikörperantwort im Rahmen einer direkten B-Zell-Aktivierung ist dabei weniger ausgeprägt als eine durch T-Zellen vermittelte B-Zell-Aktivierung, da entscheidende Mechanismen der Antikörperreifung von der Hilfe durch T-Zellen abhängen (Parker D, 1993). Die prinzipiellen Effektormechanismen der B-Zellantwort bestehen in einer Antikörper-vermittelten Komplementaktivierung, Antigen-Opsonisierung und Antigen-neutralisation.

#### **2.1.4. Selbsttoleranz und Autoimmunität**

Autoimmune Reaktionen ergeben sich fast zwangsläufig aus der zufälligen somatischen Rekombination des TCR- und Immunglobulin-Repertoires von T- und B-Zellen. Auf B-Zell- und insbesondere auf T-Zell-Ebene sind deshalb verschiedene Mechanismen nötig, die eine Selbsttoleranz gewährleisten. Besondere Bedeutung im Zuge der T-Zell-Reifung kommt dabei dem Thymus zu (Wang R et al., 1998). Hier durchlaufen naive T-Zellen in zwei Phasen eine positive und eine negative Selektion, in der sich zunächst nur die T-Zellen weiter differenzieren, die körpereigene MHC-Moleküle erkennen, und im Weiteren jene T-Zellen eliminiert werden, die MHC-assoziierte, körpereigene Peptide erkennen („klonale Deletion“). Bis zu 98% der naiven T-Zellen werden über diesen Mechanismus bereits während der Ausreifung apoptotisch (Surh C et al., 1994).

Trotz klonaler Deletion lassen sich auto-reaktive T-Zellen in verschiedenen Geweben gesunder Individuen nachweisen, z. B. T-Zellen, die das körpereigene myelo-basische Protein MBP erkennen (Goverman J et al., 1993 und Wekerle H et al., 1996). Dass es dennoch zu keiner Autoimmunreaktion kommt, liegt auch am Fehlen essentieller kostimulatorischer Signale, z. B. in Form des B7-Proteinkomplexes. Ohne diese werden T-Zellen nach Autoantigenkontakt nicht aktiviert und eine Selbsttoleranz in Form einer klonalen Anergy

bleibt erhalten (Schwartz R et al., 1996). Vor allem aus Tiermodellen ergeben sich zudem funktionelle Hinweise auf eine aktive Suppression einer Immunantwort durch T-Suppressor-Zellen, die morphologisch bisher aber noch nicht ausreichend charakterisiert sind (Weigle W et al, 1997).

Auf B-Zell-Ebene werden vier Mechanismen der Selbsttoleranz postuliert (Fulcher D et al., 1997). Neben einer der T-Zellen ähnlichen klonalen Deletion auto-reaktiver B-Zellen im Knochenmark kommt es durch reduzierte IgM-Expriemierung auf der Zell-Oberfläche zu einer Anergie autoreaktiver B-Zellen (Cornall R et al., 1995). Zudem können autoreaktive B-Zellen durch T-Helfer-Zellen erkannt werden, die über Aktivierung des Fas-Liganden der T-Zelle eine Apotose der B-Zelle induzieren (Rathmell J et al., 1995). Schließlich scheint ein spezieller apoptotischer Mechanismus auch für reife B-Zellen zu existieren, der durch somatische Rekombination generierte autoreaktive B-Zellen eliminiert. Morphologisches Korrelat könnten ausgeprägte Apoptosen in Keimzentren von B-Zell-Follikeln sein (Shokat K et al., 1995).

Bei einem Versagen der geschilderten Mechanismen kann es zu einer Autoimmunreaktion kommen, wobei transiente autoimmune Reaktionen ein häufiges und normales Phänomen sind. Unklar sind aber die Auslöser einer persistierenden autoimmunen Reaktion mit Gewebeschaden (Janeway C und Travers P, 1999). Offensichtlich sind Umweltfaktoren in Kombination mit einem entsprechenden individuellen genetischen Hintergrund in Form eines bestimmten MHC-Genotyps essentiell, wie das Beispiel der Spondylitis ankylosans mit ihrer ausgeprägten Assoziation mit HLA-B27 illustriert. In entsprechend suszeptiblen Individuen könnten dann v.a. virale oder andere Infektionen durch zwei Mechanismen eine Autoimmunreaktion auslösen.

Zum einen könnte es im Rahmen einer molekularen Mimikry zu einer Kreuzreaktion von Antikörpern einer initial anti-infektiösen Immunantwort mit körpereigenen Proteinen kommen, wie das Beispiel des rheumatischen Fiebers im Anschluss an eine Infektion mit bestimmten Streptokokkeninfektionen eindrücklich veranschaulicht. Bei der Multiplen Sklerose (MS) wurden beispielsweise T-Zellen nachgewiesen, die zum einen mit dem körpereigenen MBP reagieren, aber auch mit Bestandteilen von Influenzaviren (Wucherpfennig K et al., 1995). Zudem gibt es Hinweise auf eine Assoziation der MS mit Infektionen durch Chlamydia pneumoniae und humanes Herpes Virus 6 (Swanborg R et al., 2003). Molekulare Mimikry scheint aber ein Mechanismus v. a. der humoralen Immunantwort

zu sein, bei dem es in der Regel zu einem passageren Verlauf kommt und der für eine durch T-Zellen vermittelte persistierende Autoimmunantwort unzureichend zu sein scheint (Wucherpfennig K, 2001).

Speziell für virale Infektionen ist ein zweiter Mechanismus denkbar. Durch eine Integration des viralen Genoms in das Wirtszellen-Genom könnte es zu einer Modifikation von antigenen Determinanten und verstärkter Expressierung kostimulatorischer Faktoren der infizierten Zelle durch eine entsprechende Genaktivierung kommen (Perl A, 2003). Durch Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus kommt es beispielsweise zur Aktivierung von Onko-Genen der viralen und zellulären Transkription (Young L et al., 2004). Sobald ein Autoimmunprozess in Gang gekommen ist, ist eine weitere Anwesenheit des Infektionserregers zum Unterhalt der Immunreaktion wahrscheinlich nicht mehr notwendig (Hohlfeld R, 1997).

## **2.2. Myasthenia gravis**

### **2.2.1. Definition und klinische Aspekte**

Die Myasthenia gravis (MG) ist eine erworbene Autoimmunerkrankung, die durch eine fluktuierende, pathologische Muskelschwäche mit intermittierenden Remissionen und Exazerbationen einer oder mehrerer Muskelgruppen charakterisiert ist. In den meisten Fällen kommt es zu einer Autoantikörperbildung gegen den nikotinerge Acetylcholin-Rezeptor (AChR) der postsynaptischen Membran der neuromuskulären Endplatte (vgl. Abb.2.3).

Die MG ist mit einer Prävalenz von 85 – 125 pro Million und eine geschätzten jährlichen Inzidenz von 2 – 4 pro Million weltweit eine insgesamt seltene Erkrankung. Die MG weist zwei Altersgipfel auf: der erste zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, in dieser Phase erkranken v.a. Frauen, der zweite Gipfel zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr, mit einem ausgewogenen Geschlechterverhältnis (Beekman R et al., 1997). Initial treten bei der Mehrzahl der Patienten okuläre Symptome wie Doppelbilder und Lidptose auf, die unter Umständen die einzige Krankheitsmanifestation bleiben. Bei 85% der Patienten kommt es jedoch innerhalb von drei Jahren zu einer Generalisierung der Erkrankung mit Beteiligung v.a. der proximalen Extremitätenmuskulatur sowie axialer Muskelgruppen, z. B. der Hals- und Gesichtsmuskulatur. Dies führt häufig zum Verlust der Mimik und Schwierigkeiten der Artikulation, des Schluckens und Kauens. Typischerweise besteht dabei eine belastungsinduzierte Muskelschwäche. Bei einer Beteiligung der Atemmuskulatur im Rahmen einer so

genannten myasthenen Krise entsteht eine potentiell lebensbedrohliche Notfallsituation mit der Notwendigkeit einer mechanischen Beatmung (Bedlack R et al., 2000). Tod infolge respiratorischer Insuffizienz oder kardiopulmonaler Komplikationen sind mögliche Endpunkte der schweren myasthenen Krise, sind aber heute durch verbesserte Therapiemaßnahmen insgesamt sehr selten (Beekman R et al., 1997). Die jährliche Inzidenz der MG-Krise wird auf 2,5% geschätzt (Berrouschot J et al., 1997). Die Prognose der MG ist insgesamt sehr gut: In einer dänischen Bevölkerungs-basierten Überlebensstudie zeigte sich ein 3-, 5-, 10- und 20 Jahresüberleben von respektive 85, 81, 69 und 63% (Christenesen P et al., 1998).

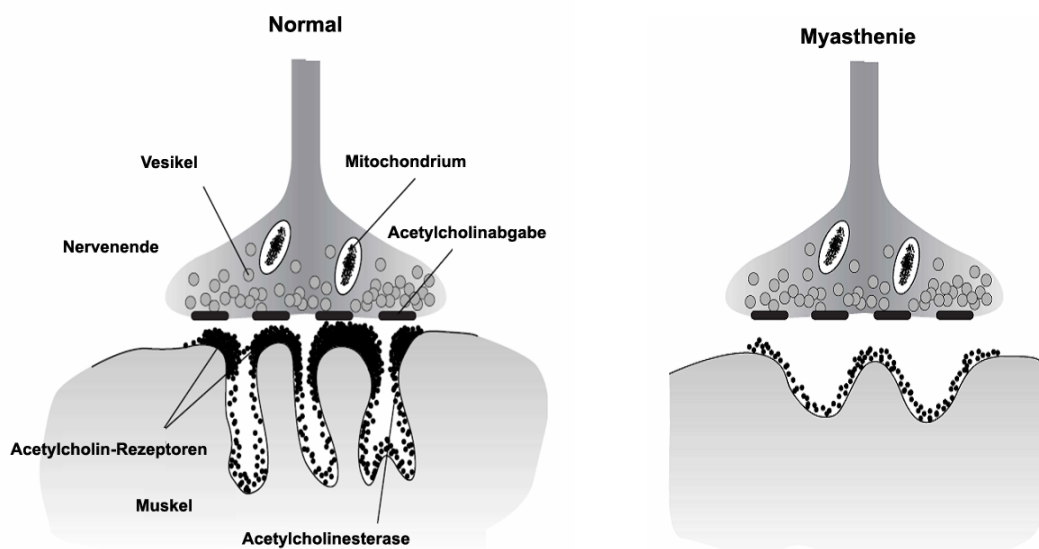


Abb. 2.3.: Links Schema einer normalen neuromuskulären Endplatte (NME), rechts die Verhältnisse an der NME beim MG-Patienten: verbreiteter Synapsenspalt, reduzierte Anzahl der Acetylcholin-Rezeptoren, Abflachung der postsynaptischen Membran (modifiziert aus Thanvi B et al, 2004).

Hinter dem relativ uniformen klinischen Bild der MG verbirgt sich eine heterogene Erkrankung, die in fünf Untergruppen eingeteilt wird und sekundären Formen myasthener Syndrome gegenübergestellt wird (vgl. Abb 2.4, Agius M et al., 2003, und Marx A et al., 1997). Die okuläre MG beinhaltet Anti-AChR-Antikörper positive MG-Formen ohne Thymom mit rein okulärer, nicht generalisierter Symptomatik. Die okuläre MG tritt zu jedem Alter auf, ist aber im Kindesalter und bei älteren männlichen Patienten am häufigsten (Beekman R et al., 1997). Bei asiatischen Kindern wurde für die okuläre MG eine Assoziation mit HLA-DQ6 beschrieben (Kanai T et al., 1997).

Die früh einsetzende Form der MG beinhaltet AChR-positive, generalisierte MG-Formen ohne Thymom mit Auftreten von myasthenen Symptomen vor dem 50. Lebensjahr. Die Thymushyperplasie ist ein Charakteristikum in dieser Gruppe, die zugleich die größte Untergruppe mit etwa 65% aller MG-Patienten darstellt. Frauen sind in dieser Gruppe etwa viermal häufiger als Männer betroffen, der Erkrankungsgipfel liegt in der 2. und 3. Lebensdekade (Aarli J et al., 2003). Typischerweise finden sich hohe Anti-AChR-Antikörpertiter und nicht selten besteht bei den Patienten eine Assoziation mit anderen autoimmunen Komorbiditäten (Thorlacius S et al., 1989). Starke positive Korrelationen finden sich mit verschiedenen HLA-Genotypen, bei Kaukasiern v.a. HLA-A1, -B8, -DQB1, -DR3 und -DR52a (Giraud M et al., 2001 und Willcox N et al., 1993).

Die spät einsetzende Form der MG beinhaltet Anti-AChR-Antikörper positive, generalisierte Formen der MG ohne Thymom mit Beginn der Krankheitssymptome nach dem 50. Lebensjahr. Der Thymus in dieser Gruppe stellt sich häufig atrophisch dar. Männer und Frauen erkranken mit gleicher Inzidenz und im Vergleich zur früh einsetzenden MG finden sich in der Regel vergleichsweise niedrige Anti-AChR-Antikörpertiter. Regelmäßig finden sich Antikörper gegen die Muskelproteine Titin und Ryanodin-Rezeptor (Romi F et al., 2000). Die Thymom-assoziierte MG beinhaltet Patienten mit MG und Nachweis eines Thymoms, unabhängig vom Ausmaß der muskulären Beteiligung. Ein Thymom tritt bei etwa 15% der MG-Patienten zu jedem Alter mit einem Häufigkeitsgipfel um das 50. Lebensjahr auf. Beide Geschlechter sind gleich häufig betroffen, neben Anti-AChR-Antikörpern finden sich häufig Anti-Titin- und Anti-RyR-Antikörper (Romi F et al., 2000). Der Nachweis eines Thymoms ist nicht mit einer schlechteren Prognose der MG assoziiert (Evoli A et al., 2002).

Die seronegative MG sind definiert durch fehlenden Nachweis von Anti-AChR-Antikörper. Bei 10 – 40% der seronegativen MG-Patienten lassen sich Antikörper gegen die muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase (MuSK) nachweisen (Hoch W et al., 2001). Anti-MuSK-positive MG-Verläufe unterscheiden sich offenbar hinsichtlich ihrer Pathogenese von Anti-MuSK-negativen Verläufen, die eventuell einen milderen Krankheitsverlauf haben (Romi F et al., 2005). Anti-MuSK-negative MG-Patienten haben eventuell andere, bisher noch unbekannte Auto-Antikörper.

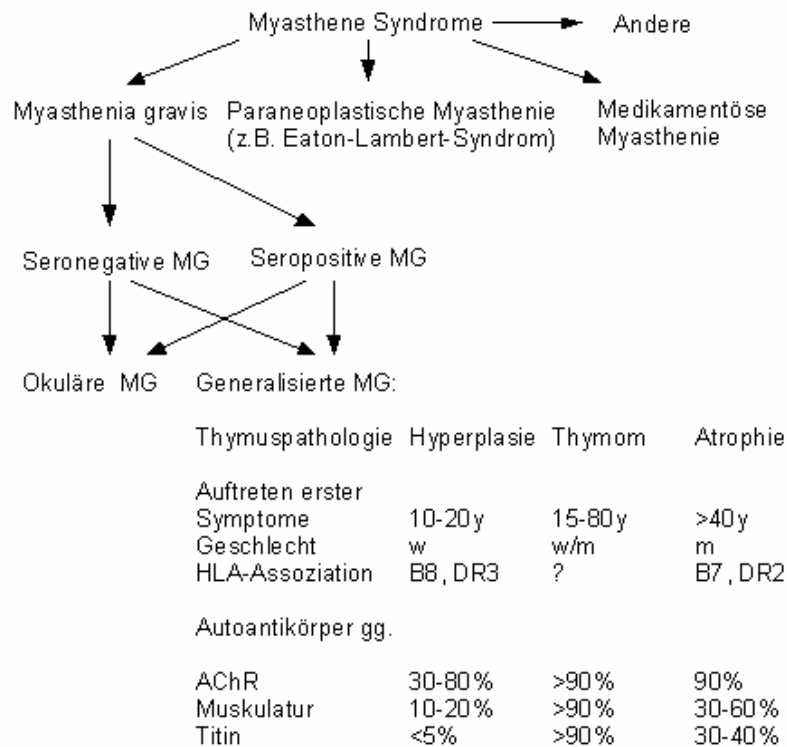


Abb. 2.4.: Übersicht der myasthenen Syndrome und epidemiologische Charakteristika in Abhängigkeit von der Thymushistologie; w: weiblich; m: männlich; y: Alter in Jahren (modifiziert aus Marx A et al., 1997).

Die Diagnose der MG wird anhand von Anamnese und charakteristischer Klinik gestellt. Als pharmakologischer Bestätigungstest eignet sich die intravenöse Applikation des Acetylcholinesterase-Inhibitors Edrophonium (Tensilon®), unter der es in 90% der Patienten zu einer reproduzierbaren Reversibilität der myasthenen Symptome kommt. Elektromyographisch zeigt sich bei repetitiver Muskelstimulation bei 2/3 der MG-Patienten ein charakteristisches Décrement der Muskelpotentiale. Ein erhöhtes Muskelzittern ("Jitter") in der Einzelfaser-Elektromyographie ist wohl sensitiver und kann bei praktisch allen MG-Patienten pathologisch nachgewiesen werden (Sanders D, 2004). Die Diagnose wird durch die typischen Anti-AChR-Antikörper gestützt, die in etwa 85% nachgewiesen werden können und für die MG sehr spezifisch sind (Almon R et al., 1974).

Bezüglich der Therapie existieren nur wenige placebo-kontrollierte, doppelblind durchgeführte Studien. Medikamentöse Therapie der ersten Wahl sind verschiedene Acetylcholinesterase-Inhibitoren die über eine Hemmung des ACh-Katabolismus im synaptischen Spalt eine Erhöhung der synaptischen ACh-Konzentration und dadurch eine reduzierte Ermüdbarkeit der Muskulatur bewirken (Millard C et al., 1995). Erst bei einer

Progression unter dieser Therapie ist die Verwendung von systemischen Immunsuppressiva indiziert, u.a. Corticosteroide, Azathioprin, Cyclophosphamid, Cyclosporin A, Methotrexat und Mycophenolatmofetil. In Fallberichten ist auch der Benefit des monoklonalen Anti-CD20-Antikörpers Rituximab beschrieben (Wylam M et al., 2003). Als in etwa gleich effiziente Therapieoptionen für schwere MG-Verläufe stehen die intravenöse Immunglobulin-Applikation und die Plasmapherese zur Verfügung. Bei Nachweis eines Thymoms kann zu dem eine transsternale oder thoroskopische Thymektomie angezeigt sein. Der Nutzen der Thymektomie ist bei der generalisierten MG unumstritten, obwohl nur für die früh einsetzende MG eine gesicherte Evidenz vorliegt (Romi F et al., 2005).

### **2.2.2. Zentrale Rolle des Thymus in der Immunpathogenese der MG**

Eine zentrale Bedeutung in der Immunpathogenese der MG kommt dem Thymus zu. Dies setzt voraus, dass sich (1) das Autoantigen, in diesem Falle also AChR, im Thymus nachweisen lässt, dass (2) das Autoantigen über Antigen-präsentierende Zellen prozessiert und präsentiert wird, bevorzugt über MHC-II als besonders potenten Immunstimulus, dass (3) autoreaktive T-Helfer-Zellen das präsentierte Peptidfragment erkennen und aktiviert werden und dass (4) eine dadurch vermittelte B-Zell-Rekrutierung und –Aktivierung in einer Anti-AChR-Antikörper-Produktion resultiert.

Erste histologische Hinweise bezüglich der Bedeutung des Thymus in der Immunpathogenese der MG ergaben sich bereits 1901, als der Pathologe Carl Weigert (1845 – 1904) den Fall eines jungen Mannes beschrieb, der an respiratorischer Insuffizienz und Pneumonie verstorben war. In der Autopsie fanden sich bis auf einen deutlich vergrößerten Thymus nur unauffällige Organe, mikroskopisch zeigten sich im Thymusgewebe des Patienten Ansammlungen kleiner lymphoider Zellen, durchsetzt mit wenigen Makrophagen, sowie epitheliales Stroma und Hassall-Körperchen (Weigert C et al., 1901). Diese durch Weigert erstmals beschriebene Thymushyperplasie ist ein Charakteristikum der MG und kann in 70% - 80% der MG-Patienten nachgewiesen werden (Marx A et al., 1997). In nur etwa 15% der MG-Patienten kommt es zu einem Thymom (Müller - Hermelink et al., 1996). Bei der Thymus-Hyperplasie finden sich ausgeprägte strukturelle Veränderungen der Thymushistologie. Die so genannten perivaskulären Räume (PVR) sind oft durch B-Zell-Infiltrate erweitert, die dadurch ein reaktives lymphatisches Gewebe in Form lymphoider Sekundärfollikel und Keimzentren bilden (Marx A. et al., 1997). In diesen Bereichen kommt

es regelmäßig zu einer Zerstörung der Basalmembran und der die PVR vom Thymusmark trennenden Epithelschicht (Roxanis I et al., 2001).

Immunhistochemisch lassen sich mit den myoiden Zellen, speziellen Muskelvorläuferzellen, im Thymus stark AChR-positive Zellen identifizieren (Wekerle H et al., 1977), die sich neben ihrer Positivität für AChR auch durch die Fähigkeit auszeichnen, Anti-AChR-Antikörper binden zu können (Schluep M et al., 1987). Myoide Zellen lassen sich zwar auch im Thymusgewebe von gesunden Patienten nachweisen, aber der hyperplastische Thymus des MG-Patienten enthält deutlich mehr myoide Zellen als der atrophische Thymus des Gesunden (Kirchner T et al., 1988). Bemerkenswerterweise findet sich bei MG-Patienten zudem eine unmittelbare Nachbarschaft von myoiden Zellen und Antigen-präsentierenden, MHC-II-positiven dendritischen Stromazellen (Melms A et al., 1988).

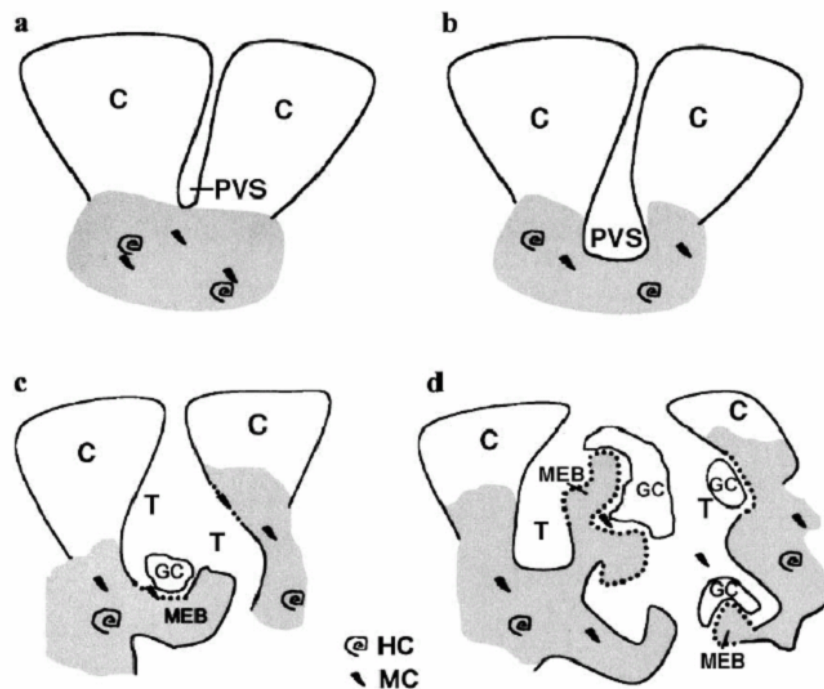


Abb. 2.5.: Im Vergleich zu pädiatrischen Kontrollen (a) zeigt der Thymus des seronegativen MG-Patienten (b) expandierte perivaskuläre Räume (PVS). Bei seropositiven MG-Patienten finden sich in diesen noch stärker expandierten Bereichen vermehrt Keimzentren (GC) mit umgebenden Arealen von T-Zellen (T). Die Epithelschicht zwischen Mark (grau) und der PVS ist regelmäßig fenestriert. Es finden sich häufig myoide Zellen in diesen Fenestrationsen; C: Cortex, HC: Hassall-Corpuskel, MC: myoide Zelle, PVS: perivaskulärer Raum, MEB: medulläres Epithelband (modifiziert aus Roxanis I et al., 2002).



Die myoiden Zellen stellen somit ein intra-thymisches AChR-Reservoir dar. Myoide Zellen besitzen zwar keine MHC-II-Determinanten, die für eine Interaktion mit den dendritischen Zellen nötig wäre. In anderen Antigen-präsentierenden Zellen der Thymus-Medulla finden sich aber AChR-ähnliche Peptid-Sequenzen (Schluep M et al., 1987), so dass spekuliert werden kann, ob es nicht über noch unverstandene Mechanismen zu einer Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von myoidem AChR bzw. AChR-Fragmenten durch MHC-II-positive dendritische Zellen und in der Folge zu einer Aktivierung autoreaktiver T-Zellen kommen könnte (Hohlfeld R et al., 1994). Potentiell autoreaktive T-Zellen mit AChR-Spezifität konnten bereits im Thymus von MG-Patienten mit und ohne Thymom nachgewiesen werden (Sommer N et al., 1990), ihre genaue pathogenetische Bedeutung ist aber letztlich noch unklar, da AChR-spezifische T-Lymphozyten auch bei gesunden Individuen nachgewiesen werden konnten (Sommer N et al., 1991 and Melms A et al., 1992).

Alternativ könnte eine Erkennung des myoiden AChR auch über AChR-spezifische B-Zellen erfolgen, die über den B-Zell-Rezeptor (BCR) das Antigen internalisieren, prozessieren und eine Aktivierung der AChR-spezifischen T-Lymphozyten initiieren. Im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen lassen sich im hyperplastischen Thymusgewebe von MG-Patienten deutlich mehr B-Zellen und Plasmazellen nachweisen, die zudem, wie oben beschrieben, lymphoide Follikel ausbilden (Levinson A et al., 1990). Aus Zellsuspensionen lassen sich zudem AChR-spezifische B-Zellen isolieren (Fujii Y et al., 1986). Da sich im Thymusgewebe aber auch Influenza- und Tetanus-Toxoid-spezifische B-Zellen isolieren lassen, ist noch nicht geklärt, ob die AChR-spezifischen B-Zellen im Thymus lokaler oder systemischer Herkunft sind (Lisak R et al., 1986). Nach Initiierung einer AChR-spezifischen Autoimmunantwort über die ausgeführten Mechanismen könnte es über AChR-exprimierende Zellen (z.B. die myoiden Zellen) auch zu einer Antigen-gesteuerten Autoimmunreaktion kommen. Dies würde gut mit der bei MG-Patienten beobachteten ausgeprägten Heterogenität der Auto-Antikörper übereinstimmen (Roxanis et al., 2002).

AChR-spezifische T-Zellen wurden auch in Thymusgeweben Thymom-assoziiierter MG-Patienten nachgewiesen (Sommer N et al., 1990). Dennoch bestehen bei der Thymom-assoziierten MG relevante Unterschiede, so dass letztlich von unterschiedlichen pathogenetischen Mechanismen ausgegangen wird. Im Gegensatz zur Thymus-Hyperplasie produziert das Thymom beispielsweise keine kompletten Anti-AChR-Antikörper. Es scheint lediglich zur Produktion von Antikörpern gegen ein abnormales AChR- $\alpha$ 373-380-Epitop zu

kommen und nicht gegen die wichtige antigene Determinante MIR (Spuler S et al., 1996). Darüber hinaus werden durch Thymome auch Epitope anderer Muskelantigene, wie Titin und Ryanodin-Rezeptor exprimiert (Marx A et al., 1997). Auf welche Weise sich die pathogenetischen Schritte der MG bei Patienten ohne Thymuspathologie abspielen, ist noch unklar.

Jenseits der Erkenntnisse auf zellulärer Ebene können bei MG-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen auch Unterschiede verschiedener Chemokin-Expressionsprofile nachgewiesen werden, wodurch indirekt ein Rückschluss auf involvierte Zellpopulationen möglich ist (Saito R et al., 2005). Kürzlich wurden auch Unterschiede in der Expression von TLR-4 sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene beschrieben, was ein Hinweis auf eine Mitbeteiligung des angeborenen Immunsystems bei der Immunpathogenese der MG sein könnte (Bernasconi P et al., 2005).

Die genannten Erkenntnisse der Grundlagenforschung zur Bedeutung des Thymus bei der MG harmonisieren mit der klinischen Beobachtung, dass es im Anschluss an eine Thymektomie v.a. bei jungen MG-Patienten mit Thymus-Hyperplasie regelhaft zu einer Besserung der MG-Klinik kommt (u.a. Romi F et al., 2005).

### **2.2.3. Antikörper und antigene Epitope der MG**

Verschiedene Tatsachen sprechen für eine Vermittlung der zentralen pathogenen Effektormechanismen der MG durch Auto-Antikörper: (1) der Nachweis von Anti-AChR-Antikörpern gelingt in 80 – 90% der MG-Patienten, (2) durch passiven Transfer von IgG-Immunglobulinen myasthener Patienten auf Mäuse lässt sich eine myastheniforme Erkrankung auslösen, (3) die Plasmapherese führt oft zu einer Reduktion der Plasma-Anti-AChR-Konzentration und konsekutiv zu einer Besserung der Klinik und (4) führt die Immunisierung von Tieren mit AChR zu einer tierexperimentellen Form der MG (Thanvi B et al., 2004).

Ein wichtiges Charakteristikum der Anti-AChR-Antikörper ist, dass es sich nicht um monoklonale Antikörper eines spezifischen B-Zell-Klons handelt, sondern um eine polyklonale Antikörperpopulation in Bezug auf Isotyp, Effektormechanismus und Epitop-Erkennung (Cardona A et al., 1994). Diese Polyklonalität der Anti-AChR-Antikörper könnte erklären, warum klinische Symptomatik und Höhe des Anti-AChR-Antikörper-Titers bei vielen MG-Patienten nur schlecht korrelieren. Offenbar besitzen nur bestimmte Subgruppen

von Anti-AChR-Antikörpern die pathogenen Effektormechanismen, die für die Entwicklung einer klinischen Symptomatik nötig sind (Drachman D, 1994).

Bei Patienten mit generalisierter MG finden sich meist Anti-AChR-Antikörper vom Typ IgG1, IgG2, oder IgG3. IgG1 und IgG3 können Komplement fixieren und aktivieren, was u.a. als Effektormechanismus an der neuromuskulären Endplatte (NME) diskutiert wird (Vincent et al., 1982). Der Nachweis verschiedener Ig-Isotypen spricht für eine Stimulation der B-Zellen durch AChR-spezifische T-Zellen mit daraus resultierendem Ig-Klassen-Switch.

Bei etwa 60% der MG-Patienten richten sich die Anti-AChR-Antikörper gegen einen im Verlauf der Evolution hochkonservierten, extrazellulären Abschnitt der  $\alpha$ -Untereinheit des AChR. Diese sich über die Aminosäuren 68 – 72 erstreckende Region wird daher auch „main immunogenic region“ (MIR) genannt und stellt einen Cluster von sich überlappenden, offenbar stark immunogenen Epitopen dar (Tzartos et al, 1990). Der passive Transfer von Anti-MIR-Antikörpern im Tierexperiment führt zur Induktion einer myasthenen Erkrankung (Tzartos S et al., 1986). MIR ist an der extrazellulären Spitze der  $\alpha$ -Kette lokalisiert ist und weist in der Achse nach lateral, die Bindung eines Anti-MIR-Antikörpers an zwei benachbarte AChR scheint daher besonders effektiv möglich (Beroukhim R et al, 1995).

Neben Anti-MIR-Antikörpern sind Autoantikörper gegen weitere Epitope nachweisbar, so z.B. gegen die  $\alpha$ -Bungarotoxin-bindende Region des AChR oder die Aminosäuren-Region 128 – 142 der  $\alpha$ -Untereinheit (Besinger U et al., 1983). Interessanterweise können in seltenen Fällen auch Antikörper gegen extrajunktionale AChR-Epitope nachgewiesen werden, wie z.B. gegen die  $\epsilon$ -Untereinheit des fetalen AChR, der sich beim Erwachsenen nur okulär und in den myoiden Zellen des Thymus findet. Letzteres passt zu der Vermutung, dass myoide Zellen das initiale Autoantigen sein könnten (Vincent A et al., 1998).

Bei etwa 10-20% der MG-Patienten lassen sich keine typischen Anti-AChR-Antikörper nachweisen. Bei bis zu 40% dieser als seronegativ bezeichneten MG-Patienten finden sich allerdings Antikörper gegen die muskel-spezifische Rezeptor-Tyrosinkinase (MuSK) (Hoch W et al., 2001), ein Protein, das während der Ausbildung einer Synapse ein „Clustering“ der AChR bewirkt und auch an der reifen neuromuskulären Endplatte nachweisbar ist (Hopf C et al., 1998). Die Anti-MuSK-Antikörper weisen eine hohe Affinität für MuSK auf und führen so zu einer Inhibierung der Tyrosinkinase.

Die Anti-AChR-Antikörper können theoretisch auf verschiedene Weise auf die Signalübertragung an der NME einwirken: (1) durch direkte Beeinträchtigung der Ionenkanal-Kinetik selbst, (2) durch Blockierung der ACh-Bindungsstelle des AChR, (3) durch

Zerstörung der NME mittels Komplementaktivierung und/oder Makrophagen-Opsonisierung, sowie (4) über einen akzelerierten Abbau von AChR (Lindstrom J, 2000). Ein direktes Angreifen am Ionenkanal mit Veränderung seiner Leitungseigenschaften wurde bisher lediglich in einer Kasuistik beschrieben (Engel A et al., 1993) und die Blockierung der ACh-Bindungsstelle des AChR durch Anti-AChR-Antikörper ist bisher nur durch in vitro-Daten gut belegt, scheint aber in vivo eine allenfalls untergeordnete Rolle zu spielen (Kachalsky S et al., 1993). Als wichtigster Effektormechanismus wird daher eine durch Anti-AChR-Antikörper vermittelte Komplementfixierung und –aktivierung mit Ausbildung des Membran-Attack-Komplexes (MAC) an der postsynaptischen Membran diskutiert. Die Fähigkeit zur Komplementaktivierung besitzen die v. a. bei MG-Patienten nachgewiesenen IgG-Subklassen IgG1 und IgG3 (Vincent et al., 1982). Abbauprodukte des MAC sowie verschiedene Komponenten des Komplements lassen sich zudem entlang der postsynaptischen Membran der NME immunhistochemisch nachweisen (Sahashi K et al., 1980). Eine Vernetzung von AChR durch Anti-AChR-Antikörper führt darüber hinaus offenbar auch zu einer gesteigerten AChR-Internalisierung (Drachman et al., 1978). Die Opsonisierung der AChR für Makrophagen scheint dagegen eine nur untergeordnete Rolle zu spielen (Nakano S et al., 1993).

### **2.3. CD19 und CD138 als Oberflächenmarker von B-Zellen und Plasmazellen**

Das CD19-Antigen ist ein 95 kd großes, transmembranöses Protein mit Immunglobulin-ähnlicher Struktur und ein Marker der B-Zell-Reihe (Tedder T et al., 1994). CD19 wird zu verschiedenen Phasen der B-Zell-Reifung auf der Zelloberfläche exprimiert und ist für die Zelldifferenzierung im Knochenmark sowie für das Zellüberleben in der Peripherie wichtig (Del Nagro C et al., 2005). CD19-vermittelte Effektormechanismen werden u. a. über Aktivierung zytoplasmatischer Tyrosinkinase vermittelt. Durch eine Assoziation mit dem B-Zell-Rezeptor (BCR) kann CD19 offenbar zu einer besonders effizienten Antikörper-Antwort der B-Zelle beitragen und scheint außerdem das angeborene und das adaptive Immunsystem miteinander zu verbinden. Außer einer Komplexbildung mit dem BCR sind Assoziationen mit anderen Molekülen beschrieben, z.B. CD21 und CD81 (Dempsey P et al., 1996).

Das CD138-Antigen ist ein 150 – 200 kd großes, transmembranöses Glykoprotein mit Heparansulfat- und Chondroitinsulfat-Seitenketten, dass insbesondere auf Epithel- und

Mesenchymzellen sowie auf Lymphozyten, speziell Plasmazellen, exprimiert wird (Wijdenes J et al., 1996). Nachdem CD138+ initial auf Precursor B-Zellen nachweisbar ist und dann im Rahmen der B-Zell-Reifung verloren geht, kommt es zu einer Re-Expression auf der Zelloberfläche bei einer Differenzierung zu Plasmazellen (Luque R et al., 1998). Die Funktion von CD138 liegt in der Vermittlung zellulärer Adhäsion und sowie der Regulation der B-Zell-Proliferation, beispielsweise im Knochenmark (Couchman J et al., 2003). CD138 ist klinisch ein guter Marker für multiple Myelom-Zellen und Sternberg-Reed-Zellen (Wijdenes J et al., 1996). Anti-CD138-monoklonale Antikörper sind geeignet, um normale und neoplastische Plasmazellen u. a. in Knochenmarkschnitten immunhistochemisch anzufärben (Chilosi M et al., 1999).

#### **2.4. CDR3-Spektratyping klonal expandierter T-Zellen von Myositis-, Multiple Sklerose- und MG-Patienten**

Das genetische Repertoire der CDR3-Region der  $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors wurde von unserer und anderen Arbeitsgruppen in Zusammenhang mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen ausführlich studiert. Dabei wurde zur Analyse des genetischen Repertoires das so genannte CDR3-Spektratyping verwendet, eine neuere PCR-gestützte Nachweismethode für klonal expandierte T- und B-Zellen.

So konnte bei Patienten mit Multipler Sklerose (MS) neben einer Persistenz individueller MBP-spezifischer T-Zell-Klone über mehrere Jahre auch eine Dynamik in Bezug auf das genetische Repertoire im Sinne eines „Antigen-spreading“ nachgewiesen werden (Goebels N et al., 2000). CDR3-Spektratyping-Studien an klonal expandierten T-Zell-Populationen aus Liquor und PBL von MS-Patienten konnten außerdem zeigen, dass sich in Liquor und Hirngewebe nachweisbare T-Zell-Klone in peripheren Blutlymphozytenpopulationen (PBL) dieser Patienten wieder finden (Skulina C et al., 2004). Ähnliche Verhältnisse bestehen auch bei der Dermatomyositis (DM) und der Polymyositis (PM). Einzelne klonal expandierte T-Zell-Populationen aus Muskelgewebe von DM- und PM-Patienten lassen sich auch in der CD8+PBL-Fraktion einzelner Patienten mittels CDR3-Spektratyping detektieren. Diese expandierten T-Zell-Klone können unter einer immunsuppressiven Therapie persistieren, verschwinden oder nach Jahren wieder re-expandieren (Hofbauer M et al., 2004).

Für die MG wurde u.a. mittels CDR3-Spektratyping auf tierexperimenteller Ebene gezeigt, dass die T-Zell-Antwort auf AChR von *Torpedo californica* zu einer spezifischen

Antikörperreaktion führt und die antigenspezifischen T-Zell-Klone offenbar ein limitiertes Spektrum bezüglich ihrer Epitop-Spezifität und der TCR-V $\beta$ -Diversität aufweisen (Pierce J et al. 1994). In manchen Fällen findet sich auch eine Konservierung bestimmter Aminosäuresequenzen der CRD3-Region (Kraig E et al., 1996). Neuere Daten an der HLA-DR3 transgenen Maus konnten im Gegensatz dazu aber auch eine ausgeprägte Diversität bezüglich Epitop-Spezifität, TCR-V $\beta$ -Diversität und CDR3-Sequenz nachweisen (Infante et al., A 2003).

Mittels CDR3-Spektratyping wurde auch das genetische Immunrepertoire der T-Zell-CDR3-Region anderer Autoimmunerkrankungen wie z.B. der rheumatoiden Arthritis (Lim A et al., 1996) sowie infektiöser (Sourdive D et al., 1998) und maligner (Prevost-Blondel A et al., 1995) Erkrankungen im zeitlichen Verlauf und in verschiedenen Kompartimenten untersucht. Bezüglich des Antikörper-Repertoires von B-Zellen bei Patienten mit MG existieren auf Protein-Ebene einige Veröffentlichungen u.a. aus Zwillingsstudien, in der die Epitop-Spezifität von Anti-AChR-Antikörpern untersucht wurde (Lefvert A et al., 1989). Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass das Repertoire der Autoantikörper von Gesunden und Erkrankten bezüglich Bindungsavidität und Epitopspezifität vergleichbar ist und sich insgesamt bei beiden Populationen durch eine hohe Diversität auszeichnet (Kakoulidou M et al., 2004).

Auf molekulargenetischer Ebene ist das Immunglobulin-Repertoire bei der MG am Beispiel eines MG-Patienten in bisher lediglich einer Arbeit detailliert untersucht worden: Aus Thymusgewebe wurden vier Keimzentren isoliert und 300 VH-Gene untersucht. Es zeigte sich eine sehr heterogene B-Zell-Population mit ausgeprägter Immunglobulin-Hypermutation. In den verschiedenen Keimzentren konnte kein dominanter Klon identifiziert werden, stattdessen fanden sich diverse B-Zell-Klone (Sims G et al., 2001).

## **2.5. Fragestellung der Arbeit**

Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit (1) mittels CDR3-Spektratyping mit CD19+ und CD138+Thymozyten eine molekulargenetische Analyse des Immunglobulinketten-Repertoires der schweren Immunglobulinkette von Myasthenie-Patienten durchgeführt und mit dem Repertoire gesunder Kontrollpersonen verglichen. Ziel war eine Charakterisierung klonal expandierter B-Zellpopulationen in beiden Gruppen. Zudem wurden mittels CDR3-Spektratyping und CDR3-Sequenzierung (2) klonal expandierte CD19+Thymozyten und klonal expandierte CD138+Thymozyten mit der Frage nach identischen B-Zell-Klonen in beiden Zell-Populationen verglichen. Schließlich wurde (3) in einem Kompartimentvergleich zwischen klonal expandierten CD138+Thymozyten und klonal expandierten CD138+Blutlymphozyten mittels CDR3-Spektratyping und CDR3-Sequenzierung sowie Verwendung klon-spezifischer Primer nach identischen B-Zell-Klonen in beiden Kompartimenten gesucht.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Ablauf der Experimente und verwendete Methoden

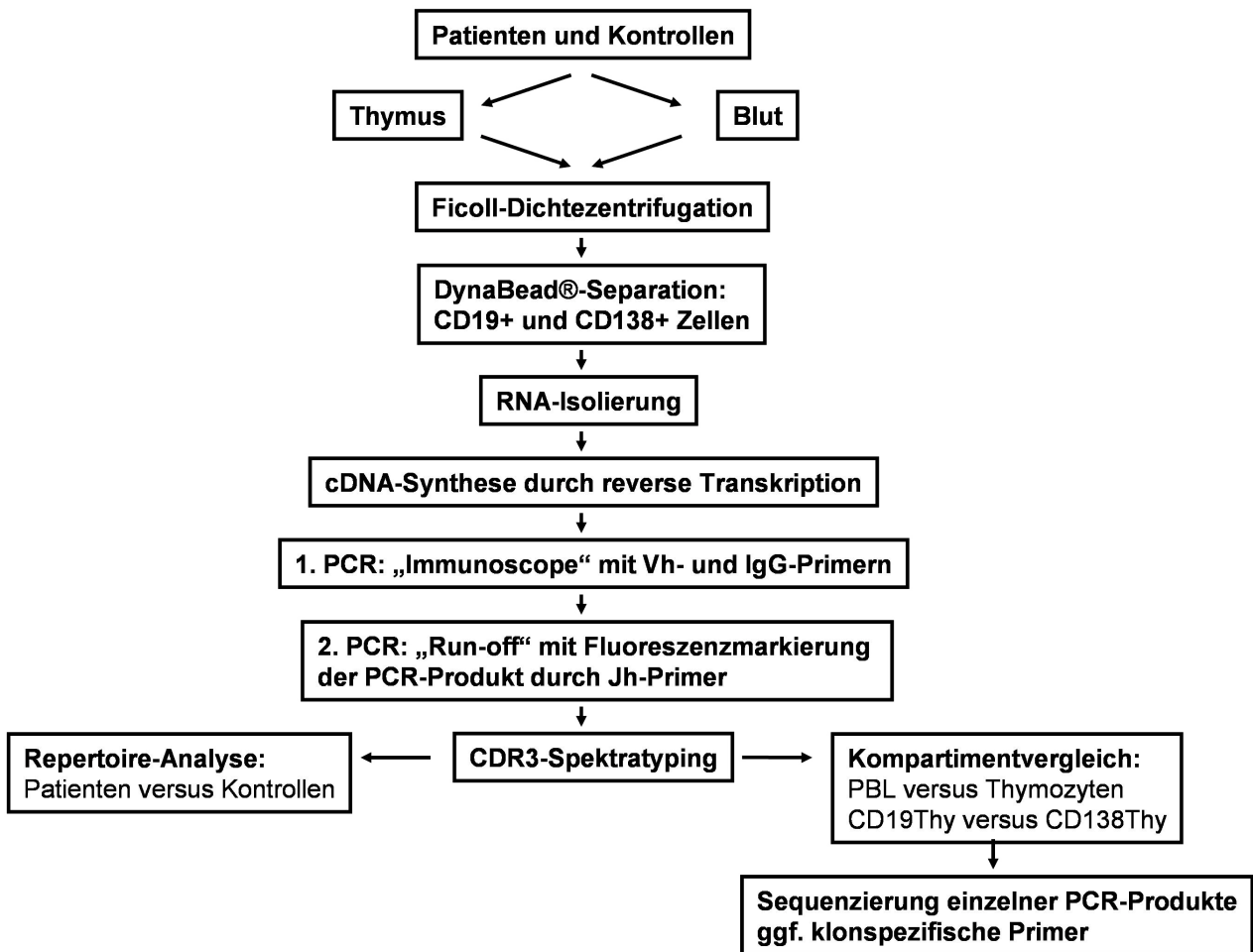


Abb. 3.1.: Übersicht über den Ablauf der Experimente in dieser Arbeit.

#### 3.2. Verwendete Gewebe und Charakterisierung von Patienten und Kontrollen

In den Experimenten wurden Lymphozytenpopulationen aus Thymusgewebe sowie des peripheren Blutes (PBL) von insgesamt fünf Patienten mit Myasthenia gravis (MG) untersucht. Die MG wurde bei allen Patienten durch die typische Anamnese und Klinik einer Belastungs-induzierten Muskelschwäche diagnostiziert und mittels Elektromyographie (EMG) und Bestimmung von Antikörpern gegen den Acetylcholinrezeptor (AChR) bestätigt.



Bei vier Patienten konnten Anti-AChR-Antikörper nachgewiesen werden (seropositive MG), bei einem Patienten wurde bei Abwesenheit der Anti-AChR-Antikörper eine seronegative MG diagnostiziert. Der Anti-AChR-Antikörper-Titer zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lag zwischen 1,18 nmol/l und 3,42 nmol/l. Vier MG-Patienten waren weiblich, ein Patient war männlich. Bei einem Patienten lag eine okulär betonte MG ohne periphere Beteiligung vor, die restlichen Patienten wiesen einen generalisierten Befall mit unterschiedlich ausgeprägter Beteiligung extraokulärer Muskelgruppen auf. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der MG lag zwischen dem 14. und 66. Lebensjahr.

Alle MG-Patienten wurden im Rahmen der MG-Therapie transsternal bzw. thorakoskopisch thymektomiert. Ein Teil des Thymuspräparates wurde zur histopathologischen Evaluation an das Institut für Pathologie der Ludwigs-Maximilians-Universität (LMU) geschickt. Die histologische Aufarbeitung des Thymusmaterials erbrachte bei vier Patienten den Befund einer Thymushyperplasie. Bei keinem Patienten ergaben sich Hinweise für ein Malignom im Sinne eines Thymuskarzinoms. Bei einem Patienten war keine Histologie verfügbar. Zum Zeitpunkt der Gewebeasservation wurden die MG-Patienten in unterschiedlicher Weise immunsuppressiv behandelt, teils bereits für Jahre (vgl. Tabelle 3.1).

| Patient/Geschlecht/<br>Alter | AChR-<br>Status          | Thymus-Histologie                             | Klinik                              | Therapie                               |
|------------------------------|--------------------------|---|-------------------------------------|--|
| Bar/w/34                     | Negativ++                | Thymushyperplasie, kein Anhalt für Malignität | Okulär, proximal obere Extremität   | Azathioprin 100mg/d<br>Cortison 20mg/d |
| Str/m/68                     | Positiv<br>(1,18 nmol/l) | Nicht vorhanden                               | Okulopharyngeal                     | Azathioprin 100mg/d                    |
| Vos/w/29                     | Positiv<br>(2,3 nmol/l)  | Thymushyperplasie, kein Anhalt für Malignität | Okulär, proximal obere Extremität   | Pyridostigmin 180mg/d                  |
| AM/w/27                      | Positiv<br>(1,92 nmol/l) | Thymushyperplasie, kein Anhalt für Malignität | v.a. obere Extremität               | Azathioprin 75 mg/d                    |
| Jas/w/21                     | Positiv<br>(3,4 nmol/l)  | Thymushyperplasie, kein Anhalt für Malignität | Okulär, obere und untere Extremität | Pyridostigmin 210 mg/d                 |

Tab. 3.1.: Charakterisierung der MG-Patienten; w: weiblich, m: männlich; ++: nebenbefundlich Anti-MuSK negativ, Anti-Titin positiv.

Das Thymusgewebe der drei Kontrollpatienten stammt von Säuglingen im Alter zwischen vier Wochen und drei Monaten, die aufgrund verschiedener Herzvitien herzchirurgisch operiert werden mussten. Bei dem transsternalen Zugang wird das Thymusgewebe regelmäßig entfernt und stand damit der Analyse zur Verfügung. Es handelte sich dabei um zwei männliche und einen weiblichen Patienten, die bis auf das Herzvitium gesund waren, wie

beurteilt in den Untersuchungen U1 – U4. Insbesondere boten sich keine Hinweise für autoimmune Erkrankungen. Als vierte Kontrolle wurde gepoolte humane fetale Thymozyten cDNA verwendet (GenePool™ cDNA, Invitrogen®, USA). Thymusgewebe von Kontrollpatienten wurde keiner histopathologischen Evaluation zugeführt.

| Kontrolle | Material        | Alter bei Thymektomie | Geschlecht | Grunderkrankung |
|-----------|-----------------|-----------------------|------------|-----------------|
| 1         | Thymusgewebe    | 4. LW.                | m          | VSD             |
| 2         | Thymusgewebe    | 6. LW.                | w          | ASD             |
| 3         | Thymusgewebe    | 12. LW                | m          | VSD             |
| 4         | humane Thy cDNA | n. anwdb.             | n. anwdb.  | n. anwdb.       |

Tab. 3.2.: Charakterisierung der Kontrollen; LW: Lebenswoche, w: weiblich, m: männlich; VSD: Ventrikelseptumdefekt, ASD: Vorhofseptumdefekt, n. anwdb: nicht anwendbar.

Das Thymusgewebe von Patienten und Kontrollen wurde in unmittelbarem Anschluss an die Asservation weiterverarbeitet bzw. in vorgekühltem Isopentan fixiert und bei -80°C für spätere Experimente eingefroren. Besonderer Wert wurde bei der Weiterverarbeitung darauf gelegt, möglichst viel Thymus-Parenchym und möglichst wenig peri-thymisches Fettgewebe zu verarbeiten. Ein 10 µm dicker Kryostat-Schnitt aller Präparate wurde hierzu vorher mittels Sudan-Färbung angefärbt, um den Fettanteil unter dem Lichtmikroskop abschätzen und überflüssiges Fettgewebe vor der weiteren Verarbeitung entfernen zu können. Unter sterilen Bedingungen erfolgte ein grober Zuschnitt des Gewebes in kleinere Schnitzel, die anschließend mit Hilfe eines Mörsers in mehreren Serien durch immer feinere Siebe passiert wurden, bis ein homogener Zellbrei vorlag. Neben dem Thymusgewebe wurde zum Zeitpunkt der Thymektomie bei allen MG-Patienten 20 ml EDTA-Vollblut asserviert.

### **3.3. Isolation von Thymozyten- und Blutlymphozyten mittels der Lymphoprep®-Dichtezentrifugations-Methode**

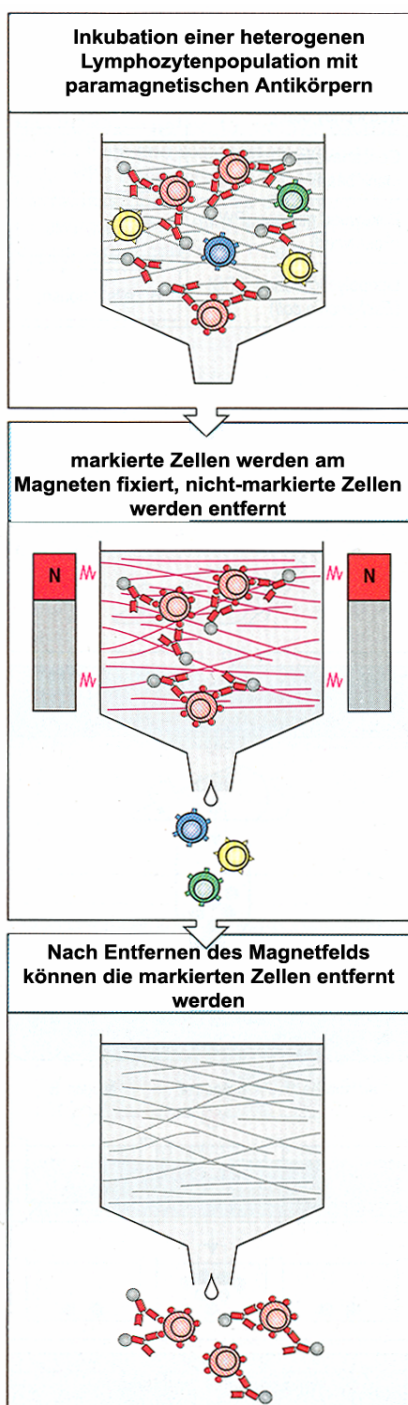
Durch Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™; Axis-Shield®, Norwegen) erfolgte aus dem Vollblut der MG-Patienten sowie aus den aufbereiteten Thymozyten von MG-Patienten und Kontrollen die Isolation der Lymphozytenpopulation. Die

Dichtegradientenzentrifugation ist eine etablierte Methode zur reproduzierbaren und effizienten Isolation großer Lymphozyten-Populationen (u.a. Nagaeva O et al., 2002). 15 ml venöses EDTA-Vollblut der MG-Patienten bzw. 15 ml homogenisierte Thymozyten-Zellsuspension wurden mit gleichem Volumen Phosphat-gepufferter Saline (PBS) gemischt. 20ml Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™, Axis-Shield®, Norwegen) wurden vorgelegt, mit der Zellsuspension überschichtet und für 40 Minuten mit 1400 Rotationen pro Minute (rpm) bei 15°C zentrifugiert. Während die Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte in diesem Schritt abzentrifugiert werden, sammeln sich die mononukleären Zellen, v.a. die Lymphozyten, an der Interphase zwischen Serum und Ficoll. Mittels elektrischer Saugpipette (Pipetus™, Eppendorf®, Hamburg) wurden die Lymphozyten abgenommen und in einem zweiten Schritt für 20 Minuten mit 1400 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Das entstehende Lymphozyten-Pellet wurde in 0,5 ml PBS mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA) aufgenommen und in ein Tube (Biopur™, Eppendorf®, Deutschland) überführt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 5 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau und 45 µl PBS auf ein Verhältnis 1:20 verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Färbung mit Trypanblau ermöglichte eine grobe Differenzierung zwischen vitalen und avitalen Zellen mit nicht mehr intakter Zellmembran und konsekutiver Blaufärbung.

### **3.4. Selektion von CD19+ und CD138+ Lymphozyten aus Thymusgewebe und Blut mittels DynaBead™-Separation**

Die mittels Ficoll angereicherten Lymphozytenpopulationen des Thymusgewebes und des peripheren Bluts aller fünf MG-Patienten wurden mittels DynaBead™-Separation (DynaBeads™, Dynal®, Deutschland) in CD19-positive und CD138-positive Lymphozyten-Subpopulationen aufgetrennt. Das Prinzip der DynaBeads™ besteht in einer Kopplung eines antigenspezifischen monoklonalen Antikörpers, z. B. Anti-CD19 bzw. Anti-CD138, an das entsprechende Antigen auf der Zelloberfläche. In einem zweiten Schritt erfolgt eine Inkubation mit einem zweiten Antikörper, der einerseits an den antigen-spezifischen Antikörper bindet, andererseits aber mit einem ferromagnetischen Material gekoppelt ist. Diese Kombination ermöglicht eine Separation der Zielzelle von den antigen-negativen, nicht markierten Zellen durch Verwendung eines Magnetic Particle Concentrators (MPC, vgl. Abb. 3.2).

Dazu wurden zur Selektion der CD19<sup>+</sup>-Lymphozyten 15-20x10<sup>6</sup> in 1 ml PBS suspendierte Lymphozyten mit Anti-CD19-Maus-Antikörpern (Dynal®, Deutschland) bzw. Anti-CD138-Maus-Antikörpern (Serotec®, Deutschland) für 45 Minuten bei +4°C auf einem rotierenden Mixer inkubiert. In einem zweiten Schritt wurde mit dem zweiten, ferromagnetisch-markierten anti-Maus-IgG-Antikörper (Dynabeads™, Dynal, Deutschland) für weitere 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Separation der markierten CD19<sup>+</sup> und CD138<sup>+</sup>-Lymphozyten, in dem die Zellsuspension für 2 Minuten in ein magnetisches Feld gestellt und der Überstand der unfixierten CD19<sup>-</sup> und CD138<sup>-</sup>-negativen Zellen mittels Pipette abgenommen wurde. Durch Resuspension der Zellen und erneuter Separation im Magnetfeld



wurde eine möglichst vollständige Isolierung der CD19<sup>+</sup> und CD138<sup>+</sup>-Zellen angestrebt. Nach Verifizierung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer erfolgte unmittelbar die Weiterverarbeitung, zum Teil durch Lyse der Zellen in Trizol-LS (Gibco-BRL®, Deutschland) mit anschließender RNA-Isolation, zum Teil durch Einfrieren bei -80°C zur Weiterverarbeitung zu einem späteren Zeitpunkt. Die Effizienz und der Grad der Reinheit der mittels Dynabead®-Separation isolierten Zellen wurden für den CD19-Antikörper durch FACS-Analysen überprüft. Die Anzahl der CD19<sup>+</sup>-Zellen wurde vor und nach der Dynabeads-Separation gemessen. Dabei zeigte sich eine Reinheit der CD19-Zellpopulation nach der Dynabead®-Separation von über 95%.

Abb. 3.2.: Separation von Lymphozyten-subpopulationen mittels ferromagnetisch-markierter monoklonaler Antikörper (modifiziert aus Janeway und Travers, 1999).

|           | <b>Bar</b>          | <b>Jas</b>          | <b>AM</b>           | <b>Vos</b>              | <b>Str</b>          |
|-----------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| CD19+Thy  | 112x10 <sup>3</sup> | 97x10 <sup>3</sup>  | 56x10 <sup>3</sup>  | 74x10 <sup>3</sup>      | 80x10 <sup>3</sup>  |
| CD138+Thy | 57x10 <sup>3</sup>  | 25x10 <sup>3</sup>  | 50x10 <sup>3</sup>  | 202x10 <sup>3</sup>     | 80x10 <sup>3</sup>  |
| CD138+PBL | 120x10 <sup>3</sup> | 56x10 <sup>3</sup>  | 42x10 <sup>3</sup>  | 34x10 <sup>3</sup>      | 235x10 <sup>3</sup> |
|           | <b>Kontrolle 1</b>  | <b>Kontrolle 2</b>  | <b>Kontrolle 3</b>  | <b>hum fet Thy cDNA</b> |                     |
| CD19+     | 75x10 <sup>3</sup>  | 130x10 <sup>3</sup> | 105x10 <sup>3</sup> | n.anwdb.                |                     |
| CD138+    | 40x10 <sup>3</sup>  | 85x10 <sup>3</sup>  | 90x10 <sup>3</sup>  | n.anwdb.                |                     |

Tab. 3.3.: Die Anzahl der durch Dynabead-Selektion separierten CD19+ und CD138+ Zellen wurde in der Neubauer-Zählkammer überprüft.

### 3.5. Gesamt-RNA-Isolation mit TRIZOL-LS®

CD19+ und CD138+Lymphozyten wurden in 250 µl PBS aufgenommen und mit 750 µl Trizol®-LS (Invitrogen™, Deutschland) gemischt, kräftig geschüttelt und anschließend für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es resultierte eine vollständige Lyse der Zellen mit Dissoziation des Nucleoproteinkomplexes. Nach Zugabe von 200µl Chloroform wurde die Probe kurz kräftig geschüttelt, für weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 Minuten mit 14.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das Probengemisch wurde dadurch in eine schwere Chloroform-Phase und in eine leichtere wässrige Phase aufgetrennt, in der sich die Ribonukleinsäure (RNA) befindet. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA anschließend mit 700 µl Isopropylalkohol ausgefällt. Nach einer Inkubation bei -20°C für 10 Minuten wurde mit 14.000 rpm für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert, das sich bildende RNA-Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes wurde mit 80% Ethanol gewaschen, anschließend kurz luftgetrocknet und in einem letzten Schritt in 22 µl DNase- und Nuklease-freiem Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC) resuspendiert.

|                  | <b>Bar</b> | <b>Jas</b> | <b>AM</b> | <b>Vos</b> | <b>Str</b> |
|------------------|------------|------------|-----------|------------|------------|
| <b>CD19+Thy</b>  | 89,3       | 93,4       | 100,6     | 124,5      | 85,2       |
| <b>CD138+Thy</b> | 53,6       | 63,6       | 64,7      | 160,5      | 55,2       |
| <b>CD138+PBL</b> | 150,1      | 74,8       | 51,8      | 65,9       | 64,1       |

Tab. 3.4.: Übersicht über die RNA-Konzentrationen der verschiedenen Patientenproben (µg/ml).

Mittels Spektrophotometrie bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm wurden RNA-Konzentration und RNA-Qualität der Proben bestimmt (RNA/DNA-Calculator™-GeneQuant II, Pharmacia-Biotech®, USA).

### **3.6. Synthese komplementärer DNA (cDNA) durch Reverse Transkription**

Unter der reversen Transkription versteht man eine enzymatische Reaktion, bei der mittels des Enzyms Reverse Transkriptase (erstmalig vor 80 Jahren in Retroviren entdeckt, welche ihre RNA in DNA umschreiben) mRNA in einzelsträngige cDNA (complementary DNA) „zurückgeschrieben“ wird. Die cDNA ist stabiler als RNA und eignet sich zur Amplifikation mittels der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR).

5 µg RNA wurden hierfür mit 0,5 µg oligo-(dt)12-18 Primer versetzt, der sich an das Poly-A-Ende des mRNA-Stranges anlagert. In einem Heizblock wurden bei einer Temperatur von 70°C zunächst Proteine denaturiert und anschließend der Probe ein Mastermix bestehend aus 4 µl Puffer (5x FirstStrand-Buffer™, Invitrogen®, Germany), 2 µl 0,1 millimolaren DTT (Gibco-BRL®, Germany), 1 µl 10 mM dNTP und 1 µl RNase Inhibitor (RNase out Ribonuklease-Inhibitor™, Invitrogen®, Germany) zugegeben. Durch Zugabe der reversen Transkriptase (SuperScript™, Gibco-BRL®, Germany) und Temperieren der Probe auf 42°C wurde die cDNA-Synthese gestartet. Nach 50 Minuten wurde die reverse Transkription durch Erhitzen der Probe auf 70°C für 15 Minuten abgebrochen und das Reaktionsvolumen von 10 µl mit DEPC-Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Die cDNA Konzentration betrug anschließend etwa 200 µg/ml je Probe.

### **3.7. VH- und JH-Familien spezifische Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die im Folgenden beschriebene molekulargenetische Untersuchung der CDR3-Region der schweren Immunglobulinkette mittels CDR3-Spektratyping erfordert eine Amplifikation der Zielsequenz durch eine PCR. Diese Technik ermöglicht eine höchst spezifische und exponentielle Amplifikation von DNA-Fragmenten (u.a. Saiki R et al., 1988). Als Primer der PCR werden zwei kurze Oligonukleotide benötigt, deren Sequenzen zu den entsprechenden Sequenzen einer zu amplifizierenden DNA-Matrize komplementär sind. Durch eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus*

aquaticus) werden die freien 3'-Enden der Primer durch Zusetzung von Nukleotiden zu zwei neuen, komplementären DNA-Strängen verlängert. Jeder Reaktionszyklus führt so zu einer Verdopplung des zu amplifizierenden DNA-Fragments.

Die DNA-Matrize der in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Experimente ist die CDR3-Region der schweren Immunglobulin-(Ig)-Kette. Wie beschrieben, liegt diese innerhalb des durch Gen-Rearrangement gebildeten VDJ-Segments des variablen Teils der schweren Immunglobulin-Kette. Zur genaueren Analyse der CDR3-Region mittels CDR3-Spektratyping sind zwei PCR-Experimente notwendig.

Mit einer ersten PCR („Immunoscope“-PCR) wurde eine VH-Familien-spezifische Amplifikation durchgeführt: Als „forward“-Primer wurden sechs verschiedene VH-Primer (VH1, VH2, VH3, VH4, VH5, VH6; Sequenzen siehe Anhang) verwendet, die die 65 verschiedenen V-Gene der schweren Immunglobulin-Kette zu „VH-Familien“ zusammenfassen. Als „backward“-Primer diente ein Primer der C-Region von IgG. Es ergaben sich also für jede eingesetzte cDNA sechs Reaktionsansätze, gemäß der Formel: (VH1, VH2, VH3, VH4, VH5, VH6) x IgG-C.

In einer im Anschluss daran durchgeführten zweiten PCR („Runoff“-PCR) wurden JH-Familien-spezifische Primer verwendet. Durch Einsatz vier verschiedener Primer der J-Gene der schweren Immunglobulin-Kette (JH1/2, JH3, JH4/5, JH6; Sequenzen siehe Anhang) sowie erneut eines IgG-C-Primers erfolgte eine J- und IgG-C-spezifische Amplifikation eines jeden PCR-Produktes der Immunoscope-PCR, so dass sich für jede initial eingesetzte cDNA 30 VH-JH-Produkte ergaben, gemäß der Formel: (VH1, VH2, VH3, VH4, VH5, VH6) x (JH1/2, JH3, JH4/5, JH6, IgG-C). Die bei der Runoff-PCR verwendeten JH- und IgG-C-Primer sind mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert, die beim anschließenden Spektratyping die Auswertung ermöglichen.

In einem typischen PCR-Ansatz wurde in einer Mikrotiterplatte ein Reaktionsvolumen von 60 µl pro well angesetzt, bestehend aus 1,0 µl cDNA, 2,5 µl VH-Primer, 2,5 µl C-Primer bzw. JH-Primer, 0,6 µl 20mM dNTP, 6,0 µl 10x PCR-Puffer mit MgCl<sub>2</sub>, 0,3 µl Taq-Polymerase (AmpliTaq-Gold™, Perkin Elmer®, USA) mit einer Aktivität von 5U/µl sowie 47,1 µl DEPC-Wasser. Die PCR-Reaktion lief unter Verwendung eines Thermocyclers (Mastercycler™, Eppendorf®, Germany) in den folgenden Schritten ab: Inkubation für 5 min bei 94°C, dadurch Inaktivierung von Nukleasen und vollständige DNA-Denaturierung, anschließend für je 40 Zyklen 1 min bei 94°C zur Denaturierung der DNA. Es folgte das

Annealing der Primer bei 59°C für 1 min, anschließend für 3 min bei 72°C Synthese des neuen DNA-Stranges durch die Taq-Polymerase, Inaktivierung bei 94°C und Beginn des nächsten Zyklus. Nach dem letzten Zyklus abschließend 7 min bei 72°C zum Aufsynthetisieren der letzten DNA-Stränge und Abkühlung auf 4°C.

Die Annealingtemperatur der Primer wurde aus dem Schmelzpunkt der Primer nach der Formel  $(G/C \times 4 + A/T \times 2)$  bestimmt, wobei G/C dem Verhältnis Guanin zu Cytosin, A/T dem Verhältnis Adenin zu Thymin entspricht. Die Anzahl von 40 Zyklen hat sich aus vorhergehenden Experimenten als zuverlässig etabliert. Als Positivkontrolle wurde bei jedem PCR-Experiment das ubiquitär vorhandene  $\beta$ -Aktin-Gen mit amplifiziert, als Negativkontrolle diente ein kompletter Reaktionsansatz ohne Zugabe von cDNA. Zum Nachweis eines PCR-Produktes sowie zur Längen- und Spezifitätskontrolle erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte über ein 1%iges Agarose-Gel (Biomol®, Deutschland) mit Anfärbung durch Ethidiumbromid (Gibco-BRL®, Germany). Ein Längenstandard (Low-DNA mass ladder™, Gibco-BRL®, Germany) diente der Größenbestimmung der PCR-Produkte.

### **3.8. Fragment-Analyse Fluoreszenz-markierter CDR3-Produkte durch CDR3-Spektratyping**

Die Suche nach klonal expandierten Zellpopulationen, insbesondere von B- bzw. T-Zellen, stellt sich technisch kompliziert dar. Sensitivität und Spezifität sind bei verschiedenen Verfahren wie dem Sequenzieren nach dem Zufallsprinzip, verschiedenen RNase-Protektions-Assays und der FACS- oder immunhistologischen Analyse von Ig-Ketten mittels spezifischer monoklonaler Antikörper nicht zufriedenstellend. Das CDR3-Spektratyping stellt ein neueres molekularbiologisches Instrument mit exzellenter Sensibilität und Spezifität dar, mit dem man effizient und in Abhängigkeit der verwendeten Primer gezielt das gesamte T-Zell-Rezeptor- bzw. B-Zell-Immunglobulin-Repertoire eines Individuums auf molekulargenetischer Ebene analysieren kann (Pannetier C et al., 1995).

Grundlage des CDR3-Spektratypings ist die durch die beschriebenen Mechanismen der somatischen Rekombination bedingte molekulargenetische Variabilität insbesondere der CDR3-Region jeder B-Zelle, die gewissermaßen als „genetischer Fingerabdruck“ für eine molekulargenetische Charakterisierung einer B-Zell-Population sowie zur Identifikation bestimmter B-Zell-Klone besonders gut geeignet ist.



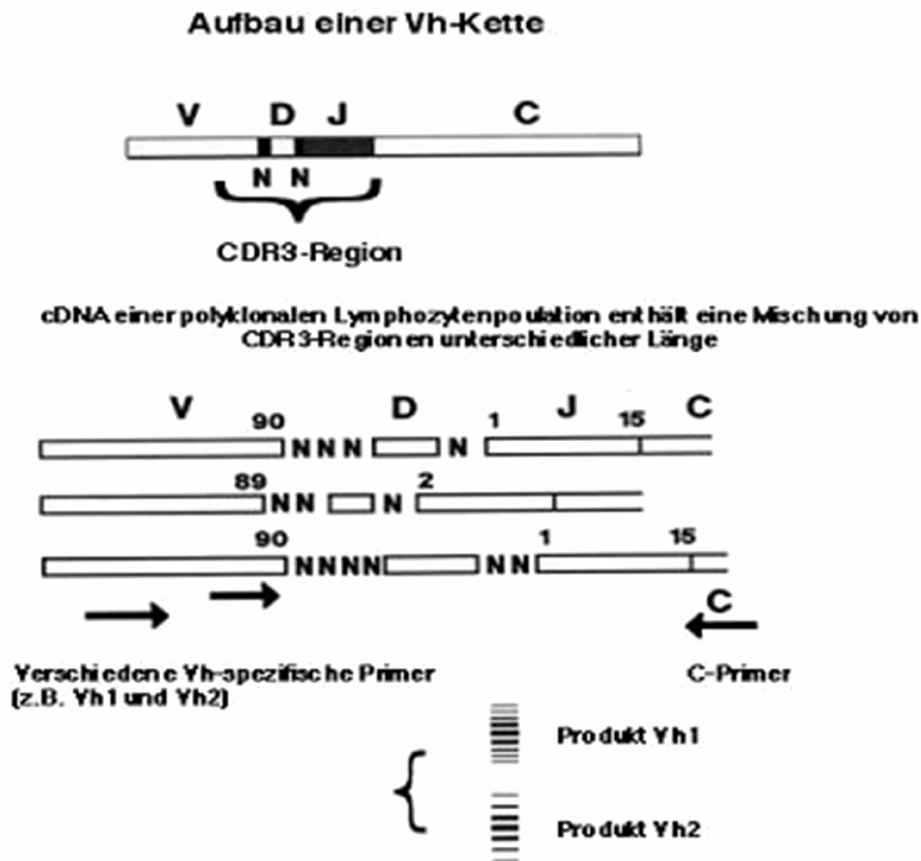


Abb. 3.3.: Die CDR3-Region der schweren Immunglobulinkette setzt sich aus verschiedenen Gen-Segmenten zusammen. Nach der ersten PCR („Immuno“) besteht das PCR-Produkt aus DNA-Fragmenten einer VH-Familie, da dieser Primer der Reaktion vorgegeben war. Die C-Region aller Fragmente ist identisch. Unterschiedlich sind die DNA-Fragmente bezüglich der zufällig arrangierten V-, D- und J-Gene. Nach dem Prinzip der Normalverteilung ist eine mittlere Größe an DNA-Fragmenten am häufigsten zu finden, so dass die graphische Darstellung der markierten DNA-Fragmente eine Gauß-Verteilung ergibt (modifiziert aus Gorski et al., 1995).

Die Abbildung 3.3 zeigt schematisch das Prinzip des CDR3-Spektrotyping: Am Anfang steht wie beschrieben eine PCR mit Amplifikation der Zielregion durch spezifische Immunglobulin-Primer. Im Falle der B-Zellen werden VH-Primer der schweren Kette als „forward“-Primer eingesetzt und mit einem C-Primer der schweren Kette als „backward“-Primer kombiniert. Nach dieser ersten PCR („Immunoscope“) erfolgt durch eine zweite PCR („Run-off“) eine Markierung der verschiedenen VH-Produkte mit jeweils 5 mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Primern der C- bzw. der J-Region.

Innerhalb eines VH-JH-Produktes liegen aufgrund der unterschiedlichen Nukleotid-Anzahl in V-, D- und J-Region stets CDR3-Fragmente unterschiedlicher Längen vor. Bei einer Auftrennung des fluoreszenzmarkierten VH-JH-Produkts über ein Polyacrylamid-Gel können diese Längenunterschiede dargestellt und mittels Laser detektiert werden. Bei einer hohen Anzahl CDR3-spezifischer DNA-Fragmente eines VH-JH-Produktes ergibt sich nach dem

Prinzip der Normalverteilung eine mittlere Größe von DNA-Fragmenten und im CDR3-Spektratyping zeigt sich das Bild einer typischen Gauß-Kurve: Um eine mittlere Länge streuen andere Längen der CDR3-Region mit abnehmender Häufigkeit.

Liegt eine bestimmte CDR3-Region im Rahmen einer monoklonalen Expansion der entsprechenden B-Zelle überproportional häufig vor, so zeigt sich dagegen ein monoklonaler Peak: Die CDR3-DNA-Fragmente wandern im Polyacrylamid-Gel auf gleicher Höhe und sind damit von identischer Länge. Aus CDR3-Analysen an der schweren Kette des T-Zell-Rezeptors weiß man, dass die Sensitivität der Methode zum Nachweis eines einzelnen expandierten Klons bei etwa 1:5000 Zellen liegt (u.a. Puisieux I et al., 1994 und eigene Daten).

Die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurden zur Durchführung des CDR3-Spektratypings zunächst durch Inkubation auf einem Heizblock bei 85°C für 30 Minuten eingedampft und anschließend in 1,0 µl Ladepuffer (blaues Dextran, 50 mg/ml; EDTA, 25mM), 2,5 µl Formamid (Merck®, Germany) sowie einem fluoreszierenden Größenstandard (TAMRA 350™, Applied Biosystems®, Germany) aufgenommen. Nach einer Denaturierung der Proben bei 85°C für 5 Minuten wurden die Proben auf Eis gekühlt und auf ein für 2 Stunden auspolymerisiertes 5%iges Polyacrylamid-Harnstoff-Gel (Long Ranger™ Single Pack, BioWhittaker Molecular Applications®, USA) aufgetragen. Mittels eines Sequenzierers (ABI377™, Applied Biosystems®, Germany) erfolgte die elektrophoretische Auftrennung über 2,5 Stunden bei einer Spannung von 3 kV. Ein angeschlossener Computer speicherte die Daten, die über eine spezielle Software (GeneScan ABI377™, Applied Biosystems®, Germany) ausgewertet wurden.

### **3.9. Sequenzierung der CDR3-Region**

Die CDR3-Spektratyping-Methode ist als Screening-Untersuchung zur Identifizierung monoklonal expandierter B-Zell-Populationen sehr gut geeignet, die genaue Analyse der CDR3-Region monoklonal expandierter Zellpopulationen auf molekularer Ebene wurde aber mittels Sequenzierung der CDR3-Region durchgeführt. Grundlegendes Prinzip der bei diesen Experimenten verwendeten Methode ist dabei die so genannte Dideoxy-Abbruch-Methode nach Sanger (Sanger F et al., 1977). Dabei werden im Rahmen einer Sequenzierungsreaktion in Analogie zur PCR DNA-Stränge synthetisiert, die aber durch den zufälligen Einbau von

2,3-Didesoxynucleotid-5'-Triphosphaten bei Fehlen eines freien 3'-Endes nicht weiter synthetisiert werden können und somit zum Abbruch gebracht werden. Die Triphosphate sind Fluoreszenz-markiert und entsprechend der vier Nukleotide Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin sind vier verschiedene Farbstoffe nötig. Durch den Überschuss der Triphosphate wird der DNA-Strang im Verlauf der Sequenzierungsreaktion an jeder Stelle der Matrix-Sequenz mindestens ein Mal zum Abbruch gebracht, wodurch Fluoreszenz-markierte DNA-Fragmente in allen Längen der Matrix-Sequenz generiert werden. Bei einer elektrophoretischen Auftrennung über ein Polyacrylamid-Gel reihen sich die synthetisierten Fragmente ihrer Größe entsprechend hintereinander auf und können durch ihre Fluoreszenzmarkierung mittels Laser detektiert werden. Ein Computer zeichnet die Fluoreszenzmarkierung jedes DNA-Fragmentes auf und erstellt die komplette DNA-Sequenz.

Vor der eigentlichen Sequenzierungsreaktion wurden die VH-IgG-C Produkte der Immunoscope-PCR in einer neuen PCR-Reaktion mit nicht fluoreszenz-markierten JH-Primern über 25 Zyklen amplifiziert („Subamplifikation“). Um Verunreinigungen aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde anschließend mit einem PCR-Aufreinigungssystem (QIAquick PCR-Purification-Kit®, Qiagen, Germany) eine Aufreinigung der Proben durchgeführt. Ein typischer Sequenzieransatz bestand aus 1 µl eines VH-spezifischen Primers (10µM Endkonzentration), 2µl Sequenzier-Mix, bestehend aus markierten Desoxy- und Didesoxynukleotiden (BigDye™, Applied Biosystems®, USA), 1 µl DNA-Polymerase (AmpliTaq-Gold™, Perkin Elmer®, USA), 6 µl DEPC-behandeltem Wasser sowie 6 µl des PCR-Produkts der Subamplifikation.

Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem Thermocycler (Mastercycler™, Eppendorf®, Germany) durchgeführt: Nach Vorinkubation für 10 Minuten bei 94°C folgte bei 59°C für eine Minute das Annealing der Primer und anschließend durch Erhitzen auf 72°C für 10 Minuten die DNA-Synthese. Diese Schritte wurden für 4 Zyklen wiederholt und die Probe abschließend bei 4°C gekühlt.

Vor Auftragen der Proben auf das Polyacrylamid-Gel erfolgte zur Entfernung von Restbeständen wie Primer, Nujol-Öl und fluoreszenzmarkierten Nukleotiden eine Aufreinigung der Sequenzierungsreaktion über Gelsäulchen (Qiagen DyeEx™ 2.0 Spin Kit, Qiagen®, Deutschland). Hierzu ließ man kleine Gelsäulchen mit 750 µl Wasser für 30 Minuten zu einem Gel verquellen. Die Säulchen wurden für 2 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert und mit den zu reinigenden Reaktionsansätzen beschickt. Dazu wurden 15 µl der Probe vorsichtig auf die Mitte der Gelsäule pipettiert und für 2 Minuten bei 3000 rpm durch

das Gelsäulchen zentrifugiert. Dadurch wurden Restbestände entfernt und die Probe als Eluat am Gefäßboden gesammelt und anschließend in einer Vakuumzentrifuge eingedampft. Die eingedampfte Probe wurde in 3,5 µl Formamid und 0,5 µl Ladepuffer (Applied Biosystems®, Deutschland) aufgenommen, anschließend für 2 Minuten bei 90°C denaturiert und auf ein 5%iges Polyacrylamid-Harnstoff-Gel (Long Ranger™ Single Pack, BioWhittaker Molecular Applications®, USA) aufgetragen. Mittels eines Sequenzierers (ABI377™, Applied Biosystems®, Germany) erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung über 3 Stunden bei einer Spannung von 3 kV.

Bei den Sequenzierungsexperimenten wurde in der Regel mit VH-spezifischen Primern sequenziert. Bei schlechter Sequenzierungsqualität wurde in Einzelfällen die Zielsequenz zusätzlich mit JH-spezifischen Primern von der Gegenseite sequenziert, um den komplementären DNA-Strang zu erhalten.

### **3.10. PCR mit Klon-spezifischen Primern**

Neben der Sequenzierung mit konventionellen VH- bzw. JH-Primern wurde in fünf Fällen die CDR3-Region mit speziellen Klon-spezifischen Primern amplifiziert (MWG-Biotech®, Germany, Sequenzen im Anhang). Sie wurden verwendet, wenn im Kompartiment-Vergleich zwischen Thymozyten und peripherem Blut bei identisch langen CDR3-Fragmenten potentiell gleiche CDR3-Sequenzen entsprechender VH-JH-Produkte vorlagen, die Sequenzierung beider CDR3-Regionen aber aufgrund eines oligo-polyklonalen CDR3-Spektratypings in Thymozyten- oder PBL-Fraktion jedoch nicht möglich war.

Ausgangspunkt war dabei ein im CDR3-Spektratyping detektiertes monoklonales CDR3-Fragment in der Thymozyten- bzw. Blutfraktion, bei dem die Sequenzierung der CDR3-Region erfolgreich gelang. Vom 3'-Ende (entspricht JH) gesehen die ersten 24 Nukleinsäuren dieser CDR3-Sequenz dienten dann als Matrize für die Sequenz des klonspezifischen Primers. Für den Fall einer identischen CDR3-Sequenzen entsprechender VH-JH-Produkte in PBL und Thymus sollte es dem klon-spezifischen Primer bei vorgegebener CDR3-Sequenz des einen Kompartimentes in einer PCR gelingen, gleichsam als Gensonde an seine entsprechende Sequenz des anderen Kompartimentes zu binden und eine Amplifikation der Zielsequenz zu ermöglichen. Der methodische Ablauf der PCR-Experimente mit Klon-spezifischen Primern ist dabei identisch mit den oben angegebenen Schritten der mit konventionellen Primern durchgeführten Experimente.

## Prinzip der Klon-spezifischen Primer

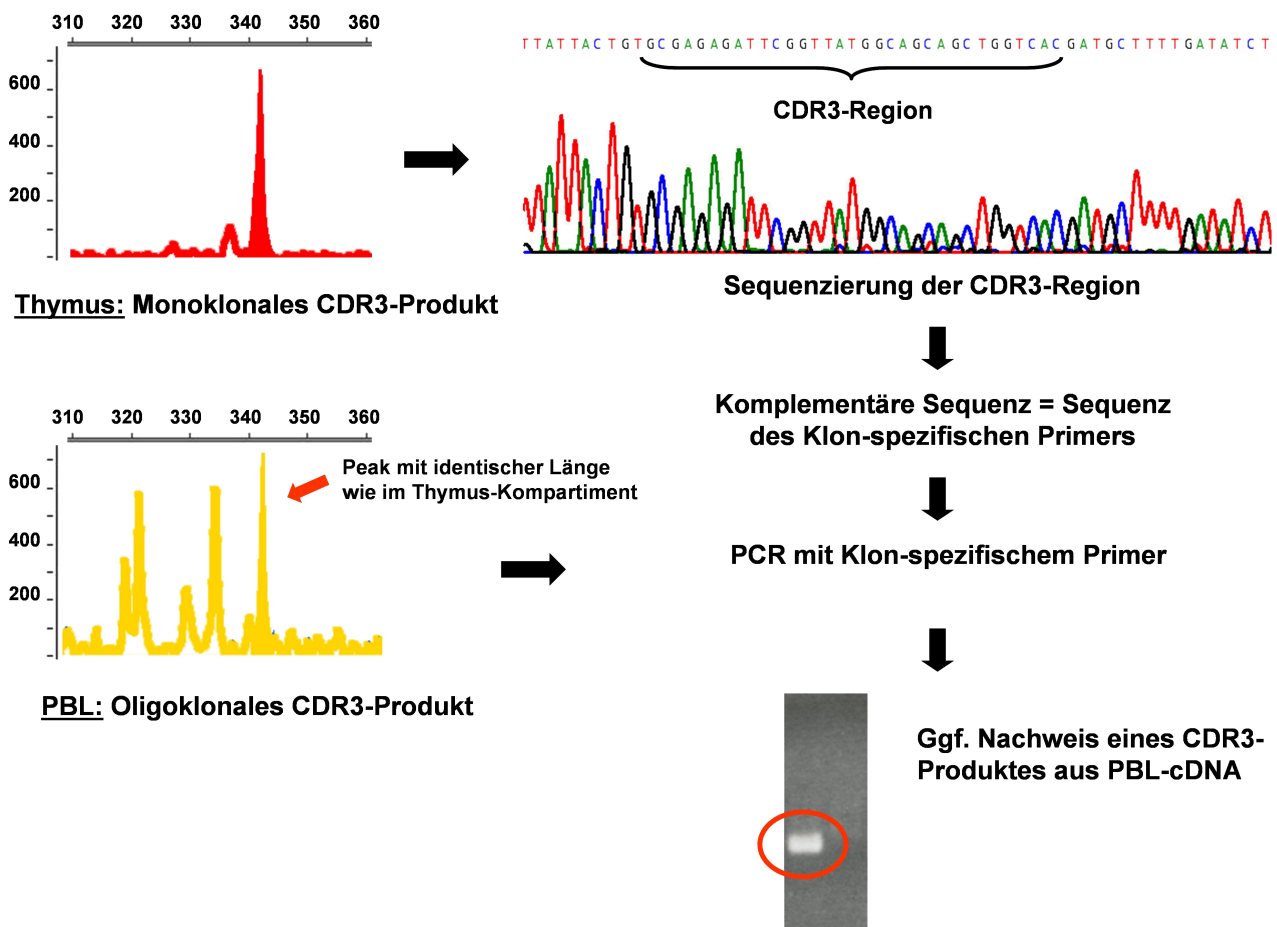


Abb. 3.4.: Prinzip der Klon-spezifischen Primer: In einigen Fällen gelang bei Mischsequenzen aus oligo- oder polyklonalen Populationen keine direkte Sequenzierung der CDR3-Region mittels konventionellen VH-Primern. Hier wurde durch eine PCR mit klon-spezifischen Primern eine Amplifikation eines CDR3-Fragmentes versucht („Gensonde“).

Mit konventionellen VH-Primern und einem klon-spezifischen JH-Primer als backward-Primer wurde eine Klon-spezifische PCR durchgeführt, bei der die cDNA aus Thymusgewebe und PBL amplifiziert wurde. Bei einer identischen CDR3-Region in beiden Kompartimenten kommt es durch den Klon-spezifischen Primer zur Amplifikation eines spezifischen CDR3-Produktes in beiden Kompartimenten. Bei unterschiedlicher CDR3-Sequenz hingegen kommt es dagegen nur in dem Kompartiment, das als Matrize für die Primer-Sequenz diente, zu einem spezifischen CDR3-Produkt, während der Primer im anderen Kompartiment nicht an den DNA-Strang binden kann und es daher zu keiner Amplifikation eines spezifischen CDR3-Produktes kommt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. CDR3-Spektratyping-Analysen von CD19+Thymozyten

#### 4.1.1. Anzahl und Anteil der amplifizierten CDR3-Fragmente bei Patienten und Kontrollen im Verhältnis zur Gesamtzahl der analysierten CDR3-Fragmente

Wie beschrieben wurden aus dem Thymusgewebe von jeweils fünf MG-Patienten mittels Dynabeads®-Separation CD19+Thymozyten separiert, deren RNA isoliert und cDNA mittels reverser Transkription synthetisiert. Durch Verwendung von VH- und JH- bzw. IgG-C-spezifischen Primern erfolgte mittels PCR eine Amplifikation der CDR3-Region der schweren Immunglobulinkette. Pro Patient wurden bei Verwendung von 6 VH-Primern in Kombination mit 4 JH-Primern plus einem IgG-C-Primer  $6 \times (4+1) = 30$  verschiedene CDR3-Fragmente pro Patient untersucht. Bei fünf Patienten wurden insgesamt 150 CDR3-Fragmente analysiert.

Nicht jede PCR führte dabei zu einer Amplifikation eines CDR3-Fragments. Tatsächlich kam es bei den CD19+Thymozyten der Patientengruppe in 74 der 150 theoretisch möglichen Fälle zur Amplifikation eines CDR3-Fragments, in 76 der 150 Möglichkeiten kam es dementsprechend zu keiner Amplifikation eines CDR3-Fragments. Der prozentuale Anteil der amplifizierten CDR3-Regionen liegt bei 49,3%. Es zeigte sich eine deutliche interindividuelle Variabilität in Bezug auf Anzahl und Anteil der amplifizierten CDR3-Fragmente. Bei Patient „Str“ gelang in lediglich 2 von 30 möglichen Fällen eine spezifische Amplifikation, während bei Patient „Jas“ in 25 von 30 Fällen die CDR3-Region amplifiziert werden konnte (Tabelle 4.1).

|   | $\Sigma$ Patienten | AM   | Bar | Jas  | Str | Vos  |
|---|--------------------|------|-----|------|-----|------|
| <b>analysierte CDR3-Fragmente insgesamt</b>     | <b>150</b>         | 30   | 30  | 30   | 30  | 30   |
| <b>tatsächlich amplifizierte CDR3-Fragmente</b> | <b>74</b>          | 17   | 12  | 25   | 2   | 18   |
| <b>Anteil in %</b>                              | <b>49,3</b>        | 56,7 | 40  | 83,3 | 6,7 | 60,8 |

Tab. 4.1.: Anzahl und Anteil der amplifizierten CDR3-Fragmente insgesamt und bei den verschiedenen MG-Patienten: Es zeigt sich eine erhebliche interindividuelle Variabilität bezüglich der Anzahl der amplifizierten CDR3-Fragmente.

In der Kontrollgruppe wurden pro Kontrolle 30 mögliche VH-JH- bzw. VH-IgG-C-Primerkombinationen untersucht. Bei vier Kontrollen wurden insgesamt 120 mögliche CDR3-Regionen untersucht. In 105 der 120 Fälle konnte eine CDR3-Region amplifiziert werden (prozentualer Anteil 87,5%), in 15 Fällen gelang keine Amplifikation eines CDR3-spezifischen PCR-Produkts. Im Vergleich mit der Patientengruppe zeigen sich bei den Kontrollen damit deutlich weniger ausgeprägte interindividuelle Unterschiede in Bezug auf den Anteil der tatsächlich amplifizierten CDR3-Regionen (vgl. Tabelle 4.2).

|   | $\Sigma$ Kontrollen | Kontrolle 1 | Kontrolle 2 | Kontrolle 3 | Hum fet Thy cDNA |
|---|---------------------|-------------|-------------|-------------|------------------|
| <b>analysierte CDR3-Fragmente insgesamt</b>     | <b>120</b>          | 30          | 30          | 30          | 30               |
| <b>tatsächlich amplifizierte CDR3-Fragmente</b> | <b>105</b>          | 27          | 25          | 27          | 26               |
| <b>Anteil in %</b>                              | <b>87,5</b>         | 90,0        | 83,3        | 90,0        | 86,6             |

Tab.4.2.: Anzahl und Anteil der amplifizierten CDR3-Fragmente insgesamt und bei den einzelnen Kontrollen: Deutlich weniger interindividuelle Unterschiede als in der Patientengruppe.

#### **4.1.2. Mono-, oligo- und polyklonale CDR3-spezifische VH-JH- und VH-IgG-C-Produkte aus CD19+Thymozyten von Patienten und Kontrollen**

Die amplifizierten CDR3-spezifischen VH-JH- bzw. VH-IgG-C-Produkte der schweren Immunglobulinkette von CD19+Thymozyten aus MG-Patienten und Kontrollen wurden in Abhängigkeit von der Anzahl der amplifizierten CDR3-Fragmente innerhalb eines VH-JH- bzw. VH-IgG-C-Produkts in monoklonale, oligoklonale und polyklonale CDR3-spezifische DNA-Fragmente unterteilt.

Als „monoklonal“ wurden solche CDR3-Fragmente bezeichnet, bei denen es durch einen klonal expandierten B-Zell-Klon zur Amplifikation von CDR3-Fragmenten identischer Länge gekommen ist. Die Auswertung eines solchen CDR3-Spektratypings zeigt einen monoklonalen Peak. Monoklonal expandierte B-Zell-Klone sind besonders interessant, weil sie im Rahmen einer Autoimmunreaktion auf aktivierte B-Zellpopulationen hindeuten könnten. Bei CDR3-Fragmenten unterschiedlicher Länge zeigt sich dagegen das Muster einer

normalverteilten Gaußkurve. Als oligoklonale CDR3-Fragmente wurden Fragmente mit zwei bis fünf verschiedenen Längen definiert (vgl. Abbildung 4.2) Im Anhang sind sämtliche CDR3-Spektratypings der CD19+Thymozyten von Patienten und Kontrollen aufgeführt.

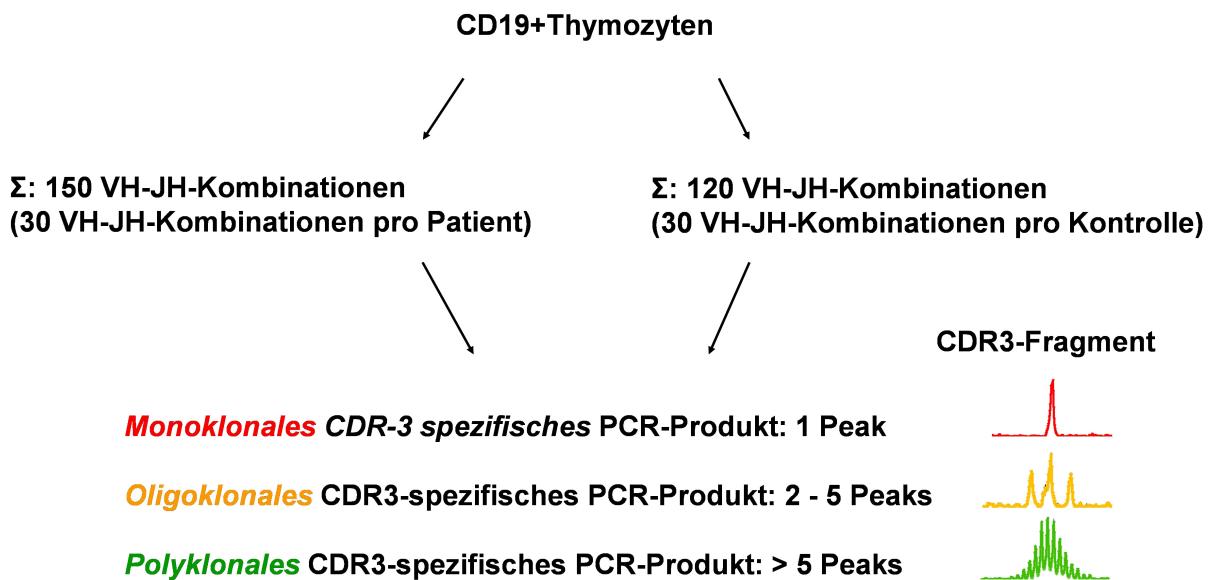
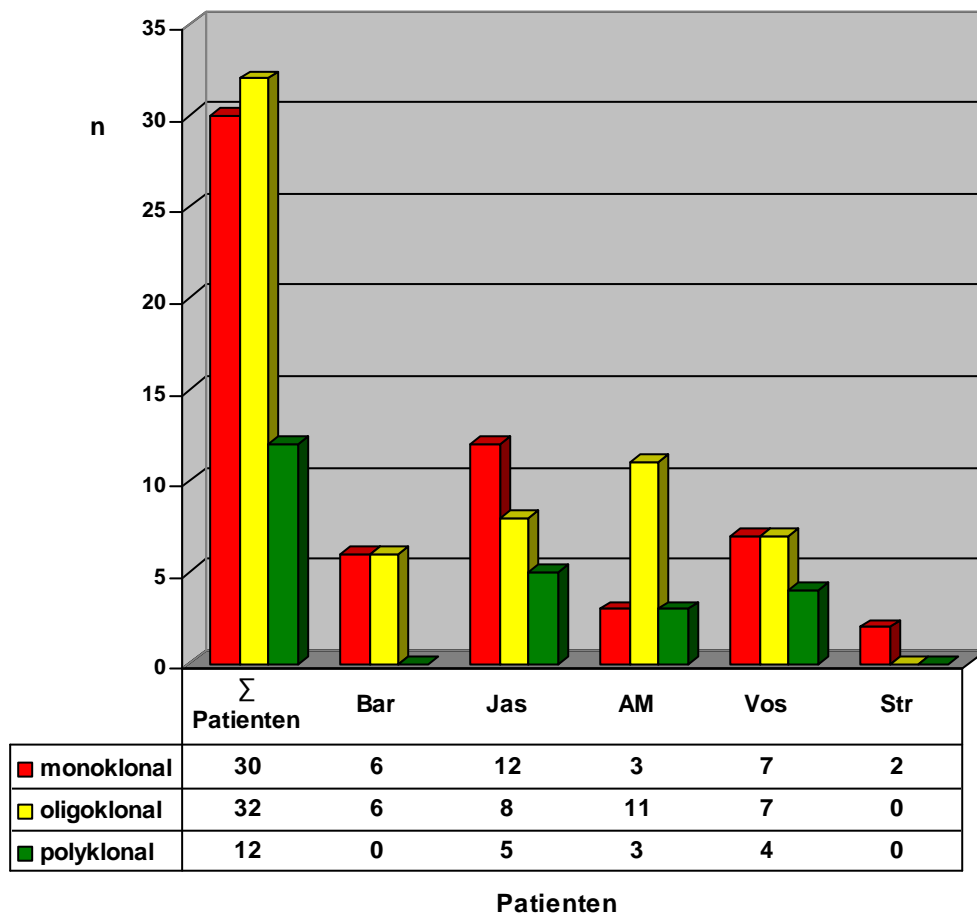


Abb. 4.1.: Farbkodierung und Definierung der mono-, oligo- und polyklonalen CDR3-Fragmente von CD19+Thymozyten: monoklonale CDR3-Fragmente stellen sich als einzelner Peak dar (rot). Oligoklonale (gelb) und polyklonale (grün) Peaks stellen sich dementsprechend dar.

In der Population der CD19+Thymozyten der Patientengruppe konnten insgesamt 30 monoklonale, 32 oligoklonale und zwölf polyklonale CDR3-Fragmente identifiziert werden. Die Patientengruppe zeigt mit 37,8% einen bemerkenswert hohen Anteil monoklonaler CDR3-Fragmente. Bei jedem einzelnen Patienten konnten darüber hinaus multiple monoklonale CDR3-Fragmente identifiziert werden (mindestens zwei bei Patient „Str“ und höchstens zwölf bei Patient „Jas“). Bei keinem Patienten fand sich lediglich ein einzelnes monoklonales CDR3-Fragment. Dies entspricht dem Nachweis verschiedener, parallel expandierter B-Zell-Klone bei allen Patienten (Abbildung 4.2).



CD19+Thymozyten der Patientengruppe: Anzahl mono-, oligo- und polyklonaler CDR3-Fragmente



mono-, oligo- und polyklonale CDR3-Fragmente  
CD19+Thymozyten von MG-Patienten (%)

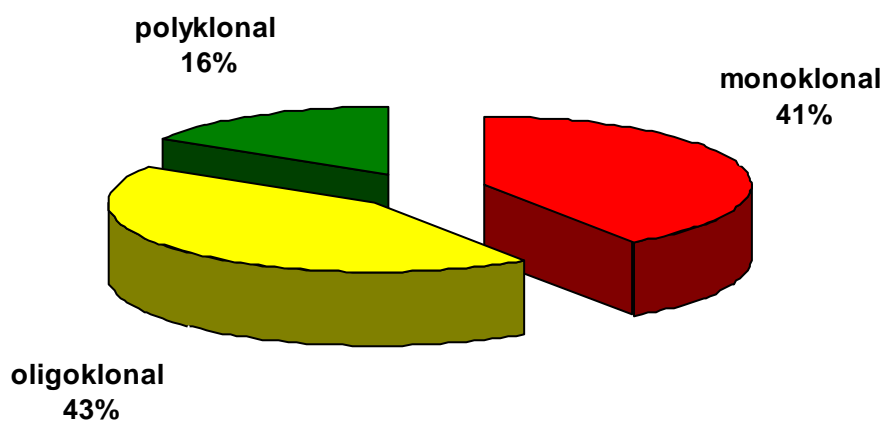
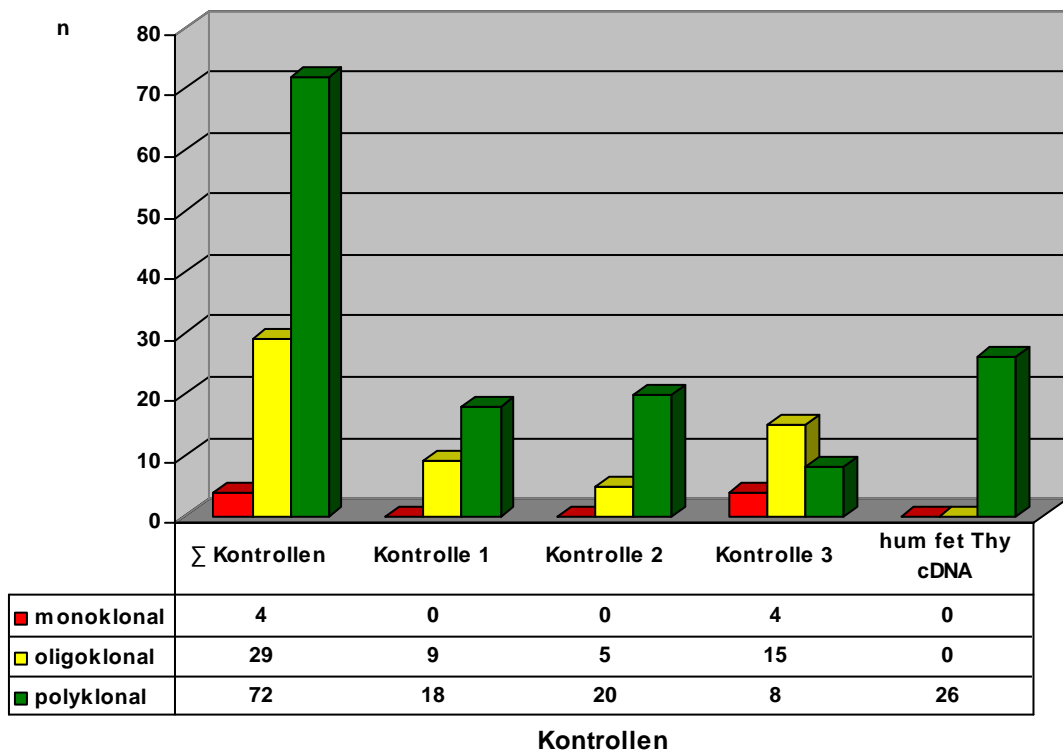


Abb. 4.2.: Anzahl und Anteil mono-, oligo- und polyklonaler CDR3-Fragmente von CD19+Thymozyten der Patientengruppe: bemerkenswert großer Anteil mono- und oligoklonal expandierter CDR3-Fragmente insgesamt und bei den einzelnen Patienten.

In der Kontrollgruppe der CD19+Thymozyten wurden bei insgesamt 105 CDR3-Fragmenten insgesamt vier monoklonale (Anteil 3,8%), 29 oligoklonale (Anteil 22,0%) und 72 polyklonale (Anteil 74,2%) CDR3-Fragmente identifiziert. Alle vier monoklonalen CDR3-spezifischen Amplifikate stammten aus dem Thymusgewebe von Kontrolle 3, alle anderen Kontrollen einschließlich der humanen fetalen Thymozyten-cDNA wiesen keine monoklonalen sondern nur oligo- und polyklonale CDR3-spezifische DNA-Fragmente auf. Bei den Kontrollen 1, 2 und 3 lagen neben den polyklonalen CDR3-Fragmenten insgesamt 23 oligoklonale CDR3-Fragmente vor (mindestens fünf bei Kontrolle 2, maximal elf bei Kontrolle 3). Bei der humanen fetalen Thymozyten-cDNA lagen ausschließlich polyklonale CDR3-Fragmente vor. Die polyklonalen CDR3-Fragmente bildeten bei allen Kontrollen den mit Abstand größten Anteil der insgesamt generierten CDR3-Fragmente (Abbildung 4.3.).

**CD19+Thymozyten von Kontrollen: Anzahl mono-, oligo- und polyklonaler CDR3-Fragmente**



**mono-, oligo- und polyklonale CDR3-Fragmente  
CD19+Thymozyten von Kontrollen (in %)**

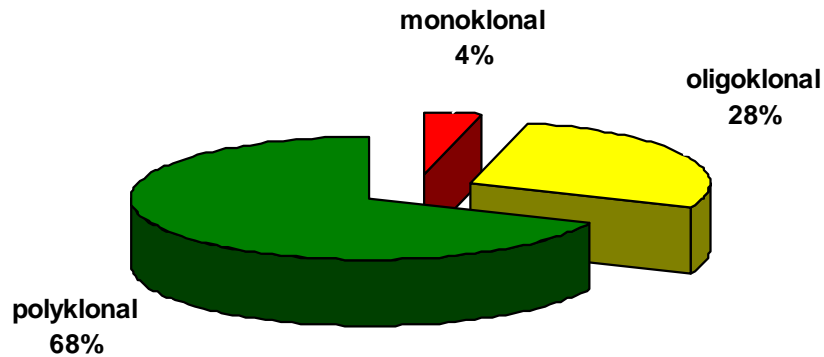


Abb. 4.3.: Anzahl (gegenüberliegende Seite) und Anteil mono-, oligo- und polyklonaler CDR3-Fragmente von CD19+Thymozyten der Kontrollen: Insgesamt und für die einzelnen Kontrollen finden sich deutlich mehr polyklonale CDR3-Fragmente als monoklonale CDR3-Fragmente.

Im Vergleich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe zeigten CD19+Thymozyten der Patientengruppe deutlich mehr monoklonale und damit expandierte CDR3-Fragmente als die Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 4.4.). In der Kontrollgruppe waren polyklonale CDR3-Fragmente am häufigsten. Für oligoklonal expandierte CDR3-Fragmente zeigte der Vergleich zwischen Kontrollen und Patienten weniger stark ausgeprägte Unterschiede mit mehr oligoklonalen CDR3-Produkten in der Gruppe der MG-Patienten. Im Thymus der Patientengruppe finden sich somit mehr konal expandierte CD19+ B-Zell-Klone als im Thymus der Kontrollpatienten.

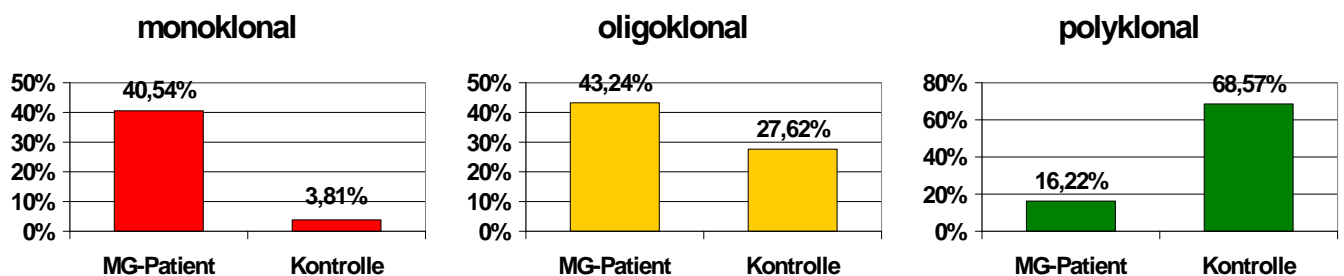


Abb. 4.4.: Die Anteile mono-, oligo- und polyklonaler CDR3-Fragmente von Patienten- und Kontrollgruppe im Vergleich: In der Patientengruppe finden sich deutlich mehr monoklonale CDR3-Fragmente als in der Kontrollgruppe. Umgekehrt finden sich in der Kontrollgruppe deutlich mehr polyklonale CDR3-Fragmente als in der Patientengruppe.

### 4.1.3. Die heterogene VH-JH- und VH-IgG-C-Zugehörigkeit klonal expandierter CDR3-Fragmente der CD19+Thymozyten der Patientengruppe

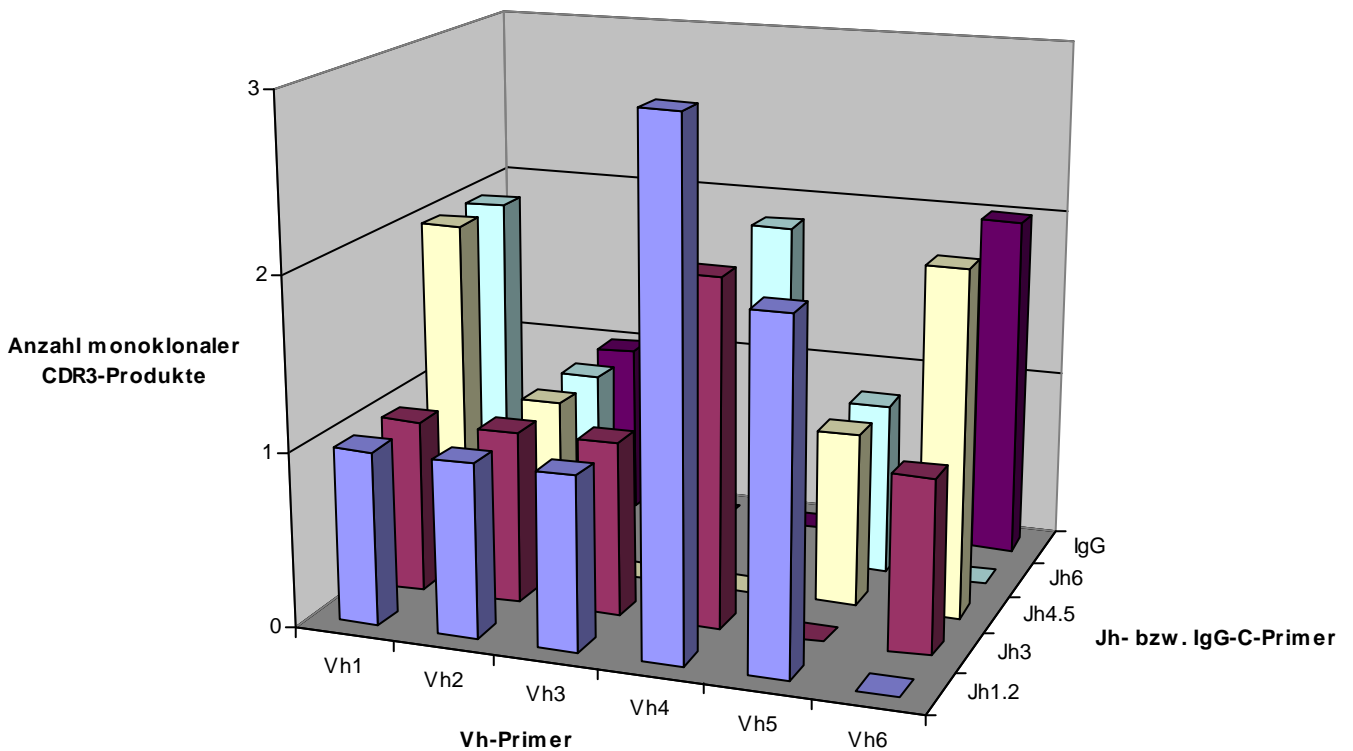
Insgesamt wurden in der Fraktion der CD19+Thymozyten der Patientengruppe durch das CDR3-Spektratyping 30 monoklonale CDR3-Fragmente identifiziert, die in Tabelle 4.3. dargestellt sind. Bemerkenswert ist, dass sich bei allen Patienten jeweils verschiedene monoklonale und damit klonal expandierte B-Zell-Klone identifizieren ließen. Bei keinem Patienten lag nur ein dominanter B-Zell-Klon vor. Die meisten klonal expandierten B-Zellpopulationen fanden sich mit zwölf monoklonalen CDR3-Fragmenten bei Patient „Jas“.. Dies ist gleichbedeutend mit einer bemerkenswerten Heterogenität der klonal expandierten B-Zell-Klone in Bezug auf ihre VH-JH- bzw. VH-IgG-C-Zugehörigkeit.

| Patient    | VH-JH-Zugehörigkeit monoklonaler CDR3-Fragmente CD19+Thymozyten  | $\Sigma$ |
|------------|--|----------|
| <b>Bar</b> | VH2-IgG, VH4-JH1/2, VH4-JH3, VH4-JH6, VH6-IgG, VH6-JH4/5   | 6        |
| <b>Str</b> | VH4-JH1/2, VH4-JH6   | 2        |
| <b>Vos</b> | VH1-JH4/5, VH1-JH6, VH4-JH3, VH5-JH4/5, VH5-JH6, VH6-IgG, VH6-JH4/5  | 7        |
| <b>AM</b>  | VH2-JH3, VH3-JH1/2, VH5-JH1/2  | 3        |
| <b>Jas</b> | VH1-JH1/2, VH1-JH3, VH1-JH4/5, VH1-JH6, VH2-JH1/2, VH2-JH4/5, VH2-JH6, VH3-JH3, VH3-JH6, VH4-JH1/2, VH5-JH1/2, VH6-JH3 | 12       |

Tab. 4.3.: Übersicht über die monoklonalen CDR3-Fragmente der CD19+Thymozyten der Patientengruppe: Bei allen fünf Patienten fanden sich multiple expandierte CD19+B-Zell-Klone

Bei drei Patienten wiesen klonal-expandierte CDR3-Fragmente eine VH4-JH1/2-Zugehörigkeit auf. Bereits sieben verschiedene VH-JH-Zugehörigkeiten fanden sich für jeweils zwei klonal-expandierte CDR3-Fragmente. Die übrigen 20 der 30 monoklonalen CDR3-Fragmente weisen 20 individuelle VH-JH- und VH-IgG-C-Zugehörigkeiten auf (Abbildung 4.5).

**Anzahl der CD19+ monoklonalen CDR3-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Vh/Jh- und Vh/IgG-C-Zugehörigkeit**



| klonal expandierte CDR3-Fragmente | VH-JH- und VH-IgG-Zugehörigkeit (CD19+Thymozyten)  |
|-----------------------------------|--|
| <b>3</b>                          | VH4-JH1/2  |
| <b>2</b>                          | VH1-JH4/5, VH1-JH6, VH4-JH3, VH4-JH6, VH5-JH1/2, VH6-JH4/5, VH6-IgG-C  |
| <b>1</b>                          | VH1-JH1/2, VH1-JH3, VH2-JH1/2, VH2-JH3, VH2-JH4/5, VH2-JH6, VH2-IgG-C, VH3-JH1/2, VH3-JH3, VH3-JH6, VH5-JH4/5, VH5-JH6 |
| <b>0</b>                          | VH1-IgG-C, VH3-JH4/5, VH3-IgG-C, VH4-JH4/5, VH4-IgG-C, VH5-JH3, VH5-IgG-C, VH6-JH1/2, VH6-JH6                          |

Abb. 4.5.: Anzahl der klonal expandierten CDR3-Fragmente der CD19+Thymozyten in Abhängigkeit ihrer VH/Jh- bzw. VH/IgG-C-Zugehörigkeit: Drei monoklonale CDR3-Fragmente mit einer VH4/JH1/2-Zugehörigkeit, sieben verschiedene VH/Jh- und VH/IgG-C-Zugehörigkeiten mit jeweils zwei monoklonalen CDR3-Fragmenten. Die übrigen monoklonalen B-Zell-Klone weisen eine individuelle VH/Jh- bzw. VH/IgG-C-Zugehörigkeit auf („Heterogenität“).

## 4.2. CDR3-Spektratyping-Analysen von CD138+Thymozyten

### 4.2.1. Anzahl und Anteil der amplifizierten CDR3-Fragmente bei Patienten und Kontrollen im Verhältnis zur Gesamtzahl der analysierten CDR3-Fragmente

Aus dem Thymusgewebe der fünf Patienten wurden neben CD19+Thymozyten auch CD138+Thymozyten isoliert und die CDR3-Region der schweren Immunglobulinkette der CD138+Thymozyten wurde wie beschrieben mittels CDR3-Spektratyping analysiert. Pro Patient wurden sechs VH-spezifische Primer verwendet, die mit vier JH- und einem IgG-C-spezifischen Primer zu 30 möglichen VH-JH- bzw. VH-IgG-C-Produkten pro Patient und damit insgesamt 150 möglichen CDR3-Fragmenten kombiniert wurden.

Ähnlich wie in der Fraktion der CD19+Thymozyten kam es aber nicht in allen Fällen zu einer Amplifikation eines spezifischen CDR3-Produktes, also einer CDR3-Region. Von insgesamt 150 möglichen CDR3-Fragmenten wurden in der Population der CD138+Thymozyten der Patientengruppe in 84 Fällen ein CDR3-Fragment amplifiziert (prozentualer Anteil 56%). In 66 Fällen kam es zu keiner Amplifikation eines CDR3-Fragments. Wie bei den CD19+Thymozyten zeigten sich zum Teil deutliche interindividuelle Unterschiede in Bezug auf den Anteil der amplifizierten CDR3-Fragmente (Tabelle 4.4).

|   | $\Sigma$ Patienten | AM   | Bar  | Jas  | Str  | Vos  |
|---|--------------------|------|------|------|------|------|
| <b>analysierte CDR3-Fragmente insgesamt</b>     | <b>150</b>         | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   |
| <b>tatsächlich amplifizierte CDR3-Fragmente</b> | <b>84</b>          | 22   | 18   | 19   | 5    | 20   |
| <b>Anteil in %</b>                              | <b>56,0</b>        | 73,3 | 60,0 | 63,3 | 16,7 | 66,6 |

Tab. 4.4.: Anzahl und Anteil der analysierten und tatsächlich amplifizierten CDR3-Fragmente insgesamt und für die einzelnen Patienten: Es zeigen sich deutliche interindividuelle Unterschiede in Bezug auf den Anteil der tatsächlich amplifizierten CDR3-Fragmente.

Bei Patient „Str“ konnten mit fünf von 30 möglichen CDR3-Fragmenten die wenigsten CDR3-Fragmente generiert werden (prozentualer Anteil 16,7%). Bei Patient „AM“ wurden mit 22 CDR3-Fragmenten die meisten CDR3-Fragmente generiert (prozentualer Anteil 73,3%).

Für die CD138+Thymozyten der drei Kontrollpatienten sowie einer gepoolten, humanen Thymozyten-cDNA ergaben sich bei der Kombination von 6 VH-spezifischen Primern mit 4 JH- und einem IgG-C-spezifischen Primer insgesamt 120 mögliche CDR3-Fragmente, je 30 pro Kontrolle. Bei den Kontrollen wurden in 110 der 120 möglichen Fälle ein CDR3-Fragment identifiziert (prozentualer Anteil 91,7%), in zehn Fällen konnte kein CDR3-spezifisches PCR-Produkt generiert werden. Im Vergleich zu den CD138+Thymozyten der Patientengruppe zeigen sich in der Kontrollgruppe weniger inter- und intraindividuelle Variationen in Bezug auf den Anteil der amplifizierten CDR3-Fragmente. Mit prozentualen Anteilen zwischen mindestens 86,7% (fetale humane Thymozyten cDNA) und 96,7% (Kontrolle 3) zeigte sich ein ausgewogenes Verhältnis (Tabelle 4.5).

|   | $\Sigma$ Kontrollen | Kontrolle 1 | Kontrolle 2 | Kontrolle 3 | Hum fet Thy cDNA |
|---|---------------------|-------------|-------------|-------------|------------------|
| <b>analysierte CDR3-Fragmente insgesamt</b>     | <b>120</b>          | 30          | 30          | 30          | 30               |
| <b>tatsächlich amplifizierte CDR3-Fragmente</b> | <b>110</b>          | 27          | 28          | 29          | 26               |
| <b>Anteil in %</b>                              | <b>91,7</b>         | 90,0        | 93,3        | 96,7        | 86,7             |

Tab. 4.5.: Anteil und Anzahl der analysierten und tatsächlich amplifizierten CDR3-Fragmente insgesamt und in Abhängigkeit der einzelnen Kontrollen: Deutlich weniger interindividuelle Unterschiede der tatsächlich amplifizierten CDR3-Fragmente als in der Patientengruppe.

#### 4.2.2. Mono-, oligo- und polyklonale CDR3-spezifische VH-JH- und VH-IgG-C-Produkte aus CD138+Thymozyten von Patienten und Kontrollen

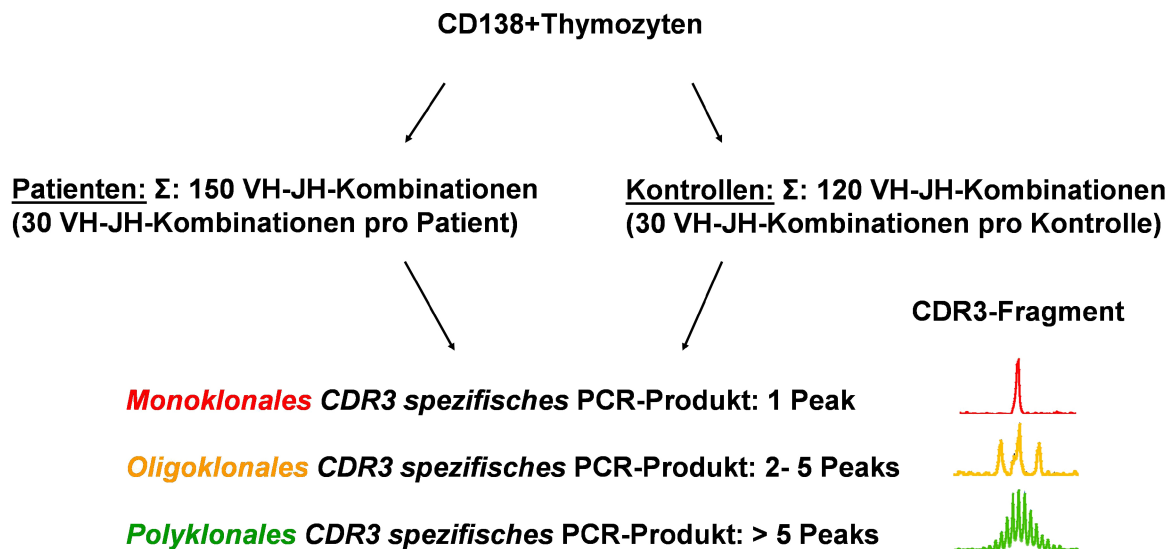


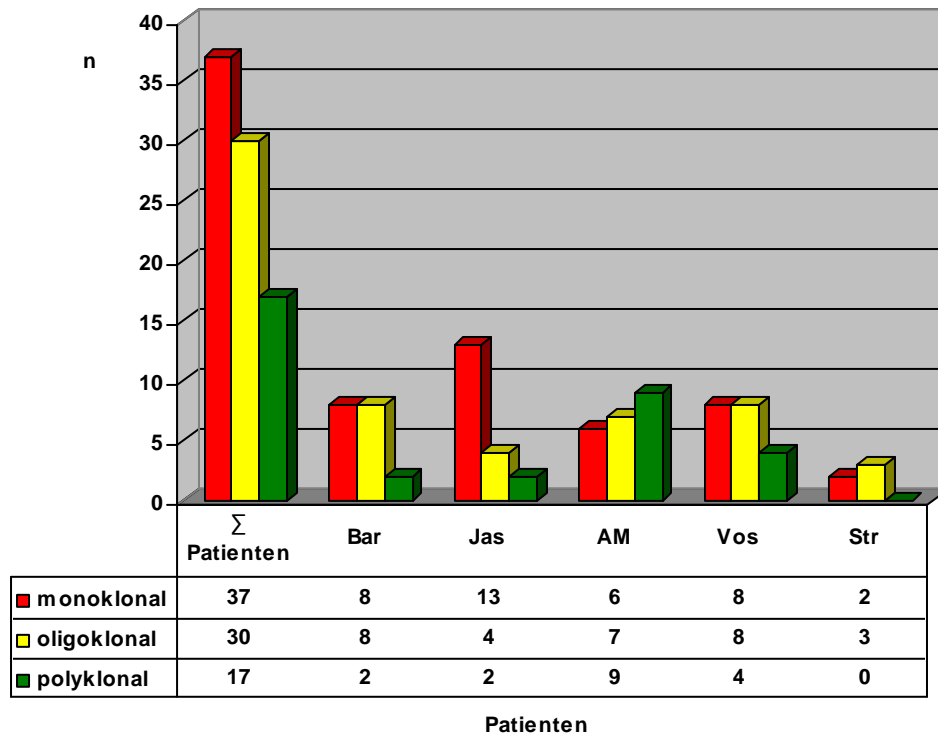
Abb. 4.6.: Farbkodierung und Definierung der mono-, oligo- und polyklonalen CDR3-Fragmente von CD138+Thymozyten: monoklonale CDR3-Fragmente stellen sich als einzelner Peak dar (rot). Oligoklonale (gelb) und polyklonale (grün) Peaks stellen sich dementsprechend dar.

In Abhängigkeit von der Anzahl der amplifizierten CDR3-Fragmente innerhalb einer VH-JH- bzw. VH-IgG-C-Zugehörigkeit wurden wie bei den CD19+Thymozyten monoklonale, oligoklonale und polyklonale CDR3-Fragmente unterschieden (vgl. Abbildung 4.6).

Auf diese Weise wurden in der Population der CD138+Thymozyten der Patientengruppe insgesamt 37 monoklonale, 30 oligoklonale und 17 polyklonale CDR3-Fragmente identifiziert. Mit einem prozentualen Anteil von 44,0% ist der Anteil der monoklonalen CDR3-Fragmente bemerkenswert hoch. 13 monoklonale CDR3-Fragmente wurden bei Patient „Jas“ identifiziert (prozentualer Anteil 68,4%), bei Patient „Str“ zeigten sich lediglich zwei monoklonale CDR3-Fragmente (prozentualer Anteil von 40%). Im Schnitt lag der Anteil monoklonaler CDR3-Fragmente aus CD138+ Thymozyten von MG-Patienten bei 44,0% (vgl. Abbildung 4.7).



**CD138+Thymozyten der Patientengruppe: Anzahl mono-, oligo- und polyklonaler CDR3-Fragmente**



**mono-, oligo- und polyklonale CDR3-Fragmente von CD138+Thymozyten der Patientengruppe (%)**

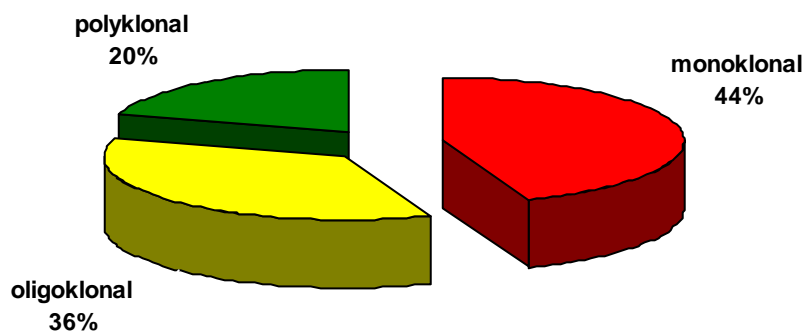
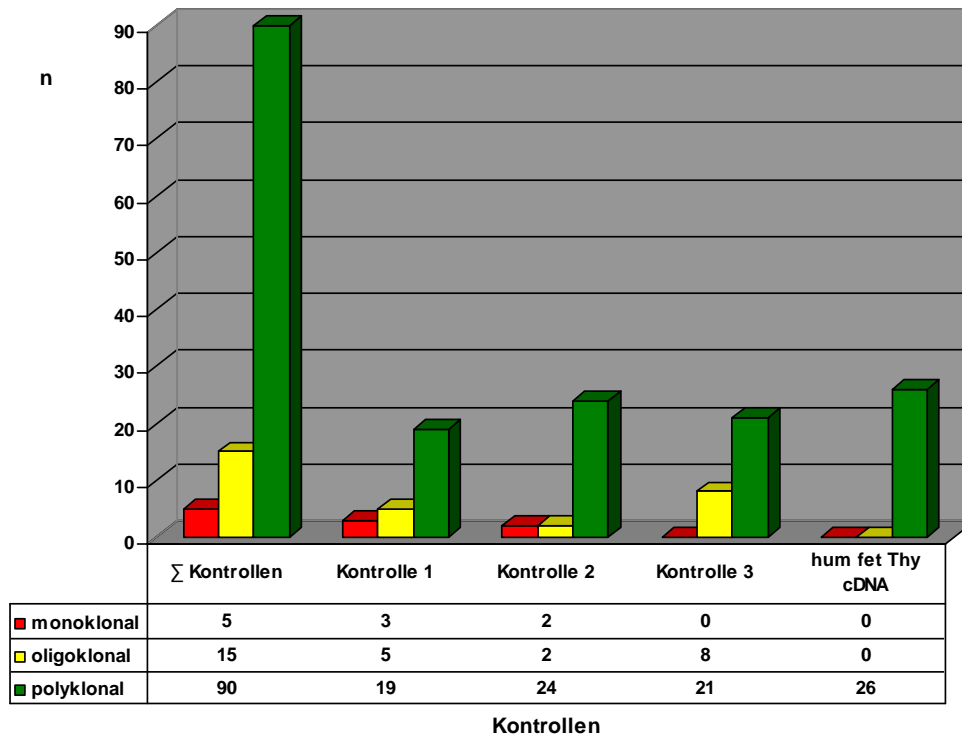


Abb. 4.7.: Anzahl und Anteil mono-, oligo- und polyklonaler CDR3-Fragmente von CD138+Thymozyten der Patientengruppe: Insgesamt und für die einzelnen Patienten zeigt sich ein hoher Anteil mono- und oligoklonal expandierter CDR3-Fragmenten.

In der Kontrollgruppe der CD138+Thymozyten wurden bei insgesamt 110 tatsächlich amplifizierten CDR3-Fragmenten fünf monoklonale (4,5%), 15 oligoklonale (13,6%) und 90 polyklonale (81,8%) CDR3-Fragmente identifiziert.

**CD138+Thymozyten der Kontrollgruppe: Anzahl mono-, oligo- und polyklonaler CDR3-Fragmente**



**mono-, oligo- und polyklonale CDR3-Fragmente CD138+Thymozyten von Kontrollen (%)**

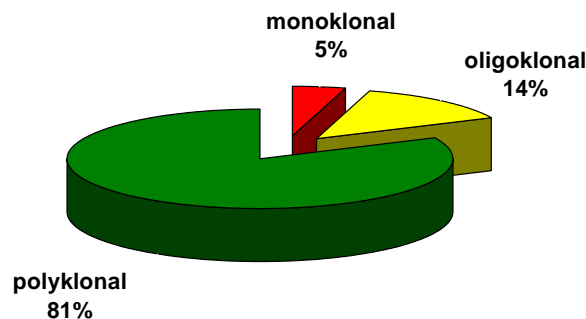


Abb. 4.8.: Anzahl und Anteil mono-, oligo- und polyklonaler CDR3-Fragmente von CD138+Thymozyten der Kontrollen: Polyklonale CDR3-Fragmente stellen den größten Anteil der amplifizierten CDR3-Fragmente dar, mono- und oligoklonale Amplifikate sind die Ausnahme.

Bei Kontrolle 1 wurden drei, bei Kontrolle 2 wurden zwei monoklonale CDR3-Fragmente generiert. Bei Kontrolle 3 sowie der humanen fetalen Thymozyten-cDNA wurden keine monoklonalen Amplifikate identifiziert. Bei den Kontrollen 1, 2 und 3 wurden zwischen zwei und acht oligoklonale CDR3-Fragmente amplifiziert, während bei der cDNA von gepoolten humanen fetalen Thymozyten nur polyklonale CDR3-Fragmente vorlagen. Die polyklonalen CDR3-Fragmente stellten insgesamt und bei allen Kontrollen den größten Anteil der generierten CDR3-Fragmente dar (Abbildung 4.8).

Im direkten Vergleich der CD138+Thymozyten der Patienten- und Kontrollgruppe konnten mittels CDR3-Spektratyping in der Patientengruppe somit deutlich mehr monoklonale CDR3-Fragmente identifiziert werden. In der Kontrollgruppe lagen ähnlich wie bei den CD19+Thymozyten praktisch nur polyklonale CDR3-Fragmente vor. Für oligoklonale CDR3-Fragmente zeigten sich weniger stark ausgeprägte Unterschiede. Wie bei den CD19+ B-Zell-Klonen zeigen sich auch bei den CD138+Thymozyten der Patientengruppe mehr klonal expandierte B-Zell-Klone (Abbildung 4.9).

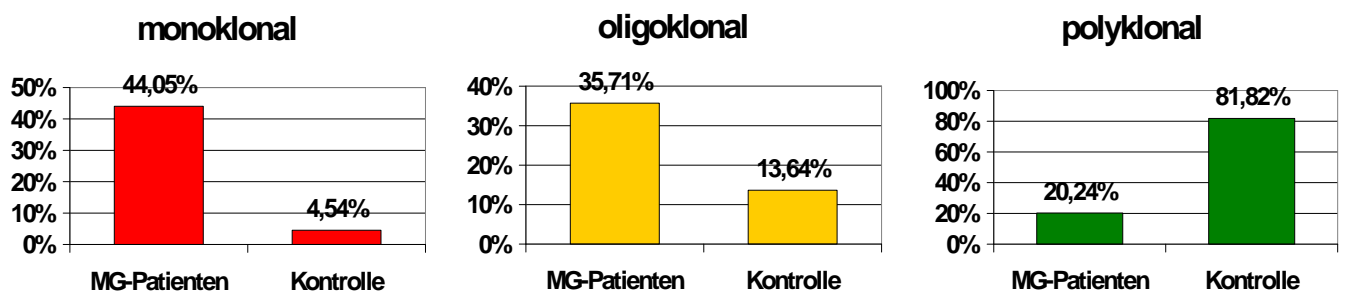


Abb. 4.9.: Die Anteile mono-, oligo- und polyklonaler CDR3-Fragmente der Patientengruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe: Deutlich mehr monoklonale CDR3-Fragmente in der Patientengruppe, entsprechend mehr klonal expandierte B-Zell-Klone. In der Kontrollgruppe liegen dagegen polyklonale CDR3-Fragmente vor.

### 4.2.3. Die heterogene VH-JH- und VH-IgG-C-Zugehörigkeit klonal expandierter CDR3-Fragmente der CD138+Thymozyten der Patientengruppe

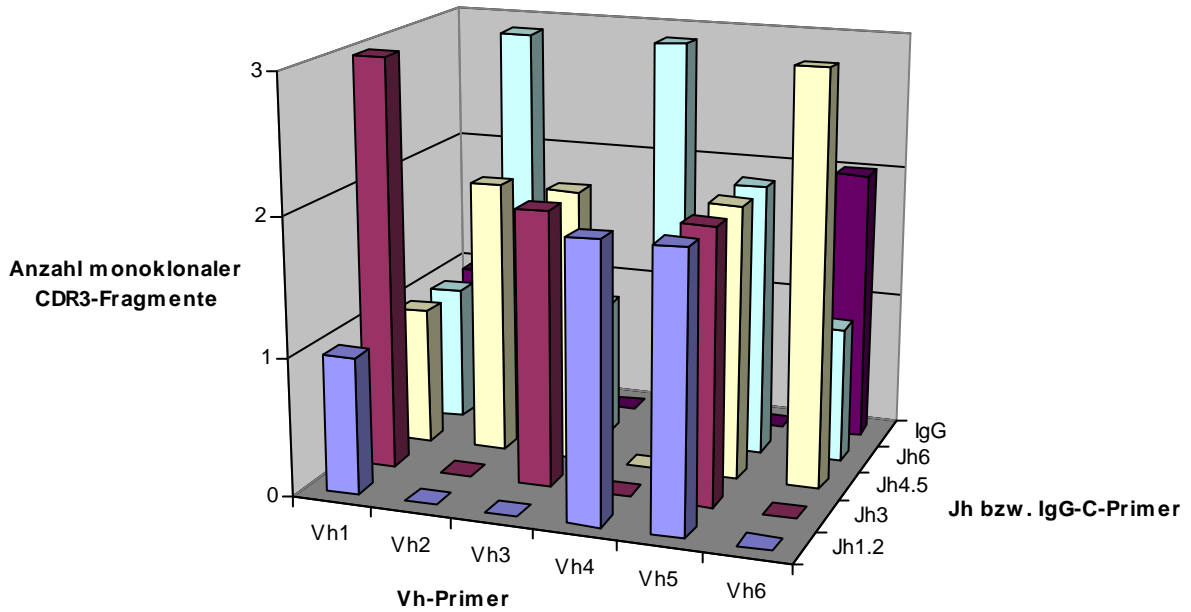
In der Fraktion der CD138+Thymozyten der Patientengruppe wurden durch CDR3-Spektratying insgesamt 37 monoklonale CDR3-Fragmente identifiziert. Tabelle 4.9 gibt eine Übersicht über die VH-JH- und VH-IgG-C-Zugehörigkeit dieser monoklonalen CDR3-Fragmente.

| Patient    | Monoklonale VH-JH-Produkte (CD138+ Thymozyten)  | $\Sigma$ |
|------------|---|----------|
| <b>Bar</b> | VH1-IgG, VH1-JH3, VH2-JH4/5, VH3-JH4/5, VH4-JH6, VH5-JH4/5, VH6-IgG, VH6-JH4/5  | 8        |
| <b>Jas</b> | VH1-JH3, VH1-JH4/5, VH2-IgG, VH2-JH6, VH3-JH3, VH3-JH4/5, VH3-JH6, VH4-JH1/2, VH4-JH6, VH5-JH1/2, VH5-JH6, VH6-IgG, VH6-JH4/5 | 13       |
| <b>AM</b>  | VH1-JH1/2, VH2-JH6, VH5-JH1/2, VH5-JH3, VH6-JH4/5, VH6-JH6  | 6        |
| <b>Vos</b> | VH1-JH3, VH1-JH6, VH2-JH4/5, VH2-JH6, VH4-JH1/2, VH5-JH3, VH5-JH4/5, VH5-JH6  | 8        |
| <b>Str</b> | VH3-JH3, VH4-JH6  | 2        |

Tab. 4.6.: Übersicht über die monoklonalen CDR3-Fragmente der CD138+Thymozyten der Patientengruppe.

Ähnlich wie bei den CD19+Thymozyten finden sich auch bei den CD138+Thymozyten der Patientengruppe multiple klonal expandierte B-Zell-Populationen, ohne dass bei einem der Patienten ein solitärer, dominanter B-Zell-Klon nachgewiesen werden konnte. Stattdessen zeigte sich erneut eine Heterogenität in Bezug auf die VH-JH- und VH-IgG-C-Zugehörigkeit der expandierten B-Zell-Populationen in der Patientengruppe: Die Analyse der VH-JH- und VH-IgG-C-Zugehörigkeit der monoklonalen CDR3-Fragmente zeigt vier verschiedene VH-JH-Genotypen, die jeweils für drei monoklonale CDR3-Fragmente verantwortlich sind (VH1-JH3, VH2-JH6, VH4-JH6 und VH6-JH4/5; bei CD19+Thymozyten nur VH4-JH1/2). In der Gruppe der CD138+Thymozyten kann im Vergleich zur Gruppe der CD19+Thymozyten somit eine größere Anzahl monoklonaler B-Zell-Klone auf eine kleinere Anzahl von VH-JH- bzw. VH-IgG-C-Zugehörigkeiten zurückgeführt werden. Neun VH-JH-Produkte führten zu jeweils zwei monoklonalen CDR3-spezifischen Amplifikaten. Für die restlichen VH-JH- und VH-IgG-C-Produkte fanden sich ein bzw. kein monoklonales CDR3-Amplifikat.

**Anzahl der CD138+ monoklonalen CDR3-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Vh/Jh- und Vh/IgG-C-Zugehörigkeit**



| <b>monoklonale CDR3-Produkte</b> | <b>VH-JH bzw. VH-IgG-Primer-Kombination (CD138+Thymozyten)</b>   |
|----------------------------------|--|
| 3                                | VH1-JH3, VH2-JH6, VH4-JH6, VH6-JH4/5   |
| 2                                | VH2-JH4/5, VH3-JH3, VH3-JH4/5, VH4-JH1/2, VH5-JH1/2, VH5-JH3, VH5-JH4/5, VH5-JH6, VH6/IgG-C            |
| 1                                | VH1-JH1/2, VH1-JH4/5, VH1-JH6, VH1-IgG-C, VH2-IgG-C, VH3-JH6, VH6-JH6                                  |
| 0                                | VH2-JH1/2, VH2-JH3, VH3-JH1/2, VH3-IgG-C, VH4-JH3, VH4-JH4/5, VH4-IgG-C, VH5-IgG-C, VH6-JH1/2, VH6-JH3 |

Abb. 4.9.: Anzahl der monoklonalen CDR3-Fragmente in Abhängigkeit der VH/Jh- bzw. VH/IgG-C-Produkts. Für die Genotypen VH1/Jh3, VH2/Jh6, VH4/Jh6 und VH6/Jh4/5 wurden jeweils drei monoklonale B-Zell-Klone identifiziert.

### 4.3. Vergleich zwischen klonal expandierten CD19+Thymozyten und klonal expandierten CD138+Thymozyten mittels CDR3-Spektratyping und Sequenzierung der CDR3-Region

Ziel des Vergleichs zwischen CD19+Thymozyten und CD138+Thymozyten war die Identifikation identischer Klone in beiden Zellpopulationen. Dazu wurden die CDR3-Spektratypings der CD19+Thymozyten mit CDR3-Spektratypings der CD138+Thymozyten verglichen. CDR3-Fragmente, die bei gleicher VH-JH-Zugehörigkeit in beiden Kompartimenten einer gleichen bzw. ähnlichen Länge zeigten waren von besonderem Interesse. In diesem Fall lagen potentiell identische CDR3-Sequenzen und damit auch potentiell identische B-Zell-Klone in beiden Zellpopulationen vor.

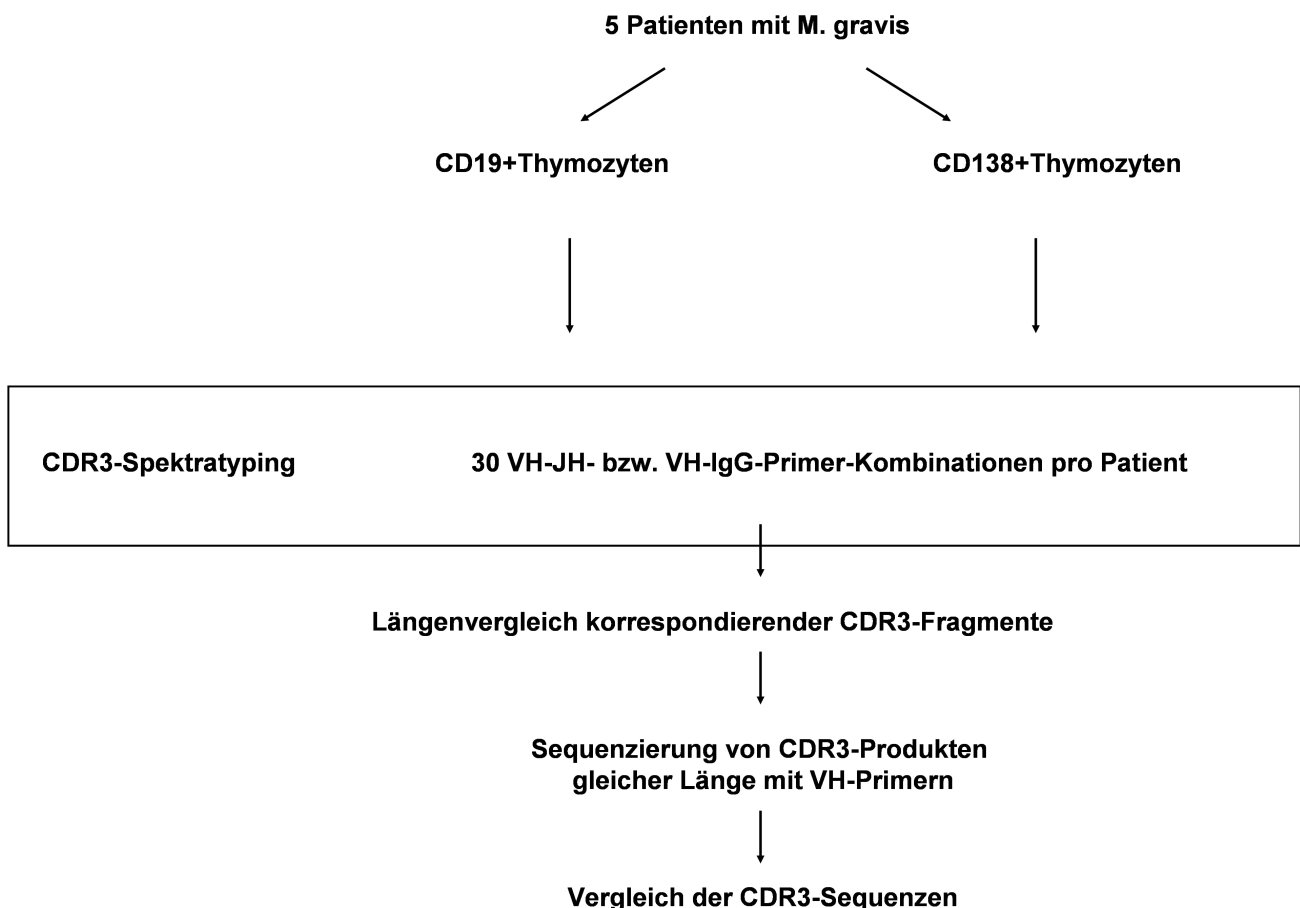


Abb. 4.10.: Übersicht über das Prinzip des Vergleichs von CD19+Thymozyten mit CD138+Thymozyten.

| Nr. | Patient-VH-JH-Produkt | Länge im CDR3-Spektratyping CD138/CD19 Thy (bp) | Charakterisierung im CDR3-Spektratyping CD138Thy | Charakterisierung im CDR3-Spektratyping CD19Thy | CDR3-Sequenz |
|-----|-----------------------|---|--|---|--------------|
| 1   | Bar-VH3-JH6           | 319/319   | oligoklonal                                      | oligoklonal                                     | ja           |
| 2   | Bar-VH4-JH1/2         | 313/313   | oligoklonal                                      | monoklonal                                      | ja           |
| 3   | Bar-VH4-JH3           | 310/310   | oligoklonal                                      | oligoklonal                                     | ja           |
| 4   | Bar-VH6-JH4/5         | 316/316   | monoklonal                                       | monoklonal                                      | ja           |
| 5   | Jas-VH1-JH3           | 318/315   | monoklonal                                       | monoklonal                                      | nein         |
| 6   | Jas-VH1-JH4/5         | 309/309   | monoklonal                                       | monoklonal                                      | nein         |
| 7   | Jas-VH1-JH6           | 356/356   | oligoklonal                                      | monoklonal                                      | nein         |
| 8   | Jas-VH3-JH3           | 322/322   | monoklonal                                       | monoklonal                                      | ja           |
| 9   | Jas-VH3-JH6           | 357/357   | monoklonal                                       | monoklonal                                      | ja           |
| 10  | Jas-VH6-JH4/5         | 310/310   | monoklonal                                       | oligoklonal                                     | nein         |
| 11  | AM-VH1-JH4/5          | 333/336   | <b>polyklonal</b>                                | <b>polyklonal</b>                               | nein         |
| 12  | AM-VH1-JH6            | 320/320   | <b>polyklonal</b>                                | <b>polyklonal</b>                               | nein         |
| 13  | AM-VH3-JH3            | 322/325   | oligoklonal                                      | oligoklonal                                     | ja           |
| 14  | AM-VH3-JH4/5          | 313/313   | <b>polyklonal</b>                                | <b>polyklonal</b>                               | nein         |
| 15  | AM-VH3-JH6            | 338/341   | <b>polyklonal</b>                                | <b>polyklonal</b>                               | nein         |
| 16  | AM-VH4-JH4/5          | 314/314   | <b>polyklonal</b>                                | <b>polyklonal</b>                               | nein         |
| 17  | AM-VH4-JH6            | 334/334   | <b>polyklonal</b>                                | <b>polyklonal</b>                               | nein         |
| 18  | Vos-VH1-JH4/5         | 323/323   | oligoklonal                                      | monoklonal                                      | ja           |
| 19  | Vos-VH2-JH4/5         | 358/361   | monoklonal                                       | oligoklonal                                     | nein         |
| 20  | Vos-VH3-JH6           | 328/325   | oligoklonal                                      | <b>polyklonal</b>                               | nein         |
| 21  | Vos-VH4-JH1/2         | 316/313   | monoklonal                                       | oligoklonal                                     | nein         |
| 22  | Vos-VH4-JH4/5         | 332/332   | <b>polyklonal</b>                                | <b>polyklonal</b>                               | nein         |
| 23  | Vos-VH4-JH6           | 328/331   | oligoklonal                                      | <b>polyklonal</b>                               | nein         |

Tab. 4.7.: Bei insgesamt 23 CD138+/CD19+Thymozyten-Paaren fanden sich CDR3-Fragmente identischer bzw. ähnlicher Länge. Bei 9 Paaren waren ein oder beide CDR3-Produkte polyklonal. Diese wurden nicht für den CD138/CD19-Vergleich herangezogen. Eine Sequenzierung der CDR3-Region wurde in insgesamt 8 der 16 verbliebenen Paare durchgeführt. Bp: Länge der CDR3-Produkte in Basenpaaren (base pairs).

Mit CD19+Thymozyten und CD138+Thymozyten wurden pro Patient je 30 CDR3-Spektratypings durchgeführt, insgesamt wurden bei fünf Patienten pro Zellpopulation 150 Spektratypings durchgeführt. Durch Vergleich der CDR3-Spektratypings beider Zellpopulationen konnten 23 CD19+/CD138+Thymozyten-Paare identifiziert werden, deren CDR3-Fragmente gleicher bzw. ähnlicher Länge waren. Bei den CD19+Thymozyten und bei den CD138+Thymozyten waren jeweils acht dieser 23 CDR3-Fragmente klonal expandiert („monoklonal“). Neun der 23 CD19+/CD138+Thymozytenpaare wiesen polyklonale CDR3-Fragmente auf und wurden nicht weiter untersucht. Von den verblieben 14 Paaren zeigten sich bei fünf CD19+/CD138+Paaren beide CDR3-Fragmente klonal expandiert.

### CD19+Thy vs. CD138+Thy

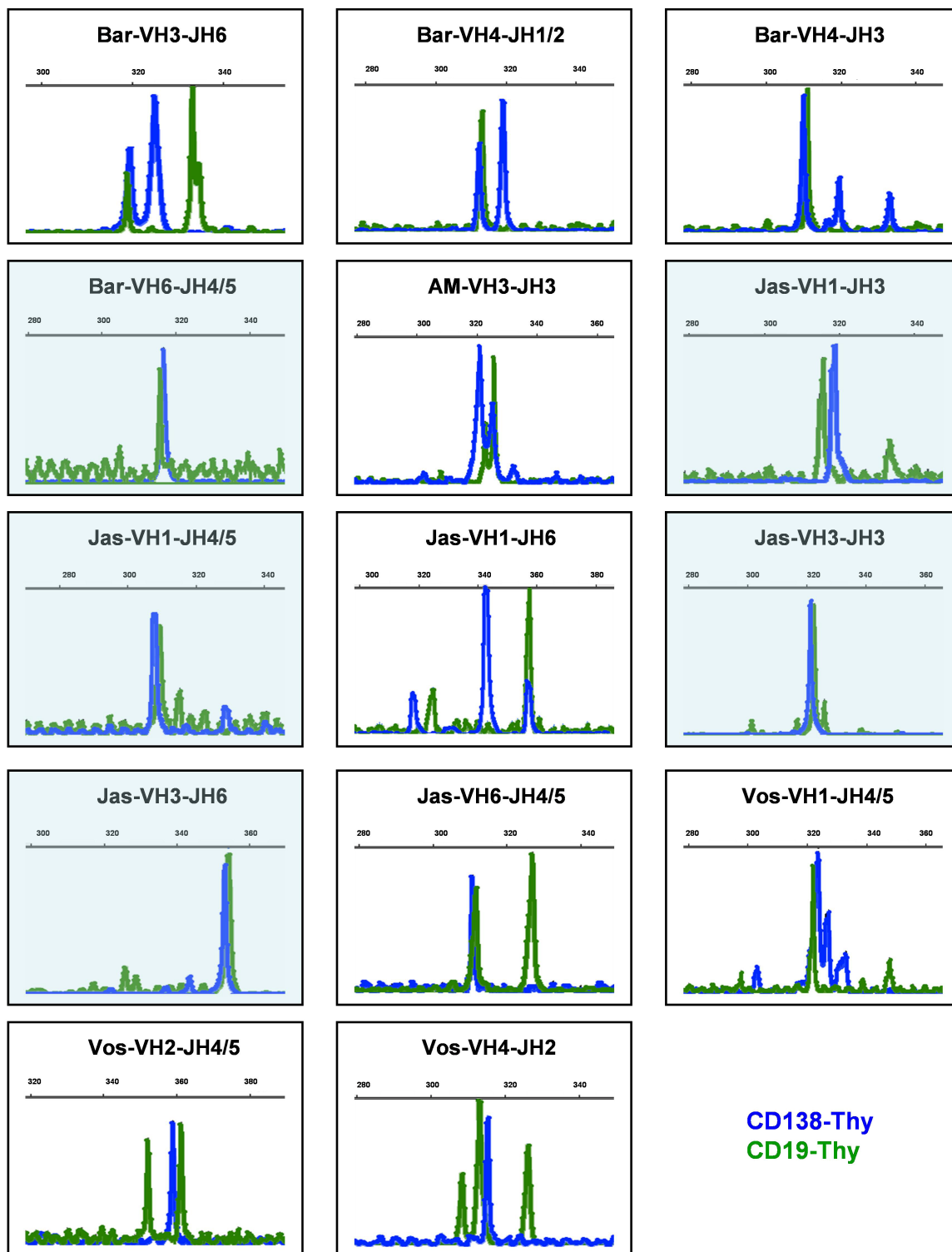


Abb. 4.11.: Übersicht über die CD19+/CD138+Thy-Paare mit identischer bzw. ähnlich langer CDR3-Region. Blau: CD138+Thy; grün: CD19+Thy; hellblau unterlegt sind Paare mit monoklonaler Expansion beider CDR3-Fragmente



Um identische CDR3-Sequenzen in beiden Zellpopulationen zu identifizieren wurde bei acht der 14 CD19+/CD138+Thymozyten-Paare eine genauere Charakterisierung der CDR3-Region durch Sequenzierung der CDR3-Region durchgeführt. Die acht ausgewählten CD19+/CD138+Thymozyten-Paare wiesen dabei im CDR3-Spektratyping entweder einen besonders hohen Grad der Übereinstimmung in bezug auf die Länge der CDR3-Region auf oder zeichneten sich durch eine besonders ausgeprägte klonale Expansion innerhalb ihrer Subpopulation aus.

Tabelle 4.8. zeigt die Nukleinsäuren-Sequenzen der CDR3-Regionen der acht untersuchten CD19+/CD138+Thymozyten-Paare. In drei Fällen konnte in einer der beiden Zellpopulationen keine lesbare CDR3-Sequenz amplifiziert werden, so dass bei diesen CD19+/CD138+Thymozyten-Paaren kein Vergleich der CDR3-Sequenzen möglich war. In keinem der übrigen Fälle konnte durch Vergleich der CDR3-Sequenzen der CD19+Thymozyten und CD138+Thymozyten eine identische CDR3-Sequenz gefunden werden. Auch in den besonders interessanten Fällen, in denen sich sowohl in der CD19+ als auch in der CD138+Population monoklonal expandierte CDR3-Fragmente identischer Länge zeigten, konnten keine identischen CDR3-Sequenzen gefunden werden (CD19+/CD138+Thymozyten-Paare Bar-VH6-JH4/5, Jas-VH1-JH3, Jas-VH1-JH4/5, Jas-VH3-JH3 und Jas-VH3-JH6, vgl. Abb. 4.11). Auch die detaillierte Analyse der Elektropherogramme bei Vorliegen von „Mischsequenzen“ innerhalb eines Elektropherogramms ergab keine Anhaltspunkte für identische Sequenzen.

Zusammenfassend konnten durch Vergleich der CDR3-Spektratypings von CD19+ und CD138+Thymozyten CDR3-Regionen mit identischer bzw. ähnlicher Länge identifiziert werden. Bei der genaueren Charakterisierung der CDR3-Region durch CDR3-Sequenzierung in ausgewählten Fällen konnten aber keine klonal expandierten B-Zellpopulationen mit identischer CDR3-Sequenz in beiden Zellpopulationen nachgewiesen werden.

| Patient-VH-JH        | Fragmentlänge<br>CDR3-<br>Spektrotyping | CDR3-Nukleinsäuresequenz der CD19+ und CD138+Thymozyten   |
|----------------------|---|---|
| <u>Bar-VH3-JH6</u>   |   |   |
| CD138+Thy            | 319 bp                                  | VH3 - TAT-TAT-TGT-GCG-AGA-GTA-GGG-GGG-TGT-AGT-AGG-GGT-GGT-AGT-TGC-TAC-TAC-ATG-GAC - JH6                   |
| CD19+Thy             | 319 bp                                  | VH3 - TAT-TAC-TGT-GCG-AGA-GGT-ATC-GAG-GAT-CAT-CAC-CTC-CCC-GGG-Axx-TAC-TAC-TAC-TAC - JH6                   |
| <u>Bar-VH4-JH1/2</u> |   |   |
| CD138+Thy            | 313 bp                                  | CDR3-Sequenz nicht lesbar   |
| CD19+Thy             | 313 bp                                  | VH4 - TAC-TAT-TGT-ACC-AGA-GAT-GAA-AGA-ATT- <b>CGG-GCC-ATC-AAT-TGG-TTT-GCT</b> -TAC-TGG-GGC-CAA - JH1/2    |
| <u>Bar-VH4-JH3</u>   |   |   |
| CD138+Thy            | 311 bp                                  | VH4 - TAT-TAC-TGT-GCG-AGA-CAA-GAT-AGT-AGT- <b>GGT-TTC-TAT-GCT-TTT-GAT-ATG</b> - JH3                       |
| CD19+Thy             | 311 bp                                  | VH4 - TAT-TAC-TGT-GCG- <b>GGT-ATG-ACA-GTG-GGT-TTT-AGG-GCT-TTT-GAT-ATC</b> - JH3                           |
| <u>Bar-VH6-JH4/5</u> |   |   |
| CD138+Thy            | 316 bp                                  | VH6 - TAT-TAC-TGT-GCA-AGA-TAA-TTA-GGC-AAC-AGC-TGG-CTT-GAC-TAC-TGG - JH4/5                                 |
| CD19+Thy             | 316 bp                                  | VH6 - TAT-TAC-TGT-GCA-AGA-GAG-AAT-CAC-AAC-TGC-TTC-TTC-AAC-TAC-TGG-GGC-CAG - JH4/5                         |
| AM-VH3-JH3           |   |   |
| CD138+Thy            | 325 bp                                  | VH3 - TAT-TAC-TGT-GCG-AGA-CAC-ATA-TAT-TGT-GAC-TTT-GAC-TGT-AAAT-GCT-TTT-GAT - JH3                          |
| CD19+Thy             | 325 bp                                  | VH3 - TAT-TAC-TGT-GCG-AGA-CAC-CAA-CAT-TGT-GAC-TTT-GAT-TGT-AAAT-GGT-TTT-GAT - JH3                          |
| <u>Jas-VH3-JH3</u>   |   |   |
| CD138+Thy            | 322 bp                                  | VH3 - TAT-TAC-TGT-GCG-AGA-GAT-GGT-GCC-GTT-CAG-ATT-TAT-GCT-TTT-GAT - JH3                                   |
| CD19+Thy             | 322 bp                                  | CDR3-Sequenz nicht lesbar   |
| <u>Jas-VH3-JH6</u>   |   |   |
| CD138+Thy            | 354 bp                                  | VH3 - TAT-TAC-TGT-GCG-AGA-ACG-GGC-TAT-GGT-TAC-AAC-TAC-TAC-TAC - JH6                                       |
| CD19+Thy             | 354 bp                                  | CDR3-Sequenz nicht lesbar   |
| <u>Vos-VH1-JH4/5</u> |   |   |
| CD138+Thy            | 323 bp                                  | VH1 - TAT-TAC-TGT-GCG-AGA-GCG-TCC-CTC-GGG-ATC- <b>ACT-GAC-GTT-GTC-CTC-CAC-TCT-TAC-TAC-TGG-GGC</b> - JH4/5 |
| CD19+Thy             | 323 bp                                  | VH1 - TAT-TAT-TGT-GCG-AGA-GGA-GGC-GAT-AGT-AGT-TGC-GTA-TTT-TGG-TGG-TGC-GAC-TAC-TGG-GGC - JH4/5             |

Tab. 4.8.: Ausgewählte CDR3-Sequenzen klonal expandierter CD19+ und CD138+Thymozyten: Es zeigen sich keine identischen CDR3-Sequenzen bei allen analysierten CD19/CD138-Paaren. In drei Fällen, in denen die CDR3-Sequenz nicht lesbar war, wurde eine PCR mit klonenspezifischen Primern durchgeführt (fett gedruckte VH-JH-Paare).

#### 4.4. Kompartimentvergleich zwischen klonal expandierten CD138+Thymozyten und klonal expandierten CD138+Blutlymphozyten mittels CDR3-Spektratyping, Sequenzierung der CDR3-Region und PCR mit Klon-spezifischen Primern

Von allen fünf MG-Patienten lag neben Thymusgewebe auch eine Blutprobe vor, die jeweils zum Zeitpunkt der Thymektomie asserviert wurde. Aus dem Thymusgewebe wurden wie beschrieben CD138+Thymozyten isoliert. Aus der peripheren Blutprobe erfolgte zunächst eine Isolierung der peripheren Blutlymphozyten (PBL) mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation wie beschrieben und im Anschluss ebenfalls eine Isolierung von CD138+-Lymphozyten.

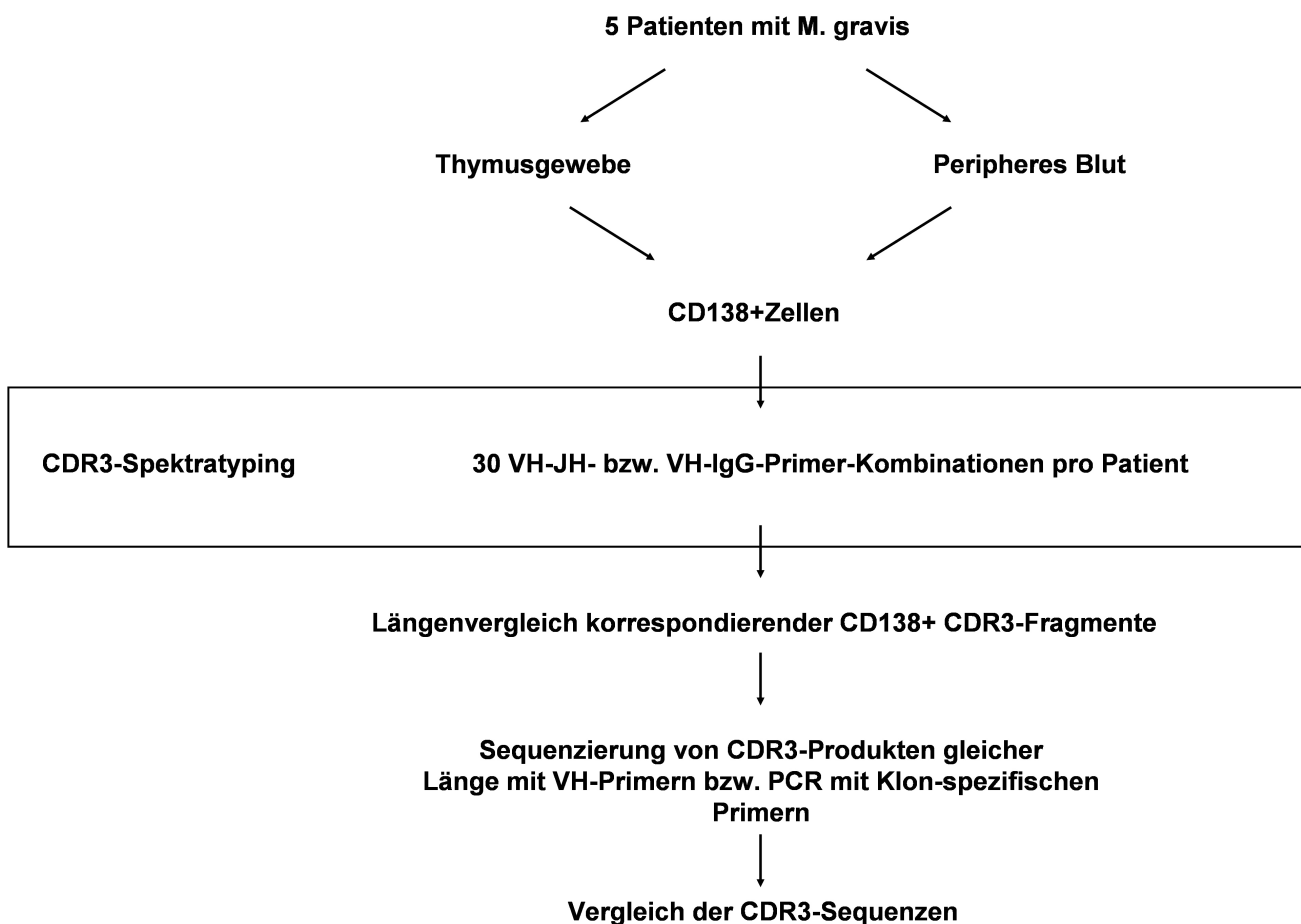


Abb. 4.12.: Prinzip des Kompartimentvergleichs zwischen CD138+Thymozyten und CD138+Lymphozyten des peripheren Bluts: Mittels CDR3-Spektratyping wurden beide Kompartimente auf gleich lange CDR3-Produkte mit entsprechender VH-JH-Zugehörigkeit untersucht. Im Falle gleich langer CDR3-Produkte wurde eine Sequenzierung der CDR3-Region mit VH-Primern bzw. eine PCR mit Klon-spezifischen Primern durchgeführt.

Die beiden Kompartimente „peripheres Blut“ und „Thymus“ wurden mit molekulargenetischen Methoden verglichen. Es wurde untersucht, ob im Thymuskompartiment B-Zell-Klone vorhanden sind, die sich im Blutkompartiment wiederfinden und umgekehrt. Dazu wurden CDR3-Spektratypings der CD138+Thymozyten mit den entsprechenden CDR3-Spektratypings der CD138+PBL verglichen. Interessant waren die CDR3-Spektratypings, deren CDR3-Region die identische bzw. ähnliche Länge wie die CDR3-Region des korrespondierenden CDR3-Spektratyping des anderen Kompartimentes hatten. Dies wurde als potentiell identische CDR3-Sequenzen in beiden Kompartimenten gewertet, so dass in diesen Fällen eine gezielte Sequenzierung der CDR3-Region beider Kompartimente mit VH-Primern durchgeführt wurde.

| Nr. | Patient-VH-JH-Produkt | Länge im CDR3-Spektratyping Thy/PBL (bp) | Charakterisierung im CDR3-Spektratyping Thy | Charakterisierung im CDR3-Spektratyping PBL | CDR3-Sequenz |
|-----|-----------------------|--|---|---|--------------|
| 1   | Bar-VH1-JH3           | 327/324                                  | monoklonal                                  | monoklonal                                  | ja           |
| 2   | Bar-VH4-JH3           | 331/331                                  | oligoklonal                                 | oligoklonal                                 | ja           |
| 3   | Bar-VH4-JH6           | 340/337                                  | monoklonal                                  | oligoklonal                                 | ja           |
| 4   | Jas-VH4-JH1/2         | 317/317                                  | monoklonal                                  | monoklonal                                  | ja           |
| 5   | Jas-VH4-JH6           | 329/335                                  | <b>polyklonal</b>                           | monoklonal                                  | nein         |
| 6   | Jas-VH6-JH4/5         | 310/310                                  | monoklonal                                  | monoklonal                                  | ja           |
| 7   | AM-VH1-JH4/5          | 333/336                                  | <b>polyklonal</b>                           | <b>polyklonal</b>                           | nein         |
| 8   | AM-VH3-JH6            | 337/337                                  | <b>polyklonal</b>                           | <b>polyklonal</b>                           | nein         |
| 9   | AM-VH4-JH1/2          | 307/307                                  | monoklonal                                  | monoklonal                                  | ja           |
| 10  | AM-VH4-JH6            | 325/325                                  | <b>polyklonal</b>                           | oligoklonal                                 | nein         |
| 11  | Vos-VH3-JH6           | 326/326                                  | oligoklonal                                 | monoklonal                                  | ja           |
| 12  | Vos-VH4-JH4/5         | 332/332                                  | <b>polyklonal</b>                           | monoklonal                                  | nein         |

Tab. 4.9.: Bei 12 CD138+ Thymozyten/PBL-Paaren fanden sich CDR3-Produkte identischer bzw. ähnlicher Länge. Bei 5 Paaren waren ein oder beide CDR3-Produkte polyklonal. Diese wurden nicht für den Kompartiment-Vergleich herangezogen, eine Sequenzierung der CDR3-Region wurde nicht durchgeführt. Bp: Länge der CDR3-Produkte in Basenpaaren (base pairs).

Mit CD138+Thymozyten und CD138+PBL wurden pro Patient je 30 CDR3-Spektratypings durchgeführt, insgesamt wurden pro Kompartiment 150 Spektratypings durchgeführt. Die Spektratypings der CD138+Thymozyten zeigten in 84 Fällen ein CDR3-spezifisches Produkt. Davon waren 37 CDR3-Produkte monoklonal expandiert. In der Gruppe der CD138+PBL wurden insgesamt 95 CDR3-spezifische Produkte identifiziert, die für einen Vergleich mit den CDR3-Produkten der CD138+Thymozyten herangezogen werden konnten. Im Kompartiment der CD138+ PBL waren 43 CDR3-Produkte monoklonal expandiert. Im

Vergleich zwischen Thymus- und PBL-Kompartiment konnten insgesamt 12 CDR3-Spektratyping-Paare identifiziert werden, deren CDR3-Produkte gleich lang waren und somit eine potentiell gleiche CDR3-Sequenz aufwiesen. In fünf Fällen waren ein oder beide CDR3-Produkte polyklonale CDR3-Produkte. Diese wurden für den Kompartimentvergleich nicht herangezogen. Nach Ausschluß der polyklonalen CDR3-Produkte blieben sieben CDR3-Produkte für den Vergleich zwischen Thymozyten- und PBL-Kompartiment. Davon waren im Thymozyten- und im PBL-Kompartiment jeweils fünf CDR3-Produkte monoklonal expandierte CDR3-Produkte. Jeweils zwei CDR3-Produkte waren oligoklonale CDR3-Produkte. Bei vier der sieben Thymozyten/PBL-Paare waren beide CDR3-Produkte monoklonale expandierte CDR3-Produkte.

### CD138+Thy vs. CD138+PBL

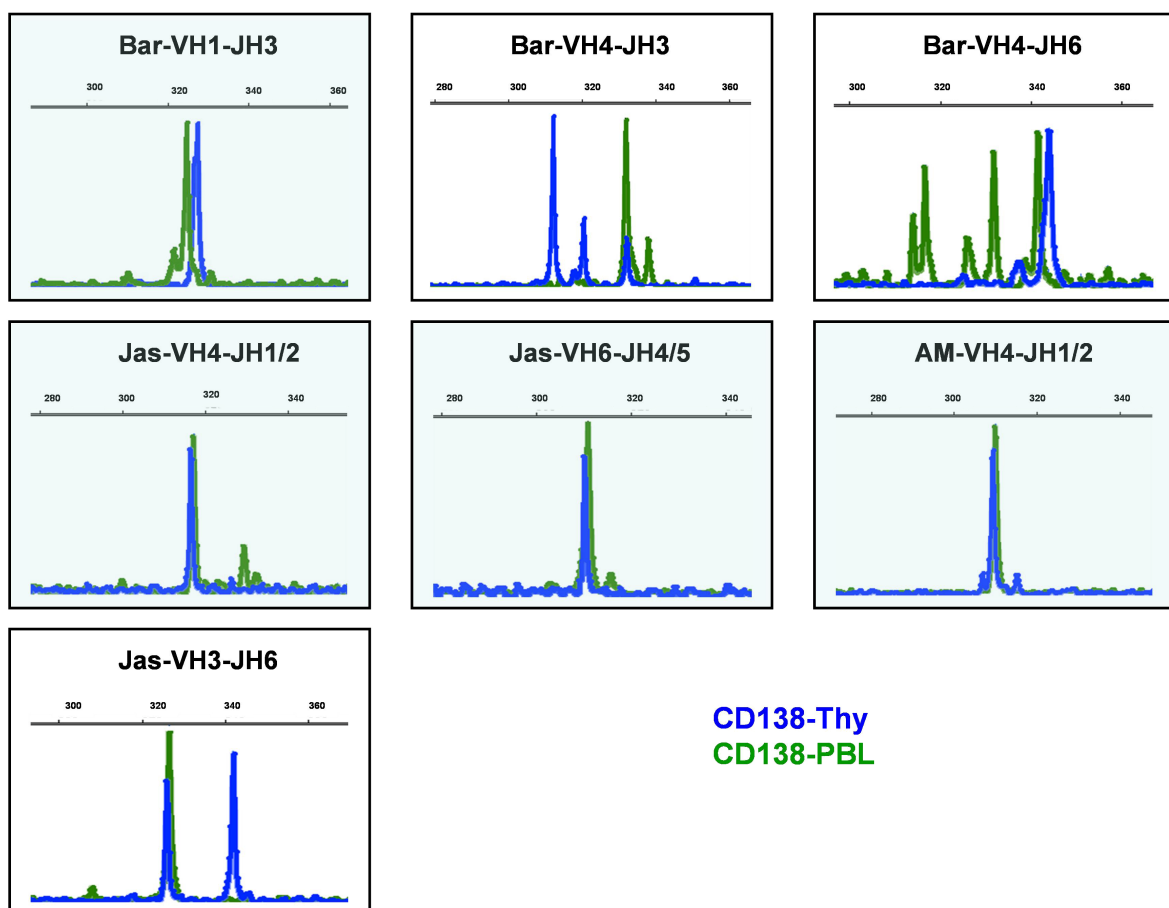


Abb. 4.13.: Übersicht über die sieben Thy/PBL-Paare mit identisch bzw. ähnlich langer CDR3-Region der fünf MG-Patienten. Blau: CD138-Thy; grün: CD138-PBL; hellblau unterlegt sind Paare mit monoklonaler Expansion beider CDR3-Produkte.

| Patient-VH-JH        | Fragmentlänge | CDR3-Nukleinsäuresequenz der CD138+Thymozyten und CD138+PBL   |
|----------------------|---------------|---|
| <u>Bar-VH1-JH3</u>   |               |   |
| Thy                  | 327 bp        | VH1 - TAT-TAC-TGT-GCG-AGA-GAT-GGT-TAT-AGT-GGC-TAC-GAC-TGG-GGG-GAC-CAC-GCT-TTT-GAC-ATC - JH3             |
| PBL                  | 324 bp        | VH1 - TAT-TAC-TGT-GCG-AGA-GAT-TCG-GTT-ATG-GCA-GCA-GCT-GGT-CAC-GAT-GCT-TTT-GAT-ATC - JH3                 |
| <u>Bar-VH4-JH3</u>   |               |   |
| Thy                  | 331 bp        | VH4 - TAT-TAC-TGT-GCG-AGA-CAA-GAT-AGT-AGT-GGT-TTC-TAT-GCT-TTT-GAT-ATG - JH3                             |
| PBL                  | 331 bp        | CDR3-Sequenz nicht lesbar   |
| <u>Bar-VH4-JH6</u>   |               |   |
| Thy                  | 344 bp        | VH4 - TAT-TAC-TGT-GCC-AGA-GAC-TCT-TTC-CCC-CGT-TAT-GGT-TCG-GGG-AGT-CAC-AAG-TAC-CAC-TAC-TAC-GGT-ATG - JH6 |
| PBL                  | 341 bp        | VH4 - TAT-TAC-TGT-TAC-AGA-GCG-AAA-GAT-AAC-TAT-TTC-TCT-CCC-TAC-TAC-ATG-GAC - JH6                         |
| <u>Jas-VH4-JH1/2</u> |               |   |
| Thy                  | 317 bp        | VH4 - TAT-TAC-TGT-GCG-AGA-GCA-CTA-AGT-ACT-TTC-GCG-AGC-ACT-GAA-TAC-TTC-CAA-CAC-TGG-GGC-CAG - JH1/2       |
| PBL                  | 317 bp        | CDR3-Sequenz nicht lesbar   |
| <u>Jas-VH6-JH4/5</u> |               |   |
| Thy                  | 310 bp        | CDR3-Sequenz nicht lesbar   |
| PBL                  | 310 bp        | VH6 - TAT-TAC-TGT-GCA-AGA-GCG-CAG-TCT-GGC-TCG-GGG-AGA-ATC-TAC-GAC-TAC-TGG-GGC - JH4/5                   |
| <u>AM-VH4-JH1/2</u>  |               |   |
| Thy                  | 307 bp        | VH4 - TAT-TAC-TGT-GCG-AGA-GAT-ACT-TCG-GGG-GAC-TGG-TAC-TTC-GAT - JH1/2                                   |
| PBL                  | 307 bp        | VH4 - TAT-TAC-TGT-GCG-AGA-GAT-GGT-TGG-GGG-GGC-TGG-TAC-TTC-GAT- JH1/2                                    |
| <u>Vos-VH3-JH6</u>   |               |   |
| Thy                  | 326 bp        | VH3 - TAT-TAC-TGT-GCA-AAA-GAT-GCA-ATC-GGA-TAT-TGT-GCT-GTA-TAC-TAC-ATG-GAC - JH6                         |
| PBL                  | 326 pb        | VH3 - TAT-TAC-TGT-GCC-TGC-CAT-AAA-GGG-GGG-GCT-TTT-AAT-GTC-TAC-TAC-TAC-ATG - JH6                         |

Tab. 4.10.: Vergleich der klonal expandierten CD138+Thymozyten mit CD138+ peripheren Blutlymphozyten (PBL): Es zeigen sich keine identischen CDR3-Sequenzen bei allen analysierten Thy/PBL-Paaren. Die Thymozyten- und PBL-Sequenzen von AM weisen allerdings eine Übereinstimmung in einer Vielzahl von Nukleinsäuren auf. Bei drei Paaren war die CDR3-Sequenz des Thymozyten- bzw. PBL-Kompartiments nicht lesbar. Bei einem Paar differierte die Länge des CDR3-Produktes im Spektrotyping von der Länge der entsprechenden CDR3-Sequenz (\*). Diese insgesamt fünf Thy/PBL-Paare wurden mit klon-spezifischen Primern weiter untersucht (in fett gedruckt).

Die sieben identifizierten Thymozyten/PBL-Paare mit gleich langen bzw. ähnlich langen CDR3-Regionen wurden mittels Sequenzierung der CDR3-Region mit der Frage nach einer identischen CDR3-Sequenz in beiden Kompartimenten genauer charakterisiert.

Abbildung 4.10 zeigt die Nukleinsäuren-Sequenzen der CDR3-Region der sieben untersuchten Thymozyten/PBL-Paare. In keinem der sieben Fälle konnte eine 100% identische CDR3-Region identifiziert werden. Die detaillierte Analyse der Elektropherogramme der CD138+Thymozyten und CD138+PBL von AM-VH4-JH1/2 ergab aber eine auffällig hohe Übereinstimmung der CDR3-Regionen beider Kompartimente. Elf der 15 Nukleinsäuren langen CDR3-Region sind identisch. Darüber hinaus zeigen die Elektropherogramme an zwei weiteren Positionen eine potentielle Übereinstimmung durch das Vorhandensein entsprechender Basen in einer „Hintergrundsequenz“, so dass bei AM-VH4-JH1/2 über eine Übereinstimmung der CDR3-Sequenz an 13 von 15 Positionen spekuliert werden kann (Abbildung 4.15). Geht man von dieser nach Abb. 4.15 modifizierten CDR3-Nukleinsäuresequenz aus und translatiert diese in die CDR3-Aminosäuresequenz, so erhält man für AM-VH4-JH1/2 im Vergleich der CD138+Thymozyten und CD138+PBL eine bis auf eine Aminosäuresequenz identische CDR3-Aminosäuresequenz (vgl. Abb 4.14).

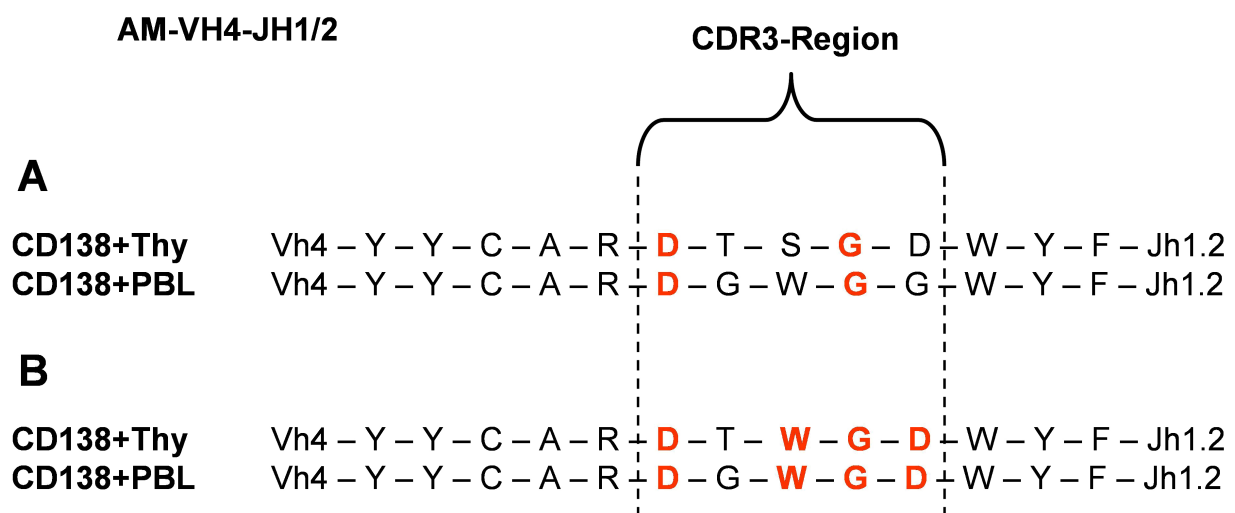


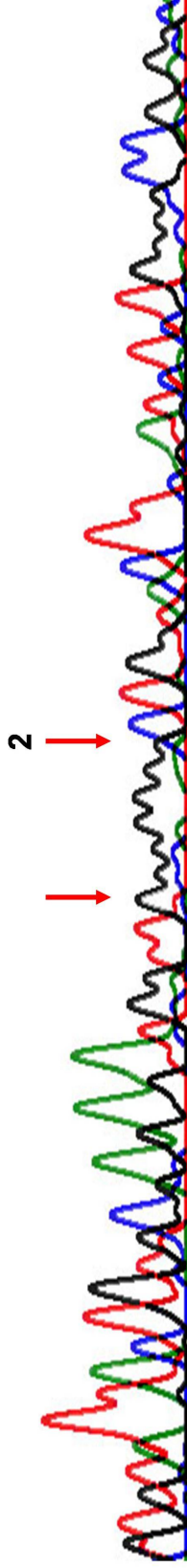
Abb 4.14.: Native Aminosäuresequenzen der CDR3-Region von AM-VH4-JH1/2 CD138+Thymozyten und CD138+PBL (A). Modifizierte CDR3-Aminosäuresequenz wie nach genauer Analyse der Elektropherogramme in Abb. 4.15 beschrieben (B): Übereinstimmung in allen bis auf einer Aminosäurepositionen.



**CD138+PBL AM-VH4-JH1/2**

**CDR3-Region**

Vh4 - T A T T A C T G T G C G A G A **G A T G G T T G G G G G G C** T G G T A C T T C G A T C T C T G G G G C C G C - Jh1.2



**CD138+Thy AM-VH4-JH1.2**

**CDR3-Region**

Vh4 - T A T T A C T G T G C G A G A **G A T A C T T C G G G G G A C** T G G T A C T T C G A T C T C T G G G G C C G C - Jh1.2



Abb. 4.15.: Elektropherogramme der CD138+Thymozyten und CD138+PBL von AM-VH4/Jh1.2: Die CDR3-Regionen weisen eine hohe Übereinstimmung auf. An elf von 15 Positionen der CDR3-Region liegen identische Nucleinsäuren vor. Darüber hinaus ist bei (1) in der Thymozyten-Sequenz die Base Guanin im Hintergrund erkennbar. Bei (2) der PBL-Sequenz zeigt sich im Hintergrund die Base Adenosin, sodass über eine Übereinstimmung der CDR3-Regionen an 13 von 15 Positionen spekuliert werden kann. Farbkodierung der Elektropherogramme: Schwarz = Cytosin; Blau = Guanin; Rot = Thymin; Grün = Adenosin.



Um das Thymozyten/PBL-Paar AM-VH4-JH1/2 noch genauer charakterisieren zu können, wurde eine PCR mit Klon-spezifischen Primern durchgeführt. Neben dem Thymozyten/PBL-Paar AM-VH4-JH1/2 wurden PCRs mit Klon-spezifischen Primern auch für die drei Thymozyten/PBL-Paare durchgeführt, bei denen die CDR3-Sequenz des Thymozyten- bzw. PBL-Kompartiments nicht lesbar war (Bar-VH4-JH3, Jas-VH4-JH1/2, Jas-VH6-JH4/5). Zudem wurde eine PCR mit Klon-spezifischen Primern mit dem Thymozyten/PBL-Paar Bar-VH4-JH6 durchgeführt, weil die Länge des CDR3-Produktes im Spekatyping von der Länge der entsprechenden CDR3-Sequenz unplausibel abwich. Insgesamt wurden damit bei fünf Thymozyten/PBL-Paaren eine PCR mit Klon-spezifischen Primern durchgeführt.

Voraussetzung für eine PCR-Amplifikation der CDR3-Region mittels Klon-spezifischer VH-Primer war das Vorhandensein einer Matrizen-CDR3-Sequenz entweder des Thymozyten- oder des PBL-Kompartiments. Von der Matrizen-CDR3-Sequenz leitete sich die Sequenz des Klon-spezifischen Primers ab (vgl. Material und Methoden). In vier der fünf Fälle diente die CDR3-Sequenz von CD138+Thymozyten als Matrize für den Klon-spezifischen Primer, in einem Fall wurde die CDR3-Sequenz eines CD138+PBL-Klons als Matrize verwendet (vgl. Tabelle 4.11). Die Nukleinsäuresequenzen sämtlicher Klon-spezifischer Primer finden sich im Anhang.

| Patient und CDR3-Produkt | Matrize des Klon-spezifischen Primers | Spezifisches CDR3-PCR-Produkt mit cDNA des anderen Kompartiments? |
|--------------------------|---------------------------------------|---|
| Bar VH4-JH3              | Thymozyten                            | nein  |
| Bar VH4-JH6              | Thymozyten                            | nein  |
| Jas VH4-JH1/2            | Thymozyten                            | nein  |
| Jas VH6-JH4/5            | PBL                                   | nein  |
| AM VH4-JH1/2             | Thymozyten                            | ja  |

Tab.: 4.11.: In fünf Fällen wurde die CDR3-Region mit Klon-spezifischen VH-Primern amplifiziert. Als Matrize diente in vier Fällen die CDR3-Sequenz von Thymozyten, in einem Fall die CDR3-Sequenz aus PBL. Ein spezifisches CDR3-Produkt durch Amplifikation der cDNA des jeweils anderen Kompartimentes gelang in keinem der fünf Fälle.

In allen fünf Fällen, in denen die CDR3-Region mit Klon-spezifischen Primern amplifiziert wurde, konnte immer die Primer-Matrize spezifisch amplifiziert werden, was als Positivkontrolle des jeweiligen Klon-spezifischen VH-Primers zu werten ist. Bei dem Thymo-

zyten/PBL-Paar AM-VH4-JH1/2 gelang die Amplifikation eines spezifischen Produktes im „Zielkompartiment“, hier im peripheren Blut. Damit konnte bei diesem Thymozyten/PBL-Paar eine identische CDR3-Sequenz im Thymozyten- und PBL-Kompartiment nachgewiesen werden. In den übrigen vier Fällen kam es durch Verwendung von Klon-spezifischen Primern zu keinem spezifischen CDR3-Produkt (Abbildung 4.16).

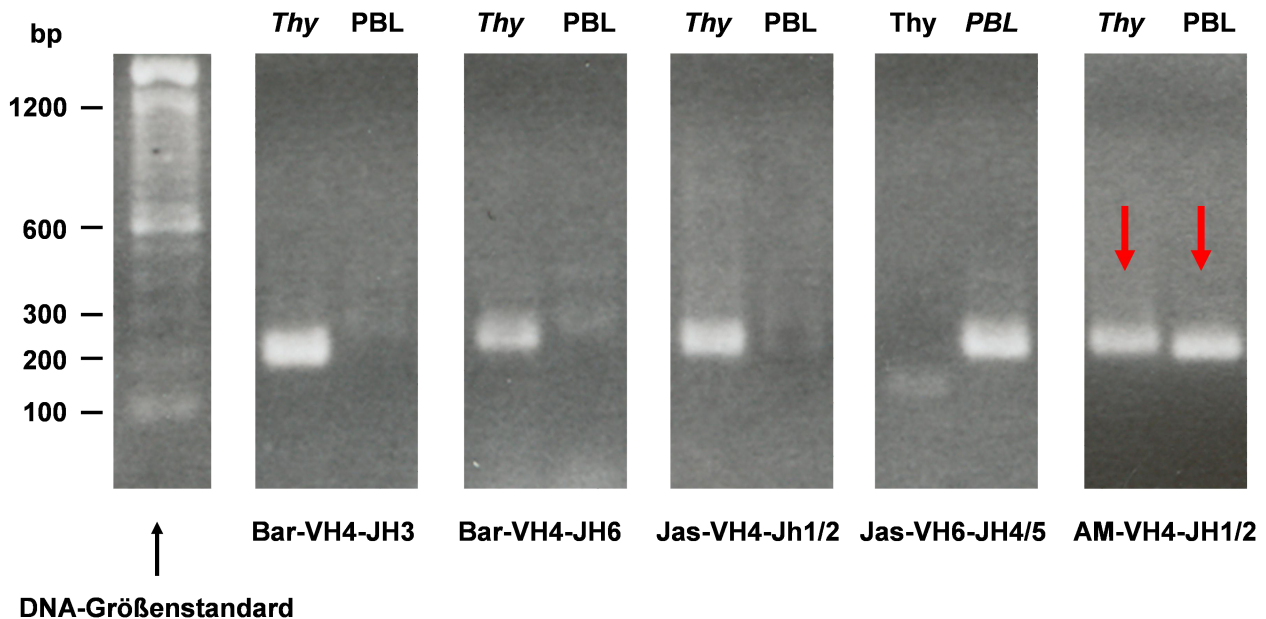


Abb. 4.16.: CDR3-Klon-spezifische PCR mit Klon-spezifischen VH-Primern: Im „Matrizenkompartiment“ (in kursiv gedruckt) kommt es wie erwartet zur Amplifikation eines CDR3-spezifischen Produktes („Positivkontrolle“). Im „Zielkompartiment“ findet sich nur bei AM-VH4/Jh1.2 ein CDR3-spezifisches Produkt (Pfeile). Die CDR3-Sequenzen sind in diesem Fall identisch. Im Thymus- und PBL-Kompartiment der anderen Patienten finden sich keine übereinstimmenden CDR3-Sequenzen.

Mittels CDR3-Spektratyping konnten somit einige Thymozyten/PBL-Paare identifiziert werden, deren CDR3-Region von identischer bzw. ähnlicher Länge sind. Die Sequenzierung der CDR3-Regionen konnte mit AM-VH4-JH1/2 ein CD138+Thymozyten/PBL-Paar identifizieren, deren CDR3-Regionen auf der Ebene der Nucleinsäuren- und der Aminosäuresequenz eine auffallend hohe Übereinstimmung aufweisen (AM-VH4-JH1/2). Die genauere Charakterisierung dieses Thymozyten/PBL-Paares durch Verwendung von Klon-spezifischen Primern konnte indirekt eine identische CDR3-Sequenz in beiden Kompartimenten nachweisen.

## 5. Diskussion

Im Thymus spielen sich zentrale immunpathogenetische Vorgänge der MG ab (Hohlfeld R et al., 1994). Neben charakteristischen pathohistologischen Veränderungen des Thymusgewebes bei Patienten mit Myasthenia gravis spricht auch die regelmäßig beobachtete klinische Besserung der Myasthenie im Anschluss an eine Thymektomie für diese These. Im Thymus und insbesondere in den Thymus-Keimzentren von Myasthenie-Patienten finden sich zudem myoide Zellen, spezielle Muskelvorläuferzellen, die mit dem AChR das Antigen der MG exprimieren (Wekerle H et al., 1977). Das in dieser Arbeit untersuchte Thymusgewebe stellt daher ein interessantes, immunologisch privilegiertes Kompartiment zur genaueren Charakterisierung des Immunglobulin-Repertoires des Thymus dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde (1) mittels CDR3-Spektratyping mit CD19+ und CD138+Thymozyten eine molekulargenetische Analyse des Immunglobulinen-Repertoires der schweren Immunglobulinkette von Myasthenie-Patienten durchgeführt und mit dem Repertoire gesunder Kontrollpersonen verglichen. Ziel war eine Charakterisierung klonal expandierter B-Zellpopulationen in beiden Gruppen. Zudem wurden mittels CDR3-Spektratyping und CDR3-Sequenzierung (2) klonal expandierte CD19+Thymozyten und klonal expandierte CD138+Thymozyten mit der Frage nach identischen B-Zell-Klonen in beiden Zell-Populationen verglichen. Schließlich wurde (3) in einem Kompartimentvergleich zwischen klonal expandierten CD138+Thymozyten und klonal expandierten CD138+Blutlymphozyten mittels CDR3-Spektratyping und CDR3-Sequenzierung sowie Verwendung klon-spezifischer Primer nach identischen B-Zell-Klonen in beiden Kompartimenten gesucht.

Bei der Charakterisierung des Immunglobulinen-Repertoires von CD19+ und CD138+Thymozyten der Patientengruppe zeigte sich (1) im Vergleich mit CD19+ und CD138+Thymozyten der Kontrollgruppe insgesamt ein kleinerer Anteil von amplifizierbaren VH-JH-Familien und damit von CDR3-Fragmenten. Die detaillierte Zuordnung der CDR3-Fragmente in klonal expandierte und oligo- bzw. polyklonale B-Zellpopulationen zeigte ferner (2) bei Myasthenie-Patienten im Vergleich mit entsprechenden Zell-Populationen gesunder Kontrollen eine deutlich klonal geprägte Ausrichtung des Immunglobulinen-Repertoires der CD19+ und CD138+Thymus-B-Zellen. Diese klonal expandierten B-Zell-Populationen der CD19+ und CD138+Thymozyten können dabei (3) nicht einer bevorzugten VH- bzw. JH-Familie zugeordnet werden. Es zeigt sich vielmehr (4) bei allen Myasthenie-

Patienten eine bemerkenswerte Heterogenität der klonal expandierten B-Zell-Populationen in Bezug auf die verwendeten VH- und JH-Familien-spezifischen Immunglobulingene. Diese Beobachtungen sind (5) konsistent mit einer bei der Myasthenie postulierten, durch den Acetylcholin-Rezeptor (AChR) als Antigen der Myasthenie vermittelten, Antigen-gesteuerten Immunantwort im Thymus mit fortgesetzter Proliferation und Selektion verschiedener AChR-spezifischer B-Zell-Populationen.

Der Vergleich von CD19+ und CD138+Thymozyten konnte (1) klonal expandierte CD19+/CD138+Thymozytenpaare mit identischer bzw. ähnlicher Länge der CDR3-Region identifizieren. Die genauere Charakterisierung der CDR3-Region einiger dieser CD19+/CD138+Thymozytenpaare durch Sequenzierung der CDR3-Region konnte (2) keine identischen CDR3-Sequenzen nachweisen.

Der Kompartimentvergleich zwischen CD138+Thymozyten und CD138+Blutlymphozyten mittels CDR3-Spektratyping konnte (1) erstmals klonal expandierte CD138+B-Zell-Populationen mit gleicher CDR3-Länge und spezifischer VH- und JH-Zugehörigkeit im Thymus- und Blutkompartiment charakterisieren. Zudem gelang durch Klon-spezifische Primer (2) erstmals die indirekte Identifikation eines identischen B-Zell-Klons im Thymus- und Blutkompartiment eines Myasthenie-Patienten.

Zur Untersuchung der oben genannten Fragestellung wurde Thymusmaterial und Blut der Patienten- und Kontrollgruppe parallel auf identische Art und Weise aufbereitet. Eine methodisch bedingte Einschränkung unserer Untersuchungen ergibt sich aus dem Umstand, dass Thymusgewebe von „gesunden Kontrollpersonen“ im Prinzip nur im Rahmen von thoraxchirurgischen Eingriffen an Säuglingen entnommen wird, während die Thymektomie bei Myasthenie-Patienten in der Regel im Erwachsenenalter durchgeführt wird. Mit der Verwendung von CD19+ und CD138+Zellen wurden etablierte und repräsentative Marker für B-Zellen und Plasmazellen untersucht. Die Separation der B-Zell-Subpopulationen mittels Antikörper-beschichteter Magnetpartikel (Dynabeads®) ist eine etablierte Methode zur Separation von Zellfraktionen und wurde gemäß etablierten und standardisierten Protokollen durchgeführt. Die Anzahl der isolierten Zellfraktionen wurde dokumentiert und die Effizienz der Antikörperseparation wurde in parallelen FACS-Analysen für beide CD-Antigene überprüft und dokumentiert. Alle PCR-Experimente wurden nach etablierten Protokollen durchgeführt. Die Qualität und Spezifität aller amplifizierten Produkte wurden im Agarose-Gel überprüft und dokumentiert. Mit dem CDR3-Spektratyping stand als methodischer Ansatz zudem eine neue, PCR-gestützte und damit sehr sensitive und spezifische Methode zur

Verfügung, die eine schnelle und effiziente Charakterisierung des Immunglobulingen-Repertoires von klonal expandierten B-Zell-Populationen ermöglichte (Pannetier C et al., 1995). Die Methodik des CDR3-Spektratypings wurde bei der molekulargenetischen Charakterisierung von T- und B-Zellpopulationen bereits bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose und der Polymyositis sowie unterschiedlichen Lymphom-Erkrankungen eingesetzt und etabliert (Hofbauer M et al., 2003). Die Sequenzierung der CDR3-Region nach der Nukleodesoxy-Abbruch-Methode nach Sanger stellte eine bewährte Methode zur Sequenzierung der CDR3-Region dar und wurde gemäß etablierten Protokollen durchgeführt.

Da alle Proben der Patienten- und Kontrollgruppe wie beschrieben auf gleiche Art und Weise aufbereitet wurden, sind methodische Gründe als Ursache des oben beschriebenen insgesamt kleineren Anteils amplifizierbarer VH-JH-Familien in der Patientengruppe unwahrscheinlich. Vielmehr muss man eine im Thymuskompartiment der Patienten vorliegende „klonale Einengung“ als Ursache diskutieren. Durch Selektionsvorgänge im Rahmen der autoimmunen Reaktion könnte es dadurch einer kleineren Anzahl amplifizierbarer CDR3-Fragmente innerhalb der Patientengruppe kommen. In der Folge sind damit im autoimmunen Szenario der Patientengruppe nicht alle CDR3-Genotypen ähnlich häufig verteilt sind wie im „immunnaiven“ Szenario der Kontrollgruppe. Die CDR3-Spektratypings von CD19+ und CD138+ Thymus-B-Zellen der Myasthenie-Patienten zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe zudem mehr klonal expandierte B-Zell-Populationen. Dies könnte in der Patientengruppe auf eine im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigerte Aktivierung des adaptiven Immunsystems auf B-Zell-Ebene bedeuten. Bemerkenswert ist darüber hinaus der Nachweis einer bemerkenswerten Heterogenität der identifizierten B-Zell-Klone in Bezug auf die Verwendung von VH- und JH-Familien-spezifischen Immunglobulingenen. Ein bevorzugter VH- bzw. JH-Genotyp konnte nicht gefunden werden. Da sich diese Heterogenität der klonal expandierten B-Zellpopulationen bei allen Patienten nachweisen lässt, ist sie zumindest am hier untersuchten Patientenkollektiv offenbar unabhängig sowohl vom Autoantikörper-Status des Myasthenie-Patienten als auch von der bei allen Patienten teils seit Jahren durchgeführten, unterschiedlichen immunsuppressiven Therapie.

Die beschriebene Heterogenität der B-Zell-Antwort im Myasthenie-Thymus fügt sich gut ein in bereits beschriebene Charakteristika der B-Zell-Antwort anderer Autoimmunerkrankungen im Allgemeinen und der Myasthenie im Besonderen. Zu einer überwiegend monoklonalen B-Zell-Antwort kommt es z. B. im Tierexperiment mit Mäusen, die auf eine Haptengabe

zunächst mit einer oligoklonalen, von drei Vorläufer-B-Zellen abstammenden Immunantwort reagieren, in deren Verlauf sich dann ein oder zwei dominante Klone herausbilden (Jacob J et al., 1991). Küppers et al. konnten bei Einzelzell-Untersuchungen an zwei Tonsillen-Keimzentren des Gesunden 13 der 20 identifizierten VH-Gene auf fünf B-Zell-Klone zurückführen (Küppers R et al., 1993). In vergleichbaren Studien von Roers et al. konnten in einem zervikalen Lymphknoten drei B-Zell-Klone identifiziert werden, die acht von 18 identifizierten funktionalen VH-Genen repräsentierten (Roers A et al., 2000). Die molekulargenetische Aufarbeitung von B-Zell-Isolaten aus der Synovia von Patienten mit rheumatoider Arthritis bzw. reaktiver Arthritis zeigte multiple B-Zell-Klone mit unterschiedlicher Spezifität in Bezug auf Antikörperproduktion und Antikörperspezifität (Schroder A et al., 1996). Bei Patienten mit Sjögren-Syndrom konnten aus Speicheldrüsengewebe neben einzelnen polyklonalen B-Zellen auch multiple klonal expandierte B-Zell-Populationen identifiziert werden (Stott D et al., 1998).

Erste Hinweise für eine Heterogenität der B-Zell-Antwort speziell bei der Myasthenie ergaben sich bereits im Rahmen von *in-situ*-Hybridisations-Studien durch den Nachweis einer sehr unterschiedlichen Expression verschiedener VH- und Vk-Gen-Familien bei Myasthenie-Patienten (Guigou V et al., 1991). Auf molekulargenetischer Basis wurde die Heterogenität von AChR-spezifischen B-Zellen bezüglich des verwendeten VH-Gen-Repertoires erstmals von Sims et al. am Beispiel von vier Thymus-Keimzentren eines Myasthenie-Patienten detailliert beschrieben. Die Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung von rund 300 VH-Genen zeigte eine ausgeprägte Heterogenität der B-Zell-Klone. In Analogie zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde in keinem der vier Keimzentren nur ein einzelner, pathogenetisch „dominanter“ B-Zell-Klon identifiziert. Die Verwendung des VH-Immunglobulingen-Repertoires entsprach vielmehr dem normalen adulten PBL-Repertoire mit einer Überrepräsentation von JH4/5 und VH3-Familien-spezifischen Genotypen und einer Unterrepräsentation von JH1, JH2 und VH4-Familien-spezifischen Genotypen (Sims G et al., 2001). Die in dieser Arbeit bei allen Myasthenie-Patienten identifizierte Heterogenität der in der Patientengruppe deutlich klonal expandierten B-Zell-Populationen mit einer variablen Verwendung der VH- und JH-Gensegmente bestätigt die Beobachtungen von Sims et al. am Beispiel von fünf Myasthenie-Patienten und spricht für eine Antigen-induzierte Immunantwort im Thymus.

Die beschriebene B-Zell-Heterogenität auf molekulargenetischer Ebene passt auch gut zu der auf Proteinebene in Bezug auf Immunglobulin-Isotyp, Effektormechanismus und Epitop-Erkennung bereits seit Längerem bekannten polyklonalen Natur der Anti-AChR-Antikörper

(Cardona A et al., 1994). Der variable Gebrauch von VH- und JH-Genen mit der daraus resultierenden Heterogenität der expandierten B-Zell-Klone könnte in bezug auf die Pathogenese der Myasthenie auf eine Antigen-gesteuerte Immunantwort durch eine persistierende Exposition immunkompetenter Zellen gegenüber verschiedenen antigenen Determinanten des AChR hindeuten. Diese These einer Antigen-gesteuerten Immunreaktion wird noch zusätzlich durch den bei der Myasthenie durch Sequenzierung geführten Nachweis gemeinsamer Aminosäuresubstitutions-Motive bei verschiedenen B-Zell-Klonen gestützt (Sims G et al., 2001). Im Falle einer Antigen-gesteuerten Immunantwort unterliegen die AChR-spezifischen B-Zellen damit einer fortgesetzten Antigen-Exposition gegenüber verschiedenen antigenen Determinanten, wodurch es durch klonale Proliferation mittels somatischer Mutation und Affinitätsreifung in Thymus-Keimzentren zur B-Zell-Heterogenität kommen könnte. Die beschriebene Heterogenität der B-Zellen unterstreicht somit die zentrale Rolle des Thymus bei der Generation heterogener AChR-spezifischer B-Zellen. Die Tatsache, dass CD19+ und CD138+B-Zellen gleichermaßen eine Immunglobulin-Heterogenität aufweisen, zeigt eine Konservierung der Heterogenität über verschiedene Entwicklungsstadien der B-Zellen an. Alternative Mechanismen über die es zur Initiierung der Immunantwort bei der Myasthenie kommen könnte sind autoimmune Kreuzreaktionen initial anti-infektiöser Antikörper bei bakteriellen Superantigenen oder molekulares Mimikry. Zur Erklärung der Heterogenität der B-Zell-Population über diesen Mechanismus müsste allerdings ein „molekulares Spreading“ im Krankheitsverlauf voraussetzt werden. Dieses Phänomen wurde bisher nur im Tierexperiment und bei der Multiplen Sklerose im Zusammenhang mit einzelnen MBP-spezifischen T-Zell-Klonen beschrieben, aber noch nicht bei der Myasthenie (Goebels N et al., 2000).

In dieser Arbeit wurden auch erstmals CD19+/CD138+Thymozytenpaare mit identischer bzw. ähnlicher Länge der CDR3-Region identifiziert. Die genauere Charakterisierung der CDR3-Region einiger dieser CD19+/CD138+Thymozytenpaare durch Sequenzierung der CDR3-Region konnte keine identischen CDR3-Sequenzen nachweisen. Nicht bei allen CD19+/CD138+Thymozytenpaaren konnte allerdings eine vollständig lesbare CDR3-Sequenz generiert werden, so dass die Aussagekraft eingeschränkt sein könnte. Die Ergebnisse könnten aber gegen eine Rekrutierung spezifischer CD138+Plasmazellen aus einem relativ unspezifischen CD19+B-Zell-Pool sprechen. Diese These wird durch ähnliche Beobachtungen bei Patienten mit MS gestützt. Untersuchungen des Liquors von drei MS-Patienten zeigten eine im Vergleich zu gesunden Kontrollen vermehrte Expansion klonaler

Plasmazellen und B-Zellen im Liquor. CD19+Zellen zeigten allerdings eine weniger stark ausgeprägte Expansion als CD138+Zellen und im Vergleich zwischen CD19+Zellen und CD138+Zellen des Liquors konnte eine nur wenige Übereinstimmung der CDR3-Sequenzen festgestellt werden (Ritchie A et al., 2004). CD19+ und CD138+B-Zellen wurden auch im Synoviagewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis untersucht und verglichen. Auch hier zeigte der Vergleich von B-Zell- und Plasmazell-Populationen klonale Expansionen in beiden Zellpopulationen, jedoch auch hier keine klare klonale Beziehung zwischen den beiden Zellpopulationen (Kim H et al., 1999). Diese fehlende Beziehung zwischen CD19+B-Zellen und CD138+Plasmazellen scheint möglicherweise ein Charakteristikum in der B-Zell-vermittelten Immunantwort verschiedener Autoimmunerkrankungen zu sein. Dieser Befund speziell bei der Myasthenia gravis könnte auf ein durch z.B. somatische Hypermutation sehr dynamisches CD19+Zell-Kompartiment im Thymus hinweisen, während längerlebige und spezifische CD138+Zellen eine längere Persistenz aufweisen.

Um die Beziehung zwischen Thymus- und Blutkompartiment bei der Myasthenia gravis näher zu untersuchen wurde in einem Kompartimentvergleich zwischen Thymus und peripherem Blut nach CD138+ und klonal expandierten B-Zellen mit identischer CDR3-Sequenz in Thymus- und Blutkompartiment gesucht. Während sich im Thymus zentrale immunpathogene Vorgänge der MG abspielen, kommt es an der neuromuskulären Endplatte (NME) durch eine durch Anti-AChR-Antikörper vermittelte Degradierung der AChR zu den entscheidenden Effektormechanismen der Myasthenie (u.a. Romi F et al., 2005). Wenig ist in diesem Zusammenhang über die immunologische Vermittlung zwischen Thymus einerseits und der NME in der Peripherie andererseits bekannt. Theoretisch vorstellbar ist (1) ein Transfer autoreaktiver B-Zellen zur NME über das lymphatische System oder das Blut, (2) ein Transfer autoreaktiver T-Zellen zur NME über die Lymphe oder das Blut mit Aktivierung von autoreaktiven B-Zellen in der Peripherie über T-Helfer-Zellen, (3) ein v. a. humoral durch den Transfer von Anti-AChR-Antikörpern vermittelter Prozess oder (4) eine Kombination aus den genannten Möglichkeiten. CD138+ Zellen des peripheren Blutes des Myasthenie-Patienten sind vor diesem Hintergrund v.a. Plasmazellen mit der Fähigkeit zur Produktion von Anti-AChR-Antikörpern.

Ähnliche Kompartimentvergleiche wurden bereits bei Autoimmunerkrankungen wie der Polymyositis und der MS durchgeführt. Bei der Polymyositis konnten beispielsweise auf T-Zell-Ebene identische klonal expandierte Zellpopulationen in entzündetem Muskelgewebe und peripherem Blut identifiziert werden (Goebels N et al., 1999), und bei MS-Patienten



gelang der Nachweis identischer T-Zell-Klone aus MS-Läsionen des Gehirns, Liquor und peripherem Blut (Skulina C et al., 2004). Bei der MS wurden auch auf B-Zell-Ebene identische klonal expandierte Zellpopulationen identifiziert, die sich in Liquor und PBL finden (Weber H et al., unveröffentlicht).

In dieser Arbeit konnten am Beispiel von fünf Myasthenie-Patienten mittels CDR3-Spektratyping insgesamt sieben CD138+B-Zell-Klone mit potentiell identischer CDR3-Sequenz im Thymus und peripherem Blut identifiziert werden. Die Sequenzierung der CDR3-Region mit konventionellen VH-Primern konnte bei keinem der sieben Kandidaten direkt eine identische CDR3-Sequenz in der PBL- und Thymozyten-Fraktion nachweisen. Für das VH-JH-Paar AM-VH4-JH1/2 zeigte sich mit 13 identischen Nukleinsäuren von 18 möglichen Nukleinsäuren allerdings eine auffallend hohe Übereinstimmung der CDR3-Sequenzen von Thymus- und PBL-Kompartiment. Mit der Verwendung Klon-spezifischer Primer konnte in diesem Fall zudem durch Amplifikation eines CDR3-spezifischen Produkts im Zielkompartiment eine identische CDR3-Sequenz im Thymus- und Blutkompartiment zumindest indirekt nachgewiesen werden. Selbst kleinere Abweichungen innerhalb der Nukleinsäuresequenz könnten sich über Spontanmutationen erklären lassen.

Der Nachweis eines identischen B-Zell-Klons im Thymus- und Blutkompartiment ist ein Indiz für eine Migration von B-Zell- bzw. Plasmazell-Klonen aus dem Thymus in das periphere Blut. Angesichts des klonal expandierten Charakters des vorliegenden Beispiels kann auch über eine pathogenetische Relevanz dieses direkten Transfers von B-Zell-Klonen spekuliert werden. Nach einer Autoantigen-vermittelten Initiierung der Immunantwort, wie beschrieben, ist somit ein Transfer autoimmun reaktiver B-Zell-Populationen in die Peripherie vorstellbar. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass im peripheren Blut von Myasthenie-Patienten auf Proteinebene Anti-AChR-spezifische B-Zellen und damit potentiell autoreaktive Zellen vorliegen. So gelang Padberg et al. der Nachweis von Anti-AChR-Antikörper produzierenden B-Zellen aus dem peripheren Blut und dem Thymusgewebe von MG-Patienten in Zellkultorexperimenten. Untransformierte, nicht-mitogen-stimulierte B-Zellen aus dem peripheren Blut und dem Thymus von MG-Patienten wurden dazu mit AChR-exprimierenden Hybridomen unter Zugabe von aktivierenden Lymphokinen ko-kultiviert. Während initial nur sehr wenig Anti-AChR-Antikörper sezerniert wurden, kam es im Verlauf mehrerer Kultur-Zyklen mit AChR-Exposition zu einer deutlichen Steigerung einer AChR-Antikörper-Produktion. Im Elispot konnte eine spezifische Aktivierung der Anti-AChR-Antikörper-sezernierenden B-Zellen nachgewiesen werden. Dies ist ein Anhalt für eine *de novo* Produktion von Anti-AChR-Antikörpern *in vitro* und spricht gegen eine einfache

Freisetzung präformierter Anti-AChR-Antikörper durch bereits *in vivo* aktivierte B-Zellen. B-Zellen aus dem peripheren Blut von Myasthenie-Patienten konnten somit selektiv zu einer gesteigerten Anti-AChR-Antikörper-Produktion stimuliert werden (Padberg F et al., 1999).

Die Tatsache, dass lediglich in einem Fall ein identischer B-Zell-Klon in Blut- und Thymuskompartiment nachgewiesen werden konnte, stellt die Frage nach eventuell weiteren Kommunikationsmechanismen zwischen Thymus- und peripherem Blut neben einer möglichen Migration vom einem in das andere Kompartiment. So lassen die Daten von Padberg et al. die Frage offen, ob die *in vitro* nachgewiesenen Anti-AChR-Antikörper-spezifischen B-Zellen des peripheren Bluts auch *in vivo* zu einer relevanten, pathogenen Anti-AChR-Antikörperproduktion beitragen oder lediglich Teil eines zirkulierenden, eventuell nicht aktivierten B-Zell-Pools sind, das erst *in vitro* durch entsprechende Stimuli aktiviert wird. Bemerkenswert sind in diesem Zusammenhang Daten aus Studien mit eineiigen Zwillingen, die diskordant bezüglich einer Myasthenie-Erkrankung sind (ein Zwilling gesund, ein Zwilling an Myasthenie erkrankt). Es konnte am Beispiel von zwei Zwillingspaaren gezeigt werden, dass im Blut des gesunden und des an Myasthenie erkrankten Zwillinges Anti-AChR-Antikörper, sowie in der Zellkultur B-Zellen mit Anti-AChR-Antikörper-Produktion nachweisbar waren. Die Anti-AChR-Antikörper-Konzentrationen im Blut beider Geschwister unterschieden sich in dieser kleinen Fallstudie dabei nicht signifikant und beim gesunden Zwilling konnte eine vergleichbare Anzahl Antikörper-produzierender B-Zellen wie beim erkrankten Zwilling gefunden werden (Kakoulidou M et al., 2004). Obwohl klinisch und elektrophysiologisch gesund, hatten die gesunden Zwillinge also die Serokonstellation typischer MG-Patienten und konnten diesbezüglich nicht von einer myasthenen Population unterschieden werden. Auch bei erstgradig Verwandten von MG-Patienten finden sich gehäuft Anti-AChR-Antikörper, ohne dass klinische Symptome einer Myasthenie auftreten (Lefvert A et al., 1985). Diese Daten stehen auch im Einklang mit Beobachtungen an Patienten mit primär bilärer Zirrhose, bei denen sich regelmäßig Anti-AChR-Antikörper ohne klinische Symptome nachweisen lassen, die im Tierexperiment aber eine experimentelle MG induzieren können (Sundewall A et al., 1990). Ähnliche Befunde mit Nachweis verschiedener Autoantikörper ohne passende Klinik wurden auch im Zusammenhang mit anderen Autoimmunerkrankungen gemacht, beispielsweise bei der Hashimoto-Thyreoiditis (Brix T et al., 2000) und der rheumatoiden Arthritis (MacGregor A et al., 1995).

Abschließend können die Ergebnisse dieser Arbeit als Grundlage für weitere Experimente auf Proteinebene dienen. Durch Klonieren der Immunglobulinschwer- und Leichtkettengene klonal expandierter CD19<sup>+</sup> oder CD138<sup>+</sup>Thymozyten von Myasthenie-Patienten könnten rekombinante Antikörper mit möglicherweise pathogenetischer Spezifität erstellt werden. Die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung pathogenetisch relevanter B-Zell-Populationen ist somit ein Schritt in Richtung einer spezifischen Immuntherapie bei der Myasthenia gravis.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Aarli JA, Romi F, Skeie GO, Gilhus NE. Myasthenia gravis in individuals over 40. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Sep;998:424-31
2. Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol.* 2003 Dec;3(12):939-51
3. Agard EA, Lewis SM. Postcleavage sequence specificity in V(D)J recombination. *Mol Cell Biol.* 2000 Jul;20(14):5032-40
4. Agius MA, Richman DP, Fairclough RH, Aarli J, Gilhus NE, Romi F. Three forms of immune myasthenia. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Sep;998:453-6
5. Almon RR, Andrew CG, Appel SH. Serum globulin in myasthenia gravis: inhibition of alpha-bungarotoxin binding to acetylcholine receptors. *Science.* 1974 Oct 4;186(4158):55-7
6. Armstrong SM, Schumann L. Myasthenia gravis: diagnosis and treatment. *J Am Acad Nurse Pract.* 2003 Feb;15(2):72-8
7. Bedlack RS, Sanders DB. How to handle myasthenic crisis. Essential steps in patient care. *Postgrad Med.* 2000 Apr;107(4):211-4, 220-2
8. Beekman R, Kuks JB, Oosterhuis HJ. Myasthenia gravis: diagnosis and follow-up of 100 consecutive patients. *J Neurol.* 1997 Feb;244(2):112-8
9. Bernasconi P, Barberis M, Baggi F, Passerini L, Cannone M, Arnoldi E, Novellino L, Cornelio F, Mantegazza R. Increased toll-like receptor 4 expression in thymus of myasthenic patients with thymitis and thymic involution. *Am J Pathol.* 2005 Jul;167(1):129-39
10. Beroukhim R, Unwin N. Three-dimensional location of the main immunogenic region of the acetylcholine receptor. *Neuron.* 1995 Aug;15(2):323-31

11. Berrouschot J, Baumann I, Kalischewski P, Sterker M, Schneider D. Therapy of myasthenic crisis. *Crit Care Med.* 1997 Jul;25(7):1228-35
12. Besinger UA, Toyka KV, Homberg M, Heininger K, Hohlfeld R, Fateh-Moghadam A. Myasthenia gravis: long-term correlation of binding and bungarotoxin blocking antibodies against acetylcholine receptors with changes in disease severity. *Neurology.* 1983 Oct;33(10):1316-21
13. Brix TH, Kyvik KO, Hegedus L. A population-based study of chronic autoimmune hypothyroidism in Danish twins. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Feb;85(2):536-9
14. Cardona A, Garchon HJ, Vernet-der-Garabedian B, Morel E, Gajdos P, Bach JF. Human IgG monoclonal autoantibodies against muscle acetylcholine receptor: direct evidence for clonal heterogeneity of the antiself humoral response in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.* 1994 Aug;53(1):9-16
15. Cepok S, Jacobsen M, Schock S, Omer B, Jaekel S, Boddeker I, Oertel WH, Sommer N, Hemmer B. Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain.* 2001 Nov;124(Pt 11):2169-76
16. Chalabreysse L, Roy P, Cordier JF, Loire R, Gamondes JP, Thivolet-Bejui F. Correlation of the WHO schema for the classification of thymic epithelial neoplasms with prognosis: a retrospective study of 90 tumors. *Am J Surg Pathol.* 2002 Dec;26(12):1605-11
17. Chilosi M, Iannucci A, Fiore-Donati L, Tridente G, Pampanin M, Pizzolo G, Ritter M, Bofill M, Janossy G: Myasthenia gravis: Immunohistological heterogeneity in microenvironmental organization of hyperplastic and neoplastic thymuses suggesting different mechanisms of breakdown. *J Neuroimmunol* 1986, 11:191-204
18. Chilosi M, Adami F, Lestani M, Montagna L, Cimarosto L, Semenzato G, Pizzolo G, Menestrina F. CD138/syndecan-1: a useful immunohistochemical marker of normal and neoplastic plasma cells on routine trephine bone marrow biopsies. *Mod Pathol.* 1999 Dec;12(12):1101-6

19. Christensen PB, Jensen TS, Tsiropoulos I, Sorensen T, Kjaer M, Hojer-Pedersen E, Rasmussen MJ, Lehfeldt E. Mortality and survival in myasthenia gravis: a Danish population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998 Jan;64(1):78-83
20. Cornall RJ, Goodnow CC, Cyster JG. The regulation of self-reactive B cells. *Curr Opin Immunol*. 1995 Dec;7(6):804-11
21. Couchman JR. Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Dec;4(12):926-37
22. Crane IJ, Forrester JV. Th1 and Th2 lymphocytes in autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2005;25(2):75-102
23. Del Nagro CJ, Otero DC, Anzelon AN, Omori SA, Kolla RV, Rickert RC. CD19 function in central and peripheral B-cell development. *Immunol Res*. 2005;31(2):119-31
24. Dempsey PW, Fearon DT. Complement: instructing the acquired immune system through the CD21/CD19 complex. *Res Immunol*. 1996 Feb;147(2):71-5; discussion 119-20
25. Drachman DB, Angus CW, Adams RN, Michelson JD, Hoffman GJ. Myasthenic antibodies cross-link acetylcholine receptors to accelerate degradation. *N Engl J Med*. 1978 May 18;298(20):1116-22
26. Drachman DB. Myasthenia gravis. *N Engl J Med*. 1994 Jun 23;330(25):1797-810
27. Dunn-Walters DK, Howe CJ, Isaacson PG, Spencer J. Location and sequence of rearranged immunoglobulin genes in human thymus. *Eur J Immunol*. 1995 Feb;25(2):513-9

28. Engel AG, Uchitel OD, Walls TJ, Nagel A, Harper CM, Bodensteiner J. Newly recognized congenital myasthenic syndrome associated with high conductance and fast closure of the acetylcholine receptor channel. *Ann Neurol.* 1993 Jul;34(1):38-47
29. Evoli A, Minisci C, Di Schino C, Marsili F, Punzi C, Batocchi AP, Tonali PA, Doglietto GB, Granone P, Trodella L, Cassano A, Lauriola L. Thymoma in patients with MG: characteristics and long-term outcome. *Neurology.* 2002 Dec 24;59(12):1844-50
30. Fremont DH, Rees WA, Kozono H. Biophysical studies of T-cell receptors and their ligands. *Curr Opin Immunol.* 1996 Feb;8(1):93-100
31. Fujii Y, Hashimoto J, Monden Y, Ito T, Nakahara K, Kawashima Y. Specific activation of lymphocytes against acetylcholine receptor in the thymus in myasthenia gravis. *J Immunol.* 1986 Feb 1;136(3):887-91
32. Fulcher DA, Basten A. B-cell activation versus tolerance--the central role of immunoglobulin receptor engagement and T-cell help. *Int Rev Immunol.* 1997;15(1-2):33-52
33. Gauss GH, Lieber MR. Mechanistic constraints on diversity in human V(D)J recombination. *Mol Cell Biol.* 1996 Jan;16(1):258-69
34. Gilliland LK, Norris NA, Marquardt H, Tsu TT, Hayden MS, Neubauer MG, Yelton DE, Mittler RS, Ledbetter JA. Rapid and reliable cloning of antibody variable regions and generation of recombinant single chain antibody fragments. *Tissue Antigens.* 1996 Jan;47(1):1-20
35. Giraud M, Beaurain G, Yamamoto AM, Eymard B, Tranchant C, Gajdos P, Garchon HJ. Linkage of HLA to myasthenia gravis and genetic heterogeneity depending on anti-titin antibodies. *Neurology.* 2001 Nov 13;57(9):1555-60

36. Goebels N, Hofstetter H, Schmidt S, Brunner C, Wekerle H, Hohlfeld R. Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: epitope spreading versus clonal persistence. *Brain*. 2000 Mar;123 Pt 3:508-18
37. Goverman J, Woods A, Larson L, Weiner LP, Hood L, Zaller DM. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell*. 1993 Feb 26;72(4):551-60
38. Guigou V, Emilie D, Berrih-Aknin S, Fumoux F, Fougereau M, Schiff C. Individual germinal centres of myasthenia gravis human thymuses contain polyclonal activated B cells that express all the VH and Vk families. *Clin Exp Immunol*. 1991 Feb;83(2):262-6
39. Han W, Mou J, Sheng J, Yang J, Shao Z. Cryo atomic force microscopy: a new approach for biological imaging at high resolution. *Biochemistry*. 1995 Jul 4;34(26):8215-20
40. Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vincent A. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med*. 2001 Mar;7(3):365-8
41. Hodgkin PD, Basten A. B cell activation, tolerance and antigen-presenting function. *Curr Opin Immunol*. 1995 Feb;7(1):121-9
42. Hofbauer M, Wiesener S, Babbe H, Roers A, Wekerle H, Dornmair K, Hohlfeld R, Goebels N. Clonal tracking of autoaggressive T cells in polymyositis by combining laser microdissection, single-cell PCR, and CDR3-spectratype analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):4090-5. Epub 2003 Mar 21
43. Hohlfeld R, Toyka KV, Heininger K, Grosse-Wilde H, Kalies I. Autoimmune human T lymphocytes specific for acetylcholine receptor. *Nature*. 1984 Jul 19-25;310(5974):244-6



44. Hohlfeld R, Wekerle H. The role of the thymus in myasthenia gravis. *Adv Neuroimmunol.* 1994;4(4):373-86
45. Hohlfeld R. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain.* 1997 May;120 ( Pt 5):865-916
46. Hopf C, Hoch W. Tyrosine phosphorylation of the muscle-specific kinase is exclusively induced by acetylcholine receptor-aggregating agrin fragments. *Eur J Biochem.* 1998 Apr 15;253(2):382-9
47. Infante AJ, Baillargeon J, Kraig E, Lott L, Jackson C, Hammerling GJ, Raju R, David C. Evidence of a diverse T cell receptor repertoire for acetylcholine receptor, the autoantigen of myasthenia gravis. *J Autoimmun.* 2003 Sep;21(2):167-74
48. Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature.* 1991 Dec 5;354(6352):389-92
49. Jacobson DM. Acetylcholine receptor antibodies in patients with Graves' ophthalmopathy. *J Neuroophthalmol.* 1995 Sep;15(3):166-70
50. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD: *Immunobiology - The immune system in health and disease.* 4<sup>th</sup> ed., Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, 1999
51. Kachalsky SG, Aladjem M, Barchan D, Fuchs S. The ligand binding domain of the nicotinic acetylcholine receptor. Immunological analysis. *FEBS Lett.* 1993 Mar 8;318(3):264-8
52. Kakoulidou M, Ahlberg R, Yi Q, Giscombe R, Pirskanen R, Lefvert AK. The autoimmune T and B cell repertoires in monozygotic twins discordant for myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.* 2004 Mar;148(1-2):183-91
53. Kamogawa Y, Minasi LA, Carding SR, Bottomly K, Flavell RA. The relationship of IL-4- and IFN gamma-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):985-95

54. Kanai T, Nomura Y, Segawa M, Takagi K, Senju S, Matsushita S, Nishimura Y. Immuno-suppressive peptides for a human T cell clone autoreactive to a unique acetylcholine receptor alpha subunit peptide presented by the disease-susceptible HLA-DQ6 in infant-onset myasthenia gravis. *Hum Immunol.* 1997 Aug-Sep;56(1-2):28-38
55. Kim HJ, Krenn V, Steinhauser G, Berek C. Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J Immunol.* 1999 Mar 1;162(5):3053-62
56. Kirchner T, Tzartos S, Hoppe F, Schalke B, Wekerle H, Muller-Hermelink HK. Pathogenesis of myasthenia gravis. Acetylcholine receptor-related antigenic determinants in tumor-free thymuses and thymic epithelial tumors. *Am J Pathol.* 1988 Feb;130(2):268-80
57. Kirchner T, Hoppe F, Schalke B, Muller-Hermelink HK. Microenvironment of thymic myoid cells in myasthenia gravis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1988;54(5):295-302
58. Kistler J, Stroud RM, Klymkowsky MW, Lalancette RA, Fairclough RH. Structure and function of an acetylcholine receptor. *Biophys J.* 1982 Jan;37(1):371-83
59. Knopf PM, Harling-Berg CJ, Cserr HF, Basu D, Sirulnick EJ, Nolan SC, Park JT, Keir G, Thompson EJ, Hickey WF. Antigen-dependent intrathecal antibody synthesis in the normal rat brain: tissue entry and local retention of antigen-specific B cells. *J Immunol.* 1998 Jul 15;161(2):692-701
60. Kraig E, Pierce JL, Clarkin KZ, Standifer NE, Currier P, Wall KA, Infante AJ. Restricted T cell receptor repertoire for acetylcholine receptor in murine myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.* 1996 Dec;71(1-2):87-95

61. Kuppers R, Zhao M, Hansmann ML, Rajewsky K. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J*. 1993 Dec 15;12(13):4955-67
62. Lansford R, Okada A, Chen J, Oltz EM, Blackwell TK, Alt FW, Rathbun G. Mechanism and control of immunoglobulin gene rearrangement. *Molecular Immunology*. 1995, 2<sup>nd</sup> edition, Oxford, IRL Press.
63. Lefvert AK, Pirskanen R, Svanborg E. Anti-idiotypic antibodies, acetylcholine receptor antibodies and disturbed neuromuscular function in healthy relatives to patients with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 1985 Jul;9(1-2):41-53
64. Lefvert AK, Pirskanen R, Eng H, Sundewall AC, Svanborg E. B cell and autoantibody repertoire in a pair of monozygotic twins discordant for myasthenia gravis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989 Nov;53(2 Pt 1):161-70
65. Levinson AI, Zweiman B, Lisak RP. Pokeweed mitogen-induced immunoglobulin secretory responses of thymic B cells in myasthenia gravis: selective secretion of IgG versus IgM cannot be explained by helper functions of thymic T cells. *Clin Immunol Immunopathol*. 1990 Nov;57(2):211-7
66. Levinson W, Jawetz E: *Medical Microbiology and Immunology*. 6<sup>th</sup> ed., Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2000
67. Lim A, Toubert A, Pannetier C, Dougados M, Charron D, Kourilsky P, Even J. Spread of clonal T-cell expansions in rheumatoid arthritis patients. *Hum Immunol*. 1996 Jun-Jul;48(1-2):77-83
68. Lindstrom JM. Acetylcholine receptors and myasthenia. *Muscle Nerve*. 2000 Apr;23(4):453-77

69. Lisak RP, Levinson AI, Zweiman B, Kornstein MJ. Antibodies to acetylcholine receptor and tetanus toxoid: in vitro synthesis by thymic lymphocytes. *J Immunol.* 1986 Aug 15;137(4):1221-5
70. Liu Y, Janeway CA Jr. Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 May 1;89(9):3845-9
71. Luque R, Brieva JA, Moreno A, Manzanal A, Escribano L, Villarrubia J, Velasco JL, Lopez-Jimenez J, Cervero C, Otero MJ, Martinez J, Bellas C, Roldan E. Normal and clonal B lineage cells can be distinguished by their differential expression of B cell antigens and adhesion molecules in peripheral blood from multiple myeloma (MM) patients--diagnostic and clinical implications. *Clin Exp Immunol.* 1998 Jun;112(3):410-8
72. MacGregor AJ, Ollier WE, Venkovsky J, Mageed RA, Carthy D, Silman AJ. Rheumatoid factor isotypes in monozygotic and dizygotic twins discordant for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1995 Dec;22(12):2203-7
73. Marchiori PE, dos Reis M, Quevedo ME, Scaff M, Cossermelli W, Assis JL, de Oliveira RM. Acetylcholine receptor antibody in myasthenia gravis. *Acta Neurol Scand.* 1989 Nov;80(5):387-9
74. Marx A, Wilisch A, Schultz A, Gattenlohner S, Nenninger R, Muller-Hermelink HK. Pathogenesis of myasthenia gravis. *Virchows Arch.* 1997 May;430(5):355-64
75. Maselli RA, Richman DP, Wollmann RL. Inflammation at the neuromuscular junction in myasthenia gravis. *Neurology.* 1991 Sep;41(9):1497-504
76. Melms A, Schalke BC, Kirchner T, Muller-Hermelink HK, Albert E, Wekerle H. Thymus in myasthenia gravis. Isolation of T-lymphocyte lines specific for the nicotinic acetylcholine receptor from thymuses of myasthenic patients. *J Clin Invest.* 1988 Mar;81(3):902-8

77. Melms A, Malcherek G, Gern U, Wietholter H, Muller CA, Schoepfer R, Lindstrom J. T cells from normal and myasthenic individuals recognize the human acetylcholine receptor: heterogeneity of antigenic sites on the alpha-subunit. *Ann Neurol.* 1992 Mar;31(3):311-8
78. Millard CB, Broomfield CA. Anticholinesterases: medical applications of neurochemical principles. *J Neurochem.* 1995 May;64(5):1909-18
79. Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:655-92
80. Morrison LA, Lukacher AE, Braciale VL, Fan DP, Braciale TJ. Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J Exp Med.* 1986 Apr 1;163(4):903-21
81. Müller-Hermelink HK, Marx A, Geuder K, Kirchner T. The pathological basis of thymoma-associated myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci.* 1993 Jun 21;681:56-65
82. Müller-Hermelink HK, Marx A, Kirchner T: Thymus. *Anderson's Pathology*, 10<sup>th</sup> edition, Mosby Year-Book, St. Louis, pp 1218-1243, 1996
83. Murthy VL, Stern LJ. The class II MHC protein HLA-DR1 in complex with an endogenous peptide: implications for the structural basis of the specificity of peptide binding. *Structure.* 1997 Oct 15;5(10):1385-96
84. Nagaeva O, Bondestam K, Olofsson J, Damber MG, Mincheva-Nilsson L. An optimized technique for separation of human decidual leukocytes for cellular and molecular analyses. *Am J Reprod Immunol.* 2002 Apr;47(4):203-12
85. Nakano S, Engel AG. Myasthenia gravis: quantitative immunocytochemical analysis of inflammatory cells and detection of complement membrane attack complex at the end-plate in 30 patients. *Neurology.* 1993 Jun;43(6):1167-72

86. Padberg F, Matsuda M, Fenk R, Patenge N, Kubuschok B, Hohlfeld R, Wekerle H, Spuler S. Myasthenia gravis: selective enrichment of antiacetylcholine receptor antibody production in untransformed human B cell cultures. *Eur J Immunol.* 1999 Nov;29(11):3538-48
87. Pannetier C, Even J, Kourilsky P. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today.* 1995 Apr;16(4):176-81
88. Parker DC. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:331-60
89. Perl A. Role of endogenous retroviruses in autoimmune diseases. *Rheum Dis Clin North Am.* 2003 Feb;29(1):123-43, vii
90. Pierce JL, Zborowski KA, Kraig E, Infante AJ. Highly conserved TCR beta chain CDR3 sequences among immunodominant acetylcholine receptor-reactive T cells in murine myasthenia gravis. *Int Immunol.* 1994 May;6(5):775-83
91. Prevost-Blondel A, Ostankovitch M, Melle J, Pannetier C, Macintyre E, Dreyfus F, Guillet JG. CDR3 size analysis of T cell receptor V beta transcripts: follow-up study in a patient with T cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1995 Oct;9(10):1711-7
92. Puisieux I, Even J, Pannetier C, Jotereau F, Favrot M, Kourilsky P. Oligoclonality of tumor-infiltrating lymphocytes from human melanomas. *J Immunol.* 1994 Sep 15;153(6):2807-18
93. Radic MZ, Weigert M. Genetic and structural evidence for antigen selection of anti-DNA antibodies. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:487-520
94. Rathmell JC, Cooke MP, Ho WY, Grein J, Townsend SE, Davis MM, Goodnow CC. CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. *Nature.* 1995 Jul 13;376(6536):181-4

95. Ritchie AM, Gilden DH, Williamson RA, Burgoon MP, Yu X, Helm K, Corboy JR, Owens GP. Comparative analysis of the CD19+ and CD138+ cell antibody repertoires in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Immunol.* 2004 Aug 173:649-656
96. Roers A, Hansmann ML, Rajewsky K, Kuppers R. Single-cell PCR analysis of T helper cells in human lymph node germinal centers. *Am J Pathol.* 2000 Mar;156(3):1067-71
97. Romi F, Skeie GO, Aarli JA, Gilhus NE. Muscle autoantibodies in subgroups of myasthenia gravis patients. *J Neurol.* 2000 May;247(5):369-75
98. Romi F, Gilhus NE, Aarli JA. Myasthenia gravis: clinical, immunological, and therapeutic advances. *Acta Neurol Scand.* 2005 Feb;111(2):134-41
99. Roxanis I, Micklem K, McConville J, Newsom-Davis J, Willcox N. Thymic myoid cells and germinal center formation in myasthenia gravis; possible roles in pathogenesis. *J Neuroimmunol.* 2002 Apr;125(1-2):185-97
100. Sahashi K, Engel AG, Lambert EH, Howard FM Jr. Ultrastructural localization of the terminal and lytic ninth complement component (C9) at the motor end-plate in myasthenia gravis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1980 Mar;39(2):160-72
101. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988 Jan 29;239(4839):487-91
102. Saito R, Onodera H, Tago H, Suzuki Y, Shimizu M, Matsumura Y, Kondo T, Itoyama Y. Altered expression of chemokine receptor CXCR5 on T cells of myasthenia gravis patients. *J Neuroimmunol.* 2005 Dec 30;170(1-2):172-8
103. Sanders DB, Andrews I, Howard IF, Massey JM: Seronegative myasthenia gravis. *Neurology* 48:S40-S45, 1997

104. Sanders DB. Electrophysiologic tests of neuromuscular transmission. *Suppl Clin Neurophysiol.* 2004;57:167-9
105. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7
106. Schluep M, Willcox N, Vincent A, Dhoot GK, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptors in human thymic myoid cells in situ: an immunohistological study. *Ann Neurol.* 1987 Aug;22(2):212-22
107. Schroder AE, Greiner A, Seyfert C, Berek C. Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jan 9;93(1):221-5
108. Schwartz RH. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med.* 1996 Jul 1;184(1):1-8
109. Shokat KM, Goodnow CC. Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal-centre immune responses. *Nature.* 1995 May 25;375(6529):334-8
110. Sims GP, Shiono H, Willcox N, Stott DI. Somatic hypermutation and selection of B cells in thymic germinal centers responding to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. *J Immunol.* 2001 Aug 15;167(4):1935-44
111. Skulina C, Schmidt S, Dornmair K, Babbe H, Roers A, Rajewsky K, Wekerle H, Hohlfeld R, Goebels N. Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Feb 24;101(8):2428-33
112. Sommer N, Willcox N, Harcourt GC, Newsom-Davis J. Myasthenic thymus and thymoma are selectively enriched in acetylcholine receptor-reactive T cells. *Ann Neurol.* 1990 Sep;28(3):312-9



113. Sommer N, Harcourt GC, Willcox N, Beeson D, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptor-reactive T lymphocytes from healthy subjects and myasthenia gravis patients. *Neurology*. 1991 Aug;41(8):1270-6
114. Song R, Harding CV. Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J Immunol*. 1996 Jun 1;156(11):4182-90
115. Sourdive DJ, Murali-Krishna K, Altman JD, Zajac AJ, Whitmire JK, Pannetier C, Kourilsky P, Evavold B, Sette A, Ahmed R. Conserved T cell receptor repertoire in primary and memory CD8 T cell responses to an acute viral infection. *J Exp Med*. 1998 Jul 6;188(1):71-82
116. Spuler S, Sarropoulos A, Marx A, Hohlfeld R, Wekerle H. Thymoma-associated myasthenia gravis. Transplantation of thymoma and extrathymomal thymic tissue into SCID mice. *Am J Pathol*. 1996 May;148(5):1359-65
117. Stott DI, Hiepe F, Hummel M, Steinhauser G, Berek C. Antigen-driven clonal proliferation of B cells within the target tissue of an autoimmune disease. The salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *J Clin Invest*. 1998 Sep 1;102(5):938-46
118. Sundewall AC, Lefvert AK. Acetylcholine receptor antibodies in primary biliary cirrhosis: characterization of antigen and idiotypic specificity. *Scand J Immunol*. 1990 Apr;31(4):477-84
119. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*. 1994 Nov 3;372(6501):100-3
120. Swanborg RH, Whittum-Hudson JA, Hudson AP. Infectious agents and multiple sclerosis--are *Chlamydia pneumoniae* and human herpes virus 6 involved? *J Neuroimmunol*. 2003 Mar;136(1-2):1-8

121. Takeo G, Motomura M, Mats H, Ohishi K, Yoshimura T, Tsujihata M, Nagataki S. Effect of myasthenic IgG on degradation of junctional acetylcholine receptor. *Muscle Nerve*. 1993 Aug;16(8):840-8
122. Tedder TF, Zhou LJ, Engel P. The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol Today*. 1994 Sep;15(9):437-42
123. Thanvi BR, Lo TC. Update on myasthenia gravis. *Postgrad Med J*. 2004 Dec;80(950):690-700
124. Thorlacius S, Aarli JA, Riise T, Matre R, Johnsen HJ. Associated disorders in myasthenia gravis: autoimmune diseases and their relation to thymectomy. *Acta Neurol Scand*. 1989 Oct;80(4):290-5
125. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983 Apr 14;302(5909):575-81
126. Tzartos S, Langeberg L, Hochschwender S, Swanson LW, Lindstrom J. Characteristics of monoclonal antibodies to denatured Torpedo and to native calf acetylcholine receptors: species, subunit and region specificity. *J Neuroimmunol*. 1986 Jan;10(3):235-53
127. Tzartos SJ, Loutrari HV, Tang F, Kokla A, Walgrave SL, Milius RP, Conti-Tronconi BM. Main immunogenic region of Torpedo electroplax and human muscle acetylcholine receptor: localization and microheterogeneity revealed by the use of synthetic peptides. *J Neurochem*. 1990 Jan;54(1):51-61
128. Vincent A, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptor antibody characteristics in myasthenia gravis. I. Patients with generalized myasthenia or disease restricted to ocular muscles. *Clin Exp Immunol*. 1982 Aug;49(2):257-65

129. Vincent A, Willcox N, Hill M, Curnow J, MacLennan C, Beeson D. Determinant spreading and immune responses to acetylcholine receptors in myasthenia gravis. *Immunol Rev.* 1998 Aug;164:17-68
130. Vincent A, Willcox N. The role of T-cells in the initiation of autoantibody responses in thymoma patients. *Pathol Res Pract.* 1999;195(8):535-40
131. Vogel A, Manns MP, Strassburg CP. Autoimmunity and viruses. *Clin Liver Dis.* 2002 Aug;6(3):739-53
132. Wabl M, Cascalho M, Steinberg C. Hypermutation in antibody affinity maturation. *Curr Opin Immunol.* 1999 Apr;11(2):186-9
133. Wang R, Nelson A, Kimachi K, Grey HM, Farr AG. The role of peptides in thymic positive selection of class II major histocompatibility complex-restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 31;95(7):3804-9
134. Wang YH, Zhang Z, Burrows PD, Kubagawa H, Bridges SL Jr, Findley HW, Cooper MD. V(D)J recombinatorial repertoire diversification during intracлонаl pro-B to B-cell differentiation. *Blood.* 2003 Feb 1;101(3):1030-7
135. Wang ZY, Karachunski PI, Howard JF Jr, Conti-Fine BM. Myasthenia in SCID mice grafted with myasthenic patient lymphocytes: role of CD4+ and CD8+ cells. *Neurology.* 1999 Feb;52(3):484-97
136. Weigle WO, Romball CG. CD4+ T-cell subsets and cytokines involved in peripheral tolerance. *Immunol Today.* 1997 Nov;18(11):533-8
137. Weigert C: Beiträge zur Lehre der Erb'schen Krankheit: I.Über die Erb'sche Krankheit (Myasthenia gravis). II. Pathologisch-anatomischer Beitrag zur Erb'schen Krankheit (Myasthenia gravis). *Neurol Zentralbl* 20:594-601, 1901
138. Wekerle H, Ketelsen UP. Intrathymic pathogenesis and dual genetic control of myasthenia gravis. *Lancet.* 1977 Mar 26;1(8013):678-80

139. Wekerle H, Hohlfeld R, Ketelsen UP, Kalden JR, Kalies I. Thymic myogenesis, T-lymphocytes and the pathogenesis of myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci.* 1981;377:455-76
140. Wekerle H, Bradl M, Linington C, Kaab G, Kojima K. The shaping of the brain-specific T lymphocyte repertoire in the thymus. *Immunol Rev.* 1996 Feb;149:231-43
141. Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, Post J, Morard F, Vita N, Laurent P, Sun RX, Klein B, Dore JM. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol.* 1996 Aug;94(2):318-23
142. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell.* 1995 Mar 10;80(5):695-70
143. Wucherpfennig KW. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J Clin Invest.* 2001 Oct;108(8):1097-104
144. Wylam ME, Anderson PM, Kuntz NL, Rodriguez V. Successful treatment of refractory myasthenia gravis using rituximab: a pediatric case report. *J Pediatr.* 2003 Nov;143(5):674-7
145. Yoshikawa H, Lennon VA. Acetylcholine receptor autoantibody secretion by thymocytes: relationship to myasthenia gravis. *Neurology.* 1997 Aug;49(2):562-7
146. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer.* 2004 Oct;4(10):757-68
147. Zhou J, Lottenbach KR, Barenkamp SJ, Reason DC. Somatic hypermutation and diverse immunoglobulin gene usage in the human antibody response to the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Type 6B. *Infect Immun.* 2004 Jun;72(6):3505-14

## 7. Abkürzungen

|           |                                       |
|-----------|---------------------------------------|
| ACh       | Acetylcholin                          |
| AChR      | Acetylcholin-Rezeptor                 |
| Anti-AChR | Anti-Acetylcholin-Rezeptor-Antikörper |
| APC       | antigen-präsentierende Zelle          |
| BSA       | bovine serum albumin                  |
| BCR       | B-Zell-Rezeptor                       |
| CD        | cluster of differentiation            |
| cDNA      | complementary deoxyribonucleic acid   |
| CDR       | complementarity determining region    |
| DEPC      | Diethylpyrocarbonat                   |
| dNTP      | deoxyribonucleoside triphosphate      |
| EDTA      | Ethylendiamintetraacetat              |
| EMG       | Elektomyographie                      |
| Fab       | Antigen binding fragment              |
| HLA       | humanes Leukozyten Antigen            |
| Ig        | Immunglobulin                         |
| IgG       | Immunglobulin G                       |
| JH        | joining region heavy chain            |
| M         | molar                                 |
| MAC       | Membrane Attack Complex               |

|       |   |
|-------|---|
| MBP   | myelin-basisches Protein                  |
| MG    | Myasthenia gravis                         |
| MHC   | major histocompatibility complex          |
| MIR   | main immunogenic region                   |
| MS    | Multiple Sklerose                         |
| MuSK  | muskel-spezifische Rezeptor-Tyrosinkinase |
| NME   | neuromuskuläre Endplatte                  |
| PBL   | periphere Blutlymphozyten                 |
| PCR   | Polymerase chain reaction                 |
| PBS   | phosphate buffered saline                 |
| PMC   | polymorphonuclear cell                    |
| PVR   | perivaskulärer Raum                       |
| RNA   | ribonucleic acid                          |
| RyR   | Ryanodine Rezeptor                        |
| SCID  | severe combined immunodeficiency          |
| Taq   | Thermus aquaticus                         |
| TCR   | T-cell-receptor                           |
| Thy   | Thymozyten                                |
| TLR-4 | toll-like receptor 4                      |
| VH    | variable heavy chain                      |

## **8. Danksagung**

Es ist mir ein besonderes Anliegen, mich an dieser Stelle bei den Menschen zu bedanken, die direkt und indirekt zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben:

Prof. Dr. Norbert Goebels, der mich als Doktorvater und Betreuer durch die Höhen und Tiefen der Dissertation geleitet hat und dabei stets eine angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre geschaffen hat.

Prof. Dr. Reinhard Hohlfeld, der mich als Doktorand in sein Institut aufgenommen und mich an Prof. Dr. Norbert Goebels vermittelt hat.

Frau Ingrid Eiglmeier, die mich in die Feinheiten der Laborarbeit eingeführt hat und immer geduldig mit Rat und Tat zu Seite stand.

Monika Hofbauer, die bei vielen Problemen stets hilfsbereit und kompetent zur Seite stand.

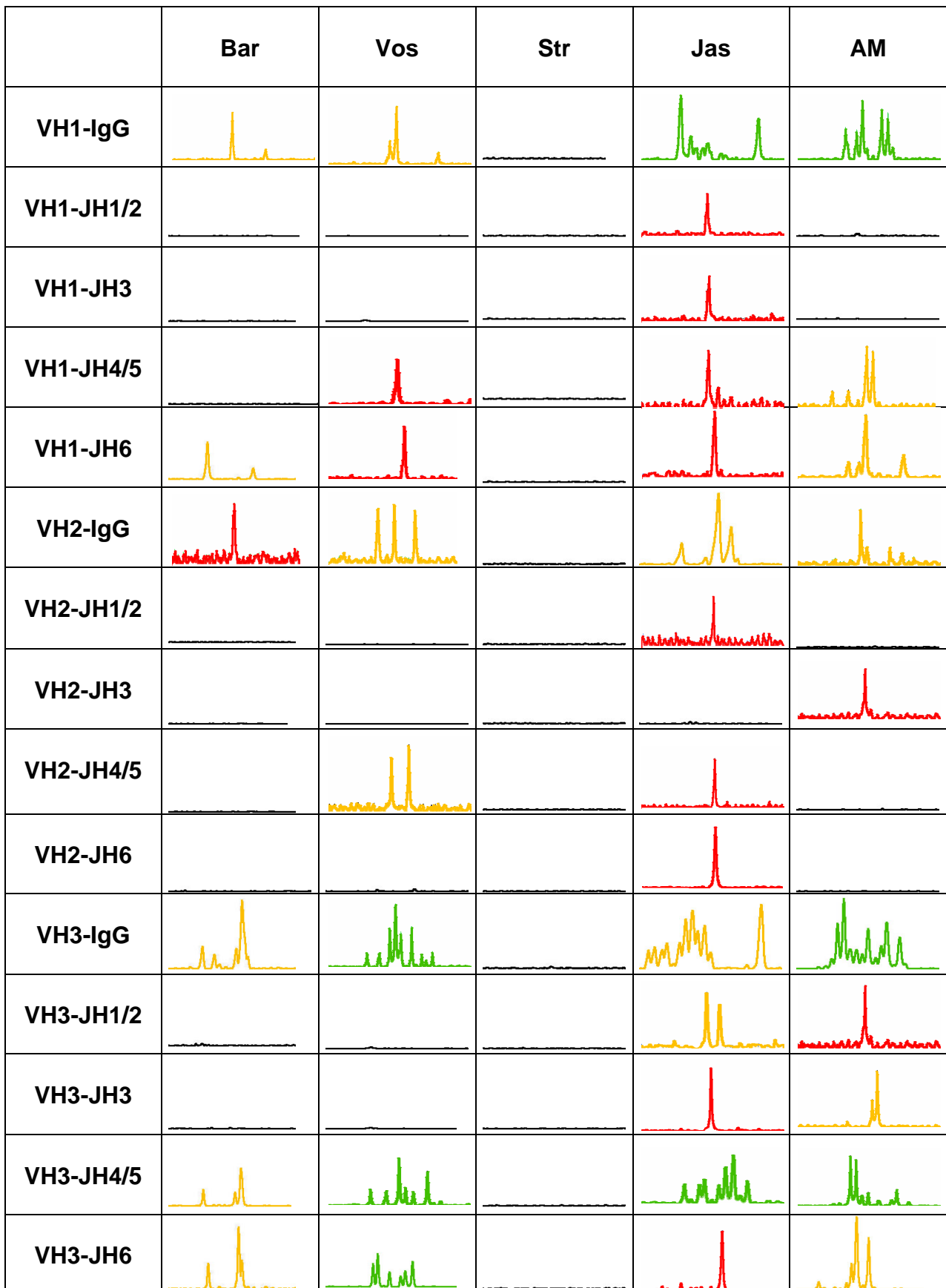
Meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben, mir das Medizinstudium ermöglichten und ohne die diese Arbeit nicht gelungen wäre.

Meinem Bruder Uli

Meinen Freunden Benedikt, Larissa, Peter und Marlis und Rebekka.

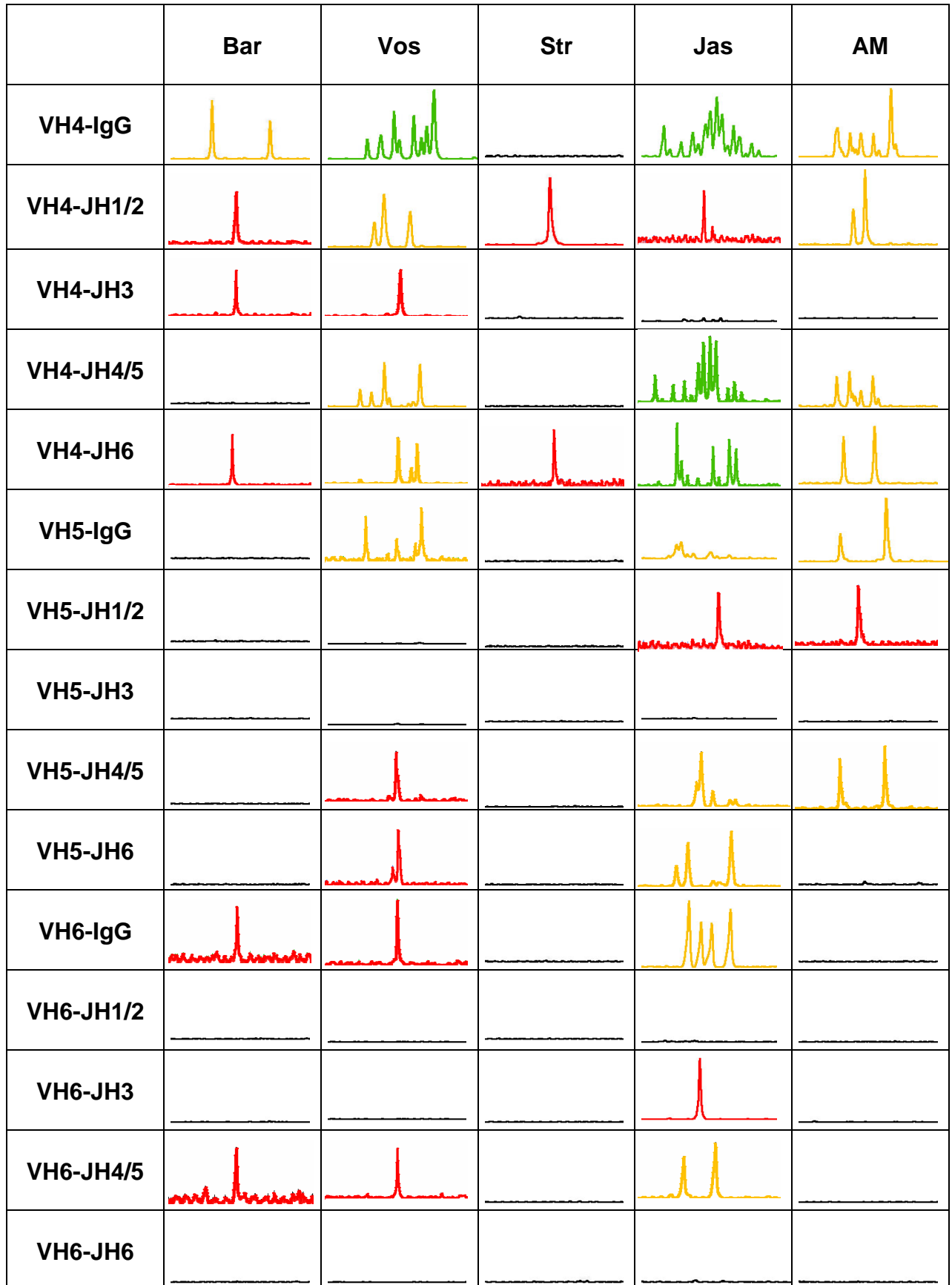
## 9. Anhang

### 9.1. CDR3-Spektrotypings von CD19+Thymozyten der Patienten (Teil 1/2)

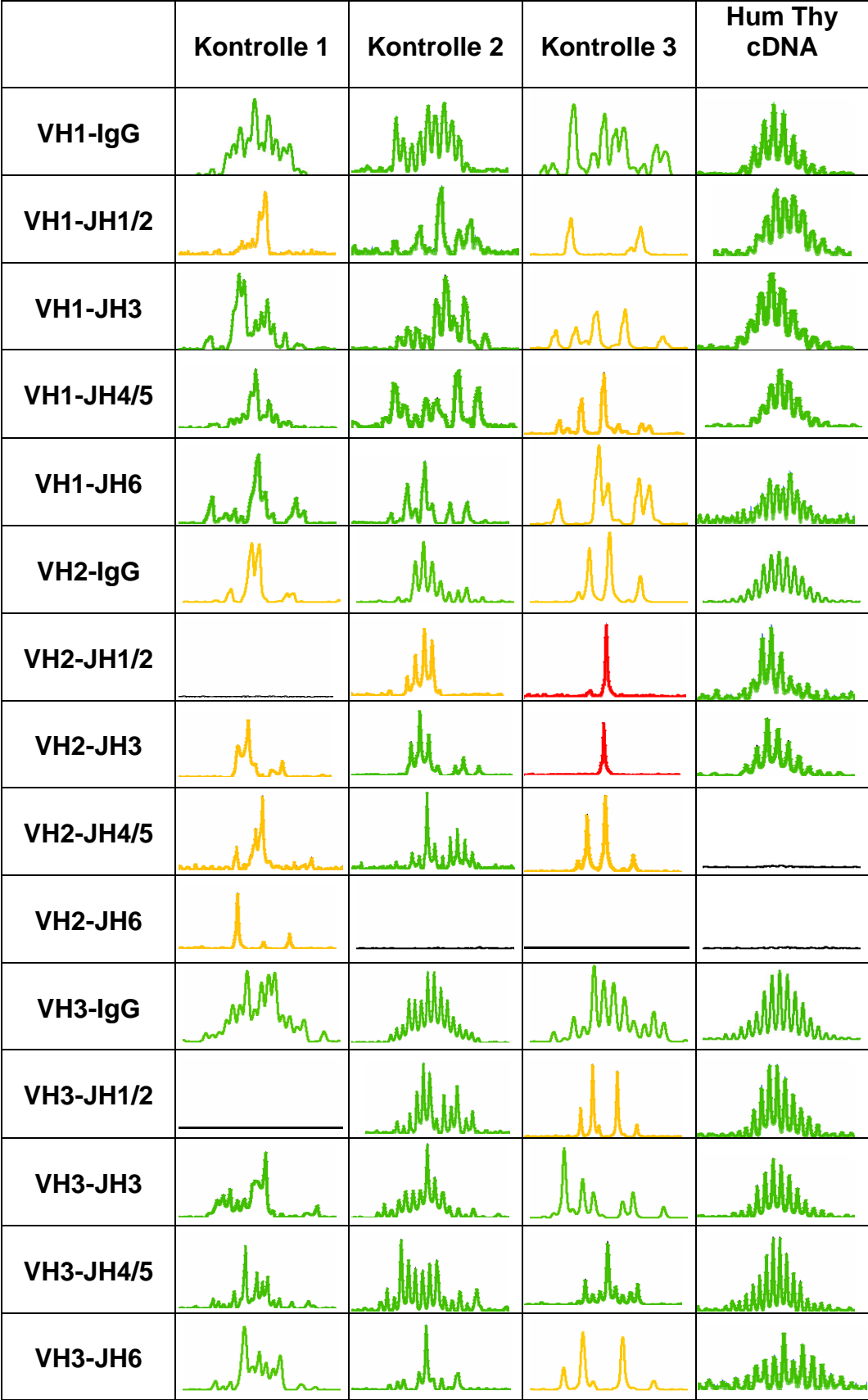




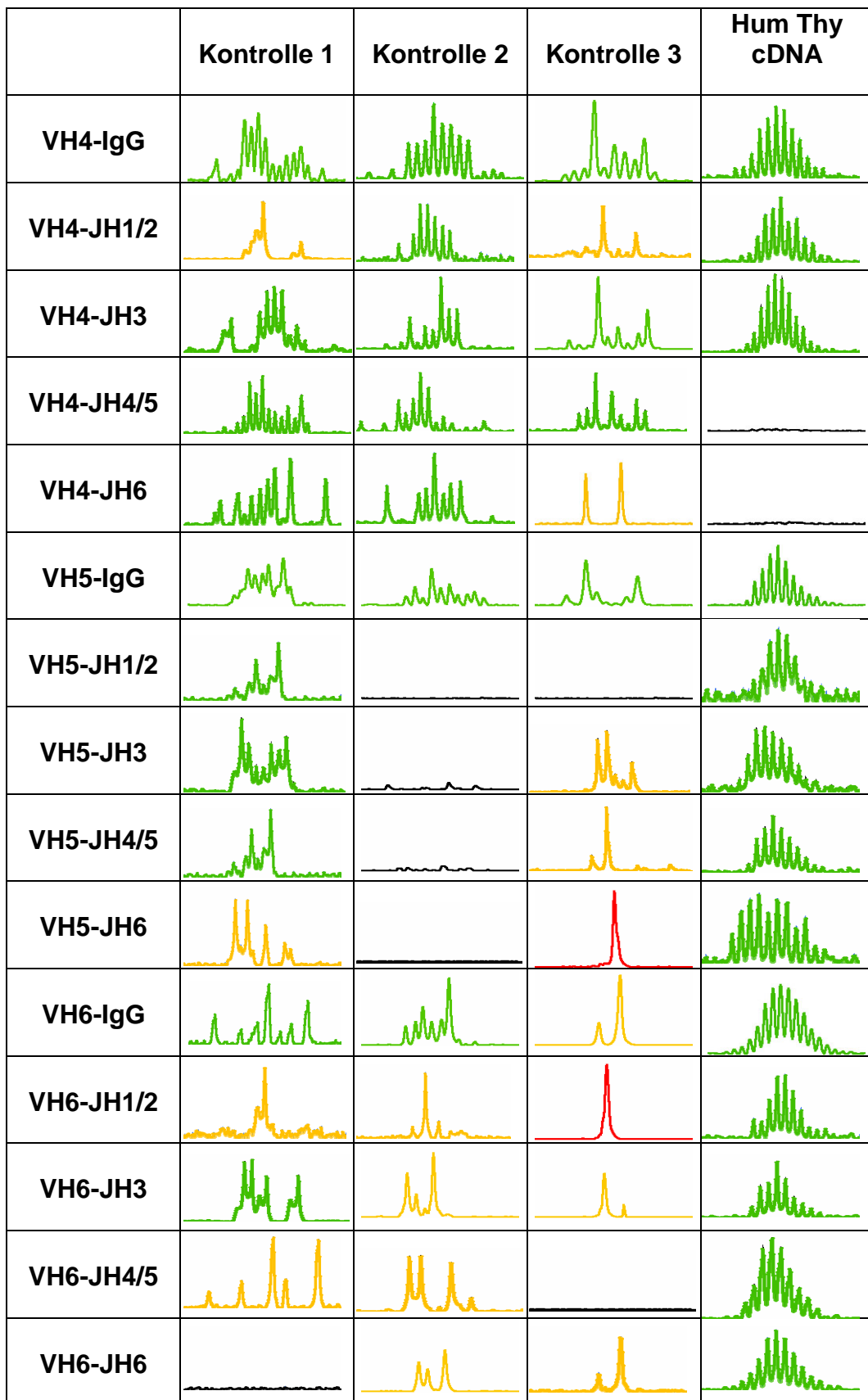
CDR3-Spektratypings von CD19+Thymozyten der Patienten (Teil 2-2)



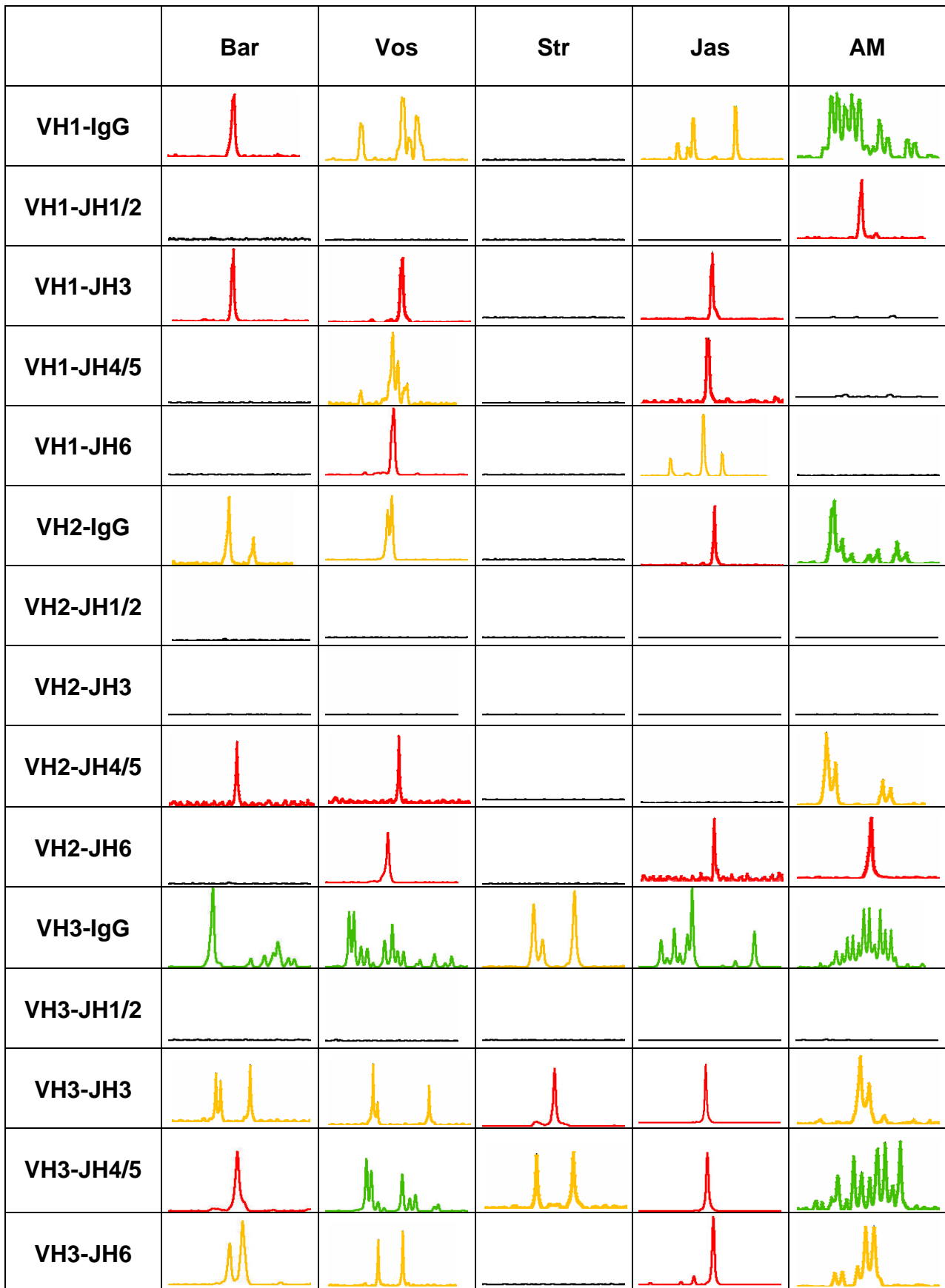
9.2. CDR3-Spektratypings von CD19+Thymozyten der Kontrollen (Teil 1/2)



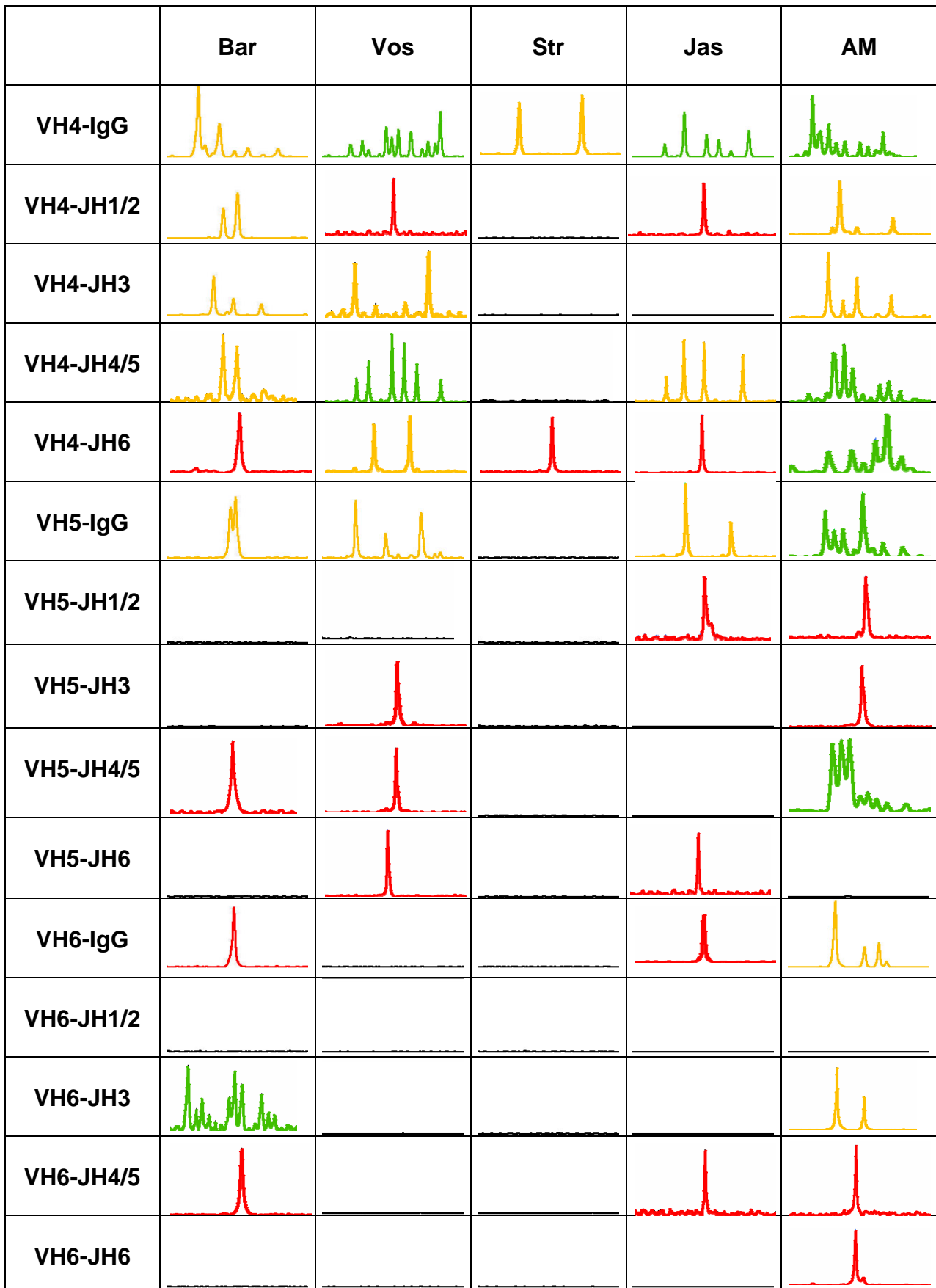
CDR3-Spektratypings von CD19+Thymozyten der Kontrollen (Teil 2/2)



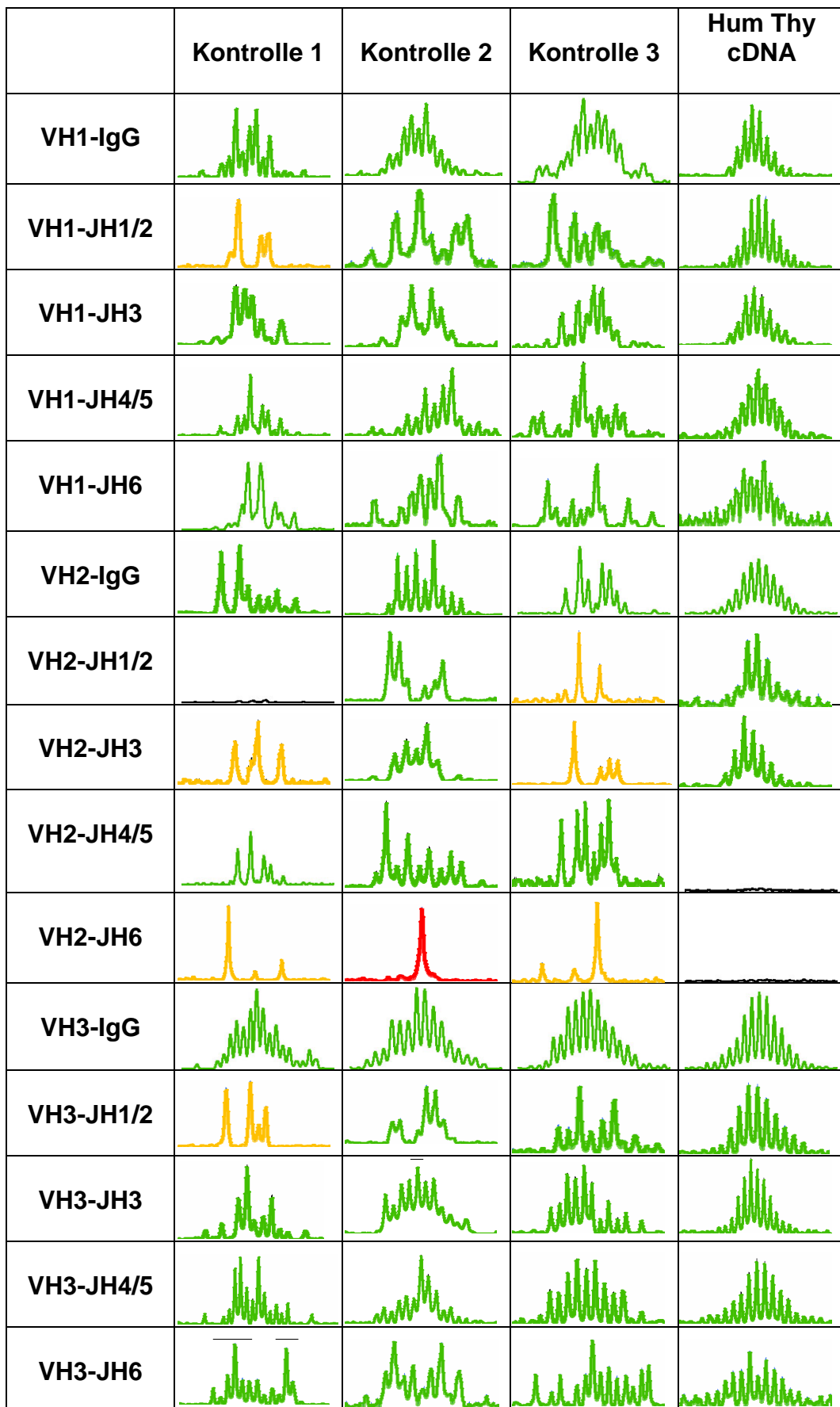
### 9.3. CDR3-Spektratypings von CD138+Thymozyten der Patienten (Teil 1/2)



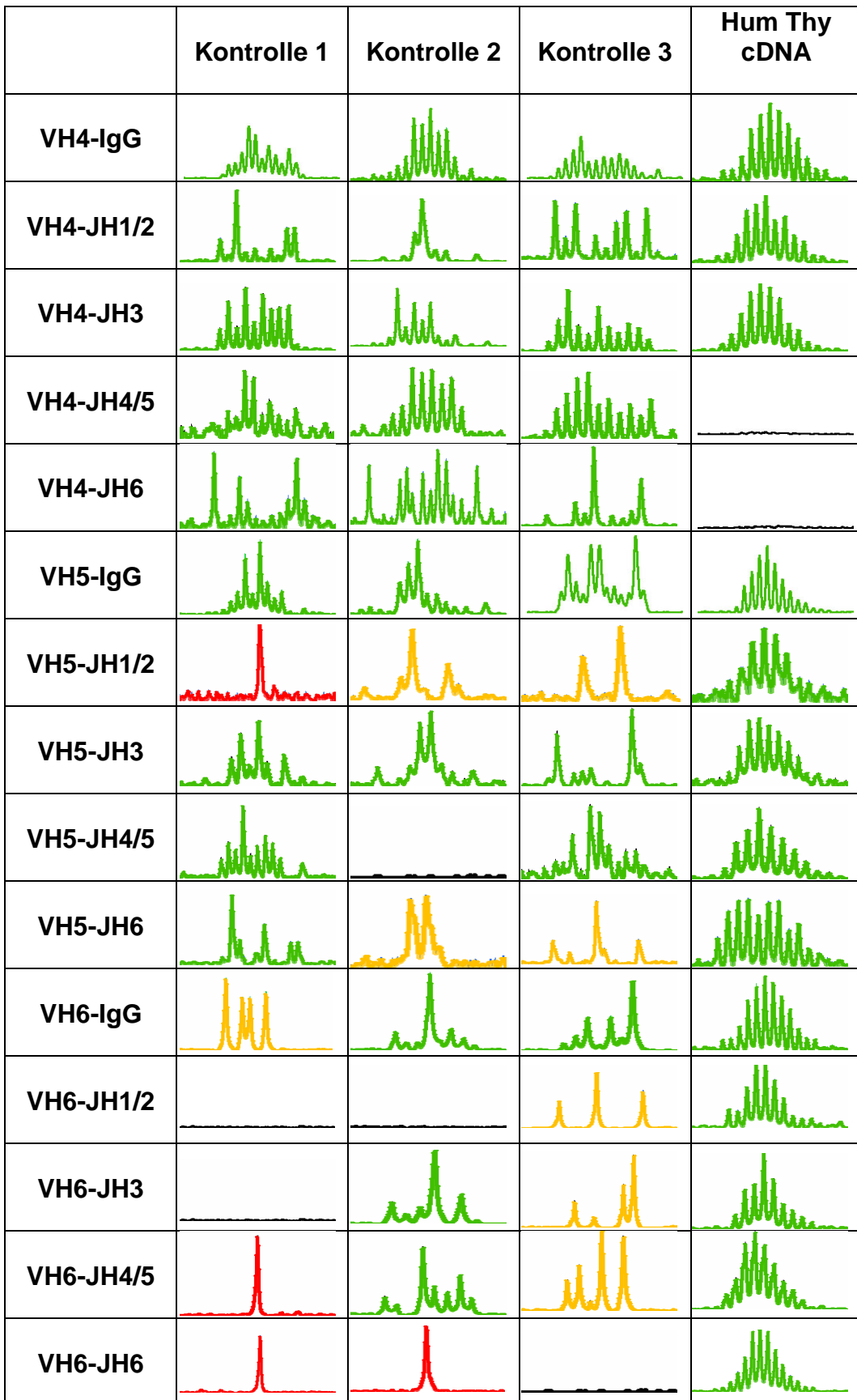
CDR3-Spektratypings von CD138+Thymozyten der Patienten (Teil 2/2)



#### 9.4. CDR3-Spektratypings von CD138+Thymozyten der Kontrollen (Teil 1/2)



CDR3-Spektratypings von CD138+Thymozyten der Kontrollen (Teil 2/2)



## 9.5. Sequenzen der verwendeten Primer

### 9.5.1. Konventionelle VH-, JH- und IgG-C-Primer (Gibco BRL®):

VH1: 5'-CCT-CAG-TGA-AGG-TYT-CCT-GCA-AGG-C-3'

VH2: 5'-GTC-CTG-CGC-TGG-TGA-AAC-CCA-CAC-A-3'

VH3: 5'-GGG-GTC-CCT-GAG-ACT-CTC-CTG-TGC-AG-3'

VH4: 5'-GAC-CCT-GTC-CCT-CAC-CTG-CRC-TGT-C-3'

VH5: 5'-AAA-AAG-CCC-GGG-GAG-GTC-TGA-RGA-3'

VH6: 5'-ACC-TGT-GCC-ATC-TCC-GGG-GAC-AGT-G-3'

IgG-C\*: 5'-GTAGGACAGC(CT)GGGAAGGTGTGC-3'

JH1/2\*: 5'-TGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC-3'

JH3\*: 5'-TGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC-3'

JH4/5\*: 5'-TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC-3'

JH6\*: 5'-TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC-3'

\*: Runoff-Primer mit gleicher Sequenz und Fluoreszenzmarkierung (Farbstoffe FAM, HEX, TET)

### 9.5.2. Klonspezifische Primer (Matrizenprodukt/Patient; MWG-Biotech®):

aus VH4-JH3 CD138+ Thy Bar: 5' – CAAAAGCATAGAAACCACTACTAT – 3'

aus VH4-JH6 CD138+ Thy Bar: 5' – CCGTAGTAGTGGTACTTGTGACTC – 3'

aus VH4-JH1/2 CD138+ Thy Jas: 5' – GGCCCCAGTGTTGGAAGTATTCAG – 3'

aus VH6-JH4/5 CD138+ PBL Jas: 5' – CCAGTAGTCGTAGATTCTCCCCGA – 3'

aus VH1-JH4/5 CD 19+ Thy Vos: 5' – AGTCGCACCACCAAATACGCAAC – 3'

aus VH4-JH1/2 CD138+ Thy AM: 5' – AAAGCATCAATCCTTCCACCCCT – 3'



## **10. Lebenslauf**

27.05.1976: Geburt als erstes Kind von Gabriele Witt (geb. Karl) und Prof. Dr. Thomas Witt in München

1982-1986: Rotbuchen-Grundschule in München

1984-1995: Maria-Theresia-Gymnasium in München

1995: Abitur

August 1995 – September 1996: Zivildienst am Krankenhaus München-Harlaching

November 1996 – Mai 2003: Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

September 1998: Ärztliche Vorprüfung

August 1999: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

März 2002: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

April 2002 – November 2002: Mehrmonatige Studienaufenthalte in Kanada und der Schweiz im Rahmen des „Praktischen Jahres“

Mai 2003: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Juni 2000- Juni 2003: Experimenteller Teil der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. med. Norbert Goebels am Institut für Klinische Neuroimmunologie der Ludwigs-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof.Dr. med. R. Hohlfeld)

Seit Oktober 2004 wissenschaftlicher Assistent an der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität (Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff)