

Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. M. Hertl

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen

und Marburg GmbH, Standort Marburg

**Charakterisierung der humoralen und zellulären  
Autoimmunantwort nach B-Zell-depletierender  
Therapie beim Pemphigus vulgaris**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung

des Doktorgrades der Humanbiologie (Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Angela Nagel  
aus Schönebeck

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 18. Mai 2009.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Michael Hertl

Koreferent: Prof. Dr. Stefan Bauer

*Was ist Wissenschaft?*

*Mit verbundenen Augen  
in einem dunklen Zimmer  
nach einer schwarzen Katze suchen.*

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>VII</b>
<b>Summary .....</b>	<b>IX</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Autoimmunität .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Pemphigus vulgaris (PV) .....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Charakteristik .....	2
1.2.2. Desmosomale Autoantigene .....	3
1.2.3. Desmosomale Autoantikörper der IgG-Klasse .....	4
1.2.4. Mechanismus der Blasenbildung .....	5
1.2.5. Diagnostische Merkmale .....	7
1.2.6. Die zelluläre Autoimmunantwort .....	9
1.2.7. Die humorale Autoimmunantwort .....	12
1.2.8. Die Interaktion der humoralen und zellulären Autoimmunantwort beim PV .....	15
1.2.9. Therapie .....	16
<b>1.3. Rituximab .....</b>	<b>19</b>
1.3.1. Das CD20-Molekül .....	19
1.3.2. Der anti-CD20 monoklonale Antikörper Rituximab .....	19
1.3.3. B-Zell-depletierende Therapie mittels Rituximab .....	20
1.3.4. Rituximab und Autoimmunkrankheiten .....	24
<b>1.4. B-Zell-aktivierende Faktoren .....</b>	<b>26</b>
1.4.1. BAFF und APRIL .....	26
1.4.2. Rezeptoren B-Zell-aktivierender Faktoren .....	28
1.4.3. BAFF und APRIL in Autoimmunerkrankungen .....	30
1.4.4. Therapeutische Manipulation der B-Zell-Homöostase .....	32
<b>2. Material .....</b>	<b>34</b>
<b>2.1. Patientenmaterial .....</b>	<b>34</b>
<b>2.2. Lösungen und Zusätze für die Kultivierung humaner Zellen .....</b>	<b>34</b>
<b>2.3. Chemikalien .....</b>	<b>34</b>
<b>2.4. Puffer und Kulturmedien .....</b>	<b>35</b>
<b>2.5. Antikörper .....</b>	<b>35</b>
<b>2.6. Kommerzielle Tests für die serologische und zelluläre Diagnostik .....</b>	<b>35</b>
<b>2.7. Verbrauchsartikel .....</b>	<b>36</b>
<b>2.8. Geräte .....</b>	<b>36</b>
<b>2.9. Software .....</b>	<b>37</b>
<b>3. Methoden .....</b>	<b>38</b>

<b>3.1. Patienten und Einschlusskriterien .....</b>	<b>38</b>
3.1.1.    Patienten der Studie: Der Einfluss von Rituximab auf die zelluläre Autoimmunantwort beim PV .....	38
3.1.2.    Patienten der Studie: Der Einfluss von Rituximab auf die humorale Immunantwort beim PV .....	39
<b>3.2. Klinische Evaluation .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3. Serologische Diagnostik .....</b>	<b>41</b>
3.3.1.    Dsg1- und Dsg3-spezifische Autoantikörper .....	41
3.3.2.    Pathogenspezifische Antikörper .....	41
3.3.3.    B-Zell-aktivierende Faktoren .....	41
3.3.4.    Zytokine .....	42
<b>3.4. Zelluläre Diagnostik .....</b>	<b>42</b>
3.4.1.    HLA-Typisierung .....	42
3.4.2.    Zellseparation .....	42
3.4.3.    Zellzahlbestimmung .....	43
3.4.4.    Nachweis von Zelloberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie .....	43
3.4.5.    Ex vivo Analyse von Dsg3-reaktiven Zellen mittels MACS Zytokin- Sekretions-Assay .....	45
<b>3.5. Statistik .....</b>	<b>47</b>
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1. Der Einfluss von Rituximab auf die zelluläre Autoimmunantwort beim             Pemphigus vulgaris – Depletion autoreaktiver B-Zellen und Verminderung             Dsg3-reaktiver T-Zellen .....</b>	<b>48</b>
4.1.1.    Der klinische Verlauf von PV-Patienten nach Rituximab-Therapie .....	48
4.1.2.    Die Rituximab-induzierte B-Zell-Depletion .....	50
4.1.3.    Die Abhängigkeit der Serumkonzentration Dsg3-spezifischer Autoantikörper vom Alter der Patienten .....	51
4.1.4.    Die Abnahme Dsg3-spezifischer Autoantikörper nach B-Zell-Depletion .....	52
4.1.5.    Die allgemeinen T-Zell-Frequenzen bleiben von der B-Zell-Depletion unbeeinflusst .....	55
4.1.6.    Rituximab induziert eine deutliche Abnahme der Zahl peripherer, autoreaktiver CD4 <sup>+</sup> T-Helfer-Zellen .....	56
4.1.7.    CD20-Expression auf T-Zellen .....	59
4.1.8.    Tetanus Toxoid (TT)-spezifische IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Th1-Zellen bleiben von einer B-Zell-Depletion unbeeinflusst .....	60
4.1.9.    Rituximab-induzierte Reduktion des Serum-IL-10 bei PV-Patienten .....	61
4.1.10.   Klinischer Verlauf nach B-Zell-Depletion bei Trägern verschiedener HLA-Klasse II - Allele .....	62
4.1.11.   Rezidiv des Pemphigus trotz depletierter bzw. stark verminderter peripherer B-Zellen .....	63

4.1.12.	Persistenz Dsg3-spezifischer Autoantikörper bei PV-Patienten in Remission .....	66
<b>4.2.</b>	<b>Der Einfluss von Rituximab auf die humorale Immunantwort beim Pemphigus vulgaris in Hinblick auf B-Zell-aktivierende Faktoren und pathogenspezifische bzw. autoreaktive Antikörper .....</b>	<b>69</b>
4.2.1.	Rituximab führt zu einer ausgeprägten BAFF-Induktion bei PV-Patienten.....	69
4.2.2.	BAFF korreliert unter Rituximab-Therapie invers mit der Zahl peripherer CD19 <sup>+</sup> B-Zellen .....	72
4.2.3.	Die Wirkung von Rituximab auf die B-Zell-Faktoren BAFF und APRIL und die Frequenz peripherer B-Zellen bei PV-Patienten.....	74
4.2.4.	Die Wirkung der B-Zell-Depletion auf die Bildung pathogenspezifischer und autoreaktiver IgG-Antikörper bei PV-Patienten .....	75
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>79</b>
<b>5.1.</b>	<b>Rituximab-vermittelte Effekte auf die humorale und zelluläre Autoimmunantwort beim Pemphigus vulgaris.....</b>	<b>79</b>
5.1.1.	Die humorale (Auto)Immunantwort nach B-Zell-depletierender Therapie .....	79
5.1.2.	Die zelluläre (Auto)Immunantwort nach B-Zell-depletierender Therapie .....	82
<b>5.2.</b>	<b>Rituximab-vermittelte Effekte auf die humorale Immunantwort beim Pemphigus vulgaris und die heterogene Wirkungsweise von BAFF auf pathogenspezifische und autoreaktive Antikörper .....</b>	<b>90</b>
5.2.1.	Die Wirkung verschiedener Therapieformen auf die Serumkonzentrationen von BAFF und APRIL beim PV.....	90
5.2.2.	Die Auswirkung der B-Zell-Depletion auf BAFF beim PV .....	91
5.2.3.	Die heterogene Wirkungsweise von BAFF auf pathogenspezifische und autoreaktive Antikörper bei Patienten mit PV .....	95
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellarischer Anhang .....</b>	<b>115</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>121</b>
<b>9.</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>122</b>
<b>10.</b>	<b>Verzeichnis akademischer Lehrer .....</b>	<b>123</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABSI	engl.: <i>autoimmune bullous skin disease intensity score</i> (Krankheitsscore für blasenbildende Autoimmunerkrankungen)
APC	a) engl.: <i>antigen presenting cell</i> (antigenpräsentierende Zelle) b) Allophycocyanin
APRIL	engl.: <i>a proliferation-inducing ligand</i> (ein Proliferation-induzierender Ligand)
AZA	Azathioprin
BAFF	engl.: <i>B cell activating factor of the TNF family</i> (B-Zell-aktivierender Faktor aus der Familie der Tumornekrosefaktoren)
BAFF-R	BAFF-Rezeptor
Bcl	B-Zell-Lymphom
BCMA	engl.: <i>B cell maturation antigen</i> (B-Zell-Reifungs-Antigen)
BSA	engl.: <i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
Caspase	engl.: <i>cysteinyI-aspartate specific protease</i> (Aspartat-spezifische Cysteinprotease)
CD	engl.: <i>cluster of differentiation</i> (Differenzierungskluster)
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
d.h.	das heißt
DIF	direkte Immunfluoreszenz
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Dsg	Desmoglein
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
et al.	lat.: <i>et alii</i> (und andere)
FACS	engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i> (fluoreszenzaktivierte Zelltrennung; Durchflusszytometrie)
FcγR	Fc gamma Rezeptor
FDA	engl.: <i>food and drug administration</i>
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
Foxp3	Transkriptionsfaktor „ <i>Forkhead box protein 3</i> “
FSC	engl.: <i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
g	a) Normalfallbeschleunigung (9,81 m·s <sup>-2</sup> ) b) Gramm
h	Stunde(n)

---

HLA	engl.: <i>human leucocyte antigen</i> (humanes Leukozyten Antigen)
HRP	engl.: <i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
IA	Immunadsorption
IFN $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
IS	Immunsuppression; immunsuppressive Therapie
ITP	idiopathische thrombozytopenische Purpura
IVIg	intravenöse Immunglobuline
KOF	Körperoberfläche
l	Liter
m	a) milli ( $\times 10^{-3}$ ) b) Meter
M	Molar
MACS	engl.: <i>magnetic cell separation</i> (Magnetische Zellseparation)
mAk	monoklonaler Antikörper
Mcl-1	engl.: <i>myeloid cell leukemia sequence 1</i>
min	Minute(n)
MMF	Mykophenolat-Mofetil
mRNA	engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
n	a) engl.: <i>number</i> (Anzahl) b) nano ( $\times 10^{-9}$ )
NF $\kappa$ B	Transkriptionsfaktor „ <i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i> “
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NTU	engl.: <i>nephelometric turbidity units</i> (Nephelometrischer Trübungswert)
OD	optische Dichte
p	a) Irrtumswahrscheinlichkeit b) pico ( $\times 10^{-12}$ )
PBMC	engl.: <i>peripheral blood mononuclear cells</i> (periphere mononukleäre Blutzellen)
PCP	engl.: <i>pneumococcal capsular polysaccharide</i> (Pneumokokken Kapsel Polysaccharid)
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
PF	Pemphigus foliaceus
PHS	engl.: <i>pooled human serum</i> (gepooltes humanes Serum)
pSS	primäres Sjögren Syndrom
PV	Pemphigus vulgaris
PZ	Plasmazellen
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson



RA	Rheumatoide Arthritis
rpm	Rotationen pro Minute
Rtx	Rituximab
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SLE	systemischer Lupus Erythematoses
SSC	engl.: <i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
SSc	systemische Sklerose
Tab.	Tabelle
TAC1	engl.: <i>transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand (CAML) interactor</i> (Transmembranaktivator und Kalzium-Modulator und Cyclophilin-Ligand Interaktor)
TGF $\beta$	engl.: <i>tumor growth factor <math>\beta</math></i> (Tumor-Wachstums-Faktor $\beta$ )
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TPMT	Thiopurinmethyltransferase
Treg	regulatorische T-Zellen
TT	Tetanus Toxoid
U	engl.: <i>units</i> (Einheiten)
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VZV	Varizella-Zoster-Virus
z.B.	zum Beispiel
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\mu$	mikro ( $\times 10^{-6}$ )

In der Arbeit verwendete englische Bezeichnungen (z.B. Eigennamen) sind *kursiv* dargestellt.

# Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Abbildungsverzeichnis

### Einleitung

- Abb. 1: Aufbau der Epidermis.
- Abb. 2: Struktureller und molekularer Aufbau der Desmosomen.
- Abb. 3: Desmoglein-Kompensations-Theorie.
- Abb. 4: Klinische Manifestation des Pemphigus vulgaris (PV).
- Abb. 5: Direkte und indirekte Immunfluoreszenz beim Pemphigus vulgaris (PV).
- Abb. 6: Histologische Begutachtung der periläsionalen Regionen im Pemphigus vulgaris (PV).
- Abb. 7: Neonataler Pemphigus vulgaris (PV).
- Abb. 8: Interaktion zwischen autoreaktiven B- und T-Zellen beim Pemphigus vulgaris (PV).
- Abb. 9: Mechanismen der Rituximab-induzierten B-Zell-Depletion.
- Abb. 10: Die Wirkung von Rituximab auf die zelluläre und humorale Autoimmunantwort.
- Abb. 11: Die Wirkung von BAFF (*B cell activating factor*) auf verschiedene zelluläre Immunfunktionen.

### Methoden

- Abb. 12: Das optische System eines FACSCaliburs.
- Abb. 13: Die Analyse der durchflusszytometrischen Messergebnisse.

### Ergebnisse

- Abb. 14: Das klinische Bild von Patienten mit refraktärem Pemphigus vulgaris (PV) nach Rituximab-Behandlung.
- Abb. 15: Das klinische Ansprechen von Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten auf die Rituximab-Behandlung.
- Abb. 16: Die Rituximab-induzierte B-Zell-Depletion bei Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten.
- Abb. 17: Die Abhängigkeit der Serumkonzentration autoreaktiver IgG-Antikörper vom Alter der Patienten vor Rituximab-Therapie.
- Abb. 18: Die Abhängigkeit der Serumkonzentration autoreaktiver IgG1- und IgG4-Antikörper vom Alter der Patienten vor Rituximab-Therapie.
- Abb. 19: Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifische IgG-Autoantikörpertiter nach Rituximab-Therapie.
- Abb. 20: Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifische IgG1-Autoantikörpertiter nach Rituximab-Therapie.
- Abb. 21: Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifische IgG4-Autoantikörpertiter nach Rituximab-Therapie.

- Abb. 22: Die Wirkung von Rituximab auf die peripheren T-Zellen im Blut.
- Abb. 23: Chronische Suppression autoreaktiver T-Helfer (Th)-Zellen nach Rituximab-Behandlung.
- Abb. 24: Die Wirkung von Rituximab auf autoreaktive IL-10<sup>+</sup> Zellen.
- Abb. 25: Die CD20-Expression auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen bei Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten.
- Abb. 26: Die Wirkung von Rituximab auf Tetanus Toxoid (TT)-spezifische IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Helfer (Th)1-Zellen und TT-spezifische IgG-Antikörper im Serum von Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten.
- Abb. 27: Veränderungen der Serumkonzentration von IFN $\gamma$ , IL-4 und IL-10 nach B-Zell-Depletion.
- Abb. 28: Klinischer Verlauf nach B-Zell-Depletion bei Trägern verschiedener HLA-Klasse II - Allele.
- Abb. 29: Autoantikörper-Verlauf im Serum von Pemphigus-Patienten mit klinischem Rezidiv.
- Abb. 30: Frequenzen autoreaktiver T-Helfer (Th)- und B-Zellen im peripheren Blut von Pemphigus-Patienten mit klinischem Rezidiv.
- Abb. 31: Autoantikörpertiter und Frequenz autoreaktiver Zellen eines repräsentativen Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten nach Rituximab-Therapie.
- Abb. 32: Die Abhängigkeit autoreaktiver IgG-Antikörpertiter vom Alter der Patienten sechs Monate nach Rituximab-Behandlung.
- Abb. 33: Die Abhängigkeit der Serumkonzentration autoreaktiver IgG1- und IgG4-Antikörper vom Alter der Patienten sechs Monate nach Rituximab-Therapie.
- Abb. 34: Persistenz Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifischer IgG-Autoantikörper im Serum eines Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten in klinischer Remission.
- Abb. 35: BAFF (*B cell activating factor*)- und APRIL (*a proliferation-inducing ligand*)-Konzentrationen im Serum von Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten unter verschiedenen Behandlungsformen.
- Abb. 36: Die relative Änderung der BAFF (*B cell activating factor*)- und APRIL (*a proliferation-inducing ligand*)-Konzentrationen im Serum eines Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten nach Immunadsorption (IA) und anschließender Rituximab-Behandlung (Rtx).
- Abb. 37: Wirkung von Rituximab auf die BAFF (*B cell activating factor*)- und APRIL (*a proliferation-inducing ligand*)-Serumkonzentration der Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten.
- Abb. 38: BAFF (*B cell activating factor*)- und APRIL (*a proliferation-inducing ligand*)-Serumkonzentration der Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten in Relation zur Frequenz peripherer CD19<sup>+</sup> B-Zellen.
- Abb. 39: Die Beziehung zwischen B-Zell-Faktoren und peripheren B-Zellen.
- Abb. 40: Die Abhängigkeit B-Zell-aktivierender Faktoren von der Anzahl peripherer B-Zellen.

- Abb. 41: Die Wirkung von Immunsuppression (IS) bzw. adjuvanter Immunadsorption (IA) auf autoreaktive und pathogenspezifische IgG-Antikörper.
- Abb. 42: Die unterschiedliche Wirkung von Rituximab auf autoreaktive und pathogenspezifische IgG-Antikörper.
- Abb. 43: Der Verlauf pathogenspezifischer und autoreaktiver Antikörper nach B-Zell-Depletion.
- Abb. 44: Die Abhängigkeit pathogenspezifischer und autoreaktiver Antikörperproduktion von BAFF (*B cell activating factor*).

## Tabellenverzeichnis

### Methoden/Tabellarischer Anhang

- Tab. 1: Patientencharakteristik einschließlich klinischer Manifestation, Serum-Autoantikörper-Konzentrationen und HLA-Klasse II - Genotypisierung der in die Studie „Der Einfluss von Rituximab auf die zelluläre Autoimmunantwort beim Pemphigus vulgaris (PV)“ eingeschlossenen Patienten.
- Tab. 2: Patientencharakteristik einschließlich klinischer Manifestation und Behandlungsprotokoll der in die Studie „Der Einfluss von Rituximab auf die humorale Immunantwort beim Pemphigus vulgaris (PV)“ eingeschlossenen Patienten.
- a) Gruppe I
  - b) Gruppe II
  - c) Gruppe III

### Ergebnisse

- Tab. 3: Klinischer Zustand der Rituximab-behandelten Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten.

## Zusammenfassung

Pemphigus vulgaris (PV) ist eine schwere, potenziell lebensbedrohliche, Autoimmunerkrankung mit ausgeprägter Blasenbildung und erosiven Substanzdefekten an der Haut und/oder den Schleimhäuten. Die Blasenbildung ist eine Folge der Akantholyse epidermaler Keratinozyten und wird durch IgG-Autoantikörper, die gegen die desmosomalen Adhäsionsproteine Desmoglein (Dsg) 3 +/- Dsg1 gerichtet sind, induziert. B-Lymphozyten besitzen in der Pathogenese des PV eine fundamentale Bedeutung. Sie sind autoantikörperproduzierende Zellen, Vorläufer autoreaktiver Plasmazellen und sezernieren zahlreiche proinflammatorische Zytokine. Trotz des allgemein gebräuchlichen Einsatzes immunsuppressiver Medikamente, einschließlich hochdosierter Glukokortikoide, ist die Behandlung des PV sehr komplex. Adjuvante Behandlungsstrategien, wie die Immunadsorption und die Verabreichung des monoklonalen anti-CD20 Antikörpers, Rituximab, wurden erfolgreich in der Therapie schwerer und hartnäckiger Krankheitsverläufe des PV eingesetzt. Die Applikation von Rituximab resultiert in einer klinischen Langzeitremission, die wahrscheinlich Folge der Depletion autoreaktiver Gedächtnis-B-Zellen als Vorläufer autoantikörperproduzierender Plasmazellen ist. Obwohl PV als autoantikörpervermittelte, organspezifische Autoimmunerkrankung eingestuft wird, besitzen Dsg3-reaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen für die Induktion und Aufrechterhaltung der Erkrankung eine entscheidende Bedeutung.

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von Rituximab auf die Frequenzen autoreaktiver Dsg3-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Helfer (Th)-Zellen untersucht. Zwölf PV-Patienten mit schwerer und/oder refraktärer Erkrankung, welche einen Zyklus Rituximab in Kombination mit systemischer immunsuppressiver Medikation erhielten, wurden in die Studie inkludiert. Über einen zwölfmonatigen Beobachtungszeitraum nach Behandlung wurden die Frequenzen peripherer Dsg3-spezifischer Th1- und Th2-Zellen im Blut der behandelten Patienten bestimmt. Nach Applikation von Rituximab war eine signifikante Abnahme Dsg3-reaktiver CD4<sup>+</sup> Th1- und Th2-Zellen detektierbar, welche der, bereits eine Woche nach Behandlung einsetzenden und durchschnittlich sechs bis zwölf Monate anhaltenden, vollständigen B-Zell-Depletion direkt nachgeschaltet war. Eine signifikante Abnahme der zirkulierenden, Dsg3-reaktiven IgG-Autoantikörper wurde dagegen erst drei Monate nach Rituximab-Behandlung beobachtet. Die ermittelten Frequenzen der autoreaktiven Th1- und Th2-Zellen korrelierten sehr gut mit dem klinischen Status der PV-Patienten, d.h. nach Rituximab-Behandlung kam es parallel zur Induktion einer Krankheitsremission bis sechs Monate nach Therapie bei allen Patienten zu einer signifikanten Abnahme der peripheren, Dsg3-spezifischen Th-Zellen. Neun PV-Patienten befanden sich zwölf Monate nach Behandlung weiterhin in klinischer Remission und zeigten auch zu diesem Zeitpunkt stark verminderte Zahlen autoreaktiver Th-Zellen im peripheren Blut, während bei drei PV-Patienten, die zwölf Monate nach Therapie ein Rezidiv aufwiesen, ein erneuter Anstieg der Dsg3-spezifischen Th1- und Th2-Zellen zu verzeichnen war. Eine direkte Wirkung von Rituximab auf, im autoimmunologischen Geschehen möglicherweise bedeutsame, CD20<sup>+</sup> T-Zellen, wie sie bereits für Patienten mit Rheumatoider Arthritis beschrieben wurde, konnte im Fall der hier untersuchten PV-Patienten ausgeschlossen werden. Interessanterweise

blieben die Frequenzen der allgemeinen  $CD3^+$ ,  $CD3^+CD4^+$  und  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen von der Behandlung unbeeinflusst. Auch die Frequenzen Tetanus Toxoid-spezifischer Th1-Zellen und die Titer von Tetanus Toxoid-reaktivem IgG im Serum zeigten keine Rituximab-induzierte Reduktion. Folglich weisen die Ergebnisse der vorliegenden Studie auf einen bisher nicht beschriebenen und höchstwahrscheinlich spezifischen Effekt von Rituximab auf periphere Dsg3-spezifische Th-Zellen hin. Die Ergebnisse lassen einen grundsätzlich zweifachen Effekt von Rituximab vermuten: i) die direkte Depletion von  $CD20^+$  autoreaktiven B-Zellen und demzufolge der Vorläufer autoreaktiver, autoantikörpersezernierender Plasmazellen und ii) die Abnahme autoreaktiver  $CD4^+$  T-Zellen als indirekte Folge der Depletion autoreaktiver B-Zellen in ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen.

Zusätzlich zu der Wirkung auf die zelluläre Immunantwort hat Rituximab wahrscheinlich großen Einfluss auf wichtige Überlebens- und Wachstumsfaktoren von B-Lymphozyten. Deshalb wurde der Einfluss von Rituximab auf die B-Zell-aktivierenden Faktoren BAFF (*B cell activating factor of the TNF (tumor necrosis factor) family*) und APRIL (*a proliferation-inducing ligand*) im Serum der PV-Patienten untersucht und mit den Konzentrationen zirkulierender Dsg3-spezifischer Autoantikörper bzw. pathogenspezifischer anti-Varizella-Zoster-Virus und anti-Epstein-Barr-Virus IgG-Antikörper verglichen. 19 PV-Patienten wurden in Abhängigkeit des durchgeführten Therapieschemas in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe (5 Patienten) wurde ausschließlich mit immunsuppressiven Medikamenten behandelt, die zweite Gruppe (6 Patienten) mit Immunsuppressiva und adjuvanter Immunadsorption und die dritte Gruppe (11 Patienten) mit Immunsuppressiva und adjuvanter Rituximab. Es zeigte sich lediglich in der Gruppe der Rituximab-behandelten Patienten eine signifikante und sehr ausgeprägte Induktion von BAFF, die invers mit der Zahl peripherer B-Zellen korrelierte. Weder Patienten unter alleiniger immunsuppressiver Medikation noch unter adjuvanter Immunadsorption zeigten Änderungen in der Konzentration von zirkulierendem BAFF. Im Gegensatz zu BAFF blieb APRIL von allen drei Therapieschemen unbeeinflusst. Interessanterweise zeigte sich bei allen PV-Patienten eine Reduktion der Dsg3-spezifischen Autoantikörpertiter im Serum, während die Konzentrationen der pathogenspezifischen IgG-Antikörper einzig in der Gruppe der Rituximab-behandelten Patienten signifikant erhöht waren. Diese Induktion der pathogenspezifischen Antikörper wies eine Korrelation zu den ansteigenden BAFF-Konzentrationen im Serum auf. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen lassen einen möglicherweise differenten Effekt von BAFF auf autoreaktive bzw. pathogenspezifische IgG-Antikörper im Serum vermuten. Da es derzeit keinen Hinweis auf verschiedene Halbwertszeiten dieser beiden Antikörpertypen gibt, legen die Resultate eine unterschiedliche Wirkung von Rituximab, und konsekutiv BAFF, auf autoreaktive und pathogenspezifische Plasmazellen nahe. Die weitergehende Charakterisierung der BAFF-vermittelten Effekte auf Plasmazellarten verschiedener Spezifität ist für das Verständnis der Regulation autoreaktiver Antikörper im PV von entscheidender Bedeutung.

## Summary

Pemphigus vulgaris (PV) is a severe, potentially life-threatening autoimmune disease, characterized by extensive blisters and erosions of skin and/or mucous membranes. IgG autoantibodies against the desmosomal adhesion proteins desmoglein (dsg) 3 +/- dsg1 have been shown to induce acantholysis of epidermal keratinocytes and subsequently blister formation. B lymphocytes have a major impact in the pathogenesis of PV. They function as autoantibody secreting cells, progenitors of autoreactive plasma cells and release several proinflammatory cytokines. Although immunosuppressive medication including high-dose systemic glucocorticoids is commonly applied, PV remains a therapeutical challenge. Adjuvant settings, such as immunoabsorption and more recently the monoclonal anti-CD20 antibody, rituximab, have been successfully introduced for the treatment of severe and recalcitrant PV. Rituximab induces long-term clinical remission, which is probably due to depletion of autoreactive memory B cells as progenitors of autoantibody secreting plasma cells. Although PV is considered as an autoantibody mediated, organ specific autoimmune disease the induction and perpetuation of disease is thought to be controlled by dsg3-specific, autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells.

In the present study, we investigated the impact of rituximab on frequencies of autoreactive dsg3-specific CD4<sup>+</sup> T helper (Th) cells. Twelve PV patients with severe and/or recalcitrant disease, who received one cycle of rituximab combined with systemic immunosuppression, were included in the study. Over an observation period of twelve months on treatment we determined the frequencies of dsg3-specific Th1 and Th2 cells in peripheral blood of patients. After application of rituximab there was a significant decrease of dsg3-reactive CD4<sup>+</sup> Th1 and Th2 cells. This decline was directly linked to complete depletion of peripheral B cells, which was detectable already one week after administration of rituximab and continued on average six to twelve months. In contrast, a significant reduction of circulating dsg3-reactive autoantibodies could be observed - more delayed - three months after rituximab treatment. Furthermore, there was a close correlation of frequencies of autoreactive Th1 and Th2 cells, respectively, and clinical course of PV, since we noticed a significant decline of peripheral dsg3-specific Th cells up to six months after rituximab therapy accompanied by complete remission in all investigated patients. In nine PV patients with ongoing clinical remission twelve months after therapy autoreactive Th cells remained decreased over the complete time, whereas three patients, relapsing twelve months after rituximab treatment, showed a reincrease of both dsg3-specific Th1 and Th2 cells at this time. Recently, rituximab-mediated direct effects on CD20<sup>+</sup> T cells, that have presumably important relevance in autoimmune processes, were described in patients with rheumatoid arthritis. However, these cells could not be detected in PV patients of the present study. Interestingly, the frequencies of peripheral CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells, respectively, remained unaffected by rituximab. Additionally, there was no reduction of peripheral tetanus toxoid-specific Th1 cells and circulating anti-tetanus toxoid IgG, respectively, of rituximab-treated PV patients over the entire observation period. Thus, the results provide evidence for a not yet described and probably specific impact of rituximab on peripheral dsg3-

specific Th cells. Summarizing the results, rituximab reveals a dual mode of action: i) depletion of CD20<sup>+</sup> autoreactive B cells and, accordingly, depletion of progenitors of autoantibody secreting plasma cells, and ii) depletion of CD20<sup>+</sup> autoreactive B cells functioning as antigen presenting cells resulting subsequently in a decrease of peripheral autoreactive CD4<sup>+</sup> T cell numbers.

Irrespective of the influence of rituximab on the cellular immune response, the monoclonal antibody has presumably a major impact on crucial factors for growth and survival of B cells. Therefore, we investigated the effect of rituximab on the B cell activating factors, BAFF (B cell activating factor of the TNF (tumor necrosis factor) family) and APRIL (a proliferation-inducing ligand), in the sera of PV patients. Moreover, serum concentrations of BAFF and APRIL were compared to serum titers of dsG3-specific autoantibodies and Varicella Zoster Virus and Epstein Barr Virus IgG, respectively. 19 PV patients were included in the study and divided into three groups depending on treatment options. The first group of patients (5 patients) was treated with immunosuppressive drugs alone, the second group (6 patients) received a combination of immunosuppression and immunoabsorption and the third group (11 patients) was treated with immunosuppression and adjuvant rituximab. Only in the group of rituximab-treated PV patients, we observed a pronounced and statistically significant induction of BAFF, correlating inversely with numbers of peripheral B cells. PV patients treated with immunosuppressive drugs alone or in combination with immunoabsorption did not show any significant alteration of serum BAFF levels. In contrast, APRIL levels were not significantly affected by each of the treatment schedules. Interestingly, there was a reduction of circulating, dsG3-specific autoantibodies in all patients, whereas titers of pathogen-specific IgG were significantly increased only in rituximab-treated patients. This induction of pathogen-specific antibodies was correlated to increasing concentrations of BAFF in serum of patients after B cell depletion. The results of the present study suggest a presumably differential effect of rituximab and subsequently BAFF on circulating autoreactive and pathogen-specific IgG antibodies, respectively. Currently, there is no evidence for different half-lives of both types of antibodies. Therefore, the results suggest a distinct impact of BAFF on autoreactive versus pathogen-specific plasma cells. Further characterization of BAFF-mediated effects on plasma cells of various specificity will be important to understand the regulation of autoreactive plasma cells in PV.



# 1. Einleitung

## 1.1. Autoimmunität

Das Immunsystem mit seinen zellulären und humoralen Komponenten dient der Abwehr körperfremder Substanzen und der Aufrechterhaltung der körpereigenen Homöostase. Körpereigene Strukturen lösen keine Immunantwort aus, ein als immunologische Toleranz bezeichnetes Phänomen. Potenzielle autoreaktive Immunzellen werden noch während ihrer Entwicklung eliminiert oder funktionell inaktiviert. Grundlage dafür bilden zentrale und periphere Toleranzmechanismen, wozu die klonale Deletion autoreaktiver Zellen, die Induktion von Anergie und immunologischer Ignoranz, der Austausch autoreaktiver Rezeptoren (Rezeptor-Editing) und die Bildung regulatorischer T-Zellen (Treg), die die Aktivierung anderer T-Zellen hemmen, gehören (Janeway et al., 2002, S. 276ff. und S. 570ff.). Als mögliche Ursachen von Autoimmunerkrankungen werden Fehlregulationen dieser Toleranzmechanismen im komplexen Zusammenspiel mit genetischen Komponenten (Assoziation mit bestimmten HLA (humanes Leukozyten Antigen)-Polymorphismen) und Umwelteinflüssen diskutiert (Plotz, 2003). Auslösende Faktoren für die Entwicklung autoimmuner Prozesse sind möglicherweise verschiedene bakterielle und virale Infektionen. Während einer Infektion kann es durch eine direkte Gewebeschädigung zur Freisetzung bisher unerkannter (oft intrazellulärer), körpereigener Proteine oder zu strukturellen Proteinveränderungen kommen, die eine Immunantwort hervorrufen (Bystander-Effekt). Weiterhin ist als Folge einer Strukturähnlichkeit des Selbst- und Fremdartigens eine Kreuzreaktion von Antikörpern oder T-Zellen, die als Antwort auf eine Infektion gebildet werden, mit körpereigenen Antigenen (Molekulare Mimikry) möglich (Plotz, 2003; Steinbrink und Knop, 2003). Zusätzlich scheinen Umwelteinflüsse, wie z.B. Nahrungsmittel, Medikamente, UV-Strahlung und hormonelle Faktoren bei der Entstehung von vielen Autoimmunkrankheiten von Bedeutung zu sein (Ollier und Symmons, 1995, S. 77ff.). Studien, die in den USA erhoben wurden, zeigen, dass 78% der von Autoimmunerkrankungen betroffenen Personen Frauen sind (Fairweather und Rose, 2004). Vor allem das Hormon Östrogen nimmt dabei eine besondere Stellung ein, da es die Eliminierung autoreaktiver B-Zellen hemmt (Grimaldi et al., 2005) und die Bildung proinflammatorischer Zytokine (Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )) fördert (Fairweather und Rose, 2004). Ein weiterer induzierender Faktor von autoimmunologischen Prozessen ist das Alter. Im Laufe der Lebensjahre kommt es zu einem fortschreitenden Effektivitätsverlust des Immunsystems, der vom Auftreten einer erhöhten Konzentration verschiedener Autoantikörper im peripheren Blut der Patienten begleitet ist und sich in einer vorrangigen Manifestation bestimmter Autoimmunerkrankungen im Alter widerspiegelt (Ollier und Symmons, 1995, S. 26ff.).

Es werden zwei große Gruppen der Autoimmunerkrankungen unterschieden, die lokal begrenzt auftretenden organspezifischen Autoimmunerkrankungen und die meist mehrere Organsysteme betreffenden systemischen Autoimmunerkrankungen.

### Blasenbildende Autoimmunerkrankungen

Die Gruppe der blasenbildenden Autoimmunerkrankungen setzt sich aus den Pemphigus- und Pemphigoid-Erkrankungen, Dermatitis herpetiformis Dühring und der Epidermolysis bullosa acquisita zusammen. Klinisches Merkmal aller Erkrankungen ist die Bildung von Blasen und erosiven Veränderungen an der Haut und/oder den hautnahen Schleimhäuten. In einigen Fällen besteht ein gehäuftes Auftreten der Krankheiten in Assoziation mit bestimmten HLA-Mustern. Bei den bereits identifizierten Autoantigenen dieser Erkrankungen handelt es sich meist um Adhäsionsproteine. Es werden Autoantikörper gegen verschiedene Adhäsionsstrukturen der Epidermis, der dermoepidermalen Junktionszone oder der Ankerfibrillen gebildet. Nachfolgend entsteht eine intraepidermale oder subepidermale Spaltbildung, aufgrund einer direkten Inhibition der Zelladhäsion und/oder von Entzündungsreaktionen in den betroffenen Arealen (Hertl und Schuler, 2002b; Steinbrink und Knop, 2003).

## **1.2. Pemphigus vulgaris (PV)**

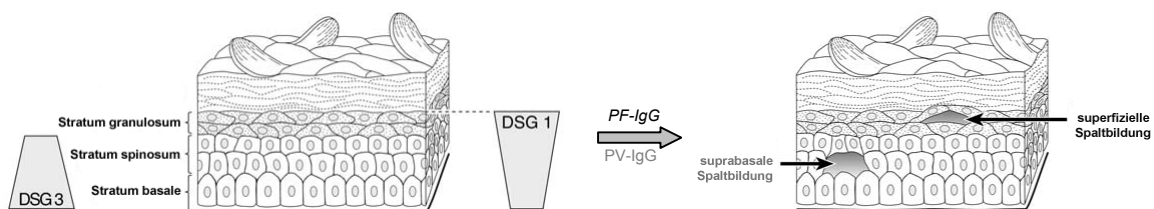
### **1.2.1. Charakteristik**

Zu den Pemphigus-Erkrankungen (griechisch: „pemphix“ – die Blase) gehören drei große Untergruppen, der Pemphigus vulgaris (PV), der Pemphigus foliaceus (PF) und der paraneoplastische Pemphigus (Nousari und Anhalt, 1999). Pemphigus vulgaris ist eine sehr seltene Autoimmundermatose, jedoch mit einer Inzidenz von 0,75-5 Neuerkrankungen/10<sup>6</sup> Menschen/Jahr die häufigste Pemphigus-Variante (Bystryn und Rudolph, 2005). PV tritt meist erstmalig zwischen dem 4. und 6. Lebensjahrzehnt auf und betrifft beide Geschlechter gleichermaßen (Amagai, 1999; Nousari und Anhalt, 1999). Zahlreiche Faktoren begünstigen die Entwicklung dieser Erkrankung. Besondere Bedeutung kommt dabei der genetischen Prädisposition zu, die an eine Prävalenz bestimmter ethnischer Gruppen (z.B. Juden) und an Veränderungen in den hypervariablen Regionen der  $\beta$ 1-Kette bestimmter HLA-Klasse II - Gene gekoppelt ist. Hierzu gehören vor allem die auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimierten HLA-Klasse II - Moleküle HLA-DR $\beta$ 1 \*0402/-DQ $\beta$ 1 \*0302 und HLA-DR $\beta$ 1 \*1401/-DQ $\beta$ 1 \*0503 (Ahmed et al., 1991; Ahmed et al., 1990; Hertl et al., 1998; Nousari und Anhalt, 1999; Sinha et al., 1988). Weiterhin haben exogene Einflüsse (Drogen, Medikamente, Viren, emotionaler Stress) eine beträchtliche Relevanz im Krankheitsgeschehen und -verlauf (Moll und Moll, 1998; Morell-Dubois et al., 2008). PV ist eine organspezifische Autoimmunerkrankung der Haut und Schleimhäute, die durch autoimmune Prozesse gegenüber Zelladhäsionsstrukturen der Epidermis verursacht wird (Amagai, 2003; Sitaru et al., 2007).

## 1.2.2. Desmosomale Autoantigene

### Epidermis

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges Plattenepithel, bestehend aus proliferierenden basalen und superfiziellen Zellgruppen. Der genaue Aufbau der Epidermis ist in Abb. 1 zusammenfassend dargestellt. Die Haftung zwischen identischen bzw. verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen (homophile bzw. heterophile Zell-Zell-Adhäsion) und zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (Zell-Matrix-Adhäsion) hat eine besondere Relevanz für die Homöostase und die mechanische Stabilität des Gewebes. Defekte in Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Adhäsionen sind grundlegende Mechanismen bei der Entstehung bullöser Autoimmundermatosen, wobei im Fall der Pemphigus-Erkrankungen die Störung der desmosomenvermittelten Zell-Adhäsion eine fundamentale Rolle bei der Krankheitsentstehung spielt (Moll und Moll, 1998).

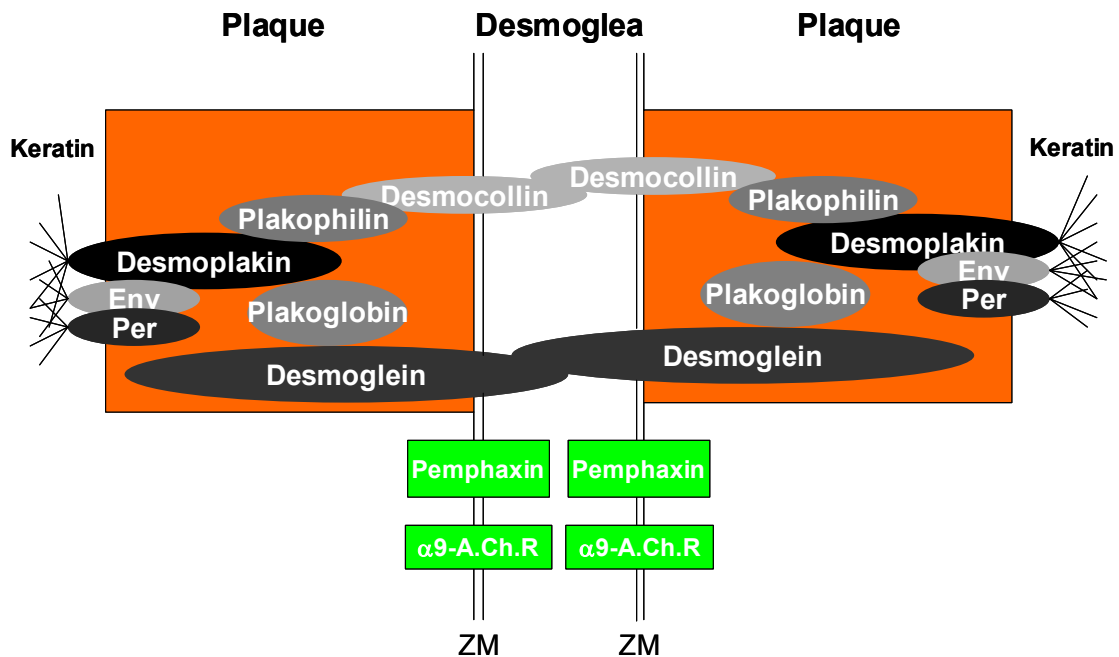


**Abb. 1: Aufbau der Epidermis.** Dargestellt ist der Aufbau des mehrschichtigen Plattenepithels der Epidermis (links). Die Expressionsstärke der in der Pathogenese vom Pemphigus vulgaris (PV) bzw. Pemphigus foliaceus (PF) besonders wichtigen Autoantigene (PV-Desmoglein (Dsg) 3; PF-Dsg1) ist gesondert gekennzeichnet. Die rechte Abbildung zeigt die epidermalen Schäden, die durch die PV- (PV-IgG, grau) bzw. PF- (PF-IgG, schwarz) spezifischen Autoantikörper verursacht werden (modifiziert nach Waschke, 2008).

### Desmosomen

Desmosomen dienen der stabilen interzellulären Verknüpfung von vorrangig epithelialen Zellen und werden insbesondere in mechanisch beanspruchten Geweben (z.B. Haut, Herz, Blase und gastrointestinale Mukosa) ausgebildet (Payne et al., 2004). Die interzelluläre Adhäsion wird hauptsächlich durch die transmembranösen Glykoproteine Desmocollin und Desmoglein vermittelt, die zur Familie der kalziumabhängigen Cadherine gehören. Dabei kommt den in vier Isoformen unterteilten Desmogleinen (Dsg) bei der Entstehung der häufigsten Pemphigus-Erkrankungen, PV und PF, die größte Bedeutung zu. Die Expression von Dsg1 und Dsg3 ist hauptsächlich auf mehrschichtige Plattenepithelien beschränkt, wobei sie ein inverses Expressionsmuster zeigen (Abb. 1, links). In der Haut ist Dsg1, das Autoantigen des PF, in allen Epidermisschichten, jedoch präferentiell in den superfiziellen Schichten (oberes Stratum spinosum und Stratum granulosum) nachweisbar. Dsg3, das Hauptautoantigen des PV, dagegen wird vorrangig in den unteren Zellschichten der Epidermis (unteres Stratum spinosum und Stratum basale) exprimiert (Moll und Moll, 1998). Die Schleimhäute zeigen ein anderes Verteilungsmuster dieser beiden Proteine. In der mukosalen Epidermis ist in allen Schichten eine ausgeprägte Expression von Dsg3 detektierbar, wohingegen Dsg1 prinzipiell nur in sehr geringer Konzentration und nicht in der basalen Zellschicht vorkommt (Amagai, 1999). Dsg2

wird in allen desmosomenhaltigen Geweben exprimiert und ist in mehrschichtigen Plattenepithelien vor allem in der basalen Zellschicht nachweisbar (Moll und Moll, 1998). Dsg4 wurde vor einigen Jahren als weitere Isoform mit vorwiegender Expression in den superfiziellen Epidermisschichten und den Haarfollikeln identifiziert (Kljuic et al., 2003). Weitere Autoantigene des PV sind cholinerge Rezeptoren, die auf der Keratinozytenoberfläche exprimiert werden und möglicherweise regulierende Funktion bei der Zelladhäsion besitzen. Dazu zählen Pemphaxin, ein Annexin-Homolog, das Acetylcholin bindet und der  $\alpha 9$ -Acetylcholin-Rezeptor (Grando, 2000). Der Aufbau der Desmosomen ist in Abb. 2 zusammenfassend dargestellt.



**Abb. 2: Struktureller und molekularer Aufbau der Desmosomen.** Veranschaulicht ist der Aufbau der Desmosomen, den in der Pathogenese des Pemphigus vulgaris (PV) und Pemphigus foliaceus (PF) bedeutenden interzellulären Adäsionsmolekülen. Per – Periplakin, Env – Envoplakin, ZM – Zellmembran,  $\alpha 9$ -A.Ch.R –  $\alpha 9$ -Acetylcholin-Rezeptor (modifiziert nach Hertl et al., 2006; Hertl und Schuler, 2002b).

### 1.2.3. Desmosomale Autoantikörper der IgG-Klasse

Autoantikörper gegen Zelloberflächenstrukturen verursachen oft eine klinische Manifestation. Das Hauptautoantigen des PV ist Dsg3. Alle an PV erkrankten Patienten besitzen polyklonale IgG-Autoantikörper, die gegen die extrazelluläre Domäne dieses Antigens gerichtet sind. Einige PV-Patienten besitzen zusätzlich Dsg1-spezifische Autoantikörper (Amagai, 1999; Moll und Moll, 1998). Diese Patienten entwickeln eine Pemphigus-Variante, die sowohl die Haut als auch die Schleimhäute betrifft (mukokutaner PV), wohingegen Patienten, die ausschließlich Dsg3-reaktive Antikörper bilden, exklusive Schleimhautbeteiligung (mukosaler PV) zeigen (Amagai, 1999; Nousari und Anhalt, 1999). PF-Patienten besitzen lediglich Dsg1-reaktive IgG-Autoantikörper und weisen somit ausschließlich Haut-Läsionen auf.

Die Relevanz der Dsg3-spezifischen Autoantikörper in der Pathogenese des PV wird durch folgende Beobachtungen untermauert: i) die Krankheitsaktivität korreliert meist mit der

Konzentration Dsg3-spezifischer IgG-Antikörper im Serum, ii) Neugeborene von Müttern im aktiven Krankheitsstadium entwickeln einen neonatalen PV als Folge der diaplazentaren Übertragung von IgG-Autoantikörpern und iii) neugeborene Mäuse, denen aufgereinigtes IgG von aktiv erkrankten PV-Patienten injiziert wird, zeigen eine intraepidermale Spaltbildung (Hertl, 2000; Hertl und Schuler, 2002b). Dagegen induziert die Injektion von IgG, welches von Remissionspatienten oder HLA-assoziierten gesunden Kontrollen stammt, keine Blasenbildung (Hertl, 2000; Hertl und Veldman, 2001). Neben der Korrelation von Krankheitsaktivität und Dsg3-spezifischen Antikörpertitern im Serum wurden Beziehungen zwischen dem Alter bzw. der Krankheitsdauer der Patienten und den Autoantikörperkonzentrationen im Serum beschrieben (Ameglio et al., 1999).

Für die Pathogenese des Pemphigus bedeutsame Antikörper gegen Dsg2 und Dsg4 wurden bisher nicht identifiziert (Amagai, 1999; Moll und Moll, 1998; Nagasaka et al., 2004; Payne et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Dsg4-spezifische Autoantikörper ausschließlich in Seren zu finden sind, die Dsg1-reaktives IgG enthalten. Ursache dafür ist eine bestehende Kreuzreaktivität von einem geringen Teil der Dsg1-spezifischen Antikörper mit Dsg4. Die untersuchten Patientenserum enthielten keine Antikörper, die ausschließlich Dsg4 banden und die kreuzreaktiven Antikörper waren nicht in der Lage, eine Blasenbildung zu induzieren (Nagasaka et al., 2004).

Dagegen besitzen Autoantikörper, die gegen die bereits erwähnten cholinergen Rezeptoren Pemphaxin und  $\alpha 9$ -Acetylcholin-Rezeptor gerichtet sind, möglicherweise pathogenetische Relevanz. Die Applikation von cholinergen Agonisten (Nguyen et al., 2004) oder der Genuss von Nikotin (Mehta und Martin, 2000) führten zur klinischen Besserung des Krankheitsbildes in PV-Patienten mit aktiver Erkrankung. Trotz des anti-akantholytischen Effekts dieser Cholinomimetika scheint Dsg3 aus den oben aufgeführten Gründen als Autoantigen beim PV die wichtigste Bedeutung zu besitzen.

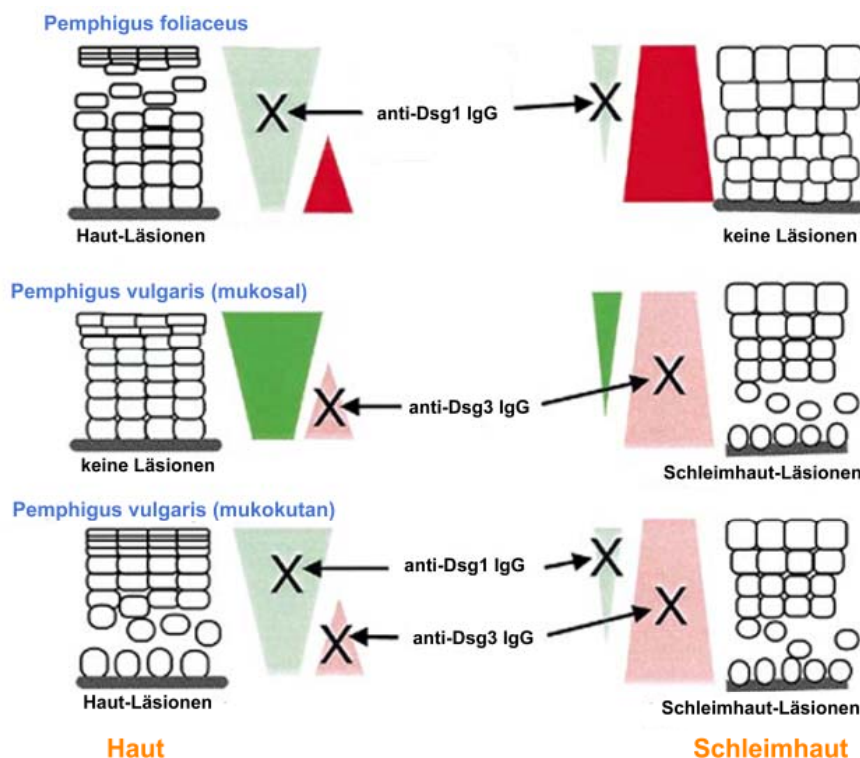
#### **1.2.4. Mechanismus der Blasenbildung**

Der genaue Mechanismus des Zellkontaktverlusts epidermaler Zellen (Akantholyse), der sich in einer epidermalen Spaltbildung manifestiert, ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise, dass die Bindung der Autoantikörper an ihre epidermalen Zielstrukturen (extrazelluläre Anteile der Desmogleine und die Keratinozytenoberfläche) sterische Effekte (Verminderung der interzellulären Adhäsion) bzw. die Induktion des programmierten Zelltods auslöst (Sitaru und Zillikens, 2005).

Klinisch manifestiert sich dies in einer Blasenbildung an den betroffenen Epithelien (Amagai, 2003). Die Akantholyse befindet sich je nach Erkrankung in sehr definierten Arealen der Epidermis, wobei PF-Patienten eine Blasenbildung der oberflächlichen und PV-Patienten der tiefen Epidermisschichten zeigen (siehe Abb. 1, rechts). Die Erklärung dafür liefert die „Desmoglein-Kompensations-Theorie“.

PV-Patienten, die nur Dsg3-reaktive Autoantikörper besitzen, zeigen keine Blasenbildung der Haut, da Dsg1, das in allen Epidermisschichten der Haut exprimiert wird, den Verlust der Dsg3-

vermittelten interzellulären Haftung funktionell kompensieren kann. Im Gegensatz dazu kann Dsg1 diesen Haftungsverlust in der Schleimhaut aufgrund seiner sehr geringen Expressionsstärke nicht ausgleichen und es kommt zum Verlust der Zell-Zell-Adhäsion mit anschließender suprabasaler Blasenbildung (Abb. 3, mittig). PV-Patienten, deren Seren sowohl Dsg3- als auch Dsg1-reaktive Antikörper enthalten, zeigen eine ausgeprägte Blasenbildung an Haut und Schleimhäuten (Abb. 3, unten). Dabei ist auch hier eine suprabasale Blasenbildung detektierbar, da die Zell-Zell-Adhäsion, aufgrund der geringeren Anzahl von Desmosomen, in den basalen Zellschichten nicht so stark ist und tiefere Epidermisschichten besser und schneller durch die von der Dermis penetrierenden Antikörper erreicht werden. Seren von PF-Patienten, die nur Dsg1-reaktive Antikörper besitzen, zeigen eine superfizielle kutane Blasenbildung, da die Zell-Adhäsion in den unteren Epidermisschichten von Dsg3 gesichert wird. In Schleimhäuten verursachen diese Antikörper aufgrund der geringen Menge an Dsg1 keine Akantholyse (Abb. 3, oben) (Amagai, 1999; Amagai, 2003; Payne et al., 2004).



**Abb. 3: Desmoglein-Kompensations-Theorie.** Die Desmoglein-Kompensations-Theorie erklärt die Lokalisation der Blasenbildung in den Autoimmundermatosen Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus. Die Dreiecke veranschaulichen die Expression von Desmoglein (Dsg) 1 und Dsg3 in den Epidermisschichten von Haut und Schleimhaut. Die spezifische Zerstörung der Adhäsionsfunktion von Dsg1 durch anti-Dsg1 IgG resultiert in einer superfiziellen Blasenbildung der Haut, jedoch nicht der Schleimhaut, wo die Zelladhäsion in allen Schichten hauptsächlich durch Dsg3 vermittelt wird (oben). Der durch anti-Dsg3 IgG verursachte Zell-Adhäsionsverlust führt zur Blasenbildung in der Schleimhaut, da die geringe Expression von Dsg1 eine mögliche Kompensation verhindert (mittig). Der Verlust der Dsg1- und Dsg3-vermittelten Zell-Adhäsion resultiert in einer ausgeprägten Blasenbildung der Haut und Schleimhaut, da keine effiziente Kompensation durch Dsg1 oder Dsg3 bestehen kann (unten) (modifiziert nach Amagai, 2003).

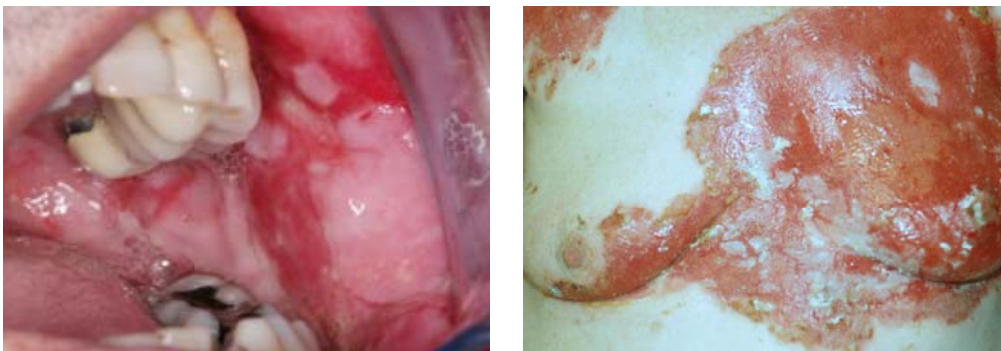
Ursache des für den PV charakteristischen Zell-Adhäsionsverlusts sind akanttholytische Keratinozyten (Amagai et al., 2006). Die Ursache der ausschließlich suprabasalen Akantholyse

im mukokutanen PV liegt neben der Erklärung durch die „Desmoglein-Kompensations-Theorie“ möglicherweise darin begründet, dass die basalen Keratinozyten nach Interaktion mit Pemphigus-Antikörpern stärker schrumpfen als die superfiziellen Keratinozyten, wodurch die Dsg-vermittelte Zelladhäsion vor allem in den basalen Zellschichten nicht mehr gegeben ist (Amagai et al., 2006). Die der Akantholyse zugrunde liegende intrazelluläre Signalkaskade beginnt nach Bindung der Dsg-spezifischen Autoantikörper an die Keratinozyten mit einer transienten Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels, gefolgt von einer proteolytischen Auflösung der interzellulären Junctionen (Hertl, 2000; Hertl und Veldman, 2001; Sitaru und Zillikens, 2005).

### 1.2.5. Diagnostische Merkmale

#### Klinisches Bild

Der PV ist durch das Auftreten schlaffer, dünnwandiger Blasen und krustöser, schmerzhafter Erosionen, die an der Haut (Gesicht, Rumpf, Axillen, Leistenregion) und vor allem an der Schleimhaut vorkommen, gekennzeichnet. Neben der oralen Mukosa sind auch die Nasenschleimhaut, Larynx, Pharynx, Anal- und Genitalschleimhaut und selten die Konjunktiven betroffen (Hertl und Schuler, 2002a; Moll und Moll, 1998). In Abb. 4 sind typische Befunde eines mukosalen PV (links) und eines mukokutanen PV (rechts) dargestellt.



**Abb. 4: Klinische Manifestation des Pemphigus vulgaris (PV).** Klinischer Befund eines Patienten mit ausschließlicher Blasenbildung an der oralen Mukosa (mukosaler PV, links) bzw. eines Patienten mit zusätzlicher Hautbeteiligung (mukokutaner PV, rechts).

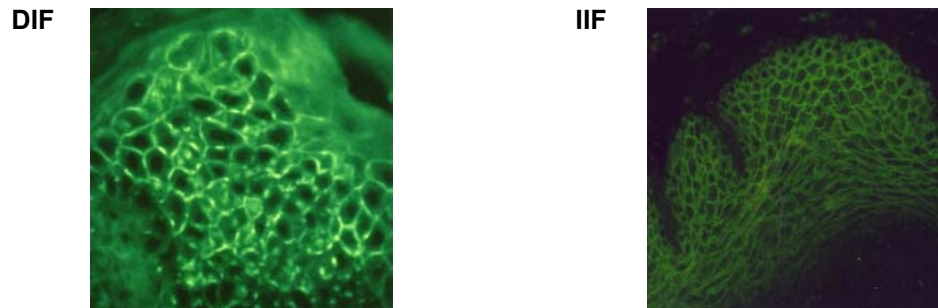
#### Antikörper-Nachweis mittels Immunfluoreszenz

Grundlagen der direkten Immunfluoreszenz (DIF) sind periläsionale Haut- und Schleimhautbiopsien. Beim PV zeigt sich ein interzelluläres netzförmiges Muster gewebegebundener Dsg-IgG-Antikörper in der Epidermis (Abb. 5, links). Zusätzlich können Ablagerungen des Komplementfaktors C3 vorhanden sein, wobei die Basalmembranzone ausgespart bleibt (Hertl und Schuler, 2002c; Moll und Moll, 1998; Nousari und Anhalt, 1999).

Mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF) werden zirkulierende Dsg-spezifische Autoantikörper im Serum der PV-Patienten nachgewiesen. Als Substrat fungieren häufig Biopsien des Affenösophagus oder der humanen Haut (Abb. 5, rechts). Analog zur DIF ist bei der IIF



ebenfalls ein typisches netzförmiges, interzelluläres Verteilungsmuster der Autoantikörper erkennbar (Hertl und Schuler, 2002c; Moll und Moll, 1998).

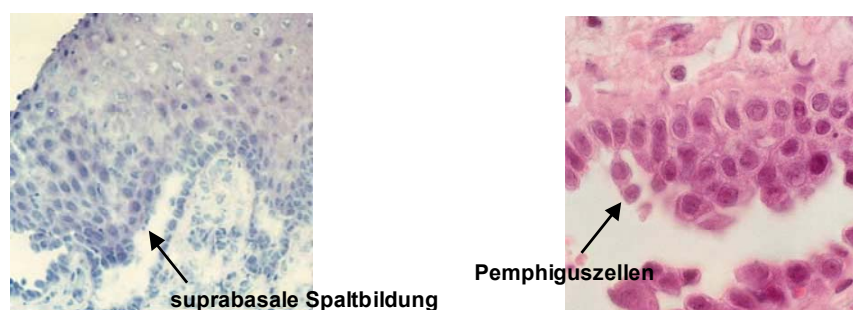


**Abb. 5: Direkte und indirekte Immunfluoreszenz beim Pemphigus vulgaris (PV).** Abgebildet ist das für PV-Erkrankungen charakteristische interzelluläre netzförmige Verteilungsmuster Desmoglein-spezifischer Autoantikörper, nachgewiesen mittels direkter Immunfluoreszenz (DIF, links) und indirekter Immunfluoreszenz (IIF (Affenösohagus), rechts) (Hertl, 2001, S. 53).

Ein weitere Möglichkeit des direkten Nachweises der Dsg1- und/oder Dsg3-spezifischen Antikörper im Serum der Patienten besteht in der Durchführung eines kommerziell erhältlichen Enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA; Firma MBL, Japan). Der Vorteil des ELISAs liegt in einer höheren Spezifität und Sensitivität des Testsystems, sowie in der quantitativen Auswertbarkeit.

### Histologie

Die histologische Begutachtung erfolgt ebenfalls an periläsionalen Haut- und Schleimhautbiopsien. Im Fall des PV ist eine basale bzw. suprabasale Spaltbildung sichtbar (Abb. 6, links). Meist bleiben die basalen Zellen an die Basalmembran gebunden, verlieren jedoch ihre seitlichen, Dsg-vermittelten Zellkontakte, wodurch ein sogenanntes „Grabsteinmuster“ der basalen Keratinozyten erkennbar ist. Die Blasenöffnung enthält oft isolierte, abgerundete, akanttholytische Keratinozyten („Pemphiguszellen“) und sehr selten schwache eosinophile Zellinfiltrate (Hertl und Schuler, 2002c; Moll und Moll, 1998).



**Abb. 6: Histologische Begutachtung der periläsionalen Regionen im Pemphigus vulgaris (PV).** Dargestellt ist die beim PV charakteristische, suprabasale Blasenbildung (links) und die in der Blasenöffnung detektierbaren, akanttholytischen, abgerundeten Keratinozyten (Pemphiguszellen, rechts) (modifiziert nach Hertl und Schuler, 2002a; Hertl und Veldman, 2001).



## 1.2.6. Die zelluläre Autoimmunantwort

### B-Zellen

Den B-Lymphozyten kommt bei der Entwicklung und der Aufrechterhaltung der autoimmunologischen Prozesse beim PV eine große Bedeutung zu. Zum einen fungieren sie als APC und aktivieren so autoreaktive T-Zellen, zum anderen produzieren sie Autoantikörper, die in der Pathogenese des PV eine entscheidende Rolle spielen. Weiterhin sind sie die Vorläuferzellen von autoreaktiven Plasmazellen (PZ) und produzieren proinflammatorische Zytokine.

Alle APC, so auch die B-Zellen, besitzen auf ihrer Zelloberfläche HLA-Klasse II - Moleküle, über welche die Antigenpräsentation erfolgt. Die antigenpräsentierende Kapazität von aktivierten B-Zellen ist ebenso effizient wie die von Dendritischen Zellen (Kleindienst und Brocker, 2005). Bei immunologischen Prozessen, die mit einer Entzündungsreaktion verbunden sind, haben B-Zellen sogar die höchste stimulatorische Kapazität (Shih et al., 2006). B-Zellen fungieren bereits im sehr frühen Stadium der primären Immunantwort als APC und sind besonders effizient, wenn das Antigen in nur sehr geringer Konzentration, wie das z.B. für organspezifische Autoantigene zutrifft, vorliegt bzw. wenn es sich um Protein-Antigene handelt (Crawford et al., 2006). B-Zellen fördern daher die optimale Generierung und Expansion von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen, da diese für die Prozesse der Zellproliferation und -reifung einen ständigen Kontakt zum Antigen und damit zur APC benötigen (Crawford et al., 2006).

Eine vermutlich wesentliche pathogenetische Bedeutung besitzen die B-Lymphozyten beim PV aufgrund ihrer Funktion als autoantikörperproduzierende Zellen (Nishifuji et al., 2000). Eine weitere wichtige Funktion ist die B-Zell-vermittelte Aktivierung autoantigenspezifischer T-Helfer (Th)-Zellen. Die aktivierten Th-Zellen sezernieren Zytokine, die eine direkte fördernde Wirkung auf die somatische Hypermutation und Affinitätsreifung der B-Zellen und damit auf die Generierung von Gedächtnis-B-Zellen und PZ ausüben. Durch die Induktion eines Klassenwechsels der Autoantikörper begünstigen diese Zytokine zusätzlich die Entstehung der beim PV vorrangig auftretenden IgG-Autoantikörper (Groom und Mackay, 2008; Manfredi et al., 2005).

Beim PV fungieren autoreaktive B-Zellen als APC und induzieren in Dsg3-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen hauptsächlich die Bildung von IL-4, IL-6 und IL-10, die für die Proliferation der Gedächtnis-B-Zellen und die Differenzierung in antikörpersezernierende PZ benötigt werden (Amagai et al., 2006). Zusätzlich produzieren B-Zellen sehr viele Zytokine, wie z.B. IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 und TNF $\alpha$ , selbst (Harris et al., 2000; Pistoia, 1997). Dies ist besonders bedeutsam, da die Antikörperproduktion der B-Zellen sehr stark von IL-10 abhängig ist und über autokrine Wirkmechanismen gesteigert werden kann. In diesem Zusammenhang konnte bei B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus Erythematodes (SLE) und dem primären Sjögren Syndrom (pSS) eine erhöhte IL-10-Produktion von B-Zellen mit ausschließlich autoreaktivem Potential nachgewiesen werden (Llorente et al., 1995).

B-Zellen fördern die Neubildung lymphoider Strukturen in entzündlich veränderten Gewebearealen. Vermittelt wird diese Lymphoneogenese über membrangebundenes

Lymphotoxin  $\alpha/\beta$  auf der Oberfläche von B-Zellen, das mit dem Lymphotoxin  $\beta$ -Rezeptor auf Stromazellen interagiert und die Neubildung ektopischer Keimzentren initiiert. Dieser Prozess ist mit der Entwicklung postkapillärer Venolen (*high endothelial venules*, HEV) und Keimzentren, sowie der ektopischen Expression von Chemokinen, die für die Gewebekompartimentalisierung und Rekrutierung von T-Zellen und Makrophagen verantwortlich sind, verbunden. Die Lymphneogenese ist ein Charakteristikum von T-Zell-abhängigen, autoimmunologischen Vorgängen (Browning, 2006; Canete et al., 2007; Groom und Mackay, 2008; Martin und Chan, 2006).

### T-Zellen

CD4<sup>+</sup> Th-Zellen haben eine entscheidende Bedeutung in der Pathogenese des PV. *In vitro*-Versuche bestätigten die starke Abhängigkeit der Autoantikörperproduktion von der Hilfe CD4<sup>+</sup>, HLA-restringierter Th-Zellen. Nach Depletion peripherer CD4<sup>+</sup> Lymphozyten aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) konnte keine Dsg3-reaktive Autoantikörperproduktion durch B-Zellen detektiert werden (Nishifuji et al., 2000). Der Hauptteil der aus dem peripheren Blut von PV-Patienten isolierten Dsg3-spezifischen T-Zellen besitzt den Phänotyp von CD4<sup>+</sup> Gedächtniszellen und nur ein sehr geringer Teil exprimiert den CD8-Rezeptor. Die Erkennung der Dsg3-Epitope durch autoreaktive T-Zellen ist mit den HLA-Klasse II - Molekülen HLA-DR $\beta$ 1 \*0402 und HLA-DQ $\beta$ 1 \*0503 auf APC assoziiert und entscheidend für die Initiierung und die Aufrechterhaltung der autoimmunen Prozesse (Hertl und Riechers, 1999).

Im peripheren Blut von PV-Patienten konnten Dsg3-spezifische Th1- und Th2-Zellen identifiziert werden. Die detektierten Frequenzen autoreaktiver Th2-Zellen waren unabhängig vom Krankheitsstadium (akut, chronisch, remittierend) in allen Patienten vergleichbar, wohingegen im chronischen Krankheitsverlauf erhöhte Zahlen autoreaktiver Th1-Zellen nachgewiesen werden konnten. Gesunde Träger pemphigusassoziierter HLA-Allele besaßen ausschließlich Th1-Zellen (Veldman et al., 2003). Dieses Ergebnis unterstreicht die besondere Bedeutung der Dsg3-spezifischen Th2-Zellen bei der Induktion des PV. Die autoreaktiven Th2-Zellen begünstigen durch die Freisetzung von IL-4, IL-6 und IL-10 hauptsächlich die Bildung des IgG-Subtyps IgG4, der besondere pathogenetische Relevanz beim PV hat. Dagegen fördern die Th1-Zellen über die Freisetzung von INF $\gamma$  maßgeblich die Produktion von Dsg3-reaktivem IgG1, welches bei PV-Patienten mit chronischem Krankheitsverlauf der vorrangig gebildete Subtyp ist (Hertl, 2000). Auch im Serum von gesunden Kontrollen konnten geringe Mengen von autoreaktiven IgG1-Antikörpern nachgewiesen werden. Es besteht jedoch keine direkte Beziehung zwischen den im Serum detektierten IgG-Autoantikörperkonzentrationen und den Frequenzen autoreaktiver Th1- oder Th2-Zellen, was das synergistische Zusammenspiel dieser beiden Dsg3-spezifischen Th-Zell-Populationen bei der Induktion der Autoantikörperproduktion untermauert (Veldman et al., 2003).

Die Teilnahme einer möglichen Fehlregulation auf Ebene der CD4<sup>+</sup> Treg an der Pathogenese des PV wurde bisher nur in sehr geringem Maße untersucht. Treg supprimieren CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen entweder über kontaktabhängige Interaktionen oder über antiinflammatorisch wirkende Zytokine. Es werden hauptsächlich drei Typen von CD4<sup>+</sup> Treg unterschieden.

Natürliche  $\text{Foxp3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  Treg werden kontinuierlich im Thymus produziert und supprimieren andere T-Zellen kontaktabhängig, während die in der Peripherie induzierten Treg ihre Suppression durch die Zytokine IL-10 und TGF $\beta$  (Tr1-Zellen) bzw. TGF $\beta$  allein (Th3-Zellen) vermitteln. Beim PV wurden bisher hauptsächlich Tr1-Zellen beschrieben und charakterisiert (Veldman et al., 2006). Es konnte eine Dysregulation bei der Bildung von Tr1-Zellen in PV-Patienten nachgewiesen werden, die sich in einer im Vergleich zu HLA-identischen gesunden Kontrollen verminderten Frequenz Dsg3-spezifischer Tr1-Zellen äußerte (Veldman et al., 2004a). Eine Subpopulation  $\text{CD8}^+\text{CD28}^-$  T-Zellen mit suppressiver Kapazität konnte bei PV-Patienten mit beginnender Remission, nicht aber in Patienten mit aktiver Erkrankung oder kompletter Remission, nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden stark verminderte Frequenzen natürlicher  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  Treg im peripheren Blut von PV-Patienten detektiert (Sugiyama et al., 2007). Möglicherweise sind verschiedene Treg-Subpopulationen in die Fehlregulation peripherer Toleranzmechanismen beim PV involviert (Hertl et al., 2006).

#### Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Im peripheren Blut von PV-Patienten wurde kürzlich eine im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen erhöhte Anzahl ruhender und aktivierter NK-Zellen detektiert (Takahashi et al., 2007). Zirkulierende NK-Zellen sind prinzipiell Quellen von Zytokinen der Th1- und Th2-Zellen. Bei PV-Patienten zeigten die NK-Zellen eine erhöhte Expression von IL-10 und eine verminderte Expression von Perforin, Granzym B und dem IL-12 Rezeptor  $\beta 2$ , einem Schlüsselmolekül bei der Differenzierung von Th1-Zellen. Während dieses Expressionsmuster bei Patienten mit aktiver Erkrankung und Remissionspatienten identisch war, konnte eine erhöhte Expression des Th2-Zytokins IL-5 ausschließlich bei Patienten mit aktiver Erkrankung detektiert werden. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass NK-Zellen beim PV eine Th2-gerichtete Immunantwort fördern, indem sie zum einen die IL-12-vermittelte Signalleitung vermindern und zum anderen die Bildung von IgG4-Antikörpern (induziert durch IL-10) und IgE-Antikörpern (induziert durch IL-5) fördern (Takahashi et al., 2007). Weiterhin besitzen die NK-Zellen bei PV-Patienten HLA-Klasse II - Moleküle und fungieren als zusätzliche APC (Stern et al., 2008).

#### Plasmazellen

Die Generierung von langlebigen, autoreaktiven PZ ist ein früher Schritt in der Pathogenese vieler autoantikörpervermittelter Autoimmunerkrankungen. Bei zahlreichen Erkrankungsfällen der Rheumatoiden Arthritis (RA) konnten schon Jahre vor dem Auftreten der ersten Symptome Autoantikörper detektiert werden konnten (Radbruch et al., 2006). Eine anhaltende antigene Stimulation, ein charakteristisches Merkmal autoimmuner Prozesse, führt zur kontinuierlichen Aktivierung von B-Zellen und der nachfolgenden Generierung von Plasmablasten und PZ (Manz et al., 2005), wobei die Plasmablasten die Vorläuferzellen der PZ darstellen (Martin und Chan, 2006). Zur Gruppe der PZ gehören kurz- und langlebige PZ. Diese Zellen haben die Expression der HLA-Klasse II - Moleküle auf ihrer Zelloberfläche eingestellt und fungieren daher nicht mehr als APC. Sie dienen ausschließlich der Produktion großer Antikörpermengen (Browning, 2006;

Manz et al., 1998). Ein signifikanter Anteil der autoreaktiven PZ bei Autoimmunerkrankungen wie z.B. SLE gehört zur Kategorie der kurzlebigen PZ, wobei die Zahlen sessiler, autoreaktiver, langlebiger PZ bei den einzelnen Patienten variieren (Tarlinton und Hodgkin, 2004).

Langlebige PZ ruhen in Überlebensnischen, die hauptsächlich in Knochenmark und Milz vorkommen (Hoyer et al., 2004; Sze et al., 2000). Das Überleben der PZ in diesen Nischen wird sowohl durch zellkontaktabhängige Signale als auch durch Zytokine und Chemokine vermittelt (Cassese et al., 2003; O'Connor et al., 2004). In diesem Kontext spielt die Interaktion von T-Zellen und PZ vermutlich eine zusätzliche wichtige Rolle (Radbruch et al., 2006; Withers et al., 2007). Ein Mechanismus der vorrangigen Akkumulation langlebiger autoreaktiver PZ im Knochenmark und folglich der Förderung der Autoantikörperproduktion ist wahrscheinlich die verminderte oder fehlende Expression des Rezeptors FcγRIIb auf diesen Zellen. Dieser Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in der Apoptosevermittlung von B-Zellen und PZ (Xiang et al., 2007).

Die bei vielen Autoimmunerkrankungen durch Lymphneogenese in den entzündeten Gewebearealen neu entstandenen lymphoiden Strukturen enthalten ebenfalls Überlebensnischen für PZ. Obwohl nachgewiesen werden konnte, dass die Population der antikörpersezernierenden Zellen in diesen Arealen sich nicht ausschließlich aus autoreaktiven PZ zusammensetzt (Cassese et al., 2001), wird eine erhöhte Akkumulation autoreaktiver PZ aufgrund der „Nähe zum autoimmunologischen Geschehen“ diskutiert (Hauser et al., 2003). Die Lebensdauer der PZ in den entzündeten Arealen ist hauptsächlich vom Entzündungsprozess abhängig. Nach Abklingen der Inflammation werden die Überlebensnischen abgebaut und die PZ sterben (Radbruch et al., 2006).

### **1.2.7. Die humorale Autoimmunantwort**

#### Desmosomale Autoantikörper der IgG-Subtypen IgG1 und IgG4

Die beim PV pathogenetisch bedeutsamen Dsg3-reaktiven IgG-Autoantikörper setzen sich hauptsächlich aus den Subklassen IgG1 und IgG4 zusammen. IgG1-Antikörper werden vorrangig nach Kontakt mit Protein-Antigenen gebildet (Sitaru et al., 2007). IgG4 ist der überwiegend gebildete Subtyp bei chronischer antigener Stimulation, wie sie z.B. bei autoimmunen Prozessen sehr ausgeprägt ist (Sitaru et al., 2007). Der Hauptvermittler der Akantholyse und damit der für die Pathogenese des PV entscheidende IgG-Subtyp ist IgG4 (Sitaru et al., 2007). Im Serum von PV-Patienten, die sich im akuten Stadium des Krankheitsbeginns befinden, sind primär autoreaktive IgG4-Antikörper nachweisbar. Dagegen besitzen Patienten in Remission oder Patienten im chronischen Krankheitsstadium vorrangig IgG1-Autoantikörper. Geringe Mengen an Dsg3-spezifischem IgG1 sind auch bei HLA-assoziierten gesunden Kontrollpersonen und gesunden Verwandten von PV-Patienten detektierbar (Bhol et al., 1995; Hertl und Veldman, 2001). Es konnte bisher nicht geklärt werden, ob die unterschiedliche pathogene Aktivität von IgG1 und IgG4 in unterschiedlichen Effektorfunktionen oder in der Bindung an verschiedene Epitope des Antigens begründet liegt (Bystryn und Rudolph, 2005). IgG4 ist der einzige IgG-Subtyp, der nur sehr geringe

komplement- und leukozytenaktivierende Eigenschaften aufweist. Es wurde gezeigt, dass die Komplementaktivierung für die Induktion der Blasenbildung nicht erforderlich ist (Sitaru et al., 2007). Allerdings sind in der DIF oft Ablagerungen vom Komplementfaktor C3 in der periläsionalen Haut von PV-Patienten detektierbar, was sehr wahrscheinlich eine Folge der Aktivierung des Komplementsystems durch Dsg3-spezifisches IgG1 ist. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass aktivierte Komplementfaktoren die Entwicklung kutaner Läsionen begünstigen (Anhalt et al., 1982), sodass IgG1 möglicherweise über die Aktivierung des Komplementsystems eine indirekte pathogene Wirkung beim PV ausübt (Kricheli et al., 2000).

#### Desmosomale Autoantikörper der Klasse IgA und IgE

Im Serum von PV-Patienten im akuten und chronisch-aktiven Krankheitsstadium konnten neben Dsg3-spezifischen IgG1- und IgG4-Antikörpern zusätzlich autoreaktive IgE- und IgA-Antikörper nachgewiesen werden. Patienten im klinischen Stadium der Remission besaßen dagegen keine IgE- und IgA-Autoantikörper. Dieses Verteilungsmuster der autoreaktiven Ig-Klassen bestätigt die Evidenz einer Th2-vermittelten Autoimmunantwort beim PV, da die Bildung von IgG4, IgA und IgE hauptsächlich von Th2-Zellen gefördert wird (Spaeth et al., 2001).

#### Neonataler PV

Die Erkrankungen der Pemphigusgruppe sind mit einem erhöhten Risiko für Früh- und Fehlgeburten verbunden (Bystryn und Rudolph, 2005). Der neonatale PV wird durch maternale Dsg3-spezifische IgG-Autoantikörper verursacht, die mittels transplazentarer Übertragung in den Fötus gelangen und dort eine Blasenbildung an der Haut induzieren (Abb. 7). Die Haut von Neugeborenen zeigt ein Dsg3-Verteilungsmuster, das der Schleimhaut von Erwachsenen entspricht, d.h. eine durchgehende Dsg3-Expression in den verschiedenen Epidermisschichten aufweist. Daher kommt es auch bei Neugeborenen von Müttern, die ausschließlich einen mukosalen PV zeigen, d.h. lediglich anti-Dsg3 IgG-Antikörper besitzen, zur Entwicklung von Haut-Läsionen (Amagai, 2003). Die blaseninduzierende Kapazität des autoreaktiven IgG4 konnte im neonatalen PV zusätzlich untermauert werden, da die exklusive Übertragung von Dsg3-spezifischen IgG4-Antikörpern ausgeprägte Haut-Läsionen beim Neugeborenen verursacht (Parlowsky et al., 2003). Die Erosionen an der Haut und den Schleimhäuten der Neugeborenen heilen innerhalb von zwei Wochen nach Geburt spontan ab und erfordern keine spezifische Therapie.



**Abb. 7: Neonataler Pemphigus vulgaris (PV).** Abgebildet sind Haut-Läsionen an Kinn, Hals und in der Mundregion (links) sowie im lumbosakralen Bereich und den glutealen Arealen (rechts) des Säuglings einen Tag nach der Geburt (Chowdhury und Natarajan, 1998).

## Interleukine

Zahlreiche proinflammatorische und regulatorische Zytokine sind in die Entstehung und den Krankheitsverlauf des PV involviert. Dazu gehören neben den charakteristischen Th1- und Th2-Zytokinen IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 und TNF $\alpha$ .

### IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$ :

IL-1 und TNF $\alpha$  sind direkt am Prozess der Akantholyse beteiligt. Der Transfer von PV-IgG in TNF $\alpha$ -Rezeptor *knockout* - Mäuse führt wesentlich seltener zur Blasenbildung als bei Mäusen, die einen intakten TNF $\alpha$ -Rezeptor besitzen (Feliciani et al., 2000). Bei PV-Patienten mit aktiver Erkrankung konnten erhöhte Konzentrationen von IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$  im Serum detektiert werden (Keskin et al., 2008), wobei eine direkte Korrelation zwischen dem Gehalt an IL-6 bzw. TNF $\alpha$  und der Autoantikörperkonzentration und somit vermutlich eine direkte Beziehung dieser Zytokine zur Entwicklung der Läsionen besteht (Ameglio et al., 1999). Untermuert wird diese Hypothese durch den Nachweis eines hohen Gehalts dieser beiden Interleukine in akantholytischen Zellen und der periläsionalen Region (Lopez-Robles et al., 2001). Zusätzlich sind IL-6 und TNF $\alpha$  wichtige Differenzierungs- bzw. Überlebensfaktoren für PZ (Browning, 2006; Hiepe und Dorner, 2005).

### IL-8:

In der Blasenflüssigkeit von PV-Patienten wurden große Mengen an IL-8 detektiert, was vermutlich Folge einer lokalen Produktion dieses Zytokins durch die Keratinozyten ist (Baroni et al., 2002). IL-8 besitzt chemotaktische Eigenschaften und rekrutiert neutrophile Granulozyten und T-Zellen zum Ort des autoimmunologischen Geschehens. Weiterhin spielt auch dieses Interleukin im akantholytischen Prozess eine wichtige Rolle (Baroni et al., 2002).

### IL-10:

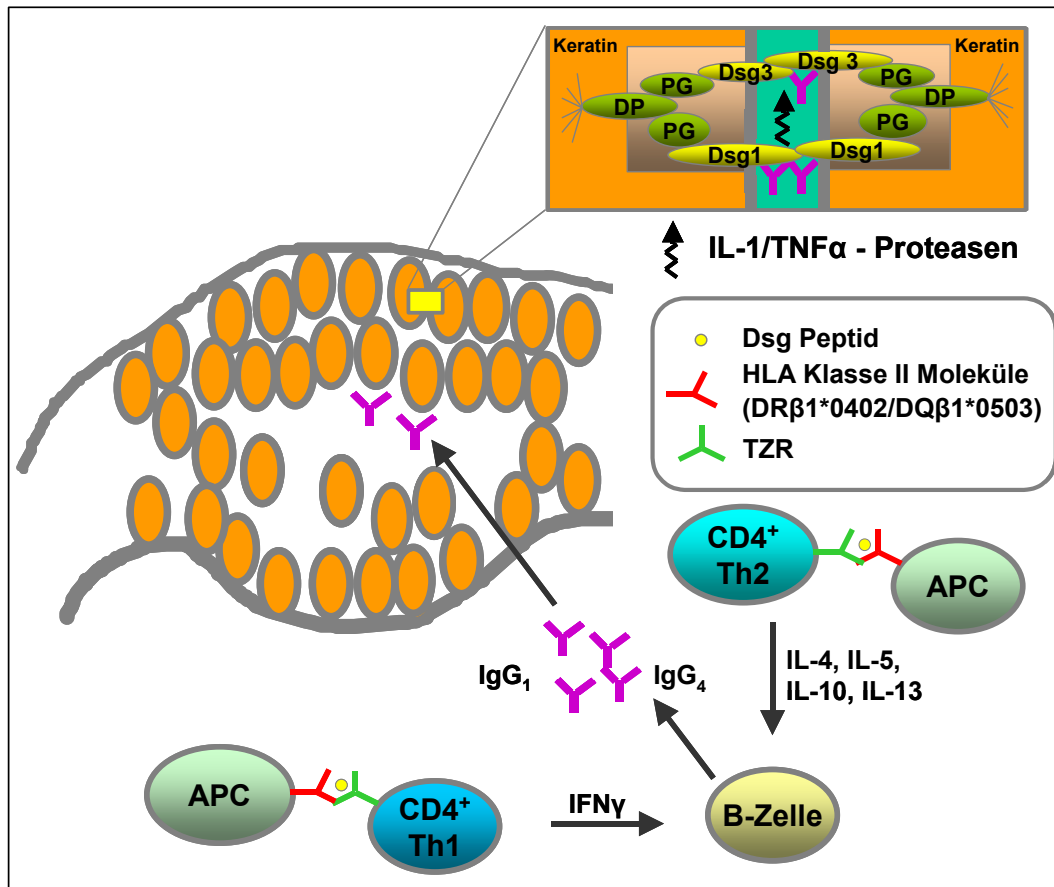
IL-10 ist ein Zytokin mit einer sehr vielfältigen Wirkungsweise. Zum einen fördert es die B-Zell-Differenzierung, -Proliferation und Antikörpersekretion und hat so eine besondere Bedeutung in der Förderung pathologischer Mechanismen in B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen. Zum anderen reduziert es die Expression kostimulierender Moleküle, die Expression von HLA-Klasse II - Molekülen und die Zytokinproduktion von APC (v.a. Monozyten, Langerhans-Zellen, Dendritische Zellen) und beeinträchtigt so die zelluläre Immunantwort (Bhol et al., 2000; Lalani et al., 1997). Die genaue Rolle von IL-10 beim PV ist bisher nicht vollständig geklärt. In den Seren von aktiv erkrankten Patienten konnten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant höhere IL-10-Konzentrationen detektiert werden. Patienten in Remission zeigten dagegen gesunden Kontrollen vergleichbare IL-10-Serumkonzentrationen (Bhol et al., 2000). Ein besonders hoher Gehalt an IL-10 war in der Blasenflüssigkeit von PV-Patienten nachweisbar, was eine Bedeutung von IL-10 im lokalen Entzündungsprozess vermuten lässt (Bhol et al., 2000). Es werden verschiedene Ursachen für die lokale Akkumulation von IL-10 diskutiert, die von einer möglicherweise stimulierenden Wirkung von IL-10 auf B-Zellen,

die gerade am Ort der Entzündung entscheidend ist (Förderung autoimmuner Prozesse) (Baroni et al., 2002), bis zur IL-10-vermittelten Inhibition des eosinophilen Zellinfiltrats und der proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF $\alpha$  (Hemmung autoimmuner Prozesse) reichen (Bhol et al., 2000; Toto et al., 2000).

IL-10 wird von einer Vielzahl immunologischer Zellen, einschließlich T-Zellen, B-Zellen, Mastzellen, eosinophilen Granulozyten und Keratinozyten gebildet. Es hat eine direkte (Hemmung der Interleukinfreisetzung) oder indirekte (Verminderung der Antigenpräsentation) inhibierende Wirkung auf die T-Zell-Proliferation (Lalani et al., 1997). IL-10 ist ein potenter Wachstums- und Differenzierungsfaktor für aktivierte humane B-Zellen (Rousset et al., 1992), fördert die Expression des antiapoptotischen Moleküls Bcl<sub>2</sub> und verhindert somit den programmierten Zelltod von B-Zellen (Levy und Brouet, 1994). Weiterhin begünstigt es die Produktion von IgM, IgA und hauptsächlich IgG (Llorente et al., 1995). IL-10 hat eine herausragende Bedeutung in vielen humoralen Autoimmunerkrankungen wie z.B. SLE oder pSS. Bei Patienten mit diesen Erkrankungen konnte eine erhöhte IL-10-Produktion von aktivierten B-Zellen und Monozyten, jedoch nicht von T-Zellen, nachgewiesen werden, während bei gesunden Kontrollpersonen alle drei Zellpopulationen kein IL-10 produzierten (Llorente et al., 1997; Llorente et al., 1994). Die erhöhte IL-10-Produktion spielt eine entscheidende Rolle im Prozess der spontanen Hyperaktivität der B-Zellen und der Autoantikörperproduktion in diesen Erkrankungen, wobei B-Zellen ihre Aktivierung und Proliferation durch die IL-10-Produktion möglicherweise selbst potenzieren (Llorente et al., 1997; Llorente et al., 1994; Ogden et al., 2005). Ein ähnlicher Wirkmechanismus könnte für die Pathogenese des PV bedeutend sein (Lalani et al., 1997).

### **1.2.8. Die Interaktion der humoralen und zellulären Autoimmunantwort beim PV**

Die Manifestation eines PV ist das Resultat multipler Fehlregulationen des Immunsystems auf humoraler und zellulärer Ebene (Abb. 8). Dsg3 als Autoantigen wird von den APC, wozu vorrangig Dendritische Zellen und B-Zellen gehören, aufgenommen, prozessiert und den Th-Zellen über HLA-Klasse II - Moleküle, im wesentlichen HLA-DR $\beta$ 1 \*0402 und HLA-DQ $\beta$ 1 \*0503, präsentiert. Diese werden aktiviert und sezernieren daraufhin Zytokine, die die B-Zell-vermittelte Produktion von IgG1 (IFN $\gamma$  von Th1-Zellen) und IgG4 (IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 von Th2-Zellen) fördern. Die gebildeten Autoantikörper binden an ihre antigenen Strukturen in der Epidermis und verursachen die Akantholyse der Keratinozyten. Diese manifestiert sich in einer suprabasalen Blasenbildung, die in Form schlaffer, dünnwandiger Blasen und Erosionen der Haut und/oder Schleimhaut klinisch sichtbar wird.



**Abb. 8: Interaktion zwischen autoreaktiven B- und T-Zellen beim Pemphigus vulgaris (PV).** Dargestellt ist die Modulation der Autoimmunantwort beim PV. Antigen-präsentierende Zellen (APC), vor allem B-Zellen, aktivieren Desmoglein3 (Dsg3)-spezifische T-Helfer-Zellen (Th-Zellen). Diese sezernieren daraufhin Zytokine, die die B-Zellen zur Autoantikörperproduktion anregen. Diese Autoantikörper vom Typ IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>4</sub> binden an epidermale Strukturen und bewirken die Acantholyse der Keratinozyten. TZR – T-Zell-Rezeptor (modifiziert nach Hertl et al., 2006; Hertl und Veldman, 2001).

### 1.2.9. Therapie

Aufgrund der großflächigen Haut- und Schleimhaut-Läsionen und der damit verbundenen Komplikationen wie Mangelernährung, Sekundärinfektionen, Protein- und Flüssigkeitsverlust verläuft der PV unbehandelt meist letal. Die Einführung von hochdosierten, systemischen Glukokortikoiden in die Behandlung des PV war ein Meilenstein in der Etablierung eines erfolgreichen Therapieschemas. Aber auch heute noch sterben 5-10% der Patienten aufgrund der auftretenden sekundären Folgen der Erkrankung oder der Nebenwirkungen der immunsuppressiven Medikamente (Amagai, 1999; Hertl und Schuler, 2002a; Nousari und Anhalt, 1999). Die Primärbehandlung des PV setzt sich aus der systemischen Gabe von hochdosierten Glukokortikoiden in Verbindung mit adjuvanten immunsuppressiven Medikamenten zusammen (Toth und Jonkman, 2001). Therapierefraktären Patienten stehen mit Immunadsorption (IA), intravenösen Immunglobulinen (IVIg) oder B-Zell-depletierenden Medikamenten weitere Therapieoptionen zur Verfügung.



Die Abheilung der Läsionen manifestiert sich in einer Verschörfung der exsudativen Erosionen, gefolgt von einer Reepithelialisierung der Haut und Schleimhäute. Die meisten Patienten erreichen eine Phase der partiellen Remission, in der keine neuen Läsionen auftreten und dieser Zustand mit einer minimalen Kortikosteroid-Dosis aufrechterhalten werden kann. Im weiteren Therapieverlauf schließt sich bei zahlreichen Patienten eine komplette Remission an, in der eine medikamentöse Behandlung nicht mehr nötig ist (Bystryn und Rudolph, 2005). Die Wirkung der genannten Medikamente/Behandlungsschemen auf das Immunsystem wird im Folgenden kurz zusammengefasst:

#### Glukokortikoide und Immunsuppressiva

Glukokortikoide haben eine direkte antiinflammatorische Wirkung, die durch die Reduktion der Expression und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und einer nachfolgenden Suppression von Gedächtnis-T-Zellen definiert ist (Toth und Jonkman, 2001). *In vitro*-Studien konnten eine Glukokortikoid-induzierte Erhöhung von IL-10- und Foxp3-mRNA zeigen, wodurch eine Induktion regulatorischer T-Zellen erzielt werden könnte (Karagiannidis et al., 2004). Außerdem wurde eine direkte Rolle der Kortikosteroide in der Modulation der epidermalen Zell-Adhäsion beschrieben, die sich in einer Hemmung der PV-IgG-vermittelten Akantholyse und Dsg3-Phosphorylierung manifestiert (Payne et al., 2004).

Azathioprin (AZA) ist das adjuvante Immunsuppressivum der ersten Wahl. Es hat eine direkte zytotoxische Wirkung auf hämatopoetische Zellen, bewirkt die Hemmung der T-Zell-Proliferation, die Reduktion der TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -Freisetzung und die Induktion der Apoptose in aktivierten Lymphozyten (Oberdisse et al., 2002, S. 745; Toth und Jonkman, 2001). Es muss vor Behandlung sicher gestellt werden, dass in den Patienten die Aktivität des Enzyms Thiopurinmethyltransferase (TPMT) im Normalbereich liegt, da Probanden mit geringer TPMT-Aktivität eine dramatische Myelosuppression als Folge der Azathioprin-Behandlung entwickeln (Bystryn und Rudolph, 2005).

Mykophenolat-Mofetil (MMF) hemmt die Proliferation von B- und T-Lymphozyten, reduziert die B-Zell-vermittelte Antikörperproduktion und provoziert den programmierten Zelltod in aktivierten T-Lymphozyten (Oberdisse et al., 2002, S. 745; Toth und Jonkman, 2001).

Cyclophosphamid hemmt das Zellwachstum und Zellteilungsvermögen und damit hauptsächlich die Zahl der B- und T-Lymphozyten (Toth und Jonkman, 2001). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass kurzlebige Plasmablasten auf eine Cyclophosphamid-Behandlung sehr sensitiv reagieren und eliminiert werden, während langlebige PZ ein refraktäres Verhalten gegenüber diesem Medikament zeigen. Somit sind die auch nach immunsuppressiver Therapie oft detektierbaren hohen Autoantikörpertiter im Serum der Patienten möglicherweise eine Folge der kontinuierlichen Produktion dieser Immunglobuline von langlebigen PZ (Hoyer et al., 2004).

#### Immunadsorption (IA)

Die IA bewirkt eine therapeutische Verminderung zirkulierender autoreaktiver IgG-Antikörper und Immunkomplexe. Basis des Adsorber-Systems ist Protein A, ein Hauptbestandteil der Zellwand des Bakteriums *Staphylokokkus aureus*. Durch die hohe Affinität von Protein A für den

Fc-Teil von humanem IgG werden beim Durchlauf des Patientenplasmas durch das Adsorbersystem ausschließlich IgG und Immunkomplexe gebunden und aus dem Plasma entfernt. Ein IA-Zyklus besteht aus mehreren IA-Behandlungen an aufeinanderfolgenden Tagen, wobei eine 50-70%ige Reduktion der autoreaktiven Antikörper im Serum der PV-Patienten erreicht wird. Dadurch kommt es zu einer schnellen Abheilung der Haut- und Schleimhaut-Läsionen (Eming und Hertl, 2006). Diese Methode ist in ihrer Spezifität der ursprünglich eingesetzten Plasmapherese überlegen, da bei dieser zusätzlich zu den Immunglobulinen Plasmaproteine, Gerinnungsfaktoren, Hormone und Albumine entfernt wurden.

#### Intravenöse Immunglobuline (IVIg)

IVIg-Präparationen beinhalten gepooltes Plasma von mehreren tausend humanen Spendern. Die immunologischen Wirkungen von IVIg sind sehr zahlreich. Sie reichen von antiinflammatorischen Effekten durch die Modulation der Zytokinproduktion von Monozyten und Th-Zellen, über die Hemmung der Reifung und Differenzierung Dendritischer Zellen bis zur Inhibition der Aktivierung und Proliferation von B- und T-Lymphozyten (Keskin et al., 2008). Weiterhin werden, vorrangig in humanen Monozyten und aktivierten B-Lymphozyten, apoptotische Prozesse induziert, da IVIg-Präparationen u.a. anti-Fas Antikörper enthalten (Prasad et al., 1998). Im Gegensatz dazu wird der autoantikörpervermittelte Zelltod in den Keratinozyten und folglich die im Krankheitsprozess des PV bedeutende Akantholyse durch IVIg-vermittelte Stimulation intrazellulärer antiapoptotischer und antionkotischer Signalwege verhindert (Arredondo et al., 2005). Im Serum von Patienten mit Autoimmunerkrankungen ist nach Behandlung mit IVIg eine selektive und schnelle Eliminierung von autoreaktiven Antikörpern zu beobachten, wobei die Gesamt-IgG-Konzentration relativ konstant bleibt. Grund dafür ist offensichtlich ein gesteigerter Katabolismus der körpereigenen Immunglobulin-Moleküle, begründet durch die IVIg-vermittelte erhöhte Konzentration des Serum-Gesamt-IgG und die damit verbundene Sättigung neonataler Fc-Rezeptoren (FcRn) (Li et al., 2005). Dieser Katabolismus spiegelt sich hauptsächlich in der Reduktion der autoreaktiven Antikörper wider, da die anderen IgG-Antikörper durch die applizierten Immunglobuline ersetzt werden (Bystryn und Rudolph, 2005; Czernik et al., 2008).

#### Rituximab

Rituximab ist ein monoklonaler anti-CD20 Antikörper der selektiv periphere B-Lymphozyten eliminiert. Die Wirkungsweise dieses Antikörpers auf das zelluläre und humorale Immunsystem wird im folgenden Kapitel genauer erläutert.

## 1.3. Rituximab

### 1.3.1. Das CD20-Molekül

CD20 ist ein membranassoziiertes, nicht glykosyliertes Phosphoprotein, das weder internalisiert noch freigesetzt wird. Es zeigt gewöhnlich eine sehr hohe Expressionsdichte auf der Zelloberfläche von B-Zellen, welche die von CD19 weit übersteigt (Glennie et al., 2007; Hultin et al., 1993). Das CD20-Molekül besteht aus vier Transmembranregionen, zwei extrazellulären Schleifen und langen zytoplasmatischen Carboxyl- und Amino-terminalen Bereichen. Der natürliche Ligand konnte bisher nicht identifiziert werden (Glennie et al., 2007; Tedder und Engel, 1994; Tedder et al., 1989). Die Signalleitung über diesen Rezeptor beeinflusst die B-Zell-Aktivierung, -Differenzierung und die Zell-Zyklus-Progression von der G1- in die S-Phase (Shan et al., 2000; Silverman und Weisman, 2003; Smith, 2003). CD20 wird auf allen B-Zellen vom Entwicklungsstadium der Prä-B-Zellen im Knochenmark bis zur abschließenden Differenzierung in antikörpersezernierende PZ exprimiert (Silverman und Weisman, 2003; Tedder et al., 1989), wobei die Expression von CD20 auf der PZ-Oberfläche kontrovers diskutiert wird. Obwohl die meisten Berichte eine fehlende Expression von CD20 auf der Zelloberfläche von PZ beschreiben (Cragg et al., 2005; Silverman und Weisman, 2003; Tedder und Engel, 1994; Tedder et al., 1989), konnte in einigen Publikationen die Expression dieses Moleküls auf etwa 20% der PZ des Knochenmarks einschließlich autoantikörpersezernierender PZ (Terstappen et al., 1990; Treon und Anderson, 2000) sowie auf fast allen tonsillären PZ und auf bis zu 50% der PZ von Milz und Lymphknoten gezeigt werden (Withers et al., 2007). Eine kleine Untergruppe der T-Lymphozyten exprimiert ebenfalls das CD20-Molekül in geringer Dichte auf der Zelloberfläche. Diese Zellpopulation weist einen sehr heterogenen Phänotyp auf. Der Hauptteil der CD20<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert CD8 und den  $\gamma\delta$  – T-Zell-Rezeptor (Hultin et al., 1993; Leandro et al., 2006).

### 1.3.2. Der anti-CD20 monoklonale Antikörper Rituximab

Rituximab ist ein chimärer monoklonaler Antikörper (mAk), der aus einer murinen anti-humanen CD20 variablen Region und einer humanen IgG1k konstanten Region besteht (Cartron et al., 2007; Silverman und Weisman, 2003). Dabei überwiegt mit einem Anteil von >70% die humane Komponente des Proteins. Chimäre Antikörper haben gegenüber murinen Antikörpern den Vorteil der geringeren Immunogenität. Rituximab bindet an Epitope des extrazellulären Bereichs vom CD20-Molekül. Die sehr hohe Dichte von CD20-Molekülen auf der B-Zelloberfläche bedingt eine sehr starke Akkumulation von Rituximab auf der Zelle (Glennie et al., 2007), die eine sehr effiziente Eliminierung der B-Zellen durch verschiedene Mechanismen (siehe Kapitel 1.3.3.) ermöglicht. Das ursprünglich für niedrigmaligne B-Zell-Lymphome festgelegte Therapieschema 4x375mg Rituximab/m<sup>2</sup> Körperoberfläche (KOF), verabreicht in wöchentlichen Abständen, wurde größtenteils für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen, wie RA und SLE, übernommen. Basierend auf dieser Dosierungsvorgabe konnte festgestellt werden, dass

sich die Serumkonzentration von Rituximab mit der Anzahl der Infusionen erhöht und der Antikörper auch sechs Monate nach Therapie noch im Serum nachweisbar ist. Pharmakokinetische Untersuchungen zeigten eine große interindividuelle Variabilität der Halbwertszeit von Rituximab. Bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen liegt diese zwischen 12 und 36 Tagen. Rituximab diffundiert in die meisten Organe wie Nieren, Lunge, Leber, Herz und Milz. Die genauen Mechanismen des Metabolismus und der Eliminierung von Rituximab sind bisher noch ungeklärt (Cartron et al., 2007).

### **1.3.3. B-Zell-depletierende Therapie mittels Rituximab**

#### Grundlage

B-Lymphozyten haben verschiedene, in der Pathogenese von autoimmunen Prozessen bedeutsame, Funktionen. Sie sind i) sehr effiziente APC, ii) Produzenten von Autoantikörpern, iii) Vorläuferzellen autoreaktiver PZ und iv) sie sezernieren Zytokine, die einerseits Autoimmunreaktionen fördern (z.B. IL-6, IL-10) und andererseits direkte proinflammatorische Wirkungen entfalten (z.B. IL-1, TNF $\alpha$ ). Es konnte gezeigt werden, dass B-Zellen als APC in B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen eine herausragende Rolle spielen. Die Depletion der B-Lymphozyten im Synovium reduzierte die T-Zell-Aktivierung und die lokale Produktion proinflammatorischer Zytokine in Patienten mit RA. Andere, im Synovium verbleibende, APC konnten diesen Ausfall nicht kompensieren (Takemura et al., 2001). Diese Ergebnisse werden von weiteren Untersuchungen untermauert. In einem Mausmodell für Typ I-Diabetes wurde gezeigt, dass die Depletion der B-Zellen mit einer direkten Suppression der antigenpräsentierenden Kapazität peritonealer Makrophagen und Dendritischer Zellen der Milz verbunden ist (Hu et al., 2007). Daher stellen B-Zellen in verschiedenen (auto)immunologischen Prozessen einen bedeutsamen Angriffspunkt für therapeutische Ansätze dar.

#### Mechanismen der B-Zell-Depletion

Nach Bindung von Rituximab an das CD20-Molekül auf der Zelloberfläche erfolgt die Eliminierung der B-Zellen über drei Mechanismen: i) Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität, ii) Komplement-abhängige Zytotoxizität und iii) programmierter Zelltod (Apoptose), wobei der vorrangige Mechanismus der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität zugeschrieben wird. Die Mechanismen der B-Zell-Depletion sind in Abb. 9 zusammenfassend dargestellt.

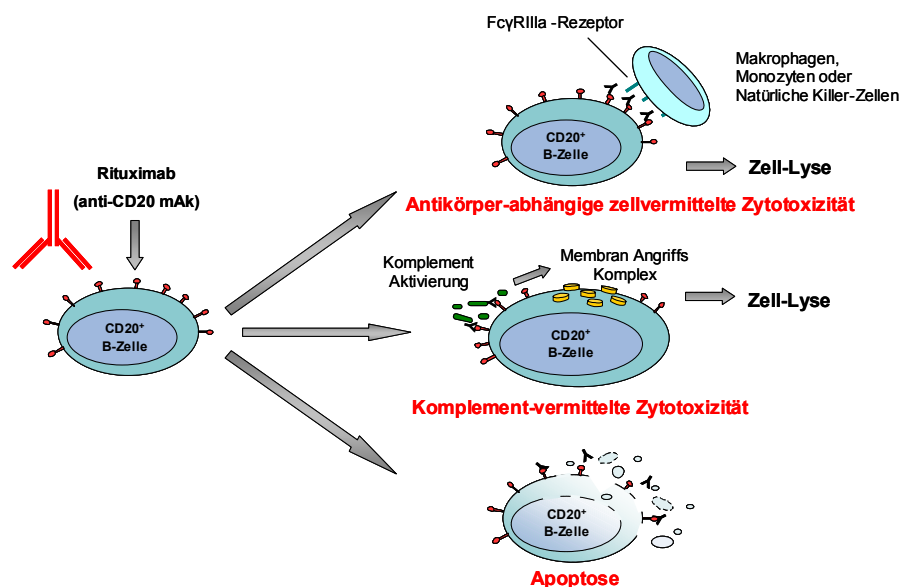
#### a) Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität

Durch Interaktion der konstanten, humanen IgG1-Region des an die B-Zellen gebundenen Rituximab mit den Fc $\gamma$ -Rezeptoren (Fc $\gamma$ R) auf phagozytosefähigen Zellen, wie Makrophagen, Dendritischen Zellen und NK-Zellen, wird die Zellzerstörung eingeleitet, wobei den Makrophagen in diesem Prozess eine besondere Bedeutung zukommt. In einem humanen CD20-transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Eliminierung der B-Zellen nach Depletion der Makrophagen, trotz Sättigung der B-Zellen mit anti-hCD20, verhindert wird (Gong

et al., 2005). Die im Prozess der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität wichtigen FcγR sind FcγRI (CD64) und FcγRIIIa (CD16). IgG1 hat eine besonders ausgeprägte Affinität zum FcγRIIIa-Rezeptor (Glennie et al., 2007), wobei der genetische Polymorphismus dieses Rezeptors entscheidend für die Bindungsstärke und damit für die Effektivität der Zellzerstörung ist. Die B-Zell-Depletion ist bei Patienten, die für das hoch affine V-Allel (Valin an Aminosäurestelle 158 des Proteins) homozygot (VV) oder heterozygot (VF) sind, viel ausgeprägter als in Patienten, die homozygot (FF) für das niedrig affine F-Allel (Phenylalanin an Aminosäurestelle 158 des Proteins) sind. Patienten, die ausschließlich das niedrig affine F-Allel besitzen, benötigen eine 10x höhere Rituximab-Dosis, um eine vergleichbare Effizienz der B-Zell-Depletion zu erreichen wie V-Allel-Träger (Anolik et al., 2003; Cartron et al., 2002).

#### b) Komplement-abhängige Zytotoxizität und Apoptose

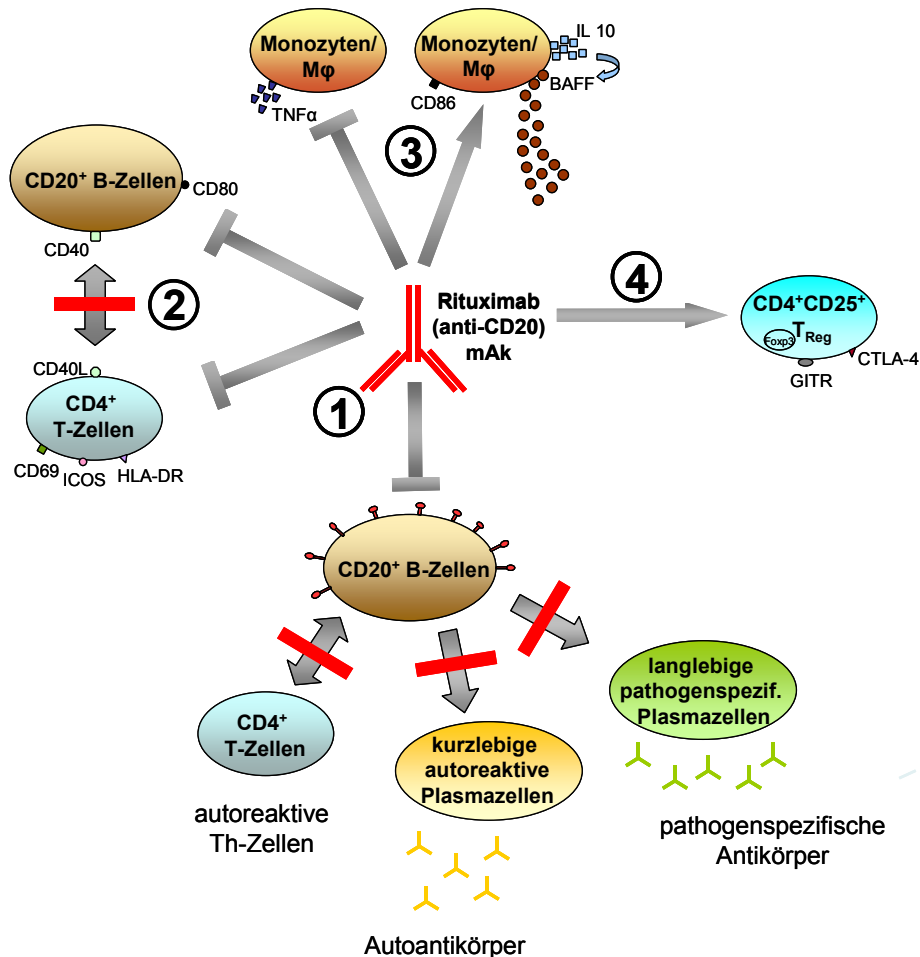
Weitere Mechanismen der Rituximab-vermittelten Eliminierung CD20<sup>+</sup> B-Zellen sind die Komplement-abhängige Zytotoxizität und der programmierte Zelltod. Die Komplement-vermittelte Zellzerstörung wird durch Aktivierung der klassischen Komplementkaskade (Rituximab bindet an C1q) initiiert, wobei vor allem Marginalzonen-B-Zellen über diesen Weg depletiert werden (Glennie et al., 2007; Gong et al., 2005). Die Förderung eines Zell-Zyklus-Arrests und die Apoptoseinduktion sind direkte Folge der Rituximab-vermittelten intrazellulären Signalkaskade (Glennie et al., 2007). Der programmierte Zelltod wird durch die verminderte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl<sub>2</sub> und die Aktivierung der Caspasen 9 und 3 ausgelöst. Der Signalweg über den Todesrezeptor Fas hat bei der Rituximab-vermittelten Apoptose keine Bedeutung (Alas et al., 2002; Shan et al., 2000).



**Abb. 9: Mechanismen der Rituximab-induzierten B-Zell-Depletion.** Der monoklonale Antikörper (mAk) Rituximab eliminiert CD20<sup>+</sup> B-Lymphozyten durch die Initiierung von hauptsächlich drei Mechanismen: Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität, Komplement-abhängige Zytotoxizität und Apoptose. Dabei ist die Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität von entscheidender Bedeutung. Polymorphismen des FcγRIIIa (CD16)-Rezeptors, der auf phagozytosefähigen Zellen wie Makrophagen, Monozyten und Natürlichen Killerzellen exprimiert wird, beeinflussen die Bindungsstärke dieser Rezeptoren an den Fc-Teil des Rituximabs und somit die Effizienz der Eliminierung der B-Zellen (modifiziert nach Hertl et al., 2007).

### Einfluss von Rituximab auf Autoimmunprozesse

Neben der B-Zell-depletierenden Wirkung übt Rituximab zahlreiche direkte und indirekte Effekte auf die zelluläre und humorale Autoimmunantwort aus (Abb. 10). Dazu gehören die Auswirkungen auf die Expression kostimulierender Moleküle auf der Zelloberfläche von B- und T-Lymphozyten sowie auf die Produktion und Freisetzung von Zytokinen aus Immunzellen wie Monozyten und Makrophagen und auf die direkte Induktion von Treg.



**Abb. 10: Die Wirkung von Rituximab auf die zelluläre und humorale Autoimmunantwort.**

1. Der monoklonale Antikörper (mAk) Rituximab depletiert die  $CD20^+$  B-Zellen, was in einer verminderten Neubildung kurz- und langlebiger Plasmazellen resultiert. Zusätzlich wird durch die Eliminierung der B-Zellen die Interaktion zwischen antigenpräsentierenden B-Zellen und autoreaktiven T-Helfer (Th)-Zellen unterbrochen.
2. Rituximab inhibiert die Expression der kostimulierenden Moleküle CD40 und CD80 auf der Zelloberfläche der B-Zellen (Tokunaga et al., 2005; Tokunaga et al., 2007) sowie die CD69-, ICOS-, HLA-DR- und CD40L-Expression auf  $CD4^+$  Th-Zellen (Sfikakis et al., 2005a; Tokunaga et al., 2007). Somit werden wichtige kostimulierende Signale, z.B. durch den CD40-CD40L Signalweg, unterbrochen und nachfolgend die Aktivierung autoreaktiver Immunprozesse verhindert (Desai-Mehta et al., 1996).
3. Rituximab hemmt die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie  $TNF\alpha$  und fördert die Sekretion von IL-10 und BAFF (*B cell activating factor*) durch Monozyten und Makrophagen (Mφ). Zusätzlich stimuliert IL-10 die Freisetzung von BAFF in einem autokrinen/parakrinen Prozess und hat dadurch eine wichtige Funktion in der Homöostase von BAFF (Ogden et al., 2005). Rituximab bewirkt weiterhin eine gesteigerte CD86-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten und Makrophagen (Toubi et al., 2007) und erhöht damit deren kostimulatorische Kapazität.
4. Rituximab induziert eine vermehrte mRNA-Produktion von Foxp3, GITR und CTLA-4, was die direkte Bildung von  $CD4^+CD25^+$  regulatorischen T-Zellen ( $T_{Reg}$ ) suggeriert (Sfikakis et al., 2007; Vallerskog et al., 2007; Vigna-Perez et al., 2006).

Im Gegensatz zur Depletion peripherer B-Zellen bleiben die allgemeinen Frequenzen CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie die der NK-Zellen von der Rituximab-Therapie unbeeinflusst (Joly et al., 2007; Kimby, 2005; Kneitz et al., 2002; Leandro et al., 2006; Mouquet et al., 2008; Shaw et al., 2003; Vallerskog et al., 2007).

#### Effektivität der B-Zell-Depletion

Rituximab bewirkt eine schnelle und vollständige Depletion humaner peripherer CD20<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> B-Zellen, die durchschnittlich sechs bis zwölf Monate andauert. Die Untersuchungen zur Effizienz des anti-CD20 mAk in der Eliminierung gewebeständiger B-Zellen zeigen kein einheitliches Muster. Bisher wurden, aufgrund der geringen Verfügbarkeit lymphatischer Organe, nur wenige Untersuchungen geweberesidenter B-Zellen im humanen System nach Rituximab-Therapie durchgeführt. Einige dieser Studien zeigten in SLE-, pSS- und ITP (idiopathische thrombozytopenische Purpura)-Patienten eine vollständige Eliminierung der B-Lymphozyten in Milz, Knochenmark, Appendix und Speicheldrüsen nach Therapie mit dem anti-CD20 mAk (Kneitz et al., 2002; Paran et al., 2006; Pers et al., 2007). Analysen des synovialen Gewebes von RA-Patienten demonstrierten dagegen eine signifikante, jedoch inkomplette Depletion, der gewebeständigen B-Zellen 4 bis 16 Wochen nach Rituximab-Behandlung. 16 Wochen nach Behandlung nahmen zusätzlich die CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Makrophagen und PZ im synovialen Gewebe signifikant ab, während die Zahlen dieser Zellen im peripheren Blut konstant blieben. Diese Resultate untermauern die bedeutende Rolle der B-Zellen bei der Organisation der lokalen Entzündungsreaktion (Thurlings et al., 2008; Vos et al., 2007).

Untersuchungen zur Wirkung von Rituximab bei Rhesusaffen ergaben ebenfalls eine vollkommene B-Zell-Depletion im peripheren Blut aller Tieren, während die Eliminierung der geweberesidenten B-Zellen in Knochenmark, Thymus und lymphatischem Gewebe (Lymphknoten, Milz, Tonsillen) sehr different war. Einige Affen zeigten auch in diesen Kompartimenten eine vollständige Depletion, andere dagegen eine inkomplette, teilweise nur 34-78%ige Eliminierung der B-Zellen (Reff et al., 1994; Schroder et al., 2003). Die Untersuchung der B-Zell-Depletion in einem humanen CD20-transgenen Mausmodell weist ebenfalls ein differentes Verhalten der B-Zellen in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation auf. Nach Behandlung der Mäuse mit 2H7, einem humanisierten anti-hCD20 mAk auf Grundlage von murinem IgG2a, wurden die peripheren B-Zellen sehr schnell innerhalb von drei Stunden nach Applikation eliminiert. Die ortständigen B-Zellen in den Lymphknoten und im Peritoneum wurden ebenfalls vollständig, aber mit einer zeitlichen Verzögerung von 2 bzw. 21 Tagen depletiert. Dagegen zeigten sich 33% der B-Lymphozyten in der Milz, hauptsächlich B-Zellen der Marginalzone und der Keimzentren, therapieresistent. Die Ursache dafür ist nicht in einer verminderten Expression von CD20 auf der Oberfläche dieser B-Zellen oder in einer verminderten Verfügbarkeit des anti-CD20 mAk in diesen Kompartimenten begründet, sondern im lokalen Milieu (z.B. dem Vorhandensein von Überlebensfaktoren wie BAFF (*B cell activating factor of the TNF family*)), das die B-Zellen umgibt (Gong et al., 2005).

Andere CD20<sup>+</sup> Zellen, z.B. geweberesidente CD20<sup>+</sup> PZ und periphere CD20<sup>+</sup> T-Zellen, werden nach Einwirkung von Rituximab ebenfalls depletiert (Dorner und Lipsky, 2007; Leandro et al., 2006; Withers et al., 2007).

Möglicherweise liegt der Grund für eine verminderte B-Zell-depletierende Effizienz von Rituximab oder für eine sehr schnelle Repopulation der B-Zellen nach Therapie, die bei einigen Patienten auftritt, in der Entwicklung von humanen anti-chimären Antikörpern (HACA) begründet (Silverman und Weisman, 2003). Um dieses Risiko zu minimieren wurden voll humanisierte oder humane anti-CD20 Antikörper (hA20, Ocrelizumab, Ofatumumab) entwickelt, die sich derzeit in der klinischen Testung befinden und bereits mit Erfolg in Einzelbehandlungen eingesetzt wurden (Dorner und Lipsky, 2007; Tahir et al., 2005).

#### B-Zell-Repopulation

Durch die Rituximab-induzierte, durchschnittlich sechs bis neun Monate andauernde, B-Zell-Depletion im peripheren Blut kommt es zur langanhaltenden Modulation des B-Zell-Repertoires. Während die erste Phase der B-Zell-Regeneration durch das vorrangige Auftreten unreifer B-Zellen (CD38<sup>++</sup>, IgD<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD24<sup>++</sup>, CD27<sup>-</sup>) im peripheren Blut gekennzeichnet ist (Leandro et al., 2006; Mouquet et al., 2008; Roll et al., 2006), sind CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen erst im weiteren Verlauf der B-Zell-Repopulation zu detektieren und ihre Anzahl bleibt in Patienten, die sich in klinischer Remission befinden, auch mehrere Jahre nach der Therapie noch signifikant reduziert. Dagegen zeigen Patienten mit sehr kurzer oder fehlender klinischer Antwort eine schnelle Wiederherstellung der peripheren Gedächtnis-B-Zellpopulation (Anolik et al., 2007; Leandro et al., 2006; Roll et al., 2006). Die vergleichsweise hohe Zahl von Gedächtnis-B-Zellen in Patienten mit Rezidiven ist möglicherweise Folge einer inkompletten Depletion dieser Zellen in den sekundären lymphatischen Organen nach Rituximab-Therapie (Leandro et al., 2006; Schmidt et al., 2008), wie sie in einigen Untersuchungen am Patienten und in Tiermodellen beschrieben wurde (Gong et al., 2005; Reff et al., 1994; Thurlings et al., 2008; Vos et al., 2007).

#### **1.3.4. Rituximab und Autoimmunerkrankheiten**

Das ursprünglich zur Behandlung niedrigmaligner B-Zell-Lymphome entwickelte Rituximab wird derzeit mit großem Erfolg in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt. 2007 wurde das Medikament von der FDA (*US Food and Drug Administration*) für die Behandlung der RA zugelassen, wobei der Einsatz derzeit auf Patienten, die gegenüber TNF $\alpha$ -Blockern resistent sind, beschränkt ist. In anderen Erkrankungen wie SLE, pSS und Vaskulitis befindet sich das Medikament derzeit in der klinischen Prüfung (Arkfeld, 2008). In der Behandlung B-Zell-vermittelter Autoimmunerkrankungen wurde größtenteils das onkologische Therapieschema, d.h. 4x375mg/m<sup>2</sup> KOF (verabreicht in wöchentlichen Abständen), übernommen. Es zeigt sich eine einheitliche klinische Besserung in Patienten mit RA, SLE, pSS, Vaskulitis, ITP (Cambridge et al., 2003; Cambridge et al., 2006a; Ferraro et al., 2008; Leandro et al., 2002; Seror et al., 2007; Stasi et al., 2007; Vallerskog et al., 2007) und in dermatologischen Autoimmunerkrankungen wie dem Pemphigus, der Epidermolysis bullosa



aquisita, dem bullösen Pemphigoid, der Dermatomyositis und dem atopischen Ekzem (Carr und Heffernan, 2007; Hertl et al., 2008; Schmidt et al., 2008; Simon et al., 2008). Die klinische Besserung ist nicht bei allen Erkrankungen von einer Abnahme autoreaktiver Antikörper im Serum der Patienten begleitet (Arkfeld, 2008; Silverman und Weisman, 2003; Stohl und Looney, 2006), was die wichtige Funktion der B-Zellen als APC und zytokinsezernierende Zellen im autoimmunen Prozess unterstreicht. Weitere Evidenz dafür liefert eine Fallbeschreibung von Singh et al., in der ein Patient mit Psoriasis, einer vorrangig T-Zell-vermittelten Erkrankung, in deren Pathogenese die Funktion der B-Zellen unklar ist, erfolgreich mit Rituximab behandelt wurde (Singh und Weinberg, 2005).

Im Gegensatz zu den Autoantikörperkonzentrationen im Serum, die bei den meisten Patienten nach Rituximab-Behandlung sinken und bei einigen Patienten (hauptsächlich SLE-Patienten) trotz klinischer Besserung konstant bleiben, zeigen pathogenspezifische Antikörper, z.B. gegen Tetanus Toxoid (TT), Pneumokokken Kapsel Polysaccharid (PCP) und Epstein-Barr-Virus (EBV), nach Rituximab-Behandlung stabile oder sogar leicht erhöhte Serumkonzentrationen (Cambridge et al., 2003; Cambridge et al., 2006a; Cutler et al., 2006; Ferraro et al., 2008; Mouquet et al., 2008).

2006 wurde von der FDA das Auftreten einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) bei zwei Rituximab-behandelten SLE-Patienten gemeldet. Da diese Erkrankung sowohl bei SLE-Patienten, die ausschließlich mit Immunsuppressiva behandelt wurden (Itoh et al., 2006) als auch bei Multiple Sklerose-Patienten, die mit dem  $\alpha$ 4-Integrin-Antikörper Natalizumab behandelt wurden (Berger, 2006), auftraten, nicht aber bei mehr als 400 Natalizumab- oder Rituximab-behandelten RA-Patienten (Smolen et al., 2007), ist die exklusive Betrachtung der PML als Folge der Rituximab-Behandlung in diesen zwei Patienten fragwürdig.

#### Pemphigus vulgaris (PV)

Bei der Behandlung des PV wurde Rituximab ( $4 \times 375 \text{ mg/m}^2$  KOF) in den vergangenen Jahren mit großem Erfolg eingesetzt. Derzeit wurden mehr als 50 PV-Patienten mit Rituximab, meist in Kombination mit systemischen Immunsuppressiva, behandelt (Hertl et al., 2008). Ungefähr 25% der gegenüber alleiniger immunsuppressiver Medikation therapierefraktären PV-Patienten erreichten nach adjuvanter Applikation von Rituximab eine komplette Remission, die durch die Abheilung aller Läsionen gekennzeichnet ist und keiner weiteren Therapie bedarf. 30% der Patienten befanden sich nach B-Zell-depletierender Therapie in klinischer Remission, definiert als Abheilung aller Läsionen mit weiterem Therapiebedarf, und 45% erreichten eine partielle Remission mit einer mehr als 50%igen Besserung des Lokalbefundes (Kasperkiewicz und Zillikens, 2007). Einheitlich war bei allen PV-Patienten, dass die klinische Besserung mit einer Abnahme der autoreaktiven, Dsg3-spezifischen IgG-Antikörper im Serum verbunden war (Carr und Heffernan, 2007). In den letzten zwei Jahren wurden zwei unabhängige multizentrische Studien zum Einsatz von Rituximab in Kombination mit IVIg (Ahmed et al., 2006) bzw. systemischen Glukokortikoiden (Joly et al., 2007) durchgeführt. Beide Studien zeigten ein sehr gutes klinisches Ansprechen der PV-Patienten, resultierend in dem Erreichen einer kompletten

Remission (Ahmed et al., 2006; Joly et al., 2007). Die Kombinationstherapie aus Rituximab und IVIg induzierte bei neun von elf behandelten PV-Patienten eine komplette Remission von durchschnittlich 22- bis 37-monatiger Dauer (Ahmed et al., 2006). Die simultane Behandlung von sieben PF- und 14 PV-Patienten mit Rituximab und systemischen Glukokortikoiden einschließlich Immunsuppressiva führte innerhalb von drei Monaten zur Entwicklung einer kompletten Remission bei 18 der 21 Patienten (Joly et al., 2007). Die Induktion der Remission bei den Patienten erfolgte ausschließlich durch Rituximab, da eine vorherige alleinige Therapie mit Glukokortikoiden (Joly et al., 2007) oder Glukokortikoiden und IVIg (Ahmed et al., 2006) keinen Behandlungserfolg zeigte.

Somit stellt Rituximab für die Behandlung von PV-Patienten mit therapierefraktärem oder sehr schwerem Krankheitsverlauf eine vielversprechende und effiziente Behandlungsmöglichkeit dar.

## **1.4. B-Zell-aktivierende Faktoren**

### **1.4.1. BAFF und APRIL**

#### BAFF

BAFF (BLyS (B-Lymphozyten-Stimulator), CD257) ist ein homotrimeres Molekül und gehört zur TNF-Familie. Es kann sowohl in membrangebundener Form als auch, nach Abspaltung von der Zellmembran, in löslicher Form vorliegen (Mackay et al., 2007). BAFF wird hauptsächlich von myeloiden Zellen wie Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Dendritischen Zellen und zu einem geringeren Teil von aktivierten T-Zellen und Mastzellen, jedoch nicht von B-Zellen, sezerniert. Ferner produzieren nicht-lymphoide Zellen, wie Stromazellen, Astrozyten, Synoviozyten und Osteoklasten, diesen Mediator (Dillon et al., 2006; Huard et al., 2004; Schneider und Tschopp, 2003; Sutherland et al., 2006; Tangye et al., 2006). Die konstitutive Produktion von BAFF durch die Stromazellen der lymphoiden Organe bestimmt die Größe des peripheren B-Zell-Pools und reguliert somit die B-Zell-Homöostase, während die induzierte BAFF-Sekretion der entscheidende Faktor bei der Aufrechterhaltung des B-Zell-Überlebens ist (Schneider, 2005; Sutherland et al., 2006). Interleukine, wie IL-10 und IFN $\gamma$ , die oft während inflammatorischer oder autoreaktiver Prozesse freigesetzt werden, erhöhen zusätzlich die Bildung und Freisetzung von BAFF durch Monozyten und Makrophagen (Mackay et al., 2003; Schneider und Tschopp, 2003) und fördern auf diese Weise indirekt das Überleben autoreaktiver B-Zellen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass das Überleben autoreaktiver B-Zellen sehr stark von BAFF abhängig ist und dass autoaggressive B-Zellen bei Reduktion des verfügbaren BAFF-Gehalts oder bei Konkurrenz mit anderen B-Zellen um die Bindung dieses Faktors bevorzugt eliminiert werden (Lesley et al., 2004; Thien et al., 2004). Somit sind Dysregulationen, die zur Erhöhung der BAFF-Produktion führen, oft mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen assoziiert. In diesem Zusammenhang entwickeln BAFF-transgene Mäuse eine antikörpervermittelte Autoimmunerkrankung mit einem SLE-, später zusätzlich pSS-artigem Phänotyp, B-Zell-Hyperplasie und Hypergammaglobulinämie. In

diesen Mäusen konnte außerdem ein erhöhter Anteil von CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen und Treg identifiziert werden (Groom et al., 2007; Mackay und Leung, 2006; Mackay et al., 2003). Die prinzipielle B-Zell-Entwicklung aus den Vorläuferzellen im Knochenmark unterliegt nicht dem Einfluss von BAFF (Mackay et al., 2003; Schneider, 2005; Thien et al., 2004). Allerdings hat BAFF eine entscheidende protegierende Wirkung auf das Überleben, die Reifung und die Differenzierung peripherer B-Zellen. Eine direkte, induzierende Wirkung auf die Proliferation dieser Zellen konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden. BAFF ist ein potenter Kostimulator für B- und T-Zellen, erhöht die Expression von CD25 auf T-Zellen, unterstützt die Keimzentrenformation und Antikörperproduktion, verhindert die Apoptose bei B- und T-Zellen durch die Erhöhung der Expression antiapoptotischer Moleküle wie Bcl<sub>2</sub>, Bcl<sub>XL</sub> und Mcl-1 und die Reduktion der proapoptotischen Moleküle Bak, Blk und Bim, induziert den Antikörper-Klassenwechsel von IgM zu hauptsächlich IgG1 und IgA und steigert die Funktion des B-Zell-Korezeptor-Komplexes durch Induktion der CD21-Expression und CD19-Phosphorylierung (Bossen und Schneider, 2006; Huard et al., 2004; Mackay et al., 2003; Schneider, 2005; Sutherland et al., 2006; Tangye et al., 2006). Die komplette Eliminierung von BAFF führt zu einem >90%igem Verlust der reifen peripheren B-Zellen (Bossen und Schneider, 2006). Neben den beschriebenen zahlreichen Funktionen von BAFF bei der adaptiven Immunantwort, konnte zusätzlich ein direkter Einfluss dieses Mediators auf die angeborene Immunität nachgewiesen werden. BAFF fördert das Überleben und die Aktivierung humaner Monozyten, resultierend in einer gesteigerten Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ) und einer erhöhten Expression kostimulatorischer Moleküle (CD40, CD80), sowie deren Entwicklung zu CD14<sup>++</sup>CD1a<sup>-</sup> Makrophagen (Chang et al., 2006).

#### APRIL

APRIL (*a proliferation-inducing ligand*; CD256) ist ein Molekül mit kostimulatorischer Potenz, das ausschließlich in löslicher Form existiert. Primäre Quellen dieses Mediators sind Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, Osteoklasten und Tumorzellen, wobei APRIL vor allem bei verschiedenen malignen Erkrankungen (Non-Hodgkin-Lymphom, chronisch lymphatische B-Zell-Leukämie) und einigen Autoimmunerkrankungen (SLE, RA, pSS) überexprimiert wird (Dillon et al., 2006; Stohl und Looney, 2006). APRIL und BAFF fördern die Generierung von Plasmablasten und PZ aus humanen Gedächtnis-B-Zellen. Es konnte jedoch bisher nicht geklärt werden, welcher der beiden Faktoren die entscheidende Bedeutung für das Überleben von PZ hat (Benson et al., 2008; Dillon et al., 2006).

Untersuchungen im Mausmodell ergaben, dass die Hemmung von BAFF und APRIL im Gegensatz zur alleinigen Inhibition von BAFF das Überleben und/oder die Migration von neugebildeten PZ im/zum Knochenmark verhindert. Diese Resultate unterstreichen die wichtige Funktion von APRIL in diesem Prozess (Ingold et al., 2005). APRIL induziert die Expression antiapoptotischer Moleküle und erhöht dadurch hauptsächlich das Wachstum und Überleben maligner Zellen in Tumorerkrankungen (Dillon et al., 2006; Mackay et al., 2003). APRIL-transgene Mäuse zeigen eine erhöhte T-Zell-Proliferation, bedingt durch einen gesteigerten Zell-Zyklus, eine erhöhte Expression des antiapoptotischen Moleküls Bcl<sub>2</sub> in T-Zellen, und

zusätzlich eine erhöhte IgM-Produktion. Der Antikörper-Klassenwechsel und das Überleben reifer B-Lymphozyten werden von APRIL nicht beeinflusst (Medema et al., 2003).

#### BAFF/APRIL-Heterotrimere

BAFF und APRIL kommen hauptsächlich als homotrimere Strukturen vor, können aber biologisch aktive Heterotrimere bilden. Bisher konnte nicht identifiziert werden, ob es sich bei den gebildeten heterogenen Molekülen um Trimere aus einem BAFF- und zwei APRIL-Molekülen oder aus einem APRIL- und zwei BAFF-Molekülen handelt. BAFF/APRIL-Heterotrimere besitzen eine hohe kostimulatorische Potenz, die in *in vitro*-Versuchen derjenigen von BAFF-Homotrimeren gleicht. In den Seren von Patienten mit verschiedenen rheumatologischen Erkrankungen, einschließlich SLE, RA, Psoriasis-Arthropathie, Reiter-Krankheit, Spondylitis ankylosans und Polymyositis, konnten diese heterotrimeren Moleküle nachgewiesen werden (Roschke et al., 2002).

### **1.4.2. Rezeptoren B-Zell-aktivierender Faktoren**

BAFF und APRIL nutzen für ihre Signalleitung jeweils drei Rezeptoren. Beide Mediatoren vermitteln die zellulären Signale über BCMA (*B cell maturation antigen*) und TACI (*transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand (CAML) interactor*). BAFF bindet zusätzlich an den BAFF-Rezeptor (BAFF-R) und APRIL an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG).

#### BAFF-R

Der BAFF-R (BR3, CD268) bindet ausschließlich BAFF und wird von B-Zellen in Abhängigkeit vom Reifungs- und/oder Aktivierungsstatus in verschiedener Stärke exprimiert. Er ist der Hauptrezeptor auf reifen, peripheren naiven und Gedächtnis-B-Zellen in Blut, Milz und Lymphknoten, sowie auf tonsillären humanen B-Zellen (Ingold et al., 2005; Mackay et al., 2007; Ng et al., 2004; Sutherland et al., 2006). Weiterhin konnte dieser Rezeptor bisher auf der Oberfläche von aktivierten humanen und murinen T-Zellen, Gedächtnis-T-Zellen, murinen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg und humanen Plasmablasten nachgewiesen werden (Dillon et al., 2006; Schneider, 2005; Tangye et al., 2006). Die Bindung von BAFF an den BAFF-R führt zur Aktivierung des intrazellulären Transkriptionsfaktors NFκB. Nachfolgend werden antiapoptotisch wirksame Moleküle induziert und der programmierte Zelltod gehemmt. Folglich hat der BAFF-R eine entscheidende Bedeutung in der Vermittlung von Signalen, die das Überleben der Zellen sichern. Weiterhin vermittelt dieser Rezeptor Signale, die in der Kostimulation aktivierter T-Zellen, der Induktion des Immunglobulin-Klassenwechsels sowie in der IL-10-Produktion von B-Zellen resultieren (Bossen und Schneider, 2006; Mackay et al., 2003; Schneider und Tschopp, 2003; Tangye et al., 2006; Xu und Shu, 2002).

### TACI

TACI (CD267) wird von einigen CD20<sup>+</sup> B-Zellen (Marginalzonen-B-Zellen, aktivierten B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen), T-Zellen, Plasmablasten, CD138<sup>+</sup> PZ und aktivierten Monozyten/Makrophagen exprimiert (Chang et al., 2006; Mackay et al., 2007; Seyler et al., 2005; Tangye et al., 2006). TACI bindet BAFF und APRIL mit gleicher Affinität und ist der einzige Rezeptor der zusätzlich BAFF/APRIL-Heterotrimere binden kann (Roschke et al., 2002; Salzer et al., 2007). TACI besitzt eine entscheidende Bedeutung in der negativen Regulation der B-Zell-Homöostase (Mackay et al., 2003). Die Signalleitung über diesen Rezeptor resultiert einerseits in der Induktion proapoptotischer Signale, andererseits kann TACI von der Zelloberfläche abgespalten werden, wodurch es die löslichen BAFF-Moleküle im Serum abfängt und somit die BAFF-Bindung an membranständige Rezeptoren verhindert (Bossen und Schneider, 2006). TACI-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte B-Zell-Proliferation und B-Zell-Hyperplasie (Salzer et al., 2007; Schneider und Tschopp, 2003). Im Gegensatz dazu fördert TACI den Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgG1 und hauptsächlich zu IgA und hat somit eine positiv regulierende Wirkung auf die humorale Immunantwort v.a. gegenüber T-Zell-unabhängigen Antigenen (Castigli et al., 2005; Salzer et al., 2007; Sutherland et al., 2006; Tangye et al., 2006).

### BCMA

Die Expression von BCMA (CD269) ist auf reife CD19<sup>+</sup> B-Zellen (insbesondere der Keimzentren), Plasmablasten und PZ beschränkt. Zusätzlich exprimieren unreife B-Zellen im sehr frühen Entwicklungsstadium diesen Rezeptor. T-Zellen besitzen diesen Rezeptor nicht (Avery et al., 2003; Ingold et al., 2005; Mackay et al., 2007; Schneider, 2005; Sutherland et al., 2006). Die Bindung von BAFF oder APRIL an BCMA fördert die Expression von antiapoptotischen Molekülen, z.B. Bcl<sub>xL</sub> und Mcl-1, sowie die von HLA-Klasse II - Molekülen und kostimulatorischen Molekülen wie CD40, CD80 und CD86 auf der Zelloberfläche (Bossen und Schneider, 2006; Dillon et al., 2006; Sutherland et al., 2006; Tangye et al., 2006). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass BCMA eine entscheidende Bedeutung im Überleben von PZ durch Induktion des antiapoptotischen Moleküls Mcl-1 besitzt (O'Connor et al., 2004). BCMA-defiziente Mäuse zeigen keine Änderungen in der Größe des peripheren B-Zell-Pools oder in der Verteilung der verschiedenen B-Zell-Subpopulationen. Auch die Lebensspanne der B-Zellen und die humorale Immunantwort sind in diesen BCMA<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen unverändert. Dagegen weisen die Mäuse eine starke, etwa 80%ige Reduktion der Zahlen langlebiger PZ im Knochenmark auf (O'Connor et al., 2004; Xu und Lam, 2001). Diese Ergebnisse unterstreichen die außerordentliche Bedeutung dieses Rezeptors beim Überleben von PZ.

### Ursachen des heterogenen Bindungs-Verhaltens von BAFF und APRIL

Die Ursache für die sehr unterschiedliche Affinität von BAFF und APRIL zu den drei Rezeptoren, BAFF-R, TACI und BCMA, liegt im elektrostatischen Oberflächenpotential der Rezeptoren und Liganden begründet. Der BAFF-R weist ein elektrostatisches

Oberflächenpotential auf, welches von positiven Ladungen dominiert ist. BAFF besitzt an seiner Rezeptor-Bindungsstelle hauptsächlich negativ geladene Ionen, sodass es zu einer sehr stabilen Bindung zwischen BAFF und dem BAFF-R kommt. Da APRIL eine Dominanz an positiven Ladungen an seiner Rezeptor-Bindungsstelle zeigt, können APRIL und der BAFF-R nicht miteinander interagieren. TACI und BCMA besitzen ein gemischtes elektrostatisches Ladungsmuster, sodass sowohl BAFF als auch APRIL an diese beiden Rezeptoren binden können (Karpusas et al., 2002).

APRIL bindet zusätzlich zu TACI und BCMA an HSPG. Dabei ist eine zeitgleiche Interaktion von APRIL mit TACI/BCMA und HSPG möglich, da APRIL unterschiedliche Bindungsstellen für diese Moleküle aufweist. Eine parallele Interaktion von APRIL mit BCMA und TACI ist dagegen nicht möglich (Dillon et al., 2006; Hendriks et al., 2005; Ingold et al., 2005; Schneider, 2005).

### HSPG

HSPG wird auf aktivierten T-Zellen, PZ und Tumorzellen exprimiert. HSPG vermittelt die Bindung von APRIL an Tumorzellen und primäre lymphoide Zellen und ist essenziell für die APRIL-induzierte Tumorpheriferation. Die APRIL-vermittelte Kostimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen wird dagegen über TACI vermittelt (Hendriks et al., 2005; Ingold et al., 2005).

## **1.4.3. BAFF und APRIL in Autoimmunerkrankungen**

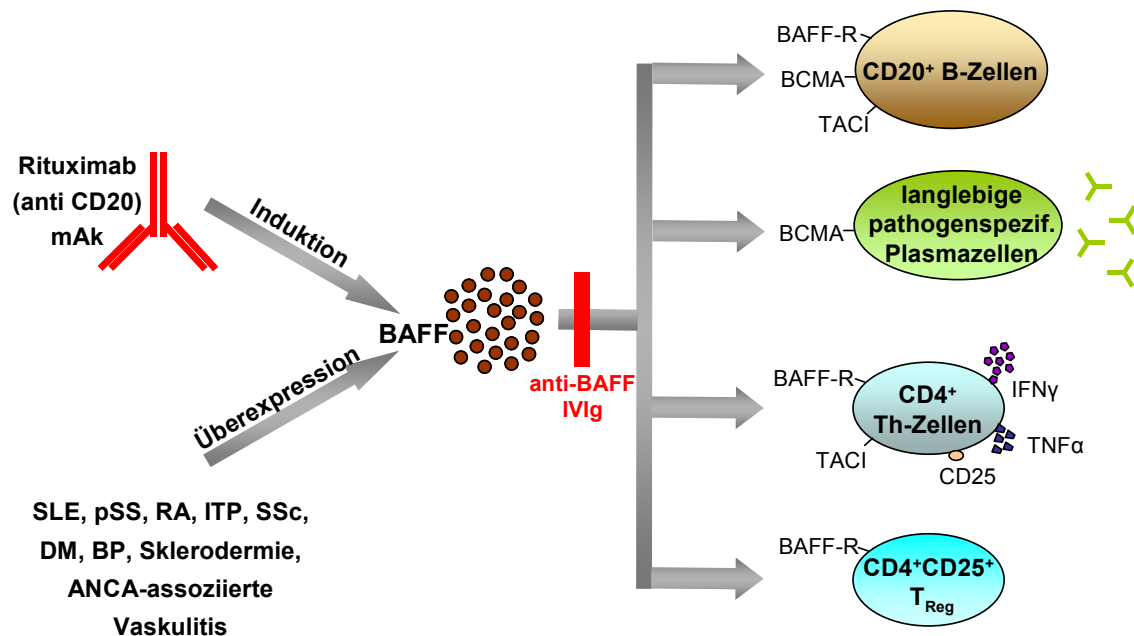
### Autoantikörpervermittelte Autoimmunerkrankungen

Bei zahlreichen antikörperassoziierten Autoimmunerkrankungen ist eine systemische und/oder lokale Überexpression von BAFF detektierbar (Abb. 11). Dazu gehören SLE, RA, pSS, systemische Sklerose (SSc), zirkumskripte Sklerodermie, Vaskulitiden, ITP, bullöses Pemphigoid und Dermatomyositis (Asashima et al., 2006; Emmerich et al., 2007; Jonsson et al., 2005; Krumbholz et al., 2005; Matsushita et al., 2007b; Matsushita et al., 2006; Pers et al., 2005; Sanders et al., 2006; Stohl et al., 2003; Vallerskog et al., 2006; Zhang et al., 2001). In diesem Zusammenhang konnte in Erkrankungen wie SLE, RA, pSS, SSc und Sklerodermie eine Korrelation der Serum-BAFF-Konzentration mit der Autoantikörperkonzentration im Serum und/oder der Krankheitsaktivität nachgewiesen werden (Matsushita et al., 2007b; Matsushita et al., 2006; Pers et al., 2005; Zhang et al., 2001). In den erkrankten Gewebearealen (z.B. in der Synovialflüssigkeit von RA- und SLE-Patienten oder in den fibrosierten Hautarealen der SSc-Patienten) ist die BAFF-Konzentration oftmals höher als im Serum, was auf die Mitwirkung dieses Mediators an der lokalen Pathogenese hinweist (Cheema et al., 2001; Matsushita et al., 2006).

APRIL wird bei einigen Autoimmunerkrankungen, wie SLE, pSS, RA, atopischem Ekzem und dem bullösen Pemphigoid, ebenfalls vermehrt exprimiert (Dillon et al., 2006; Matsushita et al., 2007b; Vallerskog et al., 2006; Watanabe et al., 2007).

### Pemphigus vulgaris

Beim PV konnte bisher keine erhöhte Expression von BAFF oder APRIL nachgewiesen werden. In drei unabhängigen Studien wurden die Konzentrationen von BAFF oder APRIL im Serum von unbehandelten PV-Patienten untersucht, wobei keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu gesunden Kontrollen detektiert werden konnten (Asashima et al., 2006; Matsushita et al., 2007b; Watanabe et al., 2007).



**Abb. 11: Die Wirkung von BAFF (*B cell activating factor*) auf verschiedene zelluläre Immunfunktionen.** BAFF wird in zahlreichen Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus Erythematoses (SLE), dem primären Sjögren Syndrom (pSS), der Rheumatoiden Arthritis (RA), der idiopathischen thrombozytopenischen Purpura (ITP), der systemischen Sklerose (SSc), der Dermatomyositis (DM), dem bullösen Pemphigoid (BP), der zirkumskripten Sklerodermie und verschiedenen ANCA (antineutrophile zytoplasmatische Antikörper) – assoziierten Vaskulitiden überexprimiert. Zusätzlich fördert die Rituximab-induzierte B-Zell-Depletion die Bildung und Freisetzung von BAFF. Nach Bindung an seine Rezeptoren, BAFF-R, BCMA und TACI, welche von den verschiedensten Lymphozyten exprimiert werden, übt BAFF eine zentrale Rolle in der Immunregulation aus. Es hat einen protektierenden Effekt auf die Neubildung von B-Zellen und das Überleben von B-Zellen und Plasmazellen. Zusätzlich fördert BAFF die Expression von CD25 auf der Zelloberfläche von CD4<sup>+</sup> T-Helfer (Th)-Zellen und deren TNFα- und IFNγ-Produktion (Huard et al., 2001). Auch die Proliferation und das Überleben von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (T<sub>Reg</sub>) wird begünstigt (Schneider, 2005; Ye et al., 2004). Die therapeutische Applikation von BAFF-Antagonisten oder intravenösen Immunglobulinen (IVIg) beeinträchtigt diese immunregulatorischen Wirkungen von BAFF.

### Effekt von Rituximab auf BAFF und APRIL in Autoimmunerkrankungen

Die Rituximab-vermittelte B-Zell-Depletion hat einen ausgeprägten Effekt auf die BAFF-Produktion (Abb. 11). In verschiedenen Untersuchungen konnten starke Erhöhungen der BAFF-Serumkonzentration nach B-Zell-depletierender Therapie bei SLE-, RA- oder pSS-Patienten gezeigt werden (Seror et al., 2007; Stohl et al., 2003; Vallerskog et al., 2006). Grund dafür ist zum einen eine kumulative Erhöhung von BAFF im Serum der Patienten, aufgrund des verringerten Verbrauchs durch BAFF-R<sup>+</sup> B-Zellen. Zum anderen erfolgt zusätzlich eine positive transkriptionelle Regulation von BAFF in PBMC, die sich in einer vermehrten mRNA- und Proteinproduktion von BAFF manifestiert (Lavie et al., 2007). Mit Wiederherstellung der

peripheren, vor Rituximab-Therapie detektierten, B-Zell-Frequenzen fiel auch die BAFF-Konzentration im Serum der Patienten auf den ursprünglichen Ausgangswert ab (Vallerskog et al., 2006). APRIL blieb in den bisherigen Studien von der B-Zell-Depletion unbeeinflusst oder sank nach Depletion sogar geringfügig ab (Vallerskog et al., 2006).

#### 1.4.4. Therapeutische Manipulation der B-Zell-Homöostase

Der bereits geschilderte Zusammenhang zwischen erhöhten BAFF-Serumkonzentrationen und der Forcierung autoreaktiver B-Zellen in zahlreichen Autoimmunerkrankungen führte zur Entwicklung zahlreicher BAFF-Antagonisten, die derzeit in Tiermodellen und klinischen Prüfungen auf ihren möglichen therapeutischen Einsatz getestet werden.

##### Tiermodelle

In einem murinen SLE-Modell (NZB/NZW F1) wurde die selektive BAFF-Blockade mittels BAFF-R-Ig im Vergleich zur nicht-selektiven BAFF-Blockade mittels TACI-Ig untersucht. Die Gabe beider Antikörper führte zu einem verzögerten Krankheitsbeginn und einem im Vergleich zu unbehandelten Mäusen milderen Krankheitsverlauf. Diese klinische Beobachtung war mit einer verminderten Zahl an Follikel-, Marginalzonen- und aktivierten B-Zellen in der Milz assoziiert. Die Zahl der PZ in Milz und Knochenmark wurde durch die Behandlung der Mäuse mit TACI-Ig, jedoch nicht durch eine selektive BAFF-Blockade, reduziert (Ramanujam et al., 2006). Die exklusive Behandlung von hCD20-transgenen Mäusen mit BR3-Fc, einem löslichen Fusionsprotein aus humanem BR3 und dem Fc-Teil von humanem IgG1, resultierte in einer starken Verminderung, jedoch keiner vollständigen Depletion, der Marginalzonen- und folliculären B-Zellen in der Milz. Die ausschließliche Behandlung dieser Mäuse mit einem depletierenden, humanisierten anti-hCD20 Antikörper führte ebenfalls zu einer unvollständigen Depletion der B-Zellen, vor allem der Marginalzonen-B-Zellen, in der Milz. Dagegen resultierte eine Kombinationsbehandlung aus BR3-Fc und anti-hCD20 mAk in einer kompletten Eliminierung aller B-Zellen in der Milz. Die Kombinationsbehandlung aus Rituximab und BAFF-Antagonisten stellt folglich eine vielversprechende therapeutische Möglichkeit in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen dar, da eine vollständige periphere B-Zell-Depletion, einschließlich der nach Behandlung mit dem anti-CD20 mAk eventuell in den sekundären lymphatischen Organen überlebenden, residenten autoreaktiven B-Zellen, erreicht wird (Gong et al., 2005). Untersuchungen im Mausmodell der SSc (TSK/+) zeigten nach Behandlung mit BAFF-R-Ig ebenfalls eine Hemmung der Krankheitsentwicklung sowie eine Verminderung der Hypergammaglobulinämie und der Autoantikörperproduktion. Die Zahl der B-Zellen in der Milz wurde um ~75% reduziert und die lokale proinflammatorische Zytokinproduktion (IL-6 und IL-10) in der Haut der Mäuse supprimiert (Matsushita et al., 2007a).

Der Einsatz von Belimumab, einem humanen monoklonalen anti-BAFF IgG1-Antikörper, oder BR3-Fc in der Behandlung von Rhesusaffen verminderte die Zahlen peripherer B-Zellen im Blut und den sekundären lymphatischen Organen innerhalb eines 13-wöchigen Behandlungszeitraums um etwa 50%. PZ im Gewebe bzw. periphere CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen



sowie NK-Zellen im Blut blieben von der Behandlung unbeeinflusst (Halpern et al., 2006; Vugmeyster et al., 2006).

### Klinische Prüfung

Derzeit befinden sich verschiedene BAFF-Antagonisten, einschließlich Belimumab (Lymphostat-B), TACI-Ig (Atacicept), BR3-Fc und AMG 623, in klinischen Studien (Stohl und Looney, 2006).

Belimumab zeigte in den bisherigen Untersuchungen sehr gute klinische Erfolge bei der Behandlung von SLE- und RA-Patienten. Dieser Antikörper befindet sich derzeit in klinischen Studien der Phase II (Dillon et al., 2006). In einer randomisierten Doppelblindstudie mit 449 SLE-Patienten konnte eine signifikante Reduktion der anti-dsDNA Autoantikörper, verbunden mit einer klinischen Besserung, die sich in der Reduktion des Krankheitsscores (SLEDAI (*SLE disease activity index*)) und der Normalisierung der bestehenden Hypergammaglobulinämie widerspiegelte, detektiert werden (Chatham et al., 2008; Ginzler et al., 2008). Weiterhin wurde eine Reduktion der Anzahl peripherer B-Zellen im Blut der Patienten nachgewiesen, die sich besonders stark in der Verminderung der CD69<sup>+</sup> aktivierten B-Lymphozyten manifestierte (Stohl et al., 2006).

Atacicept (TACI-Ig), ein rekombinantes humanes Fusionsprotein, befindet sich derzeit in der Prüfung durch Phase I-Studien beim SLE. Es konnte in bisherigen Untersuchungen eine dosisabhängige Reduktion der Antikörpertiter, der allgemeinen B-Zell-Frequenzen und der Frequenzen reifer B-Zellen nachgewiesen werden. Die Zahlen peripherer T-Zellen, Monozyten und NK-Zellen blieben von der Therapie unbeeinflusst (Dall'Era et al., 2007).

Weitere Phase I-Studien mit AMG 623, einem aus dem Fc-Teil von IgG und peptidspezifischen Sequenzen von BAFF bestehenden Fusionsprotein, und BR3-Fc werden derzeit bei RA- und SLE-Patienten durchgeführt (Dillon et al., 2006).

IVIg, welches für die Behandlung zahlreicher Autoimmunerkrankungen bereits zugelassen ist, erzielt seine guten therapeutischen Erfolge in diesen Erkrankungen möglicherweise ebenfalls durch die Hemmung von BAFF und/oder APRIL. In kürzlich durchgeführten Untersuchungen konnten in zwei analysierten IVIg-Präparationen anti-BAFF und anti-APRIL Antikörper nachgewiesen werden. Diese Antikörper neutralisieren nach Verabreichung von IVIg wahrscheinlich BAFF und APRIL im Serum der Patienten und reduzieren somit das BAFF-vermittelte gesteigerte Überleben von B-Lymphozyten, insbesondere von autoreaktiven B-Zellen (Le Pottier et al., 2007).

Die möglichen Auswirkung der Verabreichung BAFF-Antagonisten und/oder IVIg auf die Immunregulation sind in Abb. 11 zusammenfassend dargestellt.

## 2. Material

### 2.1. Patientenmaterial

Vollblut	Patienten der Universitätsklinik für Dermatologie und Allergologie Marburg; Patienten der Klinik für Dermatologie, Klinikum Nord, Nürnberg; Patienten der Universitätsklinik für Dermatologie Freiburg
----------	--

### 2.2. Lösungen und Zusätze für die Kultivierung humaner Zellen

L-Glutamin 200mM mit Penicillin-Streptomycin 10000U/ml-10000µg/ml	PAA, Cölbe
gepooltes humanes Serum (PHS), Typ AB	PAA, Cölbe
rekombinantes PVhis	AG Hertl, Dermatologische Forschung, Klinik für Dermatologie und Allergologie Marburg
RPMI 1640 Medium, ohne L-Glutamin	Lonza, Vervies, Belgien
Tetanus Toxoid (TT)	Sigma, Schnelldorf
Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)	Sigma, Taufkirchen

### 2.3. Chemikalien

Dulbecco's PBS 1x (w/o Ca <sup>2+</sup> +Mg <sup>2+</sup> )	PAA, Cölbe
FACS <i>Clean</i>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACS <i>Flow</i>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACS <i>Rinse</i>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Lymphoprep <sup>®</sup>	Axis Shield PoC AS, Oslo, Norwegen
Pancoll <sup>®</sup>	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Rinderalbumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma, Steinheim
Ziegenserum	PAA, Cölbe

## 2.4. Puffer und Kulturmedien

Puffer/Medien	Zusammensetzung
MACS – Puffer	Dulbecco´s 1xPBS + 0,5% BSA + 2mM EDTA → sterilfiltrieren mittels Stericup 0,22µm (Millipore) → Lagerung bei 4°C
FACS – Puffer	Dulbecco´s 1xPBS + 1% BSA + 0,1% Natriumazid → sterilfiltrieren mittels Stericup 0,22µm (Millipore) → Lagerung bei 4°C
RPMI <sup>++</sup>	RPMI 1640 + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 2mM L-Glutamin
RPMI <sup>++</sup> 10% PHS	RPMI 1640 + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 2mM L-Glutamin + 10% PHS

## 2.5. Antikörper

Schaf anti-human IgG1, IgG4, HRP-konjugiert

The Binding Site, Schwetzingen

Maus anti-human CD3 APC

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Maus anti-human CD20 FITC

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Isotyp-Kontrolle, Maus IgG1 APC

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Isotyp-Kontrolle, Maus IgG2b FITC

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

## 2.6. Kommerzielle Tests für die serologische und zelluläre Diagnostik

APRIL ELISA, human

Bender MedSystems, Wien, Österreich

BAFF ELISA, human, Quantikine®

R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

DuoSet IL-10 ELISA, human

R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

MESACUP Desmoglein Test "Dsg3" bzw. "Dsg1"

MBL, Naka-ku, Nagoya, Japan

OptEIA IL-4 ELISA, human  
 OptEIA IFN $\gamma$  ELISA, human  
 MACS<sup>®</sup> Zytokin-Sekretions-Test  
     IFN $\gamma$  Zell-Anreicherungs- und -Detektions-Kit  
     IL-4 Zell-Anreicherungs- und -Detektions-Kit  
     IL-10 Zell-Anreicherungs- und -Detektions-Kit

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg  
 Becton Dickinson GmbH, Heidelberg  
 Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

## 2.7. Verbrauchsartikel

Combitips 5ml, unsteril  
 Combitips 5ml, steril  
 Deckgläschen für Zählkammer, 20x26mm  
 FACS-Röhrchen (Polystyren-Röhrchen 5ml)  
 MACS<sup>®</sup>, MS Säulen  
 Millex<sup>®</sup>-Sterilfilter, Porengröße 0,22  $\mu$ m  
 Monovette<sup>®</sup> (CPDA)  
 Monovette<sup>®</sup> (EDTA)  
 Monovette<sup>®</sup> (Serum-Gel)  
 Pasteurpipetten Glas  
  
 Pipettenspitzen  
 Reaktionsgefäße 1,5ml  
 Stericup 250ml, 500ml - 0,22 $\mu$ m  
 sterile Einweg-Pipetten 1ml - 50ml  
 sterile 6-*well* (Loch)-Platten  
 sterile 24-*well* (Loch)-Platten  
 sterile 48-*well* (Loch)-Platten  
 sterile Einfrier-Röhrchen (Cryo's) 2ml  
 Zentrifugen-Röhrchen 15 und 50ml

Eppendorf, Hamburg  
 Eppendorf, Hamburg  
 Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig  
 Becton Dickinson GmbH, Heidelberg  
 Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach  
 Millipore GmbH, Schwalbach  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co  
 KG, Eberstadt  
 Kalensee, Gießen  
 Eppendorf, Hamburg  
 Millipore GmbH, Schwalbach  
 Greiner, Frickenhausen  
 Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden  
 Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden  
 Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden  
 Greiner, Frickenhausen  
 Greiner, Frickenhausen

## 2.8. Geräte

Analysenwaage 770  
  
 Auflicht-Mikroskop Axiostar  
  
 CO<sub>2</sub>-Inkubator, HERA cell 150  
  
 Durchflusszytometer FACSCalibur  
 Invertoskop ID03 (inverses Mikroskop)

Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen-  
 Frommern  
 Carl Zeiss MicroImaging GmbH,  
 Göttingen  
 Heraeus Kendro Laboratory Products  
 GmbH, Langenselbold  
 Becton Dickinson GmbH, Heidelberg  
 Carl Zeiss MicroImaging GmbH,  
 Göttingen

Kühlzentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Magnetrührer IKAMAG <sup>®</sup> RET	IKA Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipette Discovery 20-200µl	ABIMED, Langenfeld
MiniMACS <sup>®</sup> Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Multipette <sup>®</sup> plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Paul-Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen
Pipettierhilfe BD Falcon <sup>™</sup> Express <sup>™</sup>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Pipetten 10µl, 100µl, 200µl, 250µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage 440-49N	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen- Frommern
Reagenz-Reservoir	Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden
Sterilbank, HERAsafe	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Tecan Sunrise Platten-Lesegerät (ELISA-Reader)	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Vortexmixer IKA <sup>®</sup> Genius 3	IKA Labortechnik, Staufen

## 2.9. Software

Endnote 9.0	Thomson ResearchSoft, USA
Magellan V6.1	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Microsoft <sup>®</sup> Excel	Microsoft, USA
Microsoft <sup>®</sup> Word	Microsoft, USA
Microsoft <sup>®</sup> PowerPoint	Microsoft, USA
SPSS <sup>®</sup> 12.0	SPSS inc., USA
Photohop 6.0	Adobe Systems, Irland
Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry (WinMDI 2.8)	Joe Trotter, USA

## 3. Methoden

### 3.1. Patienten und Einschlusskriterien

Die Diagnose der Autoimmunerkrankung PV wurde bei allen Patienten anhand folgender diagnostischer Kriterien gestellt:

- 1) Klinisches Bild: schlaffe Blasen und Erosionen der Haut und/oder Schleimhäute
- 2) Histopathologie: nachweisbare intraepidermale Akantholyse
- 3) Immunfluoreszenz: DIF der periläsionalen Hautbiopsien und/oder IIF mittels Affen-ösophagus, welche epidermale interzelluläre Ablagerungen von IgG (DIF und IIF) und Komplementfaktor C3 (DIF) zeigen
- 4) Serologie: Nachweis von Dsg3- +/- Dsg1-spezifischen IgG-Autoantikörpern im Serum der Patienten mittels ELISA.

#### 3.1.1. Patienten der Studie: Der Einfluss von Rituximab auf die zelluläre Autoimmunantwort beim PV

In die vorliegende Studie wurden zwölf PV-Patienten (fünf Männer, sieben Frauen, Durchschnittsalter:  $48 \pm 16$  Jahre) eingeschlossen. Eine genaue Charakteristik der Patienten vor Beginn der Behandlung mit dem B-Zell-depletierenden Medikament Rituximab (MabThera<sup>®</sup>, Roche), ist in Tabelle 1 (siehe Anhang) zusammengefasst. Es wurden, wie für die B-Zell-depletierende Behandlung blasenbildender Autoimmundermatosen empfohlen (Hertl et al., 2008), ausschließlich Patienten in die Studie inkludiert, die ein schweres Erkrankungsbild aufwiesen, welches durch erosive/blasige Veränderungen von mindestens 30% der KOF und/oder 25% der oralen/genitalen Mukosa definiert ist. Zusätzlich zeigten die Patienten auch nach mindestens dreimonatigem Einsatz einer systemischen immunsuppressiven Therapie, einschließlich hochdosierter Glukokortikoide und mindestens eines adjuvanten immunsuppressiven Medikaments, keine signifikante klinische Besserung.

Vor Behandlung mit dem anti-CD20 mAk Rituximab befanden sich alle PV-Patienten unter immunsuppressiver Therapie mit Prednisolon (initale Dosis: 0,5 – 1,0 mg/kg/Tag) und AZA (1,5 – 2,5 mg/kg/Tag, bei gesicherter normaler TPMT-Aktivität) oder MMF (2-3 g/Tag). Die intravenöse Verabreichung von Rituximab ( $375 \text{ mg/m}^2$  KOF; MabThera<sup>®</sup>, Roche) wurde in wöchentlichen Abständen an den Tagen 1, 8, 15 und 22 als adjuvante Behandlung vorgenommen. Parallel zur klinischen Besserung erfolgte eine logarithmische Reduktion (anfängliche schnelle Dosis-Senkung, gefolgt von einer langsamen Verminderung der Erhaltungsdosis im weiteren Verlauf) der Prednisolondosis, wobei die Behandlung mit AZA bzw. MMF für weitere sechs Monate nach dem Absetzen des Prednisolons beibehalten wurde.

Die serologischen und zellulären Blut-Untersuchungen erfolgten zu folgenden Zeitpunkten: vor Rituximab-Therapie (Tag 0) und 1 (Tag 60), 3 (Tag 120), 6 (Tag 210) und 12 (Tag 390) Monate nach der letzten Rituximab-Infusion.

Jeder Patient gab vor Einschluss in die Studie sein schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an den wissenschaftlichen Untersuchungen, welche von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg genehmigt wurden.

### **3.1.2. Patienten der Studie: Der Einfluss von Rituximab auf die humorale Immunantwort beim PV**

Eine Kohorte von 19 PV-Patienten (8 Männer, 11 Frauen, Durchschnittsalter: 53±19 Jahre) wurde für die serologischen Untersuchung der B-Zell-aktivierenden Faktoren herangezogen (Patientencharakteristik siehe Tabelle 2 - Anhang). Anhand ihres Behandlungsschemas wurden die Patienten in drei Gruppen unterteilt:

- Gruppe I: Patienten mit immunsuppressiver Behandlung
- Gruppe II: Patienten mit immunsuppressiver Behandlung und adjuvanter Immunadsorption
- Gruppe III: Patienten mit immunsuppressiver Behandlung und adjuvanter Rituximab-Behandlung.

Alle Patienten, die aufgrund des Versagens der immunsuppressiven Therapie eine zusätzliche adjuvante Behandlung mit IA bzw. Rituximab erhielten, zeigten trotz hochdosierten, systemischen, immunsuppressiven Medikamenten in einem mindestens dreimonatigen therapeutischen Einsatz einen therapieresistenten Krankheitsverlauf. Das klinische Ansprechen während des Beobachtungszeitraums (Tabelle 2, siehe Anhang) wurde, wie für Pemphiguserkrankungen empfohlen (Murrell et al., 2008), folgendermaßen definiert: i) partielle Remission: das transiente Auftreten neuer Läsionen, die unter weiterführender immunsuppressiver Therapie innerhalb einer Woche abheilen; ii) komplette Remission: die Abwesenheit ehemals bestehender/neuer Läsionen unter immunsuppressiver Erhaltungstherapie; iii) komplette Remission ohne Therapie: die mindestens zweimonatige Abwesenheit bestehender/neuer Läsionen ohne jegliche systemische immunsuppressive Therapie (Murrell et al., 2008). Jeder Patient gab vor Einschluss in die Studie sein schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an den wissenschaftlichen Untersuchungen, welche von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg genehmigt wurden. Die Kontrollgruppe setzte sich aus den Seren von 15 gesunden Probanden zusammen.

#### Gruppe I: Patienten mit immunsuppressiver Behandlung (IS)

Fünf PV-Patienten (ein Mann, vier Frauen, Durchschnittsalter: 53±26 Jahre) wurden ausschließlich mit immunsuppressiven Medikamenten, d.h. Prednisolon (initiale Dosis: 0,5 – 1,0 mg/kg/Tag) und AZA (1,5 – 2,5 mg/kg/Tag, bei gesicherter normaler TPMT-Aktivität) bzw. MMF (2-3 g/Tag) behandelt. In Abhängigkeit vom klinischen Ansprechen auf diese Therapie wurde die Prednisolon-Dosis stufenweise reduziert (Tabelle 2a, siehe Anhang).

Gruppe II: Patienten mit IS und adjuvanter Immunadsorption (IA)

Sechs PV-Patienten (zwei Männer, vier Frauen, Durchschnittsalter: 52±18 Jahre), die therapieresistent auf eine systemische immunsupprimierende Behandlung reagierten, erhielten adjuvant einen Behandlungszyklus IA. Dieser umfasste IA-Behandlungen an vier aufeinanderfolgenden Tagen unter Fortsetzung der systemischen immunsuppressiven Behandlung mit Prednisolon (initiale Dosierung: 0,5 – 1,0 mg/kg/Tag) in Kombination mit AZA (1,5 – 2,5 mg/kg/Tag) bzw. MMF (2-3 g/Tag) (Tabelle 2b, siehe Anhang) (Eming und Hertl, 2006; Eming et al., 2006).

Gruppe III: Patienten mit IS und adjuvanter Rituximab-Behandlung (Rtx)

Die in diese Gruppe eingeschlossen PV-Patienten (sechs Männer, fünf Frauen, Durchschnittsalter: 52±17 Jahre) zeigten einen schweren Krankheitsverlauf, wobei mindestens 30% der KOF und/oder 25% der oralen/genitalen Mukosa von der Blasenbildung betroffen waren (Tabelle 2c, siehe Anhang). Des weiteren zeigten diese Patienten kein klinisches Ansprechen auf eine systemische immunsuppressive Therapie von mindestens drei Monaten Dauer. Drei der elf Patienten erhielten zusätzlich einen Behandlungszyklus IA vor Rituximab-Behandlung, der jedoch ebenfalls zu keiner langanhaltenden klinischen Besserung führte. Rituximab (375mg/m<sup>2</sup> KOF; MabThera®, Roche) wurde an den Tagen 1, 8, 15 und 22 intravenös verabreicht. Die Begleittherapie bestand aus immunsuppressiver Medikation (systemische Gabe von Prednisolon (initiale Dosis: 0,5 – 1,0 mg/kg/Tag) und AZA (1,5 – 2,5 mg/kg/Tag) bzw. MMF (2-3 g/Tag) ). Es erfolgte eine logarithmische Reduktion der Prednisolon-Dosis im Einklang mit der Besserung des klinischen Erscheinungsbildes der Patienten, wobei die Behandlung mit AZA bzw. MMF nach Beendigung der Steroidmedikation für weitere sechs Monate beibehalten wurde.

Die Analyse der verschiedenen Parameter im Serum der Patienten erfolgte zu definierten Zeitpunkten in Abhängigkeit vom eingesetzten Therapieschema:

- Gruppe I: vor immunsuppressiver Behandlung (Tag 0) sowie 1 (Tag 30), 3 (Tag 90) und 6 (Tag 180) Monate nach Therapiebeginn.
- Gruppe II: zu Beginn der IA (Tag 1) und unmittelbar nach Abschluss des Behandlungszyklus (Tag 4), sowie 1 (Tag 30) und 3 (Tag 90) Monate später.
- Gruppe III: vor Rituximab-Therapie (Tag 0) und 1 (Tag 60), 3 (Tag 120), 6 (Tag 210) und 12 (Tag 390) Monate nach der letzten Rituximab-Infusion.

### 3.2. Klinische Evaluation

Die Objektivierung der Krankheitsaktivität der PV-Patienten wurde mittels eines kürzlich entwickelten Krankheits-Scores (*autoimmune bullous skin disease intensity score*, ABSIS) vorgenommen (Pfütze et al., 2007). Dieser Score besteht aus einem Haut-Score und einem Schleimhaut-Score. Der Haut-Score quantifiziert die prozentual betroffene KOF nach der sogenannten „Neuner-Regel“ und multipliziert diesen Wert mit einem Wichtungsfaktor je nach



Qualität der Hautveränderungen (exsudativ, trocken oder reepithelialisiert). Der Schleimhaut-Score wird unterteilt, wobei der Schleimhaut-Score I das Auftreten von Erosionen und/oder Blasen an elf definierten anatomischen Arealen im Bereich der Mundhöhle quantifiziert und der Schleimhaut-Score II das subjektive Krankheitsempfinden der Patienten widerspiegelt (Pfütze et al., 2007). Für die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen wurden ausschließlich der Haut-Score und der Schleimhaut-Score I verwendet.

### **3.3. Serologische Diagnostik**

#### **3.3.1. Dsg1- und Dsg3-spezifische Autoantikörper**

Die Seren der Patienten wurden zu definierten Zeitpunkten der Behandlung mittels ELISA (Mesacup Desmoglein-Test, MBL, Naka-ku, Nagoya, Japan) auf das Vorliegen von anti-Dsg1-/Dsg3-IgG untersucht. Die Durchführung des Tests erfolgte nach Hersteller-Angaben. Die Konzentration der Autoantikörper wurde in U/ml angegeben, wobei die Nachweisgrenze bei 5 U/ml liegt und Ergebnisse von >20 U/ml als positiv gewertet werden.

Zur Ermittlung der Dsg3-spezifischen Antikörper-Subklassen IgG1 und IgG4 wurde der Dsg3-IgG ELISA (Mesacup Desmoglein-Test, MBL, Naka-ku, Nagoya, Japan) modifiziert, wobei als sekundärer Antikörper ein Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierter Schaf anti-human IgG1- bzw. IgG4-Antikörper (The Binding Site) in einer Verdünnung von 1:20000 eingesetzt wurde. Die Dsg3-spezifischen IgG1- und IgG4-Antikörpertiter wurden als bei einer Wellenlänge von 450nm gemessene optische Dichte (OD) dargestellt.

#### **3.3.2. Pathogenspezifische Antikörper**

Die Bestimmung der pathogenspezifischen Antikörper im Patientenserum wurde mittels ELISA am Institut für Virologie der Universitätsklinik Marburg durchgeführt. Es wurden Chlostridium tetani –, Varizella-Zoster-Virus – und Epstein-Barr-Virus (Virus Kapsid Antigen) – spezifisches IgG bestimmt.

#### **3.3.3. B-Zell-aktivierende Faktoren**

Der Serum-Gehalt an den B-Zell-aktivierenden Faktoren BAFF und APRIL wurde mittels ELISA bestimmt. Dabei wurde die Durchführung laut Anweisungen des jeweiligen Herstellers vorgenommen. Die Nachweisgrenze des BAFF-ELISAs (R&D Systems) lag laut Firmenangaben bei 3,38 pg/ml, die des APRIL-ELISAs (Bender MedSystems) bei 0,4 ng/ml.

### 3.3.4. Zytokine

Die Bestimmung der Zytokinkonzentration von IFN $\gamma$ , IL-4 und IL-10 im Serum der Patienten wurde ebenfalls nach Instruktionen des Herstellers mittels ELISA durchgeführt. Dabei erfolgte die Daten-Ermittlung bei neun PV-Patienten vor Behandlung mit Rituximab (Tag 0) und sechs Monate (Tag 210) nach der letzten Rituximab-Infusion. Die Kontrollgruppe bestand aus den Seren von 19 gesunden Probanden.

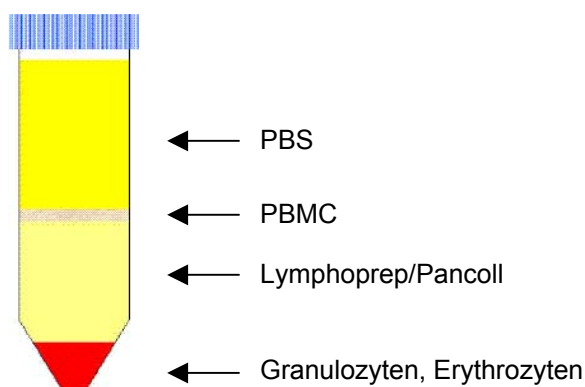
## 3.4. Zelluläre Diagnostik

### 3.4.1. HLA-Typisierung

Die HLA-Klasse II - Typisierung der untersuchten PV-Patienten wurde von Prof. Dr. Ralf Waßmuth, Universitätsklinikum Dresden, vorgenommen. Die Analyse erfolgte aus EDTA (Ethylendiamintetraazetat) – Vollblut mittels eines DNS-Hybridisierungs-Verfahrens.

### 3.4.2. Zellseparation

Die Isolation der PBMC aus CPDA (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin)-versetztem Vollblut erfolgte mittels Dichtegradienten-Zentrifugation. Die eingesetzten Ficoll-Hypaque-haltigen gebrauchsfertigen Lösungen Lymphoprep<sup>®</sup> und Pancoll<sup>®</sup> haben eine Dichte von 1,077 g/cm<sup>3</sup> und besitzen daher eine größere Dichte als Lymphozyten (1,070 g/cm<sup>3</sup>), Monozyten (1,065 g/cm<sup>3</sup>) und Thrombozyten (1,058 g/cm<sup>3</sup>), aber eine geringere Dichte als Erythrozyten (1,100 g/cm<sup>3</sup>) und die meisten Granulozyten (1,079-1,092 g/cm<sup>3</sup>). Das Polymer Ficoll bewirkt zusätzlich eine Vernetzung der Erythrozyten und beschleunigt somit deren Sedimentation, sodass nach erfolgter Dichtegradienten-Zentrifugation ein klassisches Verteilungsmuster der Zellen entsteht:



(modifiziert nach Tripmacher, 2005)

#### Durchführung:

Nach Zentrifugation des CPDA-Blutes der Patienten (1200rpm (350xg), 8min, 4°C), wurde das Blut-Plasma abgenommen und die zellulären Blutbestandteile im Verhältnis 1:2 mit einer

phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) verdünnt. Anschließend erfolgte eine vorsichtige Überschichtung der Ficoll-haltigen Lösung mit dieser Zellsuspension (Mischungsverhältnis 1:2) und nachfolgend eine 30-minütige Zentrifugation der Röhrchen bei 1500rpm (450xg), 20°C. Die Schicht der PBMC wurde mittels einer Glas-Pasteurpipette in ein 40ml PBS enthaltene Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert (1800rpm (550xg), 8min, 4°C). Dieser Waschschrift wurde wiederholt, wobei der Zentrifugationsschritt bei 1200rpm (350xg) erfolgte. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium (RPMI<sup>++</sup>) überführt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

### 3.4.3. Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der lebenden Zellen innerhalb der Suspension (Kulturmedium) wurde standardmäßig in der Neubauer-Zählkammer mittels Trypanblau-Färbung durchgeführt. Die Trypanblau-Lösung (0,4%ig) enthält Farbstoff-Anionen, die an zytosolische Proteine binden, wodurch tote Zellen bei der lichtmikroskopischen Betrachtung blau und lebende Zellen farblos erscheinen. Für die Auszählung der lebenden Zellen wurden 20µl der Zellsuspension mit 20µl 0,4%iger Trypanblau-Lösung (Verdünnung 1:2) vermischt und in die mit einem Deckglas versehene Neubauer-Zählkammer überführt. Anschließend erfolgte die lichtmikroskopische Auszählung der lebenden (farblosen) Zellen in allen vier Großquadranten der Zählkammer. Zur Berechnung der Zellzahl / ml Zellsuspension wurde folgende Formel herangezogen:

$$\begin{aligned} \text{Zellzahl/ml} &= \text{Mittelwert der Zellzahl aus den vier Großquadranten} \times \text{Verdünnung} \times 10000 \\ \text{Zellzahl/ml} &= \text{ausgezählte Gesamtzellzahl}/4 \times 2 \times 10000 \end{aligned}$$

### 3.4.4. Nachweis von Zelloberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) dient der Analyse von Zellen in Suspensionen. Dabei werden die in der Flüssigkeit enthaltenen Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln an einer Lichtquelle (Laser) vorbeigeleitet und aufgrund ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und intrazellulären Zusammensetzung unterschieden. Die an die Zellen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe werden von einem Laserstrahl angeregt, worauf sie Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren und im Meßsystem detektiert werden. Unabhängig von den gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen lassen sich Aussagen über die Größe und Granularität der Zellen treffen. Abb. 12 zeigt den Strahlengang des optischen Systems eines Durchflusszytometers und die in den jeweiligen Fluoreszenz-Kanälen detektierten Farbstoffe. Der rote Laser ist ein Dioden-Laser, der vor allem Allophycocyanin (APC) - markierte Zellen erfasst, wohingegen der blaue Laser, ein Argonionenlaser, die sehr gebräuchlichen Farbstoffe Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) anregt.

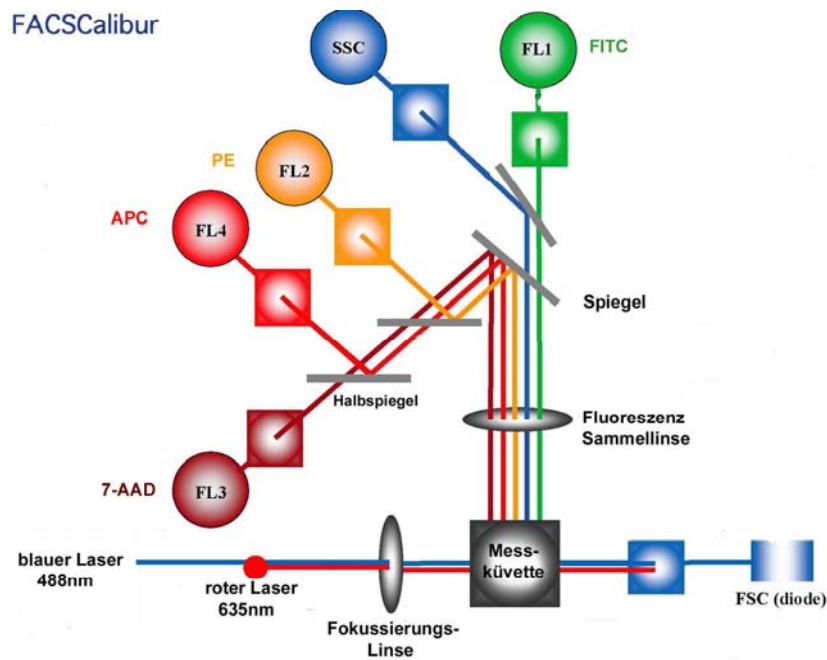


Abb. 12: Das optische System eines FACSCaliburs (Handbuch FACSCalibur, BD – modifiziert).

Die Gegenüberstellung von Vorwärtsstreulicht (FSC, Größe) und Seitwärtsstreulicht (SSC, Granularität) im Mess- und Auswertprogramm des Durchflusszytometers ergibt eine charakteristische Verteilung der gemessenen Zellen (Abb. 13, links). In dieser Arbeit wurden ausschließlich FACS-Analysen von humanen PBMC durchgeführt. Von besonderem Interesse war die Expression verschiedener Antigene auf der Zelloberfläche der Lymphozyten, die durch Inkubation mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert wurden. Für die Auswertung der Messergebnisse wurde deshalb in der FSC/SSC Darstellung die Lymphozytenpopulation (R1) ausgewählt und nachfolgend das Expressionsmuster bestimmter Zelloberflächenmarker innerhalb dieser Population in den Fluoreszenzkanälen analysiert (Abb. 13, rechts). Die Einteilung der Quadranten erfolgte durch Mitführung geeigneter Isotyp-Kontrollen, die Auswertung der gemessenen Daten mittels des Programms WinMDI 2.8.

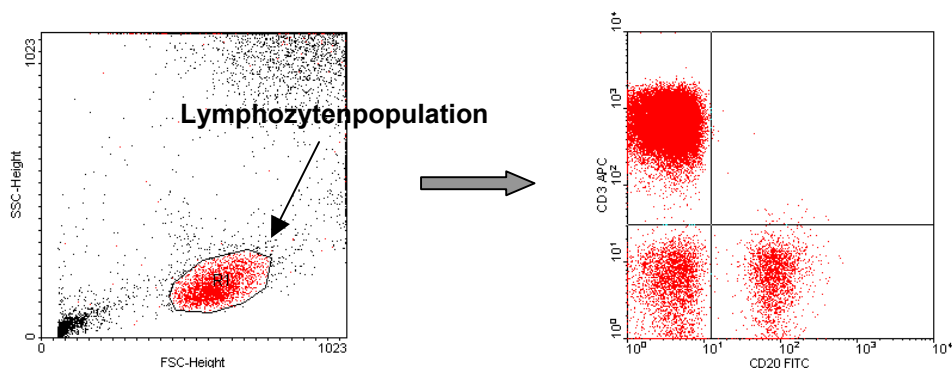


Abb. 13: Die Analyse der durchflusszytometrischen Messergebnisse. Dargestellt ist die Dotplot-Auftrennung der Population peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) der Zellen (links). Nach Definition der Lymphozytenpopulation (R1) erfolgte die Beurteilung der Expression bestimmter Oberflächenmarker innerhalb dieser Zellpopulation (rechts).

Protokoll zur Färbung der Oberflächenmarker:

- Isolation der PBMC
- Überführung von  $1 \times 10^6$  Zellen in ein FACS-Röhrchen
- Zugabe von 2ml FACS-Puffer
- Zentrifugation: 5min bei 1600rpm (= 500xg) und 4°C
- Überstand dekantieren, Zellpellet kurz aufschütteln
- Zugabe der fluoreszenzmarkierten Antikörper-Lösung (Verdünnung 1:30)
- Zellsuspension mischen
- Inkubation: 30min, auf Eis, dunkel
- Zugabe von 1ml FACS-Puffer
- Zentrifugation: 5min bei 1600rpm (= 500xg) und 4°C
- Überstand dekantieren
- Zugabe von 1ml FACS-Puffer
- resuspendieren
- Zentrifugation: 5min bei 1600rpm (= 500xg) und 4°C
- Überstand dekantieren
- Resuspension in 300µl FACS-Puffer
- Proben bis zur Messung im FACSCalibur bei 4°C lagern

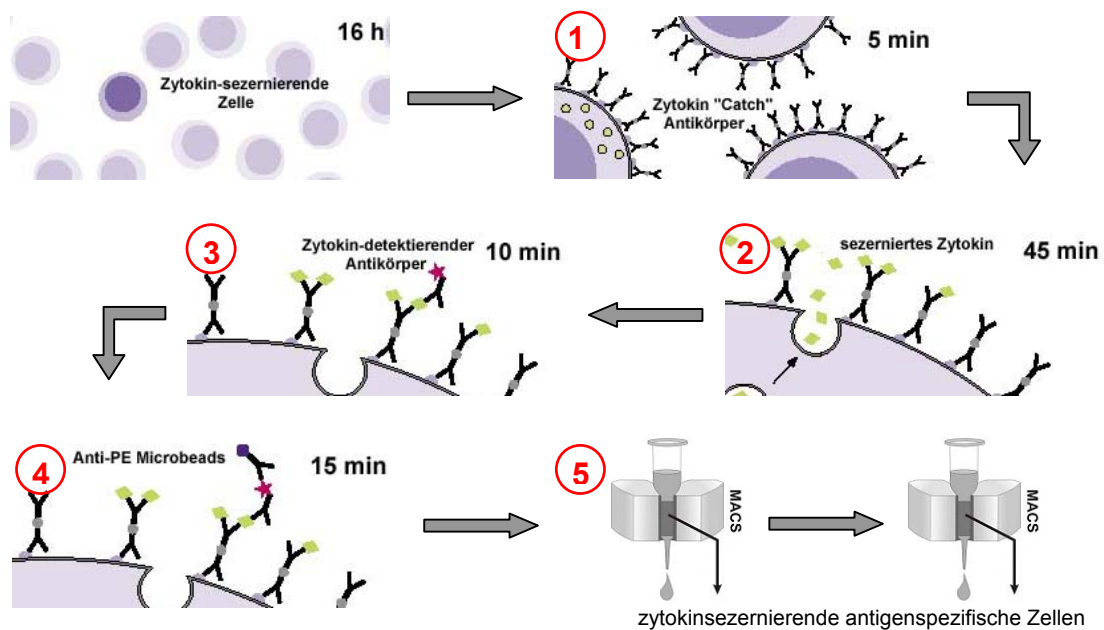
Die Zahlen der peripheren CD19<sup>+</sup> B Zellen, CD3<sup>+</sup> T-Zellen, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th-Zellen und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse im Zentrallabor der Universitätsklinik Marburg erhoben.

### **3.4.5. Ex vivo Analyse von Dsg3-reaktiven Zellen mittels MACS Zytokin-Sekretions-Assay**

Für die Analyse antigenspezifischer Th1-, Th2- und IL-10<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut der PV-Patienten erfolgte die Isolation der PBMC aus ca. 65ml CPDA-haltigem Vollblut (siehe Kapitel 3.4.2.).  $100 \times 10^6$  PBMC wurden zur Bestimmung peripherer autoantigen(Dsg3)spezifischer Zellen eingesetzt. Bei Patienten, deren serologische Untersuchung nachweisbare Antikörpertiter gegen TT ergab, erfolgte die Isolation der TT-spezifischen Zellen aus weiteren  $10 \times 10^6$  Zellen.

$90 \times 10^6$  PBMC wurden in 9ml RPMI<sup>++</sup> 10% PHS aufgenommen und in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in zwei Vertiefungen einer 6-well-Platte ausgesät (genaues Protokoll siehe Hersteller-Angaben). Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit 10µg/ml rekombinantem Dsg3 (PVhis) und eine 16-stündige Kultivierung im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Als Positiv-Kontrolle wurden  $1 \times 10^7$  PBMC in 1ml RPMI<sup>++</sup> 10% PHS resuspendiert, mit 1µg/ml Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) stimuliert, in eine Vertiefung einer 48-well-Platte überführt und ebenfalls im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 16 Stunden inkubiert. Bei den zwei Patienten, bei denen im Serum anti-TT IgG-Antikörper nachweisbar waren, erfolgte zusätzlich eine 16-stündige Kultivierung von  $1 \times 10^7$  PBMC, die mit 2µg/ml TT versetzt waren, bei

37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach abgeschlossener Inkubation der PBMC wurden die verschiedenen antigenspezifischen Zellen mittels Magnetischer Zellseparation (MACS) aufgrund ihrer verschiedenen Zytokinproduktion angereichert und quantifiziert. Dazu erfolgte die Aufteilung der 90x10<sup>6</sup> mit rekombinantem PVhis inkubierten PBMC in drei gleich große Proben (je 30x10<sup>6</sup> Zellen) und die nachfolgende Isolation der Dsg3-spezifischen IL-4-produzierenden Th2-Zellen, IFN $\gamma$ -produzierenden Th1-Zellen bzw. IL-10-produzierenden Zellen. Aus den SEB- bzw. TT-stimulierten Proben wurden IFN $\gamma$ -sezernierende Th1-Zellen separiert. Die Anreicherung wurde nach dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll durchgeführt. Das Prinzip wird im Folgenden noch einmal kurz zusammengefasst:



(modifiziert nach Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

1. Der Zytokin-spezifische „Catch“ – Antikörper bindet durch Interaktion mit CD45 an alle Leukozyten.
2. Während der 45-minütigen Inkubationszeit im Brutschrank produzieren die, durch die voraus gegangene 16-stündige Inkubation mit dem entsprechenden Antigen, bereits aktivierten Zellen Interleukine. Das sezernierte Zytokin wird vom sich auf der zytokinproduzierenden Zelle befindlichen „Catch“-Antikörper gebunden. Auf den Zellen, die kein Zytokin produzieren, bleiben die Zytokin-Bindungsstellen des „Catch“-Antikörpers unbesetzt.
3. Der PE-markierte, gegen das jeweilige Zytokin gerichtete, Detektions-Antikörper bindet an den „Catch-Antikörper – Zytokin“ - Komplex.
4. Ein weiterer magnetgekoppelter anti-PE - Antikörper kann nun an den „Catch-Antikörper – Zytokin – Detektion-Antikörper“ - Komplex binden.
5. Beim Durchfluss der Zellsuspension durch ein magnetisches Feld, welches vom MACS Separator erzeugt wird, werden die magnetgekoppelten Zellen in der MACS-Säule festgehalten. Unmarkierte Zellen können ungestört durch die Säule hindurch fließen. Die

Säule wird aus dem Magneten entnommen und mit MACS-Puffer durchgespült, wodurch die positiven, zytokinsezernierenden, magnetgekoppelten Zellen isoliert werden → positive Selektion. Zur Erhöhung der Reinheit der isolierten Zellpopulation wird dieser Schritt wiederholt.

Die isolierten vitalen Zellen wurden abschließend mittels Neubauer Zählkammer gezählt und die antigenspezifischen Zell-Frequenzen als Zellen /  $10^5$  PBMC angegeben.

#### Herstellung von rekombinantem Dsg3 (PVhis)

Die Herstellung des für *in vitro*-Versuche eingesetzten Autoantigens Dsg3 erfolgte in unserer Arbeitsgruppe. Dafür wurden SF21-Insektenzellen mit PVhis-Baculovirus infiziert und der Virus innerhalb der Zellen amplifiziert. Nachfolgend wurden *high-five* Insektenzellen mit rekombinantem Baculovirus beimpft, das Protein PVhis aus dem Zellkulturüberstand mittels Nickel-Agarose (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und die Proteinkonzentration in den Präparationen bestimmt (Ishii et al., 1997).

### **3.5. Statistik**

Da die ermittelten Patienten-Daten keine Normalverteilung aufwiesen, wurde die statistische Auswertung mittels nicht-parametrischer Tests durchgeführt. Für den Vergleich gepaarter Proben zu verschiedenen Zeitpunkten einer Therapie wurde der zweiseitige Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test eingesetzt. Die Gegenüberstellung verschiedener Patientengruppen bzw. von Patienten und Kontrollen erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test (bei Vergleich von drei und mehr Gruppen) und zweiseitigem Mann-Whitney-U-Test (bei Vergleich von zwei Gruppen). Die lineare Korrelation zweier Parameter wurde durch den Korrelationskoeffizienten nach Pearson ( $r$ ) ausgedrückt. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde auf 0,05 festgesetzt, sodass signifikante Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ ) von  $p < 0,05$  zu verzeichnen sind. Die Durchführung statistischer Signifikanzberechnungen nach Unterteilung der PV-Patienten in Remissions- und Rezidivpatienten war aufgrund der geringen Fallzahl ( $n=3$ ) der Gruppe der Rezidivpatienten nicht indiziert.

Messwert-Angaben oder Graphen (Boxplot) sind als Median  $\pm$  Spannweite dargestellt. Die Box umfasst dabei 50% der Werte (25% - 75% Quantil) und die untere bzw. obere Spannweite jeweils 25% der Daten. Der Balken innerhalb der Box repräsentiert den Median. Die Angaben  $^*^*$  und  $^\circ^\circ$  innerhalb der graphischen Darstellung sind wie folgt definiert:

$^*^*$ : Extremwert (Werte, deren Entfernung vom 25% / 75% Quantil  $> 3$  Boxlängen beträgt)

$^\circ^\circ$ : Ausreißer (Werte, deren Entfernung vom 25% / 75% Quantil  $> 1,5$  Boxlängen beträgt).

Die statistische Berechnung erfolgte mittels SPSS.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Der Einfluss von Rituximab auf die zelluläre Autoimmunantwort beim Pemphigus vulgaris – Depletion autoreaktiver B-Zellen und Verminderung Dsg3-reaktiver T-Zellen

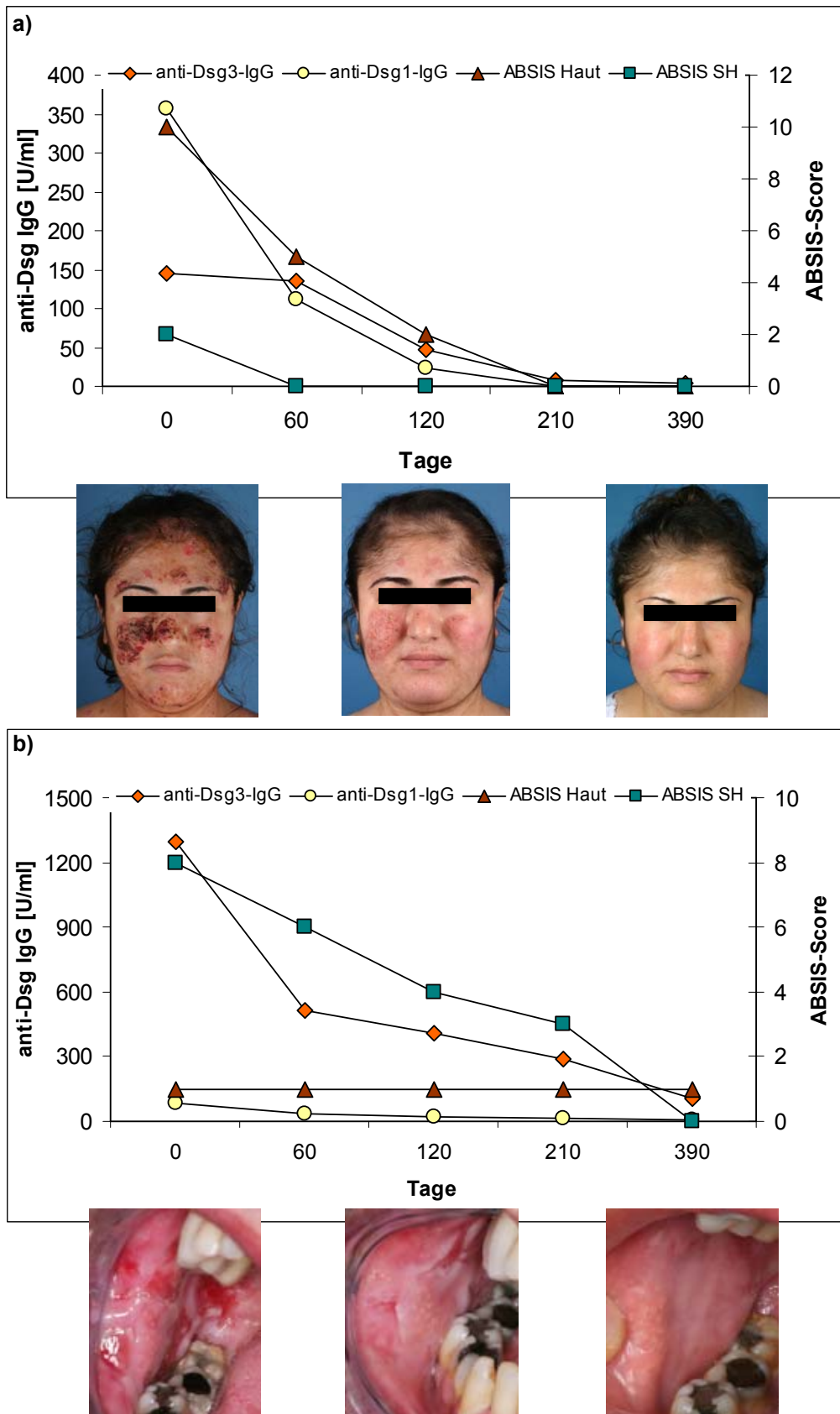
#### 4.1.1. Der klinische Verlauf von PV-Patienten nach Rituximab-Therapie

In der vorliegenden Studie wurden zwölf PV-Patienten, die unter alleiniger immunsuppressiver Medikation bzw. in Kombination mit adjuvanter IA einen therapierefraktären Krankheitsverlauf aufwiesen, mit dem B-Zell-depletierenden Antikörper, Rituximab, behandelt. Der klinische Verlauf nach Rituximab-Behandlung wurde über einen zwölfmonatigen Zeitraum dokumentiert und mittels eines klinischen Scores (ABSIS) quantifiziert. Abb. 14 zeigt den klinischen Verlauf am Beispiel von zwei repräsentativen Patienten.

Abb. 14a illustriert die klinische Besserung des Krankheitsbildes einer 24-jährigen PV-Patientin (PV4) im zeitlichen Verlauf nach Rituximab-Therapie. Die Patientin wies eine ausgeprägte Blasenbildung an der oralen Mukosa, der Gesichtshaut (Abb. 14a) sowie am Kapillitium auf, die auch nach Gabe hochdosierter Immunsuppressiva keine Abheilung zeigte. Nach Applikation von Rituximab zeichnete sich bereits innerhalb von drei Monaten (Abb. 14a, Tag 120) eine schnelle und deutliche Besserung des klinischen Befundes ab, gefolgt von einer kompletten klinischen Remission sechs Monate (Tag 210) nach Therapie. Die klinische Besserung des Haut- und Schleimhautbefundes manifestierte sich in der schnellen und kompletten Reduktion des ABSIS-Scores für Haut und Schleimhaut (SH) und korrelierte mit einem drastischen Absinken der Dsg1- und -3 reaktiven Autoantikörper im Serum der Patientin. Zum Studienendpunkt, zwölf Monate (Tag 390) nach Therapie, waren weder Krankheitssymptome noch Autoantikörpertiter im Serum detektierbar und die Patientin befand sich in kompletter klinischer Remission.

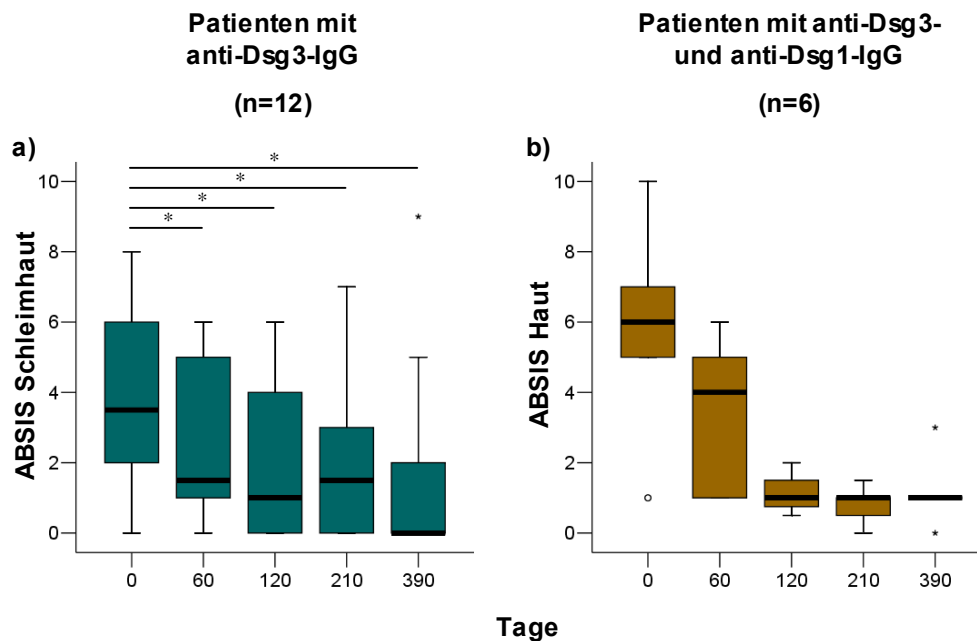
Abb. 14b fasst die Resultate eines 50-jährigen PV-Patienten (PV7) vor und nach Rituximab-Behandlung zusammen. Dieser Patient zeigte vor Rituximab-Therapie ebenfalls eine Resistenz gegenüber systemischer, immunsuppressiver Medikation, einschließlich der Gabe von hochdosiertem Prednisolon und MMF. Zu Beginn der B-Zell-depletierenden Therapie wies der Patient schwere Erosionen der oralen Mukosa (Abb. 14b) sowie der Kopfhaut auf. Die Rituximab-induzierte schnelle Krankheitsbesserung resultierte im Erreichen einer klinischen Remission zwölf Monate nach Therapie, welche sich in der Abnahme der klinischen Scores (ABSIS Haut und Schleimhaut (SH)) und der Autoantikörpertiter im Serum des Patienten widerspiegelt (Abb. 14b).





**Abb. 14:** Das klinische Bild von Patienten mit refraktärem Pemphigus vulgaris (PV) nach Rituximab-Behandlung. Dargestellt ist das klinische Verhalten zweier PV-Patienten (PV4, Abb. 14a; PV7, Abb. 14b) nach Behandlung mit Rituximab. Beide Patienten zeigten eine deutliche klinische Besserung im zeitlichen Verlauf unter Therapie, die von einer Reduktion Desmoglein (Dsg)-spezifischer Autoantikörper im Serum und dem Abfall des klinischen Scores (*autoimmune bullous skin disease intensity score* (ABSIS) Haut und Schleimhaut (SH)) begleitet war.

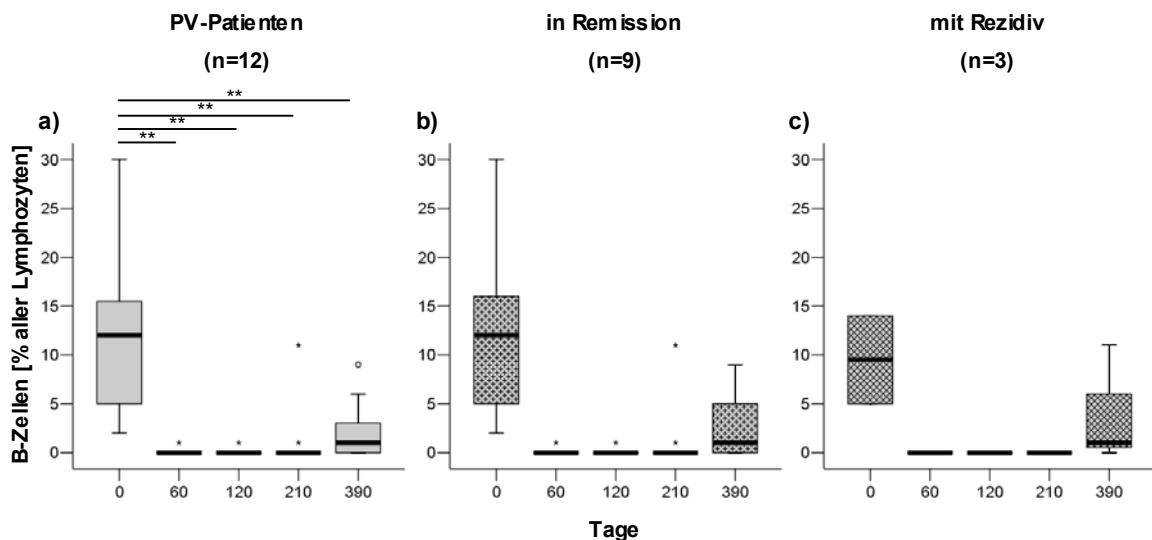
Der klinische Verlauf aller untersuchten PV-Patienten nach Rituximab-Behandlung ist in Abb. 15 zusammenfassend dargestellt. Die Anzahl der Schleimhaut- (Abb. 15a) und der Haut-Läsionen (Abb. 15b) nahm über den kompletten zwölfmonatigen Beobachtungszeitraum der Patienten stark ab. Nur 50% der untersuchten Patienten wiesen zusätzlich zu den Dsg3-spezifischen Autoantikörpern zirkulierende Dsg1-reaktive IgG-Antikörper auf, was sich klinisch in erosiven Veränderungen der Haut manifestierte. Aufgrund dieser geringen Fallzahl konnte für die Verminderung der Anzahl der Haut-Läsionen keine Signifikanzberechnung durchgeführt werden.



**Abb. 15: Das klinische Ansprechen der Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten auf die Rituximab-Behandlung.** Veranschaulicht ist die Abnahme des ABSIS (*autoimmune bullous skin disease intensity score*) zur Quantifizierung der Schleimhaut- (Abb. 15a) und Haut-Läsionen (Abb. 15b) bei den zwölf Rituximab-behandelten PV-Patienten. Statistisch signifikante Veränderungen des Schleimhaut-Scores in Relation zum Ausgangswert vor Therapiebeginn liegen vor und sind folgendermaßen dargestellt: \*  $p < 0,05$ .

#### 4.1.2. Die Rituximab-induzierte B-Zell-Depletion

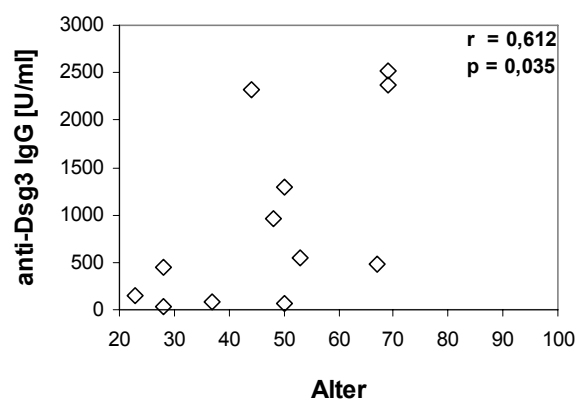
Die Behandlung der Patienten mit dem monoklonalen anti-CD20 Antikörper, Rituximab, führte zur vollständigen Depletion der CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten im peripheren Blut. Abb. 16 zeigt die durchschnittlich sechs bis zwölf Monate anhaltende, vollständige Eliminierung peripherer B-Zellen bei den zwölf PV-Patienten (Abb. 16a). Neun der zwölf PV-Patienten befanden sich zwölf Monate nach Therapie in klinischer Remission, während drei Patienten ein klinisches Rezidiv der Krankheitssymptome zeigten. Die Anzahl der peripheren B-Zellen wies weder vor Depletion (Tag 0) noch bei Wiederauftreten der B-Zellen im peripheren Blut (Tag 210-390) Unterschiede zwischen den Patienten in Remission (Abb. 16b) und den Patienten mit klinischem Rezidiv (Abb. 16c) auf.



**Abb. 16: Die Rituximab-induzierte B-Zell-Depletion bei Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten.** Abb. 16 illustriert die Verteilung der peripheren CD19<sup>+</sup> B-Zellen bei allen PV-Patienten (Abb. 16a) und in den Gruppen der Remissions- (Abb. 16b) und Rezidivpatienten (Abb. 16c) vor (Tag 0) und im zeitlichen Verlauf nach Rituximab-Therapie. Alle Patienten zeigten eine komplette sechs- bis zwölfmonatige B-Zell-Depletion nach Applikation von Rituximab. Statistisch signifikante Veränderungen in Relation zum Ausgangswert vor Therapiebeginn liegen vor und sind folgendermaßen dargestellt: \*\* p<0,01.

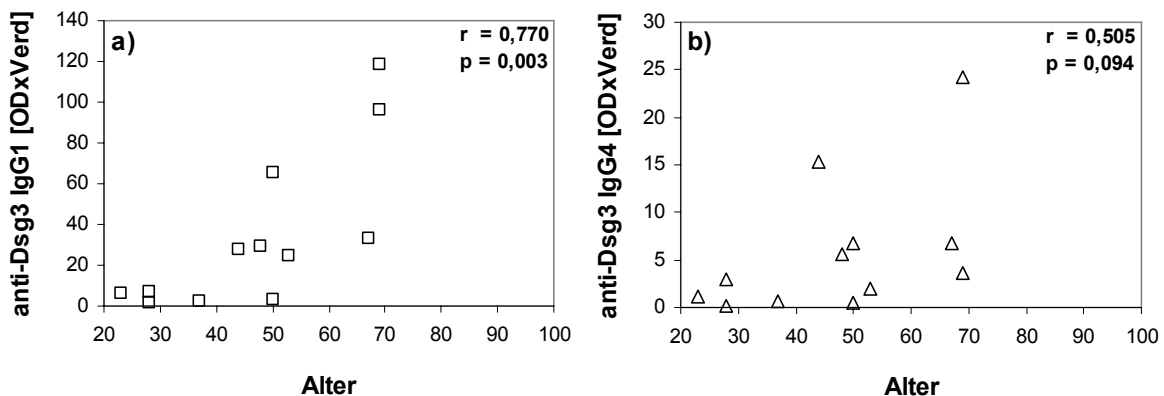
#### 4.1.3. Die Abhängigkeit der Serumkonzentration Dsg3-spezifischer Autoantikörper vom Alter der Patienten

Die vor Rituximab-Therapie in den Patientenseren detektierten Ausgangskonzentrationen zirkulierender, Dsg3-spezifischer Autoantikörper unterlagen einer sehr großen Schwankungsbreite (29 U/ml – 2521 U/ml). Um einen möglichen Zusammenhang der anti-Dsg3 IgG-Konzentrationen mit dem Alter der Patienten zu untersuchen, wurden diese zwei Parameter zueinander in Beziehung gesetzt. Es besteht eine signifikante Korrelation ( $p=0,035$ ) zwischen den Titern Dsg3-spezifischer Autoantikörper im Serum und dem Alter der in die Studie inkludierten chronisch-aktiven PV-Patienten (Abb. 17).



**Abb. 17: Die Abhängigkeit der Serumkonzentration autoreaktiver IgG-Antikörper vom Alter der Patienten vor Rituximab-Therapie.** Veranschaulicht ist die Korrelation zwischen der Serumkonzentration Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifischer IgG-Autoantikörper und dem Alter der Patienten.  $r$  – Korrelationskoeffizient,  $p$  – Irrtumswahrscheinlichkeit

Das in Abb. 17 dargestellte Dsg3-spezifische Gesamt-IgG setzt sich aus den Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 zusammen, wobei beim PV vor allem die Subtypen IgG1 und IgG4 pathogenetische Relevanz besitzen. Besonders die Konzentration des Dsg3-reaktiven IgG4 im Serum der Patienten zeigt eine ausgeprägte Korrelation mit der Krankheitsaktivität. Daher wurden zusätzlich zum Dsg3-spezifischen Gesamt-IgG (Abb. 17) die Konzentrationen von Dsg3-reaktivem IgG1 und IgG4 im Serum der Patienten vor Behandlung mit dem mAk Rituximab analysiert. IgG1 (Abb. 18a) zeigt im Gegensatz zu IgG4 (Abb. 18b) eine statistisch signifikante Korrelation mit dem Alter der Patienten ( $p=0,003$ ).

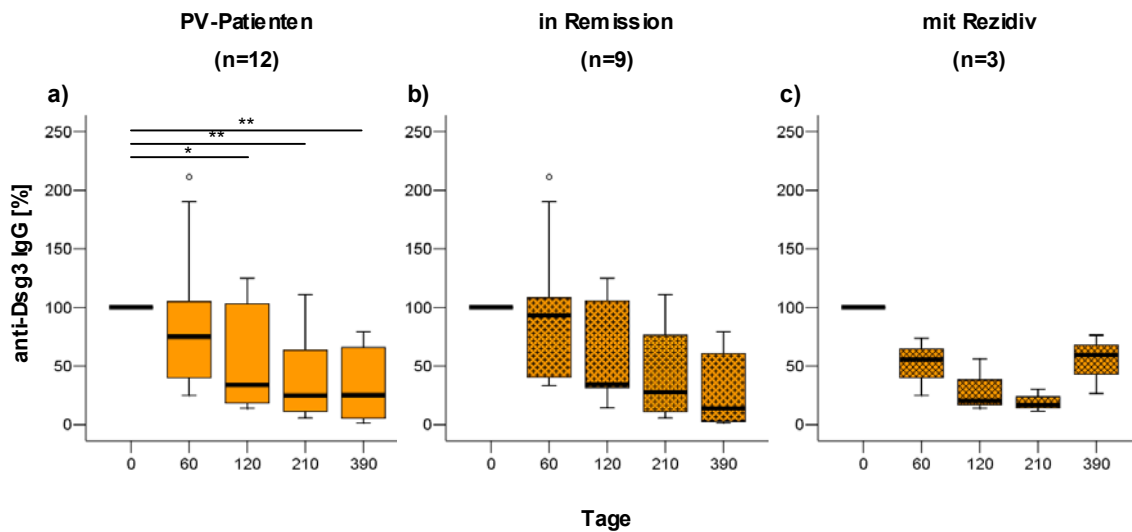


**Abb. 18: Die Abhängigkeit der Serumkonzentration autoreaktiver IgG1- und IgG4-Antikörper vom Alter der Patienten vor Rituximab-Therapie.** Veranschaulicht ist die Korrelation zwischen der Serumkonzentration Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifischer Autoantikörper-Subtypen (IgG1, Abb. 18a; IgG4, Abb. 18b) und dem Alter der Patienten. Die Bestimmung der IgG1- und IgG4-Antikörper erfolgte mittels ELISA (MESACUP Dsg3 Test), wobei die Seren aufgrund der sehr stark variierenden Antikörperkonzentrationen laut Herstellerangaben soweit verdünnt wurden, dass sie bei der photometrischen Messung im Linearitätsbereich detektiert werden konnten. Für die Darstellung der Ergebnisse, wurde die ermittelte optische Dichte (OD) mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert.  $r$  – Korrelationskoeffizient,  $p$  – Irrtumswahrscheinlichkeit

#### 4.1.4. Die Abnahme Dsg3-spezifischer Autoantikörper nach B-Zell-Depletion

Die Applikation von Rituximab und die damit verbundene B-Zell-Depletion führte bereits drei Monate nach Therapie zu einer signifikanten Abnahme ( $p=0,023$ ) Dsg3-spezifischer IgG-Autoantikörper. Einen Monat nach Behandlung zeigten die Titer autoreaktiver Antikörper noch keine deutlichen Veränderungen (Abb. 19a). Besonders ausgeprägt war die Reduktion der Autoantikörperkonzentration im Serum der behandelten PV-Patienten zu den Zeitpunkten sechs und zwölf Monate nach Therapie, an welchen durchschnittlich nur noch 25% der ursprünglichen Dsg3-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnten (Abb. 19a). Sechs Monate (Tag 210) nach B-Zell-depletierender Behandlung befanden sich alle zwölf PV-Patienten in klinischer Remission. Neun Patienten, die sich zwölf Monate nach Therapie weiterhin in klinischer Remission befanden, zeigten eine kontinuierliche Abnahme Dsg3-reaktiver Autoantikörper auf durchschnittlich 28% des Ausgangswertes sechs Monate nach Therapie und auf 14% zwölf Monate nach Rituximab-Behandlung (Abb. 19b). Bei Patienten mit einem Rezidiv konnte sechs bis zwölf Monate nach Therapie (zum Zeitpunkt des Wiederaufflammens der Erkrankung) ein erneuter und drastischer Anstieg der Autoantikörper detektiert werden (Abb. 19c).

Diese Ergebnisse zeigen eindrucksvoll die Korrelation der Krankheitsaktivität mit den Autoantikörpertitern im Serum der Patienten.

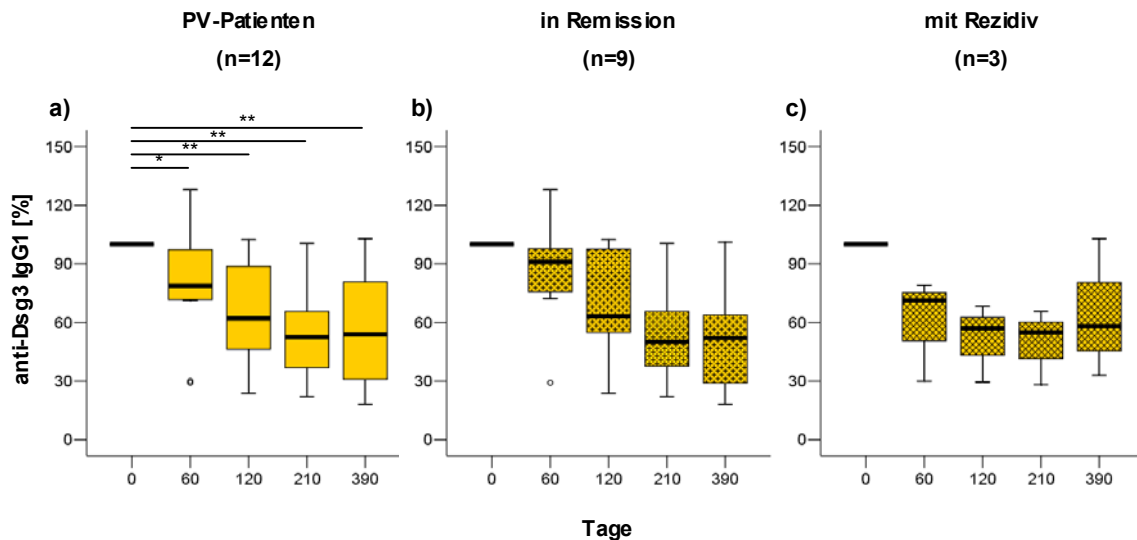


**Abb. 19: Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifische IgG-Autoantikörpertiter nach Rituximab-Therapie.** Abb. 19 zeigt die drastische Verminderung der Autoantikörperkonzentrationen aller Patienten im zeitlichen Verlauf nach Behandlung (Abb. 19a). Patienten in Remission (Abb. 19b) zeigten eine kontinuierliche Reduktion der Autoantikörper über den kompletten Zeitraum, während Patienten mit Rezidiv zum Zeitpunkt der klinischen Verschlechterung einen dramatischen Wiederanstieg der Dsg3-spezifischen Antikörper im Serum aufwiesen (Abb. 19c). Dargestellt ist die prozentuale Abweichung vom Ausgangswert (Tag 0), welcher als 100% definiert wurde. Statistisch signifikante Veränderungen in Relation zum Ausgangswert vor Therapiebeginn liegen vor und sind folgendermaßen dargestellt: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

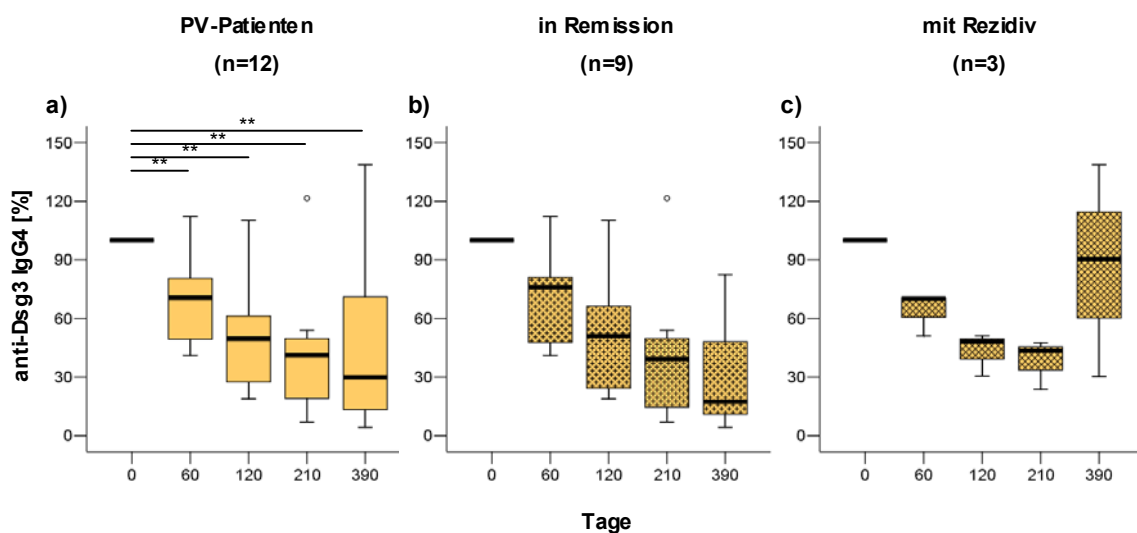
Die Analyse der Dsg3-spezifischen IgG-Subtypen ergab eine Rituximab-induzierte schnelle und signifikante Reduktion der autoreaktiven IgG1-Autoantikörper im Serum, welche bereits einen Monat nach B-Zell-Depletion einsetzte ( $p=0,045$ ), jedoch auch zwölf Monate (Tag 390) nach Therapie auf nur 50% des Ausgangswertes beschränkt war (Abb. 20a). Bei vergleichender Betrachtung der Dsg3-reaktiven IgG1-Autoantikörper im Serum von Patienten in Remission und Patienten mit Rezidiv konnte ein Monat (Tag 60) nach Therapie ein schnellerer Abfall der IgG1-Autoantikörper im Serum der Rezidivpatienten detektiert werden. Im weiteren Verlauf war jedoch kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen mehr feststellbar (Abb. 20b, 20c).

Die pathogenetisch besonders relevanten Dsg3-reaktiven IgG4-Autoantikörper zeigten bereits einen Monat nach Therapie (Tag 60) eine schnelle und gravierende Reduktion ( $p=0,003$ ; Abb. 21a). Dieser Autoantikörperverlauf korreliert sehr gut mit der bereits zu diesem Zeitpunkt bestehenden klinischen Besserung. Interessanterweise wiesen Patienten in Remission einen kontinuierlichen Abfall Dsg3-spezifischer IgG4-Autoantikörper bis einschließlich zwölf Monate nach Therapie auf (Abb. 21b), während Patienten mit erneuter Krankheitsaktivität zum Zeitpunkt des Rezidivs einen drastischen Anstieg Dsg3-spezifischer IgG4-Autoantikörper zeigten (Abb. 21c). Offensichtlich wird der in Abb. 19c dargestellte Wiederanstieg von Dsg3-spezifischem Gesamt-IgG im Serum der Rezidivpatienten zwölf Monate nach Therapie hauptsächlich durch den Wiederanstieg von autoreaktivem IgG4 verursacht.

Die hier dargestellte strikte Korrelation des klinischen Verlaufs mit den Titern der Dsg3-spezifischen IgG4-Autoantikörper weist auf deren besondere pathogenetische Relevanz hin.



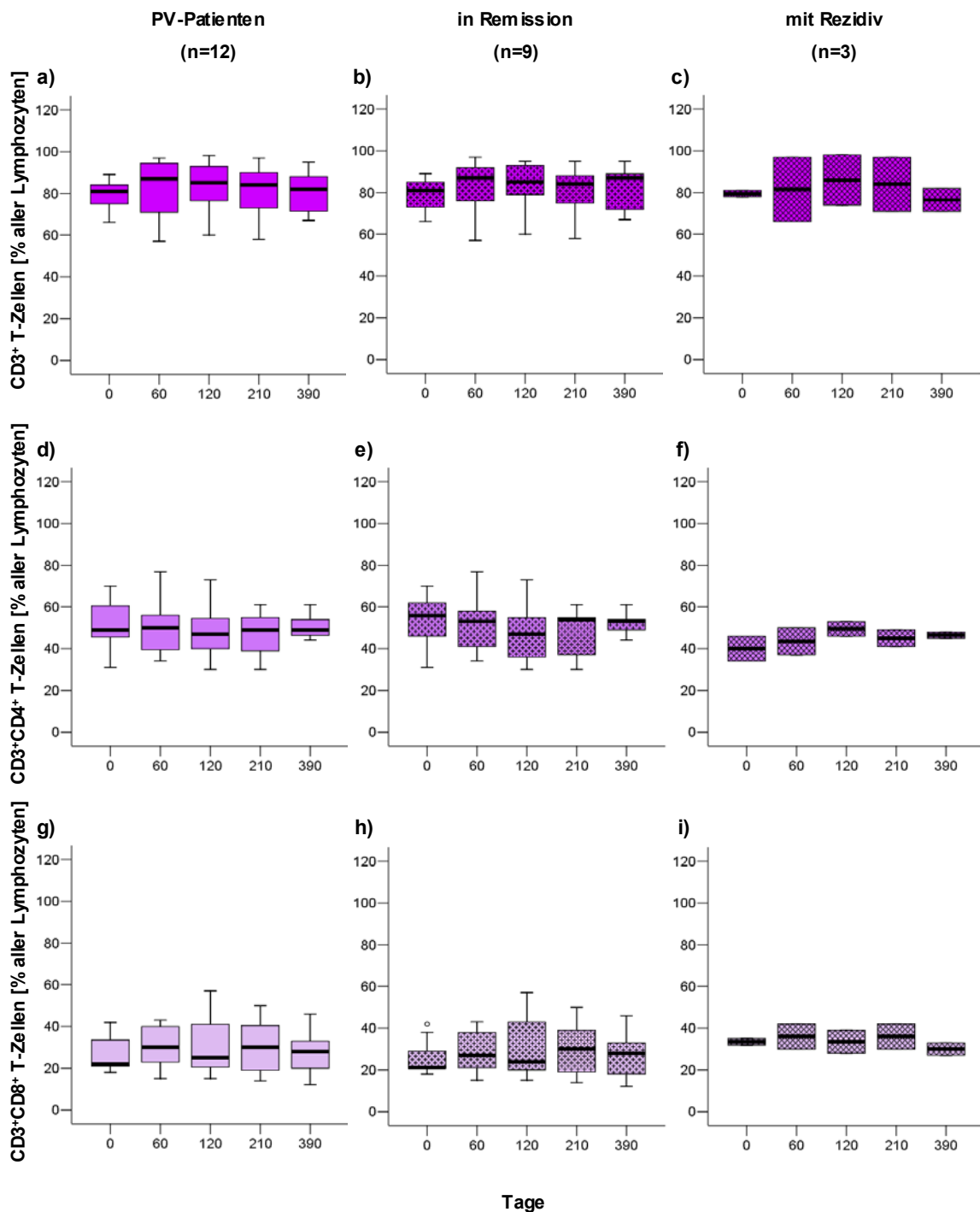
**Abb. 20: Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifische IgG1-Autoantikörpertiter nach Rituximab-Therapie.** Abgebildet ist die schnelle und signifikante Reduktion der Dsg3-reaktiven IgG1-Autoantikörper im Serum aller Patienten (Abb. 20a) nach Behandlung mit Rituximab. Zwölf Monate (Tag 390) nach Therapie war in allen Patienten, unabhängig von ihrem klinischen Verlauf (Remission, Abb. 20b; Rezidiv, Abb. 20c) eine Verringerung des IgG1-Gehalts auf etwa 50% des Ausgangswertes detektierbar. Dargestellt ist die prozentuale Abweichung vom Ausgangswert (Tag 0), welcher als 100% definiert wurde. Statistisch signifikante Veränderungen in Relation zum Ausgangswert vor Therapiebeginn liegen vor und sind folgendermaßen dargestellt: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .



**Abb. 21: Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifische IgG4-Autoantikörpertiter nach Rituximab-Therapie.** Nach Behandlung mit Rituximab kam es bis sechs Monate (Tag 210) nach Therapie zu einer sehr ausgeprägten Reduktion der Dsg3-reaktiven IgG4-Autoantikörper im Serum aller Patienten (Abb. 21a), die sehr gut mit dem Erreichen der klinischen Remission zu diesem Zeitpunkt korrelierte. Zwölf Monate (Tag 390) nach Therapie ist ein bemerkenswerter Unterschied der Serumkonzentrationen von autoreaktivem IgG4 erkennbar, der einen starken Bezug zum klinischen Befinden der Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten (Remission, Abb. 21b; Rezidiv, Abb. 21c) aufweist. Dargestellt ist die prozentuale Abweichung vom Ausgangswert, welcher als 100% definiert wurde. Statistisch signifikante Veränderungen in Relation zum Ausgangswert vor Therapiebeginn liegen vor und sind folgendermaßen dargestellt: \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.1.5. Die allgemeinen T-Zell-Frequenzen bleiben von der B-Zell-Depletion unbeeinflusst

Der Effekt von Rituximab auf die Frequenzen von  $CD3^+$  T-Zellen bzw. von Th-Zellen ( $CD3^+CD4^+$ ) und zytotoxischen T-Zellen ( $CD3^+CD8^+$ ) der PV-Patienten wurde zu definierten Zeitpunkten nach Therapie analysiert und ist in Abb. 22 zusammenfassend dargestellt.



**Abb. 22: Die Wirkung von Rituximab auf die peripheren T-Zellen im Blut.** Dargestellt ist die Verteilung peripherer  $CD3^+$  T-Zellen (Abb. 22a,b,c), T-Helfer-Zellen (Abb. 22d,e,f) bzw. zytotoxischer T-Zellen (Abb. 22g,h,i) im zeitlichen Verlauf nach Rituximab-Therapie. Es waren weder Unterschiede der T-Zell-Frequenzen nach Rituximab-Behandlung noch in Abhängigkeit vom klinischen Status der Patienten erkennbar.

Sowohl die Frequenzen der CD3<sup>+</sup> T-Zellen als auch die der T-Zell-Subpopulationen blieben von der Rituximab-Therapie unbeeinflusst (Abb. 22a,d,g). Der klinische Krankheitsverlauf der Patienten hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Frequenz peripherer T-Zellen (Remission, Abb. 22b,e,h bzw. Rezidiv, Abb. 22c,f,i).

Diese Resultate verdeutlichen, dass die Rituximab-vermittelte B-Zell-Depletion keine direkte Wirkung auf definierte T-Zell-Subpopulationen hat.

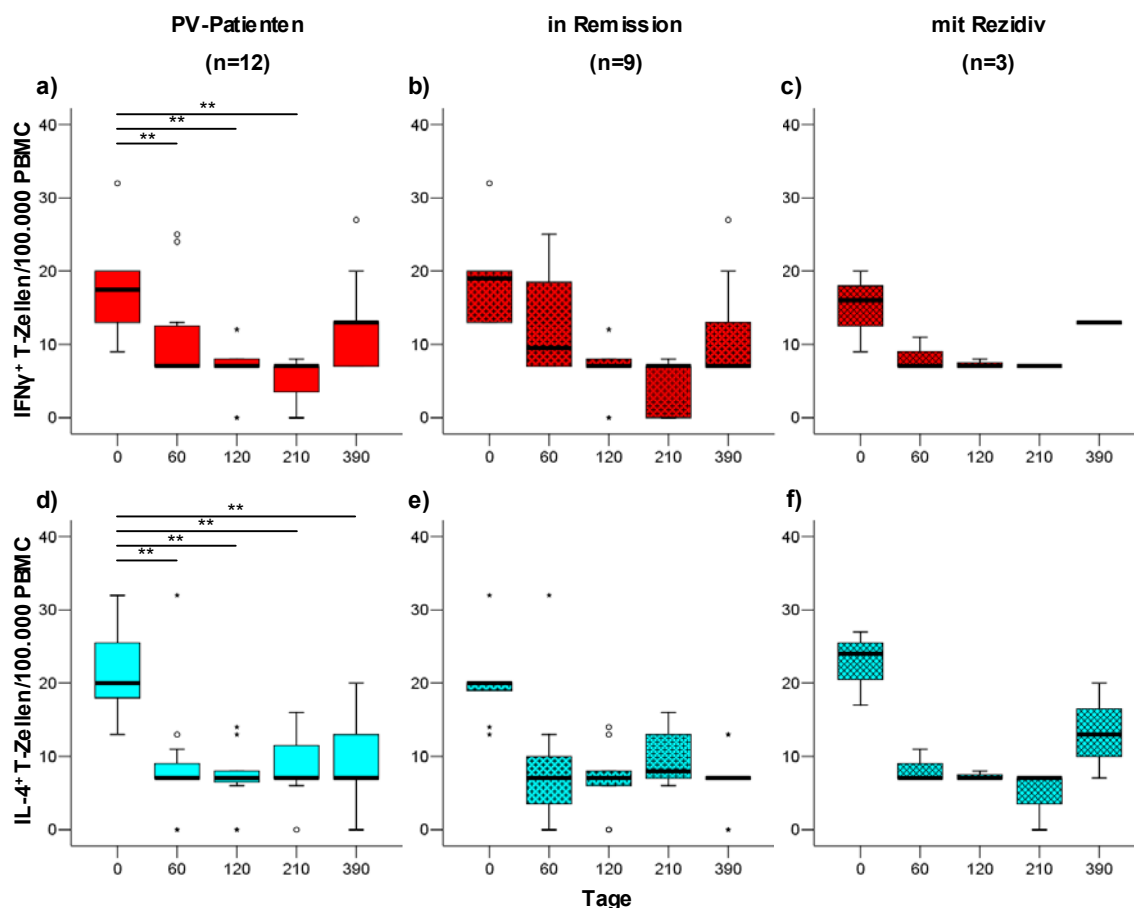
#### **4.1.6. Rituximab induziert eine deutliche Abnahme der Zahl peripherer, autoreaktiver CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen**

Die autoreaktiven Th1- und Th2-Zellen wurden mittels MACS hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion (IFN $\gamma$ , IL-4) isoliert und quantifiziert. IL-4 wird hauptsächlich von Th2-Zellen und Mastzellen produziert, wobei Mastzellen vorrangig im Bindegewebe und nur als Vorläuferzellen im peripheren Blut vorkommen. Zusätzlich sind diese anhand ihrer Größe in der Zählkammer leicht von T-Zellen abzugrenzen, sodass nur die IL-4<sup>+</sup> Th2-Zellen quantifiziert wurden. IFN $\gamma$  wird überwiegend von Th1-Zellen und Monozyten/Makrophagen gebildet. Auch die letztgenannten Zellen erscheinen bei mikroskopischer Betrachtung als sehr große Zellen und wurden bei der Quantifizierung in der Neubauer-Zählkammer ausgeschlossen. Daher handelt es sich bei den detektierten IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen vermutlich ausschließlich um Th1-Zellen.

In Abb. 23 sind die vor und über einen zwölfmonatigen Zeitraum nach Rituximab-Therapie bei den untersuchten PV-Patienten ermittelten Frequenzen peripherer Dsg3-reaktiver CD4<sup>+</sup> Th-Zellen zusammengefasst. Während die Dsg3-spezifischen Th-Zell-Frequenzen unter immunsuppressiver Behandlung bzw. in Kombination mit adjuvanter IA weitgehend konstant blieben, induzierte Rituximab eine schnelle und anhaltende Abnahme autoreaktiver Th1- und Th2-Zellen. Die ausbleibende Wirkung einer fünfmonatigen immunsuppressiven Therapie auf die Frequenzen autoreaktiver Th2-Zellen im peripheren Blut ist im Folgenden anhand eines repräsentativen PV-Patienten dargestellt: Die Therapie mit Prednisolon und MMF führte zu einer geringfügigen Abnahme der Anzahl autoreaktiver Th2-Zellen von 16/10<sup>5</sup> PBMC auf 13/10<sup>5</sup> PBMC. Unter anschließender IA blieb diese Zahl (13/10<sup>5</sup> PBMC) konstant. Auch in einer vorherigen Untersuchung von Veldman et al. zeigte sich keine Abnahme Dsg3-reaktiver Th-Zellen in einem Kollektiv von PV-Patienten unter immunsuppressiver Therapie (Veldman et al., 2003). Somit ist die in Abb. 23 dargestellte drastische Verminderung Dsg3-reaktiver Th-Zellen nach Rituximab-Therapie vermutlich auf die B-Zell-depletierende Behandlung zurückzuführen, da vorausgehende Therapien mit Immunsuppressiva  $\pm$  IA keine signifikanten Änderungen autoreaktiver Th-Zell-Frequenzen hervorrufen. Innerhalb von einem (Tag 60) bis drei (Tag 120) Monaten nach Verabreichung von Rituximab fielen die Zahlen autoreaktiver Dsg3-spezifischer Th1- und Th2-Zellen drastisch ab (Abb. 23a,d). Die Dsg3-reaktiven, IFN $\gamma$ -sezernierenden Th1-Zellen sanken innerhalb eines Monats nach Therapie von durchschnittlich 18/10<sup>5</sup> PBMC auf 7/10<sup>5</sup> PBMC (Abb. 23a). Noch etwas deutlicher war die in dieses Zeitintervall fallende Abnahme der autoreaktiven IL-4<sup>+</sup> Th2-Zellen von 20/10<sup>5</sup> PBMC auf 7/10<sup>5</sup> PBMC (Abb. 23d). Die Frequenzen autoreaktiver Th2-Zellen blieben über den kompletten zwölfmonatigen



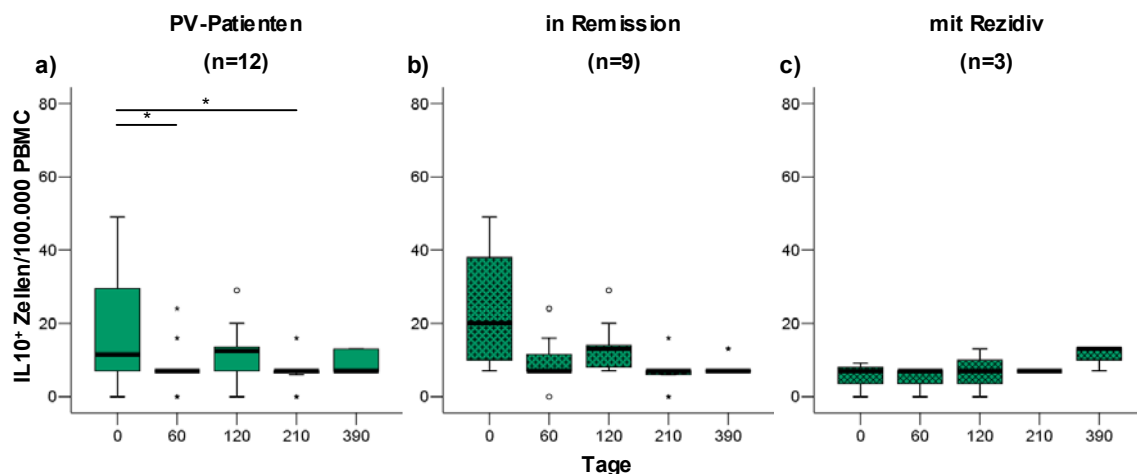
Beobachtungszeitraum der Patienten mit 15% des Ausgangswertes signifikant vermindert ( $p=0,002$ ; Abb. 23d), wohingegen die Th1-Zellen über einen sechsmonatigen Zeitraum nach Behandlung eine signifikante 61%ige Verringerung in Bezug zum Ausgangswert zeigten ( $p=0,002$ ), jedoch zwölf Monate nach Therapie wieder auf 72% des Ausgangswertes anstiegen ( $p=0,099$ ; Abb. 23a). Zwölf Monate nach Therapie konnte in der Gruppe der Patienten in Remission eine anhaltende Verminderung Dsg3-spezifischer Th1- (Abb. 23b) und Th2-Zellen (Abb. 23e) nachgewiesen werden. Die Zahlen Dsg3-reaktiver Th1- und Th2-Zellen blieben in diesen Patienten sechs und zwölf Monate nach Therapie mit  $7\cdot 10^5$  PBMC konstant niedrig (Abb. 23b,e). Die drei Patienten mit Rezidiv zeigten einen Wiederanstieg der Dsg3-spezifischen Th1 und Th2 Zellen von  $7/10^5$  PBMC auf durchschnittlich  $13/10^5$  PBMC (Abb. 23c,f). Eine statistische Auswertung der ermittelten Daten der Gruppe der Patienten in Remission und mit Rezidiv war aufgrund der geringen Fallzahl nicht möglich. Diese Ergebnisse legen einen direkten Zusammenhang zwischen dem klinischen Status der PV-Patienten und den Frequenzen autoreaktiver Th-Zellen nahe.



**Abb. 23: Chronische Suppression autoreaktiver T-Helfer (Th)-Zellen nach Rituximab-Behandlung.** Illustriert ist die drastische Verminderung Dsg3-reaktiver Th1- (Abb. 23a,b,c) und Th2-Zellen (Abb. 23d,e,f) nach Behandlung mit Rituximab. Im Gegensatz zu Patienten in klinischer Remission (Abb. 23b,e), deren autoreaktive Th-Zellen über den kompletten Beobachtungszeitraum vermindert blieben, zeigten Patienten mit Rezidiv (Abb. 23c,f) zum Zeitpunkt der klinischen Verschlechterung einen Wiederanstieg Dsg3-spezifischer Th1- und Th2-Zellen im peripheren Blut. Statistisch signifikante Veränderungen in Relation zum Ausgangswert vor Therapiebeginn liegen vor und sind folgendermaßen dargestellt: \*\*  $p < 0,01$ .

Zusätzlich zu den autoreaktiven Th1- und Th2-Zell-Populationen wurden die Frequenzen der autoreaktiven IL-10<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut der PV-Patienten vor und nach Rituximab-Therapie analysiert. Im Gegensatz zu der relativ klaren Zuordnung der isolierten IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und IL-4<sup>+</sup> Zellen zur Gruppe der Th-Zellen, ist eine genaue Definition der IL-10<sup>+</sup> Zellen schwierig. IL-10 wird von verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen, einschließlich NK-Zellen, NKT-Zellen, natürlichen und induzierten Treg, Th2-Zellen und B-Zellen, gebildet. Insbesondere bei Autoimmunerkrankungen, wie dem SLE, besitzt IL-10 eine wichtige Rolle als Überlebens- und Proliferationsfaktor der B-Zellen (Rousset et al., 1992). Es wurde in der Vergangenheit mehrfach gezeigt, dass aktivierte B-Zellen IL-10 sezernieren (Llorente et al., 1995). Daher ist eine genaue Zuordnung der mittels MACS isolierten Dsg3-spezifischen IL-10<sup>+</sup> Zellen zu einer bestimmten Zellpopulation nicht möglich und es wird im Folgenden von autoreaktiven IL-10<sup>+</sup> Zellen gesprochen.

Bereits ein Monat (Tag 60) nach B-Zell-depletierender Therapie nahm die Zahl autoreaktiver IL-10-sezernierender Zellen bei den PV-Patienten signifikant ab ( $p=0,033$ ; Abb. 24a). Dies war möglicherweise auch eine direkte Folge der Eliminierung von autoreaktiven IL-10-produzierenden CD20<sup>+</sup> B-Zellen. Im weiteren Verlauf nach Rituximab-Behandlung zeigten sich erhebliche Schwankungen innerhalb der Frequenzen peripherer, autoreaktiver IL-10<sup>+</sup> Zellen. Die Unterteilung der Patienten in Abhängigkeit des klinischen Bildes (Abb. 24b,c) ließ angesichts der innerhalb der Patientenkohorte bereits vor Therapie (Tag 0) bestehenden starken Schwankungsbreite autoreaktiver IL-10<sup>+</sup> Zellen (sehr gut zu sehen in Abb. 24b,c) ebenfalls keine klaren Aussagen bezüglich der Wirkung von Rituximab auf Dsg3-spezifische IL-10<sup>+</sup> Lymphozyten zu.



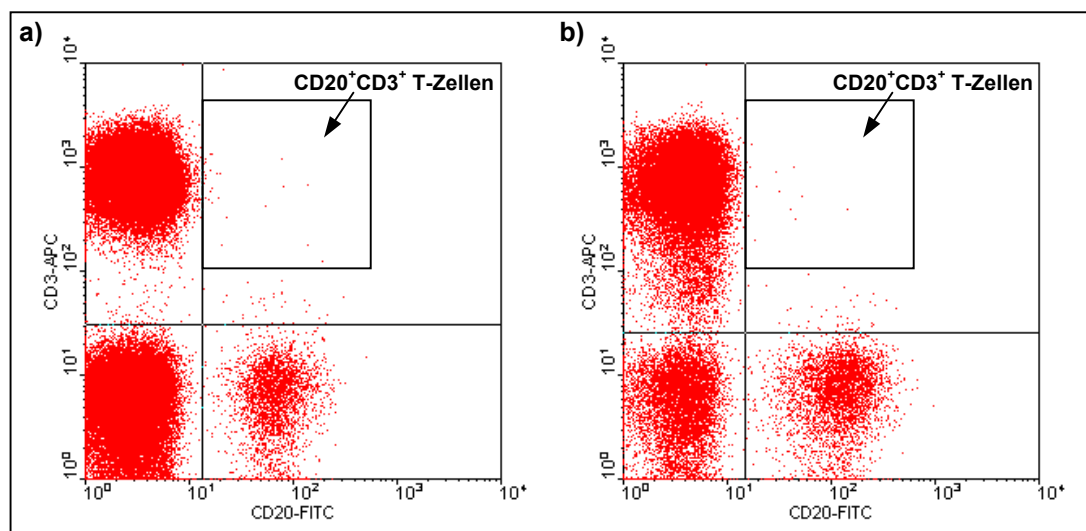
**Abb. 24: Die Wirkung von Rituximab auf autoreaktive IL-10<sup>+</sup> Zellen.** Abb. 24 zeigt die Frequenzen Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifischer IL-10<sup>+</sup> Lymphozyten nach B-Zell-depletierender Therapie. Bei der analytischen Betrachtung aller Patienten (Abb. 24a) sowie bei Unterteilung der Patienten nach ihrem klinischen Befinden (Abb. 24b,c) sind bereits vor (Tag 0), aber auch nach, Therapie erheblichen Schwankungen innerhalb der Population IL-10<sup>+</sup> Zellen detektierbar, die keine klare Interpretation der ermittelten Ergebnisse zulassen. Statistisch signifikante Veränderungen in Relation zum Ausgangswert vor Therapiebeginn liegen vor und sind folgendermaßen dargestellt: \*  $p<0,05$ .

#### 4.1.7. CD20-Expression auf T-Zellen

Leandro et al. (Leandro et al., 2006) konnten bei RA-Patienten eine Population von CD3<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut nachweisen, die auf ihrer Oberfläche in geringen Mengen CD20 exprimierten (CD3<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup> T-Zellen). Diese Population wies innerhalb der Patientenkohorte eine relative große Spannweite auf (0,38% - 20,8%, Median: 3,15% aller T-Zellen). Durch Behandlung der RA-Patienten mit dem anti-CD20 mAk, Rituximab, wurde zusätzlich zu den B-Lymphozyten diese CD3<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup> exprimierende T-Zell-Population depletiert.

Um zu prüfen, ob es sich bei der Abnahme der autoreaktiven Th-Zellen im peripheren Blut von PV-Patienten nach B-Zell-depletierender Therapie um eine mögliche direkte Rituximab-vermittelte Eliminierung dieser CD3<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup> T-Zellen handelt, wurden die PBMC der PV-Patienten vor Rituximab-Behandlung hinsichtlich der Oberflächenmarker CD3 und CD20 untersucht. Abb. 25 zeigt repräsentativ zwei Beispiele der Expression des CD20-Moleküls auf Lymphozyten von PV-Patienten vor B-Zell-depletierender Therapie. PV-Patienten besitzen im Gegensatz zu RA-Patienten keine Population CD3<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup> T-Zellen (0,023% - 0,477%, Median: 0,074% aller T-Zellen). Abb. 25a zeigt die FACS-Analyse der Lymphozyten eines PV-Patienten (PV1), dessen Anteil an CD3<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup> T-Zellen 0,023% aller T-Zellen betrug. Der in Abb. 25b dargestellte PV-Patient (PV5) besaß eine CD20<sup>low</sup> T-Zell-Population von 0,068% aller T-Zellen. Die Population an CD3<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup> T-Zellen in gesunden Kontrollpersonen hatte eine den PV-Patienten vergleichbare Größe (0,057% - 0,26%, Median: 0,11% aller T-Zellen), sodass keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich dieser Population zwischen gesunden Kontrollen und PV-Patienten ersichtlich waren.

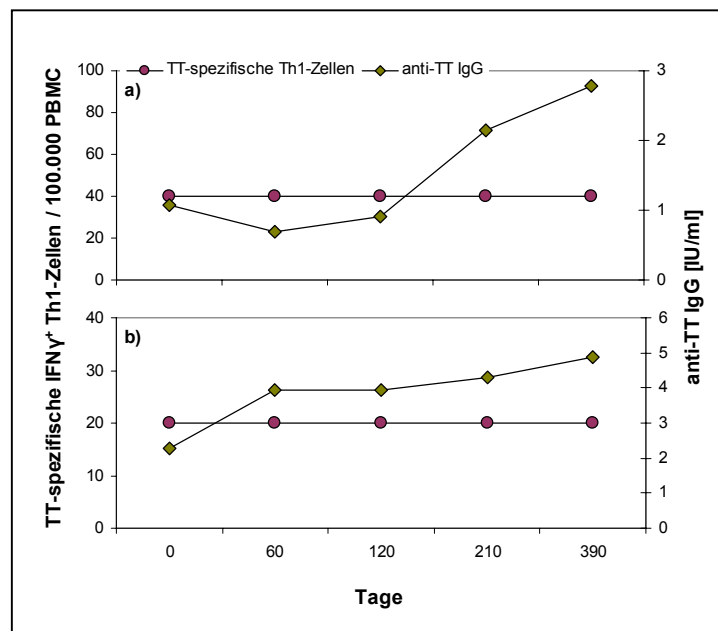
Daher ist die in Abb. 23 dargestellte Abnahme Dsg3-spezifischer Th-Zellen höchstwahrscheinlich nicht auf eine direkte Rituximab-vermittelte Depletion zurückzuführen.



**Abb. 25: Die CD20-Expression auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen bei Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten.** Dargestellt ist die Expression von CD20 auf den Lymphozyten zweier repräsentativer PV-Patienten (PV1, Abb. 25a; PV5, Abb. 25b). Beide Patienten besitzen keine Population CD3<sup>+</sup>CD20<sup>low</sup> exprimierender T-Zellen.

#### 4.1.8. Tetanus Toxoid (TT)-spezifische IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Th1-Zellen bleiben von einer B-Zell-Depletion unbeeinflusst

Neben der Untersuchung des Einflusses von Rituximab auf Dsg3-spezifische Th-Zellen, wurde weiterhin die Wirkung der B-Zell-Depletion auf Th-Zellen, deren Spezifität sich gegen ein körperfremdes Antigen richtet, getestet. Zielobjekt der Analyse waren dabei TT-spezifische CD4<sup>+</sup> Th1-Zellen, welche nach Vakzination mit TT generiert werden. Vor Rituximab-Behandlung wurden die TT-spezifischen IgG-Titer untersucht, um sicherzustellen, dass die Patienten eine Immunantwort gegenüber TT entwickelt hatten. Lediglich bei zwei der zwölf Patienten konnten TT-spezifische IgG-Antikörper im Serum detektiert werden. Grund hierfür ist wahrscheinlich eine im Laufe des Lebens nachlassende Impfbereitschaft der Patienten. In den zwei seropositiven Patienten wurden vor und während des zwölfmonatigen Untersuchungszeitraums nach Rituximab-Behandlung die TT-spezifischen IgG-Antikörperkonzentrationen im Serum bestimmt. Zusätzlich erfolgte zu den festgelegten Zeitpunkten mittels MACS die Isolation TT-spezifischer Th1-Zellen. Abb. 26 zeigt die Frequenzen TT-reaktiver IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Th1-Zellen und die IgG-Antikörper gegen TT im Serum der zwei getesteten PV-Patienten. Im peripheren Blut beider Patienten (PV5, Abb. 26a und PV11, Abb. 26b) blieb die Anzahl TT-reaktiver Th1-Zellen über den kompletten zwölfmonatigen Zeitraum unverändert (40 bzw. 20 TT-reaktive Th1-Zellen/10<sup>5</sup> PBMC). Im Gegensatz dazu fielen die Frequenzen Dsg3-spezifischer, autoreaktiver Th1- und Th2-Zellen derselben Patienten im Zeitraum bis sechs Monate nach Therapie um etwa 50% bzw. 70% ab. Während die Dsg3-spezifischen Autoantikörper nach Gabe von Rituximab stark absanken, stiegen die zirkulierenden TT-reaktiven IgG-Antikörper in den zwei untersuchten Patienten an (Abb. 26).

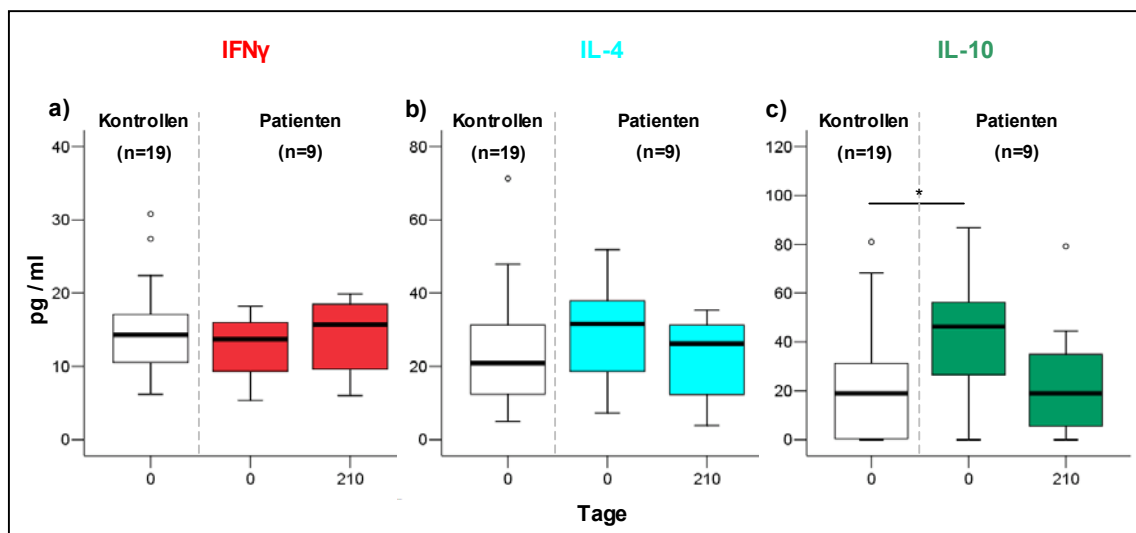


**Abb. 26:** Die Wirkung von Rituximab auf Tetanus Toxoid (TT)-spezifische IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Helfer (Th)1-Zellen und TT-spezifische IgG-Antikörper im Serum von Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten. Dargestellt ist die Zahl TT-spezifischer Th1-Zellen und des TT-spezifischen IgG bei zwei PV-Patienten (PV5, Abb. 26a; PV11, Abb. 26b) nach Rituximab-Therapie. Die TT-spezifischen Th1-Zellen blieben von der B-Zell-Depletion vollkommen unbeeinflusst, während die TT-reaktiven IgG-Antikörper nach Therapie anstiegen.

#### 4.1.9. Rituximab-induzierte Reduktion des Serum-IL-10 bei PV-Patienten

Zusätzlich zu den autoreaktiven IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Th1-Zellen, IL-4<sup>+</sup> Th2-Zellen und IL-10<sup>+</sup> Zellen wurde bei neun der zwölf PV-Patienten die Konzentration pro- und antiinflammatorischer Interleukine im Serum vor Rituximab-Therapie (Tag 0) und sechs Monate nach Behandlung (Tag 210), zu einem Zeitpunkt, an dem sich alle Patienten in klinischer Remission befanden, analysiert. Die Kontrollgruppe bestand aus 19 gesunden Probanden. In Abb. 27 ist die Verteilung der in den Seren der Patienten (farbig) und der Kontrollpersonen (weiß) gemessenen Interleukin-Konzentrationen zusammengefasst. Bei vergleichender Betrachtung der vor Therapie (Tag 0) im Serum der Patienten detektierten IFN $\gamma$ - (Abb. 27a) und IL-4- (Abb. 27b) Konzentrationen mit denen der Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kohorten nachgewiesen werden. Auch sechs Monate nach Therapie blieb der Serum-Spiegel dieser Interleukine relativ konstant und damit von der B-Zell-Depletion unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu war der Gehalt an IL-10 in den Seren der untersuchten PV-Patienten vor Rituximab-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Mann-Whitney-U-Test:  $p=0,038$ ; Abb. 27c). Sechs Monate nach Therapie (Tag 210), zum Zeitpunkt der klinischen Remission, zeigte sich eine starke Reduktion der IL-10-Serumkonzentration bei den PV-Patienten auf zur Kontrollgruppe analoge Werte.

Rituximab bewirkt eine Normalisierung der signifikant erhöhten IL-10-Konzentration in den Seren von PV-Patienten mit chronisch-aktiver Erkrankung, die möglicherweise eine direkte Folge der B-Zell-Depletion und somit der Eliminierung IL-10-produzierender Zellen sein könnte.



**Abb. 27: Veränderungen der Serumkonzentration von IFN $\gamma$ , IL-4 und IL-10 nach B-Zell-Depletion.** Der Gehalt an IFN $\gamma$  (Abb. 27a) und IL-4 (Abb. 27b) in den Seren der Patienten war im Zustand der chronisch-aktiven Krankheit (Tag 0) und in Remission (Tag 210) vergleichbar und blieb daher von der B-Zell-Depletion unbeeinflusst. IL-10 (Abb. 27c) dagegen war vor Therapie in den Seren der Patienten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht und nahm im sechsmonatigen Zeitraum nach Applikation von Rituximab auf zur Kontrollgruppe vergleichbare Werte ab. Statistisch signifikante Unterschiede der IL-10-Serumkonzentration zwischen chronisch-aktiven PV-Patienten und gesunden Kontrollpersonen liegen vor und sind folgendermaßen dargestellt: \*  $p < 0,05$ .

#### 4.1.10. Klinischer Verlauf nach B-Zell-Depletion bei Trägern verschiedener HLA-Klasse II - Allele

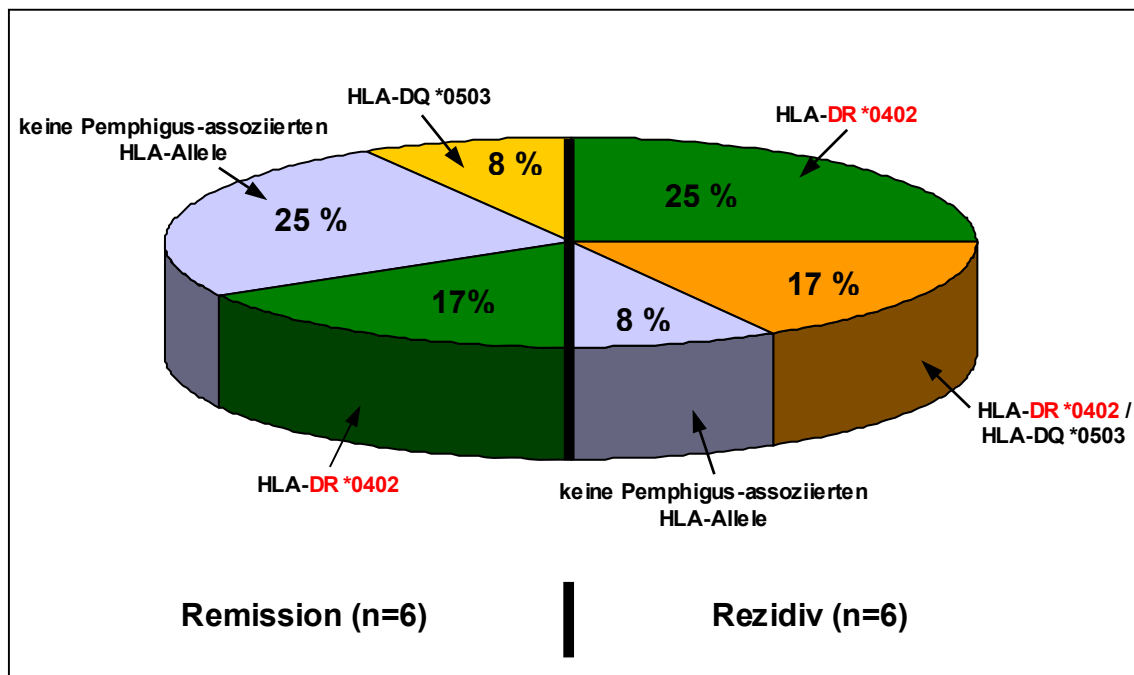
Der klinische Verlauf der Erkrankung bei den Rituximab-behandelten zwölf PV-Patienten wurde über einen 15- bis 36-monatigen Zeitraum nach Therapie dokumentiert. Sechs der zwölf Patienten (50%) befanden sich zum jeweiligen Beobachtungsendpunkt noch in Remission. Die anderen sechs Patienten zeigten eine klinische Verschlechterung des Krankheitsbildes 12 bis 25 Monate nach Therapie. Eine genaue Charakteristik der Rituximab-behandelten PV-Patienten hinsichtlich ihres HLA-Klasse II - Genotyps und ihres klinischen Zustandes zum Beobachtungsendpunkt ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3:** Klinischer Zustand der Rituximab-behandelten Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten.

Patient	HLA-Klasse II - Allele		verfolgter Zeitraum nach Rituximab [Monate]	Klinischer Status
	HLA-DRβ1	HLA-DQβ1		
PV1	<b>0402</b> , 1401	0302, <b>0503</b>	36	Rezidiv nach 25 Monaten
PV2	0804,1305	0301, 0402	34	Remission
PV3	<b>0402</b> , 1101	0301, 0302	31	Rezidiv nach 16 Monaten
PV4	0801, 1401	0402, <b>0503</b>	30	Remission
PV5	<b>0402</b> , 1101	0302, 0301	26	Rezidiv nach 12 Monaten
PV6	0102, 1401	0501, 0502	26	Remission
PV7	<b>0402</b> , 0405	02**, 0302	25	Remission
PV8	0701, 1401	0202, 0502	23	Rezidiv nach 21 Monaten
PV9	<b>0402</b> , 1404	0302, <b>0503</b>	22	Rezidiv nach 12 Monaten
PV10	<b>0402</b> , 1301	0302, 0603	20	Rezidiv nach 12 Monaten
PV11	0804, 1501	0301, 0602	17	Remission
PV12	<b>0402</b> , 1102	0302, 0319	15	Remission

Die Ursache der unterschiedlichen klinischen Verläufe der Patienten in der Langzeitbeobachtung nach Rituximab-Therapie liegt nicht in einer unvollständigen B-Zell-Depletion in der Gruppe der Rezidiv-Patienten nach Rituximab-Therapie, oder in einem schnelleren Wiederauftreten der peripheren B-Zellen in dieser Patientengruppe begründet (siehe Abb. 16c). Auffällig ist dagegen eine offensichtliche Assoziation der klinischen Verschlechterung mit dem HLA-Klasse II - Allel HLA-DRβ1 \*0402. Fünf der sechs Rezidivpatienten besitzen dieses genetische Merkmal. Nur ein Patient, der eine klinische Verschlechterung 21 Monate nach Therapie aufwies, zeigt nicht diese HLA-Assoziation. Dagegen haben nur zwei der sechs

Remissionspatienten diesen HLA-Typ, wobei bei einem der beiden Patienten die B-Zell-depletierende Behandlung zum Beobachtungsendpunkt erst 15 Monate zurücklag (PV12). Da vier der fünf HLA-DR $\beta$ 1 \*0402-positiven Rezidiv-Patienten die klinische Verschlechterung bereits 12-16 Monate nach Therapie zeigten, ist eine weitere Beobachtung dieses Patienten (PV12) erforderlich, um eine mögliche Verbindung zwischen einem zeitnahen klinischen Rezidiv nach B-Zell-depletierender Behandlung und dem HLA-DR $\beta$ 1 \*0402 - Allel genauer zu beleuchten. Die prozentuale Verteilung der PV-assoziierten HLA-Klasse II - Allele HLA-DR $\beta$ 1 \*0402 und HLA-DQ $\beta$ 1 \*0503 innerhalb aller Patienten, unterteilt in Remissionspatienten (links) und Rezidiv-Patienten (rechts) ist in Abb. 28 dargestellt.



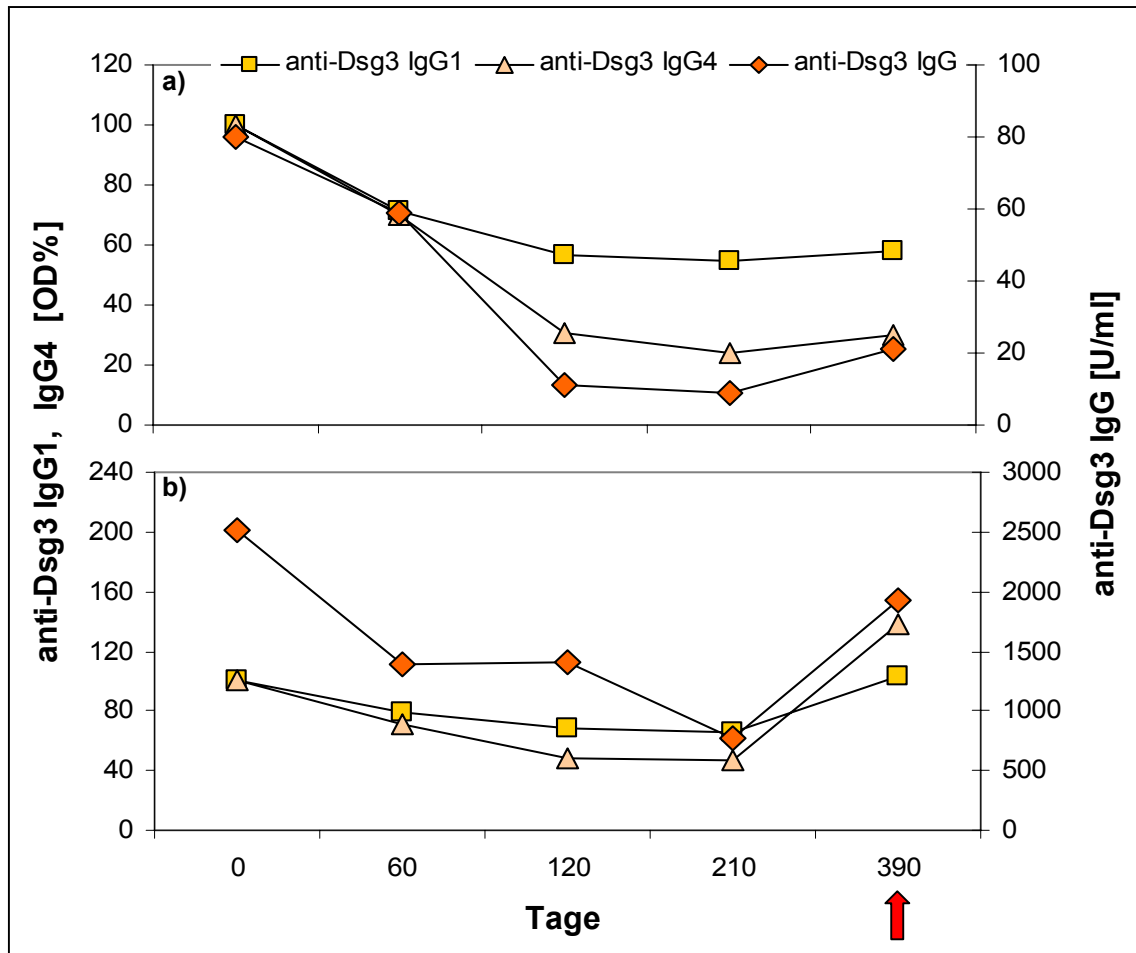
**Abb. 28: Klinischer Verlauf nach B-Zell-Depletion bei Trägern verschiedener HLA-Klasse II - Allele.** Abgebildet ist die prozentuale Verteilung der Pemphigus vulgaris (PV)-assoziierten HLA-Klasse II - Allele, HLA-DR $\beta$ 1 \*0402 und HLA-DQ $\beta$ 1 \*0503, innerhalb der zwölf Rituximab-behandelten PV-Patienten (definiert als 100%) in Bezug zu ihrem klinischen Verlauf. Die Hälfte der Patienten befand sich zum jeweiligen Beobachtungsendpunkt weiterhin in klinischer Remission (links), während die anderen sechs Patienten bereits eine Wiederaufflammen der Krankheitssymptome zeigten (rechts). Fünf der sechs Rezidiv-Patienten besitzen das Allel HLA-DR $\beta$ 1 \*0402.

#### 4.1.11. Rezidiv des Pemphigus trotz depletierter bzw. stark verminderter peripherer B-Zellen

Drei der zwölf Rituximab-behandelten PV-Patienten zeigten eine klinische Verschlechterung des Krankheitsbildes innerhalb des zwölfmonatigen Beobachtungszeitraums. Besonders auffällig war ein sehr differentes Bild dieser drei Patienten hinsichtlich der Anzahl peripherer CD19<sup>+</sup> B-Zellen zum Zeitpunkt des Rezidivs. Einer der Patienten (PV5), der hier nicht genauer betrachtet werden soll, zeigte zum Zeitpunkt des Rezidivs eine komplette Wiederherstellung der vor Rituximab-Therapie detektierten Zahl peripherer CD19<sup>+</sup> B-Zellen sowie einen Wiederanstieg

der zirkulierenden Dsg3-spezifischen IgG-Autoantikörper und der autoreaktiven Th1- und Th2-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Die anderen zwei Patienten (PV9; Abb. 29a, 30a und PV10; Abb. 29b, 30b) wiesen zum Zeitpunkt der klinischen Verschlechterung, zwölf Monate nach Therapie, ebenfalls einen Wiederanstieg Dsg3-spezifischer IgG-Autoantikörper, besonders des pathogenetisch bedeutsamen IgG4-Subtyps, im Serum auf (Abb. 29).

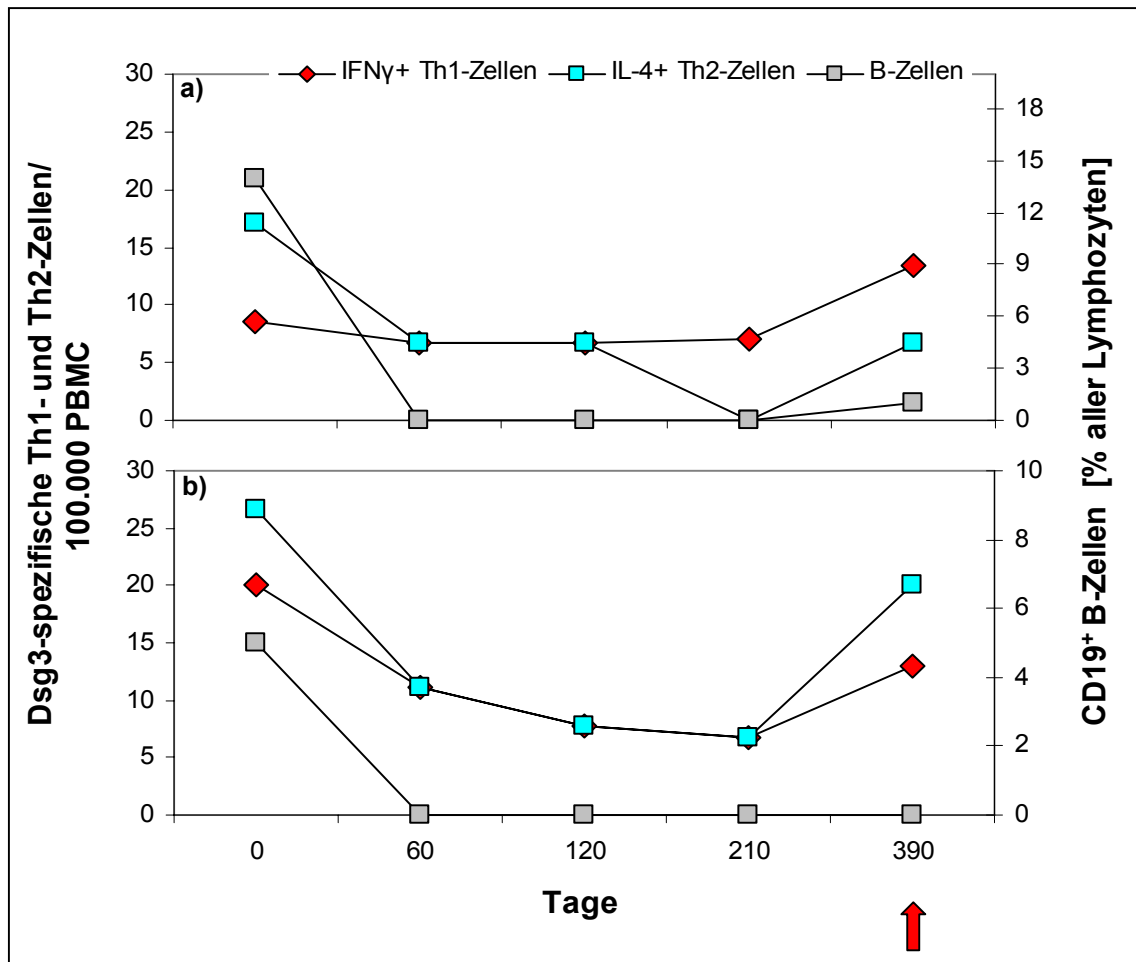


**Abb. 29: Autoantikörper-Verlauf im Serum von Pemphigus-Patienten mit klinischem Rezidiv.** Dargestellt ist der Abfall der Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifischen IgG-, IgG1- und IgG4-Autoantikörper im Serum zweier Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten nach Rituximab-Therapie. Diese Reduktion korrelierte gut mit der klinischen Remission sechs Monate (Tag 210) nach Therapie. Zum Zeitpunkt der klinischen Verschlechterung zwölf Monate nach Therapie (Tag 390, roter Pfeil) war ein Wiederanstieg der Autoantikörper (besonders des Gesamt-IgG und IgG4), zu verzeichnen. Die Verminderung der IgG1- und IgG4 - Subtypen ist als prozentuale Abweichung vom Ausgangswert (100%) dargestellt.

Auch die Frequenz der autoreaktiven Th1- und Th2- Zellen im peripheren Blut stieg, parallel zur Verschlechterung des klinischen Zustands der Patienten, erneut an (Abb. 30). Überraschenderweise konnten in diesen zwei Patienten zum Zeitpunkt des Rezidivs jedoch nur sehr wenige (Abb. 30a) bzw. keine (Abb. 30b) peripheren B-Zellen nachgewiesen werden. Da die B-Lymphozyten in ihrer Funktion als APC und autoantikörperproduzierende Zellen beim PV eine entscheidende pathogenetische Bedeutung besitzen, war die trotz bestehender starker B-Zell-Verminderung (Abb. 30a) oder B-Zell-Depletion (Abb. 30b) auftretende erneute klinische



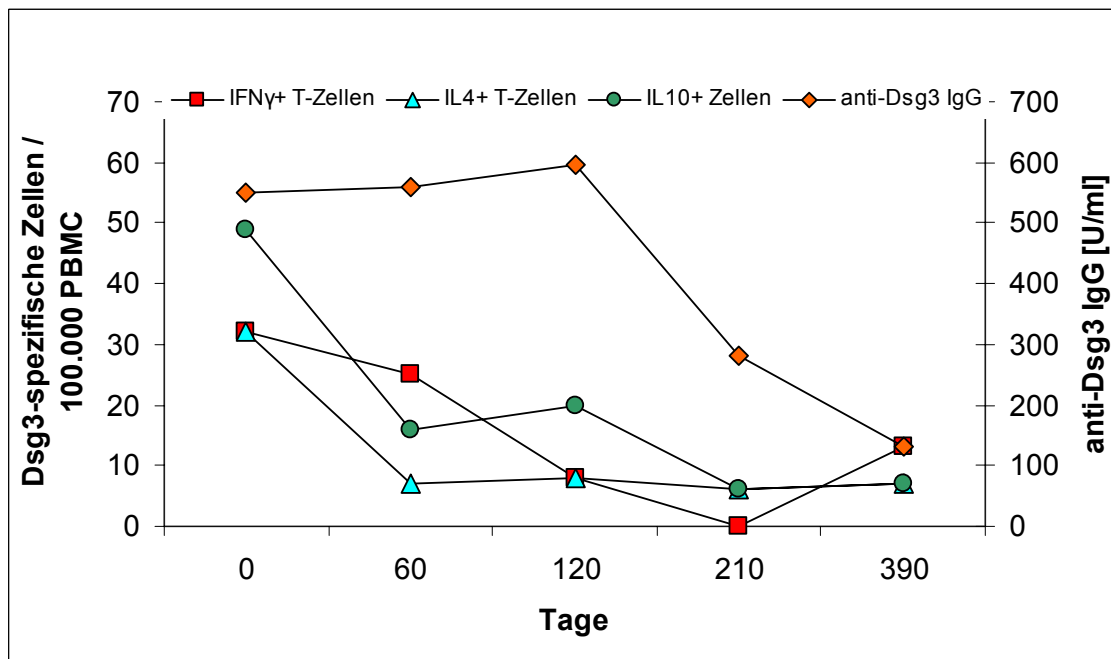
Verschlechterung der zwei PV-Patienten zwölf Monate nach Rituximab-Therapie sehr überraschend. Es besteht die Möglichkeit, dass es bei diesen Patienten zum Zeitpunkt des Rezidivs bereits zu einem Wiederauftreten der B-Zellen, einschließlich autoreaktiver B-Lymphozyten, in den peripheren lymphatischen Organen kam bzw. die B-Zellen in diesen Geweben nach Rituximab-Behandlung nur unvollständig depletiert wurden und dort als sehr potente APC für Dsg3-spezifische Th-Zellen residierten.



**Abb. 30: Frequenzen autoreaktiver T-Helfer (Th)- und B-Zellen im peripheren Blut von Pemphigus-Patienten mit klinischem Rezidiv.** Illustriert ist die durch Rituximab-Therapie induzierte Depletion von peripheren B-Zellen bzw. die Reduktion von autoreaktiven Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifischen Th-Zellen bis sechs Monate (Tag 210) nach Therapie. Zum Zeitpunkt des Rezidivs, zwölf Monate (Tag 390, roter Pfeil) nach Therapie, kam es zu einem Wiederanstieg der autoreaktiven Th-Zellen, während die peripheren B-Zellen in diesen zwei Patienten jedoch stark vermindert (Abb. 30a) bzw. depletiert (Abb. 30b) blieben.

Die Wirkung der Rituximab-induzierten B-Zell-Depletion auf die Frequenz autoreaktiver Th-Zellen und die Autoantikörperkonzentration im Serum ist eindrucksvoll in Abb. 31 dargestellt. Der hier abgebildete Patient (PV1) zeigte nach Gabe von Rituximab eine unmittelbare und vollständige Depletion der peripheren B-Zellen (Daten nicht gezeigt). Nach Eliminierung der B-Lymphozyten sank die Zahl der autoreaktiven IFN $\gamma$ <sup>+</sup>- und auch der IL-4<sup>+</sup> Th-Zellen im peripheren Blut unmittelbar ab und blieb über den kompletten zwölfmonatigen Beobachtungszeitraum vermindert. Im Gegensatz dazu zeigten die zirkulierenden Dsg3-

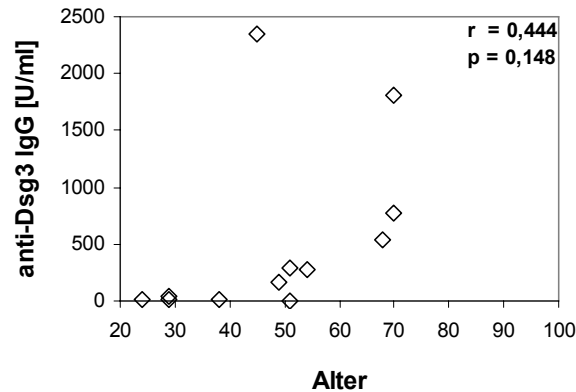
spezifische Autoantikörper erst mehr als drei Monate (>120 Tage) nach Therapie eine signifikante Abnahme, was wahrscheinlich auf die Persistenz autoantikörperproduzierender PZ zurückzuführen war (Abb. 31).



**Abb. 31: Autoantikörpertiter und Frequenz autoreaktiver Zellen eines repräsentativen Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten nach Rituximab-Therapie.** Dargestellt sind die Autoantikörperkonzentrationen und Frequenzen Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifischer IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-, IL-4<sup>+</sup>- und IL-10<sup>+</sup> Zellen des PV-Patienten PV1 im zeitlichen Verlauf nach Rituximab-Therapie. Im Gegensatz zum sofortigen Abfall der autoreaktiven Zellen nach B-Zell-Depletion, blieb die Konzentration der Dsg3-spezifischen IgG-Antikörper über einen Zeitraum von etwa 120 Tagen nach Rituximab konstant und sank erst mit zeitlicher Verzögerung signifikant ab.

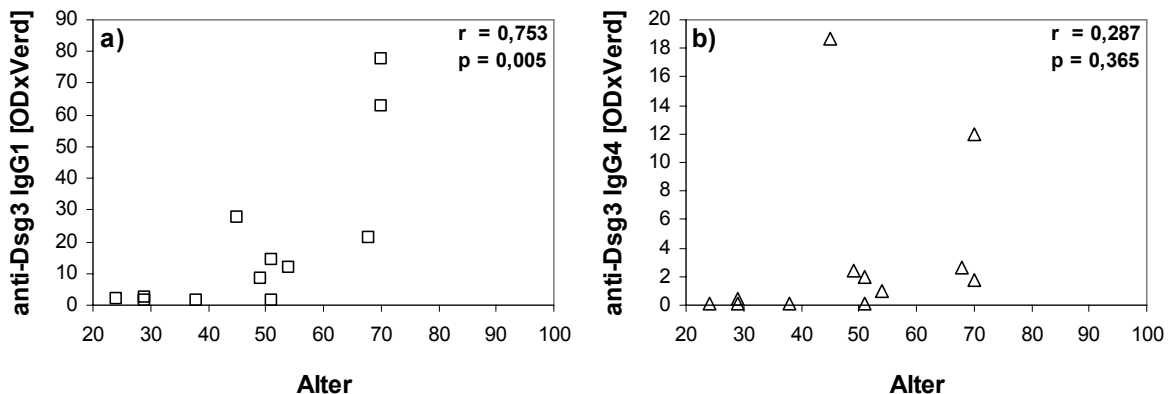
#### 4.1.12. Persistenz Dsg3-spezifischer Autoantikörper bei PV-Patienten in Remission

Die in Kapitel 4.1.3. beschriebene, große Schwankungsbreite der Serumkonzentrationen Dsg3-spezifischer IgG-Autoantikörper vor Rituximab-Therapie (29 – 2521 U/ml) war sechs Monate nach Therapie (Tag 210), zu einem Zeitpunkt, an dem sich alle zwölf Patienten in kompletter Remission befanden, ebenfalls nachweisbar (4 – 2352 U/ml). Auch nach B-Zell-depletierender Therapie konnten die sehr hohen zirkulierenden Autoantikörperkonzentrationen vornehmlich bei älteren Patienten detektiert werden. Daher wurde das Alter der Patienten zu den jeweiligen, sechs Monate nach Therapie, ermittelten Antikörperkonzentrationen in Beziehung gesetzt. In Abb. 32 ist ersichtlich, dass sechs Monate nach Therapie, zu einem Zeitpunkt der klinischen Remission, die vor Rituximab-Behandlung bestehende signifikante Korrelation zwischen dem Alter und den autoreaktiven IgG-Konzentrationen im Serum nicht mehr nachweisbar ist ( $p=0,148$ ). Allerdings ist die Tendenz einer mit dem Alter zunehmenden Konzentration zirkulierender Autoantikörper weiterhin erkennbar.



**Abb. 32: Die Abhängigkeit autoreaktiver IgG-Antikörpertiter vom Alter der Patienten sechs Monate nach Rituximab-Behandlung.** Veranschaulicht ist die Korrelation zwischen der Serumkonzentration Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifischer IgG-Autoantikörper und dem Alter der Patienten.  $r$  – Korrelationskoeffizient,  $p$  – Irrtumswahrscheinlichkeit

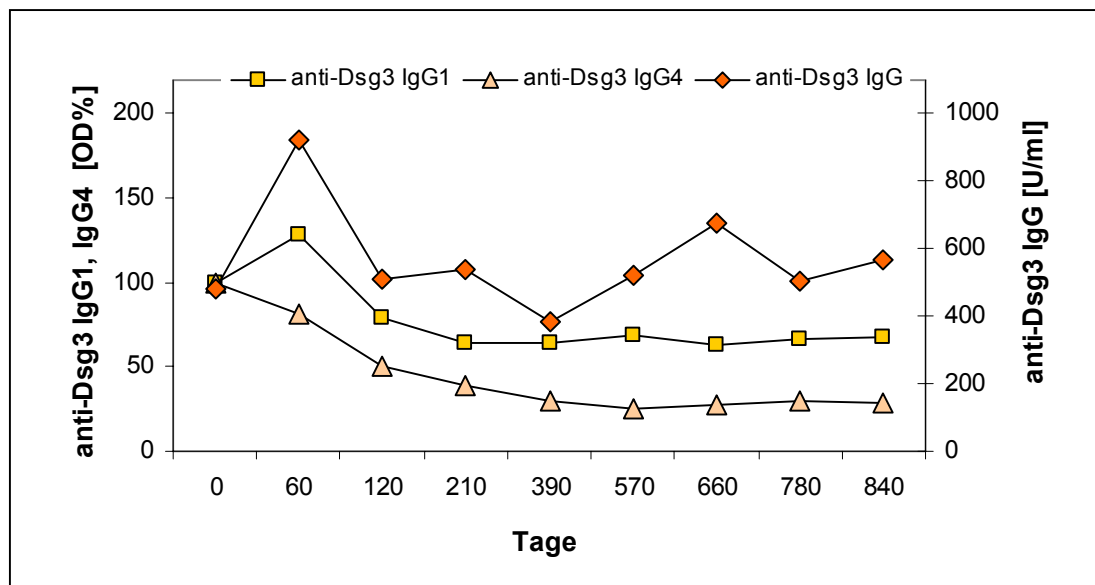
Im Gegensatz zum Gesamt-IgG zeigte die Beziehung zwischen Dsg3-spezifischen IgG1- bzw. IgG4-Antikörpern und dem Alter der Patienten eine Analogie zum Verhalten vor B-Zell-depletierender Therapie. Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen dem Alter und IgG1-Autoantikörpern ( $p=0,005$ ; Abb. 33a), jedoch nicht zwischen dem Alter und IgG4-Antikörpern ( $p=0,365$ ; Abb. 33b) im Serum.



**Abb. 33: Die Abhängigkeit der Serumkonzentration autoreaktiver IgG1- und IgG4-Antikörper vom Alter der Patienten sechs Monate nach Rituximab-Therapie.** Veranschaulicht ist die Korrelation zwischen der Serumkonzentration Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifischer Autoantikörper-Subtypen (IgG1, Abb. 33a; IgG4, Abb. 33b) und dem Alter der Patienten. Die Bestimmung der IgG1- und IgG4-Antikörper erfolgte mittels ELISA (MESACUP Dsg3 Test), wobei die Seren aufgrund der sehr stark variierenden Antikörperkonzentrationen laut Herstellerangaben soweit verdünnt wurden, dass sie bei der photometrischen Messung im Linearitätsbereich detektiert werden konnten. Für die Darstellung der Ergebnisse, wurde die ermittelte optische Dichte (OD) mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.  $r$  – Korrelationskoeffizient,  $p$  – Irrtumswahrscheinlichkeit

Die in Abb. 32 und 33 illustrierten Resultate unterstützen die Hypothese, dass es sich bei den trotz Remission im Serum der vorrangig älteren PV-Patienten persistierenden Autoantikörper um Produkte langlebiger autoreaktiver PZ handelt. Die Konzentrationen der Dsg3-spezifischen IgG-Antikörper und der autoreaktiven IgG1- und IgG4-Subtypen im Serum eines PV-Patienten (PV2), der trotz Erreichen einer kompletten Remission deutliche Autoantikörpertiter aufwies, wurden über einen Zeitraum von 27 Monaten (Tag 840) nach Rituximab-Therapie untersucht

(Abb. 34). Der Gehalt an autoreaktivem Gesamt-IgG im Serum des Patienten blieb über den kompletten Beobachtungszeitraum weitgehend konstant und stark erhöht. Die Dsg3-spezifischen IgG4-Antikörper dagegen nahmen, im Einklang mit der klinischen Besserung des zu Beginn der Behandlung chronisch-aktiven Patienten, während der ersten zwölf Monate (Tag 390) auf 30% des vor Rituximab-Therapie ermittelten Ausgangswertes ab und blieben anschließend bis Tag 840 mit 25-28% des Ursprungswertes konstant niedrig. Die Serum-Titer autoreaktiver IgG1-Antikörper sanken dagegen innerhalb der ersten sechs Monate nach B-Zell-Depletion nur auf 64% des Ausgangswertes ab und blieben während des kompletten Zeitraums auf diesem Niveau (Abb. 34).



**Abb. 34: Persistenz Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifischer IgG-Autoantikörper im Serum eines Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten in klinischer Remission.** Veranschaulicht ist die im Einklang mit der klinischen Remission stehende Abnahme der Dsg3-spezifischen IgG1- und IgG4-Autoantikörper im Serum des Patienten PV2. Die Abnahme des autoreaktiven IgG1 zeigte dabei eine viel geringere Ausprägung als die des IgG4. Dagegen blieb der Titer des autoreaktiven Gesamt-IgG im Serum des Patienten auch nach Rituximab-Behandlung dauerhaft erhöht.

Die hier dargestellten Ergebnisse und die Beobachtung, dass in den Seren aller zwölf PV-Patienten in Relation zu den IgG4-Autoantikörpern etwa vier- bis fünffach höhere Konzentrationen Dsg3-spezifischer IgG1-Antikörper (Daten nicht gezeigt) nachweisbar waren, lassen vermuten, dass Dsg3-spezifische IgG1-Autoantikörper den größten Bestandteil der persistierenden IgG-Autoantikörper im Serum ausmachen.

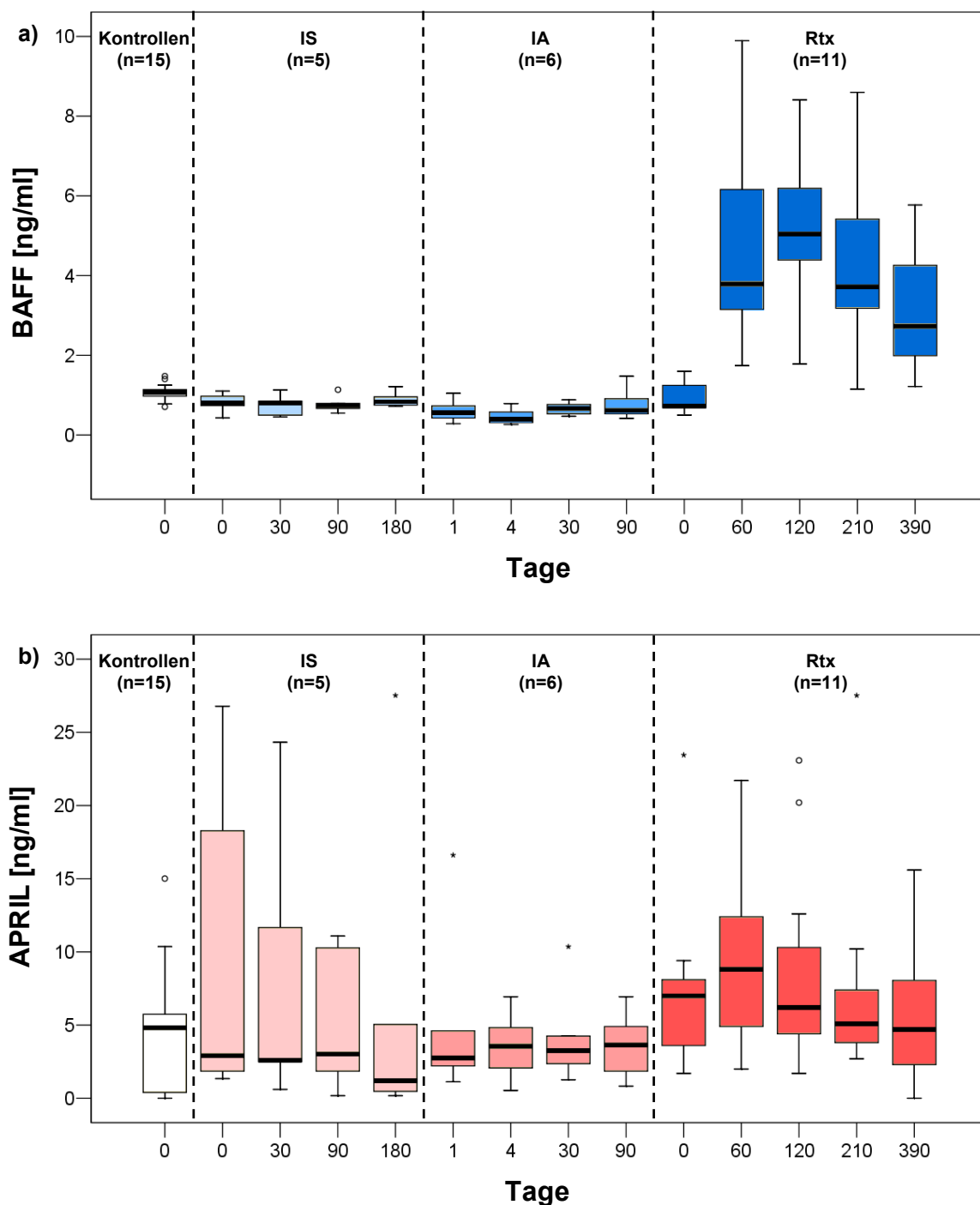
## **4.2. Der Einfluss von Rituximab auf die humorale Immunantwort beim Pemphigus vulgaris in Hinblick auf B-Zell-aktivierende Faktoren und pathogenspezifische bzw. autoreaktive Antikörper**

### **4.2.1. Rituximab führt zu einer ausgeprägten BAFF-Induktion bei PV-Patienten**

Die Konzentration von BAFF und APRIL, zwei wichtigen Faktoren für das Überleben und die Bildung von B-Lymphozyten, wurde in den Seren von PV-Patienten und gesunden Kontrollen untersucht. Hierbei war von besonderem Interesse, ob es eine prinzipielle Überexpression dieser Mediatoren beim Pemphigus gibt, wie sie für zahlreiche andere B-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankungen bereits beschrieben wurde bzw. ob verschiedene Therapieformen einen Einfluss auf die Bildung dieser Faktoren ausüben. Daher wurden Serumproben von Patienten unter alleiniger immunsuppressiver Behandlung (IS) und von Patienten, die eine adjuvante Immunadsorption (IA) bzw. adjuvante Rituximab-Behandlung (Rtx) erhielten, zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlungsbeginn analysiert.

In den Seren der untersuchten PV-Patienten konnte zu Beginn der jeweiligen Behandlung (IS und Rtx: d0, IA: d1) kein offensichtlicher Unterschied der BAFF-Konzentration im Vergleich zu gesunden Kontrollen detektiert werden. Die vergleichende Analyse des zirkulierenden BAFFs innerhalb der drei Patientengruppen vor Therapie (IS und Rtx: d0, IA: d1) ergab ebenfalls keine statistisch signifikanten Differenzen (Kruskal-Wallis-Test:  $p=0,139$ ). Weiterhin zeigte sich in den Seren IS-behandelter bzw. IA-behandelter Patienten keine signifikante Änderung der BAFF-Konzentration (Abb. 35a) im zeitlichen Verlauf der Therapien (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test:  $p>0,05$ ). Die Behandlung der PV-Patienten mit IS und adjuvanten Rtx führte dagegen bereits einen Monat nach Therapie zu einem im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mann-Whitney-U-Test:  $p<0,0001$ ) bzw. zu den Gruppen IS- und IA-behandelter PV-Patienten (Kruskal-Wallis-Test:  $p=0,0004$ ) statistisch hochgradig signifikanten Anstieg von BAFF (Abb. 35a). Zur Untermauerung des unmittelbaren BAFF-induzierenden Effekts von Rituximab wurden die einen Monat nach Initiierung der jeweiligen Therapie (IS und IA: d30, Rtx: d60) innerhalb der verschiedenen Behandlungsgruppen ermittelten BAFF-Konzentrationen miteinander verglichen. Es konnte ein statistisch hochgradig signifikanter Anstieg (Mann-Whitney-U-Test:  $p=0,0005$  (IS-Rtx) und  $p=0,0002$  (IA-Rtx)) detektiert werden, welcher auch zwölf Monate nach Therapie noch sehr ausgeprägt war (Abb. 35a).

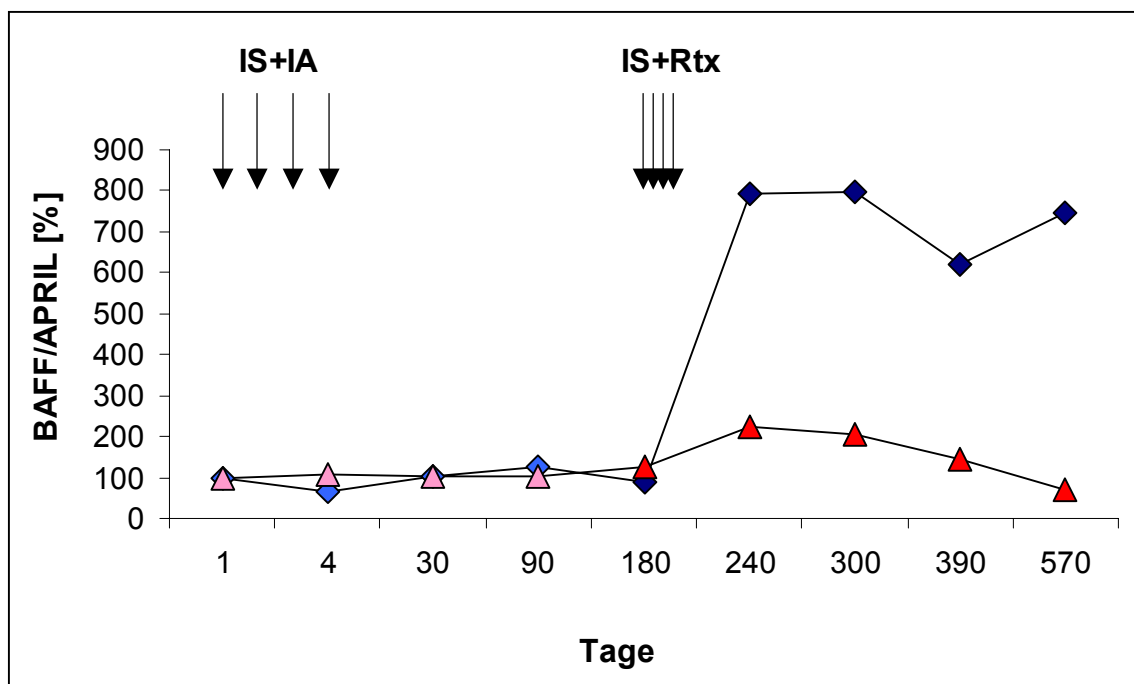
In Abb. 35b sind die APRIL-Serumkonzentrationen gesunder Kontrollenpersonen im Vergleich zu den drei unterschiedlich behandelten Gruppen der PV-Patienten (IS, IA und Rtx) dargestellt. Im Gegensatz zu BAFF fand sich weder bei alleiniger Therapie der Patienten mit IS noch bei zusätzlicher adjuvanter Behandlung mit IA oder Rtx eine signifikante Alteration von APRIL ( $p>0,05$ ).



**Abb. 35: BAFF (*B cell activating factor*)- und APRIL (*a proliferation-inducing ligand*)-Konzentrationen im Serum von Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten unter verschiedenen Behandlungsformen.** Dargestellt sind die Konzentrationen von BAFF (Abb. 35a) und APRIL (Abb. 35b) in den Seren von gesunden Kontrollpersonen (weiß) und PV-Patienten unter alleiniger immunsuppressiver Therapie (IS) oder einer Kombinationstherapie aus IS und adjuvanter Immunadsorption (IA) bzw. IS und adjuvanter Rituximab (Rtx). Einzig die B-Zell-depletierende Behandlung mittels Rituximab führte zu einer ausgeprägten und signifikanten Konzentrationserhöhung von BAFF in den Seren der Patienten (Abb. 35a). Der Serum-APRIL-Gehalt blieb von allen Behandlungsformen unbeeinflusst (Abb. 35b).

Diese Resultate verdeutlichen, dass die Akkumulation von BAFF in den Seren der Rituximab-behandelten PV-Patienten eine Folge der B-Zell-depletierenden Therapie ist. Weder eine alleinige immunsuppressive Behandlung noch eine Kombinationstherapie aus IS und IA konnten eine derartigen BAFF-Induktion bewirken. Ferner ist klar erkennbar, dass unbehandelte PV-Patienten keine grundsätzliche Überexpression der zwei B-Zell-aktivierenden Faktoren, BAFF und APRIL, zeigen.

Drei der elf Rituximab-behandelten PV-Patienten dieser Studie erhielten vor Verabreichung des B-Zell-depletierenden Antikörpers, Rituximab, zusätzlich zur Gabe von IS einen Behandlungszyklus IA. Zur Verdeutlichung der oben geschilderten Resultate sind in Abb. 36 die BAFF- und APRIL-Konzentrationen im Serum eines repräsentativen PV-Patienten (PV7) im zeitlichen Verlauf von Beginn der IA (Tag 1) bis zum Zeitpunkt zwölf Monate nach Rtx-Therapie (Tag 570) dargestellt. Während die immunsuppressive Behandlung in Kombination mit der IA keinen Einfluss auf den Gehalt beider B-Zell-Faktoren im Serum des Patienten hatte, zeigte sich nach Applikation von Rituximab ein etwa achtfacher Anstieg von BAFF.

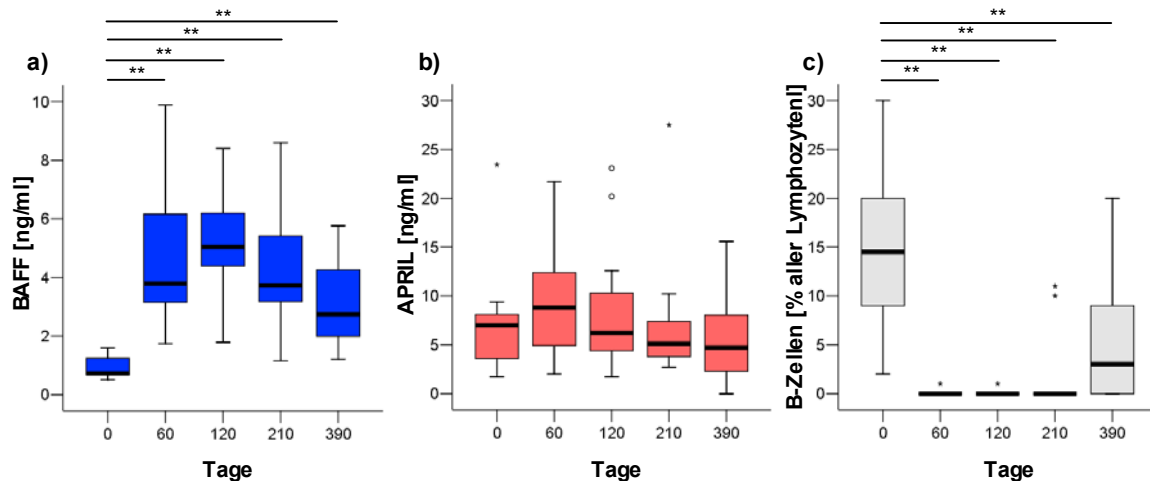


**Abb. 36:** Die relative Änderung der BAFF (*B cell activating factor*)- und APRIL (*a proliferation-inducing ligand*)-Konzentrationen im Serum eines Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten (PV7) nach Immunadsorption (IA; hellblau, rosa) und anschließender Rituximab-Behandlung (Rtx; dunkelblau, rot). Zusammengestellt sind die Serumkonzentrationen von BAFF (Raute, blau) und APRIL (Dreieck, rot) im zeitlichen Verlauf nach Therapie in Relation zum jeweiligen Ausgangswert (definiert als 100%). Während die IA keinen Einfluss auf die BAFF- und APRIL-Konzentrationen im Serum des Patienten hatte, bewirkte die Applikation von Rituximab eine starke und anhaltende Erhöhung von BAFF.

#### 4.2.2. BAFF korreliert unter Rituximab-Therapie invers mit der Zahl peripherer CD19<sup>+</sup> B-Zellen

Der Rituximab-induzierte Anstieg der BAFF-Serumkonzentration (Abb. 35a, 36) veranlasste uns zu einer weitergehenden serologischen und zellulären Untersuchung der Rituximab-behandelten Patientengruppe.

In Abb. 37 sind die BAFF- (Abb. 37a) und APRIL- (Abb. 37b) Konzentrationen in den Seren der elf Rituximab-behandelten PV-Patienten dargestellt. Bereits einen Monat (Tag 60) nach der Verabreichung des Medikaments zeigte sich ein auffälliger und statistisch signifikanter Anstieg ( $p=0,003$ ) von BAFF auf das vier- bis sechsfache des Ausgangswertes, welcher über den kompletten zwölfmonatigen Beobachtungszeitraum der Patienten ( $p\leq 0,007$ ) anhielt. Im Gegensatz dazu blieb der Gehalt an APRIL in den Seren dieser Patienten konstant oder sank sogar geringfügig ab (Abb. 37b). Der bei den Patienten mindestens sechs bis neun Monate anhaltende B-Zell-depletierende Effekt des monoklonalen anti-CD20 Antikörpers ist in Abb. 37c dargestellt.

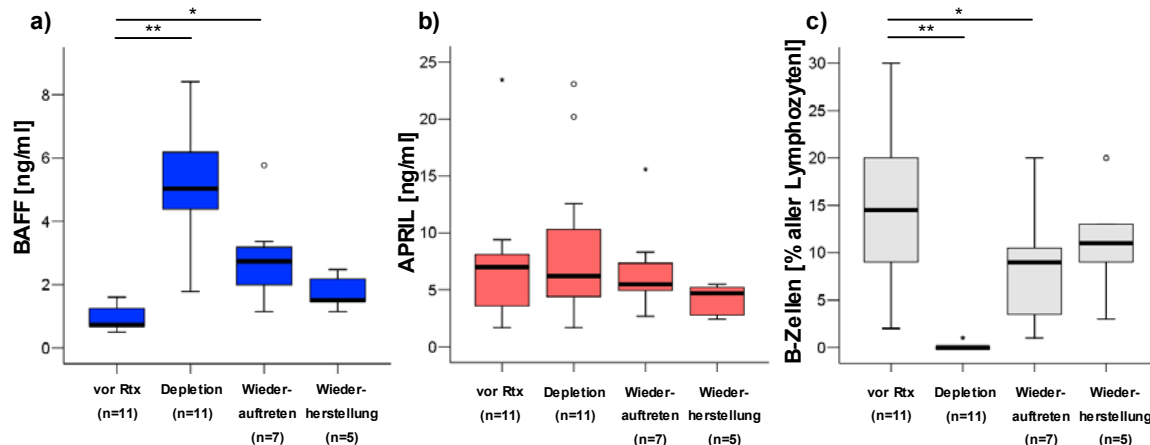


**Abb. 37: Wirkung von Rituximab auf die BAFF (*B cell activating factor*)- und APRIL (*a proliferation-inducing ligand*)-Serumkonzentration der Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten.** Abgebildet sind die vor und nach Rituximab-Therapie in den Seren der elf PV-Patienten detektierten Mengen an BAFF (Abb. 37a) und APRIL (Abb. 37b). Während BAFF nach B-Zell-Depletion stark anstieg, blieb APRIL von dieser Therapie relativ unbeeinflusst. Die langanhaltende Depletion CD19<sup>+</sup> B-Zellen im peripheren Blut der Patienten ist in Abb. 37c gezeigt. Statistisch signifikante Veränderungen in Relation zum Ausgangswert vor Therapiebeginn liegen vor und sind folgendermaßen dargestellt: \*\*  $p < 0,01$ .

Darüber hinaus ist eine inverse Korrelation zwischen der Anzahl peripherer CD19<sup>+</sup> B-Zellen und der BAFF-Konzentration im Serum der Rituximab-behandelten PV-Patienten nachweisbar (Abb. 38). Der nach B-Zell-Depletion auftretende, prägnante Anstieg der BAFF-Konzentration im Serum der Patienten ( $p=0,003$ ) blieb bis zum Wiederauftreten der peripheren B-Zellen signifikant erhöht ( $p=0,028$ ). Mit Wiederherstellung der ursprünglich vor Rituximab-Behandlung detektierten Anzahl CD19<sup>+</sup> B-Zellen im peripheren Blut der Patienten sank die BAFF-Konzentration auf ihren Ausgangswert ab (Abb. 38a). In der hier betrachteten Kohorte von elf PV-Patienten kam es im zwölfmonatigen Beobachtungszeitraum bei sieben Patienten zum



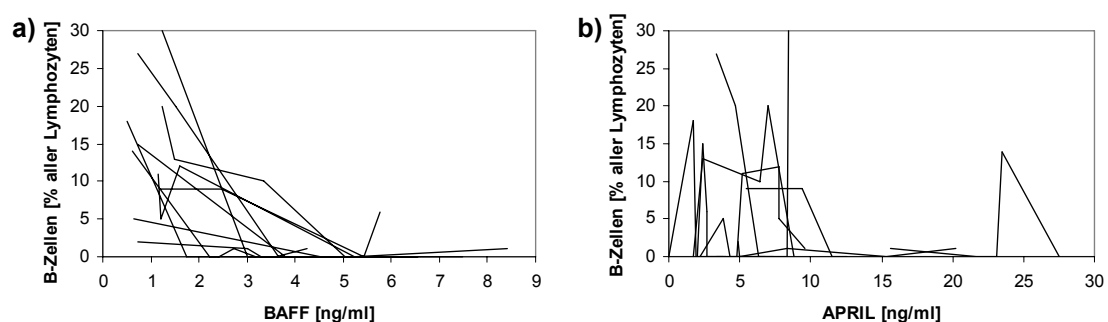
Wiederauftreten von peripheren B-Zellen, während nur fünf Patienten eine vollständige Wiederherstellung der Ausgangs-Frequenzen zeigten (Abb. 38c). Der Serum-Gehalt an APRIL blieb von den Schwankungen innerhalb der peripheren B-Zellpopulation unbeeinflusst (Abb. 38b).



**Abb. 38: BAFF (*B cell activating factor*)- und APRIL (*a proliferation-inducing ligand*)-Serumkonzentration der Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten in Relation zur Frequenz peripherer CD19<sup>+</sup> B-Zellen.** Veranschaulicht ist die Abhängigkeit des Serum-BAFF-Gehalts von der Anzahl detektierter B-Zellen im peripheren Blut (Abb. 38a). Nach B-Zell-Depletion mittels Rituximab (Rtx) war ein anhaltender signifikanter Anstieg der BAFF-Konzentration detektierbar, der bis zum Wiederauftreten der peripheren B-Lymphozyten anhielt. Bei Erreichen des vor Depletion ermittelten Ausgangswertes CD19<sup>+</sup> B-Zellen (Wiederherstellung) sank auch die Serum-BAFF-Konzentration auf ihren Ursprungswert ab (Abb. 38a). Die APRIL-Konzentration blieb von den Schwankungen der peripheren B-Zell-Zahlen (Abb. 38c) unbeeinflusst (Abb. 38b). Statistisch signifikante Veränderungen in Relation zum Ausgangswert vor Therapiebeginn liegen vor und sind folgendermaßen dargestellt: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Zur Verdeutlichung dieser Ergebnisse wurden die Serumkonzentrationen der B-Zell-aktivierenden Faktoren, BAFF und APRIL, mit der Anzahl peripherer B-Zellen korreliert, wobei jede Linie die Daten eines individuellen Rtx-behandelten PV-Patienten zeigt (Abb. 39).

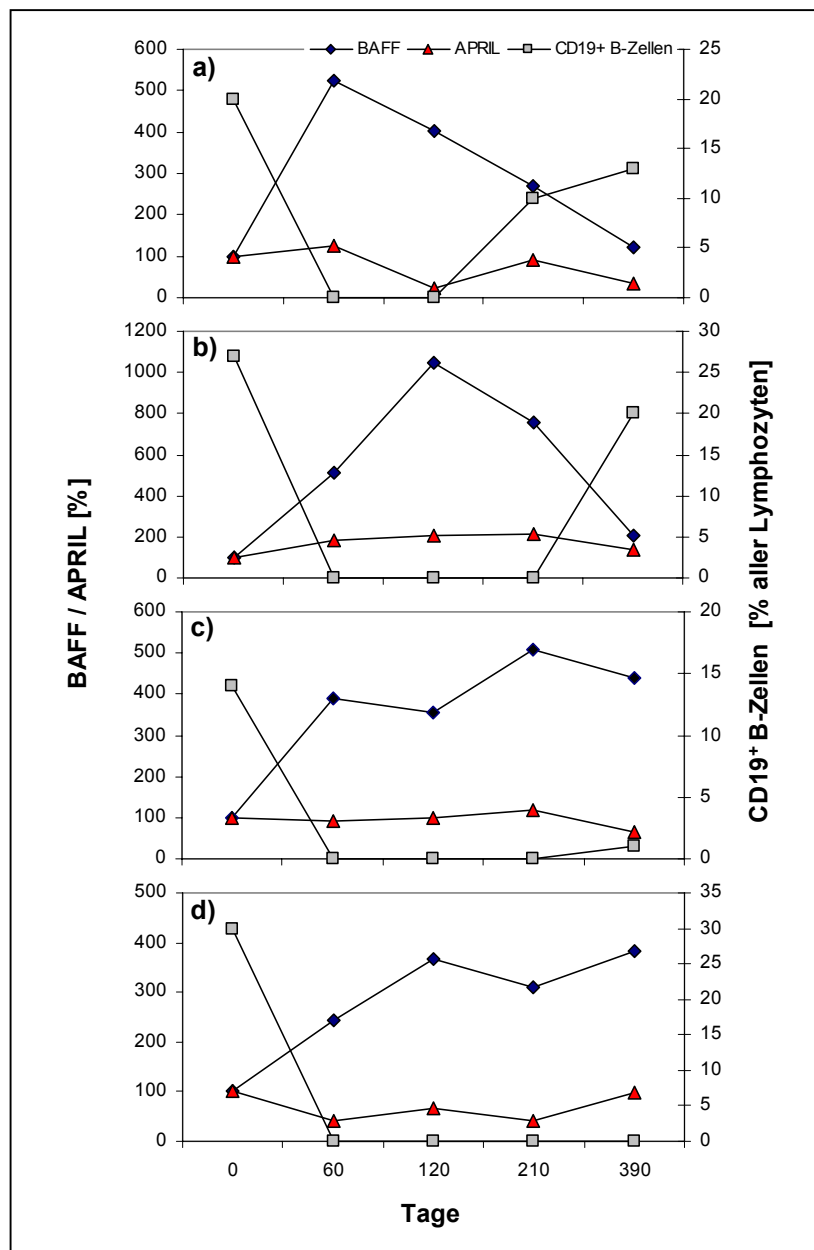
In Abb. 39a ist die inverse Korrelation zwischen den Zahlen CD19<sup>+</sup> B-Zellen im peripheren Blut der Patienten und den zirkulierenden BAFF-Konzentrationen dargestellt. Eine Beziehung zwischen APRIL und CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten ist nicht erkennbar (Abb. 39b).



**Abb. 39: Die Beziehung zwischen B-Zell-Faktoren und peripheren B-Zellen.** Es besteht eine inverse Korrelation zwischen den im Serum der Patienten detektierten BAFF (*B cell activating factor*)-Konzentrationen und der Anzahl der peripheren B-Zellen (Abb. 39a). Im Gegensatz dazu besteht keine Beziehung zwischen APRIL (*a proliferation-inducing ligand*)-Serumkonzentrationen und B-Zellen (Abb. 39b).

#### 4.2.3. Die Wirkung von Rituximab auf die B-Zell-Faktoren BAFF und APRIL und die Frequenz peripherer B-Zellen bei PV-Patienten

Die untersuchten PV-Patienten wurden in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Wiederauftretens CD19<sup>+</sup> B-Zellen im peripheren Blut nach Rituximab-induzierter Eliminierung in vier Gruppen eingeteilt. In Abb. 40 ist die Beziehung zwischen den BAFF- und APRIL-Konzentrationen und den Frequenzen CD19<sup>+</sup> B-Zellen im peripheren Blut ausgewählter PV-Patienten unter Rituximab-Behandlung dargestellt.



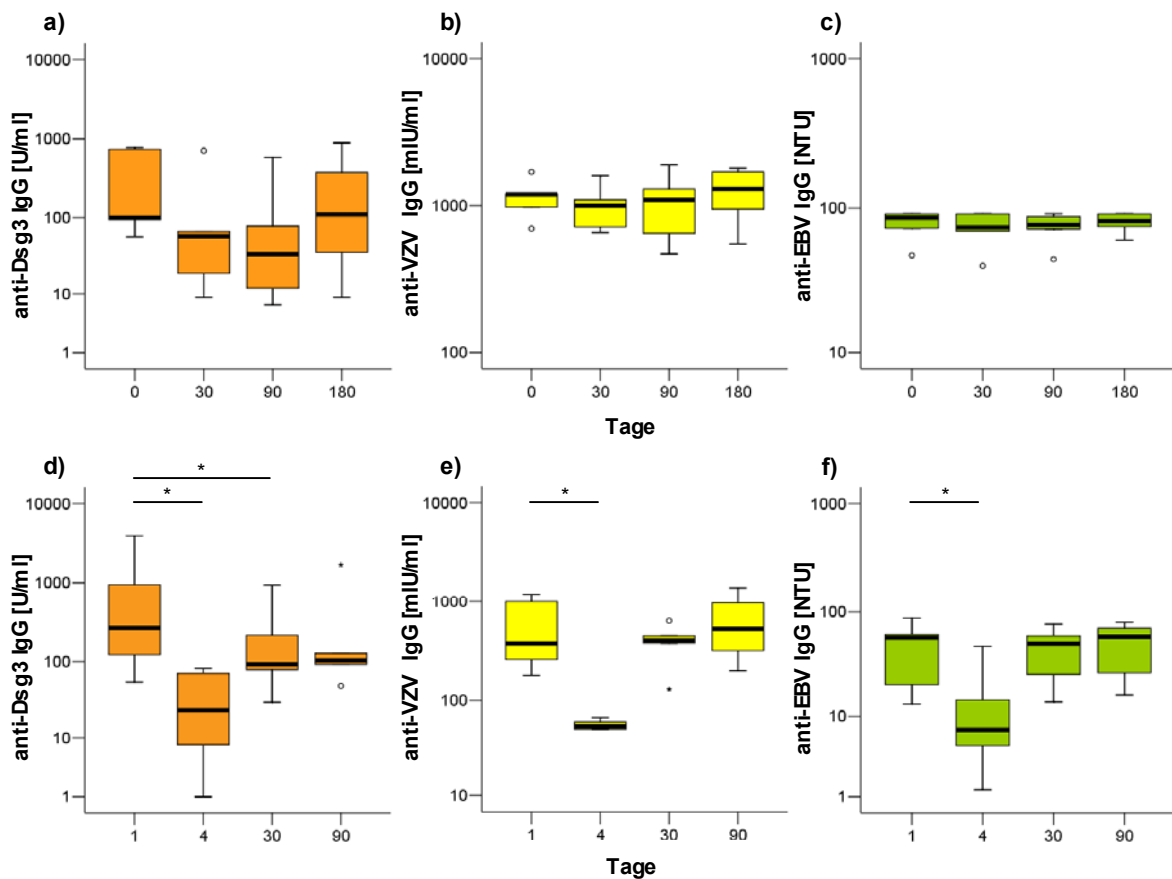
**Abb. 40: Die Abhängigkeit B-Zell-aktivierender Faktoren von der Anzahl peripherer B-Zellen.** Zusammengefasst sind die Konzentrationen von BAFF (*B cell activating factor*) und APRIL (*a proliferation-inducing ligand*) und die Zahl peripherer CD19<sup>+</sup> B-Zellen in vier Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten mit verschiedener Kinetik des Wiederauftretens peripherer B-Zellen nach Rituximab-induzierter B-Zell-Depletion. Dargestellt sind die peripheren B-Zellen gemessen als prozentualer Anteil aller Lymphozyten, sowie die jeweiligen BAFF- und APRIL-Serumkonzentrationen in Bezug zum Wert vor Behandlung, welcher als 100% definiert wurde.

Abb. 40a illustriert die Daten eines PV-Patienten (PV18), dessen B-Zellen drei bis sechs Monate nach Rituximab wieder im peripheren Blut nachweisbar waren. Dieser Patient zeigte eine schnelle und evidente Erhöhung des BAFF-Serumspiegels nach erfolgter Rituximab-Behandlung, wobei die höchsten Werte direkt nach der B-Zell-Depletion detektiert wurden. Nach Wiederauftreten der peripheren B-Zellen sank die BAFF-Konzentration im Serum des Patienten ab und erreichte ihren Ausgangswert zum Zeitpunkt der Wiederherstellung der ursprünglichen B-Zell-Frequenz zwölf Monate nach Therapie (Abb. 40a). Der in Abb. 40b dargestellte PV-Patient (PV17) gehört zur Gruppe der Patienten, bei denen das Wiederauftreten und die Wiederherstellung der vor Behandlung detektierten Frequenz peripherer B-Zellen in den Zeitraum zwischen sechs und zwölf Monate nach Therapie fielen. Nach erfolgter B-Zell-Depletion kam es im Serum dieses Patienten zu einer sehr ausgeprägten Erhöhung des Serum-BAFF-Gehalts. Mit Wiederherstellung der ursprünglichen B-Zell-Frequenz zwölf Monate nach Therapie sank auch die BAFF-Konzentration auf ihren Ausgangswert ab (Abb. 40b). Die dritte Gruppe umfasst Patienten, deren periphere B-Zellen zwölf Monate nach Therapie zwar detektierbar waren, jedoch gegenüber dem anfänglichen Wert vor Therapie vermindert blieben. Im Serum dieser Patienten (repräsentativ PV19, Abb. 40c) konnten steigende BAFF-Konzentrationen bis zwölf Monate nach Therapie nachgewiesen werden. Einige Patienten zeigten eine persistente B-Zell-Depletion, die mit einer erhöhten BAFF-Konzentration über den gesamten Beobachtungszeitraum verbunden war (z.B. PV16, Abb. 40d). In allen vier Patientengruppen blieb die Serummenge an APRIL über den gesamten Beobachtungszeitraum relativ unbeeinflusst (Abb. 40a-d).

#### **4.2.4. Die Wirkung der B-Zell-Depletion auf die Bildung pathogenspezifischer und autoreaktiver IgG-Antikörper bei PV-Patienten**

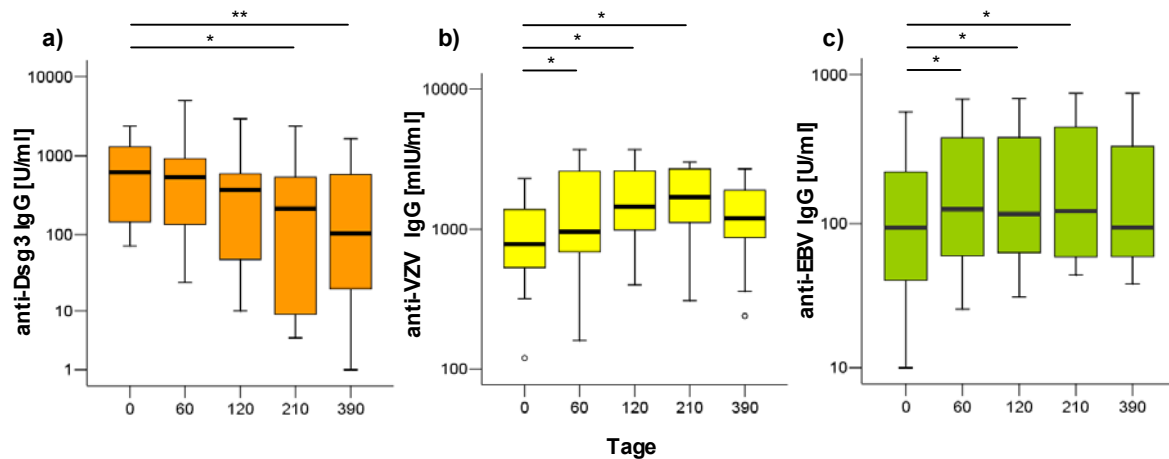
Ein Ziel der vorliegenden Studie war es, den potentiellen Einfluss der verschiedenen Behandlungsstrategien (IS, IS+IA bzw. IS+Rtx) auf die (Auto)Antikörperproduktion näher zu beleuchten.

Bei Patienten unter alleiniger IS (Abb. 41a-c) bzw. IS und adjuvanter IA (Abb. 41d-f) wurde eine Abnahme zirkulierender, Dsg3-spezifischer Autoantikörper nach Initiierung der jeweiligen Therapie nachgewiesen (Abb. 41a,d), welche zu einer klinischen Remission der Patienten führte (Tabelle 2a,b, siehe Anhang). Im Gegensatz dazu blieben die Serumkonzentrationen von anti-Varizella-Zoster-Virus (VZV) IgG (Abb. 41b,e) bzw. anti-EBV IgG (Abb. 41c,f) bei beiden Patientengruppen über den kompletten Beobachtungszeitraum relativ unbeeinflusst. Wie erwartet, führte die Behandlung der Patienten mit adjuvanter IA, vermutlich aufgrund der unselektiven Entfernung von IgG-Antikörper aus dem Patientenplasma (Tag 4, Abb. 41d-f), zu einer vorübergehenden starken Abnahme der autoreaktiven und pathogenspezifischen IgG-Antikörper.



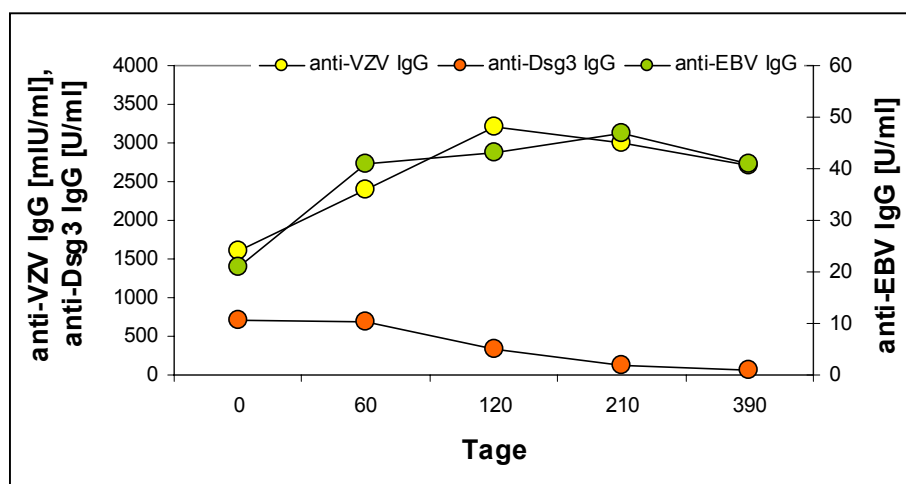
**Abb. 41: Die Wirkung von Immunsuppression (IS) bzw. adjuvanter Immunadsorption (IA) auf autoreaktive und pathogenspezifische IgG-Antikörper.** Illustriert ist der Verlauf Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifischer (Abb. 41a,d), Varizella-Zoster-Virus (VZV)-spezifischer (Abb. 41b,e) und Epstein-Barr-Virus (EBV)-spezifischer (Abb. 41c,f) IgG-Antikörper über den kompletten Beobachtungszeitraum unter alleiniger IS (Abb. 41a-c) bzw. adjuvanter IA (Abb. 41d-f). Analog zur Induktion der klinischen Remission, ist bei beiden Patientengruppen eine Abnahme der IgG-Autoantikörper detektierbar (Abb. 41a,d). Pathogenspezifische anti-VZV bzw. anti-EBV IgG-Antikörper blieben von der alleinigen IS unbeeinflusst (Abb. 41b,c) und zeigten in der Gruppe der IA-behandelten Patienten als Folge der IA-bedingten Entfernung der zirkulierenden Gesamt-IgG-Antikörper nur eine vorübergehende Abnahme (Tag 4, Abb. 41e,f). Statistisch signifikante Veränderungen in Relation zum Ausgangswert vor Therapiebeginn liegen vor und sind folgendermaßen dargestellt: \*  $p < 0,05$ .

Die Dsg3-spezifischen IgG-Autoantikörpertiter in den Seren der Rituximab-behandelten PV-Patienten zeigten innerhalb von zwölf Monaten nach B-Zell-Depletion eine kontinuierliche Abnahme (70-80%, Abb. 42a), die von einer signifikanten klinischen Besserung des Krankheitsbildes begleitet war (Tabelle 2c, siehe Anhang). Sechs der elf Rituximab-behandelten Patienten zeigten zusätzlich anti-Dsg1 IgG-Reaktivität, wobei die Dsg1-spezifischen IgG-Autoantikörper innerhalb von sechs Monaten nach Rituximab-Therapie ebenfalls drastisch absanken (Median vor Therapie: 168 U/ml → Median sechs Monate nach Therapie: 16 U/ml; Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu den Autoantikörpern ergab die Untersuchung des anti-VZV IgG (Abb. 42b) und anti-EBV IgG (Abb. 42c) im Serum aller untersuchten PV-Patienten einen signifikanten Konzentrationsanstieg bis sechs Monate nach Therapie (anti-VZV IgG:  $p \leq 0,041$ ; anti-EBV IgG:  $p \leq 0,025$ ), gefolgt von einem erneuten Abfall im Zeitraum zwischen sechs und zwölf Monate nach Behandlung (anti-VZV IgG:  $p = 0,374$ ; anti-EBV IgG:  $p = 0,208$ ).



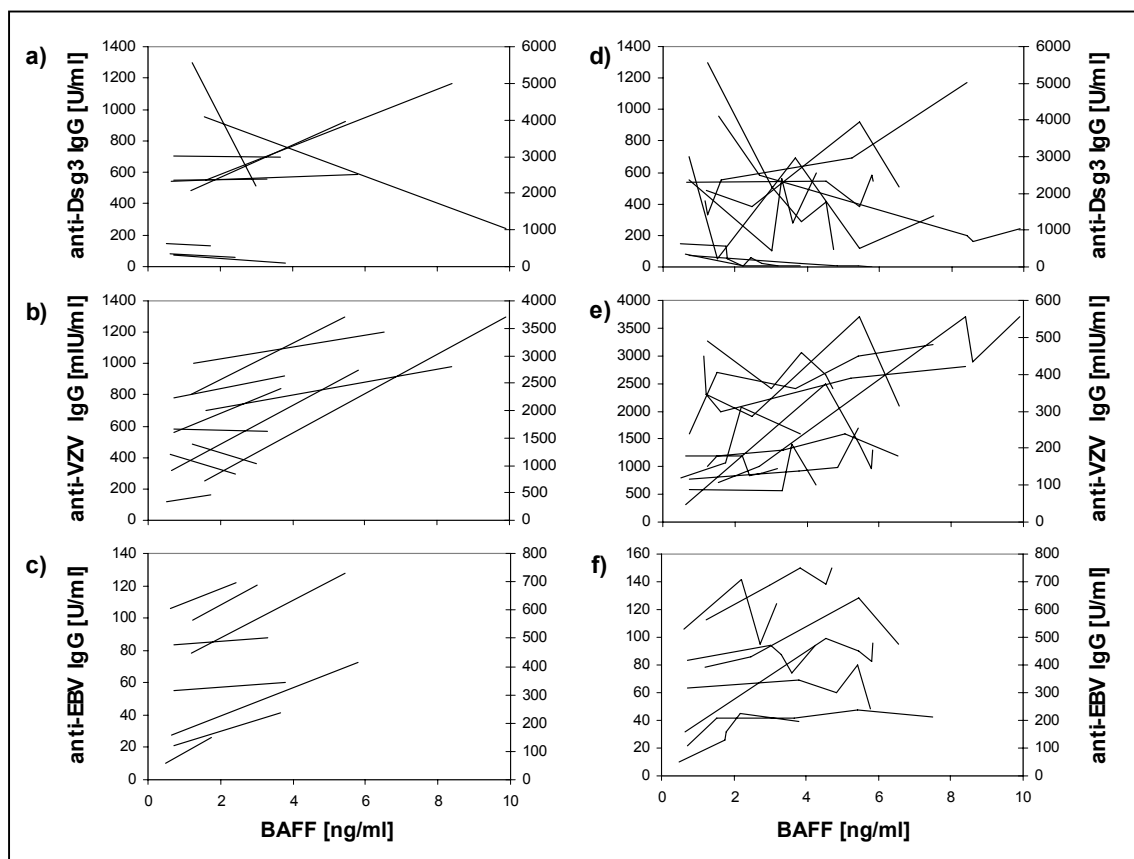
**Abb. 42: Die unterschiedliche Wirkung von Rituximab auf autoreaktive und pathogenspezifische IgG-Antikörper.** Dargestellt ist die kontinuierliche Abnahme Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifischer Autoantikörper in den Seren der elf Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten nach B-Zell-depletierender Therapie (Abb. 42a). Im Gegensatz dazu nahmen sowohl die Varizella-Zoster-Virus (VZV)-spezifischen (Abb. 42b) als auch die Epstein-Barr-Virus (EBV)-spezifischen (Abb. 42c) IgG-Antikörper bis sechs Monate nach Rituximab-Therapie signifikant zu und fielen anschließend wieder ab. Die Analyse des zirkulierenden anti-EBV IgG konnte nur bei acht der elf PV-Patienten durchgeführt werden. Statistisch signifikante Veränderungen in Relation zum Ausgangswert vor Therapiebeginn liegen vor und sind folgendermaßen dargestellt: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Zur Verdeutlichung dieser Resultate ist das unterschiedliche Verhalten von autoreaktiven und pathogenspezifischen Antikörpern nach Rituximab-Therapie repräsentativ für den Patienten PV17 in Abb. 43 dargestellt. Der Patient zeigte innerhalb des zwölfmonatigen Beobachtungszeitraums einen drastischen Abfall der Dsg3-reaktiven Autoantikörper im Serum (701 U/ml vor Therapie  $\rightarrow$  55 U/ml zwölf Monate nach Therapie), korrelierend mit einer deutlichen klinischen Besserung. Im Gegensatz zum Abfall der Dsg3-spezifischen Autoantikörper zeigte sich ein auffallender Anstieg der zirkulierenden anti-VZV und anti-EBV IgG-Antikörper.



**Abb. 43: Der Verlauf pathogenspezifischer und autoreaktiver Antikörper nach B-Zell-Depletion.** Veranschaulicht sind die Änderungen in den Konzentrationen Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifischer Autoantikörper und pathogenspezifischer Varizella-Zoster-Virus (VZV)- bzw. Epstein-Barr-Virus (EBV)-reaktiver IgG-Antikörper bei einem Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten (PV17) nach Rituximab-Therapie. Während die Autoantikörper im Beobachtungszeitraum sanken, zeigten die pathogenspezifischen Antikörper einen signifikanten Anstieg.

Anhand dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, inwieweit die nach B-Zell-Depletion ansteigende Konzentration pathogenspezifischer IgG-Antikörper im Serum eine Korrelation zu den Rituximab-induzierten erhöhten BAFF-Konzentrationen aufweist. Zur Testung dieser Hypothese wurde BAFF mit den Titern anti-Dsg3- (Abb. 44a,d), anti-VZV- (Abb. 44b,e) bzw. anti-EBV-reaktiver IgG-Antikörper (Abb. 44c,f) in Beziehung gesetzt. Dargestellt ist die Korrelation von BAFF und IgG-Antikörpern im Zeitraum vor (d0) und unmittelbar nach (d60) Rituximab-Behandlung (Abb. 44a-c) bzw. über die kompletten zwölf Monate (Abb. 44d-f). Die nach B-Zell-depletierender Therapie beobachtete Erhöhung der pathogenspezifischen anti-VZV und anti-EBV IgG-Antikörper zeigt tendenziell einen Zusammenhang zu den Rituximab-induzierten, erhöhten BAFF-Konzentrationen (Abb. 44b,c; Abb. 44e,f.). Diese Beziehung besteht zwischen autoreaktiven anti-Dsg3 IgG-Antikörpern und BAFF nicht, was eine scheinbar grundsätzlich unterschiedliche Wirkung von BAFF auf autoreaktive und pathogenspezifische Antikörper vermuten lässt.



**Abb. 44: Die Abhängigkeit pathogenspezifischer und autoreaktiver Antikörperproduktion von BAFF (*B cell activating factor*).** Illustriert ist die Abhängigkeit der Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifischen Autoantikörper (Abb. 44a,d) sowie der pathogenspezifischen anti-Varizella-Zoster-Virus (VZV, Abb. 44b,e) bzw. anti-Epstein-Barr-Virus (EBV, Abb. 44c,f) IgG-Antikörper von den serologischen BAFF-Konzentrationen im Zeitraum vor (d0) und einen Monat (d60) nach Rituximab-Behandlung (Abb. 44a-c) bzw. über den kompletten zwölfmonatigen Beobachtungszeitraum (Abb. 44d-f). Die Analyse des zirkulierenden anti-EBV IgG konnte nur bei acht der elf PV-Patienten durchgeführt werden. Jede Linie zeigt die Daten eines individuellen Rtx-behandelten PV-Patienten.

## 5. Diskussion

### 5.1. Rituximab-vermittelte Effekte auf die humorale und zelluläre Autoimmunantwort beim Pemphigus vulgaris

B-Zellen haben eine Vielzahl von Funktionen im autoimmunologischen Prozess und stellen daher einen vielversprechenden therapeutischen Ansatzpunkt bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen dar. Sie sind Vorläufer antikörperproduzierender PZ, sezernieren Zytokine und Chemokine und regulieren die T-Zell-Aktivierung und -Expansion, vornehmlich vermittelt durch ihre antigenpräsentierende Kapazität und die Bereitstellung kostimulatorischer Signale. Zusätzlich sind B-Zellen ein wichtiger Bestandteil des Prozesses der Lymphoneogenese (Nagel et al., 2009).

#### 5.1.1. Die humorale (Auto)Immunantwort nach B-Zell-depletierender Therapie

##### Autoantikörper und klinisches Erscheinungsbild

Rituximab, ein chimärer, monoklonaler IgG1-Antikörper - ursprünglich für die Behandlung niedrigmaligner B-Zell-Lymphome entwickelt - wurde bereits mit großem Erfolg in der Behandlung B-Zell-vermittelter Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Patienten mit RA, SLE, pSS, Vaskulitis und ITP zeigten nach Behandlung mit dem B-Zell-depletierenden anti-CD20 Antikörper eine signifikante klinische Besserung (Cambridge et al., 2003; Cambridge et al., 2006a; Ferraro et al., 2008; Leandro et al., 2002; Seror et al., 2007; Stasi et al., 2007; Vallerskog et al., 2007), die jedoch nicht zwangsläufig mit einer Abnahme der autoreaktiven Antikörper im Serum verbunden war (Arkfeld, 2008; Silverman und Weisman, 2003; Stohl und Looney, 2006).

Beim PV erzielte Rituximab, in den bisher beschriebenen Einzelfall- und kleineren Kohorten-Studien, meist sehr große therapeutische Erfolge (Ahmed et al., 2006; Arin et al., 2005; Carr und Heffernan, 2007; Joly et al., 2007; Nagel et al., 2009). Im Rahmen der vorliegenden Studie führte Rituximab bei allen zwölf PV-Patienten mit refraktärem Krankheitsverlauf zu einer vollständigen klinischen Remission sechs Monate nach Therapie. Dies ist mit den Ergebnissen zweier kürzlich publizierter, multizentrischer Studien vergleichbar (Ahmed et al., 2006; Joly et al., 2007). Die Daten dieser beiden Studien und der in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen belegen die Mitwirkung von Rituximab am Remissionsprozess von Patienten mit bislang therapierefraktärem PV, da eine zuvor durchgeführte alleinige immunsuppressive Behandlung oder eine Kombinationstherapie aus Immunsuppressiva und IVIg bei den Patienten zu keiner klinischen Besserung führte (Ahmed et al., 2006; Joly et al., 2007). Primärer Mechanismus der Remissionsinduktion ist vermutlich die Hemmung der Autoantikörperproduktion als Folge der Eliminierung von CD20<sup>+</sup> B-Lymphozyten im peripheren Blut (Carr und Heffernan, 2007).

Unter Rituximab-Behandlung zeigte sich bei allen PV-Patienten dieser Studie eine signifikante Abnahme der Dsg3-spezifischen IgG-, IgG1- und IgG4-Antikörper, die über den zwölfmonatigen Beobachtungszeitraum anhielt (Ahmed et al., 2006; Carr und Heffernan, 2007; Joly et al., 2007; Schmidt et al., 2008). Für die wichtige Bedeutung von IgG4-Autoantikörpern in der Pathogenese des PV spricht die sehr gute Korrelation von Dsg3-reaktiven IgG4-Antikörpern mit der Krankheitsaktivität. Im Gegensatz zu Patienten in Remission zeigte sich bei Rezidivpatienten zum Zeitpunkt der klinischen Verschlechterung (zwölf Monate nach Therapie) ein starker Wiederanstieg des Dsg3-spezifischen IgG4, und folglich auch des autoreaktiven Gesamt-IgG. Wie bereits von Ahmed et al. beschrieben, findet sich eine derartige Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und den IgG1-Autoantikörpern nicht (Ahmed et al., 2006). Die Ursache der unterschiedlichen Relevanz von IgG1 und IgG4 im Krankheitsgeschehen des PV ist derzeit noch unklar. Diskutiert werden differente Effektorfunktionen der beiden Antikörper-Subtypen und eine unterschiedliche Pathogenität, aufgrund der Bindung an verschiedene Epitope des Dsg3 (Bystryn und Rudolph, 2005).

#### Die Persistenz Dsg3-spezifischer Autoantikörper

Die Hypothese der vorrangigen Bildung von autoreaktiven, Dsg3-spezifischen IgG4-Antikörper durch Gedächtnis-B-Zellen (Carr und Heffernan, 2007; Cooper et al., 2003), die nach Rituximab-Behandlung vollständig eliminiert wurden, ist eine Erklärung für die klinische Besserung des Krankheitszustandes bei den untersuchten PV-Patienten. Bei einigen Patienten war die Remission mit einer kontinuierlichen, über den kompletten zwölfmonatigen Beobachtungszeitraum anhaltenden, Abnahme der IgG-Autoantikörper verbunden, während diese und andere Studien zeigen, dass die Dsg3-spezifischen IgG-Antikörper bei anderen PV-Patienten nach anfänglicher Reduktion persistierten (Kwon et al., 2008). Zur letztgenannten Gruppe gehörte z.B. ein Patient (PV2), der sich 27 Monate nach Rituximab-Therapie weiterhin in kompletter Remission befand, jedoch mit durchschnittlich 500-600 U/ml über den kompletten Beobachtungszeitraum stark erhöhte und persistierende, Dsg3-spezifische Autoantikörperkonzentrationen im Serum aufwies (Kapitel 4.1.12. - Abb. 34). Bei diesem Patienten korrelierte die Abnahme der IgG4-Autoantikörper nach B-Zell-depletierender Therapie sehr gut mit dem klinischen Ansprechen. Im Gegensatz dazu zeigte das Dsg3-reaktive IgG1, welches bei diesem Patienten eine etwa dreifach höhere Serumkonzentration als IgG4 aufwies, nur eine 35%ige Reduktion. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass es sich bei den im Serum dieses PV-Patienten persistierenden IgG-Autoantikörpern um Produkte langlebiger, autoreaktiver PZ handelt (Mouquet et al., 2008). Der von den PZ vorrangig produzierte Subtyp ist dabei höchstwahrscheinlich Dsg3-spezifisches IgG1 (Carr und Heffernan, 2007; Cooper et al., 2003), da dieses zum einen bei chronisch erkrankten Patienten vorrangig auftritt und zum anderen wahrscheinlich eine pathogenetisch geringere Relevanz hat, was sehr gut zum klinischen Status der erreichten Remission passen würde. Die IgG1- und IgG4-Isotypen, sowie die diese beiden Isotypen sezernierenden PZ besitzen eine vergleichbare Halbwertszeit (21 Tage IgG1 und IgG4; 138 Tage IgG1- und IgG4-produzierende PZ) (Slifka und Ahmed, 1998), sodass die viel deutlichere Reduktion des Dsg3-spezifischen IgG4 nach



Rituximab-Therapie nicht in einer unterschiedlichen Lebensdauer der Antikörper bzw. antikörpersezernierenden PZ begründet liegt.

Ameglio et al. beschrieben einen direkten Zusammenhang zwischen dem Alter bzw. der Krankheitsdauer der untersuchten PV-Patienten und der Höhe der zirkulierenden Autoantikörper (Ameglio et al., 1999). Eine Untersuchung der Korrelation zwischen dem Alter und der Autoantikörperkonzentration bei PV-Patienten in Abhängigkeit von ihrem klinischen Befinden wurde meines Wissens nach bisher nicht durchgeführt. In den zwölf PV-Patienten dieser Studie zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Serumkonzentration Dsg3-spezifischer IgG- und IgG1-Autoantikörper und dem Alter der Patienten im chronisch-aktiven Krankheitsstadium (vor Rituximab-Therapie). In Remission (sechs Monate nach Rituximab-Therapie) war weiterhin eine signifikante Korrelation zwischen dem Alter und den IgG1-Autoantikörpern, jedoch nicht zwischen dem Alter und den Dsg3-spezifischen IgG-Antikörpern nachweisbar, wobei die klare Tendenz eines Zusammenhangs zwischen dem Patientenalter und den autoreaktiven IgG-Antikörpertitern im Serum bestehen blieb. Dieses Ergebnis suggeriert eine mit dem Alter und der damit oft verbundenen Dauer der Erkrankung zunehmende, vom klinischen Zustand weitgehend unabhängige, Akkumulation der Autoantikörper, die sehr wahrscheinlich auf die Existenz langlebiger autoreaktiver PZ zurückzuführen ist. Gestützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass sechs Monate nach Rituximab-Therapie die B-Lymphozyten als potentielle antikörpersezernierende Zellen bei fast allen PV-Patienten weiterhin depletiert waren.

Langlebige PZ sezernieren Antikörper in großer Menge und benötigen für diesen Prozess keinen unmittelbaren Antigenkontakt (Hiepe und Dorner, 2005; Radbruch et al., 2006). Ferner weisen PZ eine Therapieresistenz gegenüber Immunsuppressiva auf. Der Hauptteil der langlebigen PZ im Knochenmark exprimiert kein CD20 auf der Zelloberfläche und wird folglich nicht durch Rituximab eliminiert (Hiepe und Dorner, 2005; Hoyer et al., 2005; Manz et al., 2005; Radbruch et al., 2006; Silverman und Weisman, 2003; Tedder und Engel, 1994). Somit sind die langlebigen PZ das humorale protektive, aber auch autoreaktive, Gedächtnis und vermutlich die Quelle der persistierenden Autoantikörper.

#### Die immunmodulierende Wirkung von IL-10

In den Seren der untersuchten neun PV-Patienten konnte vor Therapie mit dem anti-CD20 mAb eine Überexpression von IL-10 detektiert werden, die sich durch den Einfluss von Rituximab normalisierte. Erhöhte IL-10-Konzentrationen in den Seren und der Blasenflüssigkeit von PV-Patienten mit aktiver Erkrankung wurden bereits von Bhol et al. und Baroni et al. beschrieben (Baroni et al., 2002; Bhol et al., 2000). IL-10 wird von einer Vielzahl immunologischer Zellen, einschließlich T-Zellen, B-Zellen, Mastzellen, eosinophilen Granulozyten, NK-Zellen und Keratinozyten gebildet (Bhol et al., 2000; Lalani et al., 1997; Llorente et al., 1997; Takahashi et al., 2007). Aufgrund der protektierenden Wirkung von IL-10 auf die B-Zell-Proliferation, -Differenzierung und Antikörperproduktion (Lalani et al., 1997) ist dieses Zytokin direkt mit der Förderung autoreaktiver Prozesse bei B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen assoziiert. Bei SLE-Patienten konnte gezeigt werden, dass insbesondere die IgG-Autoantikörperproduktion

eine starke IL-10-Abhängigkeit aufweist (Llorente et al., 1995). Ein direkter Zusammenhang zwischen der Überexpression von IL-10 und der Induktion pathologischer, autoimmuner Prozesse wurde bei einigen B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen wie SLE und Myasthenia gravis bereits nachgewiesen (Lalani et al., 1997). Da eine erhöhte IL-10-Produktion von B-Zellen bisher nur bei malignen Erkrankungen und bei Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen (SLE, pSS) detektiert wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass die vermehrte IL-10-Sekretion auf maligne/autoreaktive B-Zellen zurückzuführen ist (Llorente et al., 1995).

Zusätzlich wurde eine aktivierende Wirkung von IL-10 auf Makrophagen beschrieben, welche nach IL-10-Einwirkung vermehrt BAFF freisetzen und möglicherweise so zu einer Überexpression dieses Mediators, die sich bei vielen B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen findet, beitragen (Ogden et al., 2005). Darüber hinaus erhöht IL-10 die Expression der HLA-Klasse II - Moleküle auf der Zelloberfläche und die Vitalität ruhender B-Lymphozyten der Milz. Auf IFN $\gamma$ -aktivierte Makrophagen hat IL-10 keinen derartigen Effekt. Diese Resultate lassen vermuten, dass Th1-Zellen Makrophagen als APC favorisieren, während Th2-Zellen die antigenpräsentierende Funktion der B-Zellen fördern (Go et al., 1990).

Die beschriebenen, und derzeit hauptsächlich bei SLE-Patienten untersuchten, Wirkungen von IL-10 im Hinblick auf Autoimmunprozesse sind möglicherweise ebenfalls entscheidende Mechanismen in der Pathogenese des PV. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine Normalisierung der vor Rituximab-Behandlung im Vergleich zu Kontrollpersonen signifikant erhöhten IL-10-Konzentration in den Seren der PV-Patienten. Diese IL-10-Reduktion ist möglicherweise Folge der Rituximab-induzierten Eliminierung aller peripheren, einschließlich der autoreaktiven, B-Zellen. Die alleinige immunsuppressive Therapie, die der B-Zell-Depletion vorgeschaltet war, führte dagegen zu keiner Reduktion der IL-10-Überexpression. Insofern übt Rituximab neben der direkten Eliminierung peripherer B-Zellen, und somit sehr potenter APC und Vorläuferzellen autoreaktiver PZ, durch die Reduktion der IL-10-Freisetzung eine indirekte inhibitorische Wirkung auf die autoreaktiven Prozesse beim PV aus.

### **5.1.2. Die zelluläre (Auto)Immunantwort nach B-Zell-depletierender Therapie**

#### Der Einfluss von Rituximab auf autoreaktive T-Zellen

##### *Autoreaktive B- und T-Zellen*

Bei allen in diese Studie inkludierten zwölf PV-Patienten resultierte die Behandlung mit Rituximab in einer unmittelbaren und vollständigen, 6-17 Monate anhaltenden (Median 12 Monate), Eliminierung peripherer B-Lymphozyten. Dies entspricht den Ergebnissen zweier aktueller Studien zum Einsatz von Rituximab bei PV-Patienten (Ahmed et al., 2006; Joly et al., 2007). Die Frequenzanalyse der Dsg3-spezifischen Th1- und Th2-Zellen im peripheren Blut der PV-Patienten wies eine, bisher nicht beschriebene, unmittelbar nach B-Zell-Depletion einsetzende und mindestens sechs Monate andauernde Abnahme der autoreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf.

Die Identifizierung von Dsg3-reaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut von PV-Patienten sowie die Charakterisierung der Epitopspezifität dieser Dsg3-reaktiven T-Zell-Klone konnte in verschiedenen Studien der letzten Jahre gezeigt werden (Hertl et al., 1998; Lin et al., 1997; Veldman et al., 2003; Veldman et al., 2004b; Wucherpfennig et al., 1995). Die Vermutung, dass Dsg3-reaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen entscheidend für die Initiierung und Aufrechterhaltung der beim PV pathogenetisch bedeutsamen Autoantikörperproduktion sind, wird durch mehrere *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen unterstützt, die zeigen, dass Th-Zellen eine wichtige Helferfunktion bei der Aktivierung autoreaktiver Gedächtnis-B-Zellen besitzen (Aoki-Ota et al., 2006; Lin et al., 1997; Nishifuji et al., 2000). Die in diesem Zusammenhang für die Aktivierung der autoreaktiven B-Zellen wichtigen Signale der Th-Zellen werden durch kostimulatorische Moleküle und die Ausschüttung von Zytokinen vermittelt. Ein *in vitro*-Modell des PV von Nishifuji et al. konnte bestätigen, dass die Depletion peripherer CD4<sup>+</sup> Zellen zu einem Verlust der B-Zell-vermittelten Produktion Dsg3-spezifischer Autoantikörper führt (Nishifuji et al., 2000). Es wird vermutet, dass insbesondere Dsg3-spezifische, IL-4-produzierende T-Zellen, d.h. Th2-Zellen, für die T-B-Zell-Interaktion beim PV von Bedeutung sind (Takahashi et al., 2008). Dsg3-spezifische Th2-Zellen sind v.a. bei PV-Patienten mit aktiver Erkrankung nachweisbar, während autoreaktive Th1-Zellen auch bei gesunden Trägern PV-assoziiierter HLA-Haplotypen nachgewiesen werden konnten. Analog dazu ist Dsg3-spezifisches IgG1, welches überwiegend Th1-vermittelt gebildet wird, in den Seren einiger gesunder HLA-assoziiierter Kontrollpersonen nachweisbar (Hertl et al., 2006; Veldman et al., 2003). Untersuchungen, welche die präferentielle Interaktion von Th2-Zellen mit B-Zellen beschreiben (Crawford et al., 2006; Go et al., 1990; Johansson-Lindbom et al., 2003) unterstützen die Hypothese, dass es sich bei der Krankheitsmanifestation des PV um einen Th2-induzierten Verlust der Toleranz auf B-Zell-Ebene handelt (Hertl et al., 2006). Die Freisetzung von IL-4 durch autoreaktive Th2-Zellen fördert dabei vor allem die Bildung von IgG4, welches bei aktiv erkrankten PV-Patienten der bedeutende Antikörper-Subtyp ist. Die IFN $\gamma$ -Sekretion durch autoreaktive Th1-Zellen begünstigt besonders die Entstehung von IgG1, welches sowohl bei Patienten mit chronisch-aktivem Krankheitsverlauf als auch bei Patienten in Remission nachweisbar ist (Amagai et al., 2006; Hertl et al., 2006; Spaeth et al., 2001).

Bisher wurde der Funktion autoreaktiver B-Zellen als APC für Dsg3-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur wenig Beachtung geschenkt. Aktuelle Veröffentlichungen beschreiben, dass B-Zellen prinzipiell zur Aufnahme von Autoantigenen durch den B-Zell-Rezeptor (membranständige Antikörper) und der nachfolgenden intrazellulären Prozessierung und HLA-Klasse II -vermittelten Präsentation von Epitopen des Autoantigens in der Lage sind und somit autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen antigenspezifisch aktivieren können (Dai et al., 2005). Zusätzlich weisen zahlreiche Studien auf die außerordentliche Bedeutung der gegenseitigen Interaktion zwischen B- und T-Zellen bei Autoimmunprozessen von systemischen Erkrankungen wie z.B. SLE und RA hin (Rodriguez-Pinto, 2005; Shlomchik et al., 2001; Takemura et al., 2001). Im Mausmodell des SLE konnte gezeigt werden, dass autoantigenspezifische B-Lymphozyten für die primäre Präsentation des Autoantigens gegenüber autoreaktiven T-Zellen die wichtigsten APC und somit die Initiatoren autoimmuner Mechanismen sind. Andere professionelle APC, wie Dendritische Zellen, scheinen erst im späteren Stadium der Krankheitsmanifestation zu einer

Aktivierung autoreaktiver T-Zellen zu führen und dienen der Aufrechterhaltung und Progression der Erkrankung (Yan et al., 2006). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass B-Zellen, die als sehr effiziente APC fungieren, für die optimale Expansion aktivierter T-Zellen und die Generierung von Gedächtnis-T-Zellen essentiell sind (Crawford et al., 2006; Kleindienst und Brocker, 2005; Linton et al., 2000). Dabei benötigen  $CD4^+$  T-Zellen im Gegensatz zu  $CD8^+$  T-Zellen zur optimalen Expansion den ständigen Kontakt mit dem von der APC präsentierten Antigen. Mäuse mit einer HLA-Klasse II - defizienten B-Zell-Population und HLA-Klasse II - intakten anderen APC, zeigen eine stark verminderte klonale Expansion aktivierter T-Zellen und eine eingeschränkte Differenzierung zu zytokinsezernierenden Effektor-T-Zellen, was die starke Abhängigkeit der T-Zellen von der B-Zell-vermittelten Antigenpräsentation bestätigt (Crawford et al., 2006).

In diesem Zusammenhang weist die vorliegende Studie bei allen zwölf Patienten eine Rituximab-induzierte signifikante Reduktion von autoreaktiven Th-Zellen, insbesondere der für die B-Zell-Regulation im PV besonders bedeutenden Dsg3-spezifischen  $CD4^+$  Th2-Zellen, auf. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte die vorausgegangene Eliminierung autoreaktiver B-Zellen sein. Dsg3-spezifische, antigenpräsentierende B-Zellen aktivieren autoreaktive Th-Zellen, die wiederum im Gegenzug Dsg3-reaktive B-Zellen zur Autoantikörperproduktion und Proliferation anregen. Somit entsteht vermutlich ein Teufelskreis („*vicious circle*“), der mit zunehmender Krankheitsdauer zu einer Potenzierung autoreaktiver Prozesse führt. Derartige positive Rückkopplungsmechanismen, die zur Amplifikation der Autoimmunantwort führen, wurden bereits für andere B-Zell-vermittelte Erkrankungen, wie z.B. SLE, postuliert (Shlomchik et al., 2001). Zusätzlich führt die T-Zell-vermittelte B-Zell-Aktivierung zur vermehrten Bildung autoreaktiver PZ und folglich zu einer mit dem Alter bzw. der Krankheitsdauer zunehmenden Akkumulation Dsg3-spezifischer IgG-Autoantikörper. Die der B-Zell-Eliminierung unmittelbar folgende Reduktion der Dsg3-spezifischen Th-Zellen untermauert die fundamentale Bedeutung der B-Zellen als APC im autoreaktiven Prozess und bei der Pathogenese des PV.

Die Frequenzen der allgemeinen  $CD3^+CD4^+$  Th-Zellen blieben dagegen, wie bereits mehrfach für PV-, RA-, SLE- und ITP-Patienten beschrieben (Ahmed et al., 2006; Joly et al., 2007; Kneitz et al., 2002; Leandro et al., 2006; Mouquet et al., 2008; Tamimoto et al., 2008), von der B-Zell-Depletion unbeeinflusst. Bei drei der zwölf PV-Patienten, die zwölf Monate nach Rituximab-Behandlung eine erneute klinische Verschlechterung aufwiesen, war zum Zeitpunkt des Rezidivs ein Wiederanstieg der Dsg3-spezifischen Th1- und Th2-Zell-Frequenzen zu verzeichnen. Die Zahlen der Dsg3-reaktiven Th-Zellen bei den neun Patienten in Remission blieben dagegen über den kompletten zwölfmonatigen Beobachtungszeitraum vermindert (siehe Kapitel 4.1.6.). Sowohl die Frequenzen der Dsg3-reaktiven  $CD4^+$  T-Zellen als auch die Titer der zirkulierenden, Dsg3-reaktiven IgG- und IgG4-Autoantikörper korrelierten mit der Krankheitsaktivität (siehe Kapitel 4.1.4.). Im Gegensatz dazu war eine Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und peripheren B-Zellen nicht gegeben. Wie bereits bei der RA und dem SLE beschrieben (Cambridge et al., 2003; Cambridge et al., 2006a; Smith et al., 2006), zeigten zwei der drei Patienten mit Rezidiv zum Zeitpunkt der klinischen Verschlechterung anhaltende,

stark verminderte bzw. depletierte Zahlen peripherer CD19<sup>+</sup> B-Zellen. Für dieses unerwartete Phänomen gibt es mehrere mögliche Erklärungen:

- i) Denkbar ist zum einen, dass zwölf Monate nach Rituximab-Therapie, zum Zeitpunkt des Rezidivs bei beiden Patienten, bereits eine Repopulation der peripheren B-Lymphozyten in den sekundären lymphatischen Organen zu verzeichnen war, die im peripheren Blut noch nicht detektiert werden konnte. Nach erneutem Antigenkontakt erfolgte in diesen Geweben die Aktivierung der autoreaktiven Th-Zellen und anschließend die B-Zell-vermittelte Autoantikörperproduktion.
- ii) Eine zweite Erklärung besteht in der unvollständigen, Rituximab-vermittelten Depletion von B-Lymphozyten in den peripheren lymphatischen Organen, wie sie in einigen Tiermodellen bzw. humanen Studien beschrieben wurde (Gong et al., 2005; Reff et al., 1994; Schroder et al., 2003; Thurlings et al., 2008; Vos et al., 2007). Rituximab diffundiert mit Ausnahme des Gehirns in alle Organe (Cartron et al., 2007) und depletiert die gewebeständigen B-Lymphozyten mit unterschiedlicher Effizienz. Die Ursache dafür liegt jedoch nicht in einer verminderten CD20-Expression auf der Oberfläche gewebeständiger B-Zellen oder einer geringeren Konzentration an Rituximab in den peripheren Organen, sondern in die Zellen umgebenden lokalen Milieu begründet (Gong et al., 2005). Untersuchungen bei RA-, SLE- und PV-Patienten zeigen, dass die Behandlung mit Rituximab zu einer Modulation des B-Zell-Repertoires führt, wobei in der ersten Phase der B-Zell-Regeneration vorrangig unreife CD38<sup>++</sup>, IgD<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD24<sup>++</sup>, CD27<sup>-</sup> B-Zellen im peripheren Blut auftreten (Leandro et al., 2006; Mouquet et al., 2008; Roll et al., 2006). Die Gedächtnis-B-Zellen zeigen eine sehr späte und langsame periphere Repopulation und bleiben in Remissionspatienten auch noch Jahre nach der B-Zell-depletierenden Therapie signifikant vermindert. Bei Patienten mit einer nur sehr kurzen klinischen Besserung wurde dagegen eine schnelle Wiederherstellung der peripheren Gedächtnis-B-Zell-Population (Anolik et al., 2007; Leandro et al., 2006; Roll et al., 2006), möglicherweise infolge einer inkompletten Depletion dieser Zellen in den sekundären lymphatischen Organen nach Rituximab-Therapie, beobachtet (Leandro et al., 2006; Schmidt et al., 2008).
- iii) Eine dritte Option für den mit dem Rezidiv verbundenen Anstieg autoreaktiver Th-Zellen trotz bestehender peripherer B-Zell-Depletion ist die HLA-Klasse II -vermittelte Aktivierung der autoreaktiven Th-Zellen durch APC, wie z.B. Makrophagen und Dendritische Zellen, die nicht primär von der B-Zell-Depletion betroffen sind. Untersuchungen an langlebigen PZ aus den Tonsillen ergaben eine direkte Abhängigkeit der gewebeständigen PZ von T-Lymphozyten, die für die Regulation des PZ-Überlebens von entscheidender Bedeutung ist (Withers et al., 2007). Die Aktivierung autoreaktiver Th-Zellen durch Makrophagen oder Dendritische Zellen führt möglicherweise zu einer gesteigerten Autoantikörpersekretion durch langlebigen PZ in den sekundären lymphatischen Organen, die in einer Verschlechterung des Krankheitszustands resultiert. Neuere

Studien im synovialen Gewebe von RA-Patienten zeigen allerdings, dass die Rituximab-induzierte B-Zell-Depletion die T-Zell-Aktivierung und die Produktion proinflammatorischer Zytokine stört und andere APC den Ausfall von B-Zellen als APC nicht ausgleichen können (Takemura et al., 2001). Zusätzlich konnte in einem Mausmodell des Typ I-Diabetes bestätigt werden, dass durch die B-Zell-Depletion die antigenpräsentierende Kapazität von APC, wie z.B. peritonealen Makrophagen und splenoiden Dendritischen Zellen, gegenüber  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen stark reduziert wird, wobei die Suppression mit dem Status der B-Zell-Depletion korreliert. Die B-Zell-Depletion scheint folglich eine direkte inhibitorische Wirkung auf die Funktion anderer APC zu haben (Hu et al., 2007), sodass diese denkbare Ursache einer erneuten Krankheitsaktivität trotz bestehender peripherer B-Zell-Depletion sehr unwahrscheinlich ist.

Die Ergebnisse der Frequenzanalyse Dsg3-reaktiver  $CD4^+$  T-Zellen nach Rituximab-Behandlung suggerieren eine deutliche Abhängigkeit Dsg3-spezifischer  $CD4^+$  T-Zellen von autoreaktiven B-Zellen als APC. Aktuelle Untersuchungen in Mausmodellen des Typ I-Diabetes und der RA konnten diese Hypothese bestätigen und belegen, dass eine anti-CD20 Antikörper-vermittelte B-Zell-Depletion die Aktivierung und Expansion sowohl autoreaktiver als auch pathogenspezifischer  $CD4^+$  T-Zellen signifikant reduziert (Bouaziz et al., 2007).

Der indirekte Effekt von Rituximab auf  $CD20^-$  Lymphozytenpopulationen, wie z.B. T-Zellen und Treg, wurde in zahlreichen Untersuchungen bereits beschrieben. Rituximab-assoziierte phänotypische Veränderungen der T-Zellen, d.h. eine Verminderung der Expression charakteristischer Aktivierungsmarker auf der T-Zelloberfläche, so z.B. CD40L, CD69, HLA-DR und ICOS, konnten bei SLE-Patienten nachgewiesen werden (Liossis und Sfrikakis, 2008; Sfrikakis et al., 2005b; Tamimoto et al., 2008; Tokunaga et al., 2007). Eine aktuelle Studie zeigt bei diesen Patienten zusätzlich eine Verminderung der Th1/Th2 Ratio, gemessen an den  $IFN\gamma^+$  und  $IL-4^+$   $CD4^+$  T-Zellen im peripheren Blut (Tamimoto et al., 2008). Die Verlagerung zu einer Th1-dominierten Immunantwort nach B-Zell-Depletion wird dabei auf Transkriptionsebene reguliert. Nach Rituximab-Behandlung konnte ein Anstieg des Th1-assoziierten Transkriptionsfaktors, T-bet, in  $CD3^+$  T-Zellen nachgewiesen werden, während die Konzentration des Th2-assoziierten Transkriptionsfaktors, GATA-3, konstant blieb. B-Zellen besitzen einen entscheidenden Einfluss auf die Th2-Polarisierung von  $CD4^+$  T-Zellen während der autoreaktiven Prozesse beim SLE. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Verlagerung zu einer Th1-dominierten Immunantwort nach Rituximab-vermittelter B-Zell-Depletion bei diesen und anderen Patienten zur klinischen Besserung beiträgt (Tamimoto et al., 2008). Vermutlich sind Auswirkungen auf den Aktivierungsstatus autoreaktiver T-Zellen auch der entscheidende Mechanismus der Rituximab-induzierten klinischen Besserung in vorrangig T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen, wie der Psoriasis. Studien bei Patienten mit ITP, SLE und Lupusnephritis zeigten einen Rituximab-induzierten Anstieg natürlicher Treg (Sfrikakis et al., 2007; Stasi et al., 2008; Vallerskog et al., 2007), der bei Patienten in klinischer Remission aufrecht erhalten blieb, bei Patienten mit Rezidiv dagegen eine erneute Reduktion zeigte. Es ist daher ebenso möglich, dass die Rituximab-vermittelte Induktion von Treg beim PV zur

Hemmung der autoreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen und damit zur klinischen Verbesserung der Patienten beiträgt. Bei RA-Patienten konnte eine Population CD20<sup>+</sup> T-Zellen detektiert werden, die nach Behandlung mit Rituximab vollständig eliminiert wurde (Leandro et al., 2006). Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei diesen Zellen um T-Zellen handelt, die im Krankheitsgeschehen der RA eine entscheidende Bedeutung besitzen, da diese Zellen bei gesunden Kontrollpersonen nur sehr marginal nachweisbar sind (Leandro et al., 2006). Eine direkte Rituximab-vermittelte Depletion potentiell autoreaktiver, CD20-exprimierender Th-Zellen kann bei PV-Patienten jedoch ausgeschlossen werden, da bei diesen Patienten keine signifikante Population CD20<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden konnte.

Der in dieser Studie verwendete Versuchsansatz zur Frequenzanalyse Dsg3-reaktiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen weist insofern eine Limitation auf, dass die Rituximab-induzierte B-Zell-Depletion und die damit verbundene Eliminierung der APC in einer fehlenden Dsg3-vermittelten *in vitro*-Stimulation der autoreaktiven Th-Zellen resultieren könnte. Aufgrund des nachfolgenden Ausbleibens der Zytokinproduktion würden diese nicht aktivierten T-Zellen mittels MACS nicht isoliert und detektiert werden können, was eine reduzierte Zahl peripherer autoreaktiver Th-Zellen zur Folge hätte. Diese mögliche Limitation des *in vitro*-Systems spiegelt jedoch die *in vivo*-Situation wieder, in der es analog zu einer fehlenden Aktivierung Dsg3-reaktiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen käme. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass autoreaktive Th-Zellen nach Depletion der antigenpräsentierenden B-Zellen im peripheren Blut lediglich residieren, da zahlreiche Patienten aus dieser und anderer Studien trotz Repopulation der peripheren B-Lymphozyten über Monate oder Jahre klinisch erscheinungsfrei blieben.

Gegenwärtig wird Rituximab bei der Behandlung des PV grundsätzlich als adjuvante Therapie in Kombination mit systemischen Immunsuppressiva eingesetzt (Ahmed et al., 2006; Arin et al., 2005; Joly et al., 2007). Die Identifizierung der für einen bestmöglichen klinischen Erfolg optimalen Kombination von Rituximab mit Immunsuppressiva (Joly et al., 2007) oder immunmodulierenden Behandlungsmethoden wie z.B. IVIg (Ahmed et al., 2006) bzw. IA (Niedermeier et al., 2007) bedarf der weiteren Testung in prospektiven klinischen Studien. In der hier durchgeführten Studie wurde Rituximab in einem adjuvanten Therapieschema in Kombination mit systemischen Glukokortikoiden und Immunsuppressiva eingesetzt. Die detektierte Abnahme der Dsg3-reaktiven CD4<sup>+</sup> Th-Zellen war ein unmittelbares Resultat der anti-CD20-Behandlung, da die ausschließliche Therapie mit Glukokortikoiden und Immunsuppressiva +/- IA keinen signifikanten Effekt auf die Frequenzen Dsg3-spezifischer Th1- und Th2-Zellen hatte (Veldman et al., 2003; Veldman et al., 2004b; Fallbeschreibung siehe Kapitel 4.1.6.).

Die Abnahme der autoreaktiven Th-Zellen und die daraus resultierende Verminderung der Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-6 (Th2-Zellen) und TNF $\alpha$  (Th1-Zellen), deren pathogenetische Relevanz im Prozess der Akantholyse mehrfach beschrieben wurde (Amagai et al., 2006; Ameglio et al., 1999; Harris et al., 2000; Hertl, 2000; Hertl und Schuler, 2002a; Lopez-Robles et al., 2001), haben vermutlich einen zusätzlichen direkten unterstützenden Einfluss auf die Besserung des klinischen Erscheinungsbildes des PV unter Rituximab-Behandlung.

#### *Die Assoziation von HLA-Polymorphismen mit dem klinischen Verlauf nach B-Zell-Depletion*

PV-Patienten zeigen eine ausgeprägte Assoziation mit den HLA-Klasse II - Molekülen HLA-DR $\beta$ 1 \*0402 und HLA-DQ $\beta$ 1 \*0503, die auf APC exprimiert werden. Die Erkennung von Dsg3-Epitopen durch autoreaktive T-Zellen in Verbindung mit diesen HLA-Klasse II - Molekülen ist für die Aktivierung autoreaktiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen und somit für die Initiierung und die Aufrechterhaltung der Autoantikörperproduktion beim PV entscheidend (Ahmed et al., 1993; Hertl und Riechers, 1999; Nousari und Anhalt, 1999; Veldman et al., 2003). Lin et al. konnten *in vitro* eine klare HLA-DR-Restriktion Dsg3-reaktiver T-Zellen zeigen (Lin et al., 1997). Andere Studien zeigen dagegen eine HLA-DQ-vermittelte Restriktion Dsg3-spezifischer T-Zellen (Hertl et al., 1998; Veldman et al., 2003). Ferner wurde eine im Vergleich zu HLA-DQ - Molekülen prinzipiell deutlich höhere T-Zell-aktivierende Potenz von HLA-DR - Molekülen beschrieben, die die von HLA-DQ - Molekülen um ein Vielfaches übersteigt (Brostoff et al., 1993, S. 2.4.). In der vorliegenden Studie waren fünf der sechs PV-Patienten, die zum Beobachtungsendpunkt bereits eine klinische Verschlechterung aufwiesen, HLA-DR $\beta$ 1 \*0402 - positiv. Zusätzlich zeigten vier der fünf Rezidivpatienten mit dieser HLA-Assoziation bereits 12-16 Monate nach Rituximab-Therapie ein Wiederaufflammen der klinischen Symptomatik und folglich eine relativ kurze Remissionsphase. Die klinische Relevanz dieser Beobachtung ist aufgrund der geringen Fallzahl der untersuchten PV-Patienten unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

#### Der Einfluss von Rituximab auf pathogenspezifische Immunantworten

TT ist ein Modell-Antigen, das präferentiell für die Untersuchung der Immunantwort von CD4<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen eingesetzt wird (Cellerai et al., 2007). Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde bei zwei Patienten das Verhalten TT-spezifischer, IFN $\gamma$ -produzierender CD4<sup>+</sup> Th1-Zellen nach B-Zell-depletierender Therapie untersucht. Im Gegensatz zum beobachteten inhibitorischen Effekt von Rituximab auf Dsg3-reaktive Th-Zellen blieben die Frequenzen von TT-spezifischen Th1-Zellen von der Behandlung mit Rituximab unbeeinflusst. Eine mögliche Erklärung für das differente Verhalten von autoreaktiven und pathogenspezifischen CD4<sup>+</sup> Th-Zellen nach Rituximab-Therapie könnte die fehlende Abhängigkeit der pathogenspezifischen T-Zellen von CD20<sup>+</sup> B-Zellen als APC sein.

Die Serumkonzentrationen Dsg3-reaktiver Autoantikörper nahmen bei allen untersuchten PV-Patienten nach Eliminierung der B-Zellen signifikant ab. Die zirkulierenden anti-TT IgG-Antikörper stiegen dagegen in den untersuchten zwei PV-Patienten über den zwölfmonatigen Beobachtungszeitraum nach Rituximab-Therapie an. Verschiedene Studien bei Patienten mit RA, SLE, PV, Graft-versus-Host-Reaktion und aktiver Vaskulitis konnten nach B-Zell-depletierender Behandlung ebenfalls eine Konstanz bzw. marginale Erhöhung pathogenspezifischer IgG-Antikörper nachweisen. Zu den in diesen Untersuchungen analysierten pathogenspezifischen Antikörpern gehörten u.a. Antikörper gegen TT, PCP und EBV (Cambridge et al., 2003; Cambridge et al., 2006a; Cutler et al., 2006; Ferraro et al., 2008; Joly et al., 2007).

Der offensichtlich selektive Effekt von Rituximab auf die Titer autoreaktiver Antikörper suggeriert eine primäre Abhängigkeit dieser Autoantikörper von der konstanten Generierung kurzlebiger,



autoreaktiver PZ aus CD20<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen (Radbruch et al., 2006). Eine aktuelle Studie von Withers et al. beschreibt die Expression von CD20 auf der Oberfläche von bis zu 50% der PZ von Milz, Lymphknoten und Knochenmark (Withers et al., 2007). Die Einwirkung des monoklonalen anti-CD20 Antikörpers, Rituximab, führte zu einer effizienten Depletion dieser CD20<sup>+</sup> PZ aus den Geweben. Tarlinton et al. postulieren, dass der Verlust charakteristischer B-Zell-Moleküle auf der Zelloberfläche von PZ ein Zeichen der Reife darstellt und mit einer erhöhten Lebensdauer assoziiert ist (Tarlinton und Hodgkin, 2004). Daher besteht die Möglichkeit, dass die CD20<sup>+</sup> PZ einen eher unreiferen, kurzlebigeren Phänotyp der PZ darstellen und autoreaktive PZ, im Gegensatz zu pathogenspezifischen CD20<sup>-</sup> PZ, präferentiell diesen Phänotyp besitzen. Die Applikation von Rituximab würde in einer direkten Eliminierung der autoreaktiven CD20<sup>+</sup> PZ resultieren, was sich in der beobachteten Abnahme der Autoantikörperkonzentration im Serum widerspiegeln würde. Weiterhin wurde beschrieben, dass PZ auf die Interaktion mit T-Zellen angewiesen sind (Radbruch et al., 2006; Withers et al., 2007). Bisher ungeklärt ist, ob die kontaktabhängig vermittelten Überlebenssignale unabhängig von der Spezifität der T-Zellen und PZ vermittelt werden oder ob autoreaktive T-Zellen ausschließlich mit autoreaktiven PZ interagieren. Letzteres würde bedeuten, dass durch die Rituximab-vermittelte Abnahme der autoreaktiven Th-Zellen die Interaktion zwischen Dsg3-spezifischen T-Zellen und PZ reduziert werden würde. Die pathogenspezifischen PZ wären davon nicht betroffen, da die Frequenzen pathogenspezifischer Th-Zellen von der B-Zell-depletierenden Therapie zumindest nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie unbeeinflusst bleiben.

Die Lymphoneogenese ist ein B- und T-Zell-abhängiger Prozess (Groom und Mackay, 2008). Innerhalb der neugebildeten lymphoiden Strukturen in den entzündeten Gewebearealen befinden sich Überlebensnischen für PZ. Nach B-Zell-Depletion kommt es zum Abbau dieser ektopen Strukturen, wodurch die dort residierenden PZ sterben (Radbruch et al., 2006). Da bislang jedoch in diesen Arealen keine selektive Ansammlung autoreaktiver PZ beschrieben wurde (Cassese et al., 2001), ist eine vorrangige Eliminierung Dsg3-spezifischer PZ nach B-Zell-Depletion, aufgrund der Auflösung dieser Areale, weitgehend ausgeschlossen. Der bei histologischer Betrachtung fehlende Nachweis inflammatorischer Infiltrate in periläsionalen Hautbiopsien von PV-Patienten (Ioannides et al., 2008) unterstützt diese Auffassung zusätzlich.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen einen zweifachen Effekt von Rituximab nahe:

- i) die direkte Depletion von CD20<sup>+</sup> autoreaktiven B-Zellen als Vorläufer autoreaktiver, autoantikörpersezernierender PZ.
- ii) die indirekte Abnahme autoreaktiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen möglicherweise als Folge der Depletion autoreaktiver B-Zellen in ihrer Funktion als APC.

Dieser beim PV gezeigte duale Effekt von Rituximab trägt möglicherweise zum genaueren Verständnis der Rituximab-induzierten klinischen Besserung in Patienten mit nicht ausschließlich B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen wie RA, SLE, Vaskulitiden, Psoriasis, atopischem Ekzem oder Dermatomyositis bei.

## **5.2. Rituximab-vermittelte Effekte auf die humorale Immunantwort beim Pemphigus vulgaris und die heterogene Wirkungsweise von BAFF auf pathogenspezifische und autoreaktive Antikörper**

Die Untersuchung von Mechanismen der B-Zell-Toleranz und -Homöostase ist in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen von großem Interesse. Faktoren, welche die B-Zell-Reifung beeinflussen, wurden bereits bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen identifiziert und charakterisiert (Tangye et al., 2006). BAFF ist ein entscheidender Überlebensfaktor bei der B-Zell-Entwicklung. Die komplexen Funktionen dieses Mediators in der Aufrechterhaltung der B-Zell-Toleranz sind derzeit nicht vollständig geklärt (Mackay et al., 2003; Schneider, 2005). Es konnte jedoch bereits in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass autoreaktive B-Zell-Klone eine erhöhte Abhängigkeit von BAFF besitzen (Thien et al., 2004) und bei niedrigen BAFF-Konzentrationen vorrangig eliminiert werden (Brink, 2006). Dies untermauert die fundamentale Bedeutung von BAFF beim Verlust der Selbsttoleranz und der damit verbundenen Entwicklung autoimmuner Prozesse.

### **5.2.1. Die Wirkung verschiedener Therapieformen auf die Serumkonzentrationen von BAFF und APRIL beim PV**

Bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. SLE, RA, pSS, ITP, SSc, bullöses Pemphigoid, Dermatomyositis und Sklerodermie konnte eine erhöhte Konzentration von BAFF, APRIL oder BAFF/APRIL-Heterotrimeren im Serum der Patienten bzw. in den betroffenen Gewebearealen nachgewiesen werden (Asashima et al., 2006; Emmerich et al., 2007; Jonsson et al., 2005; Matsushita et al., 2007b; Matsushita et al., 2006; Pers et al., 2005; Seyler et al., 2005; Stohl et al., 2003; Vallerskog et al., 2006). Bei einigen dieser Patienten korrelierten die erhöhten BAFF- und/oder APRIL-Konzentrationen im Serum mit den Autoantikörpertitern und/oder der Krankheitsaktivität (Cheema et al., 2001; Jonsson et al., 2005; Schaller et al., 2005; Zhang et al., 2001). Bei RA- und SLE-Patienten konnte zusätzlich zum erhöhten BAFF-Niveau im Serum eine sehr starke Akkumulation von BAFF in der synovialen Flüssigkeit detektiert werden, was eine Bedeutung dieses Mediators für die lokale Pathogenese vermuten lässt (Cheema et al., 2001). In diesem Zusammenhang wurde in einer aktuellen Studie eine BAFF-R-vermittelte Erhöhung der chemotaktischen Aktivität von primären, humanen, reifen B-Zellen gegenüber CCL21, CXCL12 und CXCL13 beschrieben (Badr et al., 2008). CXCL13 wird von Stromazellen und follikulären Dendritischen Zellen verschiedener Gewebe produziert und hat eine einzigartige Bedeutung in der Keimzentrenformation und der Rekrutierung der B-Zellen in die Lymphfollikel während einer T-Zell-abhängigen Immunantwort. Folglich besitzt die CXCL13-BAFF-Synergie eine beträchtliche Relevanz in der normalen Immunantwort. Da in zahlreichen B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen diese beiden Mediatoren überexprimiert werden, haben BAFF und CXCL13 insbesondere in der Rekrutierung autoreaktiver Gedächtnis-B-Zellen in die, während der autoimmunen Prozesse im entzündeten Gewebe durch Lymphneogenese entstandenen, ektopischen Follikel große Bedeutung (Badr

et al., 2008). Zusätzlich steigert BAFF die Funktion des B-Zell-Korezeptorkomplexes, indem die CD19- und CD21-Expression auf B-Zellen gefördert wird (Bossen und Schneider, 2006; Mackay et al., 2003) und senkt somit die nach Antigenbindung an den B-Zell-Rezeptor zur Signaltransduktion benötigte Signalstärke (Mackay et al., 2003; Pers et al., 2008). Im Gegensatz zu den verschiedenen genannten Autoimmunerkrankungen konnte eine Überexpression von BAFF oder APRIL bei PV-Patienten bisher nicht nachgewiesen werden (Asashima et al., 2006; Matsushita et al., 2007b; Watanabe et al., 2007), obwohl IL-10, das im Serum von PV-Patienten oftmals in erhöhter Konzentration vorliegt (Bhol et al., 2000; Kapitel 4.1.9.), nachweislich humane Makrophagen aktiviert und die BAFF-Produktion und -Sekretion in diesen Zellen induziert (Ogden et al., 2005). In den bisherigen Studien wiesen die BAFF- und APRIL-Konzentration bei PV-Patienten direkt nach Diagnosestellung und damit vor einer immunsuppressiven Therapie keine Unterschiede im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen auf (Asashima et al., 2006; Matsushita et al., 2007b; Watanabe et al., 2007). In Ergänzung zu diesen Analysen zeigen die aktuellen Ergebnisse der hier durchgeführten Studie, keine erkennbaren Unterschiede der BAFF- und APRIL-Konzentrationen in den Seren von 19 PV-Patienten vor Verabreichung der jeweiligen Therapie (Kapitel 4.2.1. - Abb. 35, Tag 0 bzw. 1) im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Zusätzlich hatte weder eine alleinige immunsuppressive Therapie noch eine Kombinationstherapie aus IS und IA Auswirkungen auf die Expression von BAFF und APRIL. Der in SLE-Patienten beobachtete BAFF-inhibierende Effekt von hochdosierten Kortikosteroiden (Stohl et al., 2003), der möglicherweise auf eine Beeinflussung der Transkription des BAFF-Gens bzw. der Translation des BAFF-Proteins zurückzuführen ist (Stohl et al., 2003), kann im Fall der PV-Patienten weitgehend ausgeschlossen werden, da unbehandelte PV-Patienten gesunden Kontrollpersonen vergleichbare BAFF-Konzentrationen im Serum aufweisen (Asashima et al., 2006; Matsushita et al., 2007b, Kapitel 4.2.1. - Abb. 35a, IS-Tag 0). Im Gegensatz zur Behandlung mit IS bzw. IA führte die Rituximab-induzierte Depletion der peripheren B-Zellen zu einer deutlichen und signifikanten Erhöhung von BAFF, während die APRIL-Konzentrationen im Serum der Patienten von der anti-CD20-Behandlung völlig unbeeinflusst blieben.

### **5.2.2. Die Auswirkung der B-Zell-Depletion auf BAFF beim PV**

Bei elf PV-Patienten, die mit Rituximab behandelt wurden, konnte eine inverse Korrelation zwischen BAFF und den Frequenzen peripherer B-Zellen detektiert werden. Die Rituximab-induzierte Eliminierung der B-Zellen hatte einen ausgeprägten Anstieg der BAFF-Konzentration im Serum zur Folge. Dies war höchstwahrscheinlich eine unmittelbare Folge der B-Zell-Depletion, da der BAFF-R, der Haupt-Rezeptor von BAFF, größtenteils auf B-Zellen exprimiert wird (Mackay et al., 2007; Schneider und Tschopp, 2003). Aufgrund der nach B-Zell-Depletion fehlenden Bindungsstellen für BAFF kam es zu einem reduzierten Verbrauch und folglich zur Anreicherung dieses Mediators im Serum. Die Erhöhung der BAFF-Konzentration im Serum nach Rituximab-Therapie ist kein krankheitsabhängiges Phänomen und konnte bereits in verschiedenen Studien bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie RA, SLE und pSS

beobachtet werden (Seror et al., 2007; Vallerskog et al., 2006). Die Rituximab-induzierte Erhöhung der Serumkonzentration von BAFF ist jedoch keine ausschließliche Konsequenz des verminderten Verbrauchs, sondern zusätzlich das Ergebnis einer positiven transkriptionellen Regulation. Bei Patienten mit RA, SLE und pSS konnte gezeigt werden, dass die Rituximab-vermittelte Steigerung der BAFF-Produktion in PBMC mit einer direkten Induktion von BAFF auf mRNA- und Protein-Ebene verbunden ist (Lavie et al., 2007). Die starke Zunahme der BAFF-Konzentration im Serum fördert möglicherweise die Neubildung von vorrangig autoreaktiven B-Zellen, für die eine erhöhte Abhängigkeit von BAFF gezeigt werden konnte (Lesley et al., 2004; Thien et al., 2004). In diesem Zusammenhang wiesen zwei der elf PV-Patienten dieser Studie bereits zwölf Monate nach B-Zell-depletierender Therapie eine erneute klinische Verschlechterung auf (Tabelle 2c, siehe Anhang). Eine Kombinationsbehandlung aus Rituximab und BAFF-Antagonisten wäre daher ein vielversprechender therapeutischer Ansatz für die Induktion einer Langzeit-Remission im PV.

BAFF-Antagonisten sind derzeitiger Bestandteil klinischer Studien in Tiermodellen und beim Menschen. In murinen Modellen verschiedener Autoimmunerkrankungen, wie SLE und SS, konnte einheitlich eine klinische Besserung nach Applikation von BAFF-Antagonisten (Gong et al., 2005; Matsushita et al., 2007a) sowie eine Verzögerung des Krankheitsausbruchs und eine Reduktion der Mortalitätsrate beobachtet werden (Ramanujam et al., 2006). Auch beim Menschen werden verschiedene BAFF-Antagonisten wie z.B. Belimumab, TACI-Ig, BAFF-R-Fc und AMG 623 derzeit in klinischen Prüfungen auf ihre therapeutische Effizienz getestet (Stohl und Looney, 2006). Die Neutralisation von BAFF mittels des monoklonalen anti-BAFF IgG1-Antikörpers, Belimumab, zeigte bisher gute klinische Erfolge in Phase II-Studien bei der RA (Dillon et al., 2006) und beim SLE (Chatham et al., 2008). Belimumab induzierte eine signifikante Reduktion aktivierter CD69<sup>+</sup> B-Zellen im peripheren Blut von SLE-Patienten, die auf die anti-BAFF-Therapie klinisch ansprachen (Stohl et al., 2006). Eine Phase II Placebo-kontrollierte Doppelblindstudie, die 449 aktiv erkrankte SLE-Patienten inkludierte, ergab eine Belimumab-induzierte Reduktion verschiedener Autoantikörper und eine Verminderung der bestehenden Hypergammaglobulinämie im Serum (Chatham et al., 2008). Weiterhin konnte in einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Phase I-Doppelblindstudie derselben Arbeitsgruppe, die 70 SLE-Patienten einschloss, gezeigt werden, dass Belimumab-behandelte Patienten keine erhöhte Inzidenz für Infektionen aufweisen (Furie et al., 2008), was im Fall eines kombinierten therapeutischen Einsatzes von Rituximab und Belimumab von großer Bedeutung wäre. Da in SLE-Patienten die Entwicklung autoimmuner Prozesse nicht zwangsläufig an eine gesteigerte Expression von BAFF gekoppelt ist, postulieren Stohl et al. die Existenz eines individuellen „BAFF-Schwellenwerts“, der überschritten werden muss, um die Autoantikörperproduktion zu initiieren (Stohl et al., 2003). Vermutlich würden daher vor allem Patienten mit einer offensichtlich normalen BAFF-Konzentration im Serum von einer Therapie mit BAFF-Antagonisten profitieren, da bei diesen die Senkung von BAFF unter den „Schwellenwert“ erreicht werden und folglich eine Beeinträchtigung der Autoimmunantwort und eine klinische Besserung hervorgerufen werden würde (Stohl et al., 2003). Dies könnte

möglicherweise auch der entscheidende Mechanismus einer erfolgreichen Behandlung von PV-Patienten mit BAFF-Antagonisten sein.

Der Einsatz von Belimumab bei Rhesusaffen bestätigte den selektiven Einfluss dieses Medikaments auf die Modulation der B-Zell-Funktion. T-Zellen und andere Lymphozytenpopulationen blieben von der Behandlung unbeeinflusst (Halpern et al., 2006; Vugmeyster et al., 2006).

Keimzentren in den lymphatischen Organen sind entscheidend für die Entwicklung und die Reifung von Gedächtnis-B-Zellen, einschließlich der somatischen Hypermutation, der Affinitätsreifung und des Antikörperklassenwechsels (Johansson-Lindbom et al., 2003). BAFF hat eine fundamentale Bedeutung bei der Aufrechterhaltung dieser Strukturen (Vora et al., 2003). Wesentliche zelluläre Komponenten der Keimzentren sind folliculäre Dendritische Zellen, die u.a. BAFF produzieren (Zhang et al., 2005), sowie B- und T-Lymphozyten. Th2-Zellen sind dabei die vorherrschende T-Zell-Population (Johansson-Lindbom et al., 2003). Sie sind besonders wichtig für die B-Zell-Differenzierung, benötigen jedoch selbst für den Prozess der weiteren Differenzierung die Interaktion mit B-Zellen (Johansson-Lindbom et al., 2003). Daher hat die Blockade von BAFF nach Verabreichung von BAFF-Antagonisten einen indirekten hemmenden Effekt auf die Polarisierung der Th2-Zellen und somit auf die T-Zell-abhängige Immunantwort (Vora et al., 2003). Mehrere Studien im Mausmodell und am Menschen konnten zeigen, dass PZ in ihrer Entstehung (Ettinger et al., 2007) und in ihrem Überleben (Avery et al., 2003; Darce et al., 2007; Hoyer et al., 2005; Lin et al., 2007; O'Connor et al., 2004) von BAFF abhängig sind. Da die langlebigen PZ im Knochenmark höchstwahrscheinlich keine CD20-Expression zeigen (Cragg et al., 2005; Silverman und Weisman, 2003; Tedder und Engel, 1994; Tedder et al., 1989) und folglich durch die Rituximab-Behandlung nicht eliminiert werden, ist die Applikation von BAFF-Antagonisten möglicherweise ein vielversprechender therapeutischer Ansatzpunkt in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen, in deren Pathogenese autoreaktive PZ und Autoantikörper sehr bedeutend sind. Die Eliminierung der PZ könnte eine langanhaltende klinische Besserung induzieren (Lin et al., 2007; Sutherland et al., 2006).

Untersuchungen in einem humanen CD20-transgenen Mausmodell (hCD20<sup>+</sup>), das eine Prävalenz für die Entwicklung des SLE zeigt, ergaben eine schnelle und vollständige Depletion peripherer B-Lymphozyten nach Behandlung mit dem humanisierten anti-CD20 Antikörper 2H7. Gewebeständige B-Zellen in der Milz wurden jedoch nur unvollständig eliminiert, wobei vor allem die B-Zellen der Marginalzonen und Keimzentren eine Therapieresistenz zeigten. Diese ist nicht auf eine verminderte CD20-Expression auf der Oberfläche dieser B-Zellen oder eine geringere Verfügbarkeit des anti-CD20 Antikörpers in diesen Kompartimenten der Milz, sondern vielmehr auf das die B-Zellen umgebende lokale Milieu, zurückzuführen (Gong et al., 2005). Eine Kombinationsbehandlung aus dem anti-CD20 mAk 2H7 und BAFF-R-Fc resultierte in einer vollständigen Eliminierung aller B-Lymphozyten in der Milz. Offensichtlich spielt BAFF in der inkompletten Depletion, vorrangig von Marginalzonen- und Keimzentren-B-Zellen, durch die anti-CD20 Therapie eine entscheidende Rolle (Gong et al., 2005). Diese Resultate forcieren die Annahme, dass eine simultane Verabreichung von BAFF-Antagonisten und Rituximab eine effizientere und länger anhaltende B-Zell-Depletion, aufgrund einer kompletten Eliminierung der

B-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen und einer verminderten Neubildung von B-Lymphozyten, bewirken könnte. Dies hätte wahrscheinlich vor allem für die Inhibierung der Entstehung autoreaktiver B-Zellen eine entscheidende Bedeutung, da sehr hohe BAFF-Konzentrationen, wie sie im Serum nach Rituximab-Therapie detektierbar sind, die präferentielle Generierung autoreaktiver B-Zellen, die in ihrem Überleben eine viel stärkere Abhängigkeit von BAFF als „normale“ B-Zellen aufweisen, begünstigen (Lesley et al., 2004; Thien et al., 2004).

BCMA bindet BAFF und APRIL mit vergleichbarer Affinität (Karpusas et al., 2002) und wird vorrangig im späten Entwicklungsstadium der B-Zellen, d.h. auf der Zelloberfläche von Keimzentren-B-Zellen, Plasmablasten und Plasmazellen, exprimiert (Sutherland et al., 2006). Zusätzlich exprimieren periphere B-Zellen im sehr frühen Entwicklungsstadium diesen Rezeptor. Es konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass ruhende B-Lymphozyten der Milz auf ihrer Zelloberfläche geringe Mengen von BCMA besitzen (Yang et al., 2005). IL-4 und IL-6, wichtige Th2-Zytokine, die bei verschiedenen B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen eine fundamentale Bedeutung besitzen, induzieren eine gesteigerte Expression dieses Rezeptors auf der Zelloberfläche ruhender B-Zellen. Die Zugabe von BAFF oder APRIL zu diesen IL-4/IL-6-aktivierten B-Zellen bewirkt die Oberflächenexpression zahlreicher kostimulatorischer Moleküle, wie CD40, CD80 und CD86, und der HLA-Klasse II - Moleküle, was offensichtlich in einer gesteigerten antigenpräsentierenden Kapazität dieser B-Zellen resultiert (Yang et al., 2005). Die molekulare Grundlage dieses Phänomens, das ausschließlich von BCMA, nicht aber von TACI oder dem BAFF-R vermittelt wird, ist wahrscheinlich die BCMA-abhängige Aktivierung von Januskinasen im Signaltransduktionsweg dieses Rezeptors, welche vermutlich mit einer gesteigerten antigenpräsentierenden Funktion assoziiert ist (Yang et al., 2005). Die Bedeutung von BAFF in der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen besteht somit einerseits in der Propagierung autoreaktiver B-Zell-Klone und andererseits in einer gesteigerten antigenpräsentierenden Funktion neugebildeter B-Lymphozyten gegenüber autoreaktiven T-Zellen, die im Zusammenbruch der Selbsttoleranz resultieren (Yang et al., 2005).

Interessanterweise wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie der Nachweis von anti-BAFF- und anti-APRIL-Antikörpern in zwei kommerziell erhältlichen IVIg-Präparationen beschrieben (Le Pottier et al., 2007). Da der Einsatz von IVIg in der Behandlung des PV ein sehr effizienter therapeutischer Ansatz sein kann (Ahmed, 2001; Segura et al., 2007), könnte eine Kombinationstherapie aus Rituximab und IVIg ebenfalls eine synergistische Reduktion des autoimmunen Prozesses im PV bewirken, wobei IVIg neben der BAFF-antagonisierenden Wirkung noch zahlreiche weitere immunmodulatorische Funktionen ausübt. In einer aktuellen Studie führte die synchrone Behandlung von elf therapierefraktären PV-Patienten mit Rituximab und IVIg zu einer signifikanten klinischen Besserung mit anschließender kompletter Remission, die bei fast allen Patienten durchschnittlich 22-37 Monate anhielt (Ahmed et al., 2006). Multizentrische, prospektiv-randomisierte Studien, welche die aktuell verfügbaren Therapieoptionen, IVIg, Rituximab bzw. eine Kombination beider Verfahren, vergleichend hinsichtlich ihrer klinischen Effizienz untersuchen, fehlen jedoch derzeit noch.

### 5.2.3. Die heterogene Wirkungsweise von BAFF auf pathogenspezifische und autoreaktive Antikörper bei Patienten mit PV

Zahlreiche Studien bei Patienten mit B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen beschreiben eine signifikante Abnahme zirkulierender Autoantikörper unter Behandlung mit Rituximab, die oft mit der klinischen Besserung korreliert (Ahmed et al., 2006; Cambridge et al., 2003; Cambridge et al., 2006a,b; Ferraro et al., 2008; Joly et al., 2007; Silverman und Weisman, 2003; Vallerskog et al., 2007). Auch in der vorliegenden Studie war eine signifikante Reduktion der Dsg3-spezifischen IgG-Antikörper im Serum der Rituximab-behandelten PV-Patienten nachweisbar, während die Serumkonzentrationen des anti-EBV und anti-VZV IgG signifikant anstiegen. Die Erhöhung der pathogenspezifischen Antikörper im Serum wies tendenziell eine Korrelation zur BAFF-Konzentration auf. Die Rituximab-induzierte Zunahme der BAFF-Konzentration im Serum war von einer vermehrten Bildung pathogenspezifischer Antikörper begleitet, die sich sechs bis zwölf Monate nach Rituximab-Therapie analog zu der BAFF-Serumkonzentration wieder normalisierte. Diese Beobachtungen lassen einen differenten Effekt von BAFF auf autoreaktive und pathogenspezifische PZ vermuten. Im Gegensatz zu peripheren B-Zellen, welche CD20 und BAFF-R auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, sind langlebige PZ des Knochenmarks typischerweise CD20<sup>-</sup> (Silverman und Weisman, 2003; Stohl und Looney, 2006). Daher kann ein direkter Effekt von Rituximab auf langlebige CD20<sup>-</sup> PZ weitgehend ausgeschlossen werden. Scheinbar gibt es jedoch eine indirekte Wirkung durch die Rituximab-induzierte Erhöhung von BAFF. Diese wird höchstwahrscheinlich durch BCMA, welches auf langlebigen PZ des Knochenmarks exprimiert wird, vermittelt (Darce et al., 2007; O'Connor et al., 2004). Die These wird durch die Resultate dieser Studie untermauert, die eine signifikante Erhöhung von anti-VZV und anti-EBV IgG im Serum der elf Rituximab-behandelten PV-Patienten zeigen. Obwohl BCMA mit etwa gleicher Affinität BAFF und APRIL bindet (Karpusas et al., 2002), ist die Zunahme der pathogenspezifischen IgG-Antikörper im Serum der Patienten augenscheinlich durch BAFF vermittelt, da nur BAFF nach Rituximab-Therapie eine signifikante Änderung zeigt. Diese Vermutung wird durch Berichte, die eine BAFF-induzierte Steigerung der T-Zell-abhängigen, humoralen Immunantwort bei Mäusen durch Erhöhung der Zahlen antigenspezifischer PZ (Do et al., 2000) bzw. eine BAFF-, aber nicht APRIL-, abhängige verstärkte Differenzierung von Gedächtnis-B-Zellen der Milz in PZ (Ettinger et al., 2007) beschreiben, gefestigt. Die in dieser Arbeit dargestellten Resultate sind mit verschiedenen Studien vergleichbar, die konstante oder erhöhte TT- oder PCP-spezifische IgG-Titer im Serum Rituximab-behandelter Patienten detektierten (Cambridge et al., 2003; Cambridge et al., 2006a; Cutler et al., 2006; Ferraro et al., 2008). Ursache dafür sind vermutlich die erhöhten BAFF-Konzentrationen im Serum, welche die Antikörperproduktion langlebiger PZ forcieren. Die Stabilität der Konzentrationen pathogenspezifischer Antikörper erklärt möglicherweise die klinische Beobachtung, dass Rituximab-behandelte Patienten trotz B-Zell-Depletion keine grundsätzlich erhöhte Prädisposition gegenüber viralen oder mikrobiellen Infektionen ausweisen (Mouquet et al., 2008).

Es existieren Berichte, die zwischen langlebigen (vermutlich pathogenspezifischen) PZ, welche der Aufrechterhaltung des spezifischen humoralen Gedächtnisses ohne persistente antigene Stimulation dienen und kurzlebigen (wahrscheinlich autoreaktiven) PZ, die durch anhaltende antigene Stimulation entstehen, unterscheiden (Browning, 2006; Manz et al., 2005; Radbruch et al., 2006). Langlebige PZ des Knochenmarks, welche BCMA auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, zeigen eine starke Abhängigkeit von BAFF, das die Bildung des antiapoptotischen Moleküls Mcl-1 induziert und daher entscheidende Bedeutung in der Sicherstellung des Überlebens dieser Zellen besitzt (O'Connor et al., 2004; Sutherland et al., 2006; Woodland et al., 2006).

Aktuell gibt es keine Veröffentlichungen, die eine mögliche Interaktion von BAFF und kurzlebigen PZ in B-Zell-vermittelten Erkrankungen, einschließlich PV, untersucht haben. Eine Evidenz für verschiedene Halbwertszeiten von autoantigen- und pathogenspezifischem IgG existiert ebenfalls nicht, sodass die Daten dieser Studie einen heterogenen Effekt von Rituximab bzw. BAFF auf pathogenspezifische und autoreaktive PZ vermuten lassen. Ursachen dafür sind möglicherweise:

- i) Unterschiede in der Expression bzw. Expressionsstärke BAFF-bindender Rezeptoren (BAFF-R, BCMA, TACI) auf der Zelloberfläche von pathogenspezifischen bzw. autoreaktiven PZ.
- ii) eine direkte, Rituximab-vermittelte Depletion kurzlebiger, CD20<sup>+</sup> Plasmablasten/PZ, da eine CD20-Expression auf bis zu 50% der PZ, einschließlich autoantikörpersezernierender PZ, in Knochenmark, Milz und Lymphknoten detektiert werden konnte (Dorner und Lipsky, 2007; Terstappen et al., 1990; Treon und Anderson, 2000; Withers et al., 2007). Der Verlust von charakteristischen B-Zell-Markern wie CD19, CD20, HLA-Klasse II - Molekülen und CD45 im Reifungsprozess der PZ korreliert mit einer gesteigerten Lebensdauer der PZ (Tarlinton und Hodgkin, 2004). Daher stellen CD20<sup>+</sup> PZ möglicherweise ein relativ frühes Stadium in der PZ-Entwicklung dar und sind eher kurzlebiger Natur.
- iii) eine mit der Zeit zunehmende Reduktion kurzlebiger, autoreaktiver PZ als Folge der Rituximab-induzierten Eliminierung peripherer B-Zellen und somit der PZ-Vorläufer sowie eine BAFF-vermittelte gesteigerte Antikörperfreisetzung durch langlebige, pathogenspezifische PZ.
- iv) die Abhängigkeit der PZ von T-Zell-vermittelten, kontaktabhängigen Überlebenssignalen (Radbruch et al., 2006; Withers et al., 2007). Die B-Zell-depletierende Behandlung der Patienten mit dem monoklonalen anti-CD20 Antikörper, Rituximab, resultiert in einer Beeinträchtigung der Aktivierung und Expansion CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach antigener Stimulation (Bouaziz et al., 2007) sowie in einer starken Reduktion der autoreaktiven, jedoch nicht der pathogenspezifischen Th-Zellen (siehe Kapitel 4.1.6. und 4.1.8.). Dadurch werden ausschließlich die Interaktionen zwischen autoreaktiven T-Zellen und autoreaktiven PZ stark beeinträchtigt, wodurch die autoreaktiven PZ zugrunde gehen und folglich die Autoantikörperkonzentrationen im Serum sinken.



Zusätzlich besteht die Möglichkeit der Akkumulation vorrangig autoreaktiver PZ in chronisch entzündeten Gewebearealen, die nachweislich Überlebensnischen für PZ besitzen (Cassese et al., 2001), wie sie bereits für Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie SLE (Cassese et al., 2001; Hutloff et al., 2004) und RA (Reparon-Schuijt et al., 1998) beschrieben wurde. Obwohl gezeigt werden konnte, dass die Verteilung der PZ im inflammatorischen Gewebe heterogen und nicht auf autoreaktive PZ beschränkt ist (Cassese et al., 2001), wird eine bevorzugte lokale Ansammlung autoreaktiver PZ im entzündeten Gewebe aufgrund der „Nähe zum Geschehen“ diskutiert (Hauser et al., 2003). Bei Therapiemaßnahmen, z.B. einer B-Zell-depletierenden Therapie, die das Abklingen der Entzündung initiieren, werden die Überlebensnischen in den jeweiligen Organen abgebaut und die (autoreaktiven) PZ gehen zugrunde (Radbruch et al., 2006). Aufgrund der inhomogenen PZ-Verteilung im entzündeten Gewebe (Cassese et al., 2001) ist es unwahrscheinlich, dass der differenzielle Effekt von Rituximab auf autoreaktive und pathogenspezifische Antikörper bei PV-Patienten auf eine bevorzugte Eliminierung autoreaktiver, geweberesidenter PZ zurückzuführen ist. Die fehlende Akkumulation von Entzündungsinfiltrationen und somit auch von PZ in periläsionalen Hautbiopsien von PV-Patienten untermauert diese Einschätzung zusätzlich (Ioannides et al., 2008).

Die Ergebnisse dieser Studie beleuchten erstmalig den Einfluss verschiedener Therapieformen auf die Serumkonzentrationen der B-Zell-aktivierenden Faktoren, BAFF und APRIL, beim PV. Interessanterweise, war eine Induktion von BAFF im Serum der PV-Patienten ausschließlich nach adjuvanter Rituximab-Therapie nachweisbar, die mit einer Erhöhung der pathogenspezifischen, jedoch nicht der autoreaktiven, Antikörper verbunden war. Da es sich bei der vorliegenden Studie um eine reine Beobachtungsstudie handelt, die hauptsächlich der Hypothesengenerierung diene und einige Limitationen aufweist (keine statistisch unabhängigen Beobachtungen, da drei PV-Patienten sowohl in die Gruppe der IA- als auch der Rituximab-Patienten eingeschlossen wurden; sehr kleine Fallzahlen in den Gruppen der IS- und IA-Patienten), sind weitere Fallzahl-geplante, randomisierte Studien unerlässlich, um die hier dargestellten Ergebnisse zu belegen/entkräften. Zusätzlich wäre eine zukünftige nähere Charakterisierung der differentiellen Wirkung von BAFF auf autoreaktive und pathogenspezifische PZ für das Verständnis der Funktionsweise und Regulation der autoreaktiven PZ beim PV bedeutungsvoll.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ahmed AR (2001). Intravenous immunoglobulin therapy in the treatment of patients with pemphigus vulgaris unresponsive to conventional immunosuppressive treatment. *J Am Acad Dermatol* 45: 679-690.
- Ahmed AR, Mohimen A, Yunis EJ, Mirza NM, Kumar V, Beutner EH et al. (1993). Linkage of pemphigus vulgaris antibody to the major histocompatibility complex in healthy relatives of patients. *J Exp Med* 177: 419-424.
- Ahmed AR, Spigelman Z, Cavacini LA, Posner MR (2006). Treatment of pemphigus vulgaris with rituximab and intravenous immune globulin. *N Engl J Med* 355: 1772-1779.
- Ahmed AR, Wagner R, Khatri K, Notani G, Awdeh Z, Alper CA et al. (1991). Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5056-5060.
- Ahmed AR, Yunis EJ, Khatri K, Wagner R, Notani G, Awdeh Z et al. (1990). Major histocompatibility complex haplotype studies in Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7658-7662.
- Alas S, Ng CP, Bonavida B (2002). Rituximab modifies the cisplatin-mitochondrial signaling pathway, resulting in apoptosis in cisplatin-resistant non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 8: 836-845.
- Amagai M (1999). Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. *J Dermatol Sci* 20: 92-102.
- Amagai M (2003). Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. *J Am Acad Dermatol* 48: 244-252.
- Amagai M, Ahmed AR, Kitajima Y, Bystryn JC, Milner Y, Gniadecki R et al. (2006). Are desmoglein autoantibodies essential for the immunopathogenesis of pemphigus vulgaris, or just "witnesses of disease"? *Exp Dermatol* 15: 815-831.
- Ameaglio F, D'Auria L, Cordiali-Fei P, Trento E, D'Agosto G, Mastroianni A et al. (1999). Anti-intercellular substance antibody log titres are correlated with serum concentrations of interleukin-6, interleukin-15 and tumor necrosis factor-alpha in patients with Pemphigus vulgaris relationships with peripheral blood neutrophil counts, disease severity and duration and patients' age. *J Biol Regul Homeost Agents* 13: 220-224.
- Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA (1982). Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med* 306: 1189-1196.
- Anolik JH, Barnard J, Owen T, Zheng B, Kemshetti S, Looney RJ et al. (2007). Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. *Arthritis Rheum* 56: 3044-3056.
- Anolik JH, Campbell D, Felgar RE, Young F, Sanz I, Rosenblatt J et al. (2003). The relationship of FcgammaRIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 48: 455-459.

- Aoki-Ota M, Kinoshita M, Ota T, Tsunoda K, Iwasaki T, Tanaka S et al. (2006). Tolerance induction by the blockade of CD40/CD154 interaction in pemphigus vulgaris mouse model. *J Invest Dermatol* 126: 105-113.
- Arin MJ, Engert A, Krieg T, Hunzelmann N (2005). Anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) in the treatment of pemphigus. *Br J Dermatol* 153: 620-625.
- Arkfeld DG (2008). The potential utility of B cell-directed biologic therapy in autoimmune diseases. *Rheumatol Int* 28: 205-215.
- Arredondo J, Chernyavsky AI, Karaouni A, Grando SA (2005). Novel mechanisms of target cell death and survival and of therapeutic action of IVIg in Pemphigus. *Am J Pathol* 167: 1531-1544.
- Asashima N, Fujimoto M, Watanabe R, Nakashima H, Yazawa N, Okochi H et al. (2006). Serum levels of BAFF are increased in bullous pemphigoid but not in pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 155: 330-336.
- Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M et al. (2003). BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest* 112: 286-297.
- Badr G, Borhis G, Lefevre EA, Chaoul N, Deshayes F, Dessirier V et al. (2008). BAFF enhances chemotaxis of primary human B cells: a particular synergy between BAFF and CXCL13 on memory B cells. *Blood* 111: 2744-2754.
- Baroni A, Perfetto B, Ruocco E, Greco R, Criscuolo D, Ruocco V (2002). Cytokine pattern in blister fluid and sera of patients with pemphigus. *Dermatology* 205: 116-121.
- Benson MJ, Dillon SR, Castigli E, Geha RS, Xu S, Lam KP et al. (2008). Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J Immunol* 180: 3655-3659.
- Berger JR (2006). Natalizumab and progressive multifocal leucoencephalopathy. *Ann Rheum Dis* 65 Suppl 3: iii48-53.
- Bhol K, Natarajan K, Nagarwalla N, Mohimen A, Aoki V, Ahmed AR (1995). Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenic and nonpathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris: a model for autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5239-5243.
- Bhol KC, Rojas AI, Khan IU, Ahmed AR (2000). Presence of interleukin 10 in the serum and blister fluid of patients with pemphigus vulgaris and pemphigoid. *Cytokine* 12: 1076-1083.
- Bossen C, Schneider P (2006). BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin Immunol* 18: 263-275.
- Bouaziz JD, Yanaba K, Venturi GM, Wang Y, Tisch RM, Poe JC et al. (2007). Therapeutic B cell depletion impairs adaptive and autoreactive CD4+ T cell activation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 20878-20883.
- Brink R (2006). Regulation of B cell self-tolerance by BAFF. *Semin Immunol* 18: 276-283.
- Brostoff J, Scadding GK, Male D, Roitt IM (1993). *Klinische Immunologie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

- Browning JL (2006). B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. *Nat Rev Drug Discov* 5: 564-576.
- Bystryn JC, Rudolph JL (2005). Pemphigus. *Lancet* 366: 61-73.
- Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JC, Ehrenstein MR, Salden M, Bodman-Smith M et al. (2003). Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 2146-2154.
- Cambridge G, Leandro MJ, Teodorescu M, Manson J, Rahman A, Isenberg DA et al. (2006a). B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: effect on autoantibody and antimicrobial antibody profiles. *Arthritis Rheum* 54: 3612-3622.
- Cambridge G, Stohl W, Leandro MJ, Migone TS, Hilbert DM, Edwards JC (2006b). Circulating levels of B lymphocyte stimulator in patients with rheumatoid arthritis following rituximab treatment: relationships with B cell depletion, circulating antibodies, and clinical relapse. *Arthritis Rheum* 54: 723-732.
- Canete JD, Santiago B, Cantaert T, Sanmarti R, Palacin A, Celis R et al. (2007). Ectopic lymphoid neogenesis in psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 66: 720-726.
- Carr DR, Heffernan MP (2007). Off-label uses of rituximab in dermatology. *Dermatol Ther* 20: 277-287.
- Cartron G, Blasco H, Painteaud G, Watier H, Le Guellec C (2007). Pharmacokinetics of rituximab and its clinical use: thought for the best use? *Crit Rev Oncol Hematol* 62: 43-52.
- Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P et al. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fcγ3 gene. *Blood* 99: 754-758.
- Cassese G, Arce S, Hauser AE, Lehnert K, Moewes B, Mostarac M et al. (2003). Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol* 171: 1684-1690.
- Cassese G, Lindenau S, de Boer B, Arce S, Hauser A, Riemekasten G et al. (2001). Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. *Eur J Immunol* 31: 2726-2732.
- Castigli E, Wilson SA, Scott S, Dedeoglu F, Xu S, Lam KP et al. (2005). TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med* 201: 35-39.
- Cellerai C, Harari A, Vallelian F, Boyman O, Pantaleo G (2007). Functional and phenotypic characterization of tetanus toxoid-specific human CD4+ T cells following re-immunization. *Eur J Immunol* 37: 1129-1138.
- Chang SK, Arendt BK, Darce JR, Wu X, Jelinek DF (2006). A role for BlyS in the activation of innate immune cells. *Blood* 108: 2687-2694.
- Chatham W, Stohl W, Petri M, Furie R, Merrill JT, Wallace DJ et al. (2008). Progressive normalization of autoantibody, immunoglobulin, and complement levels over 2.5 years of belimumab (anti-BlyS monoclonal antibody) therapy in SLE patients. *IMMUNO2008 Scientific Meeting, Berlin, Germany. (Abstract)*

- Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, Stohl W (2001). Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 44: 1313-1319.
- Chowdhury MM, Natarajan S (1998). Neonatal pemphigus vulgaris associated with mild oral pemphigus vulgaris in the mother during pregnancy. *Br J Dermatol* 139: 500-503.
- Cooper HL, Healy E, Theaker JM, Friedmann PS (2003). Treatment of resistant pemphigus vulgaris with an anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab). *Clin Exp Dermatol* 28: 366-368.
- Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ (2005). The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun* 8: 140-174.
- Crawford A, Macleod M, Schumacher T, Corlett L, Gray D (2006). Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells. *J Immunol* 176: 3498-3506.
- Cutler C, Miklos D, Kim HT, Treister N, Woo SB, Bienfang D et al. (2006). Rituximab for steroid-refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood* 108: 756-762.
- Czernik A, Beutner EH, Bystryk JC (2008). Intravenous immunoglobulin selectively decreases circulating autoantibodies in pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 58: 796-801.
- Dai YD, Carayanniotis G, Sercarz E (2005). Antigen processing by autoreactive B cells promotes determinant spreading. *Cell Mol Immunol* 2: 169-175.
- Dall'Era M, Chakravarty E, Wallace D, Genovese M, Weisman M, Kavanaugh A et al. (2007). Reduced B lymphocyte and immunoglobulin levels after atacicept treatment in patients with systemic lupus erythematosus: results of a multicenter, phase Ib, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating trial. *Arthritis Rheum* 56: 4142-4150.
- Darce JR, Arendt BK, Wu X, Jelinek DF (2007). Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. *J Immunol* 179: 7276-7286.
- Desai-Mehta A, Lu L, Ramsey-Goldman R, Datta SK (1996). Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J Clin Invest* 97: 2063-2073.
- Dillon SR, Gross JA, Ansell SM, Novak AJ (2006). An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 5: 235-246.
- Do RK, Hatada E, Lee H, Tourigny MR, Hilbert D, Chen-Kiang S (2000). Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. *J Exp Med* 192: 953-964.
- Dorner T, Lipsky PE (2007). B-cell targeting: a novel approach to immune intervention today and tomorrow. *Expert Opin Biol Ther* 7: 1287-1299.
- Eming R, Hertl M (2006). Immunoabsorption in pemphigus. *Autoimmunity* 39: 609-616.
- Eming R, Rech J, Barth S, Kalden JR, Schuler G, Harrer T et al. (2006). Prolonged clinical remission of patients with severe pemphigus upon rapid removal of desmoglein-reactive autoantibodies by immunoabsorption. *Dermatology* 212: 177-187.

- Emmerich F, Bal G, Barakat A, Milz J, Muhle C, Martinez-Gamboa L et al. (2007). High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 136: 309-314.
- Ettinger R, Sims GP, Robbins R, Withers D, Fischer RT, Grammer AC et al. (2007). IL-21 and BAFF/BLyS synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells. *J Immunol* 178: 2872-2882.
- Fairweather D, Rose NR (2004). Women and autoimmune diseases. *Emerg Infect Dis* 10: 2005-2011.
- Feliciani C, Toto P, Amerio P, Pour SM, Coscione G, Shivji G et al. (2000). In vitro and in vivo expression of interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha mRNA in pemphigus vulgaris: interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha are involved in acantholysis. *J Invest Dermatol* 114: 71-77.
- Ferraro AJ, Drayson MT, Savage CO, MacLennan IC (2008). Levels of autoantibodies, unlike antibodies to all extrinsic antigen groups, fall following B cell depletion with Rituximab. *Eur J Immunol* 38: 292-298.
- Furie R, Stohl W, Ginzler EM, Becker M, Mishra N, Chatham W et al. (2008). Biologic activity and safety of belimumab, a neutralizing anti-B-lymphocyte stimulator (BLyS) monoclonal antibody: a phase I trial in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 10: R109.
- Ginzler EM, Stohl W, Wallace DJ, Merrill JT, Petri M, Furie R et al. (2008). Correlation of biomarker changes with clinical improvement over 2.5 years of belimumab (anti-BlyS monoclonal antibody) therapy in SLE patients. *IMMUNO2008 Scientific Meeting, Berlin, Germany. (Abstract)*
- Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP (2007). Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 44: 3823-3837.
- Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Mosmann TR et al. (1990). Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med* 172: 1625-1631.
- Gong Q, Ou Q, Ye S, Lee WP, Cornelius J, Diehl L et al. (2005). Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J Immunol* 174: 817-826.
- Grando SA (2000). Autoimmunity to keratinocyte acetylcholine receptors in pemphigus. *Dermatology* 201: 290-295.
- Grimaldi CM, Hicks R, Diamond B (2005). B cell selection and susceptibility to autoimmunity. *J Immunol* 174: 1775-1781.
- Groom J, Mackay F (2008). B cells flying solo. *Immunol Cell Biol* 86: 40-46.
- Groom JR, Fletcher CA, Walters SN, Grey ST, Watt SV, Sweet MJ et al. (2007). BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J Exp Med* 204: 1959-1971.
- Halpern WG, Lappin P, Zanardi T, Cai W, Corcoran M, Zhong J et al. (2006). Chronic administration of belimumab, a BLyS antagonist, decreases tissue and peripheral blood

- B-lymphocyte populations in cynomolgus monkeys: pharmacokinetic, pharmacodynamic, and toxicologic effects. *Toxicol Sci* 91: 586-599.
- Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM et al. (2000). Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol* 1: 475-482.
- Hauser AE, Muehlinghaus G, Manz RA, Cassese G, Arce S, Debes GF et al. (2003). Long-lived plasma cells in immunity and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 987: 266-269.
- Hendriks J, Planelles L, de Jong-Odding J, Hardenberg G, Pals ST, Hahne M et al. (2005). Heparan sulfate proteoglycan binding promotes APRIL-induced tumor cell proliferation. *Cell Death Differ* 12: 637-648.
- Hertl M (2000). Humoral and cellular autoimmunity in autoimmune bullous skin disorders. *Int Arch Allergy Immunol* 122: 91-100.
- Hertl M, Eming R, Borradori L (2007). Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody)--ultimate or first choice in pemphigus? *Dermatology* 214: 275-277.
- Hertl M, Eming R, Veldman C (2006). T cell control in autoimmune bullous skin disorders. *J Clin Invest* 116: 1159-1166.
- Hertl M, Karr RW, Amagai M, Katz SI (1998). Heterogeneous MHC II restriction pattern of autoreactive desmoglein 3 specific T cell responses in pemphigus vulgaris patients and normals. *J Invest Dermatol* 110: 388-392.
- Hertl M, Riechers R (1999). Analysis of the T cells that are potentially involved in autoantibody production in pemphigus vulgaris. *J Dermatol* 26: 748-752.
- Hertl M, Schuler G (2002a). Bullöse Autoimmundermatosen Teil 1: Klassifikation [Bullous autoimmune dermatoses. 1: Classification]. *Hautarzt* 53: 207-219; quiz 220-201.
- Hertl M, Schuler G (2002b). Bullöse Autoimmundermatosen Teil 2: Pathogenese [Bullous autoimmune dermatoses. 2: Pathogenesis]. *Hautarzt* 53: 277-285; quiz 285, 287.
- Hertl M, Schuler G (2002c). Bullöse Autoimmundermatosen Teil 3: Diagnostik und Therapie [Bullous autoimmune dermatoses. 3: Diagnosis and therapy]. *Hautarzt* 53: 352-365; quiz 366-357.
- Hertl M, Veldman C (2001). Pemphigus--paradigm of autoantibody-mediated autoimmunity. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14: 408-418.
- Hertl M, Zillikens D, Borradori L, Bruckner-Tuderman L, Burckhard H, Eming R et al. (2008). Recommendations for the use of rituximab (anti-CD20 antibody) in the treatment of autoimmune bullous skin diseases. *J Dtsch Dermatol Ges* 6: 366-373.
- Hertl M (2001). Autoimmune Diseases of the Skin. Pathogenesis, Diagnosis, Management. *Springer Verlag Wien*
- Hiepe F, Dorner T (2005). Autoantikörper und die Zellen, die sie machen [Autoantibodies and antibody-secreting cells]. *Z Rheumatol* 64: 389-395.
- Hoyer BF, Manz RA, Radbruch A, Hiepe F (2005). Long-lived plasma cells and their contribution to autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 1050: 124-133.

- Hoyer BF, Moser K, Hauser AE, Peddinghaus A, Voigt C, Eilat D et al. (2004). Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice. *J Exp Med* 199: 1577-1584.
- Hu CY, Rodriguez-Pinto D, Du W, Ahuja A, Henegariu O, Wong FS et al. (2007). Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *J Clin Invest* 117: 3857-3867.
- Huard B, Arlettaz L, Ambrose C, Kindler V, Mauri D, Roosnek E et al. (2004). BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation. *Int Immunol* 16: 467-475.
- Huard B, Schneider P, Mauri D, Tschopp J, French LE (2001). T cell costimulation by the TNF ligand BAFF. *J Immunol* 167: 6225-6231.
- Hultin LE, Hausner MA, Hultin PM, Giorgi JV (1993). CD20 (pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes. *Cytometry* 14: 196-204.
- Hutloff A, Buchner K, Reiter K, Baelde HJ, Odendahl M, Jacobi A et al. (2004). Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50: 3211-3220.
- Ingold K, Zumsteg A, Tardivel A, Huard B, Steiner QG, Cachero TG et al. (2005). Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *J Exp Med* 201: 1375-1383.
- Ioannides D, Lazaridou E, Rigopoulos D (2008). Pemphigus. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 22: 1478-1496.
- Ishii K, Amagai M, Hall RP, Hashimoto T, Takayanagi A, Gamou S et al. (1997). Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *J Immunol* 159: 2010-2017.
- Itoh K, Kano T, Nagashio C, Mimori A, Kinoshita M, Sumiya M (2006). Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54: 1020-1022.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2002). Immunologie (5. Auflage). *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg*
- Johansson-Lindbom B, Ingvarsson S, Borrebaeck CA (2003). Germinal centers regulate human Th2 development. *J Immunol* 171: 1657-1666.
- Joly P, Mouquet H, Roujeau JC, D'Incan M, Gilbert D, Jacquot S et al. (2007). A single cycle of rituximab for the treatment of severe pemphigus. *N Engl J Med* 357: 545-552.
- Jonsson MV, Szodoray P, Jellestad S, Jonsson R, Skarstein K (2005). Association between circulating levels of the novel TNF family members APRIL and BAFF and lymphoid organization in primary Sjogren's syndrome. *J Clin Immunol* 25: 189-201.
- Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Ruckert B et al. (2004). Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114: 1425-1433.
- Karpusas M, Cachero TG, Qian F, Boriack-Sjodin A, Mullen C, Strauch K et al. (2002). Crystal structure of extracellular human BAFF, a TNF family member that stimulates B lymphocytes. *J Mol Biol* 315: 1145-1154.



- Kasperkiewicz M, Zillikens D (2007). Rituximab (anti-CD20) zur Behandlung von bullösen Autoimmundermatosen [Rituximab (anti-CD20) for the treatment of autoimmune bullous diseases]. *Hautarzt* 58: 115-116, 118-121.
- Keskin DB, Stern JN, Fridkis-Hareli M, Razzaque Ahmed A (2008). Cytokine profiles in pemphigus vulgaris patients treated with intravenous immunoglobulins as compared to conventional immunosuppressive therapy. *Cytokine* 41: 315-321.
- Kimby E (2005). Tolerability and safety of rituximab (MabThera). *Cancer Treat Rev* 31: 456-473.
- Kleindienst P, Brocker T (2005). Concerted antigen presentation by dendritic cells and B cells is necessary for optimal CD4 T-cell immunity in vivo. *Immunology* 115: 556-564.
- Kljuic A, Bazzi H, Sundberg JP, Martinez-Mir A, O'Shaughnessy R, Mahoney MG et al. (2003). Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell* 113: 249-260.
- Kneitz C, Wilhelm M, Tony HP (2002). Effective B cell depletion with rituximab in the treatment of autoimmune diseases. *Immunobiology* 206: 519-527.
- Kricheli D, David M, Frusic-Zlotkin M, Goldsmith D, Rabinov M, Sulkes J et al. (2000). The distribution of pemphigus vulgaris-IgG subclasses and their reactivity with desmoglein 3 and 1 in pemphigus patients and their first-degree relatives. *Br J Dermatol* 143: 337-342.
- Krumbholz M, Specks U, Wick M, Kalled SL, Jenne D, Meinl E (2005). BAFF is elevated in serum of patients with Wegener's granulomatosis. *J Autoimmun* 25: 298-302.
- Kwon EJ, Yamagami J, Nishikawa T, Amagai M (2008). Anti-desmoglein IgG autoantibodies in patients with pemphigus in remission. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 22: 1070-1075.
- Lalani I, Bhol K, Ahmed AR (1997). Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 79: 469-483.
- Lavie F, Miceli-Richard C, Ittah M, Sellam J, Gottenberg JE, Mariette X (2007). Increase of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment: insights into a new regulating system of BAFF production. *Ann Rheum Dis* 66: 700-703.
- Le Pottier L, Bendaoud B, Dueymes M, Daridon C, Youinou P, Shoenfeld Y et al. (2007). BAFF, a new target for intravenous immunoglobulin in autoimmunity and cancer. *J Clin Immunol* 27: 257-265.
- Leandro MJ, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JC (2006). Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54: 613-620.
- Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G (2002). Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion. *Ann Rheum Dis* 61: 883-888.
- Lesley R, Xu Y, Kalled SL, Hess DM, Schwab SR, Shu HB et al. (2004). Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity* 20: 441-453.
- Levy Y, Brouet JC (1994). Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J Clin Invest* 93: 424-428.

- Li N, Zhao M, Hilario-Vargas J, Prisayanh P, Warren S, Diaz LA et al. (2005). Complete FcRn dependence for intravenous Ig therapy in autoimmune skin blistering diseases. *J Clin Invest* 115: 3440-3450.
- Lin MS, Swartz SJ, Lopez A, Ding X, Fernandez-Vina MA, Stastny P et al. (1997). Development and characterization of desmoglein-3 specific T cells from patients with pemphigus vulgaris. *J Clin Invest* 99: 31-40.
- Lin WY, Gong Q, Seshasayee D, Lin Z, Ou Q, Ye S et al. (2007). Anti-BR3 antibodies: a new class of B-cell immunotherapy combining cellular depletion and survival blockade. *Blood* 110: 3959-3967.
- Linton PJ, Harbertson J, Bradley LM (2000). A critical role for B cells in the development of memory CD4 cells. *J Immunol* 165: 5558-5565.
- Liossis SN, Sfrikakis PP (2008). Rituximab-induced B cell depletion in autoimmune diseases: potential effects on T cells. *Clin Immunol* 127: 280-285.
- Llorente L, Richaud-Patin Y, Couderc J, Alarcon-Segovia D, Ruiz-Soto R, Alcocer-Castillejos N et al. (1997). Dysregulation of interleukin-10 production in relatives of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40: 1429-1435.
- Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R, Alcocer-Varela J, Wijdenes J, Fourrier BM et al. (1994). In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. *Arthritis Rheum* 37: 1647-1655.
- Llorente L, Zou W, Levy Y, Richaud-Patin Y, Wijdenes J, Alcocer-Varela J et al. (1995). Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 181: 839-844.
- Lopez-Robles E, Avalos-Diaz E, Vega-Memije E, Hojyo-Tomoka T, Villalobos R, Fraire S et al. (2001). TNFalpha and IL-6 are mediators in the blistering process of pemphigus. *Int J Dermatol* 40: 185-188.
- Mackay F, Leung H (2006). The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin Immunol* 18: 284-289.
- Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J (2003). BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 21: 231-264.
- Mackay F, Silveira PA, Brink R (2007). B cells and the BAFF/APRIL axis: fast-forward on autoimmunity and signaling. *Curr Opin Immunol* 19: 327-336.
- Manfredi AA, Sabbadini MG, Rovere-Querini P (2005). Dendritic cells and the shadow line between autoimmunity and disease. *Arthritis Rheum* 52: 11-15.
- Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A (2005). Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* 23: 367-386.
- Manz RA, Lohning M, Cassese G, Thiel A, Radbruch A (1998). Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *Int Immunol* 10: 1703-1711.
- Martin F, Chan AC (2006). B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic. *Annu Rev Immunol* 24: 467-496.

- Matsushita T, Fujimoto M, Hasegawa M, Matsushita Y, Komura K, Ogawa F et al. (2007a). BAFF antagonist attenuates the development of skin fibrosis in tight-skin mice. *J Invest Dermatol* 127: 2772-2780.
- Matsushita T, Hasegawa M, Matsushita Y, Echigo T, Wayaku T, Horikawa M et al. (2007b). Elevated serum BAFF levels in patients with localized scleroderma in contrast to other organ-specific autoimmune diseases. *Exp Dermatol* 16: 87-93.
- Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Koderer M, Takehara K, Sato S (2006). Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis Rheum* 54: 192-201.
- Medema JP, Planelles-Carazo L, Hardenberg G, Hahne M (2003). The uncertain glory of APRIL. *Cell Death Differ* 10: 1121-1125.
- Mehta JN, Martin AG (2000). A case of pemphigus vulgaris improved by cigarette smoking. *Arch Dermatol* 136: 15-17.
- Moll R, Moll I (1998). Epidermal adhesion molecules and basement membrane components as target structures of autoimmunity. *Virchows Arch* 432: 487-504.
- Morell-Dubois S, Carpentier O, Cottencin O, Queyrel V, Hachulla E, Hatron PY et al. (2008). Stressful life events and pemphigus. *Dermatology* 216: 104-108.
- Mouquet H, Musette P, Gougeon ML, Jacquot S, Lemerrier B, Lim A et al. (2008). B-Cell Depletion Immunotherapy in Pemphigus: Effects on Cellular and Humoral Immune Responses. *J Invest Dermatol* 128: 2859-2869.
- Murrell DF, Dick S, Ahmed AR, Amagai M, Barnadas MA, Borradori L et al. (2008). Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 58: 1043-1046.
- Nagasaka T, Nishifuji K, Ota T, Whittock NV, Amagai M (2004). Defining the pathogenic involvement of desmoglein 4 in pemphigus and staphylococcal scalded skin syndrome. *J Clin Invest* 114: 1484-1492.
- Nagel A, Hertl M, Eming R (2009). B-Cell-Directed Therapy for Inflammatory Skin Diseases. *J Invest Dermatol* 129: 289-301.
- Ng LG, Sutherland AP, Newton R, Qian F, Cachero TG, Scott ML et al. (2004). B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J Immunol* 173: 807-817.
- Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, Pittelkow MR, Kitajima Y, Grando SA (2004). Pemphigus vulgaris acantholysis ameliorated by cholinergic agonists. *Arch Dermatol* 140: 327-334.
- Niedermeier A, Eming R, Pfütze M, Neumann CR, Happel C, Reich K et al. (2007). Clinical response of severe mechanobullous epidermolysis bullosa acquisita to combined treatment with immunoabsorption and rituximab (anti-CD20 monoclonal antibodies). *Arch Dermatol* 143: 192-198.
- Nishifuji K, Amagai M, Kuwana M, Iwasaki T, Nishikawa T (2000). Detection of antigen-specific B cells in patients with pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay:

- requirement of T cell collaboration for autoantibody production. *J Invest Dermatol* 114: 88-94.
- Nousari HC, Anhalt GJ (1999). Pemphigus and bullous pemphigoid. *Lancet* 354: 667-672.
- O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, Cook WJ, Weaver LK, Ahonen C et al. (2004). BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med* 199: 91-98.
- Oberdisse E, Hackenthal E, Kuschinsky K (2002). Pharmakologie und Toxikologie (3. Auflage). *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*
- Ogden CA, Pound JD, Bath BK, Owens S, Johannessen I, Wood K et al. (2005). Enhanced apoptotic cell clearance capacity and B cell survival factor production by IL-10-activated macrophages: implications for Burkitt's lymphoma. *J Immunol* 174: 3015-3023.
- Ollier W, Symmons DPM (1995). Autoimmunität. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg*
- Paran D, Trej'bo L, Caspi D (2006). Clinical images: B cell depletion in the appendix following rituximab treatment. *Arthritis Rheum* 54: 2151.
- Parlowsky T, Welzel J, Amagai M, Zillikens D, Wygold T (2003). Neonatal pemphigus vulgaris: IgG4 autoantibodies to desmoglein 3 induce skin blisters in newborns. *J Am Acad Dermatol* 48: 623-625.
- Payne AS, Hanakawa Y, Amagai M, Stanley JR (2004). Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo. *Curr Opin Cell Biol* 16: 536-543.
- Pers JO, Daridon C, Bendaoud B, Devauchelle V, Berthou C, Saraux A et al. (2008). B-cell depletion and repopulation in autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 34: 50-55.
- Pers JO, Daridon C, Devauchelle V, Jousse S, Saraux A, Jamin C et al. (2005). BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1050: 34-39.
- Pers JO, Devauchelle V, Daridon C, Bendaoud B, Le Berre R, Bordron A et al. (2007). BAFF-modulated repopulation of B lymphocytes in the blood and salivary glands of rituximab-treated patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 56: 1464-1477.
- Pfütze M, Niedermeier A, Hertl M, Eming R (2007). Introducing a novel Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) in pemphigus. *Eur J Dermatol* 17: 4-11.
- Pistoia V (1997). Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunol Today* 18: 343-350.
- Plotz PH (2003). The autoantibody repertoire: searching for order. *Nat Rev Immunol* 3: 73-78.
- Prasad NK, Papoff G, Zeuner A, Bonnin E, Kazatchkine MD, Ruberti G et al. (1998). Therapeutic preparations of normal polyspecific IgG (IVIg) induce apoptosis in human lymphocytes and monocytes: a novel mechanism of action of IVIg involving the Fas apoptotic pathway. *J Immunol* 161: 3781-3790.
- Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dorner T et al. (2006). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol* 6: 741-750.

- Ramanujam M, Wang X, Huang W, Liu Z, Schiffer L, Tao H et al. (2006). Similarities and differences between selective and nonselective BAFF blockade in murine SLE. *J Clin Invest* 116: 724-734.
- Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R et al. (1994). Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83: 435-445.
- Reparon-Schuijt CC, van Esch WJ, van Kooten C, Levarht EW, Breedveld FC, Verweij CL (1998). Functional analysis of rheumatoid factor-producing B cells from the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 41: 2211-2220.
- Rodriguez-Pinto D (2005). B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol* 238: 67-75.
- Roll P, Palanichamy A, Kneitz C, Dorner T, Tony HP (2006). Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54: 2377-2386.
- Roschke V, Sosnovtseva S, Ward CD, Hong JS, Smith R, Albert V et al. (2002). BLyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *J Immunol* 169: 4314-4321.
- Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH et al. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 1890-1893.
- Salzer U, Jennings S, Grimbacher B (2007). To switch or not to switch--the opposing roles of TACI in terminal B cell differentiation. *Eur J Immunol* 37: 17-20.
- Sanders JS, Huitma MG, Kallenberg CG, Stegeman CA (2006). Plasma levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD30, interleukin 10 and B cell activator of the tumour necrosis factor family during follow-up in vasculitis associated with proteinase 3-antineutrophil cytoplasmic antibodies: associations with disease activity and relapse. *Ann Rheum Dis* 65: 1484-1489.
- Schaller M, Stohl W, Tan SM, Benoit VM, Hilbert DM, Ditzel HJ (2005). Raised levels of anti-glucose-6-phosphate isomerase IgG in serum and synovial fluid from patients with inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 64: 743-749.
- Schmidt E, Brocker EB, Goebeler M (2008). Rituximab in treatment-resistant autoimmune blistering skin disorders. *Clin Rev Allergy Immunol* 34: 56-64.
- Schneider P (2005). The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 17: 282-289.
- Schneider P, Tschopp J (2003). BAFF and the regulation of B cell survival. *Immunol Lett* 88: 57-62.
- Schroder C, Azimzadeh AM, Wu G, Price JO, Atkinson JB, Pierson RN (2003). Anti-CD20 treatment depletes B-cells in blood and lymphatic tissue of cynomolgus monkeys. *Transpl Immunol* 12: 19-28.
- Segura S, Iranzo P, Martinez-de Pablo I, Mascaró JM, Jr., Alsina M, Herrero J et al. (2007). High-dose intravenous immunoglobulins for the treatment of autoimmune

- mucocutaneous blistering diseases: evaluation of its use in 19 cases. *J Am Acad Dermatol* 56: 960-967.
- Seror R, Sordet C, Guillevin L, Hachulla E, Masson C, Ittah M et al. (2007). Tolerance and efficacy of rituximab and changes in serum B cell biomarkers in patients with systemic complications of primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 66: 351-357.
- Seyler TM, Park YW, Takemura S, Bram RJ, Kurtin PJ, Goronzy JJ et al. (2005). BLYS and APRIL in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 115: 3083-3092.
- Sfikakis PP, Boletis JN, Lionaki S, Vigklis V, Fragiadaki KG, Iniotaki A et al. (2005a). Remission of proliferative lupus nephritis following B cell depletion therapy is preceded by down-regulation of the T cell costimulatory molecule CD40 ligand: an open-label trial. *Arthritis Rheum* 52: 501-513.
- Sfikakis PP, Boletis JN, Tsokos GC (2005b). Rituximab anti-B-cell therapy in systemic lupus erythematosus: pointing to the future. *Curr Opin Rheumatol* 17: 550-557.
- Sfikakis PP, Souliotis VL, Fragiadaki KG, Moutsopoulos HM, Boletis JN, Theofilopoulos AN (2007). Increased expression of the FoxP3 functional marker of regulatory T cells following B cell depletion with rituximab in patients with lupus nephritis. *Clin Immunol* 123: 66-73.
- Shan D, Ledbetter JA, Press OW (2000). Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol Immunother* 48: 673-683.
- Shaw T, Quan J, Totoritis MC (2003). B cell therapy for rheumatoid arthritis: the rituximab (anti-CD20) experience. *Ann Rheum Dis* 62 Suppl 2: ii55-59.
- Shih FF, Racz J, Allen PM (2006). Differential MHC class II presentation of a pathogenic autoantigen during health and disease. *J Immunol* 176: 3438-3448.
- Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ (2001). From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 1: 147-153.
- Silverman GJ, Weisman S (2003). Rituximab therapy and autoimmune disorders: prospects for anti-B cell therapy. *Arthritis Rheum* 48: 1484-1492.
- Simon D, Hosli S, Kostylyna G, Yawalkar N, Simon HU (2008). Anti-CD20 (rituximab) treatment improves atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 121: 122-128.
- Singh F, Weinberg JM (2005). Partial remission of psoriasis following rituximab therapy for non-Hodgkin lymphoma. *Cutis* 76: 186-188.
- Sinha AA, Brautbar C, Szafer F, Friedmann A, Tzfonl E, Todd JA et al. (1988). A newly characterized HLA DQ beta allele associated with pemphigus vulgaris. *Science* 239: 1026-1029.
- Sitaru C, Mihai S, Zillikens D (2007). The relevance of the IgG subclass of autoantibodies for blister induction in autoimmune bullous skin diseases. *Arch Dermatol Res* 299: 1-8.
- Sitaru C, Zillikens D (2005). Mechanisms of blister induction by autoantibodies. *Exp Dermatol* 14: 861-875.
- Slifka MK, Ahmed R (1998). Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr Opin Immunol* 10: 252-258.

- Smith KG, Jones RB, Burns SM, Jayne DR (2006). Long-term comparison of rituximab treatment for refractory systemic lupus erythematosus and vasculitis: Remission, relapse, and re-treatment. *Arthritis Rheum* 54: 2970-2982.
- Smith MR (2003). Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 22: 7359-7368.
- Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P (2007). New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 370: 1861-1874.
- Spaeth S, Riechers R, Borradori L, Zillikens D, Budinger L, Hertl M (2001). IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of desmoglein 3 in active pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 144: 1183-1188.
- Stasi R, Cooper N, Del Poeta G, Stipa E, Laura Evangelista M, Abruzzese E et al. (2008). Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab. *Blood* 112: 1147-1150.
- Stasi R, Del Poeta G, Stipa E, Evangelista ML, Trawinska MM, Cooper N et al. (2007). Response to B-cell depleting therapy with rituximab reverts the abnormalities of T-cell subsets in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 110: 2924-2930.
- Steinbrink K, Knop J (2003). Bedeutung der immunologischen Toleranz in der Dermatologie [Significance of immunologic tolerance in dermatology]. *Hautarzt* 54: 45-52.
- Stern JN, Keskin DB, Barteneva N, Zuniga J, Yunis EJ, Ahmed AR (2008). Possible role of natural killer cells in pemphigus vulgaris - preliminary observations. *Clin Exp Immunol* 152: 472-481.
- Stohl W, Looney RJ (2006). B cell depletion therapy in systemic rheumatic diseases: different strokes for different folks? *Clin Immunol* 121: 1-12.
- Stohl W, Metyas S, Tan SM, Cheema GS, Oamar B, Xu D et al. (2003). B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations. *Arthritis Rheum* 48: 3475-3486.
- Stohl W, Wallace DJ, Merrill JT, Chatham W, Gruhn W, Aranow C et al. (2006). Changes in circulating B-cell counts, autoantibody levels and immunoglobulins that associate with therapeutic responsiveness in SLE to BLYS protein antagonism by belimumab. *Arthritis Rheum* 54: S780.
- Sugiyama H, Matsue H, Nagasaka A, Nakamura Y, Tsukamoto K, Shibagaki N et al. (2007). CD4+CD25high regulatory T cells are markedly decreased in blood of patients with pemphigus vulgaris. *Dermatology* 214: 210-220.
- Sutherland AP, Mackay F, Mackay CR (2006). Targeting BAFF: immunomodulation for autoimmune diseases and lymphomas. *Pharmacol Ther* 112: 774-786.
- Sze DM, Toellner KM, Garcia de Vinuesa C, Taylor DR, MacLennan IC (2000). Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *J Exp Med* 192: 813-821.
- Tahir H, Rohrer J, Bhatia A, Wegener WA, Isenberg DA (2005). Humanized anti-CD20 monoclonal antibody in the treatment of severe resistant systemic lupus erythematosus in a patient with antibodies against rituximab. *Rheumatology (Oxford)* 44: 561-562.

- Takahashi H, Amagai M, Nishikawa T, Fujii Y, Kawakami Y, Kuwana M (2008). Novel system evaluating in vivo pathogenicity of desmoglein 3-reactive T cell clones using murine pemphigus vulgaris. *J Immunol* 181: 1526-1535.
- Takahashi H, Amagai M, Tanikawa A, Suzuki S, Ikeda Y, Nishikawa T et al. (2007). T helper type 2-biased natural killer cell phenotype in patients with pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 127: 324-330.
- Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM (2001). T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* 167: 4710-4718.
- Tamimoto Y, Horiuchi T, Tsukamoto H, Otsuka J, Mitoma H, Kimoto Y et al. (2008). A dose-escalation study of rituximab for treatment of systemic lupus erythematosus and Evans' syndrome: immunological analysis of B cells, T cells and cytokines. *Rheumatology (Oxford)* 47: 821-827.
- Tangye SG, Bryant VL, Cuss AK, Good KL (2006). BAFF, APRIL and human B cell disorders. *Semin Immunol* 18: 305-317.
- Tarlinton DM, Hodgkin PD (2004). Targeting plasma cells in autoimmune diseases. *J Exp Med* 199: 1451-1454.
- Tedder TF, Engel P (1994). CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today* 15: 450-454.
- Tedder TF, Klejman G, Schlossman SF, Saito H (1989). Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1). *J Immunol* 142: 2560-2568.
- Terstappen LW, Johnsen S, Segers-Nolten IM, Loken MR (1990). Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood* 76: 1739-1747.
- Thien M, Phan TG, Gardam S, Amesbury M, Basten A, Mackay F et al. (2004). Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* 20: 785-798.
- Thurlings RM, Vos K, Wijbrandts CA, Zwinderman AH, Gerlag DM, Tak PP (2008). Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response. *Ann Rheum Dis* 67: 917-925.
- Tokunaga M, Fujii K, Saito K, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M et al. (2005). Down-regulation of CD40 and CD80 on B cells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after successful treatment with rituximab. *Rheumatology (Oxford)* 44: 176-182.
- Tokunaga M, Saito K, Kawabata D, Imura Y, Fujii T, Nakayamada S et al. (2007). Efficacy of rituximab (anti-CD20) for refractory systemic lupus erythematosus involving the central nervous system. *Ann Rheum Dis* 66: 470-475.
- Toth GG, Jonkman MF (2001). Therapy of pemphigus. *Clin Dermatol* 19: 761-767.
- Toto P, Feliciani C, Amerio P, Suzuki H, Wang B, Shivji GM et al. (2000). Immune modulation in pemphigus vulgaris: role of CD28 and IL-10. *J Immunol* 164: 522-529.



- Toubi E, Kessel A, Slobodin G, Boulman N, Pavlotzky E, Zisman D et al. (2007). Changes in macrophage function after rituximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66: 818-820.
- Treon SP, Anderson KC (2000). The use of rituximab in the treatment of malignant and nonmalignant plasma cell disorders. *Semin Oncol* 27: 79-85.
- Tripmacher R (2005). Untersuchungen zu Wirkungen einer eingeschränkten Energiesynthese auf Funktionen von humanen Immunzellen. *Dissertation (Berlin)*
- Vallerskog T, Gunnarsson I, Widhe M, Risselada A, Klareskog L, van Vollenhoven R et al. (2007). Treatment with rituximab affects both the cellular and the humoral arm of the immune system in patients with SLE. *Clin Immunol* 122: 62-74.
- Vallerskog T, Heimburger M, Gunnarsson I, Zhou W, Wahren-Herlenius M, Trollmo C et al. (2006). Differential effects on BAFF and APRIL levels in rituximab-treated patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 8: R167.
- Veldman C, Hohne A, Dieckmann D, Schuler G, Hertl M (2004a). Type I regulatory T cells specific for desmoglein 3 are more frequently detected in healthy individuals than in patients with pemphigus vulgaris. *J Immunol* 172: 6468-6475.
- Veldman C, Nagel A, Hertl M (2006). Type I regulatory T cells in autoimmunity and inflammatory diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 140: 174-183.
- Veldman C, Stauber A, Wassmuth R, Uter W, Schuler G, Hertl M (2003). Dichotomy of autoreactive Th1 and Th2 cell responses to desmoglein 3 in patients with pemphigus vulgaris (PV) and healthy carriers of PV-associated HLA class II alleles. *J Immunol* 170: 635-642.
- Veldman CM, Gebhard KL, Uter W, Wassmuth R, Grotzinger J, Schultz E et al. (2004b). T cell recognition of desmoglein 3 peptides in patients with pemphigus vulgaris and healthy individuals. *J Immunol* 172: 3883-3892.
- Vigna-Perez M, Hernandez-Castro B, Paredes-Saharopulos O, Portales-Perez D, Baranda L, Abud-Mendoza C et al. (2006). Clinical and immunological effects of Rituximab in patients with lupus nephritis refractory to conventional therapy: a pilot study. *Arthritis Res Ther* 8: R83.
- Vora KA, Wang LC, Rao SP, Liu ZY, Majeau GR, Cutler AH et al. (2003). Cutting edge: germinal centers formed in the absence of B cell-activating factor belonging to the TNF family exhibit impaired maturation and function. *J Immunol* 171: 547-551.
- Vos K, Thurlings RM, Wijbrandts CA, van Schaardenburg D, Gerlag DM, Tak PP (2007). Early effects of rituximab on the synovial cell infiltrate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56: 772-778.
- Vugmeyster Y, Seshasayee D, Chang W, Storn A, Howell K, Sa S et al. (2006). A soluble BAFF antagonist, BR3-Fc, decreases peripheral blood B cells and lymphoid tissue marginal zone and follicular B cells in cynomolgus monkeys. *Am J Pathol* 168: 476-489.
- Waschke J (2008). The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol* 130: 21-54.

- Watanabe R, Fujimoto M, Yazawa N, Nakashima H, Asashima N, Kuwano Y et al. (2007). Increased serum levels of a proliferation-inducing ligand in patients with bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 46: 53-60.
- Withers DR, Fiorini C, Fischer RT, Ettinger R, Lipsky PE, Grammer AC (2007). T cell-dependent survival of CD20+ and CD20- plasma cells in human secondary lymphoid tissue. *Blood* 109: 4856-4864.
- Woodland RT, Schmidt MR, Thompson CB (2006). BLyS and B cell homeostasis. *Semin Immunol* 18: 318-326.
- Wucherpennig KW, Yu B, Bhol K, Monos DS, Argyris E, Karr RW et al. (1995). Structural basis for major histocompatibility complex (MHC)-linked susceptibility to autoimmunity: charged residues of a single MHC binding pocket confer selective presentation of self-peptides in pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11935-11939.
- Xiang Z, Cutler AJ, Brownlie RJ, Fairfax K, Lawlor KE, Severinson E et al. (2007). FcγRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nat Immunol* 8: 419-429.
- Xu LG, Shu HB (2002). TNFR-associated factor-3 is associated with BAFF-R and negatively regulates BAFF-R-mediated NF-κB activation and IL-10 production. *J Immunol* 169: 6883-6889.
- Xu S, Lam KP (2001). B-cell maturation protein, which binds the tumor necrosis factor family members BAFF and APRIL, is dispensable for humoral immune responses. *Mol Cell Biol* 21: 4067-4074.
- Yan J, Harvey BP, Gee RJ, Shlomchik MJ, Mamula MJ (2006). B cells drive early T cell autoimmunity in vivo prior to dendritic cell-mediated autoantigen presentation. *J Immunol* 177: 4481-4487.
- Yang M, Hase H, Legarda-Addison D, Varughese L, Seed B, Ting AT (2005). B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the TNF family, induces antigen presentation in B cells. *J Immunol* 175: 2814-2824.
- Ye Q, Wang L, Wells AD, Tao R, Han R, Davidson A et al. (2004). BAFF binding to T cell-expressed BAFF-R costimulates T cell proliferation and alloresponses. *Eur J Immunol* 34: 2750-2759.
- Zhang J, Roschke V, Baker KP, Wang Z, Alarcon GS, Fessler BJ et al. (2001). Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 166: 6-10.
- Zhang X, Park CS, Yoon SO, Li L, Hsu YM, Ambrose C et al. (2005). BAFF supports human B cell differentiation in the lymphoid follicles through distinct receptors. *Int Immunol* 17: 779-788.

## 7. Tabellarischer Anhang

**Tabelle 1:** Patientencharakteristik einschließlich klinischer Manifestation, Serum-Autoantikörper-Konzentrationen und HLA-Klasse II - Genotypisierung der in die Studie „Der Einfluss von Rituximab auf die zelluläre Autoimmunantwort beim Pemphigus vulgaris (PV)“ eingeschlossenen Patienten.

Pat	G	Alter	verfolgter Zeitraum (nach Rituximab)	klinische Manifestation <sup>1</sup>	Autoantikörpertiter <sup>2</sup> im Serum		HLA-Klasse II - Allele	
					anti-Dsg1 IgG	anti-Dsg3 IgG	HLA-DRβ1	HLA-DQβ1
PV1	m	54	>12 Monate	Erosionen der oralen und nasalen Mukosa, des Kopfes, Gesichts und Rumpfes	103	549	<b>0402</b> , 1401	0302, <b>0503</b>
PV2	m	68	>12 Monate	Erosionen der oralen Mukosa	negativ	484	0804, 1305	0301, 0402
PV3	w	70	>12 Monate	ausgeprägte und hartnäckige Erosionen an Rumpf und oraler Mukosa	163	2368	<b>0402</b> , 1101	0301, 0302
PV4	w	24	>12 Monate	Blasen an oraler Mukosa, Gesicht und Rumpf, später an seborrhoidischen Arealen	357	145	0801, 1401	0402, <b>0503</b>
PV5	m	48	>12 Monate	ausgeprägte Erosionen an Armen, Beinen und Rumpf	901	956	<b>0402</b> , 1101	0301, 0302
PV6	w	51	>12 Monate	starke Erosionen an der oralen Mukosa	negativ	72	0102, 1401	0501, 0502
PV7	m	50	>12 Monate	hochgradige erosive Veränderungen der oralen Mukosa und des Kopfes	82	1294	<b>0402</b> , 0405	02**, 0302
PV8	w	44	>12 Monate	Erosionen der oralen Mukosa, des Rumpfes und der Augen	negativ	2318	0701, 1401	0202, 0502

Pat	G	Alter	verfolgter Zeitraum (nach Rituximab)	klinische Manifestation <sup>1</sup>	Autoantikörpertiter <sup>2</sup> im Serum		HLA-Klasse II - Allele	
					anti-Dsg1 IgG	anti-Dsg3 IgG	HLA-DRβ1	HLA-DQβ1
PV9	m	37	>12 Monate	ausgeprägte Blasenbildung und Erosionen, v.a. an seborrhoischen Arealen	173	80	<b>0402</b> , 1404	0302, <b>0503</b>
PV10	w	69	>12 Monate	ausgeprägte Erosionen der oralen und genitalen Mukosa	negativ	2521	<b>0402</b> , 1301	0302, 0603
PV11	w	28	>12 Monate	ausgeprägte Erosionen der oralen Mukosa	negativ	440	0804, 1501	0301, 0602
PV12	w	28	>12 Monate	Erosionen der oralen Mukosa	negativ	29	<b>0402</b> , 1102	0302, 0319

<sup>1</sup>Immunsuppressive Therapie, siehe Punkt 3.1.1.; <sup>2</sup>ausgedrückt in U/ml;

Dsg - Desmoglein; G - Geschlecht; m - männlich; Pat - Patient; PV - Pemphigus vulgaris; w - weiblich

**Tabelle 2:** Patientencharakteristik einschließlich klinischer Manifestation und Behandlungsprotokoll der in die Studie „Der Einfluss von Rituximab auf die humorale Immunantwort beim Pemphigus vulgaris (PV)“ eingeschlossenen Patienten.

a) Gruppe I

Pat	G	Alter	klinische Manifestation vor Behandlung	initiale Therapie	Behandlung sechs Monate nach Initiierung der IS	klinisches Ansprechen während des Beobachtungszeitraums
<b>Gruppe I: Patienten mit immunsuppressiver Behandlung (IS) – alle Patienten waren vor Studieneinschluss (Tag 0) unbehandelt</b>						
PV1	w	23	zahlreiche Erosionen des Gaumens, der Wangenschleimhaut und der Lippen	80mg/Tag Methylprednisolon, 100mg/Tag AZA	32mg/Tag Methylprednisolon, 3g/Tag MMF	partielle Remission – Rezidiv nach 6 Monaten
PV2	w	87	ausgeprägte Erosionen und Blasen an Rumpf, Kapillitium und Extremitäten	80mg/Tag Prednisolon, 50mg/Tag AZA	15mg/Tag Prednisolon, 2g/Tag MMF	partielle Remission – Rezidiv nach 6 Monaten
PV3	m	61	Blasen und Erosionen an Kopf, sowie nasaler und oraler Mukosa	80mg/Tag Prednisolon, 100mg/Tag AZA	60mg/Tag Prednisolon, 100mg/Tag AZA	komplette Remission
PV4	w	30	zahlreiche Blasen an Rumpf und Kapillitium	100mg/Tag AZA	keine immunsuppressive Therapie	komplette Remission
PV5	w	65	Erosionen am harten Gaumen und der Wangenschleimhaut	120mg/Tag Prednisolon, 100mg/Tag AZA	15mg/Tag Prednisolon, 100mg/Tag AZA	komplette Remission

**Tabelle 2:** Patientencharakteristik einschließlich klinischer Manifestation und Behandlungsprotokoll der in die Studie „Der Einfluss von Rituximab auf die humorale Immunantwort beim Pemphigus vulgaris (PV)“ eingeschlossenen Patienten.

b) Gruppe II

Pat	G	Alter	klinische Manifestation vor Behandlung	Behandlung vor IA	Behandlung drei Monate nach IA	klinisches Ansprechen während des Beobachtungszeitraums
<b>Gruppe II: Patienten mit IS und adjuvanter Immunadsorption (IA)</b>						
PV6	m	54	zahlreiche Erosionen an Rumpf, Kapillitium, Gesicht und oraler Mukosa	100mg/Tag Prednisolon, 2g/Tag MMF	30mg/Tag Prednisolon, 2g/Tag MMF	partielle Remission
PV7	w	44	Erosionen der oralen und nasalen Mukosa, des Rumpfes und der Konjunktiven	15mg/Tag Prednisolon, Cyclophosphamid-/Dexamethason – Puls Therapie (300mg/3Tage)	30mg/Tag Prednisolon, 1,5g/Tag MMF	partielle Remission – Rezidiv 1 Monat nach IA
PV8	w	62	Erosionen der oralen und genitalen Mukosa, der Konjunktiven, des Rumpfes und der Extremitäten	60mg/Tag Methylprednisolon, 3g/Tag MMF	24mg/Tag Methylprednisolon, 3g/Tag MMF	partielle Remission
PV9	w	24	Erosionen des Rumpfes, Gesichts und der unteren Extremitäten	60mg/Tag Prednisolon, 2g/Tag MMF	30mg/Tag Prednisolon, 2g/Tag MMF	partielle Remission
PV10	w	76	ausgeprägte mukokutane Blasen und Erosionen an der Haut und der oralen Mukosa	80mg/Tag Prednisolon, 100mg/Tag AZA	30mg/Tag Prednisolon, 100mg/Tag AZA	komplette Remission
PV11	m	49	ausgeprägte Erosionen an Extremitäten und Rumpf	150mg/Tag Prednisolon, 50mg/Tag AZA	30mg/Tag Prednisolon, 150mg/Tag AZA	komplette Remission

**Tabelle 2:** Patientencharakteristik einschließlich klinischer Manifestation und Behandlungsprotokoll der in die Studie „Der Einfluss von Rituximab auf die humorale Immunantwort beim Pemphigus vulgaris (PV)“ eingeschlossenen Patienten.

c) Gruppe III

Pat	G	Alter	klinische Manifestation vor Behandlung	Behandlung vor Rituximab	Behandlung zwölf Monate nach Rituximab	klinisches Ansprechen während des Beobachtungszeitraums
<b>Gruppe III: Patienten mit IS und adjuvanter Rituximab (Rtx)-Behandlung – 4x375mg Rituximab/m<sup>2</sup> KOF</b>						
PV6	m	54	Erosionen der oralen und nasalen Mukosa, des Kopfes, Gesichts und Rumpfes	40mg/Tag Prednisolon, 2g/Tag MMF	7,5mg/Tag Prednisolon, 2g/Tag MMF	komplette Remission
PV7	w	44	Erosionen der oralen Mukosa, des Rumpfes und der Konjunktiven	30mg/Tag Prednisolon, 1,5g/Tag MMF	10mg/Tag Prednisolon, 1,5g/Tag MMF	komplette Remission
PV9	w	24	anfangs Blasen an oraler Mukosa, Gesicht und Rumpf, später auch an seborrhoischen Arealen	30mg/Tag Prednisolon, 3g/Tag MMF	4mg/Tag Methylprednisolon, 3g/Tag MMF	komplette Remission
PV12	m	68	Erosionen der oralen Mukosa	5mg/Tag Prednisolon, 2g/Tag MMF	Absetzen der immunsuppressiven Therapie 6 Monate nach Verabreichung von Rituximab	komplette Remission ohne weitere Therapie
PV13	w	70	ausgeprägte und hartnäckige Erosionen an Rumpf und oraler Mukosa	80mg/Tag Prednisolon, 100mg/Tag AZA	20mg/Tag Prednisolon, 100mg/Tag AZA	komplette Remission
PV14	m	48	ausgeprägte Erosionen an Armen, Beinen und Rumpf	25mg/Tag Prednisolon, 400mg/Tag Ciclosporin	2,5mg/Tag Prednisolon, 100mg/Tag Ciclosporin	komplette Remission – Rezidiv 12 Monate nach Rituximab-Behandlung

Pat	G	Alter	klinische Manifestation vor Behandlung	Behandlung vor Rituximab	Behandlung zwölf Monate nach Rituximab	klinisches Ansprechen während des Beobachtungszeitraums
<b>Gruppe III: Patienten mit IS und adjuvanter Rituximab (Rtx)-Behandlung – 4x375mg Rituximab/m<sup>2</sup> KOF</b>						
PV15	w	51	starke Erosionen an der oralen Mukosa	20mg/Tag Methylprednisolon, 3g/Tag MMF	Absetzen des Methylprednisolons 6 Monate nach Verabreichung von Rituximab, 2g/Tag MMF	komplette Remission
PV16	m	50	hochgradige erosive Veränderungen der oralen Mukosa und des Kopfes	40mg/Tag Methylprednisolon, 2g/Tag MMF	3mg/Tag Methylprednisolon, 3g/Tag MMF	komplette Remission
PV17	m	39	ausgeprägte Erosionen der oralen Mukosa	40mg/Tag Methylprednisolon, 3g/Tag MMF	0,5g/Tag MMF	komplette Remission
PV18	w	83	Erosionen der oralen Mukosa	40mg/Tag Prednisolon, 2g/Tag MMF	Absetzen des Prednisolons 1 Monat, des MMF 9 Monate nach Verabreichung von Rituximab	komplette Remission ohne weitere Therapie
PV19	m	37	ausgeprägte Blasenbildung und Erosionen, v.a. an seborrhischen Arealen	32mg/Tag Methylprednisolon, 150mg/Tag AZA	6mg/Tag Methylprednisolon	komplette Remission – Rezidiv 12 Monate nach Rituximab-Behandlung

AZA - Azathioprin; G - Geschlecht; IA - Immunadsorption; IS - immunsuppressive Behandlung; KOF - Körperoberfläche; m - männlich; MMF - Mykophenolat-Mofetil; Pat - Patient; PV - Pemphigus vulgaris; w - weiblich



## 8. Danksagung

Ich danke:

Prof. Dr. M. Hertl	für die Möglichkeit, diese interessante Fragestellung im Rahmen einer Dissertation bearbeiten zu können und für das große Vertrauen, das er mir in den letzten drei Jahren entgegen brachte.
Dr. R. Eming	für die sehr gute Betreuung, die unkomplizierte Zusammenarbeit und die zahlreichen fachlichen und freundschaftlichen Ratschläge, die maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.
den Ärzten und Ärztinnen der Hautklinik Marburg	für die Durchführung der im Rahmen der Studien benötigten Blutentnahmen, die Erhebung des ABSIS-Scores und die große Kooperationsbereitschaft bei der individuellen Planung der Experimente.
Dr. D. Debus, Dr. O. Kautz	für die Einsendung des Untersuchungsmaterials zweier Rituximab-behandelter Patienten aus den Hautkliniken in Nürnberg und Freiburg.
Dr. M. Eickmann	für die Durchführung der virologischen Antikörper-Diagnostik und im Rahmen dessen für die schnelle und angenehme Kollaboration.
Prof. Dr. R. Waßmuth	für die HLA-Typisierung der Blutproben.
A. Gerber, E. Podstawa	für die Produktion des rekombinanten Proteins PVhis.

Des weiteren danke ich ausdrücklich den Patienten der Hautkliniken Marburg, Nürnberg und Freiburg, die durch ihre Teilnahme an den Studien grundlegend zur Entstehung dieser Dissertation beigetragen haben. Es ist nicht selbstverständlich, dass Menschen mit derartig schwerwiegenden Erkrankungen zusätzlichen Untersuchungen und Blutabnahmen zustimmen, die für die klinische Forschung jedoch unerlässlich sind.

Zudem möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danken, insbesondere Eva Podstawa, Sonja Wolff-Franke und Christian Möbs, die mir bei Problemen persönlicher und experimenteller Art mit Rat und Tat zur Seite standen.

Die für mich in den letzten drei Jahren wichtigsten Menschen waren meine Freunde und meine Familie. Sie haben mich stets, ungeachtet zahlreicher Rückschläge, motiviert und in meinem Tun bestärkt. Die Arbeit in der experimentellen Forschung ist meines Erachtens ohne die Unterstützung derartiger bemerkenswerter Menschen nicht möglich. Für dieses große Vertrauen in mich und meine Fähigkeiten gebührt ihnen mein ganz besonderer Dank!!!

## 9. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich,  
dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg  
zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

### **Charakterisierung der humoralen und zellulären Autoimmunantwort nach B-Zell-depletierender Therapie beim Pemphigus vulgaris**

in der Klinik für Dermatologie und Allergologie  
unter Leitung von Prof. Dr. M. Hertl

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine  
anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.  
Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein  
Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine  
andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Inhaltliche Auszüge der vorliegenden Arbeit wurden/ werden in folgenden

Publikationsorganen veröffentlicht:  
„Journal of Investigative Dermatology“  
“Experimental Dermatology”  
“Hautarzt”.

Marburg, Mai 2009

---

Angela Nagel

## 10. Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

Professoren, Doktoren und Dozenten

in Marburg:

Aigner, Albrecht, Aumüller, Bastians, Besedovsky, Bette, Bieller, Boche, Christ, Dahlpke, Daut, Del Rey, Dietrich, Eilers, Elsässer, Feuser, Frenking, Fritz, Garten, Gaubatz, Gudermann, Hasilik, Heeg, Hertl, Herz, Jungclas, Kirchner, Koch, Kohlmeyer, Koolmann, Krebber, Kunz, Lang, Lill, Lohoff, Löffler, Maisner, Mandrek, Meinhardt, Melsheimer, Moll, Müller H.-H., Müller R., Portenier, Renz, Röhm, Röper, Rogausch, Schäfer, Schmidt, Schrader, Schulz, Seitz K.-A., Seitz J., Stöckmann, Weihe, Westermann, Zimmermann.