

---

Aus dem Zentrum für Nervenheilkunde  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg - Klinik für Neurologie  
Direktor: Professor Dr. med. Wolfgang Hermann Oertel  
**Arbeitsgruppe Klinische Neuroimmunologie**  
Leiter: Professor Dr. med. Norbert Sommer

---

# **Klonale Expansion CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der autoimmunen Myasthenia gravis**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin der  
Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt

von  
**JENS KRUTH**  
aus Sögel

Marburg 2007

---

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 22.02.2007.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch  
Referent: Prof. Dr. N. Sommer  
Korreferent: Prof. Dr. S. Bauer

**„Alles kommt zu dem, der warten kann.“**

*unbekannter Verfasser*

*meinen Eltern und Geschwistern*

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>4</b>
<b>1</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>Epidemiologie und Klinik der Myasthenia gravis (MG)</b> .....	<b>7</b>
2.1.1	Epidemiologische Aspekte .....	7
2.1.2	Diagnostik, Klinik und Therapie der MG .....	7
<b>2.2</b>	<b>Pathogenese der MG</b> .....	<b>9</b>
2.2.1	Heterogenität .....	9
2.2.2	Konzepte von Autoimmunität und Molekularem Mimikry .....	12
2.2.3	Antikörper-vermittelte Autoimmunität .....	13
2.2.4	T-Zell-Immunologie.....	16
2.2.4.1	Autoreaktive T-Zellen in der MG .....	16
2.2.4.2	MG als T <sub>H</sub> 1-vermittelte Autoimmunerkrankung .....	17
2.2.4.3	Physiologie und Pathophysiologie des Thymus .....	18
2.2.4.4	TCR und CDR3.....	19
<b>2.3</b>	<b>Ableitung der Fragestellung</b> .....	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Patienten und Material</b> .....	<b>26</b>
3.1.1	MG-Patienten .....	26
3.1.2	Geräte .....	26
3.1.3	Chemikalien.....	28
3.1.4	Puffer und Lösungen .....	29
3.1.5	Medien.....	29
3.1.6	Nukleinsäuren .....	29
3.1.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Primer .....	30
3.1.8	FACS- und MACS-Antikörper.....	31

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.9 Kits .....	32
3.1.10 Software zur Analyse.....	32
<b>3.2 Methoden.....</b>	<b>32</b>
3.2.1 Zellbiologische Methoden.....	32
3.2.1.1 Gewinnung von mononukleären Zellen aus peripher-venösem Blut....	32
3.2.1.2 Einzelzellklonierung und <i>in vitro</i> -Expansion CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	34
3.2.1.3 Kryo-Asservierung von T-Zellklonen und PBMCs .....	35
3.2.2 Durchflusszytometrie (FACS).....	35
3.2.2.1 Färbung von peripherem Blut und FACS-Analyse .....	36
3.2.2.2 Färbung von <i>in vitro</i> expandierten T-Zellklonen und FACS-Analyse ...	37
3.2.3 Magnetic activated cell sorting (MACS).....	37
3.2.4 Molekularbiologische Methoden .....	38
3.2.4.1 RNA-Isolation und Reverse Transkription .....	38
3.2.4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	38
3.2.4.3 Agarosegel-Elektrophorese .....	40
3.2.4.4 HLA (Human leukocyte antigen)-Analyse.....	40
3.2.4.5 CDR3 (Complementary determining region 3)-Spectratyping.....	40
3.2.4.6 CDR3-Sequenzierung und Klonalitätsnachweis .....	42
3.2.5 Biostatistische Methoden.....	43
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Klinische und therapeutische Charakteristika der MG-Patienten ...</b>	<b>44</b>
<b>4.2 TCR V<math>\beta</math>-Ketten-Expansionen im Blut von MG-Patienten.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3 Ansatz zur Klonalitätsprüfung expandierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei fünf Index-MG-Patienten .....</b>	<b>50</b>
4.3.1 Durchflusszytometrische Untersuchungen expandierter CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	50
4.3.2 TCR V $\beta$ -spezifische Verteilung der CD4 <sup>+</sup> T-Zellklone in der Langzeit- Zellkultur .....	52
4.3.3 Nachweis klonal expandierter V $\beta$ -spezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut .....	53

<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>58</b>
5.1	Diskussion des Versuchsansatzes .....	58
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	62
5.2.1	Klonal expandierte CD4 <sup>+</sup> T-Zellen bei der MG .....	62
5.2.2	Antigen-Spezifität der klonal expandierten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	65
5.2.3	Hypothese zur MG-Pathogenese .....	66
5.3	Ausblick.....	71
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>VERZEICHNIS MEINER AKADEMISCHEN LEHRER .....</b>	<b>94</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>95</b>
<b>10</b>	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>97</b>
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>99</b>

# 1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der molekularbiologischen Analyse des T-Zell-Rezeptor-Repertoires bei der autoimmunen Myasthenia gravis (MG). Die MG ist eine durch Auto-Antikörper (Auto-Ak) verursachte Erkrankung, wobei das Zielantigen vor allem der Acetylcholin-Rezeptor (AChR) an der neuromuskulären Synapse darstellt. Aufgrund der bei der MG häufig beobachteten Thymusveränderungen, des positiven Einflusses einer Thymektomie auf den Krankheitsverlauf sowie des Nachweises AChR-spezifischer T-Lymphozyten (T-Zellen) wird den CD4-positiven ( $CD4^+$ ) T-Zellen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese zugeschrieben. Über den genauen Ursprung solcher pathogenen Zellen sowie über deren Antigenspezifität ist bislang allerdings wenig bekannt.

Diese Arbeit hat zum Ziel, potentiell pathogene bzw. myasthenogene T-Zellen bei der autoimmunen MG zu identifizieren und zu charakterisieren. Ausgehend von der Hypothese, dass möglicherweise krankheitsrelevante T-Zell-Populationen im peripher-venösen Blut expandiert sind, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen der T-Zellen von 118 Patienten sowie 118 gesunden Kontrollprobanden durchgeführt. Bei MG-Patienten waren  $CD4^+$  T-Zellen signifikant im peripher-venösen Blut expandiert ( $\geq 5$  Standardabweichungen über dem Mittelwert gesunder in Alter und Geschlecht übereinstimmender Kontrollen bei 21 MG-Patienten,  $p < 0,001$ ). Diese Expansionen  $CD4^+$  T-Zellen äußerten sich beim einzelnen Patienten in der übermäßigen Expression einer oder weniger variabler  $\beta$ -Ketten des T-Zell-Rezeptors (TCR). Dabei konnten unter allen untersuchten MG-Patienten Expansionen auf unterschiedlichen TCR  $V\beta$ -Ketten nachgewiesen werden, ohne dass bestimmte TCR  $V\beta$ -Ketten überproportional häufig expandiert wurden. Damit zeigt sich bei der autoimmunen MG das immunologische Bild eines individuell restringierten TCR-Repertoires.

Zum Nachweis eines womöglich klonalen Ursprungs dieser expandierten T-Zellen erfolgte mittels Spectratyping (= CDR3-Längenanalyse) die Untersuchung des hypervariablen Bereichs ihres TCR (complementary determining region 3, CDR3), welcher für die Antigenerkennung von besonderer Bedeutung ist. Durch eine Antigen-unabhängige Einzelzellklonierung konnten *in vitro* T-Zellklone generiert werden. Mittels Spectratyping der T-Zellklone gelang hieraus die Identifizierung derjenigen T-Zellen, die den expandierten T-Zellpopulationen im peripher-venösen Blut entsprachen. Die Sequenzierung des TCR entsprechender *in vitro* T-Zellklone eines jeweiligen Patienten erbrachte bei vier von fünf Index-Patienten jeweils identische CDR3 DNA-Sequenzen. Dieses Ergebnis beweist erstmals die klonale Expansion  $CD4^+$  T-Zellen bei der autoimmunen MG.

## **1 Zusammenfassung**

---

Die zukünftige Aufklärung der noch ausstehenden Antigen-spezifität kann diesen klonal expandierten T-Zellen womöglich eine maßgebliche Rolle in der Pathogenese der autoimmunen MG zuschreiben und somit einen wichtigen Schritt zum besseren Verständnis dieser Erkrankung darstellen.

# 1 Summary

This investigation concerns the analysis of the T cell receptor (TCR) repertoire in autoimmune myasthenia gravis (MG). MG is an autoimmune disease caused by autoantibodies directed against the acetylcholine receptor (AChR) at the neuromuscular junction. Due to frequently associated thymic abnormalities, positive effects of thymectomy on the course of disease and detection of AChR specific T lymphocytes (T cells), CD4 positive T cells are believed to have a key role in MG pathogenesis. However, to date little is known about these T cells' origin and antigen specificity.

The aim of this study is therefore to identify and to characterize potentially pathogenic and myasthenogenic T cells in autoimmune MG. Based on the hypothesis of possibly expanded pathogenic T cell populations in the peripheral blood (PB) of MG patients flow cytometric analyses of T cells from 118 MG patients and 118 healthy controls were performed. In PB from 21 MG patients significantly expanded CD4 positive T cells could be detected ( $\geq 5$  standard deviations above the mean of age and sex matched healthy controls,  $p < 0.001$ ). These CD4 positive T cell expansions corresponded to excessive expression of one or few TCR variable beta chains (BV). Investigating all MG patients T cell expansions on different TCR BV chains could be detected without a disproportionate frequently expansion of any specific TCR BV chain. Thus, these investigations indicate the immunological pattern of an individual restricted TCR repertoire.

In order to provide evidence for a clonal origin of these expanded T cells complementary determining region 3 (CDR3) of the TCR was analyzed, because this region is particularly important for antigen recognition. An antigen-independent single cell cloning technique was performed to generate *in vitro* T cell clones (TCC). TCC representing the expanded T cell populations could be identified by CDR3 length analysis (spectratyping). Following TCR sequencing of *in vitro* TCC showed identical CDR3 DNA sequences in 4 of 5 index MG patients. These results prove for the first time clonal CD4 positive T cell expansions in autoimmune MG.

Future clarification of the antigen specificity may attribute a relevant role to these clonal expanded T cells in autoimmune MG pathogenesis and thus provide an important contribution in the understanding of this disease.

## 2 Einleitung

### 2.1 Epidemiologie und Klinik der Myasthenia gravis

#### 2.1.1 Epidemiologische Aspekte

Myasthenia gravis (MG) ist eine Erkrankung, die durch Antikörper (Ak) gegen nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR) an der neuromuskulären Endplatte (MEP) und infolgedessen durch eine belastungsabhängige Muskelschwäche gekennzeichnet ist. Die MG ist keine seltene Erkrankung. In Deutschland wird von einer Inzidenz von 0,25 – 2,0 pro 100.000 Einwohner ausgegangen, die Prävalenz variiert zurzeit zwischen 3 und 10 pro 100.000 Einwohner. Rund 10–14% der Erkrankten sind Kinder im Alter unter 16 Jahren (www.dgn.org). Die MG ist jedoch vermutlich unterdiagnostiziert: gemäß einer britischen Studie wird vor allem bei Menschen über 75 Jahren die Erkrankung häufig übersehen beziehungsweise fehl gedeutet (Vincent et al. 2003b). Die Erkrankung kann sich von der Geburt an bis ins 8. Lebensjahrzehnt manifestieren, wobei im höheren Lebensalter das männliche Geschlecht, im jüngeren Lebensalter das weibliche Geschlecht vermehrt betroffen ist (Compston et al. 1980).

#### 2.1.2 Diagnostik, Klinik und Therapie der MG

Die Erstbeschreibung der MG erfolgte im Jahre 1672 durch den englischen Arzt Thomas Willis, welcher die heutzutage als klassisch geltenden Symptome der MG erfasste und aufzeichnete (Willis 1672). Die MG präsentiert sich als eine belastungsabhängige Ermüdung der willkürlichen Muskulatur, welche sich klinisch häufig durch eine Schwäche im Bereich der proximalen Schulter- und Beckengürtelmuskulatur äußert und dabei oft die durch Hirnnerven versorgten Bereiche wie Okulomotorik und Schlundmuskulatur mit einschließt. Initial manifestiert sich die MG in ca. 50% der Fälle rein okulär durch Beteiligung der äußeren Augenmuskeln und der Mm. levatores palpebrae. Klinisch äußert sich dieses in einer Ptose und (transienten) Doppelbildern. Im weiteren klinischen Verlauf entwickeln ca. 75% der MG-Patienten meist innerhalb von zwei Jahren eine Generalisierung der Symptome, während ca. 15% der Patienten auch über Jahre ausschließlich von okulären Symptomen betroffen bleiben (Robertson et al. 1998; Tackenberg et al. 2001). Typischerweise bildet sich die noch bis ins 20. Jahrhundert als so genannte Erb'sche Krankheit bezeichnete MG in ihrer klinischen Symptomatik (im Anfangsstadium) beim Ruhen der betroffenen Muskeln wieder zurück. Nach der

## 2 Einleitung

---

Klassifikation von Osserman und Genkins erfolgt die Einteilung der klinischen Symptomatik in vier Schweregrade: (I) okuläre MG, (IIa) generalisierte MG mit leichter Ausprägung, (IIb) generalisierte MG mit mäßiggradiger Ausprägung, (III) akute, schwere generalisierte MG und (IV) späte, schwere generalisierte MG (Osserman et al. 1971). Die Diagnosesicherung erfolgt nach eingehender Anamnese und klinischer Untersuchung durch nachfolgende serologische, elektrophysiologische und pharmakologische Untersuchungen. Der positive Nachweis AChR-spezifischer Ak gilt als pathognomonisch für die MG (siehe Abschnitt 2.2.3). Der charakteristische Befund eines myasthenen Syndroms in der elektrophysiologischen Diagnostik zeigt sich durch ein Flächendekrement >9% nach supramaximaler repetitiver Nervenstimulation des N. trapezius bei 3 Hz (Lange 1997). Pharmakologisch kommt dem „Tensilon-Test“ mit intravenöser Gabe von Edrophonium-Chlorid als Acetylcholinesterase-Inhibitor eine besondere Bedeutung zu. Erstmals durch die englische Ärztin Mary Walker im Jahre 1934 angewandt, führt dieser Test bei einem Großteil der Patienten zu einer raschen und kurzfristigen Verbesserung der Muskelkraft (Walker 1934). Die Diagnostik wird durch bildgebende Verfahren (CT oder MRT) zum Nachweis eines evtl. vorhandenen Thymoms bzw. zum Ausschluß eines Hirnstammprozesses bei rein okulärer Form komplettiert.

Unbehandelt hat die MG eine 10-Jahres Mortalität von 20-30% (Oosterhuis 1989; Grob 1999), die durch respiratorische Insuffizienz (myasthene Krise), Aspirationspneumonien, Lungenembolien sowie Thrombosen verursacht wird. Diese Komplikationen sind allerdings inzwischen aufgrund verbesserter Therapien selten geworden. Die Mortalität beträgt heute weniger als 3%, und letal endende Krankheitsverläufe sind nahezu immer mit schwerwiegenden Begleiterkrankungen assoziiert (Thomas et al. 1997). Seit 1934 werden als wichtigste symptomatische Therapiemaßnahme Cholinesterase-Hemmer verabreicht, welche die Konzentration von Acetylcholin (ACh) an der MEP erhöhen (Walker 1934). Weitere Erfolge wurden durch den Einsatz kausal wirkender Immunsuppressiva erzielt. Glukokortikoide sind dabei die am häufigsten eingesetzten Substanzen und zeigen eine Ansprechrate von 70-80% (Pascuzzi et al. 1984). Als Langzeitimmunsuppressivum der 1. Wahl wird Azathioprin eingesetzt, welches eine deutliche Reduktion der Steroiddosis ermöglicht (Mertens et al. 1969). Bei therapierefraktären Verläufen kann der Einsatz von Mycophenolat Mofetil, Cyclophosphamid und Tacrolimus erwogen werden (www.dgn.org). Seit 1976 gehört die Plasmapherese mit der Entfernung pathogener Auto-Ak (s.u.) zu den invasiven Therapieverfahren, von dem vor allem junge Patienten sowie Patienten mit schweren bzw. lebensbedrohlichen Verläufen (myasthene Krise)

## 2 Einleitung

---

klinisch profitieren (Pinching et al. 1976). Als weitgehend äquivalent dazu gilt heute die Intravenöse Immunglobulin (IVIg)-Therapie (Gajdos et al. 1997).

Die einzig chirurgische Intervention in der Behandlung der MG bleibt momentan die operative Entfernung des Thymus (Thymektomie), welche zum ersten Mal 1913 durch Ferdinand Sauerbruch erfolgreich in Zürich durchgeführt wurde (Sauerbruch 1913). Bei MG-Patienten ohne Thymom (mit der MG häufig assoziierter epithelialer Tumor des Thymus, siehe Abschnitt 2.2.4.3) stellt die Thymektomie aufgrund fehlender kontrollierter Studien zur Effizienz im Vergleich mit üblichen Immunsuppressiva lediglich eine Therapieoption dar. Dagegen bedeutet der Nachweis eines Thymoms aufgrund des potentiell invasiven Wachstums eine Operationsindikation unabhängig von der klinischen Ausprägung ([www.dgn.org](http://www.dgn.org)). Welchen Stellenwert die Thymektomie bei älteren MG-Patienten hat, ist momentan nicht bekannt.

### 2.2 Pathogenese der MG

#### 2.2.1 Heterogenität

Die MG ist eine Erkrankung mit Störung der neuromuskulären Übertragung. Neben der ganz überwiegend erworbenen autoimmunen MG gibt es weitere seltene, für die vorliegende Arbeit nicht relevante Unterformen:

- Die neonatale MG (durch transplazentaren Transfer von mütterlichen Antikörpern als temporäre Schwäche bei Neugeborenen)
- Die medikamentös induzierte MG (z.B. durch D-Penicillamin oder Chloroquin), die im Prinzip aber ebenfalls eine Sonderform einer autoimmunen MG darstellt (AChR-Antikörper sind in der Regel nachweisbar), sowie
- Seltene kongenitale Formen, die durch (meist nur in Einzelfällen oder familiären Fällen berichtete) verschiedenartige genetische Defekte der neuromuskulären Übertragung bedingt sind

Die erworbene autoimmune MG lässt sich nach klinischen, immunogenetischen und histopathologischen Kriterien in verschiedene Subgruppen unterteilen (Pirskanen 1976; Compston et al. 1980): Patienten mit einer Manifestation der MG vor dem 45. Lebensjahr (early onset myasthenia gravis, EOMG), Patienten mit Erkrankungsbeginn ab dem 45. Lebensjahr (late onset myasthenia gravis, LOMG) sowie MG-Patienten mit begleitendem Thymom (thymoma associated myasthenia gravis, TOMG), deren Erkrankung in jedem Lebensalter auftreten kann. Je nach Befall der betroffenen Muskeln wird die MG als okulär oder generalisiert bezeichnet. Eine Sonderform der Myasthenie stellt die AChR-Ak-negative MG dar. Bei mehr als der Hälfte dieser „seronegativen“ MG-Patienten lassen sich inzwischen jedoch Ak gegen die

## 2 Einleitung

---

muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase (MuSK) nachweisen (Hoch et al. 2001). Klinisch imponiert diese MuSK-Ak-positive MG (MuSK antibody positive myasthenia gravis, MAMG) häufig durch bulbopharyngeale Symptome (Tabelle 2.1).

Die in der Mehrzahl weiblichen EOMG-Patienten (>90% bei generalisierter Symptomatik) weisen positive Ak-Titer gegen den AChR auf. In ca. 20% der Fälle lassen sich weitere organspezifische Auto-Ak wie Schilddrüsen-Ak o.ä. als Ausdruck weiterer assoziierter Autoimmunerkrankungen nachweisen (Oosterhuis 1989; Maggi et al. 1991; Grob 1999). Der Thymus weist in dieser Patientengruppe regelmäßig Zeichen der Hyperplasie und des lymphoretikulären Umbaus im Sinne einer Thymitis auf (Scadding et al. 1981; Kirchner et al. 1986).

Die LOMG betrifft vorwiegend Männer. Der Thymus weist histologisch das Bild einer Thymusatrophie bzw. -involution auf. Meist ist der Thymus zum Zeitpunkt der Erkrankung bereits komplett involutiert. Insgesamt sind inzwischen mehr als 60% aller MG-Patienten aufgrund der Alterung der Bevölkerung in den Industriestaaten der LOMG zuzuordnen (Vincent et al. 2001).

Die TOMG kann in jedem Lebensalter auftreten, manifestiert sich aber in der Regel zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr. Im Serum dieser Patienten lassen sich vielfach Auto-Ak gegen Titin und Ryanodin-Rezeptor sowie gegen Zytokine wie IL-12 und TNF- $\alpha$  nachweisen (s.u.).

Es besteht eine Assoziation zwischen der MG und der Expression bestimmter Haupt-Histokompatibilitäts-Antigene (MHC, major histocompatibility complex), die beim Menschen auch als „human leukocyte antigen“ (HLA) bezeichnet werden. So zeigen 60% der EOMG-Patienten eine Assoziation zu HLA-B8 und HLA-DR3 (Compston et al. 1980). Bei der LOMG sind dies bei Männern in geringerer Ausprägung HLA-B7 beziehungsweise HLA-DR2 (Maggi et al. 1991). Die TOMG zeigt dagegen keine spezifischen HLA-Assoziationen (Vincent et al. 2001). Aufgrund dieser Beobachtungen werden verschiedene, teilweise immunpathogenetisch determinierte Signalwege vermutet, die in der Produktion von AChR-Ak als gemeinsamer pathophysiologischer Endstrecke münden und damit zu einer gleichartigen Symptomausprägung führen könnten (Compston et al. 1980; Vincent 2002).

Eine weitere klinische MG-Subgruppe stellt die okuläre MG (ocular myasthenia gravis, OMG) mit rein klinischer Manifestation an den Augenmuskeln dar. Bei etwa 50-70% dieser betroffenen Patienten lassen sich AChR-Ak nachweisen (Sommer et al. 1997; Tackenberg et al. 2001).

Subgruppen der MG						
	EOMG	LOMG	TOMG	OMG	SNMG	MAMG
<b>Häufigkeit</b>	20%	45%	10%	15%	3%	7%
<b>Verlauf</b>	generalisiert	generalisiert	generalisiert	okulär	generalisiert	generalisiert (mit okulopharyngealem Schwerpunkt)
<b>Manifestationsalter</b>	< 45 Jahre	≥ 45 Jahre	vorwiegend 40 – 60 Jahre	jedes Alter	jedes Alter	?
<b>Geschlecht m:w</b>	1:3	1,5:1	keine Präferenz	keine Präferenz	keine Präferenz	?
<b>typische Thymus-Pathologie</b>	Hyperplasie	Involution	epitheliale, z. T. maligner Tumor mit zahlreichen Lymphozyten	wie bei EOMG. LOMG oder TOMG möglich, meist jedoch kein Nachweis	unbekannt	kaum Veränderungen wenig Hyperplasie
<b>MHC-Assoziation</b>	B8, DR3 (stark)	B7, DR2 bei Männern (weniger stark)	keine klare Assoziation	?	?	?
<b>assoziierte Auto-Ak</b>	AChR-Ak, mögliche weitere organ-spezifische Auto-Ak, z.B. Tg-Ak, ANA, anti-DNA-Ak	AChR-Ak, vor allem nach dem 60. Lebensjahr Auto-Ak gegen Titin und Ryanodin-Rezeptor	AChR-Ak, häufig Ak gegen Titin, Ryanodin-Rezeptor sowie Zytokine	AChR-Ak in 50-70% d. F.	keine	MuSK in 100% d. F.

**Tabelle 2.1: Subgruppen der autoimmunen generalisierten und okulären MG (Compston et al. 1980; Newsom-Davis 1988; Vincent 2002; Vincent et al. 2003a; Lauriola et al. 2005; Saka et al. 2005)**

Diese Einteilungen beziehen sich auf Patienten kaukasischer Abstammung mit generalisierter und okulärer MG. w: weiblich; m: männlich; EOMG: early onset MG; LOMG: late onset MG; TOMG: thymoma associated MG; OMG: ocular MG; SNMG: seronegative MG; MAMG: MuSK antibody positive MG; AChR: Acetylcholin-Rezeptor; Tg: Thyreoglobulin; ANA: antinukleäre Ak; MuSK: muscle specific receptor tyrosine kinase.

## 2 Einleitung

---

Die seronegative MG (seronegative myasthenia gravis, SNMG, s.u.) ist in ihrer klinischen Ausprägung allein nicht eindeutig von den seropositiven Fällen zu unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Patienten mit autoimmuner, generalisierter MG und positiven Titern für AChR-Ak untersucht.

### 2.2.2 Konzepte von Autoimmunität und Molekularem Mimikry

Die physiologische Aufgabe des Immunsystems besteht im Schutz des Organismus vor eindringenden Pathogenen und körpereigenen entarteten Zellen. Erworbene Immunantworten werden bisweilen jedoch auch durch Antigene ausgelöst, die keinen Pathogenen entsprechen, sondern Bestandteile des menschlichen Organismus und damit „Auto-Antigene“ darstellen. Die Folge können Autoimmunerkrankungen sein (Steinman 1995), wobei die kausalen Faktoren hierfür bisher nicht vollständig geklärt werden konnten.

Obwohl im Immunsystem ein vielfältiges Repertoire an hoch- bzw. (theoretisch) monospezifischen Immunzell-Rezeptoren für nahezu jedes Antigen existiert, konnten Experimente mit Peptid-Analoga zeigen, dass ein einzelner T-Zell-Rezeptor (TCR) eine Fülle von Antigenen und Autoantigenen erkennen kann, die in maximal einer Aminosäure miteinander übereinstimmen (Evavold et al. 1995; Hemmer et al. 1998a; Hemmer et al. 1998b). Durch diese so genannte TCR-Degeneration kann z.B. eine einzelne CD4-positive ( $CD4^+$ , CD = clusters of differentiation) T-Zelle eine Antigen-„Spezifität“ für bis zu  $10^6$ - $10^8$  Nonapeptide aufweisen (Mason 1998). Während der Entwicklung zu reifen T-Zellen hängt deren weiteres Schicksal sowohl von der Art des durch den TCR gebundenen Peptids als auch von der Stärke des hierdurch bedingten Signals ab. Im Thymus wird naiven T-Zellen ein Repertoire an Autoantigenen angeboten (Hunt et al. 1992). Nach Bindung eines Autoantigen:MHC-Komplexes führen starke Signale zur negativen Selektion und damit zur Apoptose der unreifen Zelle, während schwache Signale zur positiven Selektion und damit zum Export der T-Zelle in die Peripherie führen (Robey et al. 1994). In der Peripherie vermitteln schwache Autoantigen:MHC-Komplexsignale das Überleben der T-Zelle (Brocker 1997; Kirberg et al. 1997; Tanchot et al. 1997). Unter physiologischen Bedingungen führt der (partielle) Ersatz der Autoantigene durch körperfremde Peptide zu einer deutlichen Aktivierung und Expansion von Effektor-T-Zellen (Demotz et al. 1990; Sykulev et al. 1996). Die TCR-Degeneration ermöglicht in diesem Zusammenhang die flexible Erkennung eines breiten Spektrums pathogener Antigene, birgt jedoch gleichzeitig die Gefahr einer Immunantwort gegen körpereigene Antigene (Hemmer et al. 2000).

## 2 Einleitung

---

Derzeit werden vor allem zwei Modelle zur Pathogenese der Autoimmunität diskutiert. Eines dieser Konzepte für die Entwicklung von Autoimmunität basiert auf dem Mechanismus der Kreuzreaktion und wird als „Molekulares Mimikry“ bezeichnet. Hierunter versteht man die Induktion von Autoimmunantworten durch mikrobielle Proteine aufgrund molekularer Ähnlichkeiten zu körpereigenen Strukturen (Fujinami et al. 1985), die dann als ebenfalls pathogen erkannt werden. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass aufgrund der TCR-Degeneration eine T-Zelle von Antigenen aktiviert werden kann, die in der molekularen Sequenz nur sehr wenig Homologien aufweisen (Kersh et al. 1996). Dabei sind autoreaktive T-Zellen im peripheren Blut des Menschen nicht ungewöhnlich, und auch in Untersuchungen zur MG konnten bei gesunden Kontrollen AChR-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden (Link et al. 1991; Sommer et al. 1991; Melms et al. 1992; Protti et al. 1993).

Proliferationsassays bislang untersuchter autoreaktiver T-Zellen unter Verwendung von humanen und mikrobiellen Peptiden (s.o.) konnten zeigen, dass diese T-Zellen in weit höherem Umfang auf die mikrobiellen Peptide als auf das eigene Autoantigen reagierten (Vergelli et al. 1997). Die Hypothese des Molekularen Mimikries wurde im vorliegenden Fall durch die Beobachtung unterstützt, dass einige der am stärksten Proliferations-induzierenden Peptide mikrobiellen Antigenen entstammten. Hinweise für ein mögliches Molekulares Mimikry in der autoimmunen MG lieferten Befunde wie experimentell mit dem Herpes simplex-Virus Glykoprotein D kreuzreagierende AChR-spezifische Auto-Ak (Schwimmbeck et al. 1989; Tzartos et al. 1998) sowie Strukturhomologien zwischen der immunogenen AChR- $\alpha$ -Untereinheit und Peptiden des gramnegativen Bakteriums *Haemophilus influenzae* (Im et al. 2002).

Als ein zweites Konzept beschreibt das sogenannte „epitope spreading“ die Freisetzung von Autoantigenen nach einer abgelaufenen inflammatorischen Organerkrankung. Diese Autoantigene führen zu einer Stimulation autoreaktiver T-Zellen, die dann in einer nachfolgenden Autoimmunantwort zu einer weiteren Freisetzung von Autoantigenen führt. Kaskadenartig kann sich auf diese Weise eine chronische organspezifische Autoimmunerkrankung entwickeln (Lehmann et al. 1992).

### 2.2.3 Antikörper-vermittelte Autoimmunität

Die als klassische organspezifische Autoimmunerkrankung geltende MG war die erste Erkrankung, bei der Ak als verantwortliche Auslöser des klinischen Erscheinungsbildes identifiziert werden konnten (Simpson 1960; Pinching et al. 1976; Toyka et al. 1977; Newsom-Davis et al. 1978). Aufgrund der häufigen Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen (z.B. Hashimoto-Thyreoiditis und Rheumatoide Arthritis), pathologischer Thymusveränderungen sowie transienter MG bei Neugeborenen von

## 2 Einleitung

---

MG-Patientinnen schlug Simpson als erster die Hypothese der MG als Autoimmunerkrankung vor (Simpson 1960). In den 1970er Jahren konnten bei bis zu 87% der MG-Patienten erstmals Auto-Ak gegen den nAChR an der postsynaptischen Membran der MEP nachgewiesen werden, während bei gesunden Kontrollen sowie anderen Autoimmunerkrankungen keine entsprechenden Auto-Ak festgestellt wurden (Lindstrom et al. 1976). Besonders hohe Ak-Titer wurden hierbei bei TOMG-Patienten gemessen. Eine Korrelation zwischen Ak-Titer, Alter, Geschlecht und interindividueller Erkrankungsschwere der MG-Patienten konnte dabei nicht festgestellt werden (Lindstrom et al. 1976). Der Beweis der pathogenetischen Rolle der Ak konnte durch folgende Beobachtungen erbracht werden: A) passiver Transfer von humanem Immunglobulin G (IgG) aus dem Serum von MG-Patienten erzeugte bei Mäusen ein myasthenes Syndrom (sog. experimentelle autoimmune Myasthenia gravis [EAMG]) und führte zu einer Abnahme von AChR an der neuromuskulären Membran (Toyka et al. 1975). B) Plasmapherese mit der Entfernung zirkulierender pathogener Auto-Ak führte bei MG-Patienten zu einer deutlichen klinischen Verbesserung (Pinching et al. 1976; Newsom-Davis et al. 1978). C) IgG und Komplement konnten an der neuromuskulären Membran identifiziert werden (Engel et al. 1977). D) Diese IgG-Ak zeigten sich spezifisch gegen den nAChR gerichtet.

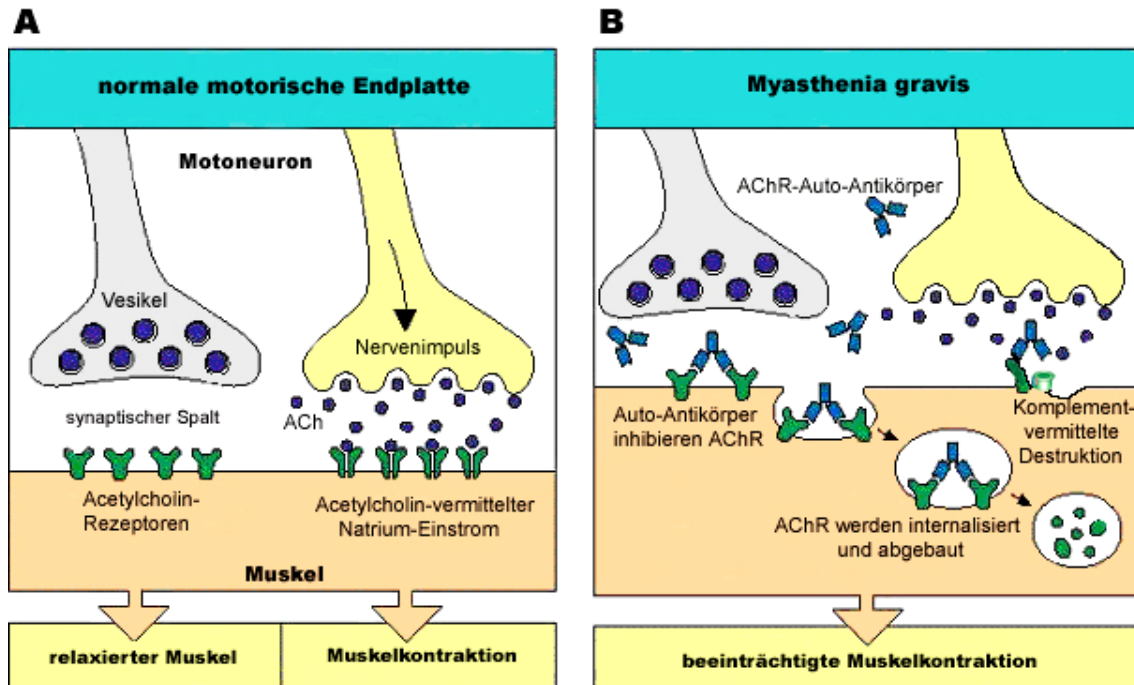
Insgesamt kommt es hierdurch zu folgenden pathophysiologischen Mechanismen: Unter physiologischen Umständen wird an der MEP ein relativ schwacher Nervenimpuls eines Motoneurons in einen starken elektrischen Impuls im Muskel übersetzt, der eine anschließende Muskelkontraktion möglich macht. Als Transmitter zwischen prä- und postsynaptischer Membran der MEP (und somit zwischen Motoneuron und Muskel) fungiert ACh. Dieses bindet an postsynaptische AChR und kann dadurch bei genügend großer Konzentration einen elektrischen Impuls auslösen, der eine Muskelantwort zur Folge hat (Abb. 2.1 A).

Im Falle einer MG wird dieser physiologische Ablauf durch die Auto-Ak gestört (Abb. 2.1 B): Die Bindung an den AChR hat zur Folge, dass 1. die sezernierten Auto-Ak die Funktion der AChR direkt inhibieren (wobei dies der klinisch am wenigsten relevante Mechanismus ist) (Drachman et al. 1982), 2. durch kreuzvernetzende Auto-Ak eine Internalisation und Degradation von AChR stattfindet (Drachman et al. 1978) und 3. ein durch Komplementfaktoren vermittelter lytischer „Membran Attackierender Komplex“ (MAC, membrane attack complex) gebildet wird (Engel 1984; Engel et al. 1987), der die postsynaptische MEP lokal destruiert.

In späten, unbehandelten Stadien der MG imponiert die neuromuskuläre Synapse als Folge dieser chronischen Endplattendestruktion (= funktionelle Denervierung durch die Auto-Ak) als erweiterter Spalt mit einer irreversibel reduzierten Zahl von AChR. Dies

## 2 Einleitung

führt schließlich zu einer deutlichen Beeinträchtigung der neuromuskulären Übertragung. Eine solche „Defekt-Myasthenie“ tritt heutzutage jedoch selten auf, und wird dann meist bei therapierefraktären Verläufen sowie insbesondere bei der SNMG und der TOMG beobachtet (Melms 2003).



**Abbildung 2.1: Auto-Ak inhibieren die Funktion des AChR in der MG**

Physiologisch bindet vom Motoneuron freigesetztes ACh an AChR auf Skelettmuskelzellen und löst so die Muskelkontraktion aus (A). Bei der MG binden Auto-Ak an den AChR, ohne ihn zu aktivieren und führen zu einer direkten Inhibition (B, links). Gebundene Ak vermitteln außerdem die AChR-Aufnahme in die Zelle, wo dieser abgebaut wird (B, Mitte). Gebundene Ak führen zu einer Komplement-Aktivierung und zur Bildung eines MAC (B, rechts). Da auf diese Weise die Anzahl der AChR auf den Muskelzellen abnimmt, führt das verminderte Ansprechen auf ACh verstärkt zu einer Beeinträchtigung der Muskelkontraktion.

(modifiziert nach <http://www.montana.edu/wwwami/523/Reading11.htm>)

Die Bestimmung der AChR-Ak gehört zur klinischen Standarddiagnostik. Ein positives Ergebnis gilt als pathognomonisch für die MG (Vincent et al. 1985). Dennoch lassen sich bei ca. 10% der Patienten mit generalisierter MG keine Ak gegen den AChR finden (SNMG, Vincent et al. 2003a). Diese SNMG ist klinisch nicht von der seropositiven Variante zu differenzieren. Nachdem für Jahre ausschließlich gegen den AChR gerichtete Auto-Ak vermutet wurden, wiesen neuere Forschungen weitere pathologisch relevante Ak gegen Muskelantigene wie Titin, den Ryanodin-Rezeptor (Aarli et al. 1990; Mygland et al. 1992) oder die muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase (MuSK) nach (Hoch et al. 2001). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass bis zu 70% der SNMG-Patienten Auto-Ak gegen MuSK besitzen. MuSK vermittelt den Einbau der AChR an der MEP, und eine Inhibition durch Auto-Ak hat eine gestörte Agrin-induzierte Clusterbildung von AChR zur Folge (Hoch et al. 2001). Einen gewissen positiven prädiktiven Wert für das Vorliegen bzw. das Rezidiv eines

## 2 Einleitung

---

Thymoms (bei Patienten unter 60 Jahren) haben Ak gegen Titin, die sich bei mehr als 85% der TOMG-Patienten frühzeitig im Krankheitsverlauf nachweisen lassen (Aarli et al. 2003). Weitere Ak gegen Zytokine wie IL-12 und TNF- $\alpha$  (Meager et al. 2003) sowie INF- $\alpha$  können möglicherweise ebenfalls in der Rezidivkontrolle eines Thymoms als Tumormarker genutzt werden (Buckley et al. 2001b).

### 2.2.4 T-Zell-Immunologie

#### 2.2.4.1 Autoreaktive T-Zellen in der MG

B-Zellen sind in ihrer Differenzierung zu Plasmazellen und damit in der Produktion von Ak gewöhnlich auf die Hilfe von T-Helferzellen angewiesen. Da bei MG-Patienten der Thymus, welcher für die Entwicklung der T-Zellen von maßgeblicher Bedeutung ist, regelmäßig deutliche histologische Veränderungen aufweist, wurde schon früh über eine entscheidende Rolle der T-Zellen in der MG-Pathogenese spekuliert.

Den direkten Nachweis autoreaktiver T-Zellen in der MG erbrachte 1984 die Isolierung AChR-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Blut von sechs EOMG-Patienten (Hohlfeld et al. 1984). Die Zelllinie, die bei einem dieser Patienten aus autoreaktiven T-Zellen etabliert werden konnte, bewies *in vitro* in Proliferations-Untersuchungen Spezifität für aufgereinigten AChR. Die Analyse der HLA-Antigene des Patienten ergab Homozygotie für HLA-DR3, welches typisch für die EOMG ist (s.o.). Außerdem konnte die Proliferation der autoreaktiven T-Zellen durch monoklonale Ak gegen HLA-DR-Determinanten inhibiert werden (Hohlfeld et al. 1984). In weiteren Untersuchungen führte die Zugabe AChR-spezifischer T-Zellen zu B-Zellen *in vitro* zu einer starken Sekretion von AChR-Ak sowie zu einem deutlichen Anstieg der IgG- und IgM-Gesamtiter. Das Ausmaß dieser Sekretion war hierbei direkt proportional zur Zahl der applizierten T-Zellen (Hohlfeld et al. 1986). Im Vergleich von MG-Patienten mit gesunden Kontrollen proliferierten auf definierte aufgereinigte Peptide des AChR ausschließlich die peripher-venösen Blut-Lymphozyten (PBLs) und Thymozyten der MG-Patienten (Berrih-Aknin et al. 1991). Allerdings konnten auch aus dem Blut gesunder Kontrollen autoreaktive AChR-spezifische T-Zellen mit CD4<sup>+</sup> Phänotyp isoliert werden (Salvetti et al. 1991; Sommer et al. 1991; Melms et al. 1992), was darauf schließen lässt, dass die reine Präsenz autoreaktiver T-Zellen eine normale Eigenschaft des Immunrepertoires darstellt. Diese autoreaktiven Zellen zeigten *in vitro* eine Immunantwort gegen die  $\alpha$ -Untereinheit des AChR, welche sowohl beim Menschen als auch in der EAMG das überwiegende immunogene Epitop darstellt.

## 2 Einleitung

### 2.2.4.2 MG als T<sub>H</sub>1-vermittelte Autoimmunerkrankung

CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden anhand des von ihnen sezernierten Zytokin-Profiles typischerweise in T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>0-Zellen eingeteilt (siehe Tabelle 2.2). Die Art des Zytokin-Profiles ist dabei zum einen vom Ursprung der Antigen-präsentierenden Zelle (APC) abhängig, zum anderen durch den Einfluß des Antigens bedingt (Gajewski et al. 1991; Kumar et al. 1995; Pfeiffer et al. 1995).

T<sub>H</sub>1-Zytokin-produzierende Zellen sind in der MG von besonderem Interesse, da diese die Synthese Komplement-bindender IgG-Ak induzieren (s.o.). Die Analyse sezernierter Zytokine, welche die aus peripherem Blut isolierten T-Zellen in der Zellkultur produzierten, zeigte bei EOMG-Patienten ein T<sub>H</sub>1-Profil (Hill et al. 1999; Nagvekar et al. 1999).

CD4 <sup>+</sup>	sezernierte Zytokine	Evidenz für pathogenetische Bedeutung in der MG
	(Abbas et al. 1996; Romagnani 1997; O'Garra 1998)	
T <sub>H</sub> 1	INF-γ, TNF-α, IL-2 u.a.	Isolation auto-AChR-spezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen mit T <sub>H</sub> 1-Profil (Moiola et al. 1994; Wang et al. 1997; Hill et al. 1999) Identifikation Komplement-aktivierender auto-AChR-Ak (IgG1, IgG3) (Engel et al. 1987; Nagvekar et al. 1999) Sekretion eines T <sub>H</sub> 1-, aber nicht T <sub>H</sub> 2-spezifischen Profiles nach Autoantigen-Stimulation AChR-spezifischer T-Zellen (Moiola et al. 1994) INF-γ-Gen-/Rezeptor-Defizienz verhindert EAMG-Induktion (McLachlan et al. 1995; Balasa et al. 2000)
T <sub>H</sub> 2	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 u.a.	Hinweise für evtl. autoimmunprotektive Wirkung (Souroujon et al. 2003)
T <sub>H</sub> 0	IL-2, IL-4, INF-γ u.a.	nicht bekannt

**Tabelle 2.2: Pathogenetische Bedeutung des Zytokin-Profiles CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der MG**

APC: Antigen-präsentierende Zelle; INF-γ: Interferon gamma; T<sub>H</sub>: T-Helferzelle; TNF-α: Tumor-Nekrose-Faktor alpha; IL: Interleukin

Während beim Menschen der endgültige Nachweis bislang aussteht, konnte im Tiermodell die Hypothese einer T<sub>H</sub>1-vermittelten Autoimmunerkrankung bestätigt werden. Auf unterschiedliche Weise wurde hierbei der T<sub>H</sub>1-Signalweg unterbrochen: bei INF-γ-defizienten Mäusen (INF-γ-Gen knockout Mäuse) war eine EAMG-Induktion nach Immunisierung mit Fisch-AChR nicht mehr möglich (Balasa et al. 1997). Experimente mit INF-γ-Rezeptor-defizienten Mäusen erbrachten ähnliche Ergebnisse: Durch die fehlende T<sub>H</sub>1-Antwort konnte hier ebenfalls kaum eine EAMG induziert werden (McLachlan et al. 1995).

## 2 Einleitung

---

In der TOMG konnten kürzlich spezifische Auto-Ak für die Zytokine INF- $\alpha$  und IL-12 festgestellt werden, die womöglich die Immunantwort in der MG beeinflussen können (Buckley et al. 2001b). Die Charakterisierung des Zytokin-Profiles ist nicht zuletzt deshalb von Interesse, da im Tierversuch durch Induktion eines T<sub>H</sub>-Shiftes (T<sub>H</sub>1  $\rightarrow$  T<sub>H</sub>2) eine Verbesserung des klinischen Verlaufes erzielt werden konnte und sich hieraus neue Therapieansätze für die MG ergeben könnten (Souroujon et al. 2003).

### 2.2.4.3 Physiologie und Pathophysiologie des Thymus

Die physiologische Aufgabe des Thymus wird im Allgemeinen als „T-Zell-Schule“ bezeichnet, in der funktionsfähige, „Selbst“-MHC-erkennende TCR generiert (positive Selektion) und gleichzeitig Zellen mit autoreaktivem TCR ausgesondert werden (negative Selektion). Die positive Selektion findet dabei vor allem während der Interaktion doppelt positiver Thymozyten (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) mit kortikalen Thymusepithelzellen (cTECs, cortical thymic epithelial cells) statt (Bousso et al. 2002). Beim Übergang ins Thymusmark treten die inzwischen einfach positiven Thymozyten (CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup>) mit medullären Thymusepithelzellen (mTECs) in Kontakt, die u.a. periphere Gewebe-spezifische Antigene (TSA, tissue specific antigens) exprimieren (Anderson et al. 2002). Eine schwache Affinität zum „Selbst“-Antigen:MHC-Komplex führt zur weiteren Reifung der Thymozyten, wohingegen eine hohe Affinität aufgrund der Gefahr sich entwickelnder autoreaktiver Zellen u.a. entweder zur klonalen Deletion (Eliminierung unreifer, potentiell autoreaktiver Lymphozyten) (Palmer 2003) oder zur Umwandlung in regulatorische T-Zellen (T<sub>Reg</sub>-Zellen) führt (Baldwin et al. 2004). Die meisten T<sub>Reg</sub>-Zellen weisen einen CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Phänotyp auf (Sakaguchi 2005). T<sub>Reg</sub>-Zellen verhindern *in vivo* und *in vitro* die Aktivierung autoreaktiver Immunzellen (Maloy et al. 2001). Als suppressive Mechanismen vermutet man inhibierende Zellkontakte zu autoreaktiven Immunzellen sowie die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine (Shevach 2002).

Von allen sich entwickelnden Thymozyten werden 98% aller Zellen durch negative Selektion sowie klonale Deletion eliminiert (Scollay et al. 1980). Dies führt zu einer frühzeitigen Bildung eines funktionstüchtigen T-Zell-Repertoires, welches im Prinzip lebenslang durch Zellteilung erhalten bleibt. Circa 5-10% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind dabei den T<sub>Reg</sub>-Zellen zuzuordnen (Stephens et al. 2001). Physiologischerweise atrophiert der Thymus bei Gesunden nach der Pubertät und ist im Alter involutiert (Steinmann 1986).

Bei etwa 75% der MG-Patienten finden sich Veränderungen des Thymus (Thanvi et al. 2004). Aus dieser Gruppe zeigen ca. 85% der Patienten eine Thymus-Hyperplasie (Thymusvergrößerung), während ca. 15% ein Thymom aufweisen.

## 2 Einleitung

---

Unter physiologischen Bedingungen wird im Thymusgewebe eine große Zahl peripherer Proteine exprimiert (Derbinski et al. 2001), mit denen die Thymozyten während ihrer Entwicklung zu reifen T-Zellen in Kontakt treten. Hierzu zählt auch die Expression von AChR auf der Oberfläche von myoidem und epithelialem Gewebe im Thymusmark (Schluep et al. 1987; Salmon et al. 1998), welche sowohl bei MG-Patienten als auch bei gesunden Kontrollen nachgewiesen werden kann. Im Gegensatz zu Gesunden weist jedoch der hyperplastische Thymus bei EOMG viele Follikelzentren mit T- und B-Zell-Regionen auf, die denen in Lymphknoten sehr ähneln (Kirchner et al. 1986). Aus solchen Thymi isolierte B-Zellen produzieren spontan AChR-Auto-Ak (Scadding et al. 1981). Darüber hinaus befinden sich die meisten AChR-spezifischen T-Zellen dieser MG-Patienten im hyperplastischen Thymus (Sommer et al. 1990). Thymektomien bewirken bei dieser Patientengruppe sowohl eine Reduktion des Auto-Ak-Titers als auch eine klinische Verbesserung und führen dadurch zu einer Einsparung von Immunsuppressiva und Acetylcholinesterase-Hemmern (Kuks et al. 1991).

Im Gegensatz zum hyperplastischen Thymus imponieren beim Thymom naive, im Experiment potentiell autoreaktive T-Zellen und nur wenig reife, positiv selektierte Thymozyten (Nenninger et al. 1998). Thymektomien führen hierbei oftmals zu keiner wesentlichen klinischen Verbesserung (Chiu et al. 1987). Häufig sind weitere Auto-Ak gegen Titin und den Ryanodin-Rezeptor vorhanden (s.o.), deren Antigene allerdings nicht vollständig im Thymom exprimiert werden (Aarli et al. 1990; Mygland et al. 1992). Gleichwohl scheint das Tumorepithel AChR-Untereinheiten zu exprimieren (Marx et al. 1989; Kornstein et al. 1995). Neuere Untersuchungen belegen, dass in der TOMG in weit größerem Maße als bei gesunden Kontrollen, bei Thymomen ohne assoziierte MG oder bei der LOMG ein ständiger Export CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Thymus in die Peripherie hin stattfindet (Buckley et al. 2001a). Dieses Ergebnis führte zu der Hypothese, dass im Gegensatz zur Hyperplasie die Immunantwort bei der TOMG hauptsächlich in der Peripherie stattfinden könnte.

Ungeklärt bleibt die Rolle des Thymus in der LOMG. Zum einen liegt der Thymus bei der Erstmanifestation oftmals schon in atrophiertem Zustand vor. Zum anderen finden sich bei ca. 60% dieser Patienten positive Anti-Titin-Ak ohne radiologische Hinweise auf ein Thymom (Aarli et al. 2003). Diese Befunde unterstützen das heterogene Bild dieser Erkrankung und erschweren zusätzlich eine Klärung der Pathogenese.

### 2.2.4.4 TCR und CDR3

Für die Erkennung von (Auto-)Antigenen spielt der TCR die entscheidende Rolle. Der TCR besteht aus einem Heterodimer von  $\alpha/\beta$ -Ketten und assoziierten Rezeptoren

## 2 Einleitung

---

(CD3, CD4 oder CD8). Die leichte  $\alpha$ - und die schwere  $\beta$ -Kette kann jeweils in einen variablen (V), der Antigenerkennung dienenden, und einen konstanten (C), in der Zellmembran verankerten Abschnitt unterteilt werden (Davis 1985) (siehe Abb. 2.2). Man unterscheidet zwei Arten von T-Zellen: zum einen  $CD8^+$  T-Zellen, welche die nahezu auf allen Zellen exprimierten MHC Klasse I-Moleküle erkennen und zur Zytolyse infizierter Zellen führen. Zum anderen  $CD4^+$  T-Zellen, welche die auf MHC Klasse II-Molekülen präsentierten Antigene erkennen und zur Sekretion pro- (bzw. anti-)inflammatorischer und zytotoxischer Moleküle fähig sind bzw. die korrespondierende Antigen-spezifische B-Zelle zur Expansion von Plasmazellen anregen (Janeway et al. 2001a).

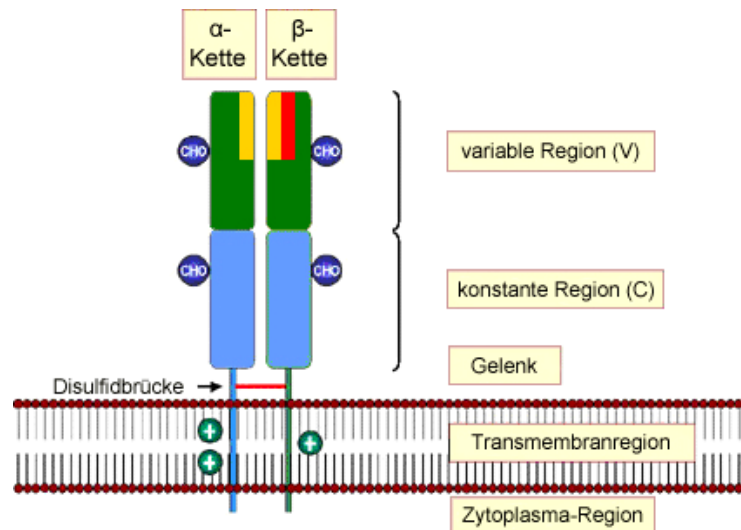
Im Thymus wird durch somatische Rekombination verschiedener Gen-Segmente im TCR-Locus der TCR und damit die Antigen-spezifität der T-Zelle festgelegt. Dieser Vorgang umfasst sowohl die leichte  $\alpha$ - als auch die schwere  $\beta$ -Kette. Im Genlocus der Antigen-bindenden, variablen Region des TCR liegen auf DNA-Ebene zahlreiche V (variable)-, D (diversity [nur in der  $\beta$ -Kette vorkommend])- und J (joining)-Segmente vor (Bassing et al. 2002).

Während der Rekombination werden nach dem Zufallsprinzip jeweils ein V-, D- und J-Element für die  $\beta$ -Kette bzw. ein V- und J-Element für die  $\alpha$ -Kette zusammengefügt sowie die nicht verwendeten Segmente entfernt, wodurch funktionsfähige Exons entstehen (Davis et al. 1988; Strominger 1989). Insgesamt wird auf diese Weise ein potentiell T-Zell-Repertoire mit ca.  $10^{16}$  möglichen TCR generiert (Davis 1990; Janeway et al. 2001a). Darüber hinaus erzeugen zufällige Insertion und Deletion von Nucleotiden im Bereich der D-Segmente und der Übergangsbereiche (NDN, non defined nucleotides) hypervariable Regionen (Davis et al. 1988; Strominger 1989), die als „complementary determining regions“ (CDR) bezeichnet werden und später im TCR für die Bindung des MHC:Antigen-Liganden wesentlich sind (Danska et al. 1990; Garcia et al. 1996). Insgesamt existieren 3 CDR, wobei die Antigenbindung vor allem im Bereich der TCR CDR3 erfolgt (Reiser et al. 2000).

Die CDR3 der  $\beta$ -Kette umfasst vorwiegend den Bereich des D-Segments, die CDR3 der  $\alpha$ -Kette den Bereich der V- und J-Segmentverbindung (Abb. 2.3). Eine identische Aminosäuresequenz der CDR3 lässt somit auf eine identische Antigen-Spezifität der T-Zelle schließen. Abb. 2.3 illustriert den Vorgang der Rekombination am Beispiel der schweren  $\beta$ -Kette des TCR. Nach der erfolgreichen Rekombination eines Allels wird das zweite Allel von der Rekombination ausgeschlossen - diese so genannte „allelische Exklusion“ verhindert die Ausprägung zweier verschiedener TCR, wodurch theoretisch eine „einzigartige“ Antigen-spezifität gewährleistet wird (Leiden et al. 1986;

## 2 Einleitung

Taussig 1987). Durch den Nachweis der TCR-Degeneration wurde diese Einschätzung nachhaltig relativiert (siehe Abschnitt 2.2.2).



**Abbildung 2.2: Struktur des TCR**

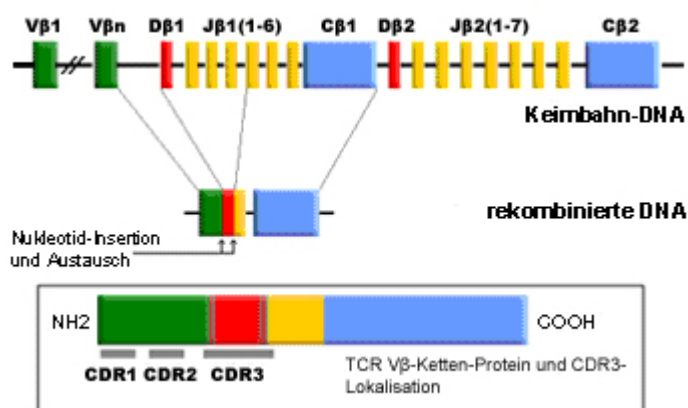
Der TCR ist ein durch eine Disulfidbrücke verknüpftes Heterodimer aus den zwei Transmembran-Glykoprotein-Ketten  $\alpha$  und  $\beta$ . Jede Kette enthält eine konstante (C), in der Zellmembran verankerte, und eine variable Region (V). Die beiden nebeneinander liegenden V-Domänen bilden die Antigenerkennungsstelle. Vergleiche die farblichen Entsprechungen der Abb. 2.2 mit Abb. 2.3!

(modifiziert nach: <http://pathmicro.med.sc.edu/bowers/tcr.jpg>)

Mittels fluoreszierender Ak ist es möglich, den variablen Teil der  $\beta$ -Kette (TCR  $V\beta$ ) zu färben. Da im Rahmen der T-Zellreifung definierte TCR  $V\beta$ -Ketten unterschiedlicher Sequenz mit einer charakteristischen Verteilung generiert werden, wurden zahlreiche  $V\beta$ -komplementäre Ak entwickelt, die je nach prozentualer Verteilung der  $V\beta$ -Ketten in der Durchflusszytometrie die Analyse des T-Zell-Repertoires eines Menschen ermöglichen (Muraro et al. 2000). Bei der MG gab es die ersten Hinweise auf TCR-spezifische Expansionen in FACS-Analysen mittels sechs TCR  $V\beta$ -Ak an MG-Thymozyten. Hierbei konnte eine deutliche Anreicherung bzw. Expansion zweier TCR  $V\beta$ -Ketten ( $V\beta 5.1$  und  $V\beta 8$ ) im Vergleich zu gesunden Kontrollen demonstriert werden. Da diese TCR  $V\beta$ -spezifischen T-Zellen vorwiegend konzentriert in den Reifungsfollikeln hyperplastischer Thymi vorlagen, maß man ihnen eine pathogenetische Rolle in der MG bei (Truffault et al. 1997), die indes noch nicht bewiesen werden konnte.

Die wenigen bislang durchgeführten TCR-Analysen bei der MG erfolgten meist PCR-basiert (PCR, polymerase chain reaction) unter dem Einsatz einer geringen Anzahl TCR  $V\beta$ -spezifischer Primer. Dieses Vorgehen erschwerte eine isolierte Betrachtung der  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen erheblich.

## 2 Einleitung



**Abbildung 2.3: Bildung der variablen  $\beta$ -Kette des TCR**

Jeweils ein V-, D- und J-Element wird während der somatischen Rekombination zusammengefügt. Hierdurch kommt es zu einer großen, nach dem Zufallsprinzip generierten Vielfalt von TCR, die nochmals durch Austausch und Insertion von Nukleotiden zwischen den Genelementen weiter potenziert wird (ca.  $10^{16}$  mögliche TCR). Die D-Region und teilweise benachbarte Abschnitte bilden zusammen die CDR3.

(modifiziert nach [http://www.tcland-biotech.com/html/science/TCW2\\_2.html](http://www.tcland-biotech.com/html/science/TCW2_2.html))

Allerdings konnten z.B. auch hier an einem vergleichsweise geringen Patientenkollektiv ( $n = 11$ ) im Gegensatz zu gesunden Kontrollen ( $n = 4$ ) signifikant expandierte T-Zell-Populationen [ $V\beta 4^+$ ,  $V\beta 6^+$ ,  $V\beta 15^+$ ,  $V\beta 16^+$ ,  $V\beta 24^+$ ] im peripher-venösen Blut nachgewiesen werden (Navaneetham et al. 1998). Andere Studien untersuchten die Expression von insgesamt 22 TCR  $V\beta$ -Ketten getrennt für  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen bei acht MG-Patienten und sieben gesunden Kontrollen: auch hier zeigten sich bei MG-Patienten deutlich expandierte T-Zellpopulationen für  $V\beta 1$ ,  $V\beta 13.2$ ,  $V\beta 17$  und  $V\beta 20$  innerhalb beider T-Zell-Subgruppen (Gigliotti et al. 1996). Mittels FACS-Analyse und dem Einsatz monoklonaler TCR  $V\beta$ -Ak wurden in einer weiteren Studie 13 TCR  $V\beta$ -Ketten auf mögliche Expansionen untersucht. Von insgesamt 38 MG-Patienten wiesen 47% deutliche  $V\beta$ -Ketten-Expansionen von mehr als dem dreifachen Median der gesunden Kontrollen auf, bei den Kontrollpersonen ( $n = 57$ ) dagegen lediglich 26% (Xu et al. 1998). In keiner dieser Studien wurde der Nachweis von Klonalität der expandierten T-Zell-Populationen erbracht.

Expandierte T-Zell-Populationen müssen den Verdacht auf das womögliche Vorhandensein klonaler T-Zellen lenken (s.o.). Der Nachweis klonaler T-Zellen in der MG im Gegensatz zu Gesunden würde wiederum stark für eine kausale pathogenetische Rolle sprechen.

Da die somatische Rekombination zufallsgesteuert ist und dabei Regionen höchster Variabilität entstehen, sind identische CDR3 zweier T-Zellen unterschiedlicher Herkunft sehr unwahrscheinlich und lassen folglich auf die Abstammung einer gemeinsamen „Mutter“-T-Zelle schließen (Even et al. 1995). In diesem Fall spricht man auch von einem klonalen Ursprung bzw. von einem „Klon“ (Burnet 1962).

## 2 Einleitung

---

### 2.3 Ableitung der Fragestellung

Expandierte T-Zell-Populationen im peripher-venösen Blut von MG-Patienten werfen die Frage nach dem Ursprung dieser Zellen und ihrem womöglichen Anteil an der Pathogenese der MG auf.

Bislang erfolgten Analysen des TCR-Repertoires in der autoimmunen MG an geringen Patientenzahlen und im Vergleich zu nur wenigen gesunden Kontrollen, was eine valide Aussage zur Signifikanz von TCR-Expansionen in der MG erschwerte. Klonalität expandierter T-Zellen wurde bislang niemals nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wird die Frage geklärt, ob und in welchem Ausmaß TCR V $\beta$ -Expansionen im Blut eines großen MG-Patientenkollektivs (n=118) nachweisbar sind, und inwieweit sich diese Expansionen signifikant vom TCR-Repertoire in Alter und Geschlecht angeglicherer gesunder Kontrollen unterscheiden.

Eine unphysiologische und übermäßige Expression einzelner TCR V $\beta$ -Ketten lenkt den Verdacht auf einen (oligo-)klonalen Ursprung solcher Zellen, der in der Literatur bislang nicht erbracht wurde. In dieser Arbeit erfolgt der Nachweis klonal expandierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der autoimmunen MG.

Der Nachweis klonaler Expansionen legt diesen T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der MG nahe und bietet gleichzeitig durch die Gewinnung womöglich autoreaktiver T-Zellen die Chance, weitere Einblicke in die Pathophysiologie der MG und von Autoimmunerkrankungen im Allgemeinen zu erhalten.

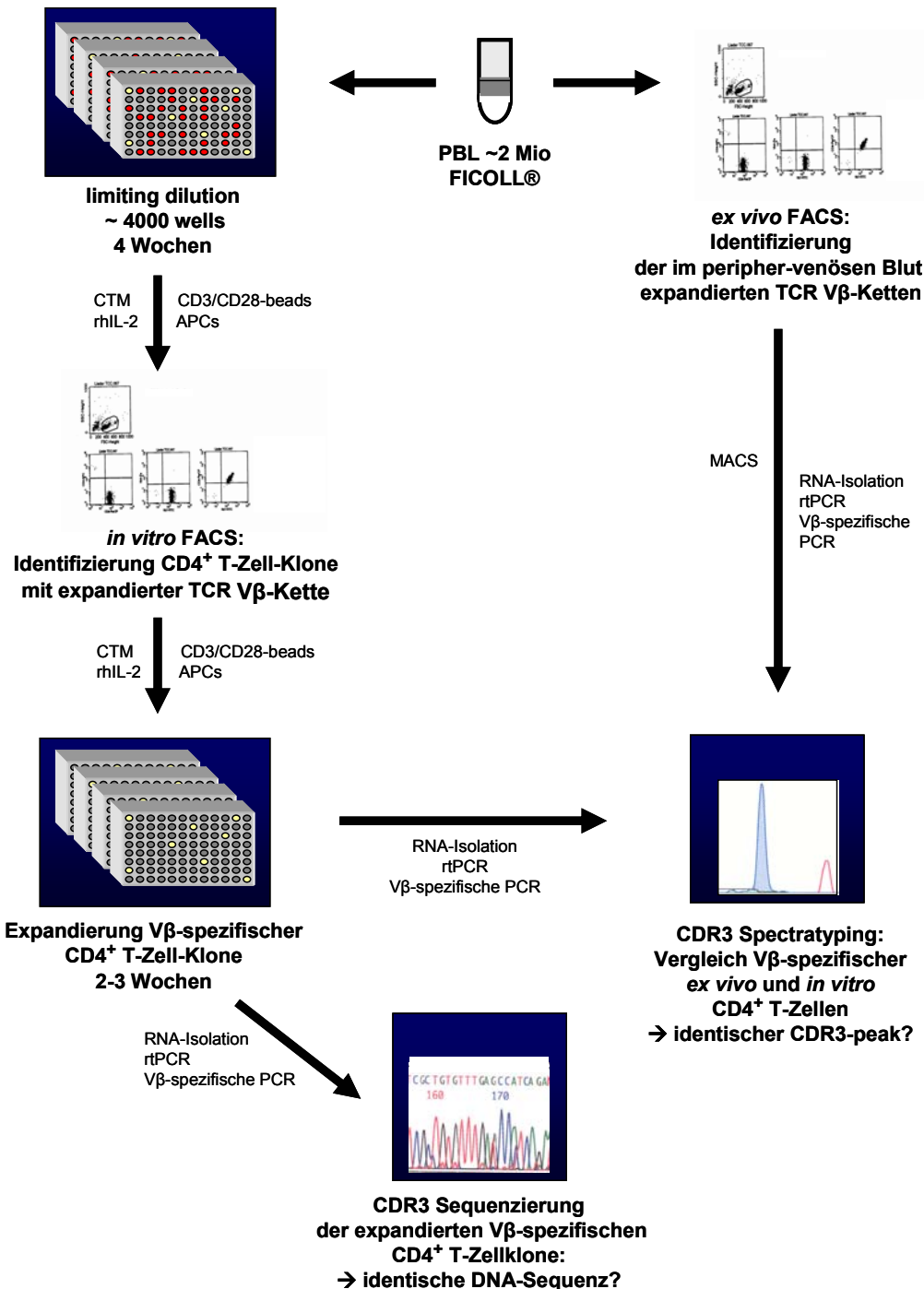
## 3 Patienten, Material und Methoden

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Identifizierung klonal expandierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der autoimmunen MG. Hierzu wurde ein zweiarmer Antigen-unabhängiger Versuchsansatz angewandt, dessen genereller Aufbau in Abbildung 3.1 dargestellt ist.

Unmittelbar im Anschluss an die peripher-venöse Blutentnahme eines MG-Patienten wurden mononukleäre Zellen isoliert, wobei sich an dieser Stelle die weiteren Untersuchungen in zwei unterschiedliche Untersuchungsarme trennten. 1) *Ex vivo*: Hierbei wurden die Lymphozyten innerhalb der mononukleären Zellen durchflusszytometrisch auf die Verteilung ihrer TCR V $\beta$ -Ketten hin untersucht, um T-Zell-Expansionen nachzuweisen. Der andere Teil der Lymphozyten wurde mittels MACS separat in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Populationen aufgereinigt, um eine separate Analyse der hypervariablen Region des TCR (CDR3) durchführen zu können. 2) *In vitro*: Hierbei wurde der überwiegende Teil der mononukleären Zellen nach der "limiting dilution"-Methode in 96-well-Mikrotiterplatten überführt, in Kultur genommen und mit APCs sowie CD3/CD28-Ak stimuliert. Dieses Vorgehen gewährleistete die selektive Proliferation CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Pro Vertiefung wurde rechnerisch eine einzelne Zelle ausgesät, was die Generierung eines T-Zellklons ermöglichen sollte. Proliferierende T-Zellkulturen wurden mit Interleukin-2 stimuliert. Sichtbar wachsende Klone wurden nach einem Zeitraum von zwei bis drei Wochen erneut durchflusszytometrisch auf ihre TCR V $\beta$ -Kette hin untersucht. Diejenigen CD4<sup>+</sup> T-Zellklone, die eine im peripher-venösen Blut des jeweiligen MG-Patienten expandierte V $\beta$ -Kette aufwiesen, wurden isoliert und *in vitro* expandiert.

Mit den gewonnenen *in vitro* und *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen konnte sodann die molekularbiologische Analyse der CDR3 des TCR erfolgen: Nach RNA-Isolation und reverser Transkription in cDNA wurde eine PCR mit TCR V $\beta$ -spezifischen Primern, die den Bereich der CDR3 umfassen, durchgeführt. Im anschließenden CDR3-Spectratyping wurde die Länge des PCR-Transkriptes (in bp) der *ex vivo* T-Zellen und *in vitro* T-Zellklone bestimmt und verglichen. Identische CDR3-Längen belegten die erfolgreiche Isolation und *in vitro* Klonierung der im Blut expandierten V $\beta$ -spezifischen T-Zellen. In diesem Fall erfolgte die CDR3 DNA-Sequenzierung der V $\beta$ -spezifischen T-Zellklone, die bei identischen Sequenzen den Beweis für die Klonalität der expandierten T-Zellpopulationen im peripher-venösen Blut der MG-Patienten erbrachte.

### 3 Patienten, Material und Methoden



**Abbildung 3.1: Versuchsansatz zur Identifizierung klonal expandierter T-Zellen**

Peripher-venöses Blut von MG-Patienten (und Kontrollen) wurde zunächst durchflusszytometrisch auf die Verteilung der TCR Vβ-Ketten auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht (ex vivo-Untersuchungen). Gleichzeitig wurden T-Zellen aus dem Blut isoliert und in Kultur genommen (in vitro-Untersuchungen). Pro Vertiefung einer 96-well Mikrotiterplatte wurde eine einzelne T-Zelle ausgesät, aus der ein T-Zellklon hervorging. Nach durchflusszytometrischer Untersuchung wurden ausschließlich CD4<sup>+</sup> T-Zellklone mit der im peripher-venösen Blut expandierten Vβ-Kette isoliert und erneut kultiviert. Die TCR CDR3-Länge der in vitro T-Zellklone und der ex vivo isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (MACS) wurde analysiert und verglichen (Spectratyping). Bei Übereinstimmung in der CDR3-Länge erfolgte die DNA-Sequenzierung der CDR3 der T-Zellklone. Identische CDR3-Sequenzen belegten den klonalen Ursprung der im peripher-venösen Blut expandierten CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation. FACS: fluorescence activated cell sorting; MACS: magnetic activated cell sorting; CTM: complete thymus medium; rhIL-2: rekombinantes humanes Interleukin-2; APC: antigen presenting cell; rtPCR: Reverse Transkription.



### 3 Patienten, Material und Methoden

---

#### Bestrahlungsgerät

<sup>137</sup>C-Strahlenquelle  
(Aktivität: 74 TBq) STS GmbH (Braunschweig)

#### Kühlgeräte

Gefrierschrank -20°C Liebherr (Ochsenhausen)  
Gefrierschrank -78°C Heraeus Instruments (Hanau)  
Gefrierschrank -136°C Nunc (Roskilde, Dänemark)  
Kühlschrank 4°C Liebherr (Ochsenhausen)

#### Sterilbank (Bench)

Clean-Bench Hera Safe Heraeus Instruments (Hanau)

#### Wärme- und Brutschrank

Wärmeschrank Hera cell Heraeus Instruments (Hanau)  
(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)

#### Magnetic activated cell sorting (MACS)

MACS Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)

#### Flourescence activated cell sorting (FACS)

FACSCalibur BD Pharmingen (Heidelberg)

#### Elektrophorese

Laufkammer Biorad (München)  
Spannungsquelle Biorad (München)  
Transilluminator Herolab (Wiesloch)

#### PCR-Gerät

PTC-200 Thermal Cycler MJ Research (Watertown, MA, USA)

#### CDR3-Spectratyping (GeneScan) und DNA-Sequenzierung

ABI Prism 310 Genetic Analyzer Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)

### 3 Patienten, Material und Methoden

---

#### Sonstige Geräte und Verbrauchsmaterialien

50 ml Röhrchen	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Corning-Filter System	Corning Inc. (NY, USA)
Deckgläschen	Menzel (Braunschweig)
Einfrierboxen	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Einmalpipetten	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Einmalspritzen	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Erlenmeyerkolben	Kobe (Marburg)
Falcon-Röhrchen	BD Pharmingen (Heidelberg)
Kolbenhubpipetten	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Kryoröhrchen	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Mikrowelle	AEG (Nürnberg)
Millex 0.22 µl Filter Unit	Millex (Carrigtwohill, Irland)
Neubauer-Zählkammer	Superior – Paul Marienfeld (Lauda-Königshofen)
PCR cups 0,2 ml	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Präzisionspipette Accu jet	Brand (Wertheim)
Präzisionspipette FinnpiPETTE	Thermo LabSystems (Vantaa, Finnland)
Zellkulturflaschen CellStar	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Zellkulturplatten, 96 wells	Nunc (Roskilde, Dänemark)

#### 3.1.3 Chemikalien (sofern nicht bereits in Kits enthalten)

Agarose	Cambrex Bio Science (ME, USA)
Aqua dest.	Braun (Melsungen)
CD3/CD28 T cell expander beads	Dynal (Oslo, Norwegen)
MACS CD4/CD8 microbeads	
CO <sub>2</sub>	Messer (Krefeld)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma (Steinkirchen)
EDTA	Promega (Madison, WI, USA)
FCS (fetal calf serum)	Biochrom (Berlin)
FICOLL	Biochrom (Berlin)
Hi-Di (Formamid)	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
rhIL-2	Strathmann Biotech AG (Hannover)
ROX-500 (6-Carboxyrhodamin X)	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
SYBR-Gold	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Trypanblau 4%	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)

### 3 Patienten, Material und Methoden

---

#### 3.1.4 Puffer und Lösungen

<u>FACS-Lösungen:</u>	BD Pharmingen (Heidelberg)
FACSFlow	
FACSafe	
FACSRinse	
CellWash	
PBS (phosphate buffered saline)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
PharMingenLyse (NH <sub>4</sub> Cl-Lösung)	BD Pharmingen(Heidelberg)
TBE-Puffer 1x	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)

#### 3.1.5 Medien

##### Zellkulturmedium, sog. Complete Thymus Medium (CTM):

Humanserum, gepoolt 2,5%	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Aminosäuren, nicht-essentiell 1%	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natrium-Pyruvat 1%	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
HEPES-Puffer 1,125%	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Penicillin/Streptomycin 1%	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
L-Glutamat 1%	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
RPMI 1640	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)

#### 3.1.6 Nukleinsäuren

dNTP Set PCR Grade (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
T7-Oligo(dT)-Primer [pd(N <sub>6</sub> )]	Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Freiburg)

### 3 Patienten, Material und Methoden

---

#### 3.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Primer

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle hier aufgeführten Primer von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

forward primer TCR V $\beta$ -Ketten (Genevee et al. 1992):

V $\beta$ 1	5'-CCG-CAC-AAC-AGT-TCC-CTG-ACT-TGC-3'
V $\beta$ 2	5'-GGC-CAC-ATA-CGA-GCA-AGG-CGT-CGA-3'
V $\beta$ 3	5'-CGC-TTC-TCC-CGG-ATT-CTG-GAG-TCC-3'
V $\beta$ 4	5'-TCC-CCA-TCA-GCC-GCC-CAA-ACC- TAA-3'
V $\beta$ 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5	5'-AGC-TCT-GAG-CTG-AAT-GTG-AAC-GCC-3'
V $\beta$ 6.1- 6.6	5'-TCT-CAG-GTG-TGA-TCC-AAA-TTC-GGG-3'
V $\beta$ 7.1, 7.2	5'-CCT-GAA-TGC-CCC-AAC-AGC-TCT-CTC-3'
V $\beta$ 8.1, 8.2	5'-CCA-TGA-TGC-GGG-GAC-TGG-AGT-TGC-3'
V $\beta$ 9	5'-TTC-CCT-GGA-GCT-TGG-TGA-CTC-TGC-3'
V $\beta$ 10	5'-CCA-CGG-AGT-CAG-GGG-ACA-CAG-CAC-3'
V $\beta$ 11	5'-TGC-CAG-GCC-CTC-ACA-TAC-CTC-TCA-3'
V $\beta$ 12.1, 12.2	5'-TGT-CAC-CAG-ACT-GGG-AAC-CAC-CAC-3'
V $\beta$ 13.1 – 13.6	5'-CAC-TGC-GGT-GTA-CCC-AGG-ATA-TGA-3'
V $\beta$ 14	5'-GGG-CTG-GGC-TTA-AGG-CAG-ATC-TAC-3'
V $\beta$ 15	5'-CAG-GCA-CAG-GCT-AAA-TTC-TCC-CTG-3'
V $\beta$ 16	5'-GCC-TGC-AGA-ACT-GGA-GGA-TTC-TGG-3'
V $\beta$ 17	5'-CTG-CTG-AAT-TTC-CCA-AAG-AGG-GCC-3'
V $\beta$ 18	5'-TGC-CCC-AGA-ATC-TCT-CAG-CCT-CCA-3'
V $\beta$ 19	5'-TCC-TCT-CAC-TGT-GAC-ATC-GGC-CCA-3'
V $\beta$ 20	5'-TCT-CAA-TGC-CCC-AAG-AAC-GCA-CCC-3'
V $\beta$ 21	5'-TCC-AAC-CTG-CAA-GGC-TTG-ACG-ACT-3'
V $\beta$ 22	5'-AAG-TGA-TCT-TGC-GCT-GTG-TCC-CCA-3'
V $\beta$ 23	5'-GCA-GGG-TCC-AGG-TCA-GGA-CCC-CCA-3'
V $\beta$ 24	5'-CCC-AGT-TTG-GAA-AGC-CAG-TGA-CCC-3'

reverse primer:

CBK 5'-CCC-ACC-CGA-GGT-CGC-TGT-G-3'

reverse primer (fluoreszierend):

6-FAM (6-Carboxyfluorescein) 5'-CGG-GCT-GCT-CCT-TGA-GGG-GCT-GCG-3'

Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)

### 3 Patienten, Material und Methoden

---

#### 3.1.8 FACS- und MACS-Antikörper

anti-TCR V $\beta$ 1-FITC	Klon BL 37.2
anti-V $\beta$ 2-PE	Klon MPB2D5
anti-V $\beta$ 3-PE	Klon CH92
anti-V $\beta$ 5.1-FITC	Klon IMMU157
anti-V $\beta$ 5.2-FITC	Klon 36213
anti-V $\beta$ 5.3-PE	Klon 3D11
anti-V $\beta$ 6.7-FITC	Klon OT145
anti-V $\beta$ 7-PE	Klon ZOE
anti-V $\beta$ 8-FITC	Klon 56C5.2
anti-V $\beta$ 9-PE	Klon FIN9
anti-V $\beta$ 11-FITC	Klon C21
anti-V $\beta$ 12-PE	Klon VER 2.32.1
anti-V $\beta$ 13.1-PE	Klon IMMU222
anti-V $\beta$ 13.6-FITC	Klon JU74.3
anti-V $\beta$ 14-PE	Klon CAS1.1.3
anti-V $\beta$ 16-FITC	Klon TAMAYA1.2
anti-V $\beta$ 17-FITC	Klon E17.5F3.15.13
anti-V $\beta$ 18-PE	Klon BA62.6
anti-V $\beta$ 20-PE	Klon ELL1.4
anti-V $\beta$ 21.3-FITC	Klon IG125
anti-V $\beta$ 22-FITC	Klon IMMU546
anti-V $\beta$ 23-PE	Klon AF23

allesamt von Beckman Coulter-Diagnostik GmbH (Krefeld), vormals Immunotech

anti-CD3-PerCP	Klon SP34-2
anti-CD4-APC	Klon RPA-T4
anti-CD8-PerCP	Klon SK2
anti-IgG-FITC	Klon G18-145

IgG

von BD Pharmingen (Heidelberg)

anti-CD8 microbeads	Klon BW135/80
anti-CD4 microbeads	Klon M-T460

von Dynal (Oslo, Norwegen)

### 3 Patienten, Material und Methoden

---

#### 3.1.9 Kits

AmpliTaq	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
CentriSep Purification Kit	Princeton (Adelphia, NJ, USA)
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy	Qiagen (Hilden)
SuperScript II RNase H	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)

#### 3.1.10 Software zur Analyse

CellQuest 4.0.2	BD Pharmingen (Heidelberg)
Sequencing Analysis 3.4.1	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
EasyWin 32.0	Herolab (Wiesloch)
SPSS 12.0	SSPS (Chicago, Illinois, USA)
GeneScan 3.1.2	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)

### 3.2 Methoden

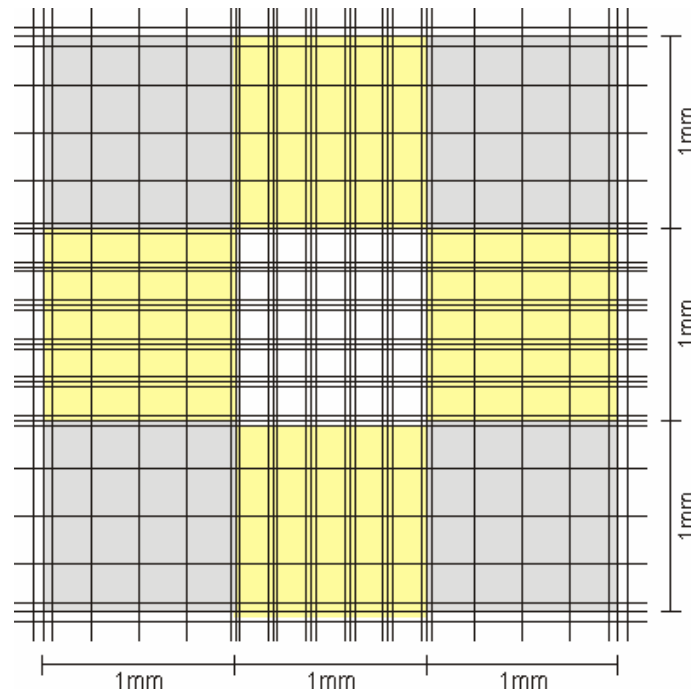
#### 3.2.1 Zellbiologische Methoden

##### 3.2.1.1 Gewinnung von mononukleären Zellen aus peripher-venösem Blut

Peripheres mit EDTA versetztes Blut wurde mit Phosphate Buffer Saline (= Phosphat gepufferte NaCl-Lösung, PBS) im Verhältnis 1:1 verdünnt und auf 10 ml sterilen Ficollpaque in 50 ml Röhrchen pipettiert. Ficoll® ist ein synthetisches Polysaccharid, welches während einer Zentrifugation zur Trennung mononukleärer Zellen (PBMCs, peripheral blood mononuclear cells ≈ T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten) von restlichen Leukozyten, Erythrozyten und von Serum führt. Aufgrund der geringeren Dichte im Vergleich zum Ficoll bzw. der höheren Dichte im Vergleich zum Serum sammeln sich die PBMCs in einer Trennschicht (Interphase).

Nach Zentrifugation für 35 min bei 300 g und maximaler Auslaufzeit (verhindert die Vermischung der zuvor getrennten Phasen) wurde der oberhalb des Ficollpaques befindliche Ring an PBMCs abgeschöpft, in ein neues 50 ml Greiner®-tube überführt und mehrmals in 4°C kaltem, sterilem PBS gewaschen. Aufgrund der Zytotoxizität des Ficoll wurde darauf geachtet, möglichst wenig Ficoll mit in das neue Röhrchen zu überführen. Die Zahl der isolierten PBMCs und ihre Viabilität wurde mikroskopisch in Neubauer-Zählkammern unter Verwendung von 4%igem Trypanblau bestimmt (Abb. 3.2).

### 3 Patienten, Material und Methoden



**Abbildung 3.2: Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer**

Die Neubauer-Zählkammer besteht aus neun großen Quadraten. Die Bestimmung der Leukozytenzahl erfolgt durch Auszählung von vier Großquadraten (dunkel) und anschließende Berechnung mit der unten angegebenen Formel.

Zunächst wurden hierzu die Zellen im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau versetzt (20  $\mu\text{l}$  + 20  $\mu\text{l}$ ). Durch Ansetzen der Pipettenspitze an der Kante zwischen Deckglas und Kammer wurde die Suspension angesaugt und die Neubauer-Zählkammer mit dieser Zellsuspension befüllt. Vier Großquadrate wurden anschließend ausgezählt und die Zellzahl PBMCs nach folgender Formel bestimmt:

- $\Sigma 4 \text{ Großquadrate} / 4 = \text{Mittelwert}_{\text{PBMC/Großquadrat}}$
- $\text{Mittelwert}_{\text{PBMC/Quadrat}} \times 2 \times 10 = \text{PBMCs} / \mu\text{l}$
- $\text{PBMCs} / \mu\text{l} \times 10^3 = \text{PBMCs} / \text{ml}$
- $\text{PBMCs} / \text{ml} \times \text{Volumen der Zellsuspension} = \text{Zellen PBMC}_{\text{gesamt}}$

Der Faktor 10 zur Berechnung der Zellkonzentration der Suspension ergibt sich aus dem Umstand, dass jedes der auszuzählenden Großquadrate eine  $1 \text{ mm}^2$  große Fläche und eine Tiefe von  $0,1 \text{ mm}$  aufweist. Ein Großquadrat besitzt somit ein Volumen von  $0,1 \text{ mm}^3 (= 0,1 \mu\text{l})$ , weswegen die Zellzahl anschließend durch  $0,1 \mu\text{l}$  dividiert bzw. mit dem Kehrwert 10 multipliziert wird. Aufgrund der Verdünnung mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 muss schließlich mit dem Korrekturfaktor 2 multipliziert werden. Die Gesamtzellzahl kann nun durch Multiplikation der Zellkonzentration mit dem Volumen der Zellsuspension errechnet werden.

### 3 Patienten, Material und Methoden

---

Durch die hier geschilderte Zellseparation konnte aus den gewonnenen Zellen je nach Verwendungszweck entweder eine Kultivierung der im peripher-venösen Blut expandierten T-Zellen für die in Abschnitt 3.2.1.2 beschriebene Einzelzellklonierung erfolgen oder aber eine Anreicherung von APCs zur Stimulation der T-Zellen ermöglicht werden.

#### 3.2.1.2 Einzelzellklonierung und *in vitro*-Expansion CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Durch Venenpunktion gewonnenes Blut von MG-Patienten wurde wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben behandelt und die PBMCs in Complete Thymus Medium (CTM) aufgenommen und gezählt. Anschließend wurden die Zellen mittels "limiting dilution culture" (Pette et al. 1990) soweit verdünnt, dass (bei einem Pipettiervolumen von 180 µl CTM) in jede Vertiefung (=well) einer 96-well-Rundboden-Mikrotiterplatte mathematisch jeweils 1 Zelle appliziert wurde. Nach Expansion dieser einzelnen Zelle (s.u.) kam es somit zum Vorliegen eines (T-Zell-)Klons.

Aufgrund der unbekanntes Antigen-Spezifität der expandierten T-Zellpopulation und zur Selektion aus den übrigen mononukleären Zellen mussten die T-Zellen durch Stimulation ihres CD28-Rezeptors unspezifisch zur Proliferation angeregt werden. Zu diesem Zweck wurde jedes well mit 300.000 APCs/ml versetzt. Als APCs dienten allogene PBMCs, die durch Ficoll aus dem Blut gesunder Probanden gewonnen wurden (siehe Abschnitt 3.2.1.1). Um eine Proliferation, nicht aber die Vitalität und damit die Fähigkeit der Antigenpräsentation der APCs zu verhindern, wurden diese vor Verwendung in der Zellkultur radioaktiv mit einer Dosis von 2700 gray bestrahlt (<sup>137</sup>Cs-Strahlenquelle). Zusätzlich zu den APCs wurden jedem well CD3/CD28-T-Zell-Expander beads in einer Konzentration von 0,5 x 10<sup>7</sup>/ml hinzugefügt. Diese CD3/CD28-T-Zell-Expander vermitteln ihre Stimulation über an mikroskopischen Kügelchen (beads) fixierten Ak gegen die CD3- und CD28-Rezeptoren der T-Zellen (Levine et al. 1997). Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Die kultivierten Lymphozyten wurden am darauf folgenden Tag und weiterhin alle 7 Tage via CD25-Rezeptor mit rekombinantem humanen Interleukin-2 (rhIL-2) in einer Konzentration von 25 IU/ml stimuliert. Nach 2 bis 3 Wochen wurden sichtbar wachsende Klone wie in Abschnitt 3.2.2.2 beschrieben durchflusszytometrisch hinsichtlich der Merkmale CD4- bzw. CD8-Rezeptor sowie TCR Vβ-Kette untersucht: Es wurden ausschließlich diejenigen CD4<sup>+</sup> T-Zellklone eines MG-Patienten isoliert und weiter analysiert, welche die jeweilige im peripher-venösen Blut expandierte TCR Vβ-Kette aufwiesen und deren Reinheit > 99% betrug. Diese wurden steril isoliert und wiederum für 2-3 Wochen mittels oben beschriebener Stimulation durch allogene APCs, CD3/CD28-beads und rhIL-2 expandiert.

### 3 Patienten, Material und Methoden

---

Die hier beschriebene Methode der Einzelzellklonierung ermöglichte die Isolation einer einzelnen peripher-venösen CD4<sup>+</sup> T-Zelle in der Zellkultur. Die anschließende Expansion mittels unspezifischer Stimulation gewährleistete die Erzeugung eines genügend großen identischen Zellvorrates für nachfolgende Untersuchungen.

#### 3.2.1.3 Kryo-Asservierung von T-Zellklonen und PBMCs

Zur Asservierung bei -140°C wurden die Zellen zentrifugiert (8 min, 300 g), in 800 µl CTM aufgenommen und bei Kühlung auf Eis in Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurden 800 µl steril filtrierte Einfrierlösung (20% DMSO, 80% FCS) langsam hinzu gegeben. Die Röhrchen wurden anschließend in speziellen Nalgene®-Einfrierboxen zunächst über Nacht bei -80°C eingefroren und am darauf folgenden Tag auf -140°C heruntergekühlt.

#### 3.2.2 Durchflusszytometrie (FACS)

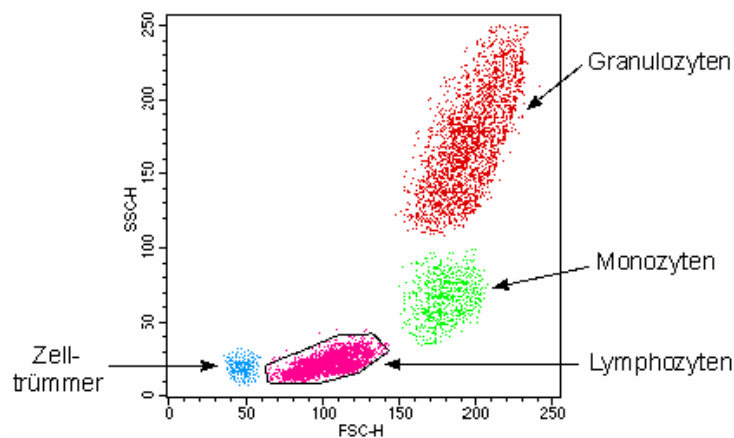
Im Vierfarben-Durchflusszytometer (FACS® = fluorescence activated cell sorting) werden Zellen anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und intrazellulären Zusammensetzung unterschieden. Die Messung im Durchflusszytometer basiert hierbei auf der Erfassung Fluoreszenz-Farbstoff- (Fluorochrom-)markierter Zellen durch einen Laserstrahl. Die in dieser Arbeit eingesetzten Fluorochrome waren PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein), APC (Allophycocyanin), PE (Phycoerythrin) und FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), die an Ak gekoppelt zur Bindung an spezifische (Oberflächen-)Moleküle (CDs, TCR Vβ-Regionen u.a) verwendet werden. Die markierten Zellen werden hierbei in einem laminaren Probenstrom einzeln am Laser vorbeigeleitet. Dabei wird zum einen Streulicht erzeugt, welches als Vorwärts- (Forwardscatter, FSC) bzw. Seitwärtsstreulicht (Sidewardscatter, SSC) Aussagen über Zellgröße und Granularität bzw. Dichte ermöglicht (Abb. 3.3). Zum anderen emittieren die durch den Laser angeregten Fluorochrome Licht einer spezifischen Wellenlänge. Der Einsatz mehrerer Fluorochrome unterschiedlicher Emissionsmaxima ermöglicht über die Zuordnung zu zellspezifischen monoklonalen Ak die gleichzeitige Bestimmung verschiedener Zell-Charakteristika.

In dieser Arbeit wurden sowohl die durch Venenpunktion gewonnenen PBMCs (*ex vivo*) von MG-Patienten als auch PBMCs gesunder Kontrollpersonen durchflusszytometrisch untersucht. Ziel dieser Untersuchung war die Analyse der T-Zell-Subpopulationen (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>) im Hinblick auf die Expression verschiedener TCR Vβ-Ketten.

### 3 Patienten, Material und Methoden

Nach der gleichen Methode wurden die *in vitro* gezüchteten T-Zellklone von MG-Patienten auf die T-Zell-Subpopulation und die exprimierte TCR V $\beta$ -Kette hin untersucht.

Für die Färbung und Charakterisierung der T-Zellklone wurden kommerziell erhältliche monoklonale Ak verwendet. Zur Untersuchung der TCR V $\beta$ -Ketten-Expression kamen 22 gegen die V $\beta$ -Kette gerichtete FACS-Ak zur Anwendung (siehe Abschnitt 3.1.8). Des Weiteren wurden Ak gegen CD3, CD4 und CD8 zur weiteren Differenzierung der T-Zell-Subpopulation eingesetzt. Zur Überprüfung von unspezifischer Bindung wurden anti-IgG-FITC und IgG als Isotyp-Kontrollen gegen peripher-venöse Blut-Lymphozyten verwendet.



**Abbildung 3.3: Zellen einer Vollblutprobe im FSC/SSC-Dotplot**

Werden Zellen einer Vollblutprobe in einem FSC/SSC-Dotplot nach ihrer Größe und ihrer Granularität aufgetrennt, lassen sich drei verschiedene Zellpopulationen deutlich voneinander abgrenzen: Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Zelltrümmer erscheinen als eine kleine, diffuse Population am linken unteren Bildrand. Um die Lymphozyten-Population ist zur weiteren Untersuchung ein „Gatter“ (Gate) gelegt worden.

#### 3.2.2.1 Färbung von peripherem Blut und FACS-Analyse

EDTA-versetztes peripher-venöses Blut wurde gemäß publizierter Methoden (Muraro et al. 2000) wie folgt bearbeitet: Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS vermischt und jeweils 200  $\mu$ l pro well auf eine 96-well-Rundboden-Mikrotiterplatte verteilt. Anschließend wurde die Platte für 5 min bei 300 g und 20°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Platte auf Zellstoff getrocknet. Danach wurden die im Rundboden verbliebenen Blutzellen mit 5  $\mu$ l einer Mischung aus monoklonalen Ak versetzt, sorgfältig mit einer Mehrkanalpipette resuspendiert und im Folgenden für 30 min bei 4°C und Dunkelheit inkubiert. Das Mischungsverhältnis der FACS-Ak war abhängig vom fluoreszierenden Farbstoff des Ak und betrug: PerCP:APC:PE:FITC = 1:1:2:2. Sodann wurden die unter den Zellen noch enthaltenen Erythrozyten zweimal mit 200  $\mu$ l Ammoniumchloridlösung (PharMingen Lyse: Aqua dest. 1:10) lysiert, 10 min

### 3 Patienten, Material und Methoden

---

bei Raumtemperatur inkubiert und im Folgenden für 4 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die wells wurden mit einer Waschlösung (4°C kaltes PBS mit 2,5% Fetal Calf Serum [FCS]) einmal gewaschen und erneut für 4 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Schließlich wurden die nun gefärbten Zellen in 200 µl CellWash®-Lösung aufgenommen, in 5 ml Falcon-Röhrchen überführt und am Durchflusszytometer (FACSCalibur®) mittels CellQuest®-Software gemessen. Weiße Blutzellen wurden am Zytometer durch die charakteristische Verteilung der Werte für SSC/FSC (Granularität/Zellgröße) identifiziert und entsprechend der Verwendung der monoklonalen Ak weiter spezifiziert. Aus statistischen Gründen bedarf es hierbei einer Mindestmenge von ca. 5000 Lymphozyten pro Messung (Cepok et al. 2001).

#### 3.2.2.2 Färbung von *in vitro* expandierten T-Zellklonen und FACS-Analyse

Mindestens 25.000 Zellen eines T-Zell-Klons (ca. 30 µl pro well aus der Einzelzellklonierung) wurden pro Färbung auf 96-well-Rundboden-Mikrotiterplatten verteilt und zentrifugiert (300 g, 4 min). Der Überstand wurde sodann verworfen und die übrigen Zellen gemäß oben beschriebenem Protokoll mit einer Mischung aus monoklonalen Ak versetzt, sorgfältig resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen und Aufnahme der Zellen in Falcon-Röhrchen erfolgte die Messung am Durchflusszytometer (FACSCalibur).

#### 3.2.3 Magnetic activated cell sorting (MACS)

Für die molekularbiologischen Untersuchungen der *ex vivo* expandierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus den zuvor frisch gewonnenen mononukleären Zellen die CD4<sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup> T-Zell-Populationen mittels eines MACS®-Systems isoliert.

Hierzu wurden die Lymphozyten zunächst mit magnetischen Microbead-markierten Ak gegen CD4 und CD8 markiert. Dabei wurden 10<sup>7</sup> Zellen in 80 µl PBS mit 20 µl der anti-CD4-/anti-CD8-microbead-Lösung versetzt und anschließend für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Proben in 500 µl MACS-Medium (PBS, 2 mM EDTA, 0,5% FCS) aufgenommen und langsam in eine eisgekühlte MACS-Säule innerhalb eines Depletionssystems überführt. Aus der Säule konnten nun die nicht-markierten Zellen eluiert werden, während die anti-CD4- bzw. anti-CD8-Ak-markierten T-Lymphozyten durch das eingebaute Magnetfeld in der MACS-Säule verblieben. Schließlich konnten die gewünschten T-Lymphozyten herausgespült werden. Diese eluierten Zellen wurden ausgezählt und der Grad der Reinheit für die jeweilige T-Zellsubpopulation in der anschließenden FACS-Untersuchung bestimmt.

### 3 Patienten, Material und Methoden

---

#### 3.2.4 Molekularbiologische Methoden

##### 3.2.4.1 RNA-Isolation und Reverse Transkription

RNA wurde aus *in vitro* expandierten T-Zellklonen sowie aus *ex vivo* isolierten bzw. geMACSten T-Zellen extrahiert, wobei mindestens 250.000 Zellen eingesetzt wurden. Zur Extraktion wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet, welches mittels spezieller Säulen die selektive Anreicherung von mRNA bei Ausschluß kleinerer RNA-Moleküle wie rRNA und tRNA ermöglicht. Dazu wurden die Proben ( $0,5 - 1 \times 10^7$  Zellen pro Probe) zunächst für 5 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden jeweils 350 µl RLT-Puffer und 70%iger Ethanol hinzugegeben, die Proben sorgfältig resuspendiert, auf Säulen aufgetragen und für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die im Filter gebundene mRNA anschließend zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen, wobei für 1 min bzw. 2 min bei 10.000 g zentrifugiert wurde. Durch Auftragen von zweimal je 50 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugation für jeweils eine Minute bei 10.000 g wurde die mRNA in ein Eppendorf®-tube eluiert. Die isolierte mRNA wurde für 2 Monate bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren oder durch anschließende Reverse Transkription den Herstellerangaben entsprechend in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierzu wurde die gesamte mRNA (25 µl) mit 2,5 µl Oligo(dT)- bzw. Zufallsprimern (pdN<sub>6</sub>, 3 µM), wovon erstere spezifisch an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden, für 10 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  denaturiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen, und anschließend 1 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 2,5 µl 25 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 µl 5x first strand buffer, 5 µl 0.1 mM DTT und 1,75 µl reverser Transkriptase (Superscript RT II®, 200 U/µl) wurde die RNA im PTC 100 Thermal Cycler® in cDNA umgeschrieben ( $25^{\circ}\text{C}$  für 10 min,  $42^{\circ}\text{C}$  für 90 min,  $70^{\circ}\text{C}$  für 15 min).

##### 3.2.4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Um mittels PCR (Mullis et al. 1986) die verschiedenen Gen-Loci der TCR V $\beta$ -Kette zu amplifizieren, erfolgte der Einsatz TCR V $\beta$ -spezifischer Forward-Primer (Genevee et al. 1992). Dabei bestimmte die im Anschluß an die PCR folgende Untersuchung die Anwendung eines Fluoreszenz-markierten (CDR3-Spectratyping, s.u.) bzw. unmarkierten Reverse-Primers (CDR3-Sequenzierung, s.u.). Der Ablauf des PCR-Programms lautete:

### 3 Patienten, Material und Methoden

<b>95°C</b>	5 min	1 x
<b>95°C</b>	40 sek	38 x
<b>58°C</b>	40 sek	
<b>72°C</b>	40 sek	
<b>72°C</b>	10 min	1 x
<b>4°C</b>	∞	

Im Falle einer anschließenden Sequenzierung wurde das PCR-Produkt mittels eines kommerziell erhältlichen Kits aufgereinigt (QiaQuick®). Dabei wurden 20 µl cDNA und 100 µl PB-Puffer auf die Säule pipettiert und anschließend zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und weitere 750 µl PE-Puffer auf die Säule pipettiert. Zwei weitere Male wurde zentrifugiert und jeweils das Eluat verworfen. Schließlich wurden 30 µl EB-Puffer auf die Säule pipettiert, diese für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals zentrifugiert. Das Eluat enthielt die nun aufgereinigte und konzentrierte cDNA. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 10.000 g für 1 min durchgeführt.

Diese cDNA wurde nun in einem weiteren Schritt nochmals mit fluoreszierenden ddNTPs amplifiziert (Cycle-Sequencing): hierbei wurden 5 µl des PCR-Produktes mit 6 µl des BigDye®-Mixes (enthält u.a. Polymerase und ddNTPs), 2 µl Forward-Primer (2 µM) und 7 µl de-ionisiertem Wasser in einem PCR-tube kombiniert und dieses erneut auf dem Thermal Cycler nach folgendem Programm amplifiziert:

<b>95°C</b>	1 min	1x
<b>96°C</b>	10 sek	25x
<b>55°C</b>	5 sek	
<b>60°C</b>	4 min	
<b>4°C</b>	∞	

Mit dem kommerziell erhältlichen CentriSep® wurde das nun amplifizierte PCR-Produkt aufgereinigt. Bei dieser Methode werden die überschüssigen ddNTPs durch ein spezielles Gel innerhalb eines tubes adsorbiert und vom Reaktionsmix entfernt, um eine fehlerfreie nachfolgende Sequenzierung zu ermöglichen.

### 3 Patienten, Material und Methoden

---

#### 3.2.4.3 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Auftrennung der Amplifikate wurde aus Trockenagarose ein 2%iges Agarosegel hergestellt, indem die Agarose mit de-ionisiertem Wasser in der Mikrowelle erhitzt und nach Abkühlung mit einem interkalierendem DNA-Farbstoff (10.000x SYBR-Gold®) gemischt wurde. Als Längenstandard wurde eine 100 bp-Leiter verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen in 10-fach konzentriertem Laufpuffer (BlueJuice) aufgenommen und entsprechend verdünnt. Nach einer Laufzeit von 1 h bei 80-140 Volt wurde das Gel unter UV-Licht photographiert (Transilluminator).

#### 3.2.4.4 HLA (Human leukocyte antigen)-Analyse

Die HLA-Bestimmung der MG-Patienten erfolgte im HLA-Labor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. A. Neubauer).

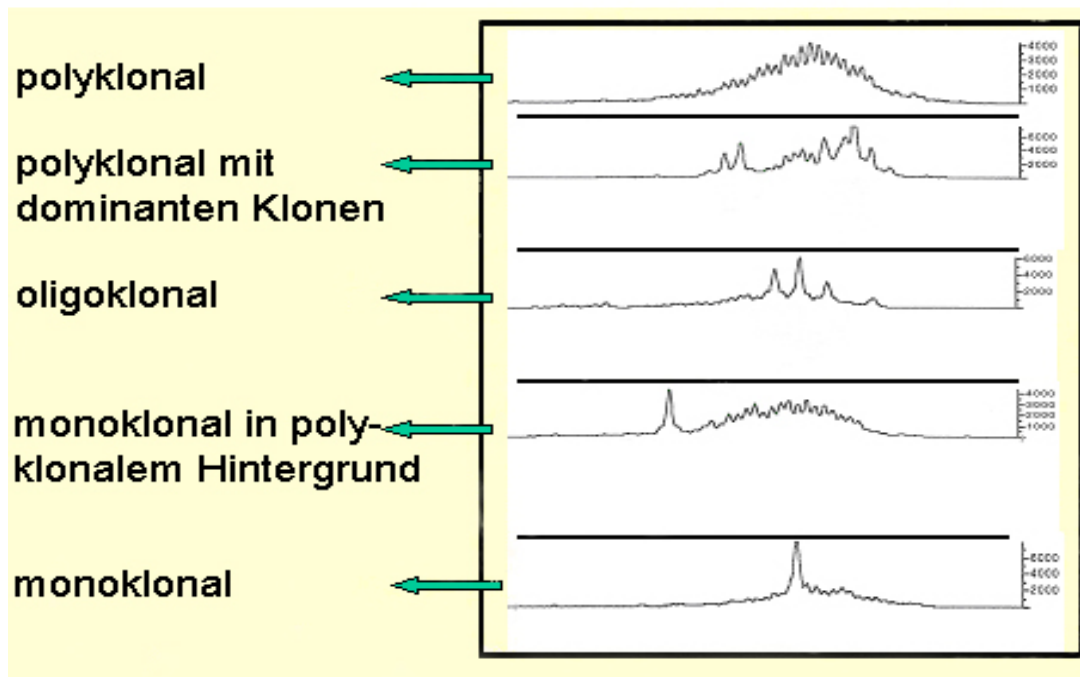
#### 3.2.4.5 CDR3 (Complementary determining region 3)-Spectratyping

Die Methode des CDR3-Spectratyping beruht auf dem natürlichen Längenpolymorphismus der dritten hypervariablen Region (CDR3) des TCR, welche für die spezifische Antigenerkennung am bedeutendsten ist (Danska et al. 1990; Garcia et al. 1996). Ein physiologisches TCR-Repertoire enthält innerhalb einer V $\beta$ -Familie aufgrund unterschiedlicher CDR3-Längen heterogene TCR, wobei die CDR3-Längen nach dem Gauß-Prinzip verteilt sind. Klonal expandierte Lymphozyten weisen dagegen aufgrund der identischen D-Region mitsamt zufällig eingeschobener Nukleotide eine identische CDR3-Länge auf. Das vermehrte Auftreten einer identischen CDR3-Länge zeigt sich in der bildlichen Darstellung des Spectratyping als „peak“ (mathematisch gesehen ein „Ausreißer“) und weist auf einen für das Merkmal CDR3 expandierten Lymphozyten-Klon hin. Somit ermöglicht das CDR3-Spectratyping, im Blut expandierte T-Zellpopulationen mit unbekannter TCR-Sequenz und Antigenpezifität nachzuweisen, die stark verdächtig auf einen klonalen Ursprung sind (Abb. 3.4). Darüberhinaus wurden die CDR3-Längen der *ex vivo* expandierten Zellen mit den CDR3-Längen der *in vitro* T-Zellklone aus der Langzeit-Zellkultur auf Übereinstimmung verglichen. Identische CDR3-Längen bedeuteten in diesem Fall die erfolgreiche Isolierung im Blut expandierter T-Zellen und ermöglichten die Klonalitätsprüfung mittels CDR3 DNA-Sequenzierung der *in vitro* T-Zellklone.

CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen mit einer Reinheit von > 99% wurden der RNA-Extraktion und Reversen Transkription unterzogen. Anschließend erfolgte die PCR mit einem der oben genannten V $\beta$ -spezifischen Forward- und einem an der C-

### 3 Patienten, Material und Methoden

Region bindenden Fluoreszenz-markiertem Reverse-Primer (6-FAM = 6-Carboxyfluorescein). Die hierbei generierten Fluoreszenzfarbstoff-markierten PCR-Fragmente konnten nun einer Längenfragmentanalyse unterzogen werden. Um die Länge der DNA-Fragmente unabhängig von der Position innerhalb des Gels bzw. unabhängig von Variationen des Laufverhaltens von Spur zu Spur bestimmen zu können, wurde in jede einzelne Spur ein kommerziell erhältlicher interner Längenstandard mit aufgetragen, der mit dem Farbstoff ROX 500 (= 6-Carboxyrhodamin X) markiert war und sich so farblich von den zu analysierenden Fragmenten unterschied.



**Abbildung 3.4: Beispiele für TCR CDR3-Spectratyping**

Gezeigt sind fünf Beispiele für die CDR3-Längenanalyse. Die graphische Darstellung (Abszisse: Basenpaarlänge, Ordinate: relative Leuchtintensität) präsentiert sich im Falle einer polyklonalen T-Zellpopulation normalverteilt (oberstes Schema). Monoklonale Populationen stellen sich aufgrund identischer Fragmentlängen als „peak“ dar (unterstes Schema).

(modifiziert nach: <http://www.med.upenn.edu/bmcrc/MDGF/data.shtml?MDGF>)

Vor dem Auftragen des PCR-Aliquots auf einem 2%igen Agarose-Gel (TBE-Puffer 1x, Agarose, SYBR-Gold) wurde das PCR-Produkt mit Hi-Di (Formamid) versetzt und für 2 min bei 95°C denaturiert, um evtl. DNA-Sekundärstrukturen aufzulösen und eine korrekte Längenanalyse zu ermöglichen. Die bekannten Fragmentlängen des Standards dienten dabei der Erzeugung einer Kalibrierungskurve. Mit Hilfe dieser Kurven wurden durch Extrapolation die Längen unbekannter PCR-Produkte im Bereich von 40-1000 Basen bis auf eine Base genau bestimmt. Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale erfolgte mit Hilfe des ABI Prism 310 Genetic Analyser®

### 3 Patienten, Material und Methoden

---

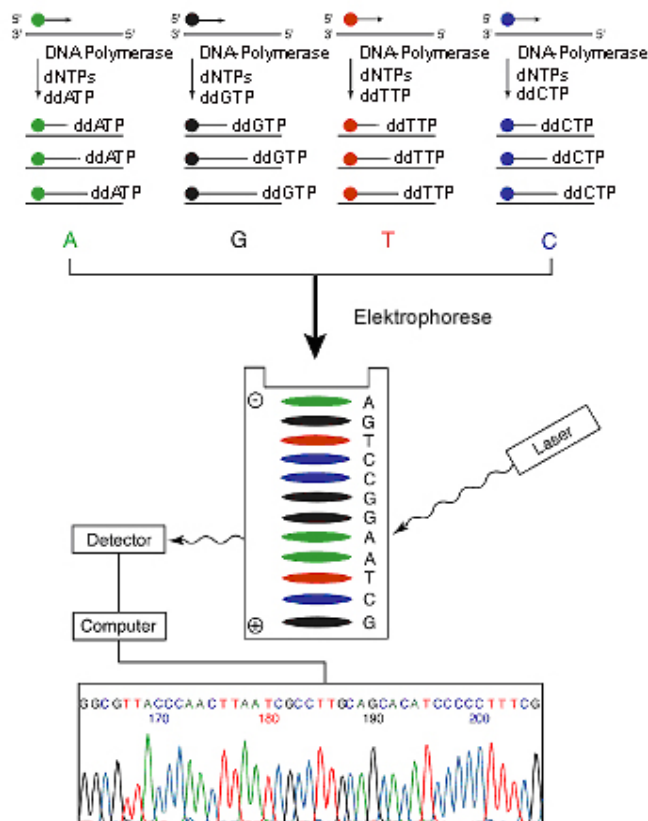
(GeneScan®). Die Genauigkeit der Längenbestimmung liegt dabei laut Herstellerangaben bei über 95%.

#### 3.2.4.6 CDR3-Sequenzierung und Klonalitätsnachweis

Die moderne Weiterentwicklung der Sequenzreaktion nach Sanger (Sanger et al. 1977) ermöglicht die rasche Information über DNA-Basenabfolgen zu untersuchender PCR-Transkripte. Im vorliegenden Fall führt der Einsatz TCR V $\beta$ -spezifischer Primer zur Verlängerung einer der beiden komplementären DNA-Stränge. Im anschließenden Cycle-Sequencing, bei dem durch den Einsatz nur *eines* Primers eine lineare Amplifikation erzeugt wird, wird in vier Ansätzen je eine der vier Basen als Didesoxynukleotid (ddNTP = ddATP, ddGTP, ddTTP sowie ddCTP) zusammen mit dNTPs im Gemisch zugegeben. Werden diese ddNTPs in die neu synthetisierte DNA eingebaut, kann die DNA-Polymerase aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe dieser „Kettenabbruch-Nukleotide“ keine weitere Verlängerung der DNA durchführen – es kommt zum Syntheseabbruch. Das jeweilige ddNTP innerhalb eines Ansatzes wird dabei an zufälliger Position eingebaut, so dass Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen. In diesem Ansatz sind die vier ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass jeder Base ein bestimmter Farbstoff zugeordnet wird. Somit ist jedes neu synthetisierte DNA-Molekül am 3'-Ende mit einem Farbstoff markiert, welcher eine der vier Basen repräsentiert. Beim hier eingesetzten ABI Prism 310 Genetic Analyser® wurden die in der Sequenzreaktion entstehenden Kettenabbruchprodukte durch eine Kapillar-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Die ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes emittierten dadurch Licht unterschiedlicher Farbe und konnten so von einem Detektor erkannt werden. Die Abfolge der Farbsignale, die am Detektor erschienen, lieferte so direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges (Abb. 3.5).

Nach Darstellung des PCR-Aliquots in der Agarosegel-Elektrophorese (siehe 3.2.4.3) wurden die PCR-Produkte (mit Formamid im Verhältnis 1:3 versetzt) den Herstellerangaben entsprechend auf dem ABI Prism 310 Genetic Analyser® sequenziert und die Nukleotid-Sequenzen unter Verwendung von Chromas 2.22®-Software bzw. durch das ExPasy-Translationsprogramm (<http://www.expasy.com>) in die entsprechenden Aminosäuresequenzen übersetzt. Gemäß der Lefranc-Nomenklatur des menschlichen TCR V $\beta$ -Locus erfolgte die Analyse der Gen-Loci unter besonderer Berücksichtigung der CDR3 (<http://imgt.cnusc.fr>).

### 3 Patienten, Material und Methoden



**Abbildung 3.5: Automatische Sequenzierung:**  
**Ein Computerprogramm übersetzt Farbausschläge in die DNA-Sequenz**

Die vier Fluoreszenz-markierten ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP) induzieren während der Amplifikation PCR-Kettenabbrüche unterschiedlichster Länge. Die Amplifikate werden der Größe nach in einer Gel-Kapillare aufgetrennt und der jeweilige Farbstoff eines ddNTPs von einem Laserstrahl erfasst. Die DNA-Sequenz kann so automatisch von links nach rechts gelesen werden. (modifiziert nach: [http://genome4.cpmc.columbia.edu/dna\\_chem.html](http://genome4.cpmc.columbia.edu/dna_chem.html))

#### 3.2.5 Biostatistische Methoden

Zur Überprüfung signifikanter Unterschiede zwischen MG-Patienten und gesunden Kontrollen wurde der  $\chi^2$ -Test durchgeführt. Mittels eines zweiseitigen Mann-Whitney-Tests und des Spearman's Rank Korrelations-Koeffizienten wurde auf Effekte durch potentielle Störgrößen wie Alter der Patienten und Kontrollen zum Zeitpunkt der Gewinnung von Blutproben, Krankheitsdauer, Geschlecht, immunsuppressive medikamentöse Behandlung, Thymektomie sowie klinische MG-Unterformen überprüft. Bei sämtlichen statistischen Vergleichen wurden zweiseitige Tests auf einem 5%igen Signifikanz-Niveau durchgeführt. Angepasst auf die Testungen von 22 Hypothesen betrug die konservative Bonferoni-Korrektur  $0,05/22 = 0,0023$ . Daher wurde im Folgenden  $p < 0,0023$  als statistisch signifikant angenommen. Für sämtliche statistische Auswertungen wurde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 12.0®-Software benutzt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klinische und therapeutische Charakteristika der MG-Patienten

Tabelle 4.1 fasst die klinischen und therapeutischen Charakteristika der 118 in dieser Studie untersuchten Patienten mit generalisierter, AChR-Ak positiver MG zusammen. Die Patienten wurden den drei MG-Subgruppen zugeordnet (EOMG, LOMG, TOMG, siehe Abschnitt 2.2.1), wobei für jede dieser Gruppen Geschlecht, Manifestationsalter der Erkrankung, Krankheitsdauer sowie ggf. immunsuppressive Therapie oder Thymektomie angegeben wurde. Außerdem wurde das Auftreten myasthener Krisen sowie zusätzlicher begleitender Autoimmunerkrankungen dokumentiert. Auffällig war in diesem Zusammenhang der hohe Anteil weiblicher Patienten (89%) in der EAMG-Gruppe. Auch andere begleitende Autoimmunerkrankungen wie z.B. Systemischer Lupus erythematodes, Polymyositis oder Rheumatoide Arthritis traten innerhalb dieser Gruppe häufiger auf als bei LOMG- oder TOMG-Patienten. In einem Viertel der Fälle und damit häufiger als in den übrigen Subgruppen war in der Krankengeschichte nicht selten als Erstmanifestation der Erkrankung eine Myasthene Krise aufgetreten.

	<i>EOMG<sup>a</sup></i>	<i>LOMG<sup>b</sup></i>	<i>TOMG<sup>c</sup></i>	<i>gesamt</i>
<b>n</b>	53	47	18	118
<b>weiblich<sup>d</sup></b>	47 (89%)	22 (47%)	11 (61%)	80 (68%)
<b>Manifestationsalter</b> (Mittelwert und Altersspanne in Jahren)	29,9 (14 - 46)	63,2 (51 - 85)	38,3 (16 - 58)	44,4 (14 - 85)
<b>Krankheitsdauer</b> (Mittelwert und Altersspanne in Jahren)	17,0 (1 - 49)	5,0 (1 - 22)	7,7 (1 - 31)	10,8 (1 - 49)
<b>Glukokortikoide</b>	11 (21%)	22 (47%)	7 (39%)	40 (34%)
<b>aza<sup>e</sup> oder mmf<sup>f</sup></b>	32 (60%)	38 (81%)	17 (94%)	87 (74%)
<b>Thymektomie</b>	36 (68%)	11 (23%)	18 (100%)	65 (55%)
<b>myasthene Krise</b>	13 (25%)	5 (11%)	3 (17%)	21 (18%)
<b>assozierte AIK<sup>j</sup></b>	21 <sup>g</sup> (40%)	10 <sup>h</sup> (21%)	1 <sup>i</sup> (6%)	32 (27%)

**Tabelle 4.1: Klinische und therapeutische Charakteristika der 118 MG-Patienten**

<sup>a</sup>Krankheitsbeginn bis zum 45. Lebensjahr ohne Thymom; <sup>b</sup>Krankheitsbeginn ab dem 45. Lebensjahr ohne Thymom; <sup>c</sup>Thymom-assoziierte MG, unabhängig vom Lebensalter; <sup>d</sup>Anzahl absolut und in %; <sup>e</sup>aza – Azathioprin; <sup>f</sup>mmf – Mycophenolat Mofetil; <sup>g</sup>autoimmune Schilddrüsenerkrankungen (n=9), Rheumatoide Arthritis (n=5), Asthma bronchiale (n=2), Systemischer Lupus Erythematodes (n=2), Polymyositis (n=1), Perniziöse Anämie (n=1), Ankylosierende Spondylitis (n=1); <sup>h</sup>autoimmune Schilddrüsenerkrankungen (n=6), Rheumatoide Arthritis (n=2), Idiopathische thrombozytopenische Purpura (n=1), Sklerodermie (n=1); <sup>i</sup>Asthma bronchiale, <sup>j</sup>Autoimmunerkrankungen.

## 4 Ergebnisse

---

Die meisten MG-Patienten wurden zum Zeitpunkt der Untersuchung immunsuppressiv therapiert (Glukokortikoide bzw. Azathioprin und Mycophenolat Mofetil), wobei der Großteil dieser Patienten auf die Subgruppen LOMG (47% bzw. 81%) und TOMG (39% bzw. 94%) entfiel.

Sämtliche Patienten aus der Subgruppe der TOMG sowie die Mehrheit der EOMG-Patienten (68%) waren im Krankheitsverlauf thymektomiert worden. Bei der LOMG kam diese Therapie nur bei einem deutlich kleineren Patientenkollektiv zur Anwendung (23%).

Als Kontrollen dienten 118 gesunde Personen, die in Bezug auf das Alter ( $54,9 \pm 15,8$  Jahre, im Bereich 19 bis 88 Jahre), das Geschlecht (68% weiblich) und ethnische Herkunft vergleichbar mit den MG-Patienten waren. Dieses Kollektiv wurde durchflusszytometrisch auf die Expression der 22 TCR V $\beta$ -Ketten hin untersucht, welches ein Bild der physiologischen TCR V $\beta$ -Ketten-Verteilung erbrachte (siehe Tabelle 4.2). Die hierbei gemessenen Ergebnisse der TCR V $\beta$ -Ketten-Verteilung bei den Kontrollen stimmten mit vormals publizierten Daten überein (Muraro et al. 2000; Epperson et al. 2001; Jacobsen et al. 2002).

### 4.2 TCR V $\beta$ -Ketten-Expansionen im Blut von MG-Patienten

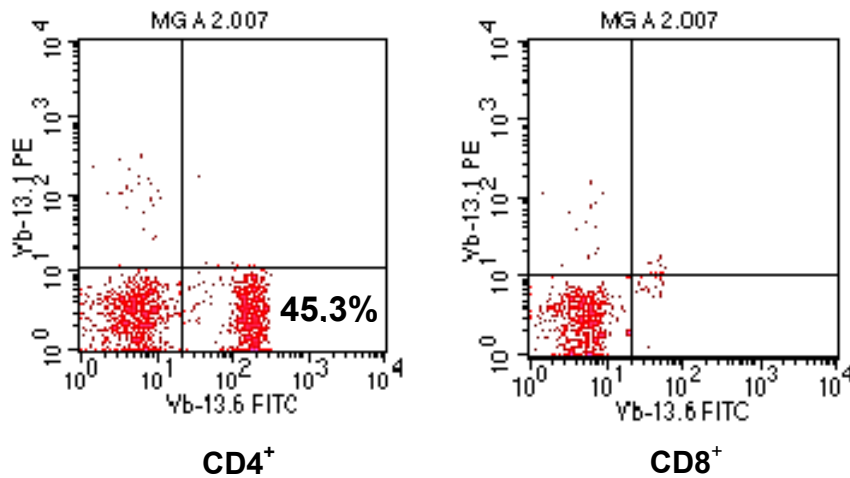
Abbildung 4.1 zeigt beispielhaft die Ergebnisse der Durchflusszytometrie (FACS) eines besonders eindrücklichen Patienten (Patient MG-A2). Bei diesem 74-jährigen Patienten (mit LOMG) zeigten die durchflusszytometrischen Untersuchungen der TCR V $\beta$ -Ketten, dass 45,3% seiner CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut zum Zeitpunkt der Blutentnahme die TCR V $\beta$ -Kette 13.6 exprimierten. In der vergleichenden Messung am gesunden Kontrollkollektiv lag der Mittelwert für die Expression der V $\beta$ -Kette 13.6 bei 2,0% ( $\pm 0,9\%$  Standardabweichung, SD). Somit lag die TCR V $\beta$ 13.6<sup>+</sup>-Expression dieses Patienten um mehr als 48 SD über dem Mittelwert der Kontrollen, die in Alter und Geschlecht mit den MG-Patienten übereinstimmten. Um das Ausmaß der einzelnen Expansionen bei den MG-Patienten besser quantifizieren zu können, wurden im weiteren Verlauf der Untersuchungen Expansionen mit  $\geq 2$  SD über dem Mittelwert als „moderat“, mit  $\geq 5$  SD über dem Mittelwert als „stark“ und mit  $\geq 8$  SD über dem Mittelwert als „exzessiv“ definiert.

Die Abbildungen 4.2 A und B stellen die Ergebnisse dieser Messungen an sämtlichen 118 MG-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen graphisch dar. Anzahl und Ausmaß der Expansionen (als SD des Mittelwertes) sind bei beiden Kollektiven jeweils für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt. Summiert man alle gemessenen Expansionen bei den

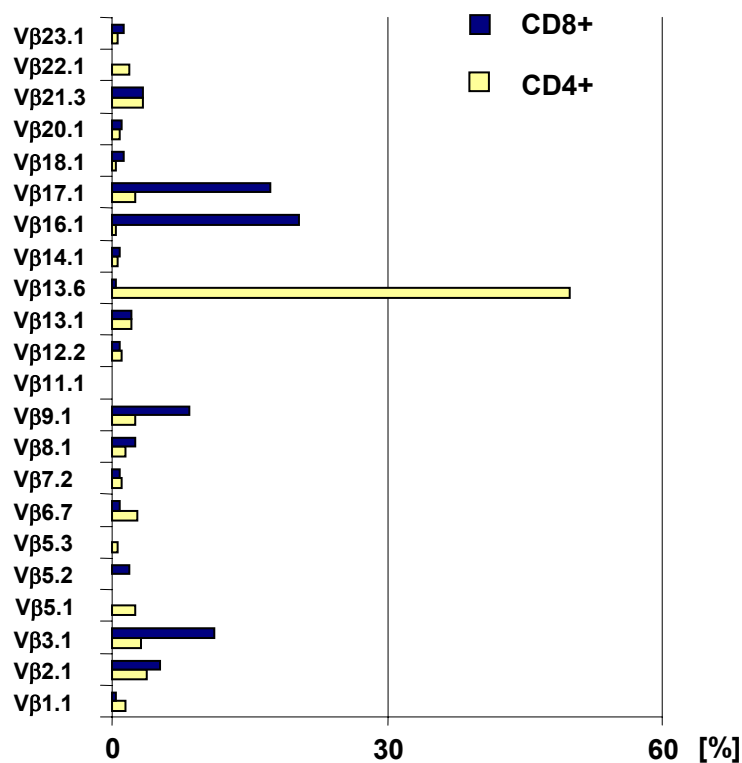
## 4 Ergebnisse

MG-Patienten, konnten unter den CD4<sup>+</sup> T-Zellen insgesamt 139 Expansionen > 2 SD sowie unter den CD8<sup>+</sup> T-Zellen insgesamt 156 Expansionen > 2 SD gemessen werden.

**A**



**B**



**Abbildung 4.1: FACS-Analyse einer Vβ-spezifischen T-Zell-Expansion ex vivo**

Die Abbildungen zeigen die Daten eines 74-jährigen LOMG-Patienten (MG-A2), bei dem 45,3% aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen die TCR Vβ-Kette 13.6 trugen. Man beachte die deutliche Überexpression der TCR Vβ13.6-Kette (x-Achse, Abb. A, links) im Vergleich zur normalen TCR Vβ13.1-Expression (y-Achse, Abb. A, links) sowie die normale Expression beider Ketten innerhalb der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. A, rechts). Abbildung B zeigt das Ausmaß der Verteilung aller TCR Vβ-Ketten unter allen T-Zellen im peripher-venösen Blut des Patienten, getestet mit allen 22 Vβ-Ak.

## 4 Ergebnisse

---

Innerhalb der gesunden Kontrollen ließen sich zwar ebenfalls 46 Expansionen unter den CD4<sup>+</sup> und 75 Expansionen unter den CD8<sup>+</sup> T-Zellen feststellen - im entscheidenden Gegensatz zu den MG-Patienten befanden sich diese jedoch in keinem Fall im exzessiven Bereich ( $p < 0,001$ ). Bei 61 MG-Patienten ließen sich unter den CD4<sup>+</sup> T-Zellen insgesamt 125 moderate oder starke Expansionen nachweisen, im Gegensatz dazu fanden sich bei 41 gesunden Kontrollen lediglich 46 solcher Expansionen ( $p < 0,001$ ). Auffällig zeigten sich die 14 exzessiven CD4<sup>+</sup> Expansionen, die bei gesunden Kontrollen in keinem Fall nachgewiesen werden konnten ( $p < 0,001$ ).

Innerhalb der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulation konnten bei 63 MG-Patienten insgesamt 126 moderate oder starke Expansionen festgestellt werden, bei 74 gesunden Kontrollen dagegen nur 75 Expansionen ( $p < 0,001$ ). Auch innerhalb der CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnten lediglich bei den 24 MG-Patienten exzessive Expansionen nachgewiesen werden, jedoch bei keiner der 118 gesunden Kontrollen.

Das Expansions-Verhältnis von MG-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen betrug bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen 3:1 und war somit größer als bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wo sich ein Verhältnis von 2:1 zeigte.

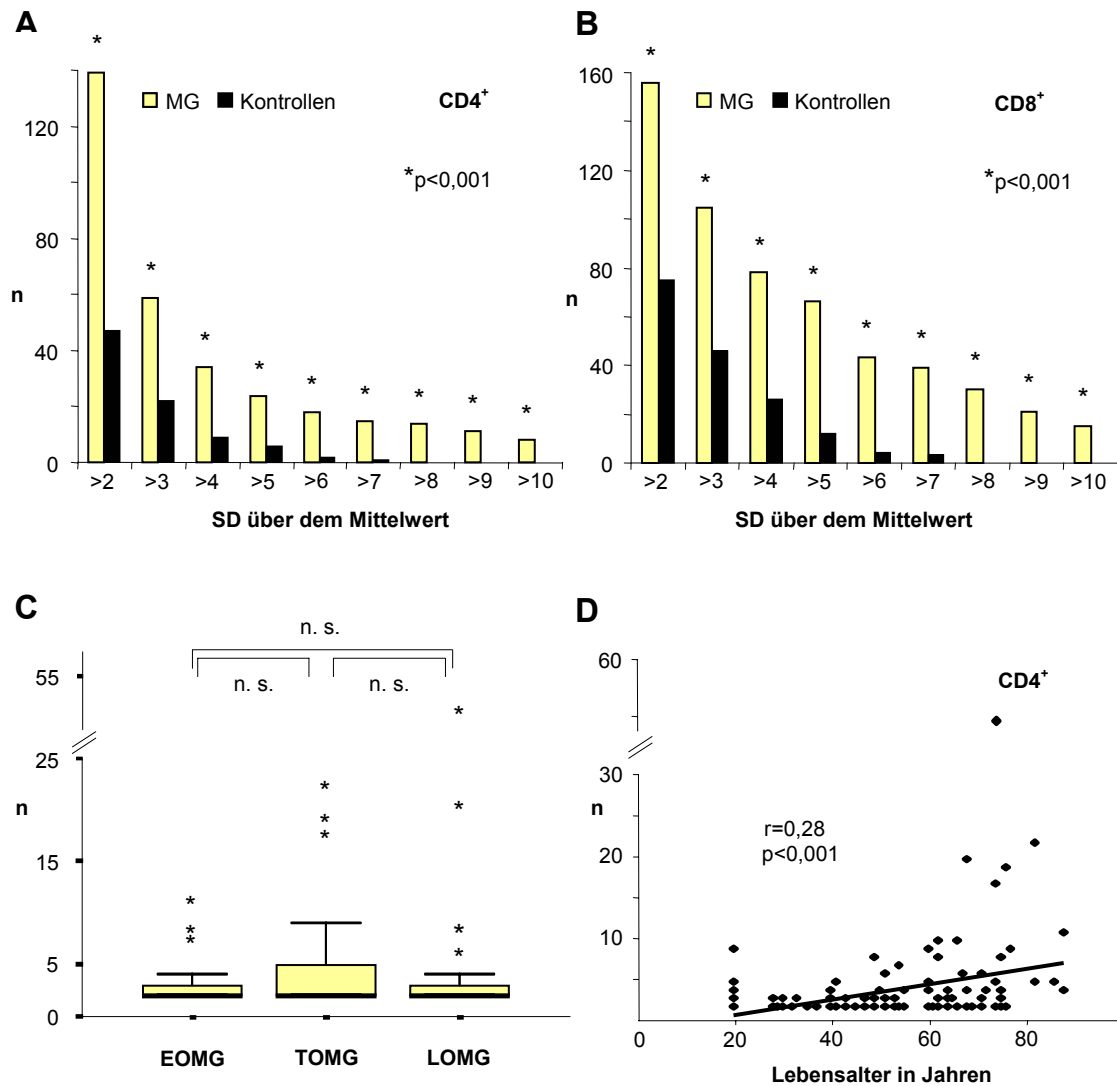
In Abbildung 4.2 C ist die Anzahl der Expansionen spezifisch für jede der MG-Subgruppen EOMG, LOMG und TOMG aufgeführt. Dargestellt sind der Mittelwert (schwarzer Balken), die dazugehörigen Standardabweichungen (oberster waagerechter Strich), 25. und 75. Perzentile (Kästchen-Begrenzungen) sowie Ausreißerwerte (Sternchen). Für keine MG-Unterform konnte (isoliert betrachtet) eine statistisch signifikante Korrelation zum Ausmaß der Expansionen festgestellt werden.

Die TCR V $\beta$ -Ketten-Expansion zeigte bei den MG-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen eine leichte Korrelation mit dem Lebensalter ( $r = 0,28$ ,  $r^2 = 0,08$ ;  $p < 0,001$ ). Abbildung 4.2 D illustriert diesen Zusammenhang für die CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei MG-Patienten.

Tabelle 4.2 zeigt die Überexpression der TCR V $\beta$ -Ketten CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei den MG-Patienten als Standardabweichung über dem Mittelwert gesunder Kontrollen. Es wurden diejenigen 21 MG-Patienten aufgeführt, die in der Durchflusszytometrie starke und exzessive Expansionen aufwiesen ( $\geq 5$  SD über dem Mittelwert). Als Referenz zeigt die Tabelle die physiologische Expression (in %) von 22 TCR V $\beta$ -Ketten innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen, die an den 118 gesunden Kontrollpersonen gemessen wurde (siehe Abschnitt 3.1.1) und die dazugehörige Standardabweichung des Mittelwertes. Der Tabelle sind außerdem der klinische Verlauf der einzelnen MG-Patienten (EOMG, LOMG und TOMG), die medikamentöse Therapie (immunsuppressive bzw. symptomatische Behandlung) sowie ggf. vormals durchgeführte Thymektomien zum Zeitpunkt der Messungen zu entnehmen.

## 4 Ergebnisse

Bei insgesamt 15 von 22 untersuchten TCR V $\beta$ -Ketten konnten starke bzw. exzessive Überexpressionen festgestellt werden. Die scheinbare Überexpression von V $\beta$ 13.1 war statistisch nicht signifikant, also zufällig.



**Abbildung 4.2: TCR V $\beta$ -Ketten-Expression bei 118 MG-Patienten**

In Abbildung A und B ist die Gesamtzahl der Expansionen als Standardabweichung des Mittelwertes der gesunden Kontrollen dargestellt (gelbe Säulen: MG; schwarze Säulen: gesunde Kontrollen). Sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> Populationen zeigen bei MG-Patienten signifikant häufiger TCR V $\beta$ -Ketten-Expansionen als bei den gesunden Kontrollen. Auf die einzelnen MG-Subgruppen bezogen (Abb. C) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede (n.s.) in der Anzahl der Expansionen. Abb. D demonstriert eine leichte Korrelation mit der Zunahme des Alters (nur die CD4<sup>+</sup> Zellen dargestellt) sowohl bei MG-Patienten als auch bei Kontrollen (nicht gezeigt). Immunsuppressive Behandlung oder vollzogene Thymektomien zeigten keinen Einfluß auf die Ergebnisse dieser Studie (nicht gezeigt).

## 4 Ergebnisse

Patient	MG-Subgruppe	Therapie	CD4* Mw (%) ± SD (%)	TCR Vβ																					
				1.1	2.1	3.1	5.1	5.2	5.3	6.7	7.1	8.1	9.1	11.1	12.2	13.1	13.6	14.1	16.1	17.1	18.1	20.1	21.3	22.1	23.1
				3.2	9.8	4.3	6.9	1.2	1.0	4.1	1.7	4.7	5.2	0.7	1.9	3.7	2.0	2.6	1.0	5.6	1.3	2.8	3.4	4.1	0.5
				0.8	1.8	2.1	1.5	1.0	0.3	1.8	0.6	1.0	2.2	0.4	0.5	0.7	0.9	0.6	0.4	1.1	0.6	1.6	1.1	1.1	0.2
				<i>Anzahl der Standardabweichungen CD4* T-Zell-Expansionen über dem Mittelwert der gesunden Kontrollen</i>																					
MG-3	LOMG	aza, py																		6					
MG-8	LOMG*	aza, py											11												
MG-A2	LOMG*	aza, py														48									
GP-A16	EOMG	aza, py																					10		
GP-A3	EOMG	cs, aza, py																				8			
GP-A8	LOMG	cs, aza, py						5								16									
Ox-2	TOMG	thx								6															
MG-D5	LOMG	py																				13			
GP-D4	LOMG	cs, aza, py, thx																							
GP-D3	LOMG	aza, py														6									
GP-B16	LOMG	cs, aza, py										8				10									
GP-C3	TOMG	aza, thx										20													
GP-C5	EOMG*	cs, aza, py, thx													5										
GP-B24	TOMG	aza, thx	5																						
MG-SI	LOMG*	py, thx																						9	
MG-SCH	LOMG	py						5								18									
RSS-A15	EOMG	aza, thx									7														
RSS-B4	LOMG*	py																				8			
FFM-A6	EOMG	k.D.						10																	
MR-KL	LOMG	py																				5			
Ox-1	TOMG	thx								9								5							

**Tabelle 4.2: TCR Vβ-Ketten-Überexpression bei 21 MG-Patienten - Referenzwerte bei CD4\* T-Zellen 118 gesunder Kontrollen**

Dargestellt sind Expansionen ab ≥ der fünffachen SD über dem Mittelwert der gesunden Kontrollen (grau).

gc – Glucocorticoide; aza – Azathioprin; py – Pyridostigmin; thx – Thymektomie; \* - anamnestiche Myasthene Krise; k.D. – keine Daten.

### 4.3 Ansatz zur Klonalitätsprüfung expandierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei fünf Index-MG-Patienten

#### 4.3.1 Durchflusszytometrische Untersuchungen expandierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Aus den 21 in der Tabelle 4.2 aufgeführten Patienten wurden fünf „Index-Patienten“ mit exzessiven TCR V $\beta$ -Expansionen ( $\geq 8$  SD über dem Mittelwert gesunder Kontrollen) in der durchflusszytometrischen *ex vivo* Untersuchung für die nachfolgende Klonalitätsprüfung ausgewählt. Alle fünf Patienten zeigten zum Zeitpunkt der Untersuchung eine symptomatische Myasthenie. Durch die Auswahl gelangten sowohl Patienten unter immunsuppressiver als auch unter rein symptomatischer Therapie mit bzw. ohne anamnestisch bekannte myasthene Krise in die nachfolgenden Untersuchungen (vergleiche Tabelle 4.2).

Patient MG-A2 wurde zum Zeitpunkt der Untersuchung mit dem immunsuppressiven Azathioprin sowie dem Cholinesterasehemmer Pyridostigmin behandelt. In der Durchflusszytometrie wurde ein Anteil der TCR V $\beta$ -Kette 13.6 innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 45,3% festgestellt. Der Mittelwert der V $\beta$ 13.6-Expression bei Gesunden lag bei 2,0% unter allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (SD  $\pm$  0,9%). Damit besaß Patient MG-A2 eine TCR V $\beta$ 13.6-Überexpression von 48 SD über dem Mittelwert (siehe Abb. 4.1).

Patientin MG-SCH wurde ausschließlich mit Pyridostigmin therapiert. Bei dieser Patientin betraf die TCR-Überexpression die V $\beta$ -Kette 13.1 innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Da Mittelwert und SD der V $\beta$ 13.1-Expression physiologisch 3,7% bzw. 0,7% unter allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen betragen, lag hier die Überexpression der TCR V $\beta$ 13.1-Kette bei 18 SD über dem Mittelwert.

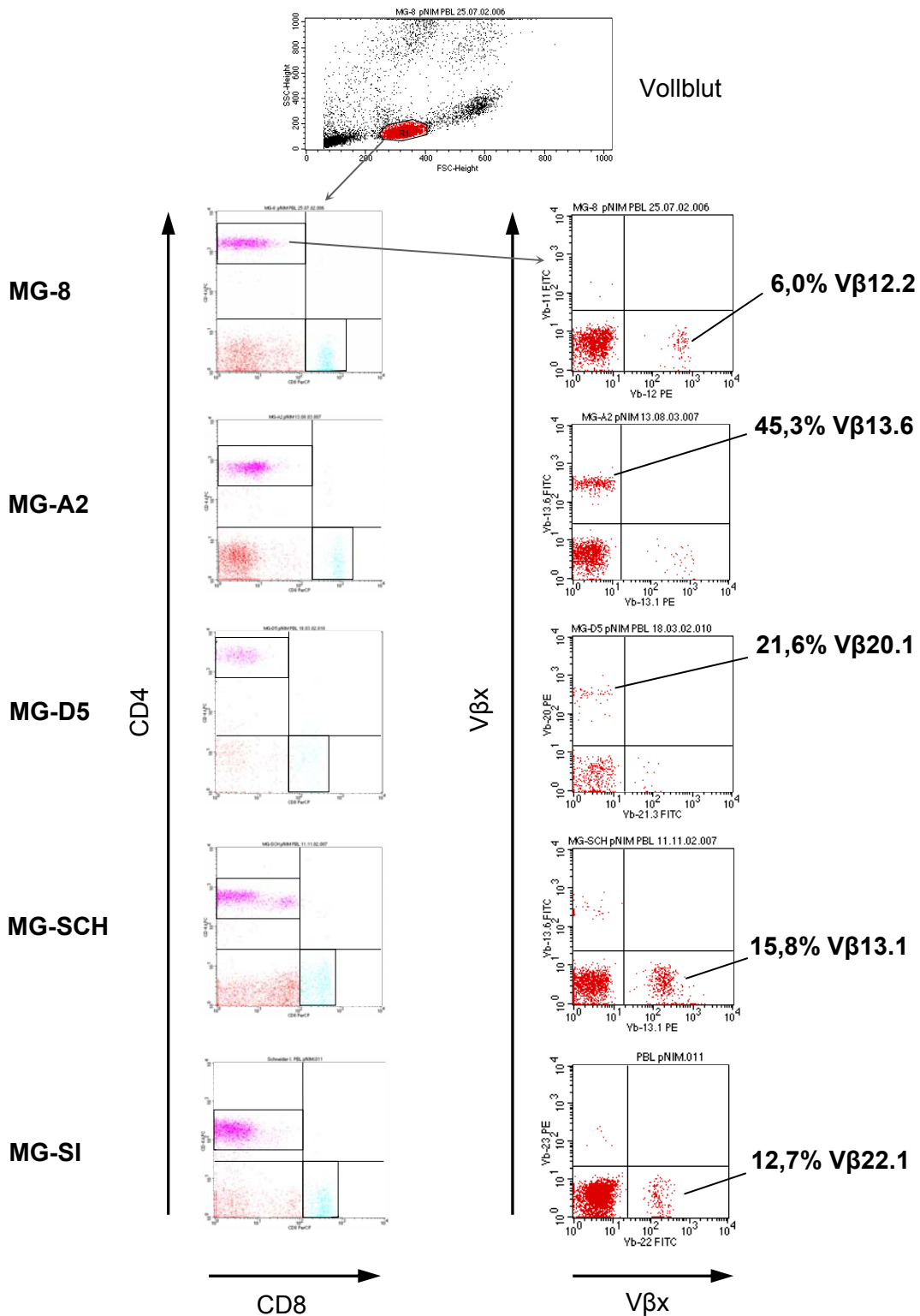
Patient MG-8 wies eine TCR V $\beta$ 12.2-Überexpression von 11 SD auf (Mittelwert der gesunden Kontrollen 1,9%, SD 0,5%). Seine Therapie bestand in der Gabe von Azathioprin und Pyridostigmin.

Bei Patientin MG-D5 konnte eine Überexpression der TCR V $\beta$ -Kette 20.1 von 13 SD festgestellt werden. Hierbei lag der physiologische Mittelwert der TCR V $\beta$ 20.1-Expression bei 2,8%, die SD bei 1,6%. Die Patientin wurde ausschließlich mit Pyridostigmin behandelt.

Bei Patientin MG-SI wurde durchflusszytometrisch eine TCR V $\beta$ 22.1-Überexpression von 9 SD gemessen (physiologischer Mittelwert 4,1%, SD 1,1%).

Sämtliche Index-Patienten zeigten klinisch den Verlauf einer LOMG. Darüberhinaus wurden vor Studienbeginn bei den Patienten MG-A2, MG-SI und MG-8 myasthene Krisen dokumentiert sowie bei Patientin MG-SI eine Thymektomie durchgeführt.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 4.3: FACS-Analyse expandierter  $CD4^+$  T-Zellen bei fünf Index-Patienten**

Es wurden fünf MG-Patienten mit TCR Vβ-Expansionen von  $\geq$  acht SD über dem Mittelwert gesunder Kontrollen ausgewählt. Dargestellt ist die FACS-Untersuchung einer Vollblut-Probe (oben [beispielhaft für Patient MG-8]), welche eine getrennte Analyse für die  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zell-Populationen ermöglicht (links). Die maximal gemessene Expression der maßgeblich expandierten TCR Vβ-Kette unter den  $CD4^+$  T-Zellen wurde in Prozent angegeben (rechts).

## 4 Ergebnisse

### 4.3.2 TCR V $\beta$ -spezifische Verteilung der CD4<sup>+</sup> T-Zellklone in der Langzeit-Zellkultur

Eine Übersicht über die Ergebnisse der durchgeführten Langzeit-Zellkulturen gibt Tabelle 4.3.

<i>Patient</i>	<i>HLA Klasse II-Allele</i>	<i>TCR V<math>\beta</math>x [mAk]</i>	<i>ex vivo Expansion [%]</i>	<i>Klone insg. [n]</i>	<i>TCC CD4<sup>+</sup> [n]</i>	<i>TCC V<math>\beta</math>x [n]</i>	<i>TCC V<math>\beta</math>x [%]</i>
<b>MG-A2</b>	DRB1*0911	13.6	<b>45.3</b>	230	141	6	<b>4.3</b>
	DRB3, DRB4						
	DQB1*0303						
<b>MG-D5</b>	DRB1*1603	20.1	<b>21.6</b>	242	124	23	<b>18.5</b>
	DRB3, DRB5						
	DQB1*0502						
<b>MG-SCH</b>	DRB1*1507	13.1	<b>15.8</b>	196	91	12	<b>13.2</b>
	DRB4, DRB5						
	DQB1*0602						
<b>MG-8</b>	DRB1*1304	12.2	<b>6.0</b>	339	81	4	<b>4.9</b>
	DRB3, DRB4						
	DQB1*0603						
<b>MG-SI</b>	DRB1*0401	22.1	<b>12.7</b>	464	113	12	<b>10.6</b>
	DRB4						
	DQB1*0503						

**Tabelle 4.3: Vergleich der TCR V $\beta$ -Expression ex vivo und in vitro expandierter T-Zellen**

Es sind hier die fünf Index-Patienten MG-A2, MG-D5, MG-SCH, MG-8 sowie MG-SI und ihre jeweilige Patienten-spezifisch expandierte TCR V $\beta$ -Kette im peripheren Blut (in % aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen) gezeigt. Dem gegenübergestellt findet sich in der Tabelle die Gesamtzahl der *in vitro* CD4<sup>+</sup> T-Zellklone (TCC) in der Langzeit-Zellkultur sowie der absolute und relative Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellklone mit der Patienten-spezifisch expandierten TCR V $\beta$ -Kette. Die Tabelle liefert zusätzlich Information über die HLA-Klasse II-Allele dieser Patienten (Schreuder et al. 2005).

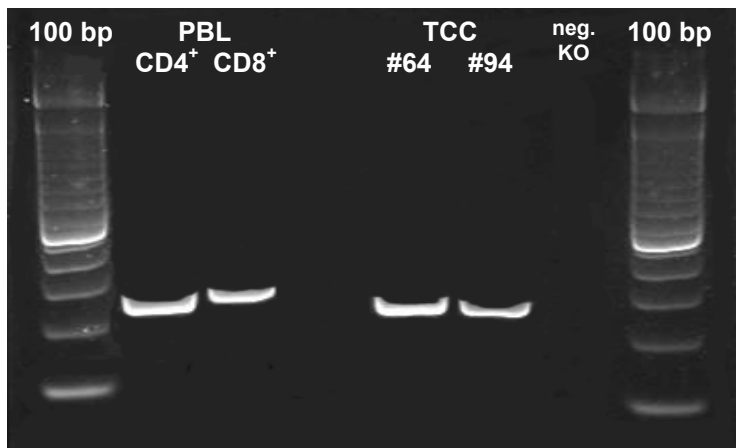
Im Durchschnitt konnten  $252 \pm 61$  Klone pro Patient gezüchtet werden, hiervon  $110 \pm 28$  CD4<sup>+</sup> T-Zellklone. Im peripheren Blut der Patientin MG-D5 ließ sich durchflusszytometrisch ein Anteil von 21,6% expandierten V $\beta$ 20.1<sup>+</sup> T-Zellen unter allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen. In der Zellkultur wurden aus insgesamt 242 Klonen 124 CD4<sup>+</sup> T-Zellklone identifiziert und isoliert, von denen genau 23 Klone durchflusszytometrisch die im peripheren Blut expandierte V $\beta$ -Kette exprimierten. Dies bedeutete einen Anteil von 18,5% V $\beta$ 20.1<sup>+</sup> Zellen an allen CD4<sup>+</sup> T-Zellklonen. Patientin MG-SCH wies *ex vivo* eine TCR V $\beta$ 13.1-Expansion von 15,8% auf. Insgesamt 196 Klone bzw. 91 CD4<sup>+</sup> T-Zellklone konnten in der Zellkultur gewonnen werden, davon zwölf V $\beta$ 13.1<sup>+</sup> T-Zellklone, was einem Anteil von 4,9% entspricht. Bei Patient MG-8 zeigten in der Durchflusszytometrie 6,0% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen den TCR V $\beta$ 12.2<sup>+</sup>

## 4 Ergebnisse

Phänotyp. *In vitro* konnten 339 Klone gewonnen werden, davon 81 CD4<sup>+</sup> T-Zellklone bzw. vier CD4<sup>+</sup> Vβ12.2<sup>+</sup> T-Zellklone, was einem Anteil von 4,9% entspricht. 12,7% der peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Patientin MG-SI exprimierten die Vβ-Kette 22.1. *In vitro* wurden 10,6% Vβ22.1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> unter insgesamt 113 T-Zellklonen identifiziert (insgesamt 464 Klone).

### 4.3.3 Nachweis klonal expandierter Vβ-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut

Die Abbildungen 4.4 A und B illustrieren die Ergebnisse dieser Untersuchungen am Beispiel der Patientin MG-D5.



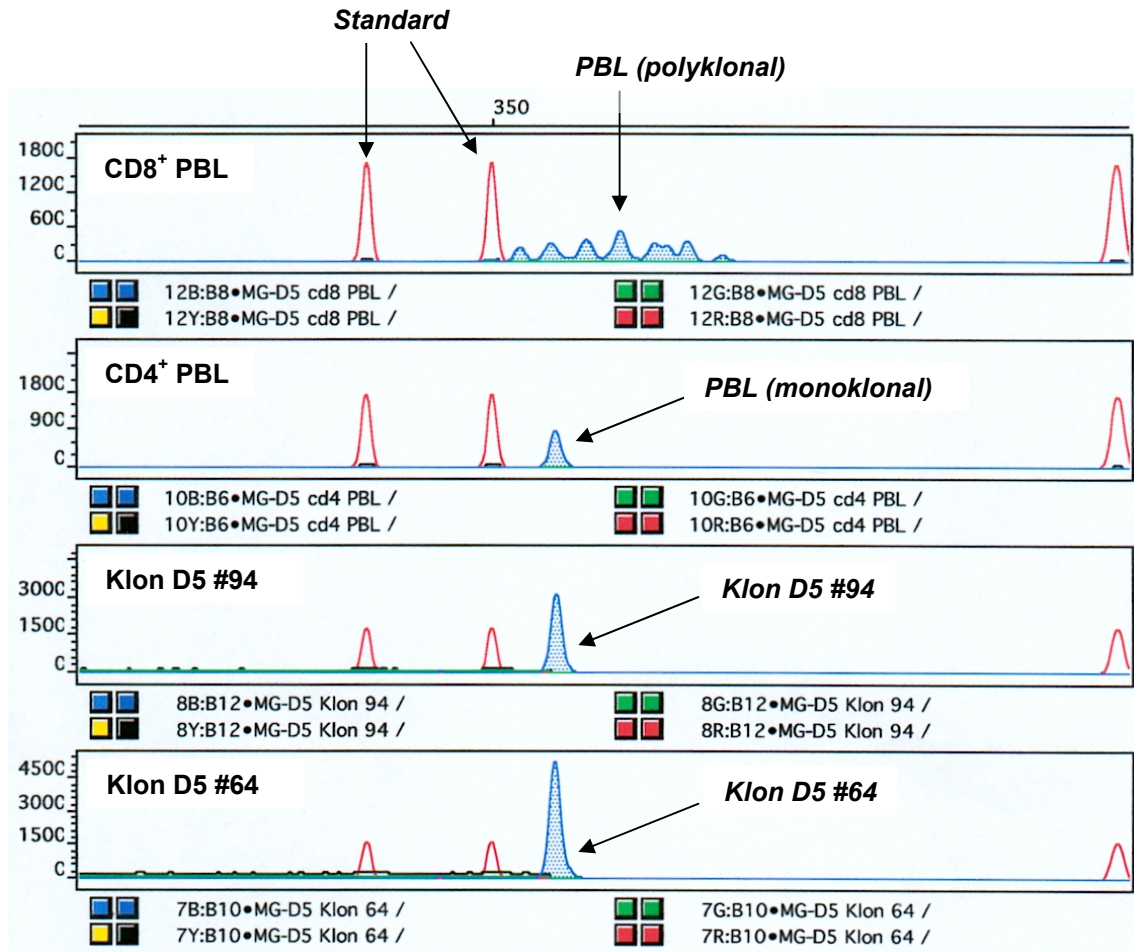
**Abbildung 4.4 A:**  
**CDR3 PCR-Transkripte**  
Dargestellt sind die Amplifikate der TCR Vβ-Kette 20.1 für die *ex vivo* CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (PBLs) sowie für zwei repräsentative *in vitro* TCC (Klon #64 und Klon #94, insg. n = 12) der Patientin MG-D5. Die Amplifikate besitzen eine Länge zwischen 300-400 bp. bp: Basenpaare; PBL: Peripherer Blut-Lymphozyt; TCC: T-Zellklon; neg. KO: Negativkontrolle.

In Abbildung 4.4 A sind die PCR-Produkte dargestellt, die mittels TCR Vβ-spezifischer Primer bei der Index-Patientin MG-D5 generiert werden konnten. Bei dieser Patientin zeigte sich in durchflusszytometrischen Untersuchungen die TCR Vβ-Kette 20.1 innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einem 21,6%igen Anteil exzessiv exprimiert. In der vorliegenden PCR wurde Template-cDNA separat von peripher-venösen CD4<sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten verwendet als auch von CD4<sup>+</sup> *in vitro* T-Zellklonen. Es gelang hiermit der qualitative Nachweis eines PCR-Produktes mit einer Größe von 300-400 bp. Des Weiteren konnte hiermit die Identifizierung der TCR Vβ-Kette 20.1 für T-Zell-Subpopulationen in der Durchflusszytometrie bestätigt werden. Mittels dieser qualitativen PCR konnte allerdings keine weitere Diskriminierung bezüglich eines womöglichen klonalen Ursprungs unternommen werden, da bei sämtlichen Vβ-identischen, jedoch nicht-klonalen T-Zellen ein PCR-Produkt in einem Bereich der gezeigten 350 bp erwartet werden musste. Im Spectratyping erfolgte die Analyse der CDR3-Länge für CD4<sup>+</sup> PBLs, CD4<sup>+</sup> T-Zellklone sowie für CD8<sup>+</sup> PBLs als interne Kontrolle (Abb. 4.4 B). Deutlich zeigte sich ein identischer peak für CD4<sup>+</sup> PBLs und CD4<sup>+</sup> T-Zellklone bei 355 bp, was auf einen monoklonalen Ursprung der TCR Vβ20.1<sup>+</sup>

## 4 Ergebnisse

PBLs hindeutete. Die in der Zellkultur gezüchteten T-Zellklone entsprachen somit den im peripheren Blut expandierten T-Zellen.

Die CD8<sup>+</sup> PBLs zeigten – als interne Kontrolle – einen polyklonalen Hintergrund für die im peripher-venösen Blut expandierte TCR V $\beta$ -Kette.



**Abbildung 4.4 B: CDR3-Spectratyping als Hinweis klonal expandierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Dargestellt ist der Vergleich der CDR3-Längen für die *ex vivo* expandierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, zwei repräsentative V $\beta$ -spezifische *in vitro* TCC (insg. n = 12) sowie für *ex vivo* CD8<sup>+</sup> T-Zellen als interne Kontrolle (Patientin MG-D5). Die Population *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigt eine identische CDR3-Länge bei 355 bp, mathematisch als peak dargestellt. Bemerkenswerterweise stimmen die CDR3-Längen der *in vitro* TCC mit der CDR3-Länge der im peripher-venösen Blut expandierten T-Zellen überein (dargestellt sind zwei repräsentative Klone), welches einen monoklonalen Ursprung stark nahe legt. Der gefüllte Graph (blau) repräsentiert das CDR3-beinhaltende PCR-Produkt, die offenen Graphen (rot) stellen die Längenstandards dar. bp: Basenpaare; PBL: Peripherer Blut-Lymphozyt; TCC: T-Zellklon.

Tabelle 4.4. fasst die Resultate des CDR3-Spectratypings für die fünf Index-Patienten zusammen. Insgesamt zeigten sämtliche Index-MG-Patienten für die CD4<sup>+</sup> peripher-venösen T-Zellen einen herausragend dominanten CDR3-Peak im Bereich von 355 bis 479 bp (Ausnahme: Patientin MG-SI). Des Weiteren konnten identische CDR3-Längen der TCR V $\beta$ -spezifischen CD4<sup>+</sup> Zellkultur-Klone nachgewiesen werden. Auf eine Analyse der T-Zellklone von Patientin MG-SI wurde verzichtet, da das Spectratyping der CD4<sup>+</sup> PBLs ebenso wie das der CD8<sup>+</sup> PBLs eine polyklonale Verteilung

## 4 Ergebnisse

demonstrierte und somit ein mono- oder oligoklonaler Ursprung der TCR V $\beta$ 22.1<sup>+</sup> Expansion ausgeschlossen werden konnte.

Patient	TCR V $\beta$	TCR CDR3-Spectratyping	TCR CDR3-Spectratyping	TCR CDR3-Spectratyping
		CD4 <sup>+</sup> PBL	CD8 <sup>+</sup> PBL	CD4 <sup>+</sup> TCC
MG-A2	13.6	478 bp	polyklonal	478 bp
MG-D5	20.1	355 bp	polyklonal	355 bp
MG-SCH	13.1	479 bp	polyklonal	479 bp
MG-8	12.2	471 bp	polyklonal	471 bp
MG-SI	22.1	polyklonal	polyklonal	n.d.

**Tabelle 4.4: Zusammenfassung der Resultate des CDR3-Spectratypings der im peripheren Blut expandierten T-Zell-Populationen und CD4<sup>+</sup> T-Zell-Klone der fünf Index-MG-Patienten**

bp: Basenpaare; PBL: Peripherer Blut-Lymphozyt; TCC: T-Zellklon; n.d.: nicht durchgeführt.

Zum endgültigen Nachweis der Klonalität wurden die isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellklone auf identische DNA-Sequenzen hinsichtlich des Merkmals „CDR3“ untersucht. Hierzu erfolgte die reverse Transkription, PCR und Sequenzierung des hypervariablen Bereiches des TCR-Genlocus (CDR3). Die Ergebnisse der CDR3-Sequenzierung sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

Insgesamt ließen sich 49 T-Zellklone der vier analysierten Index-Patienten vier verschiedenen Klonotypen zuordnen. So konnten bei der Patientin MG-D5 insgesamt 14 V $\beta$ 20.1<sup>+</sup> T-Zellklone herangezüchtet werden. Von diesen 14 Klonen waren zwölf in ihrer hypervariablen Region (CDR3) genetisch identisch und bildeten somit einen Klonotyp.

Die Analyse der CDR3-Länge dieses Klonotyps mittels Spectratyping hatte zuvor dieselbe Länge wie bei den zuvor analysierten expandierten *ex vivo* T-Zellen erbracht. Patient MG-A2 wies für sämtliche T-Zellklone eine identische CDR3-Sequenz bei übereinstimmender CDR3-Länge mit den *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf. Die Hälfte der T-Zellklone des Patienten MG-8 waren in der CDR3-Sequenz identisch.

Es gelang zwar außerdem der Nachweis weiterer CDR3-identischer Klone bei den Patienten MG-D5 bzw. MG-SCH - das Spectratyping ergab allerdings bei diesen T-Zellklonen keine Übereinstimmung mit der CDR3-Längenanalyse der expandierten *ex vivo* T-Zellen.

Patient	n/n	TCRV $\beta$ (mAk)	TRBV (Gen)	TRBV (Sequenz)	NDN (Sequenz)	TRBJ (Gen)	TRBJ (Sequenz)
MG-A2	6/6	13.6	6-6	LAAPSQTSVYFC	ASTPTGG	1-1	NTEAFFGQGTRLTVV
MG-D5	12/14	20.1	30	LLSDSGFYLC	AGTGDIIN	1-1	NTEAFFGQGTRLTVV
	2/14		30	LLSDSGFYLC	AWSGN	1-5	SNQPQHFGDGTLSIL
MG-SCH	5/21	13.1	6-5	SAAPSQTSVYFC	ASNLQG	1-1	STEAFFGQGTRLTVV
	4/21		6-5	SAAPSQTSVYFC	ASSYQG	1-5	NQPQHFGDGTLSIL
	6/21		6-5	SAAPSQTSVYFC	ASSYSG	?	?
	1/21		6-5	SAAPSQTSVYFC	ASSGQLI	1-2	GYTFGSGTRLTVV
	1/21		6-5	SAAPSQTSVYFC	ASSGRSQ	2-7	GYEYFPGGTRLSVL
	1/21		6-5	SAAPSQTSVYFC	ASSTGQL	1-1	NTEAFFGQGTRLTVV
	1/21		6-5	SAAPSQTSVYFC	ASSKPLA	2-4	TKNIQYFGAGTRLSVL
	1/21		6-5	SAAPSQTSVYFC	ASSGADSG	1-2	NYGYTFGSGTRLTVV
	1/21		6-5	SAAPSQTSVYFC	ASSYSRG	2-7	TYEQYFPGGTRLSVL
MG-8	4/8	12.2	10-3	ATSSQTSVYFC	AITRQG	2-2	GTGELFFGEGSRLTVL
	1/8		10-3	ATSSQTSVYFC	AISGVD	1-6	NSPLHFGNGTRLTVT
	1/8		10-3	ATSSQTSVYFC	ANGWG	2-3	STDTQYFPGGTRLTVL
	1/8		10-3	ATSSQTSVYFC	AISG	2-3	STDTQYFPGGTRLTVL
	1/8		10-3	ATSSQTSVYFC	ATRGAD	1-1	TEAFFGQGTRLTVV

**Tabelle 4.5: TCR CDR3-Sequenzen beweisen den klonalen Ursprung der im Blut expandierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Dargestellt ist die Anzahl der Zellkultur-Klone pro Index-Patient insgesamt sowie die Zahl der hierbei genetisch identischen Klone. Die Nomenklatur der DNA-Sequenzen erfolgte nach Lefranc (<http://imgt.cnusc.fr>). Aufgeführt sind die translatierten Sequenzen für die TCR V $\beta$ -Kette (TRBV), die CDR3 (NDN) und die TCR J $\beta$ -Kette (TRBJ). Insgesamt 49 Klone zeigten Klonalität. Man beachte die starke Ähnlichkeit von NDN-Sequenzen bei MG-SCH, z.B. ASSYQG, ASSYSG und ASSYSRG, was auf ein ähnliches Antigen-bindendes Motiv hindeuten könnte. TCR V $\beta$ -spezifische Klonotypen mit derselben CDR3-Länge *in vitro* wie die CDR3-Längen der expandierten T-Zellen *ex vivo* sind farbig unterlegt.

## 4 Ergebnisse

---

Trotz eines einzigen CDR3-konformen Klonotypen ließen sich bei der Patientin MG-SCH zahlreiche verschiedene T-Zellklone mit starker Homologie in der NDN-Sequenz nachweisen (z.B. ASSYQG, ASSYSG und ASSYARG).

Zusammenfassend zeigten vier der fünf Index-Patienten jeweils einen (genetisch identischen) Klonotyp für das Merkmal „CDR3“, der mit der CDR3-Länge der *ex vivo* expandierten T-Zellen exakt übereinstimmte.

# 5 Diskussion

## 5.1 Diskussion des Versuchsansatzes

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Identifizierung klonal expandierter T-Zellen bei der autoimmunen MG. Aufgrund der Tatsache, dass keine T-Zell-Infiltrate im Bereich des primären Antigens – des nAChR innerhalb der MEP - zu finden sind, ist eine direkte Isolation und Charakterisierung infiltrierender T-Zellen nicht möglich. Lange Zeit bestand die Strategie, potentiell autoreaktive Immunzellen zu erkennen und zu gewinnen, allein in der seriellen zellkulturellen Restimulation mit spezifischen Antigenen (z.B. in der wiederholten Applikation von rekombinantem humanen AChR bzw. überlappender Epitope) und der Isolation der dabei proliferierenden Zellen. Die Aussagekraft dieser Untersuchungen wurde durch zahlreiche technische Probleme limitiert, unter anderem durch die Schwierigkeit, das eigentliche für die Expansion der T-Zellklone verantwortliche Antigen zu identifizieren, die Tendenz aktivierter T-Zellklone, in Apoptose zu treten (Bieganowska et al. 1997) sowie das Vorhandensein regulatorischer T-Zellen in der Zellkultur (Protti et al. 1990b). Der Nachweis zusätzlicher pathogenetisch relevanter Autoantigene wie MuSK (Hoch et al. 2001), Titin (Aarli et al. 1990) und Ryanodin-Rezeptor (Mygland et al. 1992) sowie die Entdeckung von Antizytokin-Antikörpern gegen IL-12 und TNF- $\alpha$  (Meager et al. 2003) bewiesen die lange Zeit vermutete Existenz anderer autoimmunogener Epitope in der MG und implizieren das Vorhandensein weiterer unbekannter Autoantigene. Darüber hinaus beinhalten Antigen-abhängige Versuchsansätze zur Identifizierung und Isolation autoreaktiver T-Zellen durch die *a priori* Selektion entsprechender Antigen-spezifischer T-Zellen stets die Gefahr einer Verzerrung (engl.: bias) hin zu einem falsch eingeschränkten Repertoire autoimmuner Zellen. Ein auf Antigen-spezifität basierender Versuchsansatz trägt des Weiteren nicht dem Nachweis der sogenannten TCR-Degeneration Rechnung (Hemmer et al. 2000), wonach ein einzelner TCR eine Vielzahl möglicher Antigene erkennen kann. Eine solche vielfältige Spezifität erschwert zusätzlich die Identifizierung einer pathogenetisch relevanten Zielzelle.

Der hier durchgeführte Antigen-unabhängige Versuchsansatz stellt eine neuartige Strategie dar. An erster Stelle stand hierbei der Nachweis einer auffällig veränderten Zusammensetzung des TCR-Repertoires im Blut von MG-Patienten. Während hierzu in wenigen früheren Untersuchungen semiquantitative PCR-basierte Methoden zur Anwendung kamen (Okada et al. 1989; Rieux-Laucat et al. 1993), bietet die in dieser Arbeit durchgeführte Durchflusszytometrie eine sensitive und praktikable Untersuchung der TCR V $\beta$ -Ketten-Expression. Der Nachweis expandierter T-Zell-Populationen im peripher-venösen Blut von MG-Patienten wurde mittels vergleichender

## 5 Diskussion

---

durchflusszytometrischer Untersuchungen der T-Zellen von Patienten und gesunden Kontrollen geführt. Diese Methode erlaubt die Unterscheidung der beiden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subgruppen in der Expression ihres TCR-Phänotyps. Eine solche einfache Differenzierung dieser Subgruppen stellt den maßgeblichen Vorteil gegenüber den meisten allein auf PCR-Analysen basierenden Methoden dar, da bei diesen die Expression der verschiedenen TCR V $\beta$ -Ketten oftmals nur vergleichsweise zeitintensiv im T-Zell-Gesamtkollektiv dargestellt werden konnte (Navaneetham et al. 1998).

Zur molekularbiologischen Analyse des TCR wurde die einzelne Zelle in nativer Form in Zellkultur gebracht und kultiviert. Der Vorteil dieses Vorgehens liegt u.a. in der späteren möglichen Analyse eines spezifischen bzw. unveränderten TCR-Genotyps, die bei alternativen Methoden wie beispielsweise dem Einsatz von T-Zellhybridomen (Mayer et al. 1985) durch die Co-Expression transfizierter und endogener TCR deutlich beeinträchtigt worden wäre (Dornmair et al. 2003). Aufgrund der primär unbekanntem Antigen-spezifität und zur Vermeidung einer Vorselektion (s.o.) sollten die potentiell autoreaktiven Zellen in der Zellkultur unspezifisch zur Proliferation angeregt werden, wobei genügend Material für molekularbiologische Untersuchungen gewonnen wurde. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die unspezifische Stimulation durch den Einsatz von allogenen APCs, rIL-2 sowie anti-CD3/CD28-microbeads. Zuletzt genannte CD3/CD28-Ak vermitteln ihren proliferativen Einfluss auf eine physiologischere Weise als klassische Mitogene wie Phytohämagglutinin (PHA) und Concanavalin A (Con A), indem erstere z.T. über die gleichen Rezeptoren wie APCs (CD3 und CD28) eine Stimulation der T-Zellen induzieren (Trickett et al. 2003). Der Nachteil der unspezifischen Stimulation liegt allerdings in der zeitlichen Begrenzung. Die Verwendung von stimulierenden Ak bzw. APCs sowie IL-2 induziert nämlich zwar zunächst das oben geschilderte gute Wachstum; es führt jedoch nach einiger Zeit zur Expression antiproliferativer bzw. Apoptose-induzierender Moleküle wie CD152 [CTLA-4] (Walunas et al. 1996) oder CD95 [Fas] (Esser et al. 1997).

Die hier durchgeführte Einzelzellklonierungs-Strategie, welche eine Anreicherung einer einzelnen, primären Zelle unbekannter Spezifität aus dem Blut ermöglicht, beinhaltet allerdings die Gefahr eines „bias“. CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die einen CD28-Rezeptor tragen, werden effektiver stimuliert als CD28-arme Zellen. Die Ergebnisse bei Patient MG-A2 zeigen, dass sich trotz einer 45%igen TCR V $\beta$ 13.6-Expansion unter allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripher-venösen Blut lediglich sechs V $\beta$ 13.6<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellklone in der Langzeitzellkultur heranzüchten ließen, was einem Anteil von 4,3% unter allen *in vitro* gewonnenen CD4<sup>+</sup> T-Zell-Klonen entspricht. Parallel durchgeführte durchflusszytometrische Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten bei diesem Patienten deutlich erniedrigte Werte in der CD28-Expression der expandierten T-Zellen

## 5 Diskussion

---

im Vergleich zur Expression bei den anderen untersuchten MG-Patienten belegen (Tackenberg et al. 2007). Dem Problem einer solchen Zellkultur-technischen Verzerrung muss allerdings entgegengehalten werden, dass sich durch die CD28-Stimulation in der Mehrzahl der Fälle gerade diejenigen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Zellkultur expandieren ließen, die nachweislich den im peripher-venösen Blut expandierten Vβ-spezifischen T-Zellen entsprachen und somit die verfolgten Zielzellen darstellten. Sofern die Expression von CD28 nicht erniedrigt war und damit keine primäre Beeinträchtigung der T-Zellproliferation vorlag, stimmte der Anteil Vβ-spezifischer T-Zellklone in guter Annäherung mit dem Anteil der expandierten T-Zell-Population unter allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen überein (vergleiche Patienten MG-D5, MG-SCH und MG-8). Verzerrungen im Sinne von Zelltransformationen oder der Induktion eines vollständig veränderten T<sub>H</sub>-Zytokinprofils (T<sub>H</sub>-shift) unter dem Einfluss von CD3/CD28-Ak konnten bereits in früheren Studien ausgeschlossen werden, ebenso die Selektion und damit das Überleben spezieller TCR Vβ-Subgruppen (Levine et al. 1997).

Insgesamt reflektieren die Verhältnisse in der Zellkultur das Verteilungsmuster im peripher-venösen Blut. Somit eignet sich die hier angewandte Methode des *limiting dilution* gut für die *in vitro* Darstellung eines *in vivo* T-Zell-Repertoires. Die gewünschte unspezifische Stimulation der *in vitro* T-Zellklone stellt jedoch gleichzeitig den Nachteil dieser Methode dar. Native T-Zellen zeigen *in vitro* im Vergleich zu spezifisch stimulierten T-Zellen oder immortalisierten T-Zelllinien ein begrenztes Wachstum und können selten auf mehr als wenige Millionen Zellen expandiert werden (Dornmair et al. 2003).

Die womögliche Induktion von Selektion und Überleben spezieller TCR Vβ-Subgruppen würde sicherlich den größten systematischen Fehler darstellen: Theoretisch besteht die Möglichkeit, dass die durchflusszytometrisch gemessene TCR Vβ-spezifische Expansion im peripheren Blut einen polyklonalen Ursprung hat. Eine durch unspezifische Stimulation unbeabsichtigte Selektion könnte zum Überleben von im Genotyp identischen T-Zellen mit der gesuchten, *in vivo* expandierten Vβ-Kette führen. Die wenigen, in einem polyklonalen Hintergrund stets im peripher-venösen Blut existierenden, identischen T-Zellen müssten in der *limiting dilution*-Methode isoliert und kloniert werden; anschließend müssten ausschließlich diese Zellen durch unspezifische Stimulation überleben und einen monoklonalen Ursprung vortäuschen. Diese mathematisch äußerst geringe Wahrscheinlichkeit wurde in dem hier durchgeführten Versuchsansatz durch das gleichzeitige CDR3-Spectratyping und die CDR3-Sequenzierung nahezu ausgeschlossen. Da das Auftreten zweier T-Zellen unterschiedlicher genetischer Herkunft bei jedoch identischer CDR3-Länge äußerst unwahrscheinlich ist (Janeway et al. 2001b), gelingt durch die Analyse der

## 5 Diskussion

---

hypervariablen Region (CDR3) des TCR mittels Spectratyping der Nachweis von klonal imponierenden T-Zell-Repertoiren (Pannetier et al. 1995). Die Zuverlässigkeit des Spectratypings, (oligo-)klonale Expansionen von T-Zell-Populationen mit hoher Sensitivität festzustellen, konnte bereits in zahlreichen Untersuchungen wie beispielsweise bei Tumor- (Puisieux et al. 1994) oder infektiösen Erkrankungen (Lim et al. 2000) belegt werden und gilt als das zur Zeit praktikabelste Instrument zur Erfassung potentiell klonaler T-Zell-Expansionen (Dornmair et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wiesen die *ex vivo* expandierten TCR V $\beta$ -spezifischen T-Zellen in der CDR3-Längenanalyse bei vier der fünf Index-MG-Patienten jeweils eine bis zwei identische CDR3-Längen auf und deuteten dadurch auf einen mono- bis biklonalen Ursprung dieser Zellen hin. Die *in vitro* gezüchteten CD4<sup>+</sup> T-Zellklone stimmten im direkten Vergleich mit den *ex vivo* expandierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowohl in der exprimierten V $\beta$ -Kette als auch in der CDR3-Länge überein. Somit diente das Spectratyping neben der präziseren Darstellung potentieller klonal expandierter T-Zell-Populationen zudem als interne Kontrolle für die gezüchteten T-Zellklone. Durch diese *ex vivo-in vitro*-Validierung konnte die nachfolgende Sequenzierung für den Klonalitätsnachweis erfolgen.

Die Gefahr zufälliger Fehler wurde durch das hier angewandte hohe Signifikanzniveau reduziert. Hierdurch wurden nur diejenigen Expansionen für weitere Untersuchungen in Betracht gezogen, die eine statistisch signifikante Überexpression jeweiliger TCR V $\beta$ -Ketten im Vergleich zu gesunden Kontrollen aufwiesen. Ein weiterer zufälliger Fehler hätte die Untersuchung einer lediglich transienten TCR V $\beta$ -Ketten-Expansion im Blut der MG-Patienten dargestellt. Zwar wurden sowohl chronisch-entzündliche als auch akute Infektionen bei den Patienten vor und während der Untersuchungen ausgeschlossen, die TCR-Analyse zu lediglich einem Zeitpunkt hätte jedoch keinen Anhalt für dauerhaft expandierte T-Zellexpansionen dargestellt. Eine nur kurzzeitige Präsenz expandierter T-Zellen macht eine pathogenetische Relevanz für die MG allerdings eher unplausibel. Aus diesem Grunde wurden wiederholte Blutentnahmen bei den einzelnen MG-Patienten durchgeführt. Hier zeigen sich über einen Zeitraum von mehreren Jahren bislang stabile, peripher-venöse TCR V $\beta$ -Ketten-Expansionen (Tackenberg et al. 2007).

Durch die Kombination und den Vergleich der hier dargestellten Antigen-unabhängigen *in vitro*- und *ex vivo*-Untersuchungen lassen sich Zellen klonalen Ursprungs aus peripher-venösem Blut direkt nachweisen. Die zellkulturelle Isolation einer einzelnen nativen und damit genetisch unveränderten T-Zelle bietet die Möglichkeit, in weiterführenden Untersuchungen die Antigen-spezifität eines TCR innerhalb von Proliferationsessays zu untersuchen (Hemmer et al. 1997; Dornmair et al. 2003) und

## 5 Diskussion

---

stellt damit eine attraktive Alternative zur technisch aufwendigen „single cell PCR“ dar (Bertram et al. 1995). Womöglich kann der Einsatz eines Antigen-unabhängigen Ansatzes zum Nachweis weiterer, bislang unbekannter Antigene in der MG-Pathogenese führen bzw. zur Identifizierung eines maßgeblichen Autoantigens für die verschiedenen klinischen MG-Subgruppen beitragen.

### 5.2 Diskussion der Ergebnisse

#### 5.2.1 Klonal expandierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der MG

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beweisen die Existenz klonal expandierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripher-venösen Blut von MG-Patienten.

Das Auftreten von T-Zell-Expansionen ist bei einer Reihe von Auto-Immunerkrankungen beschrieben, obgleich es häufiger für die Subpopulation der CD8<sup>+</sup> als für die der CD4<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt werden konnte. Beispielsweise wurden in (durchflusszytometrischen oder PCR-basierten) Analysen des TCR-Repertoires in der Multiplen Sklerose (MS) TCR V $\beta$ -Expansionen einzelner weniger V $\beta$ -Ketten sowohl im T-Zell-Kollektiv (Kotzin et al. 1991) als auch isoliert für CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Liquor und Gehirn nachgewiesen (Babbe et al. 2000; Jacobsen et al. 2002). Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (Wagner et al. 1998), Guillian-Barré-Syndrom (GBS) (Koga et al. 2003), der Neuroborreliose (Jacobsen et al. 2003) oder dem Myelodysplastischen Syndrom (MDS) (Epperson et al. 2001).

Erste Hinweise auf mögliche alterierte TCR-Repertoires in der autoimmunen MG erbrachten durchflusszytometrische Untersuchungen an Thymozyten aus hyperplastischen Thymi. In einer Studie an 17 EOMG-Patienten konnten mittels sechs monoklonaler TCR V $\beta$ -Ak expandierte V $\beta$ 5.1<sup>+</sup> sowie V $\beta$ 8<sup>+</sup> Populationen vor allem unter den reifen und nahen Vorläuferzellen (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>high</sup>) nachgewiesen werden. Da frühe Vorläuferzellen (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>low</sup>) keine T-Zell-Expansionen aufwiesen, wurde dieses veränderte Repertoire von den Autoren als Folge einer intrathymalen Selektion interpretiert. Aufgrund der Tatsache, dass diese im Thymus expandierten Zellen vorwiegend im Kern von Reifungsfollikeln lokalisiert waren, wurde den T-Zellen eine sehr wahrscheinliche Rolle bei der Autoimmunantwort beigemessen. Dies bekräftigte erneut die Rolle des Thymus als zentrales Organ in der Pathogenese bei EOMG (Truffault et al. 1997). Dagegen ergab in einer PCR-basierten TCR V $\beta$ -Analyse der Vergleich des T-Zell-Repertoires von hyperplastischem Thymus mit peripher-venösem Blut Hinweise auf nahezu ausschließlich im Blut expandierte V $\beta$ 4<sup>+</sup>, V $\beta$ 6<sup>+</sup>, V $\beta$ 15<sup>+</sup>, V $\beta$ 16<sup>+</sup> und V $\beta$ 24<sup>+</sup> T-Zell-Populationen. Der Vergleich von Thymus und Blut bei gesunden Kontrollen förderte jedoch keine entsprechenden Ergebnisse zutage. Aufgrund dieser

## 5 Diskussion

---

Resultate präferierten die Autoren eine Aktivierung AChR-spezifischer T-Zellen in der Peripherie und maßen dem Thymus eine weit weniger wahrscheinliche Rolle in der Pathogenese bei (Navaneetham et al. 1998).

Eine weitere Untersuchung des TCR-Repertoires in der MG erfolgte an einem Kollektiv von insgesamt 38 Patienten. Durchflusszytometrisch konnten dort bei circa 47% der Patienten sowohl unter den CD4<sup>+</sup> als auch unter den CD8<sup>+</sup> T-Zellen TCR V $\beta$ -Expansionen nachgewiesen werden. Eine Klonalitätsprüfung erfolgte hierbei allerdings nicht. Die expandierten Zellen wurden in der Mehrzahl als HLA-DR<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen identifiziert und präsentierten sich in einem Beobachtungszeitraum von zwei Jahren als stabil im Blut präsent (Xu et al. 1998).

In einer der aktuellsten Studien wurde der CDR3-Längen-Polymorphismus von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei sechs MG-Patienten und sechs gesunden Kontrollen mittels Spectratyping für 24 TCR V $\beta$ -Ketten analysiert. Unter den MG-Patienten wurden insgesamt 15 CD4<sup>+</sup> (davon elf bei demselben MG-Patienten) und zwei CD8<sup>+</sup> TCR V $\beta$ -Expansionen in einer Größenordnung von mehr als zwei bis drei SD über dem Mittelwert der gesunden Kontrollen festgestellt (Infante et al. 2003).

All diese Studien zur MG erfolgten bisher entweder an einer vergleichsweise geringen Zahl an Patienten oder waren durch die lange Zeit eingeschränkte Verfügbarkeit monoklonaler V $\beta$ -spezifischer Ak bzw. Primer stark in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Der Hauptnachteil dieser Studien besteht allerdings in der fehlenden molekulargenetischen Analyse der CDR3 einschließlich Sequenzierung, die eine Evidenz einer möglichen Klonalität der im peripher-venösen Blut expandierten T-Zellen hätte erbringen können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, welche an einem vielfach größeren Kollektiv durchgeführt wurde, beweisen erstmals in statistisch signifikantem Ausmaß die Existenz (mono)klonaler Expansionen im peripher-venösen Blut von Patienten mit autoimmuner MG, wobei die Klonalitätsprüfung an Patienten der klinischen LOMG-Subgruppe erfolgte.

Des Weiteren konnte ein individuell verschobenes T-Zell-Repertoire zugunsten der Überexpression zahlreicher TCR V $\beta$ -Ketten belegt werden. Dabei zeigt sich das Ausmaß der TCR-Expansionen von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei MG-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen statistisch hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Die besonders ausgeprägte Expansionsrate unter den CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist vor allem im Hinblick auf die T<sub>H</sub>-Zell-abhängige Ak-vermittelte Pathogenese der MG von Bedeutung (siehe Kapitel 2.2.4.1 und 2.2.4.2). Da CD4<sup>+</sup> TCR V $\beta$ -Expansionen häufiger bei der MG als bei vielen anderen der bislang untersuchten Autoimmunerkrankungen zu finden sind, stellen die

## 5 Diskussion

---

hier dargestellten Ergebnisse ein weiteres Argument für eine pathogenetisch relevante Rolle der klonal expandierten T-Zellen dar.

Die Existenz autoreaktiver, auto-Ak-induzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der MG-Pathogenese wurde durch die Isolation AChR-spezifischer T-Zellen aus peripher-venösem Patientenblut nachgewiesen (Hohlfeld et al. 1984; Hohlfeld et al. 1986). Funktionelle Gründe für eine Bedeutung CD4<sup>+</sup> T-Zellen lieferten außerdem Studien, die eine Assoziation bestimmter MHC Klasse II-Haplotypen mit der MG zeigten und damit eine Bedeutung der Antigenerkennung durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen für die Pathogenese der MG nahe legten (Ong et al. 1991; Salvetti et al. 1991).

Grundsätzlich existieren klonal angereicherte T-Zellen, vor allem die der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, auch im Blut von gesunden Personen (Hingorani et al. 1993; Schwab et al. 1997) und hierbei besonders häufig bei älteren Menschen (> 65 Jahre), wobei als ein möglicher Grund das Vorliegen chronischer Infektionen vermutet wird.

In der vorliegenden Arbeit sollte durch den Vergleich der MG-Patienten mit in Alter und Geschlecht übereinstimmenden Kontrollen der Hauptunterschied in beiden Kollektiven in der Diagnose der autoimmunen MG bestehen. Es konnte kein therapeutischer Einfluss auf die Verteilung des T-Zell-Repertoires bei den Patienten festgestellt werden. Der zusätzliche Ausschluß chronischer Erkrankungen sowie akuter Infektionen und die hohe Zahl an Patienten machen Umweltfaktoren als mögliche Ursache unwahrscheinlich (Tackenberg et al. 2007).

Zusammenfassend imponiert das Auftreten expandierter, spezifischer T-Zell-Subgruppen eher als ein Charakteristikum als eine Ausnahme in der MG. Die Vielfalt an stabil expandierten TCR V $\beta$ -Ketten, die inzwischen über einen Zeitraum von mehreren Jahren im peripher-venösen Blut nachgewiesen werden können (Tackenberg et al. 2007), die heterogenen HLA-Haplotypen der Patienten sowie die im Vergleich unterschiedlichen CDR3-Sequenzen der einzelnen Klonotypen lassen den Schluss eines individuell restringierten TCR-Repertoires in der autoimmunen MG zu. Erstmals erbringen die vorliegenden Daten Evidenz für klonale CD4<sup>+</sup> T-Zell-Populationen (in der LOMG) bei hochsignifikant expandierten T-Zell-Populationen in allen klinischen MG-Subgruppen. Es bleibt zu klären, ob es sich bei den hier identifizierten T-Zellklonen um eine funktionell homogene (identische Antigenmotive, regulatorische oder autoaggressive T-Zellen etc.) oder heterogene Gruppe handelt. Weitere Untersuchungen auf der Grundlage dieser Resultate könnten Evidenz für eine gemeinsame pathophysiologische Anfangs- bzw. Teilstrecke bei unterschiedlichen Phänotypen dieser heterogenen Erkrankung erbringen. Vor allem aber könnten die Ergebnisse erste Hinweise zur Immunpathologie in der LOMG erbracht haben (über die in der MG-Pathogenese bislang am wenigsten Erkenntnisse vorliegen), da erstmals

## 5 Diskussion

---

eine potentiell pathogene Population von (T-)Zellen identifiziert und isoliert werden konnte.

### 5.2.2 Antigen-Spezifität der klonal expandierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Im Blut expandierte Immunzellen, die im Zusammenhang mit (Auto-) Immunerkrankungen stehen, werfen die Frage nach ihrer pathogenetischen Rolle bzw. ihrer Antigen-spezifität auf. In der Tat belegen TCR V $\beta$ -Analysen inzwischen bei einer Vielzahl von Erkrankungen veränderte T-Zell-Repertoires: Bei der HIV-Infektion konnte in einer deutschen Studie ein peripher-venöser HIV-1 spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellklon eines Patienten isoliert und identifiziert werden (Kolowos et al. 1999). Beim MDS wies eine CDR3-Analyse von 15 Patienten auf eine deutliche Überexpression von TCR V $\beta$ -Ketten im Vergleich zu gesunden Kontrollen hin (Epperson et al. 2001). Bei der MS konnten im Blut expandierte T-Zellpopulationen selektiv in ZNS-Läsionen nachgewiesen werden (Kotzin et al. 1991). Liquoranalysen von 36 MS-Patienten (Jacobsen et al. 2002) sowie zehn Patienten mit Neuroborreliose (Jacobsen et al. 2003) förderten die Expansion CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen zutage. Jeweils bei zwei Patienten dieser Studien waren die nachgewiesenen Expansionen auf CD8<sup>+</sup> Liquor-T-Zellklone zurückzuführen. Eine CDR3-Analyse bei 119 Patienten mit GBS wies ebenfalls auf das Bild einer oligoklonalen T-Zellexpansion hin, ohne dass jedoch eine der expandierten TCR V $\beta$ -Ketten signifikant mit der Erkrankung assoziiert war (Koga et al. 2003).

Die Interpretation möglicher pathogenetisch relevanter Antigene in der MG wird durch mehrere Faktoren erschwert: im Gegensatz zu den stark restringierten immunogenen Epitopen in der EAMG, dem Tiermodell der MG, haben zahlreiche Untersuchungen am Menschen mittels synthetisierter humaner AChR-Peptide zur Identifizierung einer Vielzahl möglicher myasthenogener Epitope innerhalb des AChR als Antigen geführt (Protti et al. 1990a; Link et al. 1992; Moiola et al. 1994). Dabei scheinen viele dieser Epitope keine natürlich exprimierten Peptide der Zelloberfläche darzustellen (Matsuo et al. 1995). Vieles spricht dafür, dass erst durch einen initialen gewebeschädigenden Prozess (sei es durch eine virale Infektion und der nachfolgenden Aktivierung CD8<sup>+</sup> [zytotoxischer] T-Zellen, ein molekulares Mimikry oder eine Autoimmunreaktion) Peptide präsentiert werden, die dem Immunsystem physiologischer Weise unzugänglich sind. In diesem Fall spricht man auch von „kryptischen“ Epitopen. Wird dabei ein entsprechender (Auto-)Immunprozess aufrechterhalten, können permanent weitere, „unnatürliche“ Epitope von APCs aufgenommen, prozessiert und präsentiert werden. Hierdurch besteht die Möglichkeit, dass im Blut existente autoreaktive B- und T-Zellen, die Antigen-spezifität gegen diese normalerweise niemals präsentierten

## 5 Diskussion

---

Epitope aufweisen, unabhängig von der eigentlichen Ursache aktiviert werden und somit die initiale Autoimmunantwort verstärken. Die dadurch steigende Zahl (auto-)immunogener Epitope als Konsequenz einer initial spezifischen Immunantwort bezeichnet man als „epitope spreading“ (Vanderlugt et al. 2002). Weitere identifizierte alternative Autoantigene in der MG wie Titin (Aarli et al. 1990), Ryanodin-Rezeptor (Mygland et al. 1992) und MuSK (Hoch et al. 2001) erschweren zusätzlich die Aufklärung der Immunantwort und bekräftigen den heterogenen Charakter der MG. Womöglich reflektiert das in dieser Arbeit beschriebene individuell restringierte TCR-Repertoire der MG-Patienten die Beobachtung einer zunehmenden Zahl potentieller immunogener Epitope in der autoimmunen MG.

Die zahlreichen, jedoch komplizierenden Befunde haben daher bei der noch ausstehenden Bestimmung der Antigen-spezifität die Hoffnung nach einer raschen Aufklärung der Pathogenese und neuen, selektiven Therapieoptionen in der MG gedämpft.

### 5.2.3 Hypothese zur MG-Pathogenese

Eine Hypothese zur Pathogenese der autoimmunen MG wird in Abbildung 5.1 illustriert. Zahlreiche Befunde (z.B. der Nachweis autoreaktiver Thymozyten, auto-AChR-Ak, Expression von AChR[-Epitopen] im Thymus) deuten auf eine zentrale Rolle des Thymus in der Pathogenese der MG hin:

Die Expression von AChR-Epitopen auf Myoid- und Epithelzellen im hyperplastischen Thymus bzw. Thymom führt möglicherweise zu einer Aktivierung autoreaktiver Immunzellen und damit zu einer Immunantwort gegen AChR an der MEP. Hierbei nehmen zunächst APCs die entsprechenden Peptide auf, prozessieren und präsentieren diese Antigen-spezifischen, autoreaktiven T-Zellen. Zwei grundsätzlich denkbare pathophysiologische Szenarien sollen dargestellt werden: in einem relativ frühen Stadium der ersten Hypothese erfolgt die direkte Aktivierung CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Autoantigen-präsentierende APCs im Thymus. Die Aktivierung und (klonale) Proliferation autoreaktiver Immunzellen im Thymus könnte hierbei das immunologische Korrelat zu den (in der EOMG beschriebenen) Lymphknoten-ähnlichen Reifungsfollikeln (vergleiche Abschnitt 2.2.4.3) darstellen, in denen die Interaktion zwischen T- und B-Zellen zur Entwicklung auto-AChR-Ak produzierender Plasmazellen führt. Die humorale Ak-Reaktion gegen periphere AChR (vergleiche Abschnitt 2.2.3) würde anschließend die typische klinische Symptomatik vermitteln. Durch die hierbei induzierte Gewebeschädigung könnte in der Folge ein „epitope spreading“ zu einer Freisetzung immer neuer, physiologischerweise „kryptischer“ Epitope führen und damit eine sekundäre Aktivierung zusätzlicher autoreaktiver Zellen, die zu einem kleinen

## 5 Diskussion

---

Prozentsatz zum physiologischen Immunzell-Repertoire gehören, zur Folge haben (Shiono et al. 2003).

Eine zweite Hypothese setzt wiederum zunächst die Entwicklung sowohl autoreaktiver CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Thymus voraus, wie sie im Rahmen eines „Selektionsfehlers“ beim Thymom diskutiert wird. Eine Aktivierung der autoreaktiven Immunzellen könnte jedoch alternativ in der Peripherie stattfinden. Als Konsequenz einer Gewebeverletzung bzw. Entzündung von Muskelstrukturen und der damit verbundenen Präsentation von AChR-Epitopen durch APCs wäre eine Aktivierung autoreaktiver zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen denkbar. Die nachfolgende Entzündungsreaktion hätte die Freisetzung immunogener Epitope in den Extrazellularraum (z.B. Blut) zur Folge, wodurch zusätzlich die zirkulierenden autoreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels der APCs (zum Beispiel innerhalb der Lymphknoten) aktiviert werden könnten. Würden Autoantigen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen und entsprechende B-Zellen im Lymphknoten aufeinander treffen, könnte dies zur Bildung pathogener AChR-spezifischer Ak durch Plasmazellen führen (Vincent et al. 1999).

Die Pathogenese der LOMG bleibt weiterhin unklar. Die hier vorgelegten Ergebnisse klonal expandierter T-Zellen bei der LOMG sind womöglich die Folge einer peripheren Aktivierung autoreaktiver T-Zellen entsprechend dem o.g. Modell der TOMG-Pathogenese. Veränderungen im Thymusepithel bei der LOMG könnten als Ursache für die Generierung autoreaktiver Immunzellen gemutmaßt werden. In diesem Zusammenhang wären sekundäre Thymusepithelveränderungen (*post involutionem*) denkbar, die analog zum Thymom zu einer Alteration des T-Zell-Repertoires und der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen führen könnten.

In den dargestellten Hypothesen wäre als Folge der Autoimmunreaktion gegen den peripheren AChR die Gefahr eines „circulus vitiosus“ denkbar: die (chronische) Entzündungsreaktion an der MEP mit peripherer Aktivierung CD8<sup>+</sup> autoreaktiver Zellen durch Freisetzung autoimmungener Epitope würde eine aufrecht erhaltene Immunisierung im Thymus überflüssig machen (Marx et al. 1997). Womöglich liegt dieser Mechanismus der klinischen Beobachtung zugrunde, dass Thymektomien bei TOMG-Patienten oftmals zu keiner klinischen Verbesserung führen und diese Patienten häufig auf weitere immunsuppressive Behandlung angewiesen sind (Vincent et al. 1999; Vincent 2002).

Der Nachweis autoreaktiver Immunzellen im Blut gesunder Kontrollen (Sommer et al. 1991) wirft die Frage nach möglichen Faktoren auf, die (in der MG) zur Durchbrechung der Deletion bzw. Inaktivierung sich entwickelnder autoreaktiver T-Zellen im Thymus, der sog. Toleranz, und damit für die Immunantwort gegen Autoantigene verantwortlich sein könnten.

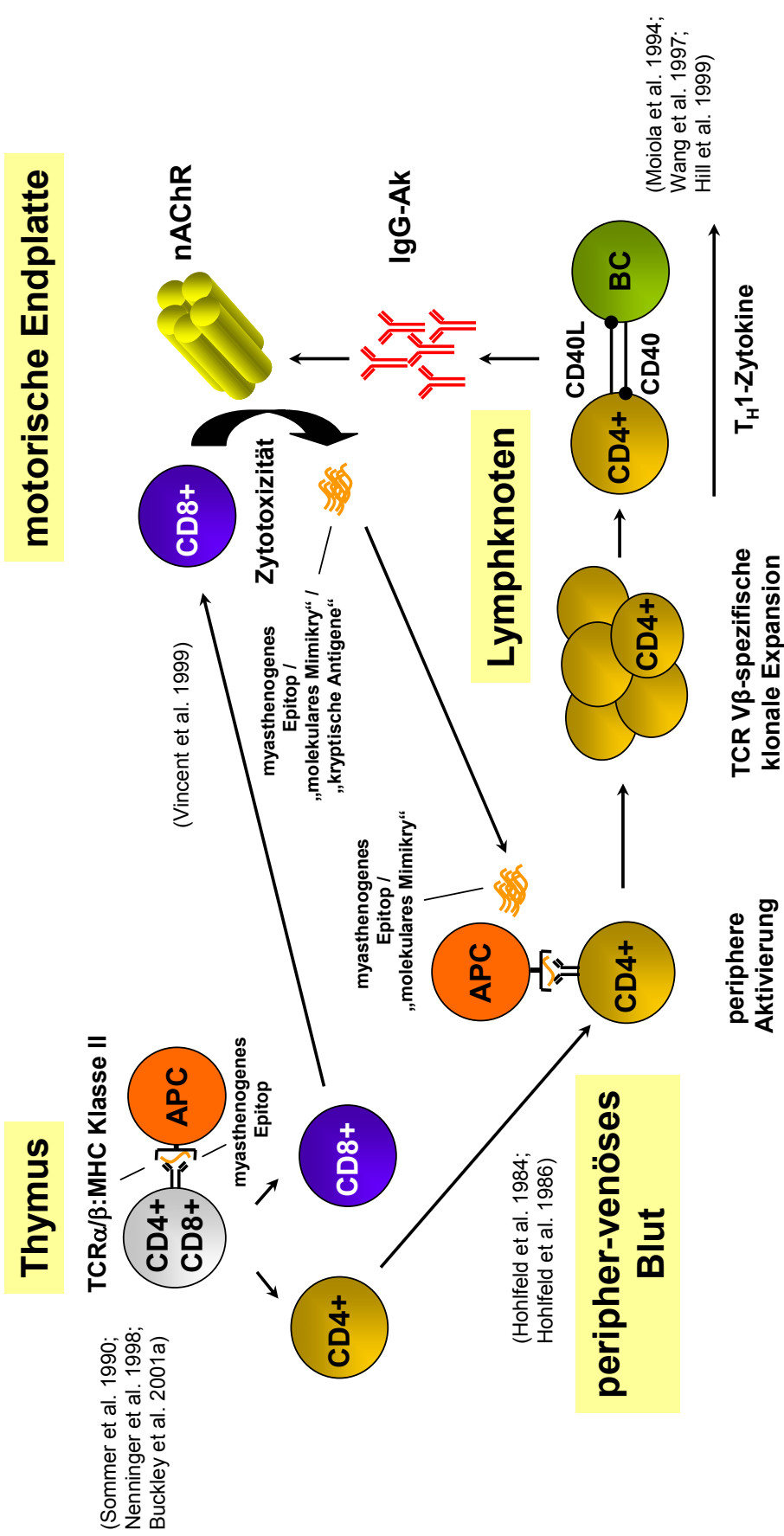
## 5 Diskussion

---

Eine kontrovers diskutierte Möglichkeit stellt die Kreuzreaktion im Sinne eines molekularen Mimikries dar (s.o.). Hierbei führt eine klassische Infektion zunächst zu einer adäquaten Immunantwort und damit zur Aktivierung des angeborenen bzw. erworbenen Immunsystems. Liegen in einem solchen Fall allerdings gleichzeitig strukturell hoch verwandte Epitope von Erregern und körpereigenen Strukturen vor, besteht die Gefahr der fehlerhaften Distinktion von Erreger und körpereigenen Antigenen durch das Immunsystem. Erreger-spezifische T- und B-Zellen können in diesem Fall mit Autoantigenen kreuzreagieren und dadurch zu Schädigungen des Organismus führen. Beispiele solcher Erreger-vermittelten Phänomene stellen post-infektiöse Erkrankungen durch die gramnegative Spirochäte *Campylobacter jejuni* oder dem der Herpesviren-Gruppe zugehörigem Cytomegalievirus (CMV) dar. Beim GBS konnte auf diese Weise gezeigt werden, dass die pathogenetisch relevanten Auto-Ak gegen Autoantigene wie Ganglioside gerichtet sind, die Homologien zu den Lipopolysacchariden von *C. jejuni* aufweisen (Yuki 2001). Die Infektion mit CMV bedingt einen viralen Einbau von körpereigenen CD13-Molekülen (Aminopeptidase N). Eine daraufhin induzierte Immunantwort gegen viral inkorporierte CD13-Moleküle hat die parallele Zerstörung körpereigener Zellen (vor allem von Granulozyten und Monozyten) zur Folge und kann bei immunsupprimierten, transplantierten Patienten zur „graft-versus-host disease“ (GvHD) führen (Naucler et al. 1996).

Ein kohärentes Konzept zum Molekularen Mimikry stellt die TCR-Degeneration (Hemmer et al. 2000) dar (siehe Abschnitt 2.2.2), wonach jede (positiv selektierte) T-Zelle auf ein breites Spektrum von Anti- bzw. Pathogenen spezifisch reagieren kann. Der Vorteil dieser TCR-Flexibilität liegt in der effizienten Bekämpfung von Pathogenen, die permanent in den Organismus eindringen. Im Rahmen der eintretenden Aktivierung und Expansion von T-Zellen wird der TCR quantitativen und qualitativen Veränderungen unterworfen, die zu einer herabgesetzten Aktivierungsschwelle führen. Hierdurch wird eine beschleunigte Bekämpfung des gleichen Antigens bei einer erneuten Infektion gewährleistet. Allerdings ermöglicht diese nun niedrigere Aktivierungsschwelle bei breiter Antigenespezifität gleichzeitig die Gefahr der Kreuzreaktion mit Autoantigenen und damit der Ausbildung von Autoimmunität (Hemmer et al. 1997) sowie weiter des o.g. „epitope spreadings“.

Auch in der MG wird die Möglichkeit eines molekularen Mimikries diskutiert. Experimentell konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass eine Kreuzreaktivität von AChR-spezifischen Ak zu Glykoprotein-Resten von Herpes simplex-Viren besteht (Schwimmbeck et al. 1989). Ein Datenbank-Abgleich von mikrobiellen Proteinen mit der am häufigsten (auto-)immungenen  $\alpha$ -Untereinheit des humanen AChR erbrachte hunderte viraler und bakterieller strukturell verwandter



**Abbildung 5.1: Hypothese zur Pathogenese der autoimmunen Myasthenia gravis**

Im Zentrum der Pathogenese steht die Aktivierung und klonale Expansion autoreaktiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche durch Interaktion mit spezifischen B-Zellen die Produktion von Auto-Ak zur Folge hat. Die Autoimmunantwort kann ihren Ausgang im (pathologisch veränderten) Thymus nehmen, in dem autoreaktive CD8<sup>+</sup> und/oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen generiert werden, die in der Peripherie ihr spezifisches Antigen erkennen oder durch mikrobielles molekulares Mimikry aktiviert werden. Die Endstrecke dieser Vorgänge äußert sich stets in der Ak-vermittelten Affektion des nAChR und der damit verbundenen klinischen Folgen. (Weitere Erläuterungen siehe Text.)

## 5 Diskussion

---

Regionen (Deitiker et al. 2000). Im Folgenden konnten einige mikrobielle Peptide synthetisiert und ihre Affinität zu humanen AChR-Ak getestet werden. Ein signifikanter Teil der angebotenen Antigene wurde hierbei im Patientenserum von AChR-Ak gebunden. Somit konnte unter experimentellen Bedingungen zumindest die theoretische Möglichkeit eines molekularen Mimikries bei der MG gezeigt werden. Gegen ein molekulares Mimikry in der Pathogenese der MG sprechen allerdings die hohe Affinität und Spezifität der auto-AChR-Ak. Diese Befunde deuten eher auf den AChR selbst als das primäre Antigen in der MG hin und wären bei einem molekularen Mimikry in dieser Form nicht zu erwarten (Vincent 2002).

Zahlreiche Befunde sprechen für den Thymus als primären Ort der Immunisierung: die Expression von AChR(-Untereinheiten) auf myoiden sowie epithelialen Thymuszellen von EOMG und TOMG-Patienten (Schluep et al. 1987; Marx et al. 1989; Salmon et al. 1998), die deutlich vermehrte Zahl AChR-präsentierender Thymus-APCs (Sommer et al. 1990; Melms et al. 1992) sowie maximale Konzentrationen an AChR-Ak im Thymusgewebe (Scadding et al. 1981). In der Zusammenschau scheint der Thymus über alle Voraussetzungen für eine Autoimmunantwort gegen myasthenogene Epitope zu verfügen (Vincent 2002). Da AChR auch bei Gesunden im Thymus exprimiert werden, könnte ein womöglich kritischer Faktor dabei das Angebot bzw. die Konzentration an präsentiertem AChR darstellen, welche in der EOMG und TOMG auf unterschiedliche Weise erhöht ist. Anhand der typischen histologischen Veränderungen könnte man in der TOMG aufgrund des erhöhten Antigen-Angebots von einem „Selektionsfehler“ sprechen, der durch die aberrante Expression von AChR, Titin und anderen Neurofilamenten induziert würde. Quantitativ konnten entsprechende Expansionen durch die Untersuchungen reifer, aus dem Thymus exportierter T-Zellen, so genannter Thymus-Emigranten, untermauert werden. Durch die Analyse episomaler DNA-Fragmente, die während der somatischen Rekombination des TCR entstehen (TRECs, T cell receptor rearrangement excision circles) (Douek et al. 1998) konnte bei TOMG-Patienten ein im Vergleich zu gesunden Kontrollen deutlich erhöhter Titer reifer, exportierter T-Zellen belegt werden. Thymektomien führten zum drastischen Abfall von TRECs; auf der anderen Seite zeigten wiederkehrende TREC-Titer eine erneute Tumorprogression an und waren mit Ak gegen IL-12 und INF- $\alpha$  vergesellschaftet (Buckley et al. 2001a). Ungeklärt blieb bislang, ob es sich hierbei um autoreaktive T-Zellen handelt. Analog zur TOMG würden die oftmals als „Thymitis“ (Kirchner et al. 1986) bezeichneten histologischen Veränderungen in der EOMG mit der Ausbildung von Lymphknoten-ähnlichen (entzündlichen) Reifungsfollikeln zu einem „Expansionsfehler“ autoreaktiver T-Zellen führen (siehe Abschnitt 2.2.4.3).

## 5 Diskussion

---

Trotz dieser Modelle bleiben weitere Fragen ungelöst, u.a. warum die potentiell autoreaktiven Immunzellen nicht im Rahmen der dafür vorgesehenen negativen Selektion deletiert wurden? Physiologischer Weise kommt es in der negativen Selektion vermutlich zur Interaktion zwischen Thymozyten und Antigen-präsentierenden medullären Thymusepithel-Zellen (Hogquist et al. 2005). Der entscheidende Parameter für die negative Selektion scheint die Affinität des TCR für den Auto-Ag:MHC-Liganden darzustellen: eine hohe Affinität führt demnach meist zur klonalen Deletion. Eine Möglichkeit der Deletion zu entgehen stellt allerdings der Übergang solcher T-Zellen in  $CD4^+ CD25^+$   $T_{Reg}$ -Zellen dar, wobei zurzeit unklar ist, welche Faktoren hierfür verantwortlich sind (Hogquist et al. 2005).  $T_{Reg}$ , die ca. 5-10% aller  $CD4^+$  T-Zellen beim Menschen ausmachen, weisen eine hohe Affinität zu Autoantigenen auf, und es konnte u.a. indirekt in Depletionsexperimenten von  $T_{Reg}$  demonstriert werden, dass diese Zellen durch autoreaktive T-Zellen induzierte Autoimmunreaktionen verhindern können. Als Mechanismen werden inhibitorische Einflüsse auf APCs, antiproliferative Wirkungen auf T-Zellen und die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine vermutet (Maloy et al. 2001). *In vitro* konnte allerdings demonstriert werden, dass unter Einfluß von IL-2 und Stimulation von CD3 und CD28, wie es z.B. im Rahmen einer Infektion mittels aktivierter APCs stattfindet,  $CD4^+ CD25^+$   $T_{Reg}$  ihre autoreaktive Suppression verlieren und der Transfer dieser Zellen in athymen Mäusen zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen führt (Itoh et al. 1999). Unklar bleibt, ob diese Entstehung von Autoimmunität allein durch immunmodulatorische Effekte auf umgebende Zellen oder durch eine Entwicklung von  $T_{Reg}$  in autoreaktive T-Zellen selbst induziert wurde. In letzterem Fall müsste diskutiert werden, ob die in dieser Arbeit nachgewiesenen klonalen T-Zellexpansionen einem solchen Kollektiv entsprechen.

Die in jüngster Vergangenheit veröffentlichten Befunde stellen ein offenbar empfindliches Gleichgewicht zwischen Toleranz und Autoimmunität dar, welches offensichtlich die potentielle Gefahr autoimmuner Reaktionen beinhaltet. Die letztendlich Toleranz-durchbrechenden Faktoren wie auch evtl. unabdingbare Vorraussetzungen (HLA-Haplotyp etc.) bleiben weiter zu klären.

### 5.3 Ausblick

Zum augenblicklichen Zeitpunkt kann lediglich darüber spekuliert werden, welche konkrete Ursache das klonal expandierte, restringierte T-Zell-Repertoire bei den untersuchten MG-Patienten hat: nahe liegend ist eine Antigen-spezifische Expansion, jedoch können als Auslöser auch Unterschiede im HLA-Haplotyp sowie eine

## 5 Diskussion

---

womöglich bei MG-Patienten generell veränderte TCR-Expression als Reaktion auf gewöhnliche Antigene in Betracht gezogen werden.

Schlüssel der nachfolgenden Untersuchungen bleibt die Untersuchung der TCR-Spezifität. Mit dem noch ausstehenden Nachweis der Antigen-spezifität kann den expandierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen womöglich eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der autoimmunen MG zugeschrieben werden. Eine unlängst veröffentlichte Studie weist in diesem Zusammenhang auf die mögliche klinische Relevanz eines solchen Nachweises hin: hierbei gelang der Nachweis regulierender anti-TCR-Ak gegen AChR-spezifische T-Zellen aus dem Blut von EOMG-Patienten. Der regulatorische Einfluss dieser Auto-Ak, die womöglich durch T<sub>Reg</sub> induziert wurden, äußerte sich bei steigenden Titern durch eine Verbesserung der klinischen Symptomatik. Hierdurch ergibt sich die Frage nach der Entwicklung spezifischer Immuntherapien. Als eine vieler theoretischer Therapie-Strategien sei die Vakzinierung von MG-Patienten mittels charakterisierter TCR angeführt, die in der Theorie die Produktion Patient-eigener, spezifischer anti-TCR-Ak zur Folge haben könnte. In diesem Fall würden hierdurch autoreaktive Immunzellen - in unserem Fall die expandierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen - selektiv durch die körpereigene Abwehr eliminiert werden können (Jambou et al. 2003). Erste Erfolge im Tierversuch mittels TCR-spezifischer Ak belegen in einem anderen Autoimmunmodell mit allerdings stark restringierten TCR-Hintergrund (experimentell autoimmune Enzephalomyelitis, EAE) die prinzipielle Durchführbarkeit einer solchen Therapie (Acha-Orbea et al. 1988). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit müssen die Hoffnung auf derartige Therapieoptionen jedoch deutlich dämpfen. Auf das obige Beispiel bezogen würde dies bedeuten, dass eine Immunisierung mittels lediglich *eines* immundominanten TCR beim Vorliegen des gezeigten individuellen TCR-Repertoires bei Patienten aller MG-Subgruppen unwirksam wäre. Eine solche Therapie könnte ausschließlich individuell und nur Patienten-spezifisch erfolgreich sein.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten belegen, dass das verschobene T-Zell-Repertoire zugunsten spezifischer TCR V $\beta$ -Ketten im peripher-venösen Blut von MG-Patienten auf der Existenz klonaler CD4<sup>+</sup> T-Zell-Populationen beruht. Diese klonalen CD4<sup>+</sup> T-Zell-Expansionen bieten in Zukunft die Möglichkeit weiterer Analysen der T-Zell-Funktion an einzelnen MG-Patienten. Mittels der hier vorgestellten Methoden können *ex vivo* expandierte T-Zellen Antigen-unabhängig *in vitro* kloniert und für die anschließenden Untersuchungen expandiert werden. Die Kombination von *ex vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen erlaubt eine zuverlässige Identifizierung und Isolation klonaler T-Zell-Populationen. Die anschließende DNA-Sequenzierung der CDR3 bedeutet für den Untersucher die Möglichkeit, einen „molekularen Fingerabdruck“ zu erstellen,

## 5 Diskussion

---

wodurch die Beobachtung expandierter T-Zellen in prospektiven Langzeitstudien ermöglicht wird.

Die Klonalitätsprüfung erfolgte bislang an expandierten T-Zellen von LOMG-Patienten. Da statistisch hochsignifikante TCR-Expansionen unter allen MG-Subgruppen nachzuweisen waren, können auch hier klonal expandierte T-Zellen vermutet werden. Weiterführende Klonierungsexperimente mit Langzeitzellkulturen werden in Zukunft notwendig sein. Des Weiteren müssen weitergehende Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung der klonal expandierten T-Zellen mittels FACS erfolgen. Hierbei sind vor allem Untersuchungen zur Immunzytologie und zum Zytokinprofil der Zellen zu nennen, die Hinweise zum Reifegrad und zur immunologischen Aktivität liefern. In Kombination mit durchflusszytometrischen Analysen von Thymusmaterial (insbesondere bei LOMG) kann das Verhältnis zwischen peripheren und zentralen T-Zellen beleuchtet werden. Diese Untersuchungen könnten Hinweise zum Ort der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen liefern und somit entscheidende Informationen v.a. zur Pathogenese der LOMG liefern.

Entsprechende Analysen im Zeitverlauf werden folgen, um zum einen die stabile Expansion der klonalen T-Zellen zu belegen, zum anderen mittels Studien zur Verteilung der T-Zellen in Kompartimenten wie dem Thymus eine weitere Aufklärung in der Pathogenese der MG und ihrer auslösenden Mechanismen zu ermöglichen.

### 6 Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholin-Rezeptor
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APC	antigen presenting cell
B	bone marrow
bp	Basenpaar
C	constant
CD	cluster of differentiation
CDR	complementary determining region
CMV	Cytomegalievirus
cTEC	cortical thymic epithelial cell
CTM	complete thymus medium
D	diversity
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EAMG	experimentelle autoimmune Myasthenia gravis
EOMG	early onset myasthenia gravis
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
GvHD	graft-versus-host disease
HLA	human leukocyte antigen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon

## 6 Abkürzungsverzeichnis

---

IVIG	Intravenöse Immunglobuline
J	joining
LOMG	late onset myasthenia gravis
m	monoklonal
MAC	membrane attack complex
MACS	magnetic activated cell sorting
MAMG	MuSK-positive myasthenia gravis
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MEP	motorische Endplatte
MG	Myasthenia gravis
MGUS	monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MHC	major histocompatibility complex
MS	Multiple Sklerose
MuSK	Muskel-spezifische Rezeptor-Tyrosin-Kinase
mTEC	medullary thymic epithelial cell
nAChR	nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBL	peripheral blood lymphocyte
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll- $\alpha$ Protein
rh	rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SNMG	seronegative myasthenia gravis
T	Thymus
TCR	T-Zell-Rezeptor

## 6 Abkürzungsverzeichnis

---

T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TOMG	thymoma associated myasthenia gravis
TREC	t cell receptor excision circle
T <sub>Reg</sub> -Zelle	regulatorische T-Zelle
TSA	tissue specific antigen
V	variable
V $\beta$	variable $\beta$ -Kette
ZNS	zentrales Nervensystem

## 7 Literaturverzeichnis

- Aarli, J. A., F. Romi, G. O. Skeie and N. E. Gilhus (2003). "Myasthenia gravis in individuals over 40." Ann N Y Acad Sci **998**: 424-31.
- Aarli, J. A., K. Stefansson, L. S. Marton and R. L. Wollmann (1990). "Patients with myasthenia gravis and thymoma have in their sera IgG autoantibodies against titin." Clin Exp Immunol **82**(2): 284-8.
- Abbas, A. K., K. M. Murphy and A. Sher (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." Nature **383**(6603): 787-93.
- Acha-Orbea, H., D. J. Mitchell, L. Timmermann, D. C. Wraith, G. S. Tausch, M. K. Waldor, S. S. Zamvil, H. O. McDevitt and L. Steinman (1988). "Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention." Cell **54**(2): 263-73.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist and D. Mathis (2002). "Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein." Science **298**(5597): 1395-401.
- Babbe, H., A. Roers, A. Waisman, H. Lassmann, N. Goebels, R. Hohlfeld, M. Friese, R. Schroder, M. Deckert, S. Schmidt, R. Ravid and K. Rajewsky (2000). "Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction." J Exp Med **192**(3): 393-404.
- Balasa, B., C. Deng, J. Lee, L. M. Bradley, D. K. Dalton, P. Christadoss and N. Sarvetnick (1997). "Interferon gamma (IFN-gamma) is necessary for the genesis of acetylcholine receptor-induced clinical experimental autoimmune myasthenia gravis in mice." J Exp Med **186**(3): 385-91.
- Balasa, B. and N. Sarvetnick (2000). "Is pathogenic humoral autoimmunity a Th1 response? Lessons from (for) myasthenia gravis." Immunol Today **21**(1): 19-23.
- Baldwin, T. A., K. A. Hogquist and S. C. Jameson (2004). "The fourth way? Harnessing aggressive tendencies in the thymus." J Immunol **173**(11): 6515-20.

## 7 Literaturverzeichnis

---

- Bassing, C. H., W. Swat and F. W. Alt (2002). "The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination." Cell **109 Suppl**: S45-55.
- Berrih-Aknin, S., S. Cohen-Kaminsky, V. Lepage, D. Neumann, J. F. Bach and S. Fuchs (1991). "T-cell antigenic sites involved in myasthenia gravis: correlations with antibody titre and disease severity." J Autoimmun **4**(1): 137-53.
- Bertram, S., F. T. Hufert, D. Neumann-Haefelin and D. von Laer (1995). "Detection of DNA in single cells using an automated cell deposition unit and PCR." Biotechniques **19**(4): 616-20.
- Bieganowska, K. D., L. J. Ausubel, Y. Modabber, E. Slovik, W. Messersmith and D. A. Hafler (1997). "Direct ex vivo analysis of activated, Fas-sensitive autoreactive T cells in human autoimmune disease." J Exp Med **185**(9): 1585-94.
- Bouso, P., N. R. Bhakta, R. S. Lewis and E. Robey (2002). "Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy." Science **296**(5574): 1876-80.
- Brocke, T. (1997). "Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells." J Exp Med **186**(8): 1223-32.
- Buckley, C., D. Douek, J. Newsom-Davis, A. Vincent and N. Willcox (2001a). "Mature, long-lived CD4+ and CD8+ T cells are generated by the thymoma in myasthenia gravis." Ann Neurol **50**(1): 64-72.
- Buckley, C., J. Newsom-Davis, N. Willcox and A. Vincent (2001b). "Do titin and cytokine antibodies in MG patients predict thymoma or thymoma recurrence?" Neurology **57**(9): 1579-82.
- Burnet, F. M. (1962). "The immunological significance of the thymus: an extension of the clonal selection theory of immunity." Australas Ann Med **11**: 79-91.
- Cepok, S., M. Jacobsen, S. Schock, B. Omer, S. Jaekel, I. Boddeker, W. H. Oertel, N. Sommer and B. Hemmer (2001). "Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis." Brain **124**(Pt 11): 2169-76.
- Chiu, H. C., A. Vincent, J. Newsom-Davis, K. H. Hsieh and T. Hung (1987). "Myasthenia gravis: population differences in disease expression and acetylcholine receptor antibody titers between Chinese and Caucasians." Neurology **37**(12): 1854-7.

## 7 Literaturverzeichnis

---

Compston, D. A., A. Vincent, J. Newsom-Davis and J. R. Batchelor (1980). "Clinical, pathological, HLA antigen and immunological evidence for disease heterogeneity in myasthenia gravis." Brain **103**(3): 579-601.

Danska, J. S., A. M. Livingstone, V. Paragas, T. Ishihara and C. G. Fathman (1990). "The presumptive CDR3 regions of both T cell receptor alpha and beta chains determine T cell specificity for myoglobin peptides." J Exp Med **172**(1): 27-33.

Davis, M. M. (1985). "Molecular genetics of the T cell-receptor beta chain." Annu Rev Immunol **3**: 537-60.

Davis, M. M. (1990). "T cell receptor gene diversity and selection." Annu Rev Biochem **59**: 475-96.

Davis, M. M. and P. J. Bjorkman (1988). "T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition." Nature **334**(6181): 395-402.

Deitiker, P., T. Ashizawa and M. Z. Atassi (2000). "Antigen mimicry in autoimmune disease. Can immune responses to microbial antigens that mimic acetylcholine receptor act as initial triggers of Myasthenia gravis?" Hum Immunol **61**(3): 255-65.

Demotz, S., H. M. Grey and A. Sette (1990). "The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation." Science **249**(4972): 1028-30.

Derbinski, J., A. Schulte, B. Kyewski and L. Klein (2001). "Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self." Nat Immunol **2**(11): 1032-9.

Dornmair, K., N. Goebels, H. U. Weltzien, H. Wekerle and R. Hohlfeld (2003). "T-cell-mediated autoimmunity: novel techniques to characterize autoreactive T-cell receptors." Am J Pathol **163**(4): 1215-26.

Douek, D. C., R. D. McFarland, P. H. Keiser, E. A. Gage, J. M. Massey, B. F. Haynes, M. A. Polis, A. T. Haase, M. B. Feinberg, J. L. Sullivan, B. D. Jamieson, J. A. Zack, L. J. Picker and R. A. Koup (1998). "Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection." Nature **396**(6712): 690-5.

Drachman, D. B., R. N. Adams, L. F. Josifek and S. G. Self (1982). "Functional activities of autoantibodies to acetylcholine receptors and the clinical severity of myasthenia gravis." N Engl J Med **307**(13): 769-75.

## 7 Literaturverzeichnis

---

- Drachman, D. B., C. W. Angus, R. N. Adams, J. D. Michelson and G. J. Hoffman (1978). "Myasthenic antibodies cross-link acetylcholine receptors to accelerate degradation." N Engl J Med **298**(20): 1116-22.
- Engel, A. G. (1984). "Myasthenia gravis and myasthenic syndromes." Ann Neurol **16**(5): 519-34.
- Engel, A. G. and K. Arahata (1987). "The membrane attack complex of complement at the endplate in myasthenia gravis." Ann N Y Acad Sci **505**: 326-32.
- Engel, A. G., E. H. Lambert and F. M. Howard (1977). "Immune complexes (IgG and C3) at the motor end-plate in myasthenia gravis: ultrastructural and light microscopic localization and electrophysiologic correlations." Mayo Clin Proc **52**(5): 267-80.
- Epperson, D. E., R. Nakamura, Y. Sauntharajah, J. Melenhorst and A. J. Barrett (2001). "Oligoclonal T cell expansion in myelodysplastic syndrome: evidence for an autoimmune process." Leuk Res **25**(12): 1075-83.
- Esser, M. T., R. D. Dinglasan, B. Krishnamurthy, C. A. Gullo, M. B. Graham and V. L. Braciale (1997). "IL-2 induces Fas ligand/Fas (CD95L/CD95) cytotoxicity in CD8+ and CD4+ T lymphocyte clones." J Immunol **158**(12): 5612-8.
- Evavold, B. D., J. Sloan-Lancaster, K. J. Wilson, J. B. Rothbard and P. M. Allen (1995). "Specific T cell recognition of minimally homologous peptides: evidence for multiple endogenous ligands." Immunity **2**(6): 655-63.
- Even, J., A. Lim, I. Puisieux, L. Ferradini, P. Y. Dietrich, A. Toubert, T. Hercend, F. Triebel, C. Pannetier and P. Kourilsky (1995). "T-cell repertoires in healthy and diseased human tissues analysed by T-cell receptor beta-chain CDR3 size determination: evidence for oligoclonal expansions in tumours and inflammatory diseases." Res Immunol **146**(2): 65-80.
- Fujinami, R. S. and M. B. Oldstone (1985). "Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity." Science **230**(4729): 1043-5.
- Gajdos, P., S. Chevret, B. Clair, C. Tranchant and C. Chastang (1997). "Clinical trial of plasma exchange and high-dose intravenous immunoglobulin in myasthenia gravis. Myasthenia Gravis Clinical Study Group." Ann Neurol **41**(6): 789-96.

## 7 Literaturverzeichnis

---

Gajewski, T. F., M. Pinnas, T. Wong and F. W. Fitch (1991). "Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations." J Immunol **146**(6): 1750-8.

Garcia, K. C., M. Degano, R. L. Stanfield, A. Brunmark, M. R. Jackson, P. A. Peterson, L. Teyton and I. A. Wilson (1996). "An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 A and its orientation in the TCR-MHC complex." Science **274**(5285): 209-19.

Genevee, C., A. Diu, J. Nierat, A. Caignard, P. Y. Dietrich, L. Ferradini, S. Roman-Roman, F. Triebel and T. Hercend (1992). "An experimentally validated panel of subfamily-specific oligonucleotide primers (V alpha 1-w29/V beta 1-w24) for the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction." Eur J Immunol **22**(5): 1261-9.

Gigliotti, D., A. K. Lefvert, M. Jeddi-Tehrani, S. Esin, V. Hodara, R. Pirskanen, H. Wigzell and R. Andersson (1996). "Overexpression of select T cell receptor V beta gene families within CD4+ and CD8+ T cell subsets of myasthenia gravis patients: a role for superantigen(s)?" Mol Med **2**(4): 452-9.

Grob, D. (1999). "The natural history of myasthenia gravis." In: Engel, AG, ed. Myasthenia gravis and myasthenic disorders. Oxford: Oxford University Press. Contemporary Neurology Series, 1999: 131-45.

Hemmer, B., B. T. Fleckenstein, M. Vergelli, G. Jung, H. McFarland, R. Martin and K. H. Wiesmuller (1997). "Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone." J Exp Med **185**(9): 1651-9.

Hemmer, B., M. Jacobsen and N. Sommer (2000). "Degeneracy in T-cell antigen recognition - implications for the pathogenesis of autoimmune diseases." J Neuroimmunol **107**(2): 148-53.

Hemmer, B., M. Vergelli, B. Gran, N. Ling, P. Conlon, C. Pinilla, R. Houghten, H. F. McFarland and R. Martin (1998a). "Predictable TCR antigen recognition based on peptide scans leads to the identification of agonist ligands with no sequence homology." J Immunol **160**(8): 3631-6.

Hemmer, B., M. Vergelli, C. Pinilla, R. Houghten and R. Martin (1998b). "Probing degeneracy in T-cell recognition using peptide combinatorial libraries." Immunol Today **19**(4): 163-8.

## 7 Literaturverzeichnis

---

- Hill, M., D. Beeson, P. Moss, L. Jacobson, A. Bond, L. Corlett, J. Newsom-Davis, A. Vincent and N. Willcox (1999). "Early-onset myasthenia gravis: a recurring T-cell epitope in the adult-specific acetylcholine receptor epsilon subunit presented by the susceptibility allele HLA-DR52a." Ann Neurol **45**(2): 224-31.
- Hingorani, R., I. H. Choi, P. Akolkar, B. Gulwani-Akolkar, R. Pergolizzi, J. Silver and P. K. Gregersen (1993). "Clonal predominance of T cell receptors within the CD8+ CD45RO+ subset in normal human subjects." J Immunol **151**(10): 5762-9.
- Hoch, W., J. McConville, S. Helms, J. Newsom-Davis, A. Melms and A. Vincent (2001). "Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies." Nat Med **7**(3): 365-8.
- Hogquist, K. A., T. A. Baldwin and S. C. Jameson (2005). "Central tolerance: learning self-control in the thymus." Nat Rev Immunol **5**(10): 772-82.
- Hohlfeld, R., I. Kalies, B. Kohleisen, K. Heininger, B. Conti-Tronconi and K. V. Toyka (1986). "Myasthenia gravis: stimulation of antireceptor autoantibodies by autoreactive T cell lines." Neurology **36**(5): 618-21.
- Hohlfeld, R., K. V. Toyka, K. Heininger, H. Grosse-Wilde and I. Kalies (1984). "Autoimmune human T lymphocytes specific for acetylcholine receptor." Nature **310**(5974): 244-6.
- Hunt, D. F., R. A. Henderson, J. Shabanowitz, K. Sakaguchi, H. Michel, N. Sevilir, A. L. Cox, E. Appella and V. H. Engelhard (1992). "Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry." Science **255**(5049): 1261-3.
- Im, S. H., D. Barchan, T. Feferman, L. Raveh, M. C. Souroujon and S. Fuchs (2002). "Protective molecular mimicry in experimental myasthenia gravis." J Neuroimmunol **126**(1-2): 99-106.
- Infante, A. J., J. Baillargeon, E. Kraig, L. Lott, C. Jackson, G. J. Hammerling, R. Raju and C. David (2003). "Evidence of a diverse T cell receptor repertoire for acetylcholine receptor, the autoantigen of myasthenia gravis." J Autoimmun **21**(2): 167-74.
- Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka and S. Sakaguchi (1999). "Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance." J Immunol **162**(9): 5317-26.

## 7 Literaturverzeichnis

---

Jacobsen, M., S. Cepok, E. Quak, M. Happel, R. Gaber, A. Ziegler, S. Schock, W. H. Oertel, N. Sommer and B. Hemmer (2002). "Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients." Brain **125**(Pt 3): 538-50.

Jacobsen, M., D. Zhou, S. Cepok, S. Nessler, M. Happel, S. Stei, B. Wilske, N. Sommer and B. Hemmer (2003). "Clonal accumulation of activated CD8+ T cells in the central nervous system during the early phase of neuroborreliosis." J Infect Dis **187**(6): 963-73.

Jambou, F., W. Zhang, M. Menestrier, I. Klingel-Schmitt, O. Michel, S. Caillat-Zucman, A. Aissaoui, L. Landemarre, S. Berrih-Aknin and S. Cohen-Kaminsky (2003). "Circulating regulatory anti-T cell receptor antibodies in patients with myasthenia gravis." J Clin Invest **112**(2): 265-74.

Janeway, C., P. Travers, M. Walport and M. Shlomchik (2001a). "General properties of armed effector T cells." Immunobiology **5th ed.**(Garland Publishing): 319-328.

Janeway, C., P. Travers, M. Walport and M. Shlomchik (2001b). "T cell receptor gene rearrangement." Immunobiology **5th ed.**(Garland Publishing): 137-141.

Kersh, G. J. and P. M. Allen (1996). "Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen." Nature **380**(6574): 495-8.

Kirberg, J., A. Berns and H. von Boehmer (1997). "Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules." J Exp Med **186**(8): 1269-75.

Kirchner, T., B. Schalke, A. Melms, T. von Kugelgen and H. K. Muller-Hermelink (1986). "Immunohistological patterns of non-neoplastic changes in the thymus in Myasthenia gravis." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol **52**(3): 237-57.

Koga, M., N. Yuki, Y. Tsukada, K. Hirata and Y. Matsumoto (2003). "CDR3 spectratyping analysis of the T cell receptor repertoire in Guillain-Barre and Fisher syndromes." J Neuroimmunol **141**(1-2): 112-7.

Kolowos, W., M. Schmitt, M. Herrman, E. Harrer, P. Low, J. R. Kalden and T. Harrer (1999). "Biased TCR repertoire in HIV-1-infected patients due to clonal expansion of HIV-1-reverse transcriptase-specific CTL clones." J Immunol **162**(12): 7525-33.

Kornstein, M. J., O. Asher and S. Fuchs (1995). "Acetylcholine receptor alpha-subunit and myogenin mRNAs in thymus and thymomas." Am J Pathol **146**(6): 1320-4.

## 7 Literaturverzeichnis

---

Kotzin, B. L., S. Karuturi, Y. K. Chou, J. Lafferty, J. M. Forrester, M. Better, G. E. Nedwin, H. Offner and A. A. Vandenberg (1991). "Preferential T-cell receptor beta-chain variable gene use in myelin basic protein-reactive T-cell clones from patients with multiple sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 9161-5.

Kuks, J. B., H. J. Oosterhuis, P. C. Limburg and T. H. The (1991). "Anti-acetylcholine receptor antibodies decrease after thymectomy in patients with myasthenia gravis. Clinical correlations." J Autoimmun **4**(2): 197-211.

Kumar, V., V. Bhardwaj, L. Soares, J. Alexander, A. Sette and E. Sercarz (1995). "Major histocompatibility complex binding affinity of an antigenic determinant is crucial for the differential secretion of interleukin 4/5 or interferon gamma by T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9510-4.

Lange, D. J. (1997). "Electrophysiologic testing of neuromuscular transmission." Neurology **48** (suppl 5): 18-22.

Lauriola, L., F. Ranelletti, N. Maggiano, M. Guerriero, C. Punzi, F. Marsili, E. Bartoccioni and A. Evoli (2005). "Thymus changes in anti-MuSK-positive and -negative myasthenia gravis." Neurology **64**(3): 536-8.

Lehmann, P. V., T. Forsthuber, A. Miller and E. E. Sercarz (1992). "Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen." Nature **358**(6382): 155-7.

Leiden, J. M., D. P. Dialynas, A. D. Duby, C. Murre, J. Seidman and J. L. Strominger (1986). "Rearrangement and expression of T-cell antigen receptor genes in human T-lymphocyte tumor lines and normal human T-cell clones: evidence for allelic exclusion of Ti beta gene expression and preferential use of a J beta 2 gene segment." Mol Cell Biol **6**(9): 3207-14.

Levine, B. L., W. B. Bernstein, M. Connors, N. Craighead, T. Lindsten, C. B. Thompson and C. H. June (1997). "Effects of CD28 costimulation on long-term proliferation of CD4+ T cells in the absence of exogenous feeder cells." J Immunol **159**(12): 5921-30.

Lim, A., L. Trautmann, M. A. Peyrat, C. Couedel, F. Davodeau, F. Romagne, P. Kourilsky and M. Bonneville (2000). "Frequent contribution of T cell clonotypes with public TCR features to the chronic response against a dominant EBV-derived epitope: application to direct detection of their molecular imprint on the human peripheral T cell repertoire." J Immunol **165**(4): 2001-11.

## 7 Literaturverzeichnis

---

- Lindstrom, J. M., M. E. Seybold, V. A. Lennon, S. Whittingham and D. D. Duane (1976). "Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value." Neurology **26**(11): 1054-9.
- Link, H., O. Olsson, J. Sun, W. Z. Wang, G. Andersson, H. P. Ekre, T. Brenner, O. Abramsky and T. Olsson (1991). "Acetylcholine receptor-reactive T and B cells in myasthenia gravis and controls." J Clin Invest **87**(6): 2191-6.
- Link, H., Z. Y. Xu, A. Melms, H. Kalbacher, J. B. Sun, Z. Y. Wang, S. Fredrikson and T. Olsson (1992). "The T-cell repertoire in myasthenia gravis involves multiple cholinergic receptor epitopes." Scand J Immunol **36**(3): 405-14.
- Maggi, G., C. Casadio, A. Cavallo, R. Cianci, M. Molinatti and E. Ruffini (1991). "Thymoma: results of 241 operated cases." Ann Thorac Surg **51**(1): 152-6.
- Maloy, K. J. and F. Powrie (2001). "Regulatory T cells in the control of immune pathology." Nat Immunol **2**(9): 816-22.
- Marx, A., T. Kirchner, F. Hoppe, R. O'Connor, B. Schalke, S. Tzartos and H. K. Muller-Hermelink (1989). "Proteins with epitopes of the acetylcholine receptor in epithelial cell cultures of thymomas in myasthenia gravis." Am J Pathol **134**(4): 865-77.
- Marx, A., A. Wilisch, A. Schultz, S. Gattenlohner, R. Nenninger and H. K. Muller-Hermelink (1997). "Pathogenesis of myasthenia gravis." Virchows Arch **430**(5): 355-64.
- Mason, D. (1998). "A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor." Immunol Today **19**(9): 395-404.
- Matsuo, H., A. P. Batocchi, S. Hawke, M. Nicolle, L. Jacobson, A. Vincent, J. Newsom-Davis and N. Willcox (1995). "Peptide-selected T cell lines from myasthenia gravis patients and controls recognize epitopes that are not processed from whole acetylcholine receptor." J Immunol **155**(7): 3683-92.
- Mayer, L., S. M. Fu and H. G. Kunkel (1985). "Rapid generation of human T cell hybridomas." J Immunol Methods **81**(2): 271-81.
- McLachlan, S. M. and B. Rapoport (1995). "Heterogeneity of organ-specific autoimmune diseases." Immunol Today **16**(9): 457-8.
- Meager, A., M. Wadhwa, P. Dilger, C. Bird, R. Thorpe, J. Newsom-Davis and N. Willcox (2003). "Anti-cytokine autoantibodies in autoimmunity: preponderance of neutralizing autoantibodies against interferon-alpha, interferon-omega and interleukin-

## 7 Literaturverzeichnis

---

12 in patients with thymoma and/or myasthenia gravis." Clin Exp Immunol **132**(1): 128-36.

Melms, A., Hohlfeld, R. (2003). Myasthenia gravis und myasthene Syndrome. In: Brandt, T., Dichgans, J. und Diener H.C. (Hrsg.) Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen. 4. Auflage. Verlag W. Kohlhammer.

Melms, A., G. Malcherek, U. Gern, H. Wietholter, C. A. Muller, R. Schoepfer and J. Lindstrom (1992). "T cells from normal and myasthenic individuals recognize the human acetylcholine receptor: heterogeneity of antigenic sites on the alpha-subunit." Ann Neurol **31**(3): 311-8.

Mertens, H. G., F. Balzereit and M. Leipert (1969). "The treatment of severe myasthenia gravis with immunosuppressive agents." Eur Neurol **2**(6): 321-39.

Moiola, L., M. P. Protti, D. McCormick, J. F. Howard and B. M. Conti-Tronconi (1994). "Myasthenia gravis. Residues of the alpha and gamma subunits of muscle acetylcholine receptor involved in formation of immunodominant CD4+ epitopes." J Immunol **152**(9): 4686-98.

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.

Muraro, P. A., M. Jacobsen, A. Necker, J. W. Nagle, R. Gaber, N. Sommer, W. H. Oertel, R. Martin and B. Hemmer (2000). "Rapid identification of local T cell expansion in inflammatory organ diseases by flow cytometric T cell receptor Vbeta analysis." J Immunol Methods **246**(1-2): 131-43.

Mygland, A., O. B. Tysnes, R. Matre, P. Volpe, J. A. Aarli and N. E. Gilhus (1992). "Ryanodine receptor autoantibodies in myasthenia gravis patients with a thymoma." Ann Neurol **32**(4): 589-91.

Nagvekar, N., L. Corlett, L. W. Jacobson, H. Matsuo, R. Chalkley, P. C. Driscoll, S. Deshpande, E. G. Spack and N. Willcox (1999). "Scanning a DRB3\*0101 (DR52a)-restricted epitope cross-presented by DR3: overlapping natural and artificial determinants in the human acetylcholine receptor." J Immunol **162**(7): 4079-87.

Naucler, C. S., S. Larsson and E. Moller (1996). "A novel mechanism for virus-induced autoimmunity in humans." Immunol Rev **152**: 175-92.

## 7 Literaturverzeichnis

---

- Navaneetham, D., A. S. Penn, J. F. Howard, Jr. and B. M. Conti-Fine (1998). "TCR-Vbeta usage in the thymus and blood of myasthenia gravis patients." J Autoimmun **11**(6): 621-33.
- Nenninger, R., A. Schultz, V. Hoffacker, M. Helmreich, A. Wilisch, B. Vandekerckhove, T. Hunig, B. Schalke, C. Schneider, S. Tzartos, H. Kalbacher, H. K. Muller-Hermelink and A. Marx (1998). "Abnormal thymocyte development and generation of autoreactive T cells in mixed and cortical thymomas." Lab Invest **78**(6): 743-53.
- Newsom-Davis, J. (1988). "Autoimmunity in neuromuscular disease." Ann N Y Acad Sci **540**: 25-38.
- Newsom-Davis, J., A. J. Pinching, A. Vincent and S. G. Wilson (1978). "Function of circulating antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: investigation by plasma exchange." Neurology **28**(3): 266-72.
- O'Garra, A. (1998). "Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets." Immunity **8**(3): 275-83.
- Okada, C. Y. and I. L. Weissman (1989). "Relative V beta transcript levels in thymus and peripheral lymphoid tissues from various mouse strains. Inverse correlation of I-E and MIs expression with relative abundance of several V beta transcripts in peripheral lymphoid tissues." J Exp Med **169**(5): 1703-19.
- Ong, B., N. Willcox, P. Wordsworth, D. Beeson, A. Vincent, D. Altmann, J. S. Lanchbury, G. C. Harcourt, J. I. Bell and J. Newsom-Davis (1991). "Critical role for the Val/Gly86 HLA-DR beta dimorphism in autoantigen presentation to human T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7343-7.
- Oosterhuis, H. J. (1989). "The natural course of myasthenia gravis: a long term follow up study." J Neurol Neurosurg Psychiatry **52**(10): 1121-7.
- Osserman, K. E. and G. Genkins (1971). "Studies in myasthenia gravis: review of a twenty-year experience in over 1200 patients." Mt Sinai J Med **38**(6): 497-537.
- Palmer, E. (2003). "Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire." Nat Rev Immunol **3**(5): 383-91.
- Pannetier, C., J. Even and P. Kourilsky (1995). "T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples." Immunol Today **16**(4): 176-81.

## 7 Literaturverzeichnis

---

Pascuzzi, R. M., H. B. Coslett and T. R. Johns (1984). "Long-term corticosteroid treatment of myasthenia gravis: report of 116 patients." Ann Neurol **15**(3): 291-8.

Pette, M., K. Fujita, D. Wilkinson, D. M. Altmann, J. Trowsdale, G. Giegerich, A. Hinkkanen, J. T. Epplen, L. Kappos and H. Wekerle (1990). "Myelin autoreactivity in multiple sclerosis: recognition of myelin basic protein in the context of HLA-DR2 products by T lymphocytes of multiple-sclerosis patients and healthy donors." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(20): 7968-72.

Pfeiffer, C., J. Stein, S. Southwood, H. Ketelaar, A. Sette and K. Bottomly (1995). "Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo." J Exp Med **181**(4): 1569-74.

Pinching, A. J. and D. K. Peters (1976). "Remission of myasthenia gravis following plasma-exchange." Lancet **2**(8000): 1373-6.

Pirskanen, R. (1976). "Genetic associations between myasthenia gravis and the HL-A system." J Neurol Neurosurg Psychiatry **39**(1): 23-33.

Protti, M. P., A. A. Manfredi, R. M. Horton, M. Bellone and B. M. Conti-Tronconi (1993). "Myasthenia gravis: recognition of a human autoantigen at the molecular level." Immunol Today **14**(7): 363-8.

Protti, M. P., A. A. Manfredi, C. Straub, J. F. Howard, Jr. and B. M. Conti-Tronconi (1990a). "CD4+ T cell response to the human acetylcholine receptor alpha subunit in myasthenia gravis. A study with synthetic peptides." J Immunol **144**(4): 1276-81.

Protti, M. P., A. A. Manfredi, C. Straub, X. D. Wu, J. F. Howard, Jr. and B. M. Conti-Tronconi (1990b). "Use of synthetic peptides to establish anti-human acetylcholine receptor CD4+ cell lines from myasthenia gravis patients." J Immunol **144**(5): 1711-20.

Puisieux, I., J. Even, C. Pannetier, F. Jotereau, M. Favrot and P. Kourilsky (1994). "Oligoclonality of tumor-infiltrating lymphocytes from human melanomas." J Immunol **153**(6): 2807-18.

Reiser, J. B., C. Darnault, A. Guimezanes, C. Gregoire, T. Mosser, A. M. Schmitt-Verhulst, J. C. Fontecilla-Camps, B. Malissen, D. Housset and G. Mazza (2000). "Crystal structure of a T cell receptor bound to an allogeneic MHC molecule." Nat Immunol **1**(4): 291-7.

## 7 Literaturverzeichnis

---

Rieux-Laucat, F., F. Le Deist, F. Selz, A. Fischer and J. P. de Villartay (1993). "Normal T cell receptor V beta usage in a primary immunodeficiency associated with HLA class II deficiency." Eur J Immunol **23**(4): 928-34.

Robertson, N. P., J. Deans and D. A. Compston (1998). "Myasthenia gravis: a population based epidemiological study in Cambridgeshire, England." J Neurol Neurosurg Psychiatry **65**(4): 492-6.

Robey, E. and B. J. Fowlkes (1994). "Selective events in T cell development." Annu Rev Immunol **12**: 675-705.

Romagnani, S. (1997). "The Th1/Th2 paradigm." Immunol Today **18**(6): 263-6.

Saka, E., M. A. Topcuoglu, B. Akkaya, A. Galati, M. Z. Onal and A. Vincent (2005). "Thymus changes in anti-MuSK-positive and -negative myasthenia gravis." Neurology **65**(5): 782-3; author reply 782-3.

Sakaguchi, S. (2005). "Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self." Nat Immunol **6**(4): 345-52.

Salmon, A. M., C. Bruand, A. Cardona, J. P. Changeux and S. Berrih-Aknin (1998). "An acetylcholine receptor alpha subunit promoter confers intrathymic expression in transgenic mice. Implications for tolerance of a transgenic self-antigen and for autoreactivity in myasthenia gravis." J Clin Invest **101**(11): 2340-50.

Salvetti, M., S. Jung, S. F. Chang, H. Will, B. C. Schalke and H. Wekerle (1991). "Acetylcholine receptor-specific T-lymphocyte clones in the normal human immune repertoire: target epitopes, HLA restriction, and membrane phenotypes." Ann Neurol **29**(5): 508-16.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.

Sauerbruch, H., Schumacher, C. H. & P. Roth (1913). "Thymektomie bei einem Fall von Morbus Basedowi mit Myasthenie." Mitteil. Grenzgeb. Med. Chir. **25**: 746-765.

Scadding, G. K., A. Vincent, J. Newsom-Davis and K. Henry (1981). "Acetylcholine receptor antibody synthesis by thymic lymphocytes: correlation with thymic histology." Neurology **31**(8): 935-43.

## 7 Literaturverzeichnis

---

- Schluep, M., N. Willcox, A. Vincent, G. K. Dhoot and J. Newsom-Davis (1987). "Acetylcholine receptors in human thymic myoid cells in situ: an immunohistological study." Ann Neurol **22**(2): 212-22.
- Schreuder, G. M., C. K. Hurley, S. G. Marsh, M. Lau, M. Fernandez-Vina, H. J. Noreen, M. Setterholm and M. Maiers (2005). "The HLA Dictionary 2004: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5 and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR and -DQ antigens." Int J Immunogenet **32**(1): 19-69.
- Schwab, R., P. Szabo, J. S. Manavalan, M. E. Weksler, D. N. Posnett, C. Pannetier, P. Kourilsky and J. Even (1997). "Expanded CD4+ and CD8+ T cell clones in elderly humans." J Immunol **158**(9): 4493-9.
- Schwimmbeck, P. L., T. Dyrberg, D. B. Drachman and M. B. Oldstone (1989). "Molecular mimicry and myasthenia gravis. An autoantigenic site of the acetylcholine receptor alpha-subunit that has biologic activity and reacts immunochemically with herpes simplex virus." J Clin Invest **84**(4): 1174-80.
- Scollay, R. G., E. C. Butcher and I. L. Weissman (1980). "Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice." Eur J Immunol **10**(3): 210-8.
- Shevach, E. M. (2002). "CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers." Nat Rev Immunol **2**(6): 389-400.
- Shiono, H., I. Roxanis, W. Zhang, G. P. Sims, A. Meager, L. W. Jacobson, J. L. Liu, I. Matthews, Y. L. Wong, M. Bonifati, K. Micklem, D. I. Stott, J. A. Todd, D. Beeson, A. Vincent and N. Willcox (2003). "Scenarios for autoimmunization of T and B cells in myasthenia gravis." Ann N Y Acad Sci **998**: 237-56.
- Simpson, J. (1960). "Myasthenia gravis: a new hypothesis." Scott Med J(5): 419-36.
- Sommer, N., G. C. Harcourt, N. Willcox, D. Beeson and J. Newsom-Davis (1991). "Acetylcholine receptor-reactive T lymphocytes from healthy subjects and myasthenia gravis patients." Neurology **41**(8): 1270-6.
- Sommer, N., B. Sigg, A. Melms, M. Weller, K. Schepelmann, V. Herzau and J. Dichgans (1997). "Ocular myasthenia gravis: response to long-term immunosuppressive treatment." J Neurol Neurosurg Psychiatry **62**(2): 156-62.

## 7 Literaturverzeichnis

---

- Sommer, N., N. Willcox, G. C. Harcourt and J. Newsom-Davis (1990). "Myasthenic thymus and thymoma are selectively enriched in acetylcholine receptor-reactive T cells." Ann Neurol **28**(3): 312-9.
- Souroujon, M. C., P. K. Maiti, T. Feferman, S. H. Im, L. Raveh and S. Fuchs (2003). "Suppression of myasthenia gravis by antigen-specific mucosal tolerance and modulation of cytokines and costimulatory factors." Ann N Y Acad Sci **998**: 533-6.
- Steinman, L. (1995). "Escape from "horror autotoxicus": pathogenesis and treatment of autoimmune disease." Cell **80**(1): 7-10.
- Steinmann, G. G. (1986). "Changes in the human thymus during aging." Curr Top Pathol **75**: 43-88.
- Stephens, L. A., C. Mottet, D. Mason and F. Powrie (2001). "Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro." Eur J Immunol **31**(4): 1247-54.
- Strominger, J. L. (1989). "Developmental biology of T cell receptors." Science **244**(4907): 943-50.
- Sykulev, Y., M. Joo, I. Vturina, T. J. Tsomides and H. N. Eisen (1996). "Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response." Immunity **4**(6): 565-71.
- Tackenberg, B., B. Hemmer, W. H. Oertel and N. Sommer (2001). "Immunosuppressive treatment of ocular myasthenia gravis." BioDrugs **15**(6): 369-78.
- Tackenberg, B., J. Kruth, J. E. Bartholomäus, K. Schlegel, A. Hehenkamp, N. Willcox, W. H. Oertel, B. Hemmer and N. Sommer (2007). "Persistend clonal expansions in CD4+ follicular B helper T cells in autoimmune myasthenia gravis." Eur J Immunol (*in press*).
- Tanchot, C., F. A. Lemonnier, B. Perarnau, A. A. Freitas and B. Rocha (1997). "Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells." Science **276**(5321): 2057-62.
- Taussig, M. J. (1987). "Recent research in organization and expression of immunoglobulin V region genes." J Immunogenet **14**(4-5): 179-88.
- Thanvi, B. R. and T. C. Lo (2004). "Update on myasthenia gravis." Postgrad Med J **80**(950): 690-700.

## 7 Literaturverzeichnis

---

Thomas, C. E., S. A. Mayer, Y. Gungor, R. Swarup, E. A. Webster, I. Chang, T. H. Brannagan, M. E. Fink and L. P. Rowland (1997). "Myasthenic crisis: clinical features, mortality, complications, and risk factors for prolonged intubation." Neurology **48**(5): 1253-60.

Toyka, K. V., D. B. Brachman, A. Pestronk and I. Kao (1975). "Myasthenia gravis: passive transfer from man to mouse." Science **190**(4212): 397-9.

Toyka, K. V., D. B. Drachman, D. E. Griffin, A. Pestronk, J. A. Winkelstein, K. H. Fishbeck and I. Kao (1977). "Myasthenia gravis. Study of humoral immune mechanisms by passive transfer to mice." N Engl J Med **296**(3): 125-31.

Trickett, A. and Y. L. Kwan (2003). "T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads." J Immunol Methods **275**(1-2): 251-5.

Truffault, F., S. Cohen-Kaminsky, I. Khalil, P. Levasseur and S. Berrih-Aknin (1997). "Altered intrathymic T-cell repertoire in human myasthenia gravis." Ann Neurol **41**(6): 731-41.

Tzartos, S. J., T. Barkas, M. T. Cung, A. Mamalaki, M. Marraud, P. Orlewski, D. Papanastasiou, C. Sakarellos, M. Sakarellos-Daitsiotis, P. Tsantili and V. Tsikaris (1998). "Anatomy of the antigenic structure of a large membrane autoantigen, the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor." Immunol Rev **163**: 89-120.

Vanderlugt, C. L. and S. D. Miller (2002). "Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy." Nat Rev Immunol **2**(2): 85-95.

Vergelli, M., B. Hemmer, M. Kalbus, A. B. Vogt, N. Ling, P. Conlon, J. E. Coligan, H. McFarland and R. Martin (1997). "Modifications of peptide ligands enhancing T cell responsiveness imply large numbers of stimulatory ligands for autoreactive T cells." J Immunol **158**(8): 3746-52.

Vincent, A. (2002). "Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis." Nat Rev Immunol **2**(10): 797-804.

Vincent, A., J. Bowen, J. Newsom-Davis and J. McConville (2003a). "Seronegative generalised myasthenia gravis: clinical features, antibodies, and their targets." Lancet Neurol **2**(2): 99-106.

## 7 Literaturverzeichnis

---

- Vincent, A., L. Clover, C. Buckley, J. Grimley Evans and P. M. Rothwell (2003b). "Evidence of underdiagnosis of myasthenia gravis in older people." J Neurol Neurosurg Psychiatry **74**(8): 1105-8.
- Vincent, A. and J. Newsom-Davis (1985). "Acetylcholine receptor antibody as a diagnostic test for myasthenia gravis: results in 153 validated cases and 2967 diagnostic assays." J Neurol Neurosurg Psychiatry **48**(12): 1246-52.
- Vincent, A., J. Palace and D. Hilton-Jones (2001). "Myasthenia gravis." Lancet **357**(9274): 2122-8.
- Vincent, A. and N. Willcox (1999). "The role of T-cells in the initiation of autoantibody responses in thymoma patients." Pathol Res Pract **195**(8): 535-40.
- Wagner, U. G., K. Koetz, C. M. Weyand and J. J. Goronzy (1998). "Perturbation of the T cell repertoire in rheumatoid arthritis." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14447-52.
- Walker, M. (1934). "Treatment of myasthenia gravis with physostigmine." Lancet **1**: 1200-1201.
- Walunas, T. L., C. Y. Bakker and J. A. Bluestone (1996). "CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation." J Exp Med **183**(6): 2541-50.
- Wang, Z. Y., D. K. Okita, J. Howard, Jr. and B. M. Conti-Fine (1997). "Th1 epitope repertoire on the alpha subunit of human muscle acetylcholine receptor in myasthenia gravis." Neurology **48**(6): 1643-53.
- Willis, T. (1672). "De anima brutorum." Oxford, UK: Theatro Sheldoniano: 404-6.
- World Medical Association (1964). "World Medical Association Declaration Of Helsinki (1964) - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. 18th WMA General Assembly, Helsinki, Finland, June 1964."
- Xu, B. Y., R. Giscombe, A. Soderlund, M. Troye-Blomberg, R. Pirskanen and A. K. Lefvert (1998). "Abnormal T cell receptor V gene usage in myasthenia gravis: prevalence and characterization of expanded T cell populations." Clin Exp Immunol **113**(3): 456-64.
- Yuki, N. (2001). "Infectious origins of, and molecular mimicry in, Guillain-Barre and Fisher syndromes." Lancet Infect Dis **1**(1): 29-37.

### 8 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Becker, Bertalanffy, Beyer, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, Dodel, Gemsa, Gerdes, Görg, Gotzen, Griss, Gudermann, Hamer, Happle, Hebebrand, Heeg, Hemmer, Hofmann, Kern, Klenk, Klingmüller, Klose, König, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuni, Lill, Lippert, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Radsak, Renschmidt, Renz, Rogausch, Röhm, Rompel, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schepelmann, Schnabel, Schüffel, Schulz, Seitz, Seyberth, Slenczka, Sommer, Steiniger, Stief, Stiletto, Suske, Vogelmeier, Voigt, Weihe, Werner, Westermann, Wulff.

### 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei den Menschen bedanken, die mich in der Zeit meiner Dissertation unterstützt haben:

Meinem Doktorvater **Prof. Dr. Norbert Sommer** danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie für die Überlassung des spannenden Themas. Ich bin davon überzeugt, in seinem Labor eine Menge gelernt zu haben! Auf seine hilfsbereite Unterstützung und seinen guten Rat konnte ich mich jederzeit verlassen.

Herrn **Prof. Dr. Wolfgang H. Oertel**, Direktor der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Marburg und Gießen, Standort Marburg, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Laboreinrichtungen sowie der nötigen infrastrukturellen Voraussetzungen.

Meinem Betreuer **Dr. Björn Tackenberg** danke ich für die hervorragende Betreuung meiner Dissertation sowie für zahlreiche laienpsychologische Diskussionen... Ohne die durch ihn erfolgte sehr gute Einarbeitung und die stets kritische Auseinandersetzung der Ergebnisse hätte diese Arbeit sicherlich nicht zum erlangten Erfolg geführt!

Bei **Prof. Dr. Andreas Neubauer**, Direktor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie des Universitätsklinikums Marburg und Gießen, Standort Marburg, und bei **PD Dr. Jörg Beyer** bedanke ich mich für die HLA-Analyse der MG-T-Zellklone.

Meinem Komillitonen und Freund **Michael („Prinz“) Sieren** danke ich für die vielen Stunden, die wir in den letzten Jahren tatkräftig im Labor (und im Studium) miteinander verbracht haben sowie für die gegenseitige (seelische) „Wiederaufbauhilfe“ in vielen stressigen Phasen.

Meiner Komillitonin **Johanna Bartholomäus** danke ich für die gute Zusammenarbeit bei unseren gemeinsamen Forschungen an der Myasthenia gravis.

Bei **Kerstin Schlegel** möchte ich mich für die Unterstützung meiner Arbeiten sowie für viele gut gelaunte Stunden an der Bench bedanken, außerdem natürlich für die zahlreichen Bereitstellungen ihres schönen Automobils, und nicht zuletzt für die intensive (Vit. B-)Hilfe bei der Organisation eines Leihwagens in die Schweiz.

## 9 Danksagung

---

Allen sonstigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Neuroimmunologie sei an dieser Stelle für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und hilfreiche Tipps gedankt:

**Dr. Alwina Bittner, Rosi Burmester, Michael Happel, Annette Hehenkamp, Christine Höft** und **Susanne Stei**.

Bei meinen Kommilitonen und Freunden **Michael Küper, Michael Püsken** und **Rüdiger Spormann** bedanke ich mich für eine unvergessliche Zeit während des gesamten Studiums in Marburg.

Meiner Freundin **Mirjam Peter** möchte ich hiermit besonders danken: zum einen für die vielen sachlichen Ratschläge, aber auch ganz besonders für den emotionalen Beistand, der mir gerade in der stressigen Endphase der Dissertation den Rücken gestärkt hat.

Mein allergrößter Dank gilt meiner Familie, namentlich meinem Vater **Bernhard Kruth** sowie meinen Geschwistern **Rainer, Birgit** und **Sylvia**. Ohne den ständigen Zuspruch, das stetige Vertrauen sowie die finanzielle Unterstützung wäre mir ein erfolgreiches Studium nicht möglich gewesen.

Jens Kruth

Heidelberg, den 13.11.2006

### 10 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Jens Kruth, geboren am 19. Juni 1978 in Sögel, ehrenwörtlich, dass ich meine dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegte Dissertation *Klonale Expansion CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der autoimmunen Myasthenia gravis* unter Leitung von Prof. Dr. N. Sommer selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich bei der Abfassung der Arbeit keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde weder in jetziger noch in ähnlicher Form bei einer anderen Hochschule im In- oder Ausland eingereicht noch hat sie sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Maßgebliche Inhalte dieser Arbeit fanden Eingang in folgenden Veröffentlichungen:

#### Originalarbeiten:

Tackenberg B, **Kruth J**, Bartholomaeus JE, Schlegel K, Willcox N, Hehenkamp A, Oertel WH, Hemmer B, Sommer N. Clonal expansions of CD4<sup>+</sup> B helper T cells in autoimmune myasthenia gravis. *Eur J Immunol* 2007 (im Druck)

#### Zitierfähige Vorträge:

Tackenberg B, Bartholomaeus JE, **Kruth J**, Cepok S, Nessler SA, Oertel WH, Hemmer B, Sommer N. Skewed T-cell receptor V $\beta$  usage of CD4 positive T cells in peripheral blood from patients with autoimmune myasthenia gravis Skewed T-cell receptor V $\beta$  usage of CD4 positive T cells in peripheral blood from patients with autoimmune myasthenia gravis. *J Neurol* 2002; 249 (S1): 58

Tackenberg B, Bartholomäus JE, Schlegel K, **Kruth J**, Happel M, Oertel WH, Hemmer B, Willcox N, Sommer N. Immunzytologie und Klonalität TCR V $\beta$ -spezifisch expandierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der autoimmunen Myasthenia gravis. *Akt Neurol* 2005; 32 (S4): S132

## 10 Ehrenwörtliche Erklärung

---

### Preise:

1. Preis beim 5. Kleinen Hirntag der Philipps-Universität Marburg, Marburg 2003

Vortrag: „Klonal expandierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der autoimmunen Myasthenia gravis“.

---

**Ort, Datum**

---

**Unterschrift**

# 11 Lebenslauf

### ***Persönliche Daten***

Name	Jens Kruth
Geburtsdatum und –ort	19. Juni 1978 in Sögel

### ***Schulbildung***

1984 – 1988	Grundschule Ahlen (Emsland)
1988 – 1990	Orientierungsstufe Dörpen
1990 – 1997	Hümming-Gymnasium Sögel 06/1997 Allgemeine Hochschulreife

### ***Zivildienst***

1997 – 1998	Zivildienst bei der Malteser Hilfsdienst gGmbH Papenburg, Bereich Rettungsdienst 05/1998 Prüfung zum Rettungssanitäter
-------------	--

### ***Hochschulausbildung***

1998 – 2005	Medizinstudium an der Philipps-Universität Marburg 09/2000 Physikum 09/2001 1. Staatsexamen 04/2004 2. Staatsexamen Praktisches Jahr:
04/2004 – 04/2005	Neurologie, Chirurgie (Marburg) Innere Medizin (Universitätsspital Zürich, Schweiz) 06/2005 3. Staatsexamen und Approbation als Arzt

### ***Berufliche Tätigkeit***

seit Oktober 2005	Assistenzarzt III. Medizinische Klinik (Hämatologie und Onkologie) Direktor: Prof. Dr. Rüdiger Hehlmann Universitätsklinikum Mannheim Medizinische Fakultät Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
-------------------	---