

Der Einfluss einer fünftägigen Behandlung mit intravenösen Immunglobulinen (IVIg) auf die Konzentration und Expression von B-Zell aktivierender Faktor (BAFF) sowie Proliferation-induzierender Ligand (APRIL) und die Expression der BAFF-Rezeptoren im Blut von Patienten mit Myasthenia gravis und Immunneuropathien

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Spreunat, Anne-Teresa Juliane, geb. Karg  
aus Dresden

Gießen 2024

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Klinik für Neurologie am Standort Gießen

Gutachter: Professor Dr. med. Franz Blaes

Gutachter: Professor Dr. med. Uwe Lange

Tag der Disputation: 17.09.2025

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Autoimmunität.....	1
1.2. BAFF, APRIL und deren Rezeptoren.....	4
1.2.1. Struktur und Expression der Liganden BAFF und APRIL.....	4
1.2.2. Die Rezeptoren TACI, BCMA und BAFF-R.....	5
1.2.3. Die Aufgaben von BAFF und APRIL.....	8
1.2.4. Die Rolle von BAFF und APRIL bei Autoimmunerkrankungen.....	10
1.3. Neurologische Autoimmunerkrankungen.....	11
1.3.1. Myasthenia gravis.....	12
1.3.2. Chronisch Inflammatorische Demyelinisierende Polyneuropathie.....	13
1.3.3. BAFF und APRIL in Myasthenia gravis und Immunneuropathien.....	14
1.4. Therapie mit intravenösen Immunglobulinen.....	14
1.5. Fragestellungen.....	16
2. Material und Methoden.....	17
2.1. Patienten.....	17
2.2. Probenmaterial.....	19
2.3. Methoden.....	20
2.3.1. Durchflusszytometrie.....	20
2.3.2. ELISA.....	22
2.4. Statistik.....	24
3. Resultate.....	25
3.1. Konzentrationen von BAFF und APRIL im Serum von Patienten mit Myasthenia gravis, Patienten mit Immunneuropathien und gesunden Probanden an Tag 1, Tag 3 und Tag 5.....	25
3.1.1. Vergleich der BAFF- und APRIL-Konzentrationen zwischen gesunden Probanden und Patientengruppen an Tag 1.....	25
3.1.2. Vergleich der BAFF- und APRIL-Konzentrationen innerhalb der Patientengruppen Tag 1 bis Tag 5.....	26
3.2. Expression von BAFF, APRIL und den BAFF-Rezeptoren auf und in Blutzellen von Patienten mit Myasthenia gravis, Patienten mit Immunneuropathien und gesunden Probanden an Tag 1, Tag 3 und Tag 5.....	29
3.2.1. Vergleich der zellulären BAFF-Expression der CD14+Monozyten.....	29
3.2.2. Vergleich der zellulären APRIL-Expression der CD14+Monozyten.....	32

3.2.3. Vergleich der zellulären TACI-, BCMA- und BAFF-R-Expression der CD19+B-Zellen.....	35
4. Diskussion.....	40
4.1. Konzentrationen und Expression von BAFF, APRIL und den BAFF-Rezeptoren bei Patienten mit Myasthenia gravis, Patienten mit Immunneuropathien und gesunden Probanden .....	40
4.2. Die Effekte von IVIg insbesondere auf BAFF, APRIL und die BAFF-Rezeptoren .....	43
4.3. Schlussfolgerung .....	47
5. Zusammenfassung/Summary .....	48/49
6. Abkürzungsverzeichnis .....	50
7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	53
8. Literaturverzeichnis .....	56
9. Publikationen aus der Dissertation.....	73
10. Ehrenwörtliche Erklärung .....	74
11. Danksagung .....	75

# 1. Einleitung

## 1.1. Autoimmunität

Autoimmunität ist die Folge der Unfähigkeit des Immunsystems zur Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd. Die Entstehung einer Autoimmunerkrankung geschieht durch das Zusammenspiel verschiedener Mechanismen, wobei eine Prädisposition vorhanden sein muss, auf welche triggernde Ereignisse treffen (Shoenfeld & Isenberg 1989). Autoimmunerkrankungen sind durch eine Bandbreite an klinischen Manifestationen und das Auftreten von Autoantikörpern und/oder autoreaktiven T-Zellen gekennzeichnet (Shoenfeld & Isenberg 1989).

Zum Verständnis sollen kurz die Aufgabe und Wirkungsweise des Immunsystems erläutert werden. Das Immunsystem hat die Funktion, den Organismus vor pathogenen Erregern zu schützen (George et al. 1996). Dies geschieht durch eine gezielte Immunreaktion, welche aus der Interaktion einer zellulären und einer humoralen Komponente besteht (George et al. 1996). Die erworbene zelluläre Immunreaktion wird durch T-Zellen vermittelt, während die erworbene humorale Immunreaktion durch die Antikörper der B-Zellen durchgeführt wird (George et al. 1996). Die Präsentation von Antigenbestandteilen, sogenannten Epitopen, durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) an T-Zellen startet die Immunantwort (George et al. 1996). Zu den APC gehören u.a. Makrophagen, Dendritische Zellen oder B-Zellen. Die Präsentation findet über MHC-Moleküle (*Major Histocompatibility Complex*, Haupthistokompatibilitätskomple), welche auch HLA (*Human Leucocyte Antigen*, humane Leukozytenantigene) genannt werden, statt (Ada & Rose 1988). Zytokine koordinieren die Immunreaktion (George et al. 1996). Das Immunsystem muss zudem in der Lage sein, körpereigene Bestandteile von fremden Antigenen zu unterscheiden. Dies nennt man Selbst-Toleranz. Die zentrale Toleranz bezieht sich dabei auf die Entwicklung und Selektionierung der T-Zellen im Thymus (Boyton & Altmann 2002). Da dennoch autoreaktive T-Zellen dieses Organ verlassen können, muss auch eine periphere Toleranz existieren (Boyton & Altmann 2002). Diese versetzt pathogene T-Zellen in Anergie, führt sie in die Apoptose oder lässt sie durch regulatorische T-Zellen supprimieren (Boyton & Altmann 2002).

Kriterien für das Vorliegen einer Autoimmunerkrankung wurden erstmals 1957 von Witebsky et al. definiert und klassifiziert und 1993 von Rose und Bona revidiert (Rose & Bona 1993; WITEBSKY et al. 1957). Grundlage für die Einordnung einer Erkrankung als Autoimmunerkrankung heutzutage stellen immer noch diese klassischen Kriterien dar. Diese fordern 1. den Nachweis der Existenz von Autoantikörpern oder autoreaktiven Zellen, 2. die Identifikation eines definierten Autoantigens und 3. die Induktion einer ähnlichen Autoimmunantwort und Krankheit wie im Menschen im Tierexperiment durch Transfer von Autoantikörpern oder T-Zellen.

Bei der Entwicklung einer Autoimmunerkrankung sind mehrere Faktoren beteiligt; u.a. die genetische Prädisposition eines Menschen, Umgebungsfaktoren und Störungen des Immunsystems (Christen & Herrath 2004; Sarvetnick & Ohashi 2003). Die genauen Mechanismen bei einzelnen Autoimmunerkrankungen sind jedoch oft unbekannt.

**Genetischer Hintergrund:** Der MHC stellt einen Komplex aus mehreren Genen mit einer hohen Zahl an Polymorphismen dar. Die MHC-Moleküle werden auf den Oberflächen verschiedener Zelltypen exprimiert. MHC-II-Moleküle haben die Aufgabe, Teile von (konformationalen) Fremd-Antigenen nach erfolgter Phagozytose durch eine APC zu präsentieren (Babbitt et al. 1985; Buus et al. 1986). Dagegen zeigen MHC-I-Moleküle Zell-interne, lineare Proteinantigene (Townsend et al. 1986). Einige HLA-Gene gehen mit einem erhöhten Risiko einher, eine bestimmte Autoimmunerkrankung zu entwickeln (Thorsby 1997). So ist zum Beispiel Diabetes mellitus Typ 1 häufig mit HLA DR3/4 assoziiert (Johnston et al. 1983).

**Epigenetische Veränderungen:** Diese sind vererbare Änderungen der Genexpression, die nicht die DNA direkt betreffen, sondern diese z. B. durch DNA-Methylierung modifizieren (Januchowski et al. 2004; Singal & Ginder 1999). Die Methylierung führt normalerweise zu einer Herunterregulierung der DNA-Transkription eines bestimmten Genbereichs (Januchowski et al. 2004; Singal & Ginder 1999). T-Zellen, deren Methylierung gehemmt wurde, zeigten eine Aktivierung in Reaktion auf MHC-Moleküle selbst ohne spezifisches Antigen (Yung et al. 1996). So weisen T-Zellen von SLE-Patienten eine geringere DNA-Methylierung auf, was ein Grund für deren gesteigerte Aktivität sein könnte (Richardson et al. 1990).

**Umgebungsfaktoren:** Die größte Gruppe der umfeldbedingten Urheber stellen Infektionen dar (George & Shoenfeld 1995; Shoenfeld & Isenberg 1988). Infektionen scheinen an der Entwicklung einer Autoimmunitätslage beteiligt zu sein, da infektiöse Erreger Reize für das Immunsystem darstellen, und unter Umständen die Auswahl autoreaktiver Zellen in anfälligen Personen gefördert werden. Ein möglicher Mechanismus stellt die molekulare Nachahmung (*molecular mimicry*) dar (George et al. 1996). Dabei kann es aufgrund struktureller Ähnlichkeiten eines pathogenen, fremden Antigens mit einem Selbst-Antigen zur Bildung von Antikörpern gegen das Selbst-Antigen und damit zum Zusammenbruch der Selbst-Toleranz kommen (Lindsley et al. 1974). Zudem können wohl durch die molekulare Nachahmung kryptische Selbst-Epitope durch autoreaktive B-Zellen aufgrund eines fremden Antigens hochreguliert werden (George et al. 1996). Die physiologische Aufgabe einer Epitopausbreitung ist es sonst, zu einer schnellen und anhaltenden sekundären Immunreaktion mit hohen Antikörperzahlen zu führen (Carl et al. 2005; Christen & Herrath 2004).

**Das idiotypische Netzwerk:** Eine Region der Antigenbindungsseite eines Antikörpers, durch welche die Immunantwort moduliert werden kann, wird auch Idiotyp genannt (Jerne 1984). Gegen diese Region der Antigenbindungsseite können anti-idiotypische Antikörper gebildet werden, welche wiederum immunogen wirken und zur Bildung von anti-Antiidiotypen führen können (Jerne 1984). Das idiotypische Netzwerk übernimmt durch diesen Kreislauf regulatorische Aufgaben in der Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz (Shoenfeld 1994). Es kann jedoch auch durch eine aktive Dysregulation zu einer Autoimmunerkrankung führen (Bakimer et al. 1992; Mendlovic et al. 1988). Zudem können einige Bakterien und Viren eine Selbst-Situation so gut imitieren, dass es zur Hochregulierung von anti-idiotypischen Antikörpern gegen die Antikörper kommt, welche gegen die ursprünglichen Keime gerichtet waren (Jerne 1984).

**Apoptose:** Apoptose ist wichtig für die Gewebekomöostase und Toleranzaufrechterhaltung. Der Oberflächenrezeptor Fas und sein Ligand Fas-L induzieren die Aktivierung der Kaspase-Signalkaskade, welche den geregelten Zelltod herbeiführt (Orbach et al. 2010). Apoptose verringert auf physiologische Weise die Anzahl der immunkompetenten T-Zellen und führt somit zu einer Einschränkung der

Immunantwort mit Verringerung des Risikos der Kreuzreaktivität oder Bildung von Autoantigenen (Dianzani et al. 2003; Nagata & Suda 1995). Mutierte T-Zellen können jedoch der Apoptose widerstehen und unkontrolliert proliferieren (Holzelova et al. 2004).

## **1.2. BAFF, APRIL und deren Rezeptoren**

### 1.2.1. Struktur und Expression der Liganden BAFF und APRIL

B-Zell aktivierender Faktor (*B-cell activating factor*, BAFF), auch bekannt als BLys, TALL-1, THANK, zTNF-a oder TNFSF-13B, und Proliferation-induzierender Ligand (*a proliferation-inducing ligand*, APRIL), der auch TALL-2, TRDL-1 oder TNFSF-13 genannt wird, sind Liganden der Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie (Gross et al. 2000; Hahne et al. 1998; Moore et al. 1999). Die meisten TNF-Liganden sind Typ-II-Membranproteine, die eine Furin-Konvertase-Spaltseite und eine THD (*TNF homology domain*) besitzen (Bodmer et al. 2002).

**BAFF** existiert sowohl in einer membrangebundenen als auch in einer löslichen Form (Cheema et al. 2001; Groom et al. 2002; Moore et al. 1999). Solubler BAFF entsteht durch die Abspaltung des auf der Zelloberfläche gebundenen BAFF (Nardelli et al. 2001; Schneider et al. 1999). BAFF besitzt die für die TNF-Familie typische  $\beta$ -Faltblatt Struktur (Karpusas et al. 2002; Liu et al. 2002; Oren et al. 2002). Löslicher BAFF existiert bei einem pH-Wert von unter 7,4 nur als Trimer (Karpusas et al. 2002; Oren et al. 2002). Ab einem pH-Wert gleich oder über 7,4 formieren sich 20 BAFF-Trimere zu einer Virus-artigen Gruppe (Liu et al. 2002). Das BAFF-60mer ist *in vitro* aktiver als das BAFF-Trimer (Cachero et al. 2006; Liu et al. 2002). Verschiedene Autoren zeigten jedoch, dass das BAFF-Homotrimer die aktive Form des Proteins ist (Karpusas et al. 2002; Oren et al. 2002). BAFF wird von Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen, T-Zellen und Neutrophilen Granulozyten im Blut, in Lymphknoten, der Milz und verschiedenen anderen Geweben exprimiert (Moore et al. 1999; Scapini et al. 2003; Schneider et al. 1999). Aktivierte B-Zellen, Zellen der chronisch lymphatischen Leukämie (B-CLL), Zellen des Knochenmarks von Patienten mit Multiplem Myelom,

Zytotrophoblastenzellen der Plazenta, EBV-infizierte B-Zellen sowie verschiedene andere Immun-abhängige oder -unabhängige, gesunde oder Tumor-Gewebe sind ebenfalls in der Lage BAFF zu exprimieren und zu produzieren (He et al. 2003; Novak et al. 2002; Phillips et al. 2003; van Chu et al. 2007; Kampa et al 2020). Die Expression und Sekretion von BAFF in den Zellen wird von verschiedenen Zytokinen gefördert, unter anderem von Interferon (IFN) $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$  oder Interleukin (IL)-10 (Litinskiy et al. 2002; Moore et al. 1999; Nardelli et al. 2001). IL-4 hat einen hemmenden Einfluss auf die BAFF-Expression (Nardelli et al. 2001; Shu et al. 1999).

**APRIL** wird von Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und T-Zellen gebildet (Hahne et al. 1998; Litinskiy et al. 2002; Pradet-Balade et al. 2002; Shu et al. 1999; Stein et al. 2002). APRIL-mRNA wird vermehrt in aktivierten T-Zellen als in ruhenden transkribiert (Pradet-Balade et al. 2002). Aktivierte B-Zellen und B-CLL-Zellen können APRIL ebenfalls exprimieren (Kern et al. 2004; van Chu et al. 2007). Die Hochregulierung der APRIL-Expression wird in Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen durch IFN $\alpha$  und IFN $\gamma$  stimuliert (Litinskiy et al. 2002; Moore et al. 1999; Nardelli et al. 2001). APRIL kommt nur in geringen Mengen in gesundem Gewebe vor, während seine Konzentration in transformierten Zelllinien und Geweben von humanen Krebserkrankungen hoch ist (Hahne et al. 1998; Kampa et al. 2020). APRIL wird innerhalb der Zelle gespalten und direkt sekretiert (López-Fraga et al. 2001). Das Protein tritt dann als Homotrimer auf (Wu et al. 2000).

BAFF und APRIL können jedoch auch Heteromere bilden, bestehend aus einem APRIL- und zwei BAFF-Molekülen (ABB) oder einem BAFF- und zwei APRIL-Molekülen (BAA) (Samy et al. 2017).

### 1.2.2. Die Rezeptoren TACI, BCMA und BAFF-R

Der BAFF-Rezeptor (*BAFF-receptor*, BAFF-R oder BR-3), der Transmembran Aktivator und CAML Interaktor (*transmembrane activator and CAML interactor*, TACI) sowie das B-Zell-Reifungs-Antigen (*B-cell maturation antigen*, BCMA) werden den Typ-III-Membranproteinen zugeordnet (Madry et al. 1998; Bülow und Bram 1997). Sie enthalten Cystein-reiche Domänen (CRD) für die Bindung der Liganden (Hatzoglou

et al. 2000). BAFF und APRIL und ihre Heteromere binden an BCMA und ebenso an TACI (Gross et al. 2000; Rennert et al. 2000; Thompson et al. 2000; Samy et al. 2017). BAFF und das Heteromer ABB interagieren zusätzlich mit BAFF-R (Yan et al. 2001a; Samy et al 2017). Zudem bindet APRIL Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) in der extrazellulären Matrix oder auf Zelloberflächen u.a. von Plasmazellen (Samy et al 2017). TACI bindet sowohl BAFF als auch APRIL mit hoher Affinität (Patel et al. 2004; Pelletier et al. 2003). BAFF-R bindet BAFF sehr viel stärker als BCMA, während BCMA eine sehr hohe Affinität für APRIL besitzt, jedoch nur eine minimale Bindungsaffinität seitens BAFF-R für APRIL besteht (Day et al. 2005) (siehe auch schematische Darstellung der Bindungsaffinitäten der Rezeptoren zu BAFF und APRIL in Abb. 1.1).

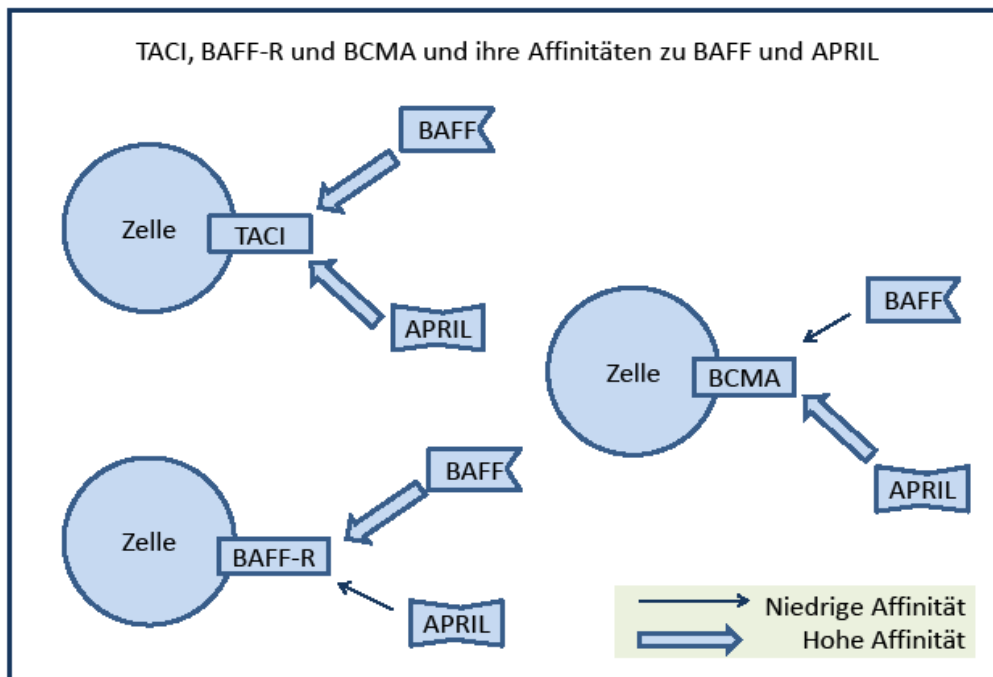


Abb. 1.1:

TACI, BAFF-R und BCMA sind sich im N-terminalen Submodul ähnlich, unterscheiden sich jedoch in der C-terminalen Domäne, woraus sich die unterschiedlichen Affinitäten der Rezeptoren für die Liganden BAFF und APRIL ergeben (Hymowitz et al. 2005).

**TACI**, auch CD267 oder TNFRSF13B genannt, enthält zwei CRD und ist der größte BAFF-Rezeptor (Bülow & Bram 1997). Für die hochaffine Bindung von APRIL oder BAFF wird jedoch nur die membrannahe CRD benötigt (Hymowitz et al. 2005). Der Rezeptor wird in allen B-Zellen und vermehrt in einer aktivierten Fraktion von T-Zellen präsentiert (Bülow & Bram 1997; Wu et al. 2000). Die TACI-Expression wird während der B-Zell-Reifung beständig hochreguliert (Zhang et al. 2004). Der Rezeptor wird besonders stark von Marginalzonen-B-Zellen der Milz exprimiert (Groom et al. 2007). TACI wird auch von Gedächtnis-B-Zellen und humanen Plasmablasten gebildet (Avery et al. 2003; Zhang et al. 2005).

**BCMA** ist ebenfalls als CD269 oder TNFRSF13C bekannt und besitzt eine sehr kleine extrazelluläre Domäne, welche eine CRD enthält (Madry et al. 1998; Laâbi et al. 1992). BCMA wird auf peripheren und im Knochenmark befindlichen Plasmazellen exprimiert, jedoch auch von tonsillären Gedächtniszellen und von B-Zellen der Keimzentren (Benson et al. 2008; Ng et al. 2004; O'Connor et al. 2004). IL-4 und IL-6 regulieren die BCMA-Expression auf B-Zellen hoch und stimulieren deren Empfindlichkeit für APRIL (Yang et al. 2005). Sowohl BCMA als auch TACI werden von T-Lymphozyten und zirkulierenden Monozyten exprimiert (Kampa et al. 2020).

**BAFF-R** heißt auch BR3, CD268 oder TNFRSF17 (Thompson et al. 2001; Yan et al. 2001a). BAFF-R enthält in seiner extrazellulären Domäne nur vier Cystein-Reste, welche zu einer partiellen CRD zusammengefasst werden (Thompson et al. 2001; Yan et al. 2001a). BAFF-R wird in naiven B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen und seltener von Plasmazellen, welche sich nicht in der Milz oder im Knochenmark befinden, exprimiert (Darce et al. 2007; Ng et al. 2004). Die B-Zellen der Keimzentren bilden vor allem BAFF-R, kaum BCMA und kein TACI (Ng et al. 2004; Zhang et al. 2005). Nach der Aktivierung von T-Zellen wird BAFF-R hoch reguliert und konstitutiv auf regulatorischen T-Zellen exprimiert (Mackay & Leung 2006).

### 1.2.3. Die Aufgaben von BAFF und APRIL

**BAFF:** BAFF ist bedeutsam für die Differenzierung unreifer B-Zellen in reife B-Zellen und für das Überleben von reifen B-Zellen (Samy et al. 2017). Bei BAFF-*knockout*-Mäusen und mit BAFF-Antagonisten behandelten Mäusen herrscht ein Mangel an reifen B-Zellen (Gross et al. 2001; Schiemann et al. 2001; Thompson et al. 2000). Dagegen zeigen Mäuse, welche transgenetisch für BAFF sind, eine B-Zell-Hyperplasie und erhöhte Level des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) (Gross et al. 2000; Khare et al. 2000; Mackay et al. 1999). BAFF fördert besonders das Überleben von Milz-B-Zellen, welche sich im T2-Stadium ihrer Entwicklung befinden und steigert auch den Fortbestand von Immunglobulin (Ig)-sekretierenden Zellen, die von Gedächtniszellen abstammen (Avery et al. 2003; Batten et al. 2000). Durch eine Bindung an BAFF-R kommt es zu einer erhöhten Proliferation und Überleben von peripheren B-Zellen, was auf die Hochregulierung der antiapoptotischen Faktoren wie Bcl-2, A1 und Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*) zurückzuführen ist (Amanna et al. 2003; Smith und Cancro 2003). Eine durch BAFF induzierte Proliferation kann durch ein an die konstante Fc-Region eines IgG-Antikörpers gekoppeltes BCMA-Protein, BCMA-Fc oder BAFF-R-Protein, BAFF-R-Fc, blockiert werden (Gross et al. 2000; Thompson et al. 2000; Thompson et al. 2001; Yan et al. 2001a). Die Exposition von BAFF *in vivo* und *in vitro* führt in TACI-abhängiger Weise zur Hochregulation des immunsuppressiven Zytokins IL-10 durch regulatorische B-Zellen (Samy et al. 2017). Desweiteren co-stimuliert BAFF *in vitro* die Aktivierung und Proliferation humaner T-Zellen (Huard et al. 2001; Huard et al. 2004). Diese Aktivierung der T-Zellen und die B-Zell-Proliferation sowie das B-Zell-Überleben und die IL-10-Expression kann jedoch durch TACI-Ig, ein mit einem Immunglobulin fusioniertem TACI-Protein, verhindert werden (Huard et al. 2001; Wang et al. 2001; Yan et al. 2001b; Samy et al. 2017).

**APRIL:** APRIL stimuliert die B- und T-Zell-Proliferation *in vitro* und hat einen proliferativen Effekt auf Tumorzelllinien *in vitro* und *in vivo* (Hahne et al. 1998; Yu et al. 2000). Diese Wirkung von APRIL kann durch BCMA-Fc blockiert werden (Rennert et al. 2000). Zudem ist APRIL wichtig für das Überleben von B-Zellen, welche einen Antikörperklassenwechsel (*class switch recombination*, CSR) erfahren haben und spielt eine relevante Rolle in der Bildung und Erhaltung von Plasmablasten (Belnoue et al.

2008; Hardenberg et al. 2008; Scholz et al. 2008, Samy et al. 2017). Das Protein ist essentiell für die IgA-Synthese, da APRIL-defiziente Mäuse einen selektiven IgA-Mangel und eine geringe Serum-IgA-Immunantwort aufweisen (Castigli et al. 2004). Ebenso ist bei TACI-defizienten Mäusen eine Verringerung der IgA-Antikörper-Level zu verzeichnen (Bülow et al. 2001). TACI fördert jedoch die Plasmazelldifferenzierung und triggert in Reaktion auf APRIL den Antikörperklassenwechsel und die IgA-Produktion (Mantchev et al. 2007; Sakurai et al. 2007). Die Antigenpräsentationsfunktion von B-Zellen mit einer aufgrund dessen erhöhten Aktivierung von T-Zellen wird ebenfalls signifikant verstärkt, indem über die Bindung von APRIL an BCMA co-stimulatorische Moleküle hochreguliert werden (Yang et al. 2005). Denn BCMA ist wichtig für das Überleben von langlebigen Plasmazellen im Knochenmark und für eine prolongierte Antikörperproduktion (O'Connor et al. 2004). Der Rezeptor spielt jedoch eine geringe Rolle in der B-Zell-Entwicklung (Schneider et al. 2001; Xu & Lam 2001).

**Gemeinsame Aufgaben von BAFF und APRIL:** BAFF und APRIL können im Zusammenspiel mit den Zytokinen IL-10, IL-15 und dem TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*, transformierender Wachstumsfaktor) oder mit Einbeziehung des BCR (*B-cell receptor*, B-Zell-Rezeptor) zu einem CSR von IgM zu IgG oder IgA und der Sekretion der neuen Antikörperklasse in B-Zellen führen (Litinskiy et al. 2002). Der durch APRIL induzierte CSR verläuft über TACI, während sowohl TACI als auch BAFF-R den durch BAFF herbeigeführten CSR vermitteln (Castigli et al. 2005). BAFF und APRIL scheinen zusammen zu arbeiten und zu einem gewissen Teil austauschbar zu sein, um durch die Erhaltung langlebiger Plasmazellen das humorale Gedächtnis zu unterstützen (Samy et al. 2017, Cornelis et al. 2021).

Nachfolgend sind die Funktionen und Interaktionen der Liganden und Rezeptoren zusammengefasst dargestellt (Tab. 1.1).

Tab. 1.1: Interaktionen und Reaktionen auf BAFF und APRIL

Rezeptor	BAFF-R	TACI	BCMA
Ligand	BAFF	BAFF, APRIL	APRIL, BAFF
Funktionen	Förderung des Überlebens von reifen B-Zellen; Klassenwechsel zu IgG und IgA; Co-Stimulation der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen	Förderung der Plasmazell-differenzierung; Klassenwechsel zu IgG und IgA Überleben von langlebigen Plasmazellen	Überleben von Plasmablasten; Förderung der Antigen-Präsentation durch reife B-Zellen

#### 1.2.4. Die Rolle von BAFF und APRIL bei Autoimmunerkrankungen

Offensichtlich scheint eine gestörte B-Zell-Signalkaskade eine bedeutende Rolle in der Entstehung von Autoimmunität zu spielen (Corneth et al. 2022). Eine Überexpression von löslichem BAFF in Mäusen führt zu einer B-Zell-Hyperplasie, Splenomegalie, anti-DNA-Antikörpern, Proteinurie und einer Glomerulonephritis, was dem Bild des humanen Systemischen Lupus erythematoses (SLE) ähnelt (Gross et al. 2000; Thompson et al. 2000; Yan et al. 2001b). Die autoimmune Aktivität in den Mausmodellen für SLE konnte durch Behandlung mit BAFF-Inhibitoren effizient kontrolliert werden (Gross et al. 2000; Wang et al. 2001). Auch beim Menschen kann der SLE mit dem BAFF-Inhibitor Belimumab behandelt werden (Fischer-Betz & Schneider 2013). Inzwischen liegt mit Atacicept ein IgG1-Fc-TACI Fusionsprotein vor, mit dem man BAFF und APRIL gleichzeitig inhibieren kann. Dieses Medikament wird erfolgreich bei SLE eingesetzt (Kaegi et al. 2020). Die Analyse von biologischen Proben von Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis (RA), dem Sjögren Syndrom (SjS) oder bei Erkrankungen wie dem kindlichen Opsoclonus-Myoclonus Syndrom (OMS) mit möglicher autoimmuner Pathogenese zeigen eine Assoziation zwischen hohen BAFF-Spiegeln und der Erkrankung (im Vergleich zu nicht-entzündlichen Erkrankungen), jedoch nicht mit der

Erkrankungsaktivität (Cheema et al. 2001; Fühlhuber et al. 2009; Groom et al. 2002; Zhang et al. 2001). Auch im Serum von SLE- und IgA-Nephropathie-Patienten konnten sowohl erhöhte BAFF- als auch APRIL-Level nachgewiesen werden (Samy et al. 2017; Ortiz-Aljaro et al. 2022). Bezüglich einer Korrelation zwischen erhöhten Serumleveln der Zytokine und erhöhten Auto-Antikörper-Leveln sowie der Erkrankungsaktivität sind die Ergebnisse bisher diskrepant (Samy et al. 2017; Ortiz-Aljaro et al. 2022). Zudem wurden kürzlich lösliche Formen von TACI (sTACI) und BCMA (sBCMA) neben erhöhten BAFF- und APRIL-Level bei SLE-Patienten entdeckt, welche als Lock-Rezeptoren für BAFF und APRIL dienen und so eine Bindung mit den membrangebundenen Rezeptoren verhindern, welche wiederum zu einer Hemmung des B-Zell-Überlebens führt (Samy et al. 2017; Kampa et al. 2020).

### **1.3. Neurologische Autoimmunerkrankungen**

Neurologische Autoimmunerkrankungen können zum einen vorwiegend T-Zell-vermittelt sein, wobei die nachweisbaren Autoantikörper hier nur diagnostische Bedeutung haben, aber pathogen nicht oder nur wenig wirksam sind. Hierzu gehören zum Beispiel die paraneoplastischen neurologischen Syndrome mit ihren onkoneuronalen Autoantikörpern (Übersicht in Blaes et al. 2021). Zum anderen gibt es Antikörper-vermittelte neurologische Autoimmunerkrankungen, bei denen die Autoantikörper selbst den pathogenen Effekt erzeugen. Neurologische Erkrankungen, bei denen B-Zellen und Autoantikörper eine zentrale Rolle spielen, sind z. B. die Myasthenia gravis (MG) mit Antikörpern gegen den muskulären Acetylcholin-Rezeptor, Immunneuropathien, bei denen Antikörper gegen Ganglioside oder Glykolipide gegen Bestandteile der Myelinscheide gebildet werden (Dalakas 2008; Lucchinetti et al. 2000; Vincent et al. 2000) oder Autoimmunenzephalitiden, bei denen sich Autoantikörper gegen Rezeptoren oder Ionenkanäle des zentralen Nervensystems nachweisen lassen. Zu letzteren gehört u.a. die 2007 erstmalig beschriebene Anti-N-methyl-D-Aspartat-Rezeptor-Enzephalitis (NMDA-R-Enzephalitis) als häufigste Autoimmunenzephalitis (Dalmau et al. 2007). Inzwischen wurden aber weitere Rezeptor-Autoantikörper, u.a. gegen die gamma-Aminobuttersäure- (GABA-) A- und B-Rezeptoren, sowie gegen einen weiteren Glutamatrezeptor, den alpha-Amino-3-

hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure- (AMPA) Rezeptor mit entsprechenden klinischen Syndromen charakterisiert (Dalmau & Graus 2018)

Die für diese Arbeit wichtigen chronischen Immuneuropathien teilen sich in die chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP), von der es zusätzlich zwei seltene Varianten gibt, und die extrem seltene multifokale motorische Neuropathie (MMN) (Kuwabara & Misawa 2018, Naum & Gwathmey 2023).

### 1.3.1. Myasthenia gravis (MG)

Die MG ist eine der klassischen Antikörper-vermittelten Autoimmunerkrankungen. Die Inzidenz beträgt ca. 2-3/100.000 Menschen pro Jahr (Cursiefen & Mäurer 2008). Klinisch äußert sich die Erkrankung durch eine belastungsabhängige Schwäche der Augen- und mimischen Muskulatur, sowie der Kau-, Schluck- und proximalen Extremitätenmuskulatur (Cursiefen & Mäurer 2008; Vincent 2002). 85% der Patienten mit generalisierter Myasthenia gravis haben Antikörper gegen den Acetylcholin-Rezeptor (anti-AChR-AK), welche eine Behinderung der neuromuskulären Transmission an der motorischen Endplatte erzeugen (Conti-Fine et al. 2006). Die 15% der Patienten, bei denen keine nachweisbar sind, haben in 40 - 45% der Fälle Antikörper gegen die muskelspezifische Tyrosinkinase (anti-MUSK-AK, synaptisches Antigen) (Hoch et al. 2001). Inzwischen wurde bei wenigen Patienten das LRP4 (lipoprotein receptor-related protein-4) als weiteres Autoantigen an der neuromuskulären Endplatte charakterisiert (Higuchi et al. 2011). Etwa 25% der Patienten haben ein zugrundeliegendes Thymom und bei über 80% der jüngeren (< 45 Jahre), anti-AChR-AK positiven Patienten lassen sich charakteristische Thymusveränderungen wie epitheliale Hyperplasien und Infiltrationen von Lymphfollikel-ähnlichen Strukturen mit T-Zell-Regionen und Keimzentren im Sinne einer Thymitis nachweisen (Berrih et al. 1984; Roxanis et al. 2001; Roxanis et al. 2002; Schlupe et al. 1988; Shiono et al. 2003). In diesen Fällen kommt es häufig durch eine Thymektomie zu einer Verbesserung des langfristigen Krankheitsverlaufs (Berrih et al. 1984; Wolfe et al. 2016, Wolfe et al. 2019). Der Autoimmunprozess im Thymus scheint in zwei Schritten zu erfolgen (Roxanis et al. 2002; Shiono et al. 2003). Erst werden T-Helfer-Zellen gegen die AChR-Untereinheiten, die von Thymusepithelzellen präsentiert

werden, sensibilisiert (MacLennan et al. 1998; Wakkach et al. 1996). Anschließend kommt es zu einer T-Zell-abhängigen Produktion von Autoantikörpern gegen diese Untereinheiten des intakten AChR, der auf den Muskel-ähnlichen myoiden Zellen des Thymus exprimiert wird (Schluep et al. 1987). Zudem ist das Komplementsystem in diese entzündlichen Prozesse an der neuromuskulären Synapse und die folgende Zerstörung der AChR involviert (Leite et al. 2007).

### 1.3.2. Chronisch Inflammatorische Demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP)

Die CIDP ist eine chronische Erkrankung des peripheren Nervensystems, welche eine weltweite Prävalenz von 2-7/100.000 Menschen aufweist (Latov 2002; Lunn et al. 1999). Die typische CIDP ist charakterisiert durch eine chronisch progressive, schrittweise oder wiederkehrende, vorwiegend proximale Schwäche und sensorische Dysfunktion aller Extremitäten, die sich über mindestens zwei Monate entwickelt, möglicherweise auch Hirnnerven betrifft und mit abwesenden oder abgeschwächten Muskeleigenreflexen in allen Extremitäten einhergeht (Hughes et al. 2006a). Eine Autoimmunpathogenese gilt als sicher, da Patienten mit dieser Erkrankung im Bereich der Nerven Infiltrate mit aktivierten T-Zellen, Makrophagen und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen aufweisen (Hughes et al. 2006b; Köller et al. 2005). Außerdem finden sich Autoantikörper gegen periphere Glykolipide und Proteinantigene der Myelinscheide, wie zum Beispiel gegen Neurofascin, und die CIDP spricht gut auf immunsuppressive Behandlungen an (Devaux et al. 2016; Hughes et al. 2006b; Köller et al. 2005). Zudem konnte in Studien zur Untersuchung der Pathophysiologie der CIDP neben der lokalen auch eine systemische Aktivierung von T-Zellen gezeigt werden (Bouchard et al. 1999; Khalili-Shirazi et al. 1998). Die Diagnose einer CIDP wird klinisch und elektrophysiologisch gestellt (Said 2006), wobei die Diagnosekriterien regelhaft von der European Academy of Neurology aktualisiert werden (van den Bergh et al. 2021).

### 1.3.3. BAFF und APRIL in Myasthenia gravis und Immunneuropathien

Die Literatur hinsichtlich BAFF- und APRIL-Konzentrationen im Serum von MG- und IN-Patienten ist uneinheitlich. Zwar konnten in einer ersten Arbeit keine Unterschiede in den BAFF-Serumspiegeln zwischen Myasthenia gravis-Patienten und gesunden Kontrollen nachgewiesen werden, spätere Studien zeigten dann aber Erhöhungen der BAFF-Serumspiegel bei Patienten mit Myasthenia gravis (Thangaraij et al. 2006; Scuderi et al. 2011; Kang et al. 2016). Unter einer Kortikosteroidtherapie zeigten sich bei Myasthenia gravis eine deutlich niedrigere BAFF-Serumkonzentration als bei anderen Myastheniepatienten, während die Thymektomie keinen Einfluß auf die BAFF-Serumkonzentration zeigte (Sobieszczuk et al. 2021). Die Serumkonzentration von APRIL war lediglich bei den late-onset MG erhöht, nicht jedoch bei den early-onset MG oder den Thymom-assoziierten MG (Uzawa et al. 2016).

Zu Untersuchungen zu BAFF bei Immunneuropathien findet sich bisher nur eine Studie. Diese zeigte erhöhte BAFF-Serumkonzentrationen bei CIDP-Patienten (Ritter et al. 2014). Zu APRIL-Serumkonzentrationen bei Immunneuropathien finden sich bis zum April 2024 keinerlei Daten in der Literatur.

## 1.4. Therapie mit intravenösen Immunglobulinen

Kommerzielle intravenöse Immunglobulin- (IVIg-) Präparate, welche aus gepooltem Plasma von tausenden gesunden Spendern entwickelt werden, enthalten polyspezifische IgG sowie geringe Mengen an IgA (Kazatchkine & Kaveri 2001; Lemm 2002). IgG haben *in vivo* eine Halbwertszeit von ca. drei Wochen (Cursiefen & Mäurer 2008).

IVIg zeichnen sich durch vielfältige Wirkmechanismen aus, deren Details noch nicht vollständig bekannt sind (Lehmann & Hartung 2011; Nagelkerke & Kuijpers 2014).

IVIg enthalten u.a. spezifische Antikörper gegen IL-1 und IL-6, was zu ihrem antipyretischen Effekt beiträgt (Hansen et al. 1995; Svenson et al. 1998). Die Plasmalevel von antiinflammatorischen Faktoren wie IL-10 werden stattdessen durch IVIg erhöht (Gullestad et al. 2001). IVIg fördern die Differenzierung von B- und T-Zellen (Grandmont et al. 2003). Sie können anti-idiotypische Antikörper enthalten, welche Autoantikörper neutralisieren (Buchwald et al. 2002; Fuchs et al. 2008;

Nagelkerke & Kuijpers 2014). Desweiteren gibt es auch Antikörper gegen BAFF und APRIL, deren Rolle im B-Zell-Überleben dadurch funktionell neutralisiert werden kann (Le Pottier et al. 2007a). Eine Behandlung mit IVIg kann anscheinend außerdem die Proliferation Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) im Mausmodell anregen oder auch natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg) aktivieren (Burns et al. 2015; Gregoire-Gauthier et al. 2015). Mögliche Mechanismen der Fc-Domäne von IVIg-Molekülen sind die Blockade aktivierender Fc $\gamma$ -Rezeptoren (Fc $\gamma$ R) um die Möglichkeit einer Komplexbildung zwischen Autoantikörper und Autoantigen zu verringern, Veränderung der zellulären Balance von pro- zu antiinflammatorisch durch Veränderung der Dendritischen Zellen, Inhibition der Komplement-Kaskade, Veränderung des Zytokinnetzwerk und die Hochregulierung des inhibitorischen Fc $\gamma$ RIIb durch sialylierte IgG-Fc (Bendtsen et al. 1993; Nagelkerke & Kuijpers 2014). Eventuelle Modulations-Mechanismen der F(ab)-Domäne stellen u.a. die Neutralisation von Chemokinen, Entzündungszytokinen und Apoptose-Molekülen dar (Nagelkerke & Kuijpers 2014).

IVIg wird in geringer Dosierung entweder zur Antikörper-Ersatz-Therapie z. B. bei Immundefizienz oder in höherer Dosis bei verschiedenen Autoimmunstörungen angewandt (Nagelkerke & Kuijpers 2014). Die Immunthrombozytopenie war die erste Autoimmunerkrankung, welche erfolgreich mit IVIg behandelt wurde (Imbach et al. 1981). Heute sind IVIg-Präparationen bei einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen von Nutzen (Dalakas 2004; Toubi et al. 2005). In der Neurologie sind IVIg offiziell in der Therapie der akuten Polyradikulitis Guillain-Barré (GBS) und der CIDP zugelassen (Cursiefen & Mäurer 2008; Hughes et al. 2008). Sie werden als Erstlinientherapie beim GBS, der CIDP und der MMN eingesetzt (Hughes 2008, Lünemann et al. 2015, Bus et al. 2024). Als Mittel der zweiten Wahl kommen IVIg bei Dermatomyositis und dem Stiff-Person-Syndrom in Frage (Lünemann et al. 2015). Bei neurodegenerativen Erkrankungen wurden IVIg auch getestet. Bisher erzielte eine Studie mit Alzheimer-Erkrankten jedoch nur enttäuschende Ergebnisse (Lünemann et al. 2015). Eine Therapieindikation für IVIg bei MG-Patienten ist die myasthene Krise und die Progredienz der Erkrankung unter immunsuppressiven Standardtherapien (Fateh-Moghadam et al. 1984; Lünemann et al. 2015; Zinman et al. 2007). Die übliche Dosierung von IVIg beträgt 0,4g/kg Körpergewicht täglich über fünf Tage (Hahn et al. 1996; Kubori et al. 1999). Der Effekt der Kurzzeitbehandlung bei CIDP ist durch eine Reduktion der Behinderung und eine Verbesserung der Kraft gekennzeichnet, während

der Langzeiteffekt mit weniger Rückfällen während der initialen und der Erhaltungstherapie einhergeht (Hughes et al. 2008; Bus et al. 2024). Ca. ein Viertel der Patienten erreichen eine Langzeitremission unter der Therapie (Hughes 2010). Bei Langzeitanwendung und in höheren Dosen sind selbst schwerwiegende Nebenwirkungen durch IVIg gering (Hughes et al. 2008).

### **1.5. Fragestellungen**

In der Annahme, dass BAFF, APRIL und die BAFF-Rezeptoren ein verändertes Konzentrations- und Expressionsverhalten in Immunneuropathie-Patienten und MG-Patienten im Vergleich zu Gesunden zeigen und IVIg aufgrund seiner vielfältigen Wirkweise einen Einfluss auf diese Liganden und möglicherweise auch deren Rezeptoren in den genannten Erkrankungen hat, ergaben sich für diese Arbeit die folgenden Fragestellungen:

1. Gibt es Unterschiede in den Konzentrationen von BAFF, APRIL und den BAFF-Rezeptoren im Serum oder in und auf Blutzellen zwischen Gesunden, MG-Patienten und Immunneuropathie-Patienten?
2. Hat eine Therapie mit IVIg über fünf Tage (2g/kg Körpergewicht) bei Patienten mit Immunneuropathien oder MG einen Effekt auf die Expression von BAFF, APRIL und den BAFF-Rezeptoren in und auf Blutzellen bzw. die Serumkonzentration von BAFF und APRIL?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Patienten**

Patienten mit einer definierten neuroimmunologischen Erkrankung, die über fünf Tage IVIg erhielten, wurden in die Studie eingeschlossen. Ein positives Votum der Ethikkommission des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen für diese Studie liegt vor (Ethikvotum Nr. 77-08). Die Rekrutierung der Patienten fand vom 18.03.2009 bis zum 19.02.2010 statt. Es wurde 12 Patienten nach einer entsprechenden Aufklärung und mit deren Einverständnis Serum und Vollblut abgenommen.

Sechs Patienten waren männlich, sechs Patienten waren weiblich. Das mittlere Alter lag bei  $57,8 \pm 13,9$  Jahren (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Von 10 Patienten lag Vollblut zur Analyse vor, bei allen 12 Patienten Serum. Acht Patienten hatten eine Erstmanifestation einer chronischen Immuneuropathie (IN) im Sinne einer CIDP nach den damals gültigen Diagnosekriterien der European Association of Neurology (Van den Bergh et al. 2010). Vier Patienten hatten eine AChR-Ak-positive MG, alle vier Patienten waren vorbehandelt mit Immunsuppressiva (2 Azathioprin, 2 Steroide und Azathioprin). Die klinischen Daten der Patienten sind in Tabelle 2.1 und 2.2 dargestellt.

Als Kontrollgruppe dienten 11 gesunde Probanden. Davon waren acht weiblich und drei männlich. Das mittlere Alter lag bei  $44,9 \pm 10,6$  Jahren (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Tab. 2.1: Klinische Daten der Patienten mit Immuneuropathien, Symptome und Wirkung der IVIg-Behandlung

Pat.	Geschlecht, Alter	Symptome	Klinischer Therapieeffekt nach 4 Wochen
1	M, 52	Distale Sensibilitäts-störungen aller Extremitäten, Paresen der unteren Extremitäten	Verbesserung der Motorik
2	M, 45	Distale Sensibilitäts-störungen und Paresen der unteren Extremitäten	keine Verbesserung
3	W, 39	Gangstörung, Paraparese und Sensibilitätsstörungen der Beine	Verbesserung der Motorik
4	W, 64	Distale Sensibilitäts-störungen der Extremitäten, Gangstörung	mäßige Besserung der Sensibilitätsstörung und der Gangstörung
5	M, 61	Distale Sensibilitäts-störungen und leichte Paresen der unteren Extremitäten, Gangunsicherheit	keine Verbesserung
6	W, 67	Progrediente Tetraparese, Gangstörung	weitgehende Rückbildung der Tetraparese
7	W, 67	Schwäche in Armen und Beinen	keine Verbesserung (Besserung nach 6 Wochen)
8	W, 56	Progrediente Sensibilitätsstörungen und Paresen der distalen Extremitäten	Verbesserung der Paraparese

Tab. 2.2: Klinische Daten der Patienten mit MG, Symptome und Wirkung der IVIg-Behandlung, gemessen als Veränderung des quantitativen Myasthenie-Scores (QMG 0-39 Punkte, signifikante Veränderung > 2 Punkte)

Pat.	Geschlecht, Alter	Symptome	Effekt innerhalb der ersten vier Wochen nach der Therapie (nach QMG)
9	W, 38	Ptose, Dysphagie, Dysarthrie, progrediente Schwäche der Extremitäten	Verbesserung 18 auf 16 Punkte (nicht signifikant)
10	M, 58	Ptose, Dysphagie, Dysarthrie	Verbesserung 21 auf 18 Punkte
11	M, 58	Ptose, Dysphagie, Dysarthrie, progrediente Paresen der Extremitäten	Verbesserung 17 auf 11 Punkte
12	M, 89	Ptose, Dysphagie, Kopfhalteschwäche	Verbesserung 22 auf 13 Punkte

## 2.2. Probenmaterial

Zur Probenmaterialgewinnung fanden drei Blutentnahmen statt: die erste direkt vor der ersten IVIg-Gabe an Tag 1, die zweite direkt vor der dritten IVIg-Gabe an Tag 3 und die dritte innerhalb einer Stunde nach der fünften IVIg-Gabe an Tag 5. Die Vollblutproben wurden innerhalb der ersten vier Stunden nach der Blutentnahme für die Durchflusszytometrie aufbereitet und gemessen, während die Serumproben aliquotiert, eingefroren und zunächst bei -20°C aufbewahrt wurden.

## 2.3. Methoden

### 2.3.1. Durchflusszytometrie (*Fluorescence-activated cell sorting* = FACS)

Die extrazelluläre und intrazelluläre Expression von BAFF und APRIL von CD14+Monozyten sowie die Expression der BAFF-Rezeptoren der CD19+B-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Hierzu werden in Suspension befindliche Einzelzellen durch einen Laserstrahl geführt und die relative Größe, die Granularität, die spezifische Fluoreszenz und die entsprechende relative Fluoreszenzintensität der Zellen gemessen. Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Proteine können mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern bestimmt werden. Dabei ist das emittierte Fluoreszenzlicht proportional zur Zahl der gebundenen Fluorchrommoleküle. Die Darstellung erfolgt in Histogrammen.

Die Messung der hier verwendeten Zellproben erfolgte am FACS-Calibur (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) mit dem Programm CellQuest®. Es wurde die Fluoreszenzintensität der extrazellulären Expression von TACI, BCMA, BAFF-R und CD19, einem Oberflächenmarker von B-Zellen, gemessen. In den Proben der B-Zellen wurden zwischen 40.000 und 50.000 Zellen gezählt, je nach Gesamtmenge der Zellen, welche sich von Patient zu Patient etwas unterschied. Bei den extra- und intrazellulären Proben der Monozyten wurden 100.000 Zellen pro Messung gezählt. Hierbei wurde der quantitative extrazelluläre und intrazelluläre Nachweis von BAFF, APRIL und CD14, einem spezifischem Oberflächenmarker für Monozyten, gemessen. Zur Kontrolle wurde jeweils eine Negativ-Kontrolle (eine Probe ohne Antikörper) durchgeführt.

Aufbereitung des Vollblutes:

Je 100 µl Vollblut wurden in PP-FACS-Röhrchen pipettiert, mit jeweils 1 ml FACS-Puffer (1:10 10 x PBS, 1:100 FCS, 1:100 NaN<sub>3</sub> in Aqua dest. verdünnt) gewaschen und dann bei 1600 *rounds per minute* (rpm) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Zellen resuspendiert. Darauf wurden mit verschiedenen Fluorochromen markierte monoklonale Antikörper (verwendete Antikörper und Konzentrationen siehe Tabelle 2.3) zur Zellsuspension hinzugegeben, durchmischt und bei 4°C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde jeweils 1 ml Lyse-Puffer (10 x BD-Lyse 1:10 mit Aqua dest. verdünnt) hinzu pipettiert und für 15 Minuten im Dunkeln

bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Zentrifugations- und Waschschrift wie oben beschrieben. Anschließend wurden die Proben 3-mal mit jeweils 2 ml FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Probe resuspendiert. Die Zell-Suspension wurde in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und bei 4°C bis zur Messung der extrazellulären Proteine gelagert. Zur Analyse der intrazellulären Proteine wurde zunächst wie oben beschrieben verfahren und die Proben nach Zugabe des Lyse-Puffers mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Proben resuspendiert. Anschließend wurden sie in 500 µl Cytofix/Cytoperm-Puffer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) aufgenommen, durchmischt und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Zentrifugations- und Waschschrift, woraufhin die Proben für 10 Minuten bei 4°C mit je 2 ml Perm/Wash-Puffer (10 x BD-Perm/Wash-Puffer-Konzentrat 1:10 mit Aqua dest. verdünnt) inkubiert wurden, gefolgt von einem weiteren Waschschrift. Dann wurden bereits markierte monoklonale Antikörper (verwendete Antikörper und Konzentrationen siehe Tabelle 2.3) zugegeben, durchmischt und die Proben bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben 3-mal mit Perm/Wash-Puffer gewaschen, zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zell-Suspension resuspendiert. Zum Schluss wurden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und bei 4°C bis zur Messung gelagert.

Tab. 2.3: Übersicht über die verwendeten Antikörper, die eingesetzte Verdünnung und die Herstellerfirmen

Antikörper	Konjugat	eingesetzte Verdünnung (in FACS-Puffer)	Firma
CD19	PerCP-Cy5.5	1:20	BD Pharmingen
TACI	PE	1:20	Biozol (Biolegend)
BCMA	FITC	1:20	Alexis
BAFF-R	FITC	1:20	BD Pharmingen
CD14	PerCP-Cy5.5	1:20	BD Pharmingen
APRIL	PE	1:20	Biolegend
BAFF	Atto488	1:50	Alexis

### 2.3.2. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

BAFF und APRIL wurden mit kommerziell erhältlichem ELISA aus dem Serum der Patienten bestimmt. Das Testprinzip basiert darauf, dass die zu untersuchenden Patientenserum in eine Mikrotiterplatte gegeben werden, die mit spezifischen Antikörpern gegen BAFF oder APRIL beschichtet ist, an welche BAFF oder APRIL binden. Anschließend wird ein Enzymkonjugat hinzugegeben, welches das Vorhandensein von BAFF oder APRIL über eine Reaktion mit einem Farbstoff nachweisen kann. Anschließend wird die Farbreaktion am Photometer gemessen und quantifiziert.

Messung von löslichem BAFF:

Die BAFF-Konzentrationen wurden mittels des Quantikine BAFF ELISA Kits (R & D Systems, Wiesbaden, Deutschland) gemessen. Als erstes wurden je 100 µl Assay-Verdünnungslösung in die Wells der 96 Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurden jeweils 50 µl der sieben Standardverdünnungen (1:2 Verdünnungsserie des BAFF-Standards mit einem Verdünnungsmittel), Kontrollen und verdünnte Serumproben (Patientenserum 1:2 mit Verdünnungsmittel) in die Wells pipettiert, mit einer selbstklebenden Folie bedeckt und im Dunkeln bei Raumtemperatur zwei Stunden inkubiert. Die Folie wurde entfernt, der Überstand verworfen und die Wells 4-mal mit je 400 µl Waschpuffer (Waschpufferkonzentrat 1:25 in Aqua dest. verdünnt) gewaschen. Danach wurden 200 µl BAFF-Konjugat in jedes Well gegeben, diese wurden wieder mit einer selbstklebenden Folie bedeckt und im Dunkeln bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgten vier weitere Reinigungsschritte mit Waschpuffer und die Zugabe von 200 µl Substratlösung (1:1 Vermischung der Farbreaugenzien A und B) in jedes Well. Danach folgte eine erneute Inkubation für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend wurden je 50 µl Stopplösung in die Wells gegeben. Innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 450 nm photometrisch in einem ELISA-Microplate-Reader (Multiskan EX, Thermofisher, Schwerte, Deutschland). Anhand der sieben Standards wurde eine Eichkurve angefertigt, mittels derer die BAFF-Konzentrationen berechnet werden konnten. Jede Serumprobe wurde

doppelt für jeden ELISA-Versuch gemessen, woraus der Mittelwert der BAFF-Konzentration für jede Patientenprobe errechnet wurde.

Messung von löslichem APRIL:

Die APRIL-Konzentrationen wurden mittels des APRIL ELISA Kits (Bender MedSystems®, Wien, Österreich) gemessen. Die 96-Well-Platte wurde zunächst zweimal mit 400 µl Waschpuffer (Waschpufferkonzentrat 1:20 in Aqua dest. verdünnt) pro Well gewaschen. Darauf wurden jeweils 100 µl der sieben APRIL-Standardlösungen (1:2 Serienverdünnungsreihe), 100 µl Samplelösung und 50 µl Samplelösung mit 50 µl verdünnter Serumproben (Patientenseren 1:3 in Samplelösung verdünnt, bei falsch hohen oder falsch niedrigen Messergebnissen in einer 1:2 oder 1:6 Verdünnung nochmals gemessen) in die Wells gegeben. Daraufhin wurden 50 µl Biotin-Konjugat (Biotin-Konjugat-Konzentrat 1:100 mit Assaypuffer verdünnt; Assaypufferkonzentrat 1:20 mit Aqua dest. verdünnt) in jedes Well pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Folie bedeckt und bei Raumtemperatur für zwei Stunden auf dem Schüttler mit 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und dreimal mit 400 µl Waschpuffer gewaschen. Daraufhin wurden 100 µl Streptavidin-HRP (Streptavidin-HRP-Konzentrat 1:100 mit Assaypuffer verdünnt) in jedes Well gegeben, die Platte wurde abgedeckt und bei Raumtemperatur für eine Stunde auf dem Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und es folgten drei weitere Waschschrte. Anschließend wurden 100 µl TMB (Tetramethylbenzidin)-Substratlösung in jedes Well in einem abgedunkelten Raum gegeben. Die Platte wurde abgedeckt und bei Raumtemperatur im Dunkeln für acht bis zehn Minuten inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 100 µl Stopplösung (1 M Phosphorsäure) pro Well. Innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 450 nm photometrisch in einem ELISA-Microplate-Reader (Multiskan EX, Thermofisher). Anhand der sieben Standards wurde eine Eichkurve angefertigt, mittels derer die APRIL-Konzentrationen ermittelt werden konnten. Die Versuche wurden in Doppelansätzen durchgeführt. Daraus wurden die Mittelwerte der APRIL-Konzentration für jede Patientenprobe ermittelt.

## 2.4. Statistik

Für die statistische Analyse wurde der GeoMean der Fluoreszenzintensität der FACS-Messungen und die Mittelwerte der APRIL- bzw. BAFF-Konzentrationen aus den ELISA-Messungen benutzt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPadPrism Version 4.0. Zur Überprüfung ihrer Signifikanz wurden Häufigkeitsvergleiche zwischen den Gruppen mit Hilfe des Fisher's exact tests, Titerunterschiede mit Hilfe des U-Tests und Vergleiche sonstiger Werte mit Hilfe des ANOVA-Tests ermittelt. Häufigkeitsvergleiche zwischen den Gruppen mit mehr als zwei Variablen wurden mit dem Chi-Quadrat Test berechnet. Ein  $p < 0.05$  galt als signifikant. Die Werte sind als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben.

### **3. Resultate**

Bei 10 von 12 Patienten lag Vollblut zur Analyse vor, bei allen 12 Patienten Serum. Acht Patienten hatten eine Immuneuropathie (IN), vier Patienten hatten eine AChR-Ak-positive MG. Als Kontrollgruppe dienten 11 gesunde Probanden (GP). Da die Kontrollgruppe etwas jünger war, als die Patientengruppe, wurde in beiden Gruppen eine Altersabhängigkeit der BAFF- und APRIL-Serumkonzentrationen ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt).

#### **3.1. Konzentrationen von BAFF und APRIL im Serum von Patienten mit Myasthenia gravis, Patienten mit Immuneuropathien und gesunden Probanden an Tag 1, Tag 3 und Tag 5**

##### **3.1.1. Vergleich der BAFF- und APRIL-Konzentrationen zwischen gesunden Probanden und Patientengruppen an Tag 1**

Der Vergleich der BAFF- und APRIL-Konzentrationen an Tag 1 im Serum von Patienten mit Immuneuropathien (IN), Myasthenia gravis (MG) und gesunden Probanden (GP) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen (BAFF, IN-Patienten 796.1 +/- 361.5 pg/ml, MG-Patienten 489.5 +/- 148.8 pg/ml, GP 798.9 +/- 182.7 pg/ml; APRIL, IN-Patienten 200.5 +/- 538.8 ng/ml, MG-Patienten 4.3 +/- 3.5 ng/ml, GP 265.8 +/- 764.6 ng/ml;  $p > 0.05$ , Abb. 3.1). Bei den APRIL-Konzentrationen im Serum fiel ein Patient der IN-Gruppe mit einem extrem erhöhten APRIL-Serumspiegel auf. Diese Probe wurde mehrfach nachgemessen, der Patient wurde in der Analyse belassen.

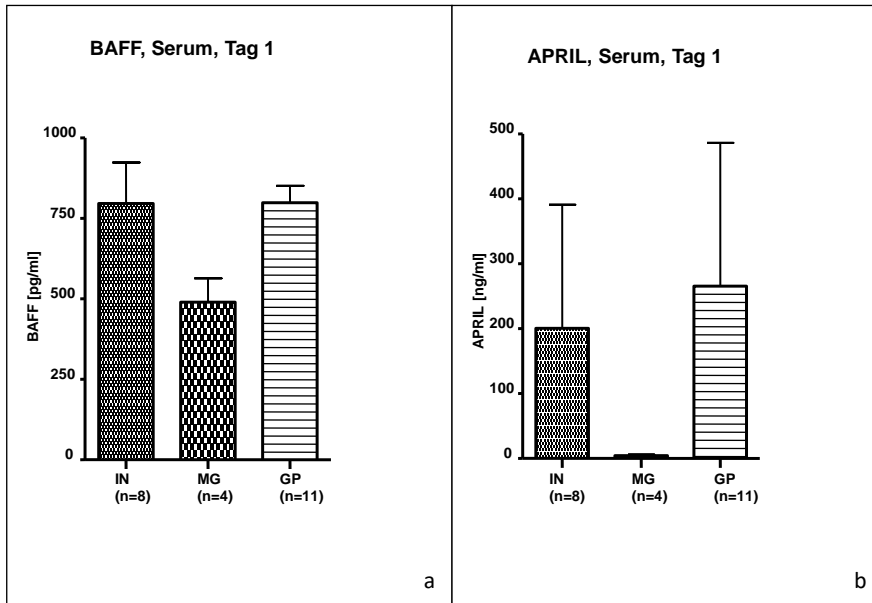


Abb. 3.1 a und b: BAFF- (a) und APRIL-Konzentrationen (b) im Serum von Patienten mit IN und MG sowie von GP an Tag 1 ( $p > 0.05$ ).

### 3.1.2. Vergleich der BAFF- und APRIL-Konzentrationen innerhalb der Patientengruppen an Tag 1, Tag 3 und Tag 5

Die BAFF- und APRIL-Konzentrationen im Serum von Patienten mit MG und IN wurden an Tag 1, 3 und 5 der IVIg-Gabe gemessen. Es ergaben sich keine signifikanten Veränderungen über den Zeitverlauf (BAFF, MG-Patienten: Tag 1 489.5 +/- 148.8 pg/ml, Tag 3 418.9 +/- 96.9 pg/ml, Tag 5 369.7 +/- 49.9 pg/ml; BAFF, IN-Patienten: Tag 1 796.1 +/- 361.5 pg/ml, Tag 3 735.1 +/- 339.7 pg/ml, Tag 5 746.3 +/- 348.9 pg/ml; APRIL, MG-Patienten: Tag 1 4.3 +/- 3.5 ng/ml, Tag 3 65.6 +/- 64.6 ng/ml, Tag 5 145.2 +/- 153.4 ng/ml; APRIL, IN-Patienten: Tag 1 200.5 +/- 538.8 ng/ml, Tag 3 260.2 +/- 594.7 ng/ml, Tag 5 249.4 +/- 371.6 ng/ml;  $p > 0.05$ , Abb. 3.2 und 3.3). Bezüglich der Veränderungen der APRIL-Konzentrationen im Serum war bei den Immuneuropathien ein extremer Ausreißer zu verzeichnen (Abb. 3.3b). Die extrem hohen APRIL-Konzentrationen bei diesem Patienten wurden mehrfach nachgemessen und der Patient in der Analyse belassen. Würde man diesen Ausreißer entfernen, wäre bei den

Immuneuropathien ein signifikanter Anstieg der APRIL-Konzentration im Serum unter IVIg-Therapie zu verzeichnen (ANOVA, Kruskal-Wallis-Test,  $p < 0.01$ ).

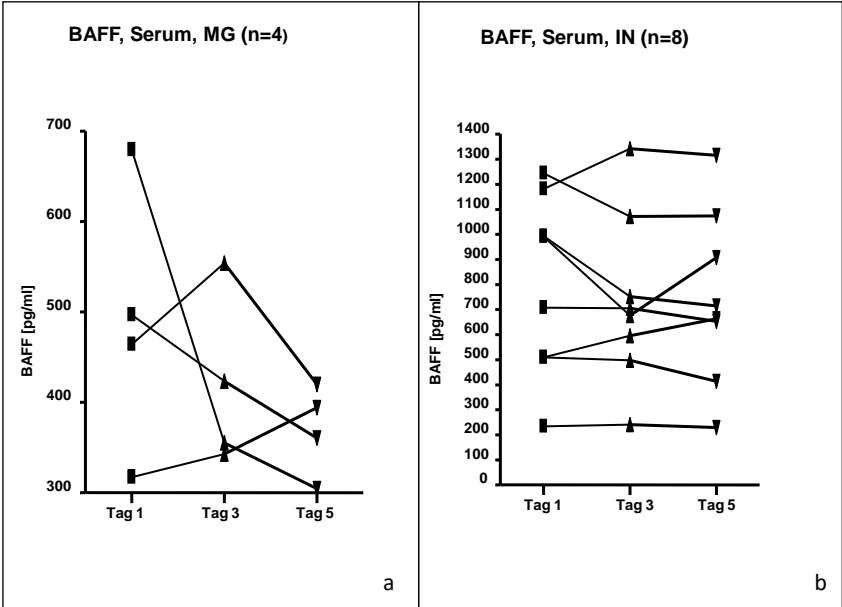


Abb. 3.2 a und b: Die BAFF-Konzentrationen im Serum von Patienten mit MG (a) und von Patienten mit IN (b) wurden an Tag 1, 3 und 5 gemessen. Es gab keine signifikanten Veränderungen ( $p > 0.05$ ).

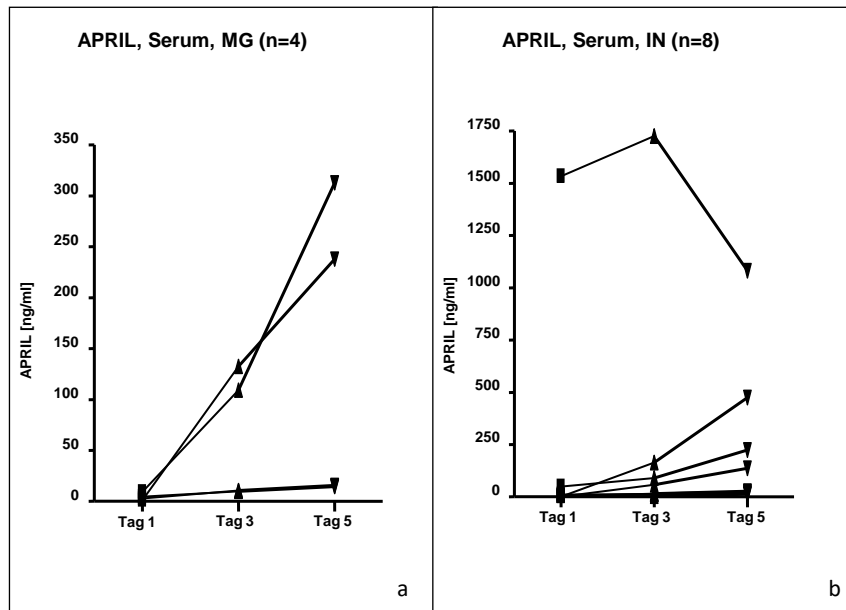


Abb. 3.3 a und b: Die APRIL-Konzentrationen im Serum von Patienten mit MG (a) und von Patienten mit IN (b) wurden an Tag 1, 3 und 5 gemessen und zeigten keine signifikanten Veränderungen ( $p > 0.05$ ).

Es wurden dann die Veränderungen der BAFF- und der APRIL-Serumspiegel unter IVIg-Therapie hinsichtlich möglicher Unterschiede im klinischen Ansprechen auf die IVIg-Therapie in der Gesamtgruppe untersucht. Dabei zeigte sich, dass Patienten, die auf eine IVIg-Therapie gut respondierten, eine Abnahme des BAFF-Serumspiegels von  $21.2 \pm 15.8\%$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) des Ausgangswertes aufwiesen, während IVIg-Nonresponder einen Anstieg des BAFF-Serumspiegels von  $16.1 \pm 14.5\%$  zeigten (Abb. 3.4a,  $p < 0.01$ ). Bei den APRIL-Veränderungen fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen IVIg-Respondern und –Nonrespondern (Abb. 3.4b,  $p > 0.05$ ).

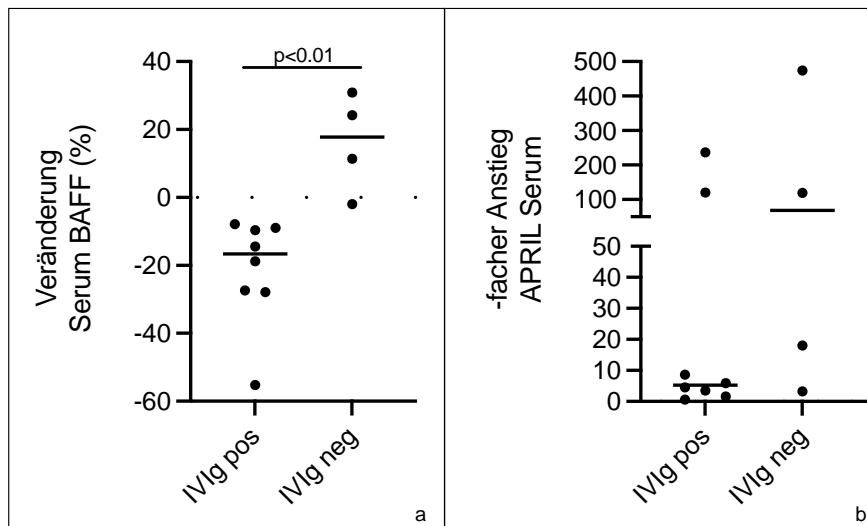


Abb. 3.4. a und b: Veränderung der Serumspiegel unter Therapie mit IVIg von BAFF (a) und APRIL (b) in Abhängigkeit vom klinischen Respondieren der Patienten auf die IVIg-Therapie. (a) Signifikanter Abfall des BAFF-Serumspiegels bei Patienten mit gutem Ansprechen auf IVIg (IVIg pos) im Vergleich zu non-Respondern (IVIg neg), ( $p < 0.01$ ). (b) kein signifikanter Unterschied in der Veränderung des APRIL-Serumspiegels zwischen IVIg-Respondern (IVIg pos) und non-Respondern ( $p > 0.05$ ).

### 3.2. Expression von BAFF, APRIL und den BAFF-Rezeptoren auf und in Blutzellen von Patienten mit Myasthenia gravis, Patienten mit Immunneuropathien und gesunden Probanden an Tag 1, Tag 3 und Tag 5

#### 3.2.1. Vergleich der extra- und intrazellulären BAFF-Expression der CD14+Monozyten zwischen Kontroll- und Patientengruppen an Tag 1 und innerhalb der Patientengruppen an den Tagen 1-5

Der Vergleich der extrazellulär auf CD14+Monozyten gemessenen BAFF-Expression an Tag 1 zwischen den drei Gruppen ergab eine signifikant höhere BAFF-Expression an Tag 1 auf CD14+Monozyten von Patienten mit einer IN im Vergleich zu GP. Im Gegensatz dazu waren auf CD14+Monozyten von Patienten mit einer MG keine erhöhten BAFF-Werte im Vergleich zu GP und IN-Patienten nachweisbar (BAFF

extrazellulär; IN-Patienten 5.1 +/- 1.3, MG-Patienten 4.4 +/- 0.2, GP 3.7 +/- 0.7;  $p < 0.05$  und  $p > 0.05$ , Abb. 3.5 a).

Allerdings muss hier festgehalten werden, dass die Expressionsänderungen sich insgesamt auf einem sehr niedrigen Expressionsniveau bewegen. Die intrazelluläre BAFF-Expression in CD14+Monozyten bei Patienten mit IN und MG sowie bei den GP an Tag 1 zeigte keine signifikanten Unterschiede (BAFF intrazellulär, IN-Patienten 9.3 +/- 2.8, MG-Patienten 8.9 +/- 0.5, GP 12.3 +/- 4.9;  $p > 0.05$ , Abb. 3.5 b).

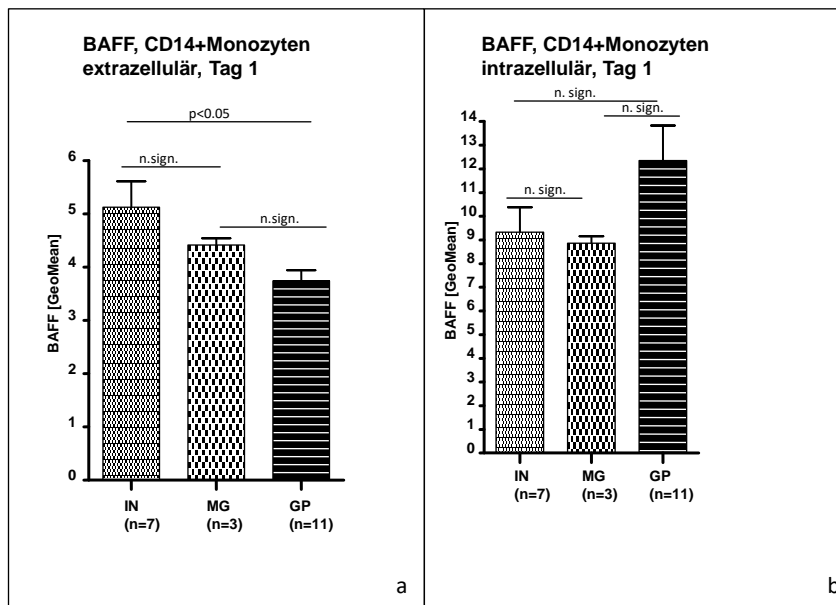


Abb. 3.5 a und b: Extrazelluläre BAFF-Expression auf CD14+Monozyten an Tag 1 (a). Patienten mit IN zeigen eine signifikant höhere BAFF-Expression ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv, während Patienten mit MG im Vergleich zu GP und IN-Patienten keine erhöhte BAFF-Expression auf Monozyten aufweisen ( $p > 0.05$ ). Intrazelluläre BAFF-Expression in CD14+Monozyten an Tag 1 (b) bei Patienten mit IN und MG sowie bei GP ohne signifikanten Unterschied ( $p > 0.05$ ).

Der Vergleich der extrazellulären BAFF-Expression auf CD14+Monozyten im Verlauf der fünftägigen IVIg-Gabe bei MG-Patienten ergab eine signifikante Verringerung der BAFF-Expression zwischen Tag 1 und Tag 5 sowie zwischen Tag 3 und Tag 5. Die BAFF-Expression auf den CD14+Monozyten zwischen Tag 1 und Tag 3 zeigte keinen

signifikanten Unterschied (BAFF extrazellulär, MG-Patienten: Tag 1 4.4 +/- 0.2, Tag 3 4.5 +/- 0.04, Tag 5 3.8 +/- 0.2;  $p < 0.01$  und  $p > 0.05$ , Abb. 3.6 a). Die intrazelluläre Expression von BAFF in CD14+Monozyten bei Patienten mit Myasthenia gravis an Tag 1, 3 und 5 ergab keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse (BAFF intrazellulär, MG-Patienten: Tag 1 8.9 +/- 0.5, Tag 3 13.8 +/- 6.9, Tag 5 12.3 +/- 3.9;  $p > 0.05$ , Abb. 3.6 b).

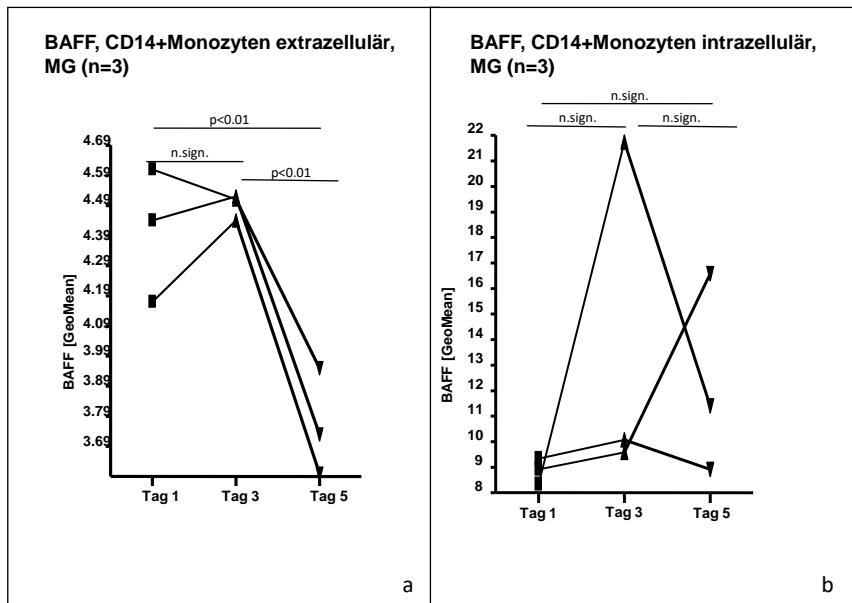


Abb. 3.6 a und b: Extrazelluläre BAFF-Expression auf CD14+Monozyten (a). Patienten mit MG weisen eine signifikante Abnahme der BAFF-Expression auf CD14+Monozyten im Verlauf der fünftägigen IVIg-Therapie auf ( $p < 0.01$ ). Intrazelluläre Expression von BAFF in CD14+Monozyten (b) bei Patienten mit MG an Tag 1, 3 und 5 ohne signifikante Unterschiede ( $p > 0.05$ ).

Die extrazelluläre BAFF-Expression auf CD14+Monozyten von Patienten mit IN an Tag 1, 3 und 5 ergab keine signifikanten Ergebnisse (BAFF extrazellulär, IN-Patienten: Tag 1 5.1 +/- 1.3, Tag 3 4.7 +/- 1.6, Tag 5 4.4 +/- 1.0;  $p > 0.05$ , Abb. 3.7 a). Die intrazelluläre Expression von BAFF in CD14+Monozyten bei Patienten mit Immunneuropathien an Tag 1, 3 und 5 ergab ebenfalls keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse (BAFF intrazellulär, IN-Patienten: Tag 1 9.3 +/- 2.8, Tag 3 8.3 +/- 2.2, Tag 5 8.6 +/- 1.8;  $p > 0.05$ , Abb. 3.7 b).

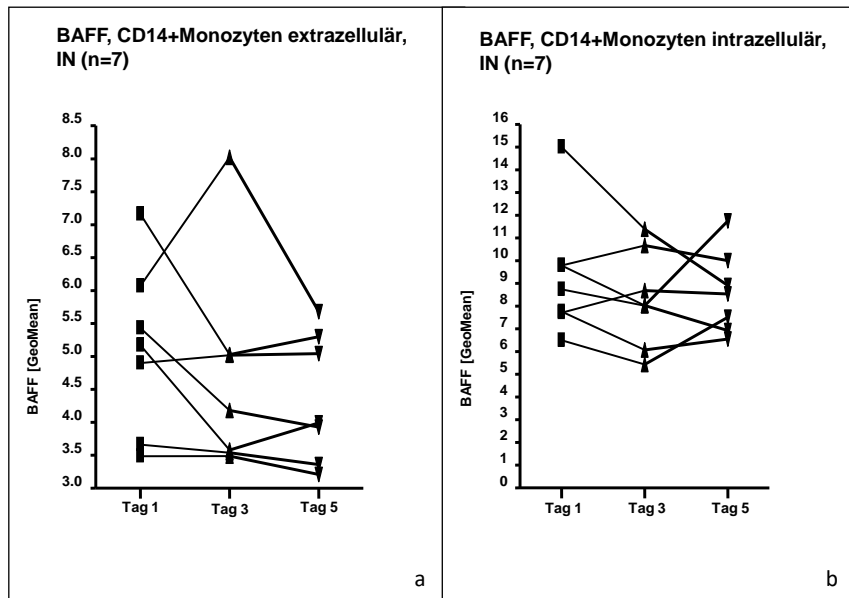


Abb. 3.7 a und b: Extrazelluläre (a) und intrazelluläre (b) BAFF-Expression von CD14+Monozyten bei Patienten mit IN an Tag 1, 3 und 5 ohne signifikante Unterschiede ( $p > 0.05$ ).

### 3.2.2. Vergleich der extra- und intrazellulären APRIL-Expression der CD14+Monozyten zwischen Kontroll- und Patientengruppen an Tag 1 und innerhalb der Patientengruppen an den Tagen 1-5

Die extrazelluläre Expression von APRIL auf CD14+Monozyten bei Patienten mit IN und MG sowie den GP an Tag 1 wies keine signifikanten Unterschiede auf (APRIL extrazellulär, IN-Patienten  $4.6 \pm 1.9$ , MG-Patienten  $4.5 \pm 0.8$ , GP  $3.5 \pm 1$ ;  $p > 0.05$ , Abb. 3.8 a). Der Vergleich der intrazellulär in CD14+Monozyten gemessenen APRIL-Expression an Tag 1 zwischen den drei Gruppen zeigte eine signifikant erhöhte APRIL-Expression in CD14+Monozyten von IN- und MG-Patienten im Vergleich zu den GP (APRIL intrazellulär, IN-Patienten  $72.4 \pm 28.1$ , MG-Patienten  $70.3 \pm 9.8$ , GP  $32.1 \pm 10.6$ ;  $p < 0.01$  und  $p < 0.05$ , Abb 3.8 b). Zwischen den beiden Patientengruppen bestand kein signifikanter Unterschied ( $p > 0.05$ ).

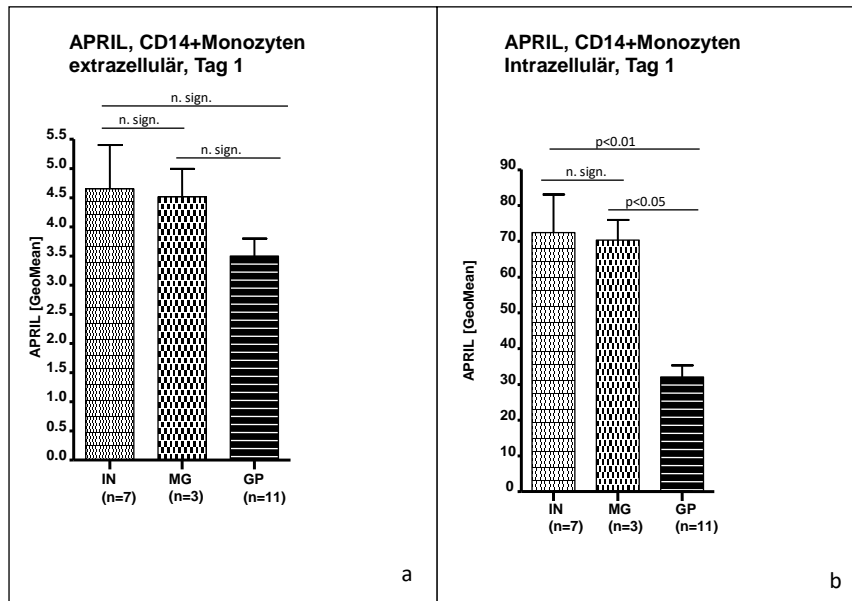


Abb. 3.8 a und b: Extrazelluläre Expression von APRIL auf CD14+Monozyten (a) bei Patienten mit IN und MG sowie bei GP an Tag 1 ohne signifikante Unterschiede ( $p > 0.05$ ). Intrazelluläre Expression von APRIL in CD14+Monozyten (b). Es bestand eine signifikant erhöhte Expression von APRIL an Tag 1 bei IN-Patienten im Gegensatz zu GP ( $p < 0.01$ ) und bei MG-Patienten im Vergleich zu GP ( $p < 0.05$ ).

Die extrazelluläre und intrazelluläre APRIL-Expression von CD14+Monozyten bei Patienten mit MG an Tag 1, 3 und 5 ergab keine signifikanten Unterschiede (APRIL extrazellulär, MG-Patienten: Tag 1  $4.5 \pm 0.8$ , Tag 3  $3.8 \pm 0.5$ , Tag 5  $3.6 \pm 0.5$ ; APRIL intrazellulär, MG-Patienten: Tag 1  $70.3 \pm 9.8$ , Tag 3  $143.1 \pm 181.3$ , Tag 5  $99.9 \pm 33.9$ ;  $p > 0.05$ , Abb. 3.9).

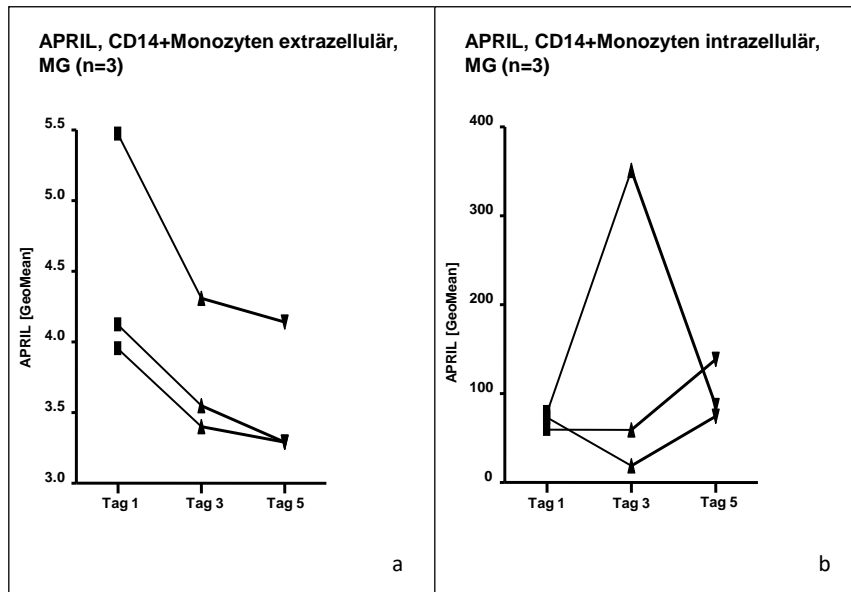


Abb. 3.9 a und b: Extrazelluläre (a) und intrazelluläre (b) APRIL-Expression von CD14+Monozyten bei MG-Patienten. Es zeigten sich keine signifikanten Änderungen über den analysierten Zeitraum ( $p > 0.05$ ).

Bei Patienten mit IN ergaben die Messungen der extra- und intrazellulären APRIL-Expression der CD14+Monozyten an Tag 1, 3 und 5 keine signifikanten Änderungen (APRIL extrazellulär, IN-Patienten: Tag 1 4,6 +/- 1,9, Tag 3 5,0 +/- 2,7, Tag 5 4,7 +/- 2,1; APRIL intrazellulär, IN-Patienten: Tag 1 72,4 +/- 28,1, Tag 3 65,8 +/- 37,7, Tag 5 61,1 +/- 21,4;  $p > 0.05$ , Abb. 3.10).

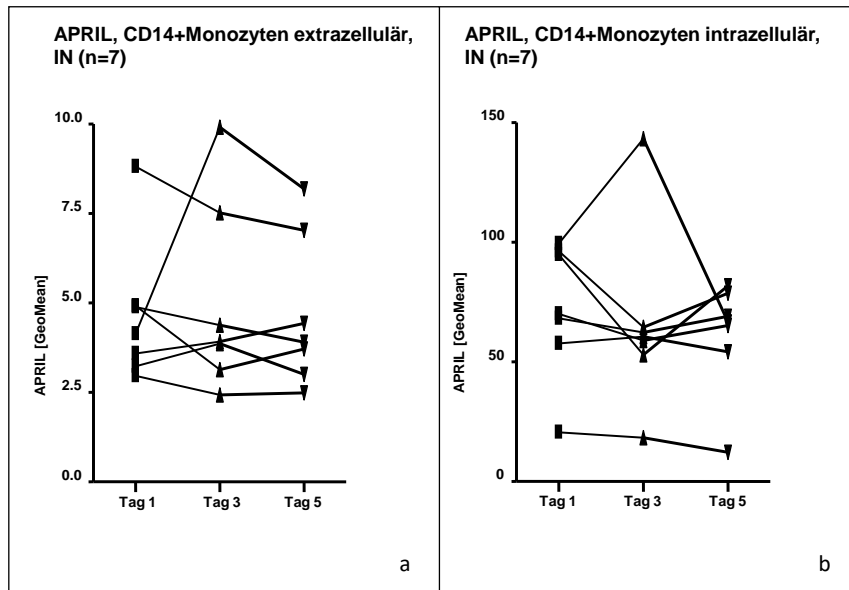


Abb. 3.10 a und b: Extrazelluläre (a) und intrazelluläre (b) APRIL-Expression von CD14+Monozyten bei Patienten mit IN an Tag 1, 3 und 5 ohne signifikante Unterschiede im Verlauf der IVIg Therapie ( $p > 0.05$ ).

### 3.2.3. Vergleich der extrazellulären TACI-, BCMA- und BAFF-R-Expression der CD19+B-Zellen zwischen Kontroll- und Patientengruppen an Tag 1 und innerhalb der Patientengruppen an den Tagen 1-5

Der Vergleich der extrazellulär auf CD19+B-Zellen gemessenen TACI-Expression an Tag 1 zwischen den drei Gruppen ergab keine signifikanten Unterschiede der TACI-Expression bei Patienten mit IN und MG im Vergleich zu den GP. Es ließ sich jedoch eine Tendenz einer höheren TACI-Expression auf CD19+B-Zellen bei den MG-Patienten im Vergleich zu den GP sehen ( $p=0.06$ ), die möglicherweise durch die kleine Gruppengröße das Signifikanzniveau nicht erreichte (TACI, IN-Patienten  $4.7 \pm 3.1$ , MG-Patienten  $8.4 \pm 1.9$ , GP  $4.8 \pm 1.7$ ;  $p > 0.05$ , Abb. 3.11 a). Die Expression von BCMA und BAFF-R auf CD19+B-Zellen bei Patienten mit IN und MG sowie den GP an Tag 1 ergab ebenfalls keine relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen (BCMA, IN-Patienten  $4.6 \pm 0.9$ , MG-Patienten  $6.2 \pm 2.6$ , GP  $5.2 \pm 1.9$ , BAFF-R, IN-

Patienten 84.9 +/- 31.7, MG-Patienten 90.7 +/- 53.2, GP 79.5 +/- 17.9;  $p > 0.05$ , Abb. 3.11 b und c).

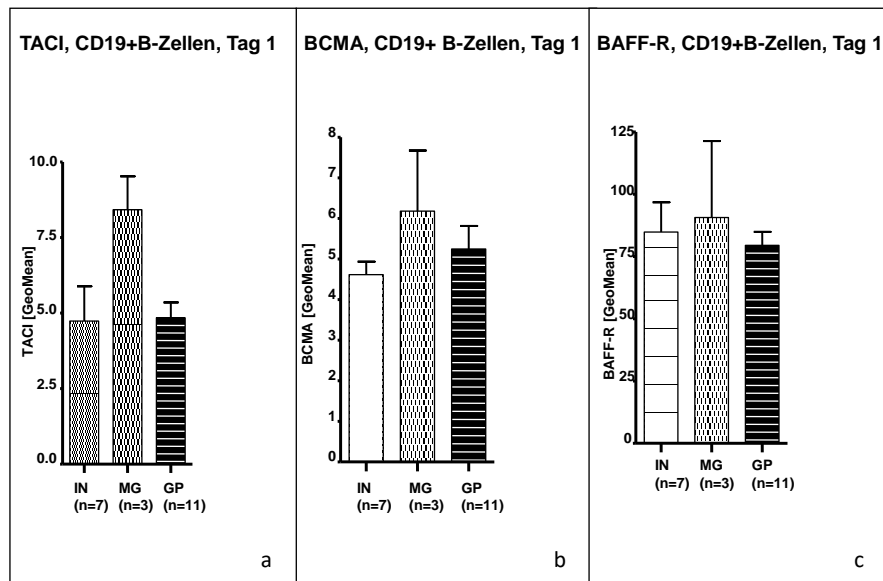


Abb. 3.11 a - c: Extrazelluläre Expression von TACI (a), BCMA (b) und BAFF-R (c) auf CD19+B-Zellen bei Patienten mit IN und MG sowie bei GP an Tag 1 ohne signifikante Unterschiede ( $p > 0.05$ ).

Die extrazelluläre Expression des Rezeptors TACI auf CD19+B-Zellen bei Patienten mit MG und IN an Tag 1, 3 und 5 zeigte keine signifikante Veränderung über den analysierten Zeitraum (TACI, MG-Patienten: Tag 1 8.4 +/- 1.9, Tag 3 7.1 +/- 4.1, Tag 5 8.3 +/- 1.7; TACI, IN-Patienten: Tag 1 4.7 +/- 3.1, Tag 3 4.8 +/- 3.3, Tag 5 5.7 +/- 3.8;  $p > 0.05$ , Abb. 3.12).

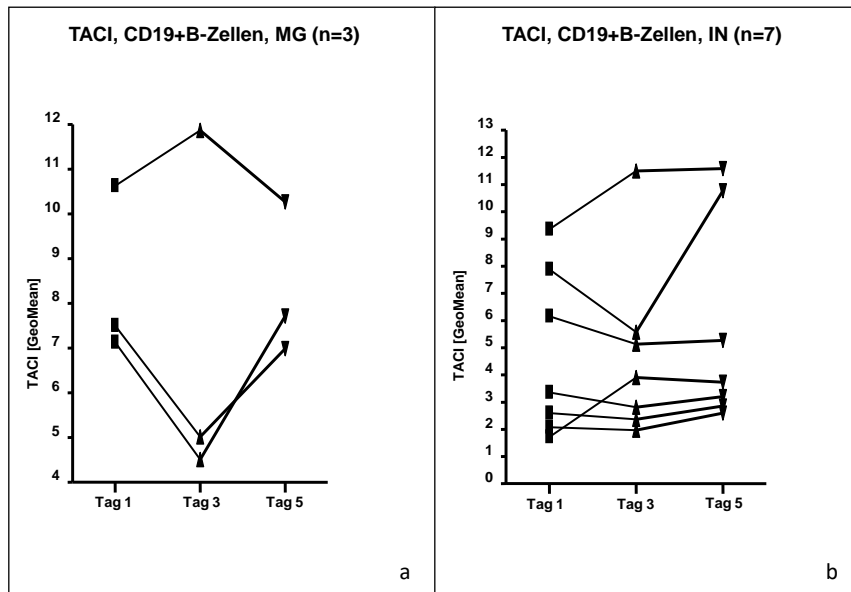


Abb. 3.12 a und b: Extrazelluläre TACI-Expression auf CD19+B-Zellen bei Patienten mit MG (a) und IN (b) an Tag 1, 3 und 5 ohne signifikanten Unterschied ( $p > 0.05$ ).

Bei Patienten mit MG und IN zeigte die extrazelluläre Expression des Rezeptors BCMA auf CD19+B-Zellen an Tag 1, 3 und 5 ebenfalls keine signifikante Veränderung unter der fünftägigen IVIg-Behandlung (BCMA, MG-Patienten: Tag 1  $6.2 \pm 2.6$ , Tag 3  $4.4 \pm 0.7$ , Tag 5  $6.6 \pm 1.0$ ; BCMA, IN-Patienten: Tag 1  $4.6 \pm 0.9$ , Tag 3  $4.5 \pm 1.2$ , Tag 5  $4.3 \pm 1.1$ ;  $p > 0.05$ , Abb. 3.13).

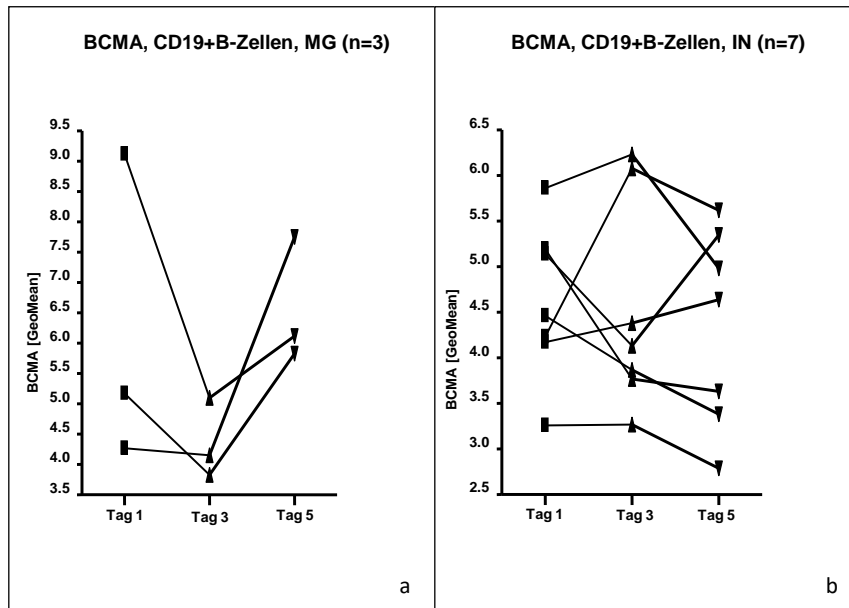


Abb. 3.13 a und b: Extrazelluläre BCMA-Expression auf CD19+B-Zellen bei Patienten mit MG (a) und IN (b) an Tag 1, 3 und 5 ohne signifikanten Unterschied ( $p > 0.05$ ).

Die extrazelluläre Expression des Rezeptors BAFF-R auf CD19+B-Zellen bei Patienten mit MG und IN zeigte keine signifikante Veränderung von Tag 1 bis Tag 5 (BAFF-R, MG-Patienten: Tag 1  $90.7 \pm 53.2$ , Tag 3  $60.8 \pm 15.4$ , Tag 5  $88.4 \pm 55.1$ ; BAFF-R, IN-Patienten: Tag 1  $84.9 \pm 31.7$ , Tag 3  $74.4 \pm 27.0$ , Tag 5  $91.2 \pm 36.5$ ;  $p > 0.05$ , Abb. 3.14).

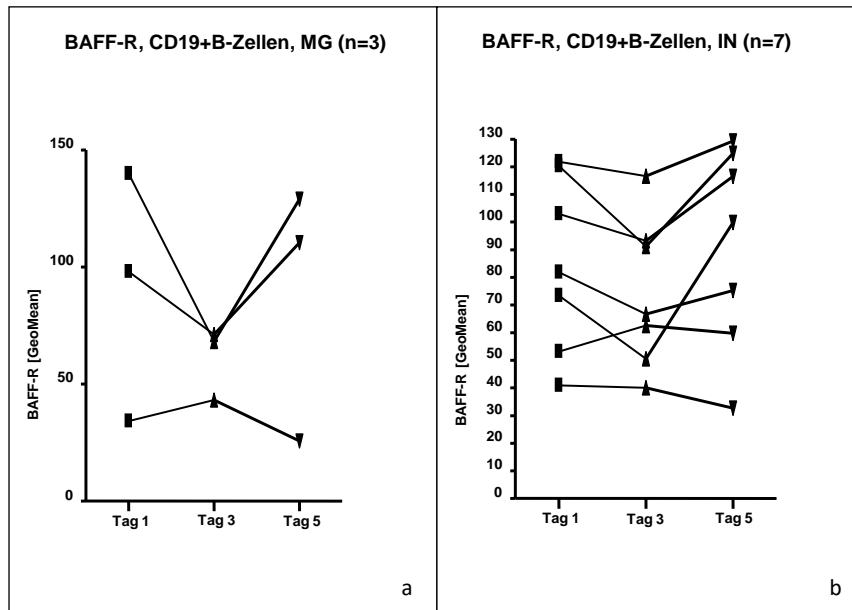


Abb. 3.14 a und b: Extrazelluläre BAFF-R-Expression auf CD19+B-Zellen bei Patienten mit MG (a) und IN (b) an Tag 1, 3 und 5 ohne signifikanten Unterschied ( $p>0.05$ ).

## **4. Diskussion**

### **4.1. Konzentrationen und Expression von BAFF, APRIL und den BAFF-Rezeptoren bei Patienten mit Myasthenia gravis, Patienten mit Immuneuropathien und gesunden Probanden**

B-Zellen und Autoantikörper sind in der Pathogenese verschiedener neurologischer Erkrankungen wie Multiple Sklerose (MS), Neuromyelitis optica, Immuneuropathien, und der Myasthenia gravis (MG) involviert (Dalakas 2008). Die MG ist eine Erkrankung, die typische Charakteristika einer B-Zell-vermittelten, autoimmunen Genese aufweist. In den meisten Fällen können Autoantikörper gegen den AChR nachgewiesen werden, welche vermutlich aufgrund eines fehlerhaften T-Zell-abhängigen Prozesses im Thymus der Patienten entstehen und zusammen mit dem Komplementsystem zu einer Entzündungsreaktion an der neuromuskulären Synapse und einer Internalisierung des AChR führen (Conti-Fine et al. 2006; Leite et al. 2007). Zudem kann die MG durch Übertragung von anti-AChR-AK im Tiermodell induziert werden (Conti-Fine et al. 2006). Ebenso ist bei den Immuneuropathien eine vorwiegend B-Zell-vermittelte Entstehung wahrscheinlich, da sie diverse Entzündungsprozesse im Sinne von aktivierten Immunzellen und proinflammatorischen Zellmediatoren im Bereich der Nervenbahnen, teilweise Autoantikörper und ein gutes Ansprechen auf immunmodulatorische und IgG-entfernende Behandlungen (Plasmapherese, Immunadsorption) aufweisen (Hughes et al. 2006b; Köller et al. 2005). BAFF, APRIL und deren Rezeptoren sind kritische Faktoren für das Überleben und die Differenzierung von B-Zellen (Dalakas 2008). Es ist daher nicht verwunderlich, dass BAFF, APRIL und ihre Rezeptoren in einigen Erkrankungen mit autoimmuner Genese erhöht sind. So konnten unter anderem für die autoimmunhämolytische Anämie, für das primäre Sjögren Syndrom und für den Morbus Crohn erhöhte BAFF Serumkonzentrationen nachgewiesen werden (Xu et al. 2015, Loureiro-Amigo et al. 2021, Andreou et al. 2021). Interessanterweise finden sich nur wenige Daten zu APRIL-Serumspiegeln. Bei der autoimmunhämolytischen Anämie zeigten sich neben den erhöhten BAFF- auch erhöhte APRIL-Serumspiegel (Xu et al. 2015) und beim kindlichen autoimmunen Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom konnten im Liquor zwar

erhöhte BAFF-Spiegel nachgewiesen werden, die APRIL-Spiegel waren jedoch normal (Fühlhuber et al. 2009).

Die bisher publizierten Ergebnisse zu BAFF- und APRIL-Serumkonzentrationen in MG-Patienten sind allerdings uneinheitlich. So konnten Ragheb et al. bei MG-Patienten im Vergleich zu verschiedenen Kontrollgruppen signifikant erhöhte BAFF-Serumspiegel messen, es zeigte sich aber keine Korrelation zu klinischen Parametern (Ragheb et al. 2008). Auch in einer Studie von Kim et al. konnte nachgewiesen werden, dass die BAFF-Serumspiegel in MG-Patienten signifikant höher als in gesunden Probanden sind (Kim et al. 2008). Hierbei zeigten nicht immuntherapierte MG-Patienten die höchsten BAFF-Konzentrationen im Serum (Kim et al. 2008). Auch fand sich in dieser Studie und einer weiteren Studie, dass die BAFF-Serumspiegel bei seropositiven (AChR-/MUSK-Antikörper-positiven) MG-Patienten höher sind als bei seronegativen (Kim et al. 2008, Ragheb et al. 2008). Eine weitere Studie wies ebenfalls erhöhte BAFF-Serumwerte bei AChR-Antikörper-positiven Myastheniepatienten nach (Sobieszczyk et al. 2021), während in einer anderen Studie keine erhöhten BAFF-Serumspiegel bei MG-Patienten gemessen werden konnten (Thangarajh et al. 2006). Es zeigte sich bei keiner der Studien eine Korrelation zwischen den BAFF-Konzentrationen und den Serumtitern der anti-AChR-AK oder der Krankheitsschwere, wobei auch die anti-AChR-AK nicht mit der Krankheitsschwere korrelierten (Lindstrom et al. 1998, Thangarajh et al. 2006, Kim et al. 2008). Ein Problem dieser Heterogenität scheint allerdings in der verschiedenen Patienten-Vorauswahl zu bestehen. So sind in fast allen Studien sowohl Patienten mit einer early-onset Myasthenia gravis (< 50 Jahre) wie auch einer late-onset Myasthenia gravis (> 60 Jahre) eingeschlossen worden, obwohl diese Patienten eine unterschiedliche Immunpathogenese aufweisen: Bei den jungen Patienten liegt häufig eine Thymushyperplasie mit ausgeprägter Aktivierung von Immunzellen (sogenannte Thymitis) vor, während bei den late-onset Patienten eine Thymusinvolutions zu beobachten ist. Zudem waren in allen Studien sowohl therapienaive als auch bereits immunsupprimierte Patienten eingeschlossen.

Die vermehrte Expression von BAFF und APRIL im hyperplastischen Thymus von MG-Patienten konnte nachgewiesen werden (Thangarajh et al. 2006). Dies wird durch die Studie von Li et al. unterstützt, die 2008 zeigen konnte, dass BAFF-R in den meisten B-Zellen der Keimzentren und im Serum von MG-Patienten signifikant höher exprimiert wird als in Kontrollpersonen (Li et al. 2008). Chen et al. konnte zeigen, dass

es eine erhöhte Expression von BAFF-R im Thymusgewebe von MG-Patienten gibt (Chen et al. 2011). Die Spiegel von BAFF-R jedoch sind in MG-Patienten mit atrophem Thymus genauso hoch wie in Patienten mit hyperplastischem Thymus (Chen et al. 2011). In einer andere Studie fand sich bezüglich der Rezeptor-Expression kein Unterschied in der Expression von BAFF-R, BCMA und TACI zwischen MG-Patienten und gesunden Kontrollen (Thangarajh et al. 2007). In dieser mittels FACS und ELISA durchgeführten Studie exprimierten fast alle CD19+B-Zellen und CD19+CD27+Gedächtnis-B-Zellen BAFF-R (Thangarajh et al. 2007).

Die hier vorgestellte Studie konnte ebenso wie Thangarajh et al. (2006) keine signifikant erhöhten Serumkonzentrationen von BAFF und APRIL bei den Patienten mit MG im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. Allerdings waren die MG-Patienten immunsuppressiv vorbehandelt und könnten dadurch verringerte BAFF- und APRIL-Konzentrationen aufweisen. Die MG-Patienten der vorgenannten Studien wiesen verschiedene oder gar keine Therapien auf. Möglicherweise wäre dies und die kleine Gruppengröße der MG-Patienten eine Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse. Auch die Expression der BAFF-Rezeptoren zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patientengruppen und den gesunden Probanden, was früheren Ergebnissen entspricht (Thangarajh et al. 2007). Eine tendenziell höhere Expression von TACI auf B-Zellen bei den MG-Patienten dieser Studie erreichte, möglicherweise aufgrund der kleinen Gruppengröße, keine Signifikanz.

Erstmals konnte hier gezeigt werden, dass die intrazelluläre APRIL-Expression in Monozyten bei Myasthenia gravis-Patienten erhöht ist. Die zelluläre Expression von APRIL wurde bisher bei Myasthenia gravis nicht untersucht. Zu den APRIL-Serumspiegeln gibt es, wie oben erwähnt, inkonsistente Daten (Thangarajh et al. 2006, Uzawa et al. 2016).

Bei den acht Patienten mit einer Immuneuropathie konnten keine signifikant erhöhten BAFF- und APRIL-Konzentrationen im Serum im Vergleich zu den gesunden Probanden nachgewiesen werden. Allerdings wurde nach einer Extensionsstudie als Nachfolgestudie zu dieser Studie eine leichte, signifikante Erhöhung der BAFF-Serumspiegel nachgewiesen (Bick et al. 2013), so dass hier die geringe Patientenzahl das Ergebnis beeinflusst haben dürfte. In einer Studie von Ritter et al. mit 23 Patienten mit chronischen Immuneuropathien (CIDP) konnten ebenfalls signifikant erhöhte BAFF-Serumkonzentrationen gemessen werden (Ritter et al. 2014). Die APRIL-

Serumkonzentrationen wurden in dieser Studie oder auch in anderen Studien nicht bestimmt. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die zelluläre Expression von APRIL in Monozyten bei Patienten mit Immunneuropathien im Vergleich zu gesunden Kontrollen deutlich erhöht ist. Zwar konnte in dieser Studie auch eine signifikant erhöhte extrazelluläre BAFF-Expression bei IN-Patienten nachgewiesen werden, allerdings waren die extrazellulären Expressionslevel von BAFF in allen Gruppen so niedrig, dass eine Relevanz dieses Befundes fragwürdig erscheint. Die Expression der BAFF-Rezeptoren auf den CD19+B-Zellen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Immunneuropathie-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe.

Auch wenn in dieser Stichprobe die BAFF- und APRIL-Serumspiegel der Patienten mit Immunneuropathien und Myasthenia gravis nicht signifikant erhöht waren, weist dies in Verbindung mit der Folgestudie sowie den Expressionsstudien in Monozyten darauf hin, dass eine Fehlregulation von BAFF und APRIL eine Rolle in der Pathogenese der Immunneuropathien und der Myasthenia gravis spielt.

#### **4.2. Die Effekte von IVIg insbesondere auf BAFF, APRIL und die BAFF-Rezeptoren**

Intravenöse Immunglobuline (IVIg) werden bei einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen therapeutisch eingesetzt (Dalakas 2004; Toubi et al. 2005, Watad et al. 2017). In der Neurologie stellen Therapieindikationen für IVIg u.a. die myasthene Krise oder Erkrankungsprogredienz der MG, die akute Polyradikulitis Guillain-Barré (GBS) und die chronischen Immunneuropathien (CIDP, MMN) dar (Fateh-Moghadam et al. 1984; Hughes et al. 2008; Hughes et al. 2012; Lünemann et al. 2015; Zinman et al. 2007).

IVIg entfalten ihre Wirkung über verschiedene Wege, wie zum Beispiel Blockade von Fc-Rezeptoren, Down-Regulation der proinflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-6 sowie eine Erhöhung der regulatorischen T-Zellen (Übersichten in (Lehmann & Hartung 2011, Victor & Nahm 2023)). BAFF, APRIL und deren Rezeptoren scheinen dabei nicht unbedeutend zu sein.

In einer Studie über Patienten mit Kawasaki-Syndrom, einer akuten fiebrigen Vaskulitis der frühen Kindheit, besserten sich unter der IVIg-Therapie rasch die klinischen Symptome in allen Fällen (Doi et al. 2010; Kawasaki 1967). Die mittleren BAFF-Konzentrationen waren vor der IVIg-Therapie hoch und sanken danach signifikant ab, während die APRIL-Werte unter der IVIg-Behandlung signifikant anstiegen (Doi et al. 2010). Es wurde eine inverse Korrelation zwischen BAFF und APRIL bei diesen Patienten beobachtet (Doi et al. 2010). Die BAFF-Werte waren vor der IVIg-Behandlung bei Patienten mit Kawasaki-Syndrom tendenziell höher als bei Gesunden, jedoch ohne signifikanten Unterschied (Doi et al. 2010). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den APRIL-Spiegeln vor und nach der Behandlung zwischen Patienten und Gesunden festgestellt werden (Doi et al. 2010). Die Autoren schlussfolgerten, dass IVIg möglicherweise den Verlauf des Kawasaki-Syndroms durch Veränderungen der BAFF- und APRIL-Konzentrationen beeinflussen (Doi et al. 2010). In einer Studie mit einer experimentellen, autoimmunen Myasthenia gravis (EAMG) in Ratten konnte die Expression von BAFF-R und APRIL signifikant unter der IVIg-Behandlung reduziert werden, was auf eine Inhibierung der B-Zell-Aktivität durch IVIg hindeutet (Zhu et al. 2006).

Im Gegensatz zu den vorgenannten Studien konnte in dieser Studie bei den MG- und bei den IN-Patienten keine eindeutige Änderung der Serumkonzentrationen von BAFF und APRIL unter der IVIg-Therapie nachgewiesen werden. Die APRIL-Serumkonzentration stieg zwar bei den meisten Patienten (MG und IN) während der IVIg-Gabe deutlich an, erreichte aber aufgrund eines einzelnen Ausreißers keine statistische Signifikanz. Wird dieser Ausreißer (hypothetisch) außer acht gelassen, wäre eine inverse Regulation von APRIL unter IVIg-Therapie möglich. Eine solche inverse Regulation von APRIL wurde bereits beim systemischen Lupus erythematodes beschrieben. Hier zeigte sich in einer Studie, dass die APRIL-Serumspiegel invers mit der Krankheitsaktivität korrelieren (Stohl et al. 2004). Eine statistisch zwar signifikante Reduktion der extrazellulären BAFF-Expression auf CD14+Monozyten der MG-Patienten erscheint von fraglicher Relevanz, da die basalen extrazellulären BAFF-Expressionslevel bereits sehr niedrig waren.

Wenn die Veränderungen der BAFF-Serumspiegel in der Gesamtgruppe (MG und IN) mit dem Ansprechen der Patienten auf die IVIg-Therapie (klinische Evaluation 4 Wochen nach Therapiebeginn) korreliert werden, zeigt sich, dass Patienten mit gutem

Ansprechen auf IVIg eine Abnahme des BAFF-Serumspiegels zeigen, während dieser bei Patienten ohne klinisches Ansprechen sogar ansteigt. Eine Studie von Ritter et al. konnte belegen, dass eine Behandlung mit hochdosiertem IVIg (1g/kg Körpergewicht) bei CIDP-Patienten zu einer signifikanten Reduktion der pathologisch erhöhten BAFF-Konzentrationen führte, während IVIg in der geringeren Dosierung von 0,4g/kg Körpergewicht zu einer nicht signifikanten Reduktion der BAFF-Serumspiegel führte (Ritter et al. 2014). Es konnten jedoch keine klinischen Korrelationen nachgewiesen werden. Eine rezente Studie zeigte zwar erhöhte BAFF-Serumspiegel bei CIDP-Patienten, allerdings war hier keine Korrelation zum langfristigen klinischen Verlauf nachweisbar (Michael et al. 2023).

Ebenso wie in der Studie von Ritter et al. konnte bei den IN-Patienten in dieser Studie keine signifikante Änderung der BAFF-Expression bei den Monozyten und keine Unterschiede in der Expression der BAFF-Rezeptoren bei den B-Zellen ermittelt werden. Möglicherweise lassen sich die teilweise differierenden Ergebnisse durch unterschiedlichen Patientenkohorten und -zahlen erklären. Zudem erfolgte die Blutentnahme bei den Patienten von Ritter et al. direkt vor und 30 min nach der Infusion (Ritter et al. 2014). Bei den Patienten der vorliegenden Studie erfolgte die erste Blutentnahme direkt vor der ersten IVIg-Gabe, die zweite direkt vor der dritten IVIg-Gabe und die dritte innerhalb einer Stunde nach der fünften IVIg-Gabe. Eventuell ist der zeitliche Abstand zwischen IVIg-Gabe und Messung bedeutend, um Änderungen der Konzentrationen und Expression der Liganden und Rezeptoren festzustellen.

In der Studie von Trebst et al. wurde die Expression von inflammatorischen Chemokinrezeptoren auf zirkulierenden T-Zellen und auf zirkulierenden Monozyten mittels Durchflusszytometrie vor und nach IVIg-Therapie in Patienten mit Immunneuropathien untersucht und kein Unterschied vor und nach Therapie mit IVIg nachgewiesen (Trebst et al. 2006). Dies spricht dafür, dass die Modulation der Expression der Chemokinrezeptoren auf zirkulierenden Leukozyten durch IVIg keine Wirkungsweise in Immunneuropathien ist (Trebst et al. 2006). Ritter et al. konnte auf CD3+T-Zellen, nicht jedoch auf B-Zellen, eine geringere Expression von BAFF-R direkt nach der IVIg-Infusion nachweisen (Ritter et al. 2014). Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Studie, wo sich ebenfalls keine signifikante Veränderung der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA auf den CD19+ B-Zellen zeigte.

In einer *in vitro* Studie mit Monozyten-Zellkulturen wurde festgestellt, dass sowohl die intrazelluläre als auch die soluble BAFF-Expression durch IVIg inhibiert werden konnte (Bick et al. 2013). Monozyten scheinen Zielstrukturen von IVIg zu sein, um die BAFF-Produktion zu modulieren, da die lösliche BAFF-Form nach der IVIg-Behandlung deutlich niedrigere Werte aufwies (Bick et al. 2013). Dies ist konform mit den vorliegenden Ergebnissen über eine Reduktion der extrazellulären BAFF-Expression bei den MG-Patienten unter der IVIg-Behandlung, die jedoch *in vivo* schon von einem sehr niedrigen Expressionslevel ausging. Bick et al. beschrieben auch, dass IVIg dauerhaft in der Zellkultur vorhanden sein muss, um seinen inhibitorischen Effekt auf die BAFF-Sekretion ausüben zu können (Bick et al. 2013). Nach Entfernung des Medikamentes kam es innerhalb von 48h zu einem BAFF-Level-Anstieg auf Werte, welche bei unbehandelten Zellen gemessen wurden (Bick et al. 2013). Ein Unterschied in der BAFF-Transkription zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zeigte sich nicht (Bick et al. 2013). Abschließend auffällig war der inhibitorische Effekt des F(ab')<sub>2</sub>-Fragments von IVIg auf die BAFF-Expression vergleichbar mit jener des kompletten IVIg (Bick et al. 2013). Daraus wurde geschlossen, dass IVIg die BAFF-Expression durch FcγR unabhängige Wege in den Monozyten inhibiert (Bick et al. 2013).

Le Pottier et al. konnten erstmals die Präsenz von anti-BAFF- und anti-APRIL-Antikörpern in IVIg dokumentieren, wobei vor allem IgG und deren F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente eine Rolle zu spielen scheinen (Le Pottier et al. 2007a; Le Pottier et al. 2007b). Mittels ELISA und Western Blot konnte nachgewiesen werden, dass IVIg BAFF und APRIL in einer dosisabhängigen Weise bindet (Le Pottier et al. 2007a). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass rekombinantes BAFF (rBAFF) die Lebensfähigkeit von B-Zellen positiv beeinflusst und dieser Effekt durch Zugabe eines monoklonalen BAFF-Antikörpers oder durch IVIg wieder aufgehoben werden kann (Le Pottier et al. 2007a; Le Pottier et al. 2007b). Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass IVIg die Rolle von BAFF im B-Zell-Überleben funktionell neutralisieren kann und dass natürliche anti-BAFF-Autoantikörper in den Seren einiger gesunder Menschen vorkommen müssen (Le Pottier et al. 2007a). Auch Ritter et al. konnten anti-BAFF-Antikörper in ihrer Studie nachweisen (Ritter et al. 2014).

Das Ansprechen von fünf der acht IN-Patienten dieser Studie auf IVIg entspricht ungefähr den in der Literatur angegebenen Zahlen. 30% der CIDP-Patienten reagieren

nicht oder nur unzureichend auf IVIg (Hughes et al. 2008, Dalakas 2011). Da sich in dieser Studie weder die BAFF- oder APRIL-Serumspiegel noch die zelluläre Expression als Biomarker für ein Ansprechen auf die IVIg-Therapie gezeigt haben, wäre die Suche nach einem Parameter hilfreich, der IVIg-Responder frühzeitig von Non-Respondern zu unterscheiden hilft. Ein vielversprechender Marker stellt möglicherweise der inhibitorische FcγRIIb auf B-Zellen und Monozyten dar (Tackenberg et al. 2009). Es wurde festgestellt, dass Patienten mit CIDP weniger FcγRIIb auf naiven B-Zellen besitzen und sie an der Hochregulierung bzw. Beibehaltung des FcγRIIb während der Krankheitsprogression scheitern (Tackenberg et al. 2009). Nach klinisch effektiver IVIg-Therapie wurde die FcγRIIb-Proteinexpression auf Monozyten und B-Zellen hochreguliert, was daraufhin deutet, dass der Effekt von IVIg auf FcγRIIb ein potentieller Faktor ist, der eine Vorhersage über die Empfänglichkeit der Patienten auf IVIg erlaubt (Tackenberg et al. 2009). In einer Studie mit japanischen CIDP-Patienten konnte zudem gezeigt werden, dass TAG-1 (*transient axonal glycoprotein 1*) ein wichtiger Faktor zu sein scheint, der die Reaktivität gegenüber IVIg beeinflusst (Iijima et al. 2009).

### **4.3. Schlussfolgerung**

In der vorliegenden Studie konnten zwar keine signifikanten Unterschiede der basalen BAFF- oder APRIL-Serumspiegel bei MG- oder IN-Patienten nachgewiesen werden, allerdings war die basale zelluläre Expression von APRIL bei beiden Erkrankungen erhöht. Unter der IVIg-Therapie zeigten die BAFF-Serumspiegel ein unterschiedliches Verhalten zwischen Patienten mit gutem oder fehlendem Ansprechen auf die IVIg-Behandlung. Dies weist auf eine Fehlregulation des BAFF/APRIL-Systems auf der Synthese-/Sekretionsebene hin, da die entsprechenden Rezeptoren auf B-Zellen weder basal noch unter der IVIg-Therapie relevante Veränderungen aufwiesen. Die teilweise inkonsistenten Resultate der beiden Patientengruppen lassen sich möglicherweise durch eine unterschiedliche molekulare Regulation des BAFF/APRIL-Systems in den beiden Erkrankungen, aber auch möglicherweise durch die geringen Patientenzahlen erklären. Es sind weitere Studien nötig, um den genauen Effekt von IVIg auf BAFF und APRIL zu untersuchen und die Wirkmechanismen weiter zu ergründen.

## 5. Zusammenfassung

Bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen spielen verschiedene Faktoren eine Rolle: die genetische Prädisposition, Umgebungsfaktoren als potentielle Trigger und mögliche regulatorische Störungen innerhalb des Immunsystems. Die B-Zell-aktivierenden Faktoren BAFF und APRIL sind an der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen beteiligt. Sie werden vorrangig von Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und T-Zellen gebildet und binden an die Rezeptoren BAFF-R, BCMA und TACI, die hauptsächlich auf B-Zellen unterschiedlicher Entwicklungsstufen exprimiert werden. Bei einigen Autoimmunerkrankungen konnten BAFF-Inhibitoren zu einer Besserung führen.

In der vorliegenden Studie wurde Blut von Patienten mit Myasthenia gravis und Immuneuropathien vor, während und nach der fünftägigen Therapie mit IVIg hinsichtlich der BAFF- und APRIL-Spiegel im Serum, der Expression beider Zytokine auf und in Monozyten und der Rezeptorexpression von BAFF-R, BCMA und TACI auf B-Zellen untersucht. Die Bestimmung der BAFF- und APRIL-Serumkonzentrationen erfolgte mittels ELISA. Die extrazelluläre und/oder intrazelluläre Expression von BAFF, APRIL und deren Rezeptoren wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den basalen BAFF- und APRIL-Serumspiegeln der Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen. Allerdings war die Expression von APRIL in Monozyten bei beiden Patientengruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht. Der Einfluss von IVIg auf die Serumkonzentrationen von BAFF und APRIL war uneinheitlich. Es zeigte sich jedoch, dass ein gutes Ansprechen auf IVIg in der Gesamtpatientengruppe mit einer Reduktion des BAFF-Serumspiegels einhergeht. IVIg hatte keinen Einfluss auf die Expression der BAFF- und APRIL-Rezeptoren auf B-Zellen.

Die vorgestellten Ergebnisse sprechen dafür, dass eine Fehlregulation von BAFF und APRIL in der Pathogenese der Immuneuropathien und der Myasthenia gravis eine Rolle zu spielen scheint. Zudem fand sich ein inhibitorischer Effekt der IVIg auf die BAFF-Freisetzung bei Patienten mit gutem Ansprechen auf die Therapie. Dieser legt damit einen weiteren Wirkmechanismus von IVIg bei neurologischen Autoimmunerkrankungen nahe.

## **Summary**

Different factors play a role in the development of autoimmune disorders: genetic predisposition, environmental factors as potential triggers and dysregulations within the immune system. The B-cell activating factors BAFF and APRIL are involved in the pathogenesis of various autoimmune diseases and are mainly produced by monocytes, macrophages, dendritic cells and T-lymphocytes. They bind to three receptors, BAFF-R, BCMA and TACI, which are expressed in B-cells of different developmental stages. BAFF-inhibitors have also been effective in the treatment of some autoimmune diseases.

In the present study BAFF and APRIL serum levels, expression in monocytes and expression of their receptors in B-lymphocytes before, during and after the 5 days of IVIg-therapy in patients with chronic immune neuropathies (IN) and myasthenia gravis (MG) were investigated. The BAFF and APRIL serum levels were examined by ELISA, while the surface and intracellular expression of BAFF and APRIL in monocytes and their receptors in B-cells were measured with flow cytometry.

The disease groups' basal serum levels of BAFF and APRIL were not different from controls. APRIL expression in monocytes was increased in MG and IN compared to controls. The effect of IVIg on BAFF and APRIL serum levels showed no clear tendency in all patients. However, patients with a good clinical response to IVIg showed a decrease in BAFF serum level, whereas BAFF level in patients without response increased.

The dysregulation of BAFF and APRIL seems to play a role in the pathogenesis of immune neuropathies and myasthenia gravis and IVIg seems to have a BAFF-inhibitory effect in patients with treatment response, indicating a further mechanism of action of IVIg in neurological autoimmune diseases.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AChR	Acetylcholin-Rezeptor
AK	Antikörper
ANOVA	Analysis of Variance
anti-MUSK	anti-muskelspezifische-Tyrosinkinase
APC	antigen presenting cell, Antigen-präsentierende Zelle
APRIL	A proliferation-inducing ligand, Proliferation-induzierender Ligand
Aqua dest.	Aqua destillata
BAFF	B-cell activating factor, B-Zell aktivierender Faktor
BAFF-R	BAFF-receptor, BAFF-Rezeptor
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
B-CLL	B-Zell Chronisch Lymphatische Leukämie
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BCMA	B-cell maturation antigen, B-Zell-Reifungs-Antigen
BCR	B-cell receptor, B-Zell-Rezeptor
CAML	Calcium modulating ligand
CD	Cluster of Differentiation
CH	constant heavy
CIDP	Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
CRD	Cystein-reiche Domäne
CSR	Class switch recombination, Antikörperklassenwechsel
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
EAMG	Experimental Autoimmune Myasthenia gravis, experimentelle autoimmune Myasthenia gravis
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
F(ab)	antigen-binding fragment, antigenbindendes Fragment
FACS	Fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie
Fas-L	Fas-Ligand

Fc	crystallisable fragment, kristallisierbares Fragment
Fc $\gamma$ R	Fc $\gamma$ -Rezeptor
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
GBS	akute Polyradikulitis Guillain-Barré, Guillain-Barré Syndrom
GP	Gesunde Probanden
HLA	Human Lymphocyte Antigen, humanes Lymphozytenantigen
HRP	Horseradish Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IN	Immunneuropathien
INF	Interferon
IVIg	Intravenöse Immunglobuline
LRP4	lipoprotein receptor-related protein 4
MG	Myasthenia gravis
MHC	Major Histocompatibility Complex, Hauptkompatibilitätskomplex
MMN	Multifokale motorische Neuropathie
mRNA	messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMDA-R-Enzephalitis	Anti-N-methyl-D-Aspartat-Rezeptor-Enzephalitis
nTreg	natürliche regulatorische T-Zellen
OMS	Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom
PE	Phycoerythrin
PerCP-Cy 5.5	Peridin Chlorophyll Cyanin 5.5
QMG	quantitativer Myasthenie-Score
RA	Rheumatoide Arthritis
rBAFF	rekombinantes BAFF
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes

SjS	Sjögren Syndrom
Tab	Tabelle
TACI	Transmembrane activator and CAML interactor, Transmembran Aktivator und CAML Interaktor
TAG-1	transient axonal glycoprotein 1
TGF	Transforming Growth Factor, Transformierender Wachstumsfaktor
THD	TNF homology domain
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor

## **7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

**Abb. 1.1:** TACI, BAFF-R und BCMA sind sich im N-terminalen Submodul ähnlich, unterscheiden sich jedoch in der C-terminalen Domäne, woraus sich die unterschiedlichen Affinitäten der Rezeptoren für die Liganden BAFF und APRIL ergeben (Hymowitz et al. 2005). ..... **S. 6**

**Abb. 3.1 a und b:** BAFF- (a) und APRIL-Konzentrationen (b) im Serum von Patienten mit IN und MG sowie von GP an Tag 1 ( $p>0.05$ ). ..... **S. 26**

**Abb. 3.2 a und b:** Die BAFF-Konzentrationen im Serum von Patienten mit MG (a) und von Patienten mit IN (b) wurden an Tag 1, 3 und 5 gemessen. Es gab keine signifikanten Veränderungen ( $p>0.05$ ). ..... **S. 27**

**Abb. 3.3 a und b:** Die APRIL-Konzentrationen im Serum von Patienten mit MG (a) und von Patienten mit IN (b) wurden an Tag 1, 3 und 5 gemessen und zeigten keine signifikanten Veränderungen ( $p>0.05$ ). ..... **S. 28**

**Abb. 3.4 a und b:** Veränderung der Serumspiegel unter Therapie mit IVIg von BAFF (a) und APRIL (b) in Abhängigkeit vom klinischen Respondieren der Patienten auf die IVIg-Therapie. (a) Signifikanter Abfall des BAFF-Serumspiegels bei Patienten mit guter IVIg-Response (IVIg pos) im Vergleich zu non-Respondern (IVIg neg), ( $p<0.01$ ). (b) kein signifikanter Unterschied in der Veränderung des APRIL-Serumspiegels zwischen IVIg-Respondern (IVIg pos) und non-Respondern ( $p>0.05$ ). ..... **S. 29**

**Abb. 3.5 a und b:** Extrazelluläre BAFF-Expression auf CD14+Monozyten an Tag 1 (a). Patienten mit IN zeigen eine signifikant höhere BAFF-Expression ( $p<0.05$ ) im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv, während Patienten mit MG im Vergleich zu GP und IN-Patienten keine erhöhte BAFF-Expression auf Monozyten aufweisen ( $p>0.05$ ). Intrazelluläre BAFF-Expression in CD14+Monozyten an Tag 1 (b) bei Patienten mit IN und MG sowie bei GP ohne signifikanten Unterschied ( $p>0.05$ ). ..... **S. 30**

- Abb. 3.6 a und b:** Extrazelluläre BAFF-Expression auf CD14+Monozyten (a). Patienten mit MG weisen eine signifikante Abnahme der BAFF-Expression auf CD14+Monozyten im Verlauf der fünftägigen IVIg-Therapie auf ( $p < 0.01$ ). Intrazelluläre Expression von BAFF in CD14+Monozyten (b) bei Patienten mit MG an Tag 1, 3 und 5 ohne signifikante Unterschiede ( $p > 0.05$ ). ..... **S. 31**
- Abb. 3.7 a und b:** Extrazelluläre (a) und intrazelluläre (b) BAFF-Expression von CD14+Monozyten bei Patienten mit IN an Tag 1, 3 und 5 ohne signifikante Unterschiede ( $p > 0.05$ ). ..... **S. 32**
- Abb. 3.8 a und b:** Extrazelluläre Expression von APRIL auf CD14+Monozyten (a) bei Patienten mit IN und MG sowie bei GP an Tag 1 ohne signifikante Unterschiede ( $p > 0.05$ ). Intrazelluläre Expression von APRIL in CD14+Monozyten (b). Es bestand eine signifikant erhöhte Expression von APRIL an Tag 1 bei IN-Patienten im Gegensatz zu GP ( $p < 0.01$ ) und bei MG-Patienten im Vergleich zu GP ( $p < 0.05$ ). .....**S. 33**
- Abb. 3.9 a und b:** Extrazelluläre (a) und intrazelluläre (b) APRIL-Expression von CD14+Monozyten bei MG-Patienten. Es zeigten sich keine signifikante Änderungen über den analysierten Zeitraum ( $p > 0.05$ ). ..... **S. 34**
- Abb. 3.10 a und b:** Extrazelluläre (a) und intrazelluläre (b) APRIL-Expression von CD14+Monozyten bei Patienten mit IN an Tag 1, 3 und 5 ohne signifikante Unterschiede ( $p > 0.05$ ). ..... **S. 35**
- Abb. 3.11 a - c:** Extrazelluläre Expression von TACI (a), BCMA (b) und BAFF-R (c) auf CD19+B-Zellen bei Patienten mit IN und MG sowie bei GP an Tag 1 ohne signifikante Unterschiede ( $p > 0.05$ ). ..... **S. 36**
- Abb. 3.12 a und b:** Extrazelluläre TACI-Expression auf CD19+B-Zellen bei Patienten mit MG (a) und IN (b) an Tag 1, 3 und 5 ohne signifikanten Unterschied ( $p > 0.05$ ). ..... **S. 37**

<b>Abb. 3.13 a und b:</b> Extrazelluläre BCMA-Expression auf CD19+B-Zellen bei Patienten mit MG (a) und IN (b) an Tag 1, 3 und 5 ohne signifikanten Unterschied ( $p>0.05$ ). .....	<b>S. 38</b>
<b>Abb. 3.14 a und b:</b> Extrazelluläre BAFF-R-Expression auf CD19+B-Zellen bei Patienten mit MG (a) und IN (b) an Tag 1, 3 und 5 ohne signifikanten Unterschied ( $p>0.05$ ). .....	<b>S. 39</b>
<b>Tab. 1.1:</b> Interaktionen und Reaktionen auf BAFF und APRIL .....	<b>S. 10</b>
<b>Tab. 2.1:</b> Klinische Daten der Patienten mit Immunneuropathien, Symptome und Wirkung der IVIg-Behandlung .....	<b>S. 18</b>
<b>Tab. 2.2:</b> Klinische Daten der Patienten mit MG, Symptome und Wirkung der IVIg-Behandlung, gemessen als Veränderung des quantitativen Myasthenie-Scores QMG (signifikante Veränderung > 2 Punkte) .....	<b>S. 19</b>
<b>Tab. 2.3:</b> Übersicht über die verwendeten Antikörper, die eingesetzte Verdünnung und die Herstellerfirmen .....	<b>S. 21</b>

## 8. Literaturverzeichnis

Ada GL, Rose NR (1988) The initiation and early development of autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 47: 3–9

Amanna IJ, Dingwall JP, Hayes CE (2003) Enforced bcl-xL gene expression restored splenic B lymphocyte development in BAFF-R mutant mice. *J Immunol* 170: 4593–4600

Andreou NP, Legaki E, Dovrolis N et al (2021) B-cell activating factor (BAFF) expression is associated with Crohn's disease and can serve as a potential prognostic indicator of disease response to Infliximab treatment. *Dig Liver Dis* 53: 574-80

Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI et al. (2003) BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest* 112: 286–297

Babbitt BP, Allen PM, Matsueda G et al. (1985) Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 317: 359–361

Bakimer R, Fishman P, Blank M et al. (1992) Induction of primary antiphospholipid syndrome in mice by immunization with a human monoclonal anticardiolipin antibody (H-3). *J Clin Invest* 89: 1558–1563

Batten M, Groom J, Cachero TG et al. (2000) BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med* 192: 1453–1466

Belnoue E, Pihlgren M, McGaha TL et al. (2008) APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood* 111: 2755–2764

Bendtzen K, Svenson M, Hansen M (1993) Autoantibodies to cytokines in IVIG. *J Rheumatol* 20: 2176–2177

Benson MJ, Dillon SR, Castigli E et al. (2008) Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J Immunol* 180: 3655–3659

Berrih S, Morel E, Gaud C et al. (1984) Anti-AChR antibodies, thymic histology, and T cell subsets in myasthenia gravis. *Neurology* 34: 66–71

- Bick S, Tschernatsch M, Karg A et al. (2013) Intravenous immunoglobulin inhibits BAFF production in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy - a new mechanism of action? *J Neuroimmunol* 256: 84–90
- Blaes F (2021) Pathogenesis, diagnosis and treatment of paraneoplastic neurological syndromes. *Expert Rev Neurother* 21: 675-686
- Bodmer J-L, Schneider P, Tschopp J (2002) The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* 27: 19–26
- Bouchard C, Lacroix C, Planté V et al. (1999) Clinicopathologic findings and prognosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 52: 498–503
- Boyton RJ, Altmann DM (2002) Transgenic models of autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 127: 4–11
- Buchwald B, Ahangari R, Weishaupt A et al. (2002) Intravenous immunoglobulins neutralize blocking antibodies in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 51: 673–680
- Bülow GU von, Bram RJ (1997) NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science* 278: 138–141
- Bülow GU von, van Deursen JM, Bram RJ (2001) Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity* 14: 573–582
- Burns JC, Touma R, Song Y et al. (2015) Fine specificities of natural regulatory T cells after IVIG therapy in patients with Kawasaki disease. *Autoimmunity* 48: 181–188
- Bus SR, de Haan RJ, Vermeulen M, van Schaik IN, Eftimov F (2024) Intravenous immunoglobulin for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy Cochrane Database Syst Rev 2(2):CD001797
- Buus S, Colon S, Smith C et al. (1986) Interaction between a "processed" ovalbumin peptide and Ia molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 3968–3971
- Cachero TG, Schwartz IM, Qian F et al. (2006) Formation of virus-like clusters is an intrinsic property of the tumor necrosis factor family member BAFF (B cell activating factor). *Biochemistry* 45: 2006–2013
- Carl PL, Temple BRS, Cohen PL (2005) Most nuclear systemic autoantigens are extremely disordered proteins: implications for the etiology of systemic autoimmunity. *Arthritis Res Ther* 7: 74

- Castigli E, Scott S, Dedeoglu F et al. (2004) Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3903–3908
- Castigli E, Wilson SA, Scott S et al. (2005) TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med* 201: 35–39
- Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM et al. (2001) Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 44: 1313–1319
- Chen Z, Luo H, Peng Y et al. (2011) Comparative clinical features and immune responses after extended thymectomy for myasthenia gravis in patients with atrophic versus hyperplastic thymus. *Ann Thorac Surg* 91: 212–218
- Christen U, Herrath MG von (2004) Initiation of autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 16: 759–767
- Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ (2006) Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest* 116: 2843–2854
- Cornelis R, Chang HD, Radbruch A (2021) Keeping up with the stress of antibody production: BAFF and APRIL maintain memory plasma cells. *Curr Opin Immunol* 71: 97–102
- Corneth OBJ, Neys SFH, Hendriks RW (2022) Aberrant B cell signaling in autoimmune diseases. *Cells* 11:3391
- Cursiefen S, Mäurer M (2008) Immunglobuline in der Neurologie: Aktuelle Datenlage (Current use of immunoglobulins in neurology). *Nervenarzt* 79 Suppl 2: 67–74;
- Dalakas MC (2004) Intravenous immunoglobulin in autoimmune neuromuscular diseases. *JAMA* 291: 2367–2375
- Dalakas MC (2008) Invited article: inhibition of B cell functions: implications for neurology. *Neurology* 70: 2252–2260
- Dalakas MC (2011) Potential biomarkers for monitoring therapeutic response in patients with CIDP. *J Peripher Nerv Syst* 16 Suppl 1: 63–67
- Dalmau J, Tüzün E, Wu H-y et al. (2007) Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol* 61: 25–36
- Dalmau J, Graus F (2018) Antibody-mediated encephalitis. *N Engl J Med* 378: 840–851

- Darce JR, Arendt BK, Wu X et al. (2007) Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. *J Immunol* 179: 7276–7286
- Day ES, Cachero TG, Qian F et al. (2005) Selectivity of BAFF/BLyS and APRIL for binding to the TNF family receptors BAFFR/BR3 and BCMA. *Biochemistry* 44: 1919–1931
- Devaux JJ, Miura Y, Fukami Y et al. (2016) Neurofascin-155 IgG4 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 86: 800–807
- Dianzani U, Chiochetti A, Ramenghi U (2003) Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity. *Life Sci* 72: 2803–2824
- Doi M, Takeda T, Sakurai Y et al. (2010) Altered immunoglobulin A and M levels associated with changes in BAFF and APRIL after administration of intravenous immunoglobulin to treat Kawasaki disease. *J Investig Allergol Clin Immunol* 20: 413–418
- Fateh-Moghadam A, Wick M, Besinger U et al. (1984) High-dose intravenous gammaglobulin for myasthenia gravis. *Lancet* 1: 848–849
- Fischer-Betz R, Schneider M (2013) Empfehlungen zum Einsatz von Belimumab beim systemischen Lupus erythematodes (Recommendation for use of belimumab for systemic lupus erythematosus). *Z Rheumatol* 72: 462–467
- Fuchs S, Feferman T, Meidler R et al. (2008) A disease-specific fraction isolated from IVIG is essential for the immunosuppressive effect of IVIG in experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 194: 89–96
- Fühlhuber V, Bick S, Kirsten A et al. (2009) Elevated B-cell activating factor BAFF, but not APRIL, correlates with CSF cerebellar autoantibodies in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome. *J Neuroimmunol* 210: 87–91
- George J, Levy Y, Shoenfeld Y (1996) Immune network and autoimmunity. *Intern Med* 35: 3–9
- George J, Shoenfeld Y (1995) Infections, idiotypes and SLE. *Lupus* 4: 333–335
- Grandmont MJ de, Racine C, Roy A et al. (2003) Intravenous immunoglobulins induce the in vitro differentiation of human B lymphocytes and the secretion of IgG. *Blood* 101: 3065–3073

Gregoire-Gauthier J, Fontaine F, Benchimol L et al. (2015) Role of Natural Killer Cells in Intravenous Immunoglobulin-Induced Graft-versus-Host Disease Inhibition in NOD/LtSz-scidIL2rg(-/-) (NSG) Mice. *Biol Blood Marrow Transplant* 21: 821–828

Groom JR, Fletcher CA, Walters SN et al. (2007) BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J Exp Med* 204: 1959–1971

Groom J, Kalled SL, Cutler AH et al. (2002) Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest* 109: 59–68

Gross JA, Dillon SR, Mudri S et al. (2001) TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLyS. *Immunity* 15: 289–302

Gross JA, Johnston J, Mudri S et al. (2000) TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* 404: 995–999

Gullestad L, Aass H, Fjeld JG et al. (2001) Immunomodulating therapy with intravenous immunoglobulin in patients with chronic heart failure. *Circulation* 103: 220–225

Hahn AF, Bolton CF, Zochodne D et al. (1996) Intravenous immunoglobulin treatment in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. A double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *Brain* 119 (Pt 4): 1067–1077

Hahne M, Kataoka T, Schröter M et al. (1998) APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J Exp Med* 188: 1185–1190

Hansen MB, Svenson M, Abell K et al. (1995) Influence of interleukin-6 (IL-6) autoantibodies on IL-6 binding to cellular receptors. *Eur J Immunol* 25: 348–354

Hardenberg G, van Bostelen L, Hahne M et al. (2008) Thymus-independent class switch recombination is affected by APRIL. *Immunol Cell Biol* 86: 530–534

Hatzoglou A, Roussel J, Bourgeade MF et al. (2000) TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* 165: 1322–1330

He B, Raab-Traub N, Casali P et al. (2003) EBV-encoded latent membrane protein 1 cooperates with BAFF/BLyS and APRIL to induce T cell-independent Ig heavy chain class switching. *J Immunol* 171: 5215–5224

Higuchi O, Hamuro J, Motomura M, Yamanashi Y. Autoantibodies to low density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis (2011) *Ann Neurol* 69: 418–422

Hoch W, McConville J, Helms S et al. (2001) Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 7: 365–368

Holzelova E, Vonarbourg C, Stolzenberg M-C et al. (2004) Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *N Engl J Med* 351: 1409–1418

Huard B, Arlettaz L, Ambrose C et al. (2004) BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation. *Int Immunol* 16: 467–475

Huard B, Schneider P, Mauri D et al. (2001) T cell costimulation by the TNF ligand BAFF. *J Immunol* 167: 6225–6231

Hughes R (2008) The role of IVIg in autoimmune neuropathies: the latest evidence. *J Neurol* 255 Suppl 3: 7–11

Hughes R (2010) Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy. *J Clin Immunol* 30 Suppl 1: 3

Hughes RAC, Allen D, Makowska A et al. (2006) Pathogenesis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 11: 30–46

Hughes RA, Bouche P, Cornblath et al. (2006) European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol* 13: 326–332

Hughes RAC, Donofrio P, Bril V et al. (2008) Intravenous immune globulin (10% caprylate-chromatography purified) for the treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (ICE study): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 7: 136–144

Hughes RAC, Swan AV, van Doorn PA (2012) Intravenous immunoglobulin for Guillain-Barré syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 7: CD002063

Hymowitz SG, Patel DR, Wallweber HJA et al. (2005) Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. *J Biol Chem* 280: 7218–7227

Iijima M, Tomita M, Morozumi S et al. (2009) Single nucleotide polymorphism of TAG-1 influences IVIg responsiveness of Japanese patients with CIDP. *Neurology* 73: 1348–1352

Imbach P, Barandun S, d'Apuzzo V et al. (1981) High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet* 1: 1228–1231

Januchowski R, Prokop J, Jagodziński PP (2004) Role of epigenetic DNA alterations in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Appl Genet* 45: 237–248

Jerne NK (1984) Idiotypic networks and other preconceived ideas. *Immunol Rev* 79: 5–24

Johnston C, Pyke DA, Cudworth AG et al. (1983) HLA-DR typing in identical twins with insulin-dependent diabetes: difference between concordant and discordant pairs. *Br Med J (Clin Res Ed)* 286: 253–255

Kaegi C, Steiner UC, Wuest B, et al (2020) Systematic review of safety and efficacy of atacicept in treating immune-mediated disorders. *Front Immunol* 11:433

Kampa M, Notas G, Stathopoulos EN et al. (2020) The TNFSF Members APRIL and BAFF and Their Receptors TACI, BCMA, and BAFFR in Oncology, With a Special Focus in Breast Cancer. *Front Oncol* 10: 827

Kang SY, Kang CH, Lee KH. (2016) B-cell-activating factor is elevated in serum of patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 54:1030–1033

Karpusas M, Cachero TG, Qian F et al. (2002) Crystal structure of extracellular human BAFF, a TNF family member that stimulates B lymphocytes. *J Mol Biol* 315: 1145–1154

Kawasaki T (1967) [Acute febrile mucocutaneous syndrome with lymphoid involvement with specific desquamation of the fingers and toes in children]. *Arerugi* 16: 178–222

Kazatchkine MD, Kaveri SV (2001) Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med* 345: 747–755

Kern C, Cornuel J-F, Billard C et al. (2004) Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood* 103: 679–688

Khalili-Shirazi A, Gregson NA, Londei M et al. (1998) The distribution of CD1 molecules in inflammatory neuropathy. *J Neurol Sci* 158: 154–163

Khare SD, Sarosi I, Xia XZ et al. (2000) Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3370–3375

Kim JY, Yang Y, Moon J-S et al. (2008) Serum BAFF expression in patients with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 199: 151–154

Köller H, Kieseier BC, Jander S et al. (2005) Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *N Engl J Med* 352: 1343–1356

Kubori T, Mezaki T, Kaji R et al. (1999) [The clinical usefulness of high-dose intravenous immunoglobulin therapy for chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and multifocal motor neuropathy]. *No To Shinkei* 51: 127–135

Kuwabara S, Misawa S (2018) Chronic inflammatory demyelinating neuropathy. *Adv Exp Med Biol* 1190: 357-369

Laâbi Y, Gras MP, Carbonnel F et al. (1992) A new gene, BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by a t(4;16)(q26;p13) translocation in a malignant T cell lymphoma. *EMBO J* 11: 3897–3904

Latov N (2002) Diagnosis of CIDP. *Neurology* 59: 6

Le Pottier L, Bendaoud B, Dueymes M et al. (2007) BAFF, a new target for intravenous immunoglobulin in autoimmunity and cancer. *J Clin Immunol* 27: 257–265

Le Pottier L, Sapir T, Bendaoud B et al. (2007) Intravenous immunoglobulin and cytokines: focus on tumor necrosis factor family members BAFF and APRIL. *Ann N Y Acad Sci* 1110: 426–432

Lehmann HC, Hartung H-P (2011) Plasma exchange and intravenous immunoglobulins: mechanism of action in immune-mediated neuropathies. *J Neuroimmunol* 231: 61–69

- Leite MI, Jones M, Ströbel P et al. (2007) Myasthenia gravis thymus: complement vulnerability of epithelial and myoid cells, complement attack on them, and correlations with autoantibody status. *Am J Pathol* 171: 893–905
- Lemm G (2002) Composition and properties of IVIg preparations that affect tolerability and therapeutic efficacy. *Neurology* 59: 32
- Li X, Xiao B-G, Xi J-Y et al. (2008) Decrease of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells and elevation of CD19(+)BAFF-R(+) B cells and soluble ICAM-1 in myasthenia gravis. *Clin Immunol* 126: 180–188
- Lindsley HB, Kysela S, Steinberg AD (1974) Nucleic acid antibodies in African trypanosomiasis: studies in Rhesus monkeys and man. *J Immunol* 113: 1921–1927
- Lindstrom JM, Seybold ME, Lennon VA et al. (1998) Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. 1975. *Neurology* 51: 933
- Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM et al. (2002) DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol* 3: 822–829
- Liu Y, Xu L, Opalka N et al. (2002) Crystal structure of sTALL-1 reveals a virus-like assembly of TNF family ligands. *Cell* 108: 383–394
- López-Fraga M, Fernández R, Albar JP et al. (2001) Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. *EMBO Rep* 2: 945–951
- Loureiro-Amigo J, Franco-Jarava C, Perurena-Prieto J et al. (2021) Serum CXCL13, BAFF, IL-21 and IL-22 levels are related to disease activity and lymphocyte profile in primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 39 Suppl 133: 131-39
- Lucchinetti C, Brück W, Parisi J et al. (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47: 707–717
- Lünemann JD, Nimmerjahn F, Dalakas MC (2015) Intravenous immunoglobulin in neurology--mode of action and clinical efficacy. *Nat Rev Neurol* 11: 80–89
- Lunn MP, Manji H, Choudhary PP et al. (1999) Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: a prevalence study in south east England. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 66: 677–680

Mackay F, Leung H (2006) The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin Immunol* 18: 284–289

Mackay F, Woodcock SA, Lawton P et al. (1999) Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* 190: 1697–1710

MacLennan CA, Beeson D, Willcox N et al. (1998) Muscle nicotinic acetylcholine receptor mRNA expression in hyperplastic and neoplastic myasthenia gravis thymus. *Ann N Y Acad Sci* 841: 407–410

Madry C, Laabi Y, Callebaut I et al. (1998) The characterization of murine BCMA gene defines it as a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Int Immunol* 10: 1693–1702

Mantchev GT, Cortesão CS, Rebrovich M et al. (2007) TACI is required for efficient plasma cell differentiation in response to T-independent type 2 antigens. *J Immunol* 179: 2282–2288

Mendlovic S, Brocke S, Shoenfeld Y et al. (1988) Induction of a systemic lupus erythematosus-like disease in mice by a common human anti-DNA idiotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 2260–2264

Michael MR, Wieske L, Koel-Simmelink MJ et al. (2023) Serum B-cell activating factor is not a potential biomarker for disease activity in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol* 382: 578169

Moore PA, Belvedere O, Orr A et al. (1999) BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science* 285: 260–263

Nagata S, Suda T (1995) Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* 16: 39–43

Nagelkerke SQ, Kuijpers TW (2014) Immunomodulation by IVIg and the Role of Fc-Gamma Receptors: Classic Mechanisms of Action after all? *Front Immunol* 5: 674

Nardelli B, Belvedere O, Roschke V et al. (2001) Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood* 97: 198–204

Naum R, Gwathmey KG (2023) Autoimmune polyneuropathies. *Handbook Clin Neurol* 195: 587-608

Ng LG, Sutherland APR, Newton R et al. (2004) B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J Immunol* 173: 807–817

Novak AJ, Bram RJ, Kay NE et al. (2002) Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood* 100: 2973–2979

O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD et al. (2004) BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med* 199: 91–98

Orbach A, Rachmilewitz J, Shani N et al. (2010) CD40·FasL and CTLA-4·FasL fusion proteins induce apoptosis in malignant cell lines by dual signaling. *Am J Pathol* 177: 3159–3168

Oren DA, Li Y, Volovik Y et al. (2002) Structural basis of BLyS receptor recognition. *Nat Struct Biol* 9: 288–292

Ortiz-Aljaro P, Montes-Cano MA, García-Lozano J-R et al. (2022) Protein and functional isoform levels and genetic variants of the BAFF and APRIL pathway components in systemic lupus erythematosus. *Sci Rep* 12: 11219

Patel DR, Wallweber HJA, Yin J et al. (2004) Engineering an APRIL-specific B cell maturation antigen. *J Biol Chem* 279: 16727–16735

Pelletier M, Thompson JS, Qian F et al. (2003) Comparison of soluble decoy IgG fusion proteins of BAFF-R and BCMA as antagonists for BAFF. *J Biol Chem* 278: 33127–33133

Phillips TA, Ni J, Hunt JS (2003) Cell-specific expression of B lymphocyte (APRIL, BLyS)- and Th2 (CD30L/CD153)-promoting tumor necrosis factor superfamily ligands in human placentas. *J Leukoc Biol* 74: 81–87

Pradet-Balade B, Medema JP, López-Fraga M et al. (2002) An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein. *EMBO J* 21: 5711–5720

Ragheb S, Lisak R, Lewis R et al. (2008) A potential role for B-cell activating factor in the pathogenesis of autoimmune myasthenia gravis. *Arch Neurol* 65: 1358–1362

Rennert P, Schneider P, Cachero TG et al. (2000) A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth. *J Exp Med* 192: 1677–1684

Richardson B, Scheinbart L, Strahler J et al. (1990) Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 33: 1665–1673

Ritter C, Förster D, Albrecht P et al. (2014) IVIG regulates BAFF expression in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *J Neuroimmunol* 274: 225–229

Rose NR, Bona C (1993) Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 14: 426–430

Roxanis I, Micklem K, McConville J et al. (2002) Thymic myoid cells and germinal center formation in myasthenia gravis; possible roles in pathogenesis. *J Neuroimmunol* 125: 185–197

Roxanis I, Micklem K, Willcox N (2001) True epithelial hyperplasia in the thymus of early-onset myasthenia gravis patients: implications for immunopathogenesis. *J Neuroimmunol* 112: 163–173

Said G (2006) Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neuromuscul Disord* 16: 293–303

Sakurai D, Hase H, Kanno Y et al. (2007) TACI regulates IgA production by APRIL in collaboration with HSPG. *Blood* 109: 2961–2967

Samy E, Wax S, Huard B et al. (2017) Targeting BAFF and APRIL in systemic lupus erythematosus and other antibody-associated diseases. *Int Rev Immunol* 36: 3–19

Sarvetnick N, Ohashi PS (2003) Autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 15: 647–650

Scapini P, Nardelli B, Nadali G et al. (2003) G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLYS. *J Exp Med* 197: 297–302

Schiemann B, Gommerman JL, Vora K et al. (2001) An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 293: 2111–2114

- Schluep M, Willcox N, Ritter MA et al. (1988) Myasthenia gravis thymus: clinical, histological and culture correlations. *J Autoimmun* 1: 445–467
- Schluep M, Willcox N, Vincent A et al. (1987) Acetylcholine receptors in human thymic myoid cells in situ: an immunohistological study. *Ann Neurol* 22: 212–222
- Schneider P, Mackay F, Steiner V et al. (1999) BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 189: 1747–1756
- Schneider P, Takatsuka H, Wilson A et al. (2001) Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen. *J Exp Med* 194: 1691–1697
- Scholz JL, Crowley JE, Tomayko MM et al. (2008) BLYS inhibition eliminates primary B cells but leaves natural and acquired humoral immunity intact. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15517–15522
- Scuderi F, Alboini PE, Bartoccioni E, et al. (2011) BAFF serum levels in myasthenia gravis: effects of therapy. *J Neurol* 258:2284–2285
- Shiono H, Roxanis I, Zhang W et al. (2003) Scenarios for autoimmunization of T and B cells in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 998: 237–256
- Shoenfeld Y (1994) Idiotypic induction of autoimmunity: a new aspect of the idiotypic network. *FASEB J* 8: 1296–1301
- Shoenfeld Y, Isenberg DA (1988) Mycobacteria and autoimmunity. *Immunol Today* 9: 178–182
- Shoenfeld Y, Isenberg DA (1989) The mosaic of autoimmunity. *Immunol Today* 10: 123–126
- Shu HB, Hu WH, Johnson H (1999) TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. *J Leukoc Biol* 65: 680–683
- Singal R, Ginder GD (1999) DNA methylation. *Blood* 93: 4059–4070
- Smith SH, Cancro MP (2003) Cutting edge: B cell receptor signals regulate BLYS receptor levels in mature B cells and their immediate progenitors. *J Immunol* 170: 5820–5823
- Sobieszczuk E, Szczudlik P, Kubiszewska J, et al. (2021) Lower BAFF Levels in myasthenic patients treated with glucocorticoids. *Arch Immunol Ther Exp* 69: 22

Stein JV, López-Fraga M, Elustondo FA et al. (2002) APRIL modulates B and T cell immunity. *J Clin Invest* 109: 1587–1598

Stohl W, Metyas S, Tan SM, et al. (2004) Inverse association between circulating APRIL levels and serological and clinical disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 63: 1096-103

Svenson M, Hansen MB, Ross C et al. (1998) Antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a dominant anti-cytokine activity in human IgG preparations. *Blood* 91: 2054–2061

Tackenberg B, Jelcic I, Baerenwaldt A et al. (2009) Impaired inhibitory Fcγ receptor IIB expression on B cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 4788–4792

Thangarajh M, Kisiswa L, Pirskanen R et al. (2007) The expression of BAFF-binding receptors is not altered in multiple sclerosis or myasthenia gravis. *Scand J Immunol* 65: 461–466

Thangarajh M, Masterman T, Helgeland L et al. (2006) The thymus is a source of B-cell-survival factors-APRIL and BAFF-in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 178: 161–166

Thompson JS, Bixler SA, Qian F et al. (2001) BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science* 293: 2108–2111

Thompson JS, Schneider P, Kalled SL et al. (2000) BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population. *J Exp Med* 192: 129–135

Thorsby E (1997) Invited anniversary review: HLA associated diseases. *Hum Immunol* 53: 1–11

Toubi E, Kessel A, Shoenfeld Y (2005) High-dose intravenous immunoglobulins: an option in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 66: 395–402

Townsend AR, Rothbard J, Gotch FM et al. (1986) The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* 44: 959–968

Trebst C, Brunhorn K, Lindner M et al. (2006) Expression of chemokine receptors on peripheral blood mononuclear cells of patients with immune-mediated neuropathies treated with intravenous immunoglobulins. *Eur J Neurol* 13: 1359–1363

Uzawa A, Kanai T, Kawaguchi N, et al. (2016) Changes in inflammatory cytokine networks in myasthenia gravis. *Sci Rep* 13: 25886 doi: 10.1038/srep25886

Van Chu T, Enghard P, Riemekasten G et al. (2007) In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells. *J Immunol* 179: 5947–5957

Van den Bergh PY, Hadden RD, Bouche P, et al. (2010) EAN/PNS guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. Report of a joint task force of the EFNS and PNS – first revision. *Eur J Neurol* 17: 356-363

Van den Bergh PYK, van Doorn PA, Hadden RDM, et al. (2021) EAN/PNS guideline on diagnosis and treatment of chronic inflammatory demyelinating disease. Report of a joint task force – second revision *Eur J Neurol* 28: 3556-3583

Victor JR, Nahm DH. (2023) Mechanism underlying polyvalent IgG-induced regulatory T-cell activation and its clinical application: Anti-idiotypic regulatory T cell theory for immune tolerance. *Front Immunol* 14:1242860

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

Vincent A, Beeson D, Lang B (2000) Molecular targets for autoimmune and genetic disorders of neuromuscular transmission. *Eur J Biochem* 267: 6717–6728

Wakkach A, Guyon T, Bruand C et al. (1996) Expression of acetylcholine receptor genes in human thymic epithelial cells: implications for myasthenia gravis. *J Immunol* 157: 3752–3760

Wang H, Marsters SA, Baker T et al. (2001) TACI-ligand interactions are required for T cell activation and collagen-induced arthritis in mice. *Nat Immunol* 2: 632–637

Watad A, Amital H, Shoenfeld Y (2017) Intravenous immunoglobulin: a biological corticosteroid-sparing agent in some autoimmune conditions. *Lupus* 26: 1015-22

WITEBSKY E, Rose NR, TERPLAN K et al. (1957) Chronic thyroiditis and autoimmunization. *J Am Med Assoc* 164: 1439–1447

Wolfe GI, Kaminski HJ, Alban IB, et al. MGTX Study group (2016) Randomized trial of thymectomy in myasthenia gravis *N Engl J Med* 375:511-22

Wolfe GL, Kaminski HJ, Alban IB (2019) Long-term effect of thymectomy plus prednisone versus prednisone alone in patients with non-thymomatous myasthenia gravis: 2-year extension of the MGTX randomized trial. *Lancet Neurol* 18: 259-68

Wu Y, Bressette D, Carrell JA et al. (2000) Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BLYS. *J Biol Chem* 275: 35478–35485

Xu ZZ, Zhao BB, Xiong H, et al. (2015) Serum BAFF and APRIL levels in patients with autoimmune hemolytic anemia and their clinical significance. *Int J Hematol* 102: 394-400

Xu S, Lam KP (2001) B-cell maturation protein, which binds the tumor necrosis factor family members BAFF and APRIL, is dispensable for humoral immune responses. *Mol Cell Biol* 21: 4067–4074

Yan M, Brady JR, Chan B et al. (2001) Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. *Curr Biol* 11: 1547–1552

Yan M, Wang H, Chan B et al. (2001) Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nat Immunol* 2: 638–643

Yang M, Hase H, Legarda-Addison D et al. (2005) B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the TNF family, induces antigen presentation in B cells. *J Immunol* 175: 2814–2824

Yu G, Boone T, Delaney J et al. (2000) APRIL and TALL-I and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. *Nat Immunol* 1: 252–256

Yung R, Powers D, Johnson K et al. (1996) Mechanisms of drug-induced lupus. II. T cells overexpressing lymphocyte function-associated antigen 1 become autoreactive and cause a lupuslike disease in syngeneic mice. *J Clin Invest* 97: 2866–2871

Zhang M, Ko KH, Lam QLK et al. (2004) Novel function of TNF cytokines in regulating bone marrow B cell survival. *Cell Mol Immunol* 1: 447–453

Zhang X, Park C-S, Yoon S-O et al. (2005) BAFF supports human B cell differentiation in the lymphoid follicles through distinct receptors. *Int Immunol* 17: 779–788

Zhang J, Roschke V, Baker KP et al. (2001) Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 166: 6–10

Zhu K-Y, Feferman T, Maiti PK et al. (2006) Intravenous immunoglobulin suppresses experimental myasthenia gravis: immunological mechanisms. *J Neuroimmunol* 176: 187–197

Zinman L, Ng E, Brill V (2007) IV immunoglobulin in patients with myasthenia gravis: a randomized controlled trial. *Neurology* 68: 837–841

## **9. Publikationen aus der Dissertation**

Bick S, Tschernatsch M, Karg A et al. (2013) Intravenous immunoglobulin inhibits BAFF production in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy - a new mechanism of action? *J Neuroimmunol* 256: 84–90

## **10. Ehrenwörtliche Erklärung**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **11. Danksagung**

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Franz Blaes sehr, dass er mir die Möglichkeit zu dieser Arbeit gegeben und mich bei der Ausarbeitung der Dissertation in all den Jahren unterstützt hat. Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuerinnen Dr. Sandra Bick und Dr. Marlene Tschernatsch für ihre Geduld bei der Einführung in die Methoden sowie Durchführung derselben, stete Hilfsleistung bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse, ihre Bereitschaft meine ersten Entwürfe Korrektur zu lesen und für ihre immer offenen Ohren bei sämtlichen Fragen. Meinen Kolleginnen Mandy Arnold und Tanja Penz und den MTAs im Neuro-Labor möchte ich ebenfalls großen Dank für die inspirierende und angenehme Zusammenarbeit aussprechen. Desweiteren danke ich meiner Familie, insbesondere meiner lieben Mutter, meinen Wegbegleitern Andreas und Stefan sowie Inge, Anita und Uwe für ihre Unterstützung und hilfreichen Ratschläge.