

Aus der Klinik für Neurologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Sven Meuth

**Recombinant Acetylcholine
Receptor Immunization Induces a
Robust Model of Experimental
Autoimmune Myasthenia Gravis in
Mice**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Lukas Pieter Theissen

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Tobias Ruck

Zweitgutachter: Prof. Dr. Norbert Gerdes

Drittgutachter: Prof. Dr. Stefan Bittner

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

1. Lukas Theissen, Christina B. Schroeter, Niklas Huntemann, Saskia Räuber, Vera Dobelmann, Derya Cengiz, Alexander Herrmann, Kathrin-Koch-Hölsken, Norbert Gerdes, Hao Hu, Philipp Mourikis, Amin Polzin, Malte Kelm, Hans-Peter Hartung, Sven G. Meuth, Christopher Nelke and Tobias Ruck. Recombinant Acetylcholine Receptor Immunization Induces a Robust Model of Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis in Mice. *Cells*. 2024;13(6):508. Published 2024 Mar 14. doi:10.3390/cells13060508

Zusammenfassung (deutsch)

Die Myasthenia gravis (MG) ist eine Autoimmunerkrankung der neuromuskulären Synapse, die durch die Bildung von Autoantikörpern gegen Proteine der postsynaptischen Membran gekennzeichnet ist. Diese Antikörper beeinträchtigen die neuromuskuläre Signalübertragung, die sich in einer belastungsabhängigen Muskelschwäche manifestiert. Die experimentelle autoimmune Myasthenia gravis (EAMG) stellt ein etabliertes präklinisches Modell dar, das zur Untersuchung der Pathophysiologie der MG sowie zur Evaluierung potenzieller therapeutischer Ansätze genutzt wird. Die bisherigen EAMG-Modelle sind jedoch aufgrund der aufwendigen Gewinnung des Acetylcholinrezeptors (AChR) aus den Organen des elektrischen Zitteraals in ihrer Durchführung limitiert. Das Ziel der vorliegenden Studie war die Entwicklung eines EAMG-Modells in der Maus, das auf der Immunisierung mit rekombinantem AChR basiert. Hierdurch soll die Verfügbarkeit des Modells verbessert und die Möglichkeit geschaffen werden, transgene Mauslinien zur Untersuchung spezifischer Krankheitsmechanismen und therapeutischer Interventionen zu verwenden. Für die Entwicklung des EAMG-Modells wurden acht Wochen alte C57BL/6-Mäuse mit rekombinantem CHRNA1 (einer Untereinheit des AChR) immunisiert, welches die immunogene Sequenz enthält. Die klinischen Symptome wurden anhand eines standardisierten Scores der Muskelschwäche sowie einer Griffkraftmessung nach Belastung bewertet. Histopathologische Analysen der neuromuskulären Endplatten (NMJ) wurden durchgeführt, um die morphologische Schädigung durch Immunzellinfiltration und die reduzierte Anzahl funktioneller Synapsen zu beurteilen. Um die zelluläre Immunantwort zu charakterisieren, wurden Antikörper-Titer im Serum mittels ELISA quantifiziert. Zusätzlich wurden durchflusszytometrische Analysen von B- und T-Zell-Populationen aus lymphatischen Organen durchgeführt. Die EAMG-Mäuse wiesen eine belastungsabhängige Muskelschwäche auf. Zehn von insgesamt zwölf EAMG-Mäusen zeigten einen klinischen Phänotyp mit einer signifikant reduzierten Griffkraft. Immunhistochemische Analysen der Skelettmuskulatur ergaben eine reduzierte Dichte von NMJs und eine deutliche Kolo-kalisation dieser mit Komplementfaktor C3 und IgG. Mittels ELISA wurden signifikant erhöhte Antikörper-Titer in den EAMG-Mäusen nachgewiesen. In der Durchflusszytometrie zeigte sich eine dysregulierte T-Helferzellantwort sowie eine verstärkte Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen in den lymphatischen Organen. Die CXCR5/CXCL13-Achse spielt eine zentrale Rolle in der B-Zell-Differenzierung und könnte ein potenzielles therapeutisches Ziel für die Behandlung der MG sein. Das auf rekombinantem AChR basierende EAMG-Modell stellt ein wertvolles Instrument zur Untersuchung der Pathophysiologie von MG und zur präklinischen Prüfung therapeutischer Interventionen dar. Es ermöglicht die Untersuchung sowohl der zellulären als auch der humoralen Immunantworten und bietet die Möglichkeit, neue therapeutische Strategien zu erforschen. Weitere Forschung ist erforderlich, um das Modell zu validieren und das therapeutische Potenzial der CXCR5/CXCL13-Achse zu untersuchen.

Summary (english)

Myasthenia gravis (MG) is an autoimmune disorder of the neuromuscular junction characterized by the formation of autoantibodies against post-synaptic membrane proteins. These antibodies impair neuromuscular transmission, resulting in fatigable muscle weakness. Experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) is a well-established preclinical model used to investigate the pathophysiology of MG and to evaluate potential therapeutic approaches. However, previous EAMG models have been limited by the labor-intensive extraction of acetylcholine receptor (AChR) from the organs of the electric eel. The aim of this study was to develop a mouse EAMG model based on immunization with recombinant AChR to improve the model's accessibility and enable the use of transgenic mouse lines to investigate specific disease mechanisms and therapeutic interventions. For the development of the EAMG model, eight-week-old C57BL/6 mice were immunized with recombinant CHRNA1 (a subunit of the AChR) which contains the immunogenic sequence. Clinical symptoms were evaluated using a standardized score for muscle weakness and a grip strength measurement after exercise. Histopathological analyses of the neuromuscular junctions (NMJ) were performed to assess morphological damage due to immune cell infiltration and the reduced number of functional synapses. To characterize the cellular immune response, antibody titers in the serum were quantified using ELISA. Additionally, flow cytometric analyses of B and T cell populations from lymphoid organs were conducted. The EAMG mice showed fatigable muscle weakness. Ten out of twelve EAMG mice exhibited a clinical phenotype with significantly reduced grip strength. Immunohistochemical analyses of skeletal muscle revealed a reduced density of NMJs and a clear colocalization with complement factor C3 and IgG. ELISA confirmed significantly elevated anti-AChR antibody titers in EAMG mice. Flow cytometry revealed dysregulated T-helper cell responses and increased activation and differentiation of B cells in lymphoid organs. The CXCR5/CXCL13 axis appears to play a central role in B-cell differentiation and may represent a promising therapeutic target for the MG treatment. The recombinant AChR-based EAMG model is a valuable tool for investigating the pathophysiology of MG and for preclinical testing of therapeutic strategies. It allows investigation of both cellular and humoral immune responses and opens new possibilities for exploring innovative therapeutic approaches. Further studies are needed to validate the model and assess the therapeutic potential of targeting the CXCR5/CXCL13 axis.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholinrezeptor
AIRE	Transkriptionsfaktor Autoimmun-Regulator
Anti-AChR-AK	Autoantikörper gegen den Acetylcholinrezeptor
Anti-MuSK-AK	Autoantikörper gegen die muskelspezifische Rezeptor- Tyrosin-Kinase
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
Bregs	Regulatorische B-Zelle
Ca ²⁺	Calcium
CHRNA1	<i>Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-1</i>
CXCL13	C-X-C-Ligand 13
CXCR5	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 5
DHPR	Dihydropyridinrezeptoren
EAMG	Experimentelle autoimmune Myasthenia gravis
ELISA	<i>Enzyme-linked- immunosorbent Assay</i>
EOMG	<i>Early-onset Myasthenia gravis</i>
EPP	Endplattenpotential
FCRn	Neonataler Fc-Rezeptor
IgA	Immunglobulin-A
IgG	Immunglobulin-G
IgM	Immunglobulin-M
IL	Interleukin
KO	Knockout
LRP4	<i>Lipoprotein-related Protein 4</i>
MAC	Membranangriffskomplex
MG	Myasthenia gravis
MuSK	Muskelspezifische Rezeptor- Tyrosinkinase
Na ⁺	Natrium
NMJ	Neuromuskuläre Endplatte
RyR1	Ryanodinrezeptoren
SERCA	Sarkoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase
Tfh	Follikuläre T-Helferzelle
TH1	T-Helferzelle Typ 1
TH2	T-Helferzelle Typ 2
Thp	<i>T-helper precursors,</i>
Tregs	Regulatorische T-Zelle

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Physiologische motorische Endplatte	4
Abbildung 2	AChR-Präsentation im Thymus	9

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung (deutsch)	i
Summary (english)	ii
Abkürzungsverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	iv
1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologie	1
1.2 Ätiologie & Pathophysiologie	1
1.2.1 Physiologische Grundlagen der neuromuskulären Transmission und Kontraktion	2
1.2.2 Autoantikörper der Myasthenia gravis	4
1.2.3 Die Rolle des Thymus	7
1.2.4 Die Rolle der T-Zellen	9
1.3 Aktueller Stand der Wissenschaft und Ziele der Arbeit	10
2. Recombinant Acetylcholine Receptor Immunization Induces a Robust Model of Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis in Mice. Lukas Theissen, Christina B. Schroeter, Niklas Huntemann, Saskia Räuber, Vera Dobelmann, Derya Cengiz, Alexander Herrmann, Kathrin-Koch-Hölsken, Norbert Gerdes, Hao Hu, Philipp Mourikis, Amin Polzin, Malte Kelm, Hans-Peter Hartung, Sven G. Meuth, Christopher Nelke and Tobias Ruck. Cells 2024, 13(6), 508.	14
3. Diskussion	15
3.1 Etablierung eines EAMG-Mausmodells	15
3.2 T- und B-Zell-Dysregulation in der EAMG	16
3.3 Die CXCR5-CXCL13-Achse	19
3.4 Limitationen und Ausblick	20
4. Literatur- und Quellenverzeichnis	24
5. Anhang	31

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie

Die Myasthenia gravis (MG) ist eine chronische Autoimmunerkrankung, die zu einer Übertragungsstörung an der neuromuskulären Endplatte (NMJ) führt. In den letzten Jahrzehnten sind die weltweite Prävalenz und Inzidenz der MG angestiegen. Dieser Anstieg lässt sich unter anderem durch eine verbesserte Früherkennung, Diagnostik und Therapie sowie durch die gestiegene Lebenserwartung der Patienten erklären [1]. Aktuell wird die Prävalenz auf etwa 150–200 pro 1.000.000 Einwohner geschätzt, während die Inzidenz bei 8–10 pro 1.000.000 liegt [2]. In Europa beträgt die Prävalenz etwa 1:5000, wodurch MG als die häufigste erworbene neuromuskuläre Erkrankung gilt [3].

Charakteristisch für die MG sind alters- und geschlechtsspezifische Häufigkeitsgipfel: Frauen erkranken überwiegend zwischen dem 3. und 5. Lebensjahrzehnt, während Männer vor allem im höheren Lebensalter (60–80 Jahre) betroffen sind [4]. Besonders bei der *early-onset Myasthenia gravis* (EOMG), die hauptsächlich vor dem 50. Lebensjahr auftritt, besteht ein deutliches Geschlechterungleichgewicht mit einer etwa dreifach höheren Prävalenz bei Frauen. [4].

Zudem hat der ethnische Hintergrund einen relevanten Einfluss auf den Phänotyp der MG. Patienten afrikanischer Abstammung zeigen im Vergleich zu Personen europäischer Herkunft häufiger einen schweren sowie früher einsetzenden Krankheitsverlauf [5]. Bei Patienten ostasiatischer Herkunft wird zudem eine erhöhte Prävalenz von Autoantikörpern gegen die muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase (Anti-MuSK-AK) im Vergleich zu Personen aus Europa oder Afrika beobachtet [5, 6, 7].

1.2 Ätiologie & Pathophysiologie

Die genaue Ätiologie der MG ist bislang noch nicht abschließend geklärt. Es handelt sich um eine heterogene Autoimmunerkrankung, die in verschiedene Subtypen unterteilt werden kann. Diese unterscheiden sich hinsichtlich des Alters bei Krankheitsbeginn, der klinischen Symptome, der Thymuspathologie sowie der nachweisbaren Antikörper. Die bestehende Variabilität der Subtypen legt nahe, dass unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen zur Entstehung von Autoantikörpern beitragen und somit den klinischen Verlauf der Erkrankung beeinflussen. Die Mehrzahl der bei der MG nachgewiesenen Autoantikörper richten sich gegen verschiedene Strukturen der postsynaptischen Membran, darunter der

Acetylcholinrezeptor (Anti-AChR-AK), die muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase (MuSK), das *Lipoprotein-related Protein 4* (LRP4) und Agrin [8, 9, 10].

1.2.1 Physiologische Grundlagen der neuromuskulären Transmission und Kontraktion

Die motorische Endplatte ist eine chemische Synapse, die für die Übertragung von Erregungspotenzialen zwischen den Nervenfasern und den Muskelfasern verantwortlich ist. Sie besteht aus der Präsynapse der terminalen Nervenfasern, in denen Acetylcholin (ACh) in Vesikeln gespeichert ist, einem synaptischen Spalt sowie einer postsynaptischen Muskelmembran, an der sich die entsprechenden Acetylcholinrezeptoren (AChR) befinden.

Ein präsynaptisches Aktionspotenzial öffnet spannungsabhängige Calciumkanäle, wodurch Calciumionen (Ca^{2+}) in die Präsynapse einströmen und die Freisetzung von ACh aus synaptischen Vesikeln auslösen. ACh diffundiert durch den synaptischen Spalt und bindet an nikotinische AChR der postsynaptischen Membran. Der daraus resultierende Einstrom von Natriumionen (Na^{+}) depolarisiert das Endplattenpotenzial (EPP) und löst bei Erreichen des Schwellenwerts ein Muskelaktionspotenzial aus [11]. Dieses breitet sich über das T-Tubulus-System aus und aktiviert spannungsabhängige Dihydropyridinrezeptoren (DHPR), die mechanisch mit Ryanodinrezeptoren (RyR1) des sarkoplasmatischen Retikulums gekoppelt sind. Die dadurch induzierte Ca^{2+} -Freisetzung ins Zytosol initiiert die Muskelkontraktion.

Im physiologischen Ruhezustand befindet sich die Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen im Zytosol im unteren nanomolaren Bereich. In diesem Zustand sind die Myosin-Bindungsstellen auf den Aktinfilamenten durch Tropomyosin blockiert, welches gemeinsam mit den Troponinuntereinheiten T, I und C einen regulatorischen Proteinkomplex bildet. Dieser Komplex reagiert hochempfindlich auf Veränderungen des intrazellulären Ca^{2+} -spiegels [14].

Der Ca^{2+} -Einstrom infolge des Aktionspotenzials induziert eine Konformationsänderung des Troponin-Tropomyosin-Komplexes durch Bindung an Troponin C, wodurch die Myosin-Bindungsstellen auf dem Aktin freigelegt werden. Dies ermöglicht die zyklische Querbrückenbildung zwischen Aktin und Myosin [15]. Der nachfolgende Kraftschlag überträgt die durch die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) gespeicherte Energie in mechanische Bewegung. Nach Ablösung von Adenosindiphosphat und Phosphat kippt das Myosinköpfchen in seine energetisch niedrigere Konformation und verschiebt das Aktinfilament sarkomerzentral. Die Bindung eines neuen ATP-Moleküls löst die Aktin-Myosin-Verbindung

und initiiert den nächsten Zyklus, der bei anhaltender Ca^{2+} -Verfügbarkeit und ausreichender ATP-Konzentration kontinuierlich abläuft [15, 16].

Die Beendigung der Kontraktion und Einleitung der Relaxation erfordert die rasche Reduktion der freien Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol. Diese erfolgt primär durch die Aktivität der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA), einer energieabhängigen Pumpe, die Ca^{2+} aktiv zurück in das sarkoplasmatische Retikulum transportiert [12, 13]. Mit abnehmender Ca^{2+} -Verfügbarkeit dissoziiert das Ion von Troponin C, woraufhin Tropomyosin seine inhibitorische Position wieder einnimmt und eine erneute Querbrückenbildung verhindert. Der Muskel kehrt dadurch in den entspannten Zustand zurück [14, 15, 16].

Dieser komplexe Regulationsmechanismus ermöglicht eine hochgradig kontrollierte, schnelle und reversible Muskelaktivität, bei der Ca^{2+} als zentrales Schaltsignal fungiert, SERCA die intrazelluläre Homöostase wiederherstellt und Aktin-Myosin-Interaktionen die mechanische Kraftentwicklung vermitteln.

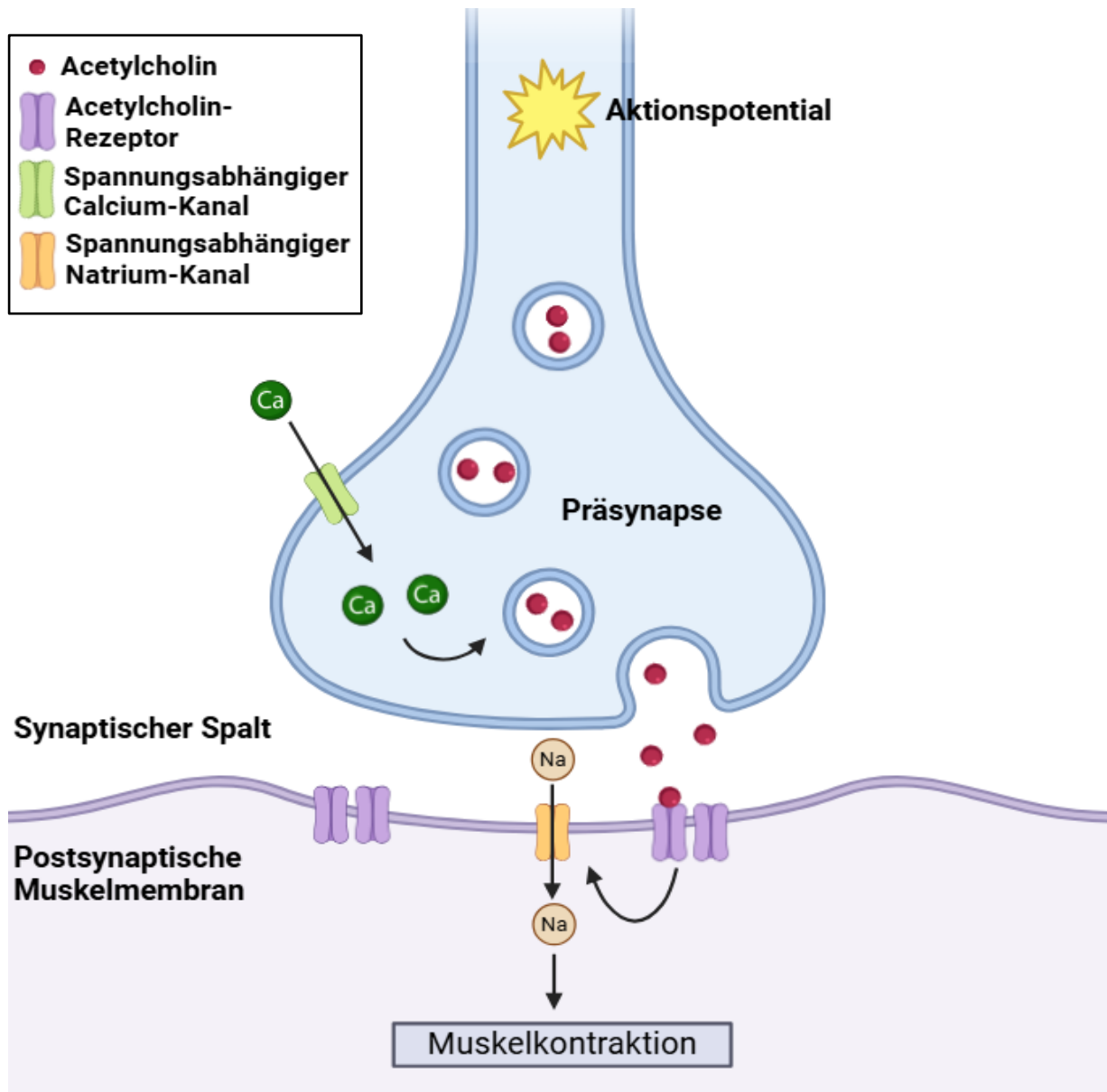


Abb. 1 Physiologische Motorische Endplatte. Die Abbildung stellt eine physiologische motorische Endplatte dar. Ein Aktionspotential an der Präsynapse der terminalen Nervenfasern führt zur Öffnung von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen und somit zu einem Calcium-Einstrom in die Präsynapse. Calcium (Ca^{2+}) führt zu einer Freisetzung des Acetylcholins aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt. Acetylcholin bindet an die entsprechenden Rezeptoren an der postsynaptischen Membran und führt durch die Öffnung von spannungsabhängigen Natrium-Kanälen (Na^+) zu einer Depolarisation des Muskels.

1.2.2 Autoantikörper der Myasthenia gravis

Die MG wird als Modellerkrankung für antikörpervermittelte Autoimmunerkrankungen angesehen. Bei dieser sind insbesondere pathogene Autoantikörper von hoher Relevanz, da deren Zielstrukturen bestimmte Proteine und Rezeptoren der postsynaptischen Membran sind und aufgrund dessen die neuromuskuläre Übertragung bei der MG stören. Der überwiegende Teil der Patienten (80–90 %) weist Antikörper gegen den nikotinischen AChR auf, welche die cholinerge Signalübertragung zwischen Nerven- und Muskelzellen stören [17]. Hierbei handelt es sich überwiegend um oligoklonale Antikörper der Immunglobulin-G-Klasse (IgG), die

verschiedene Oberflächenepitope des AChR gezielt erkennen und binden können. Seltener werden Antikörper der Immunglobulin-A- (IgA) oder M-Klasse (IgM) nachgewiesen, deren pathophysiologische Bedeutung bislang jedoch nicht eindeutig geklärt ist [18].

Da der AChR eines der primären Ziele der Autoantikörper bei der MG darstellt, kommt seiner Interaktion mit diesen Antikörpern eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der Erkrankung zu. Durch die Bindung an den AChR können die Antikörper die neuromuskuläre Übertragung über drei verschiedene Mechanismen stören:

1. **Aktivierung des Komplementsystems:** AChR-Antikörper können das klassische Komplementsystem aktivieren und die Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) initiieren. Der MAC schädigt die Muskelmembran und führt zu einem vermehrten Abbau der AChR sowie der spannungsabhängigen Calciumkanäle in der Präsynapse [19, 20, 21].
2. **Erhöhte Abbaurate der AChR:** Durch die Bindung der Antikörper kommt es zu einer Quervernetzung der AChR, die unter anderem eine verstärkte Internalisierung und Degradation der Rezeptoren verursacht. Dies führt zu einer verringerten AChR-Dichte an der postsynaptischen Membran [22].
3. **Direkte Inhibition der AChR:** Die Antikörper können die AChR direkt blockieren, sodass sie ihre Funktion verlieren und kein freies Acetylcholin mehr binden können [23, 24, 25].

Durch diese Mechanismen kommt es insgesamt zu einem Verlust der AChR und dadurch zu einer gestörten neuromuskulären Übertragung. Infolgedessen nehmen sowohl die Amplituden der Miniaturendplattenpotentiale als auch der EPPs ab, was zu ausbleibenden Muskelkontraktionen, einer belastungsabhängigen Muskelschwäche sowie schnellerer körperlicher Erschöpfung führt [22, 26].

In den letzten Jahren wurde durch die vorausgehende Forschung deutlich, dass die MG eine immunologisch heterogene Erkrankung ist. So konnten bei einem Teil der seronegativen Patienten – also solchen ohne nachweisbare Anti-AChR-AK – Autoantikörper gegen alternative Zielstrukturen identifiziert werden. Hierzu zählen insbesondere Antikörper gegen die MuSK, LRP4 oder Agrin [11]. Dabei handelt es sich überwiegend um Subklassen der Antikörper der Immunglobulin-G (IgG) 1, 3 und insbesondere 4, wobei insbesondere IgG4-Antikörper im Zusammenhang mit MuSK-assoziiierter MG eine pathophysiologisch bedeutsame Rolle spielen.

So lassen sich ungefähr bei 5-10 % der Patienten Autoantikörper gegen MuSK nachweisen, welches eine essenzielle Rolle bei der Aggregation des AChR während der neuromuskulären Synapsenbildung spielt. Anti-MuSK-AK sind typischerweise mit einem ausgeprägten, generalisierten Muskelschwund assoziiert, der frühzeitig die Bulbus- und Gesichtsmuskulatur involviert, während eine Schwäche der Extremitäten sowie der okulären Muskulatur seltener beobachtet wird. Die Erkrankung betrifft überwiegend weibliche Patienten und ist durch eine geringere Fluktuation der Muskelkraft sowie ein erhöhtes Auftreten von Atemmuskelschwäche im Vergleich zu anderen Subtypen der MG gekennzeichnet [27, 28]. Anti-MuSK-AK binden an die Immunglobulin-ähnliche Domäne des Proteins und verhindern dessen Phosphorylierung, wodurch die Agrin-LRP4-MuSK-Dok-7-Signalkaskade funktionell unterbrochen wird. Da diese Signalachse entscheidend für die synaptische Organisation ist, führt ihre Störung zu einer reduzierten Dichte von AChR in der postsynaptischen Membran sowie zu einer gestörten Anordnung der Rezeptoren gegenüber der präsynaptischen Nervenendigung [29, 30]. Darüber hinaus zeigt die Antikörperkonzentration bei MuSK-positiver MG häufig eine Korrelation mit dem klinischen Schweregrad und reflektiert im zeitlichen Verlauf die Aktivität der Erkrankung [31].

Auch LRP4, der physiologische Rezeptor für Agrin, stellt ein relevantes Autoantigen bei seronegativer MG dar. LRP4-Antikörper lassen sich bei etwa 1-5 % aller MG-Patienten nachweisen und bei circa 7-33 % der doppelt seronegativer MG-Fälle nachweisen [32, 33, 34]. LRP4 vermittelt als postsynaptischer Agrinrezeptor die Aktivierung von MuSK und initiiert so die AChR-Aggregation an der neuromuskulären Endplatte. LRP4-Antikörper verhindern die MuSK-Aktivierung und führen infolgedessen zu einer gestörten AChR-Clusterung sowie einer destabilisierten neuromuskulären Endplatte [35]. Klinisch präsentieren sich LRP4-Antikörper-positive Patienten häufig mit einem vergleichsweise milden Verlauf, wobei vornehmlich fokale oder okuläre Symptome im Vordergrund stehen [32, 33]. Eine myasthene Krise tritt in diesem Subtyp nur selten auf und die Notwendigkeit einer respiratorischen Unterstützung im Krankheitsverlauf ist insgesamt gering [36].

Autoantikörper gegen Agrin sind bislang nur in Einzelfällen beschrieben und ihre klinisch-pathophysiologische Relevanz bleibt derzeit unzureichend charakterisiert. Als löslicher Ligand von LRP4 ist Agrin ein zentraler Initiator der MuSK-abhängigen Signalkaskade, die essenziell für die Induktion, Organisation und strukturelle Stabilität der neuromuskulären Endplatte ist. Eine Beeinträchtigung der Agrin-Funktion kann folglich die postsynaptische Reifung erheblich stören und die Effizienz der neuromuskulären Transmission nachhaltig einschränken [37].

Die Identifikation dieser unterschiedlichen Autoantikörper verdeutlicht die Komplexität und Variabilität der immunologischen Mechanismen bei MG. Ungeachtet dessen bleibt der nikotinische AChR das am besten charakterisierte Zielantigen und steht weiterhin im Mittelpunkt experimenteller Modelle. Vor diesem Hintergrund konzentriert sich die vorliegende Arbeit gezielt auf die AChR-assoziierte Form der MG. Hierfür wurde das in der aktuellen Forschung etablierte Tiermodell der experimentellen autoimmunen Myasthenia gravis (EAMG) gewählt, das durch aktive Immunisierung gegen den AChR induziert wird. Diese Fokussierung ermöglicht eine spezifische Analyse der pathophysiologischen Prozesse und der immunologischen Mechanismen, die für die Modellentwicklung und das Verständnis der AChR-positiven MG von zentraler Bedeutung sind.

1.2.3 Die Rolle des Thymus

Der Thymus selbst ist ein primäres lymphatisches Organ und bildet sich normalerweise nach der Pubertät zurück. Seine Hauptfunktion besteht in der Ausreifung, Differenzierung und Elimination von T-Lymphozyten. Die genaue Rolle des Thymus in der MG und seine Beteiligung an der Produktion von Autoantikörpern ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Allerdings ist die MG die häufigste paraneoplastische Erkrankung, die mit Thymomen und Thymushyperplasien assoziiert wird. So konnte bei 10-20 % aller MG-Patienten ein Thymom nachgewiesen werden [38]. Umgekehrt bilden etwa 50 % der Thymom-Patienten Anti-AChR-AK, ohne klinische Symptome einer MG zu zeigen, während weitere 30 % im Verlauf ihres Lebens tatsächlich an einer MG erkrankten [27]. Dies ist auf die Beschaffenheit der Thymome zurückzuführen. Sie weisen morphologische Ähnlichkeiten mit der Rinde des Thymus auf, sodass sie die Reifung von naiven CD4-T-Zellen fördern und reife T-Zellen in die Peripherie exportieren können [39]. Die Thymektomie stellt daher eine relevante therapeutische Maßnahme bei MG dar, von der insbesondere jüngere Patienten mit Thymushyperplasie und nachweisbaren Anti-AChR-AK profitieren [40].

Dieser therapeutische Nutzen ist unter anderem auf die zahlreichen Keimzentren in der hyperplastischen Thymusdrüse zurückzuführen, in denen B-Zellen Anti-AChR-AK produzieren, welche zur Pathogenese der Erkrankung beitragen. Keimzentren sind typischerweise auf lymphatische Organe mit B-Zell-Produktion beschränkt und treten im gesunden Thymus nur in geringem Maße auf [41]. In mehreren Studien wurde bei Patienten mit EOMG eine erhöhte Anzahl von B-Zellen sowie IgG-produzierenden Plasmazellen nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass Keimzentren eine potenzielle Schlüsselrolle in der Aktivierung von B-Zellen und der Produktion von Anti-AChR-AK produzierenden

Plasmazellen sein könnten [42, 43, 44, 45, 46]. Allerdings variierten die Anti-AChR-Titer nach einer erfolgreichen Thymektomie. Es wird angenommen, dass im Thymus generierte Plasmazellen die Fähigkeit besitzen, in periphere Gewebe zu migrieren [47]. Dabei dürfte es sich überwiegend um langlebige Plasmazellen handeln, die sich durch eine deutlich verlängerte Lebensdauer von den kurzlebigen Plasmazellen unterscheiden, welche typischerweise nach Antigenkontakt rasch einem apoptotischen Zelltod unterliegen. Diese langlebigen Zellen sind in der Lage, über längere Zeiträume hinweg kontinuierlich Anti-AChR-AK zu sezernieren [48].

Infolge der zuvor dargelegten Aspekte lässt sich festhalten, dass der Thymus eine zentrale Rolle in der Immunopathogenese der AChR-MG einnimmt. Zur Entstehung der Autoimmunität tragen insbesondere Keimzentren, Anti-AChR-AK-produzierende B-Zellen, Thymusepithelzellen, myoide Zellen und antigenpräsentierenden Zellen (APC) bei [22, 49, 50]. Thymusepithelzellen und myoide Zellen präsentieren hierbei den reifenden T-Zellen die Antigene direkt oder mittels APC und können unter anderem zur Ausbildung von autoreaktiven T-Zellen gegen Skelettmuskelproteine wie den AChR führen [51, 52]. Die für AChR spezifischen autoreaktiven T-Zellen konnten bereits mehrfach in Thymomen sowie im peripheren Blut von MG-Patienten nachgewiesen werden [53]. Ebenfalls der Transkriptionsfaktor Autoimmun-Regulator (AIRE) spielt eine entscheidende Rolle bei der Vermeidung von Autoimmunität, indem er während der Negativselektion in der Thymopoese, die T-Zellen mit einer hohen Affinität für Antigene eliminiert. Aufgrund Thymuspathologien kommt es vermehrt zu einer gestörten Expression dieses Transkriptionsfaktors, wodurch autoreaktive CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen freigesetzt werden können [54].

Durch das hieraus resultierende Ungleichgewicht der T-Zell-Untergruppen sowie der dysregulierten Zytokine, wird die Ausbildung von autoreaktiven B-Zellen und langlebigen Anti-AChR-AK produzierenden Plasmazellen gefördert [55].

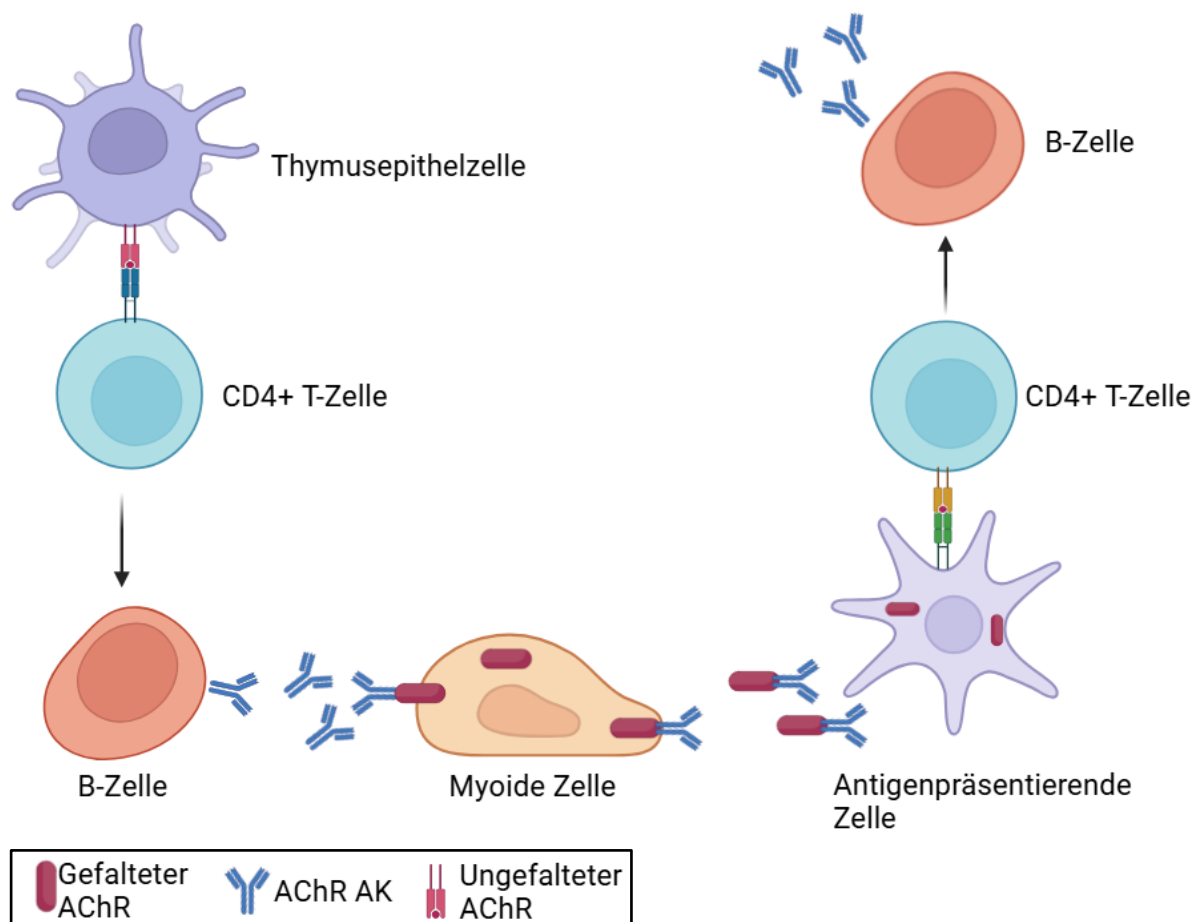


Abb. 2 AChR-Präsentation im Thymus. Thymusepithelzellen sind in der Lage, CD4⁺-T-Zellen Epitope des Acetylcholinrezeptors (AChR) zu präsentieren und so die Produktion von AChR-Antikörpern zu fördern. Zudem werden myoide Zellen, die AChR präsentieren, von diesen Antikörpern angegriffen und es kommt zur Freisetzung von AChR-Immunkomplexen, die wiederum antigenpräsentierende Zellen aktivieren können. Die antigenpräsentierenden Zellen können die B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen.

1.2.4 Die Rolle der T-Zellen

Obwohl die MG primär als durch B-Zellen vermittelte Autoantikörper-Erkrankung gilt, tragen verschiedene T- und B-Zell-Subtypen wesentlich zur Pathogenese bei. Hierzu zählen insbesondere T-Helferzellen Typ 1, 2 und 17 (TH1, TH2, TH17), folliculäre T-Helferzellen (Tfh) sowie regulatorische T- und B-Zellen (Tregs, Bregs) und deren Zytokine.

So konnte mittels Tiermodellen beispielsweise aufgezeigt werden, dass Mäuse, bei denen CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen depletiert wurden, keine EAMG nach Immunisierung mit AChRs entwickelten [56, 57, 58]. Abhängig von den jeweils vorherrschenden Zytokinen sind *T-helper-precursors* (Thp) in der Lage, sich zu TH1-, TH2-, TH17-Zellen oder Tregs zu differenzieren. Die Mehrheit der CD4⁺-T-Zellen fungiert dabei entweder als antigenspezifische Helferzellen oder proinflammatorische Zellen. Während TH1-Zellen Interleukin (IL) -2 und Interferon- γ , produzieren, schütten TH2-Zellen die IL 4, IL-5 und IL-10 aus [59]. Bei der MG sind sowohl

autoreaktive TH1- als auch TH2-Zellen involviert. TH2-Zytokine wie IL-4 fördern die B-Zell-Aktivierung, während TH1-Zellen durch Interferon- γ die Antigenpräsentation verstärken können. Zudem weisen AChR-MG-Patienten erhöhte Spiegel von IL-4, IL-10, IL-17 und IL-21 in CD4⁺-T-Zellen auf, was auf eine komplexe Immunregulation hindeutet [60, 61].

Diese dysregulierte T-Zell-Antwort kann bei der MG ein entzündliches Milieu schaffen, das die Bildung von antikörperproduzierenden B-Zellen fördert. IL-4 beispielsweise ist bekannt dafür, dass es den Klassenwechsel von B-Zellen zu IgG fördert und dadurch die Antikörperproduktion verstärkt [62, 63]. IL-17 kann indirekt die Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen unterstützen, indem es Stromazellen stimuliert und den Isotypenwechsel zu IgG verstärkt [62, 64].

Bei der Entwicklung der MG spielen auch die verminderte Aktivität regulatorischer Zelltypen wie Tregs eine entscheidende Rolle, die normalerweise die Immuntoleranz aufrechterhalten und überschießende Immunreaktionen von anderen T-Zellen und APC unterdrücken können. Sie hemmen insbesondere autoreaktive T- und B-Zellen, die in der MG eine zentrale Rolle spielen. Bei mehreren Autoimmunerkrankungen, unter anderem auch in der MG mit Thymushyperplasien, konnten vermehrt dysfunktionale Tregs nachgewiesen werden [65, 66, 67]. Hierbei war insbesondere die regulatorische Funktion beeinträchtigt, nicht aber die Anzahl der Tregs [68, 69, 70, 71].

1.3 Aktueller Stand der Wissenschaft und Ziele der Arbeit

MG ist eine prototypische Erkrankung für die antikörpervermittelte Autoimmunität. Die detaillierte Aufklärung der zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen, insbesondere der Rolle von Autoantikörpern und ihrer Interaktion mit dem Komplementsystem, hat die Entwicklung gezielter therapeutischer Ansätze ermöglicht. Ein bedeutendes Beispiel für einen solchen Ansatz ist die Komplementblockade mittels monoklonaler Antikörper gegen den Komplementfaktor C5, die darauf abzielt, die komplementvermittelte Zytotoxizität an der NMJ zu verhindern [72]. Durch die Hemmung spezifischer Komplementkomponenten wird die schädliche Immunantwort, die zu einer Störung der neuromuskulären Signalübertragung führt, effektiv moduliert.

Ein weiterer innovativer Therapieansatz ist die gezielte Hemmung des neonatalen Fc-Rezeptors (FcRn), wie es in der Behandlung von MG durch das verminderte Recycling von Autoantikörpern zum Tragen kommt [73]. Diese Therapie zielt darauf ab, die Lebensdauer von Autoantikörpern zu verkürzen und somit die autoimmunvermittelte Schädigung zu reduzieren. Die klinische Wirksamkeit dieser therapeutischen Interventionen unterstreicht die Relevanz eines tiefgehenden Verständnisses der zugrunde liegenden Krankheitsmechanismen und betont die Notwendigkeit, die Immunpathogenese von MG weiter zu erforschen, da weiterhin bei einer relevanten Anzahl an Patienten die Erkrankung nicht ausreichend zu kontrollieren ist [74].

Ein erheblicher Teil der wissenschaftlichen Evidenz für die zentrale Rolle der Komplementaktivierung in der Verstärkung der Immunantwort und der damit verbundenen Exazerbation der MG stammt aus präklinischen murinen Modellen [75, 76]. Diese Modelle haben es ermöglicht, die komplexen immunologischen Mechanismen, die zur Pathogenese der Erkrankung beitragen, zu entschlüsseln. Insbesondere konnte der MAC als ein entscheidender Faktor identifiziert werden, der für den Verlust des AChR verantwortlich ist und die neuromuskuläre Signalübertragung erheblich beeinträchtigt [75]. Die Aktivierung des Komplementsystems führt zu einer Zytotoxizität an der NMJ und verstärkt die autoimmune Reaktion, die in der Störung der AChR-vermittelten Kommunikation zwischen Nerv und Muskel resultiert. Unter den verschiedenen Tiermodellen hat sich insbesondere die EAMG als präklinisches Modell zur Untersuchung der Pathophysiologie von MG etabliert. Das EAMG-Modell wird insbesondere genutzt, um die Immunantwort von Anti-AChR-AK zu untersuchen und potenzielle therapeutische Interventionen zu evaluieren. Das Modell ist bedeutsam, da es sowohl den klinischen Phänotyp der MG mit der belastungsabhängigen Muskelschwäche als auch die zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen realistisch abbildet. Die Mehrheit der aktuellen EAMG-Modelle basiert auf der Immunisierung von Ratten mit AChR, das in der Regel aus elektrischen Aalen wie beispielsweise dem *Torpedo californica* (auch als *Tetronarce californica* bekannt) isoliert wird [77].

Die Vorgehensweise ist jedoch mit diversen Herausforderungen verbunden. Der Umgang mit den Tieren sowie die Isolierung und Aufbereitung des AChR aus den Aalen stellen technische Hürden dar. Die Herstellung und Verfügbarkeit von ausreichenden Mengen des Antigens für die Immunisierung ist begrenzt, was die Reproduzierbarkeit und den praktischen Einsatz des Modells einschränkt. Zudem steht diese Methode dem 3R-Prinzip entgegen. Das 3R-Prinzip („*Replace, Reduce, Refine*“) ist ein zentraler Grundbestandteil der biomedizinischen Forschung zur Vermeidung, Verringerung und Verbesserung von Tierversuchen beziehungsweise der

Verwendung von Tieren für wissenschaftliche Zwecke. Diese limitierten Ressourcen werfen die Notwendigkeit auf, alternative Strategien zur Antigenbeschaffung zu entwickeln. Ein vielversprechender Alternativansatz in diesem Zusammenhang ist die Verwendung von rekombinantem AChR [78, 79]. Der Einsatz von rekombinantem AChR könnte nicht nur die Verfügbarkeit des Antigens verbessern, sondern auch eine standardisierte Immunisierung ermöglichen, die eine höhere Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit von Experimenten gewährleisten würde.

Trotz der potenziellen Vorteile des rekombinanten AChR existieren bislang nur wenige Studien, die den Einsatz von rekombinantem AChR in experimentellen Modellen systematisch untersucht haben. Darüber hinaus wurde in keiner dieser Untersuchungen ein murines Modellsystem verwendet [77]. Die Implementierung eines solchen Ansatzes in der Maus bietet jedoch erhebliche methodologische und relevante Vorteile. Hierbei ist insbesondere die Verfügbarkeit von transgenen Mauslinien zu nennen, die für die Untersuchung spezifischer genetischer Mechanismen und für die Testung von Therapeutika von besonderem Interesse sind. Die Entwicklung eines rekombinanten AChR-Modells, das auf Mäusen basiert, könnte somit nicht nur die Probleme der Antigenverfügbarkeit überwinden, sondern auch neue Möglichkeiten für die Untersuchung der MG-Pathophysiologie und die Entwicklung innovativer Behandlungsstrategien eröffnen.

Vor diesem Hintergrund erscheint die Etablierung eines murinen EAMG-Modells unter Verwendung von rekombinanten AChRs in Mäusen als besonders vielversprechender Ansatz. Ein solches Modell könnte nicht nur bestehende Limitationen hinsichtlich Antigenverfügbarkeit und Spezieswahl adressieren, sondern auch die präklinische Forschung durch die Integration genetisch veränderbarer Mausmodelle erheblich bereichern.

Das EAMG-Modell stellt ein etabliertes und unverzichtbares Instrument zur Rekonstruktion der zugrunde liegenden Krankheitsmechanismen der MG dar, einschließlich der Pathophysiologie durch Autoantikörper und der Komplementaktivierung, die die neuromuskuläre Signalübertragung beeinträchtigen. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die Entwicklung eines modifizierten EAMG-Modells, das durch den Einsatz von rekombinantem AChR als Antigen eine erhöhte Reproduzierbarkeit und Verfügbarkeit ermöglicht. Ein besonderer Fokus lag auf der Immunisierung von Mäusen anstelle von Ratten, um die Anwendung des Modells auf transgene Mauslinien zu erweitern und so die Untersuchung spezifischer genetischer Modifikationen sowie molekularer Mechanismen zu erleichtern.

Das entwickelte Modell wurde darauf ausgelegt, einen klar definierten klinischen Phänotyp zu induzieren, der eine präzise Quantifizierung des Krankheitsverlaufs erlaubt. Darüber hinaus sollte es die Bindung von Autoantikörpern sowie die komplementvermittelte Schädigung der NMJ zuverlässig detektieren. Alle Tierversuche dieser Arbeit wurden von dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen genehmigt (Projektnummer G 408/21 bzw. 81-02.04.2021 A408) und gemäß lokalen, nationalen sowie europäischen Richtlinien durchgeführt.

Die in dieser Dissertation dargestellten Ergebnisse wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht: Theissen et al., Cells, 2024;13(6):508 (Siehe 2.).

2. Recombinant Acetylcholine Receptor Immunization Induces a Robust Model of Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis in Mice. Lukas Theissen, Christina B. Schroeter, Niklas Huntemann, Saskia Räuber, Vera Dobelmann, Derya Cengiz, Alexander Herrmann, Kathrin-Koch-Hölsken, Norbert Gerdes, Hao Hu, Philipp Mourikis, Amin Polzin, Malte Kelm, Hans-Peter Hartung, Sven G. Meuth, Christopher Nelke and Tobias Ruck. Cells 2024, 13(6), 508.

3. Diskussion

Die MG zählt zu den am besten erforschten Erkrankungen, wenn es um das Zusammenspiel zwischen pathogenen Autoantikörpern und komplementvermittelten Gewebeschäden geht. In diesem Kontext hat sich das Modell der EAMG als überaus wertvoll erwiesen, insbesondere bei der Aufklärung der zugrunde liegenden Pathophysiologie und der Evaluation neuer therapeutischer Strategien [72, 73, 80]. Das EAMG-Modell ermöglicht eine detaillierte Analyse der zentralen Immunmechanismen, die zur Entstehung der MG beitragen, mit einem besonderen Fokus auf die T-Zell-Dysregulation, die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen, die Produktion von Antikörpern und die komplementvermittelte Schädigung des Gewebes [81].

Gleichzeitig ist zu beachten, dass die Übertragbarkeit tierexperimenteller Ergebnisse auf den Menschen mit methodischen und biologischen Limitationen behaftet ist. Unterschiede in der Immunantwort zwischen Spezies, das Fehlen individueller Krankheitsvariabilität sowie die teils künstlich induzierte Krankheitsentstehung im Tiermodell schränken die Aussagekraft in Bezug auf die klinische Relevanz potenzieller Therapien ein. Dennoch bleiben präklinische Tiermodelle, wie die EAMG, ein unverzichtbares Instrument, um sowohl die Chancen als auch die potenziellen Risiken neuer therapeutischer Ansätze systematisch zu evaluieren, bevor diese in klinische Prüfungen überführt werden.

Vor dem Hintergrund dieser Chancen und Einschränkungen zielt die vorliegende Arbeit darauf ab, das etablierte EAMG-Modell weiterzuentwickeln – insbesondere durch den Einsatz von rekombinantem AChR als Antigen sowie durch die Verwendung der Maus als Versuchstier. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieses Ansatzes unter Berücksichtigung der erzielten Erkenntnisse, methodischen Stärken und Limitationen sowie möglicher Implikationen für zukünftige Forschungsansätze kritisch diskutiert werden.

3.1 Etablierung eines EAMG-Mausmodells

In früheren Studien zur EAMG wurden überwiegend Ratten als Modell verwendet, bei denen der AChR aus elektrischen Aalen als Antigen zur Immunisierung diente [61, 66]. Die Nutzung von AChR aus Aalen stellt jedoch erhebliche Herausforderungen dar, da sowohl die Haltung und Züchtung der Tiere als auch die Isolierung und Aufbereitung des Antigens mit hohem technischem Aufwand und begrenzter Verfügbarkeit verbunden sind. Dies erschwert nicht nur die Standardisierung und Reproduzierbarkeit experimenteller Ansätze, sondern steht auch im Widerspruch zu den Prinzipien der tierexperimentellen Forschung.

Im Sinne des 3R-Prinzips (*Replace, Reduce, Refine*) stellt das in dieser Arbeit etablierte Mausmodell, basierend auf der Immunisierung mit rekombinantem AChR, einen wichtigen Fortschritt dar. Durch den Einsatz eines biotechnologisch hergestellten Antigens können tierische Ressourcen geschont (*Reduce*), invasive Eingriffe zur Antigengewinnung vermieden (*Replace*) und die Belastung der Versuchstiere durch eine verbesserte Standardisierung reduziert werden (*Refine*). Darüber hinaus trägt das Modell zur Erhöhung der Reliabilität und Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen bei.

Ein vielversprechender alternativer Ansatz ist der Einsatz von rekombinantem AChR, das unabhängig von tierischen Quellen in stabilen Mengen hergestellt werden kann. Dies reduziert nicht nur die Anzahl der für die Antigenproduktion benötigten Tiere, sondern ermöglicht auch eine kontrollierte und standardisierte Immunisierung. Die Verwendung von Mäusen anstelle von Ratten bietet erhebliche Vorteile für die präklinische Forschung, da Mäuse nicht nur einfacher zu halten, sondern auch genetisch besser charakterisiert sind. Zudem ermöglicht die Verfügbarkeit transgener Mauslinien sowie sogenannter Knockout-(KO)-Modelle eine gezielte Untersuchung immunologischer und molekularer Mechanismen, was zu einer erhöhten Validität führt [82, 83]. Aufgrund seiner umfassenden Charakterisierung sowie der Vielzahl verfügbarer genetischer Werkzeuge bietet der weit verbreitete C57BL/6-Stamm eine ideale Grundlage für genetische und pharmakologische Untersuchungen.

Im vorliegenden EAMG-Modell führte die Immunisierung mit humanem rekombinantem *neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-1* (CHRNA1) zur Ausbildung eines klinischen Phänotyps, der durch belastungsabhängige Muskelschwäche gekennzeichnet war. Zudem konnte mittels Immunhistochemie der komplementvermittelte Schaden an den NMJs nachgewiesen werden, was einen zentralen Mechanismus der MG im Modell widerspiegelt. Die Kolokalisation von C3 und IgG mit den NMJs entspricht der humanen Pathophysiologie. Zudem zeigte sich eine deutliche Reduktion sowohl in der Anzahl als auch in der Komplexität der NMJs, was die Schädigung und Funktionsbeeinträchtigung der neuromuskulären Übertragung weiter verdeutlichte.

3.2 T- und B-Zell-Dysregulation in der EAMG

In dem EAMG-Modell konnten zudem dysregulierte T-Helferzell-Kompartimente sowie eine gestörte Differenzierung und Aktivierung von B-Zellen nachgewiesen werden, was mit dem aktuellen Wissen über die Pathophysiologie der MG übereinstimmt [84]. Dabei zeigte sich eine unterschiedliche Immunzellzusammensetzung zwischen der Milz und den Lymphknoten der EAMG-Mäuse. In der Milz waren sowohl vermehrt aktivierte B-Zellen als auch Plasmazellen

nachweisbar, wobei die aktivierten B-Zellen eine erhöhte Expression von MHC-II und des CXCR5-Motiv-Chemokinrezeptors 5 (CXCR5) aufwiesen. Dies könnte auf eine gesteigerte Antigenpräsentation und Interaktion mit follikulären T-Helferzellen hinweisen. Eine ähnliche Verschiebung zeigte sich in den Lymphknoten, wo ebenfalls eine Zunahme aktivierter B-Zellen mit hoher CXCR5-Expression beobachtet wurde. Im Gegensatz zur Milz war jedoch keine vermehrte Präsenz von Plasmazellen in den Lymphknoten der EAMG-Mäuse festzustellen.

Die Rolle der B-Zellen und ihrer Differenzierungsstadien, insbesondere der Plasmazellen, ist ein zentraler Aspekt in der Pathophysiologie der MG, da sie maßgeblich an der Produktion pathogener Autoantikörper beteiligt sind. Sowohl bei MG-Patienten als auch in der EAMG konnte eine Expansion antikörperproduzierender B-Zellen in lymphatischen Organen wie dem Thymus, der Milz und den Lymphknoten nachgewiesen werden [85].

Vor diesem Hintergrund war es von besonderer Relevanz, diese zentralen immunologischen Mechanismen im EAMG-Modell zu reproduzieren und näher zu charakterisieren. Das vorliegende Modell ermöglicht die Untersuchung der Immunzellaktivierung und -differenzierung in lymphatischen Organen, wodurch wichtige pathophysiologische Prozesse nachgebildet werden können. Trotz dieser Fortschritte besteht weiterhin ein Forschungsbedarf hinsichtlich der systematischen Analyse von B-Zellen und anderen Immunzellpopulationen in lymphoiden Geweben sowohl bei MG als auch in der EAMG. Ein vertieftes Verständnis der B-Zell-Dynamik kann potenzielle therapeutische Zielstrukturen zur Modulation der Autoimmunreaktion und zur gezielten Steuerung der Autoantikörperproduktion aufzeigen. Darüber hinaus könnte dieses Wissen wesentlich zur Optimierung des Einsatzzeitpunkts B-Zell-gerichteter Therapien – wie etwa Rituximab – beitragen. Wie die Ergebnisse der RINOMAX-Studie nahelegen, ist insbesondere bei neu diagnostizierter MG der frühzeitige therapeutische Eingriff entscheidend für die Wirksamkeit solcher Interventionen [86].

Neben den dysregulierten B-Zell-Kompartimenten ließen sich ebenfalls vermehrt IL-4⁺-Tfh-Zellen in der Milz und auch in den Lymphknoten nachweisen. Tfh sind ein Subtyp der CD4⁺-T-Zellen und sind relevant für die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen. Sie sind in der Lage CXCR5 zu exprimieren und in lymphatischen Follikeln die Antikörperproduktion sowie die Aufrechterhaltung der Keimzentren zu fördern [87].

Neben IL-4⁺-Tfh-Zellen wurde in der Milz auch eine erhöhte Anzahl an IL-17⁺-Tfh-Zellen festgestellt. Bereits frühere Studien der EAMG konnten erhöhte Konzentrationen von IL-17-

produzierenden Zellen im peripheren Blut der Mäuse nachweisen [88]. Auch beim Menschen ließen sich solche CD4⁺-T-Zellen mit einer erhöhten Produktion von IL-4, IL-17 und IL-21 finden [61, 89]. Die beobachtete Dysregulation der T-Zell-Antwort könnte eine zentrale Rolle bei der Induktion und Aufrechterhaltung der antikörperproduzierenden B-Zell-Populationen spielen. Insbesondere die Zytokine IL-4 und IL-17 scheinen dabei eine maßgebliche Funktion zu übernehmen. IL-4 ist bekannt dafür, den Klassenwechsel von B-Zellen zu IgG zu fördern, wodurch die Produktion spezifischer Antikörper verstärkt wird und ein proinflammatorisches Milieu entsteht, welches die Pathogenese der Erkrankung begünstigen könnte [62, 63]. Zusätzlich könnte IL-17 über die Aktivierung von Stromazellen indirekt zur Modulation der B-Zell-Funktion beitragen. Diese stromazelluläre Aktivierung kann wiederum den Isotypenwechsel zu IgG verstärken und dadurch die Differenzierung sowie Aktivierung von B-Zellen unterstützen [62, 64].

Die genannten Mechanismen unterstreichen die enge Interaktion zwischen T- und B-Zellen im Verlauf der autoimmunvermittelten Immunantwort und verdeutlichen die Relevanz einer gestörten T-Zell-Homöostase für die Pathophysiologie der EAMG.

Die funktionellen und anatomischen Unterschiede zwischen Milz und Lymphknoten könnten maßgeblich zu den in unserem EAMG-Modell beobachteten differenzierten Immunantworten in diesen Organen beitragen. Beide Organe sind essenzielle Bestandteile des Immunsystems, übernehmen jedoch unterschiedliche Aufgaben in der Immunregulation, was zu spezifischen immunologischen Reaktionen in den jeweiligen Geweben führt. Die Milz fungiert primär als Filter für das Blut und dient als wichtiges Reservoir für Immunzellen, insbesondere für B-Zellen und Monozyten. Ihre zentrale Funktion besteht darin, zirkulierende Antigene zu erkennen und eine adäquate Immunantwort einzuleiten [90]. Darüber hinaus stellt die Milz einen bedeutenden Ort für die Initiierung adaptiver Immunreaktionen dar, insbesondere im Kontext systemischer Infektionen oder Autoimmunerkrankungen.

Im Gegensatz dazu sind Lymphknoten als spezialisierte immunologische Organe darauf ausgerichtet, die Interaktion zwischen APC und T-Zellen zu erleichtern. Sie fungieren als zentrale Knotenpunkte für die Immunüberwachung und -aktivierung, indem sie Antigene aus dem lymphatischen System aufnehmen und gezielt Immunzellen aktivieren [91]. Insbesondere sind Lymphknoten für die Differenzierung und Proliferation von T-Zellen von entscheidender Bedeutung, wodurch sie einen zentralen Ort der Modulation der adaptiven Immunantwort darstellen.

Vor diesem Hintergrund könnte die in dem vorliegenden Modell beobachtete verstärkte Immunantwort in der Milz durch verschiedene Faktoren bedingt sein. Zum einen könnten zirkulierende Antigene, die aus der systemischen Immunisierung resultieren, eine verstärkte Aktivierung von B-Zellen und nachgeschalteten Immunprozessen in der Milz auslösen. Zum anderen könnte die Milz als primärer Ort der Antikörperproduktion eine zentrale Rolle in der Pathogenese der EAMG spielen, indem hier verstärkt Plasmazellen ausdifferenzieren, welche autoreaktive Antikörper produzieren. Die spezifische Funktionalität der Milz als Blutfilter könnte zudem zu einer erhöhten Antigenexposition und damit zu einer amplifizierten Immunreaktion in diesem Organ führen. In einer Fallserie von Patienten mit therapieresistenter MG führte eine Splenektomie bei einem Teil der Patienten zu einer Verbesserung der Symptome, was auf eine verminderte Produktion pathogener Autoantikörper durch die Entfernung dieses immunologisch aktiven Organs hindeutet [92]. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Milz im EAMG-Modell nicht nur als Filter, sondern als zentraler Ort der Immunantwort fungiert, was die verstärkte Immunaktivität in diesem Organ plausibel erklärt und gleichzeitig Hinweise für mögliche therapeutische Interventionen liefert.

Insgesamt verdeutlichen diese Unterschiede zwischen Milz und Lymphknoten die komplexen regulatorischen Mechanismen, die der Immunantwort in der EAMG zugrunde liegen und unterstreichen die Notwendigkeit einer differenzierten Betrachtung dieser Organe bei der Analyse der Pathophysiologie der Erkrankung.

3.3 Die CXCR5-CXCL13-Achse

Bei der vorliegenden Arbeit konnte eine vermehrte Expression von CXCR5 in aktivierten B-Zellen in sekundären lymphoiden Organen von EAMG-Mäusen festgestellt werden. CXCR5 wird auf der Oberfläche von Tfh und B-Zellen exprimiert und spielt eine zentrale Rolle bei der Bildung von Keimzentren sowie bei der Positionierung von Tfh und B-Zellen in lymphatischen Organen [93]. Beim Menschen zeigen thymische Plasmablasten zudem eine erhöhte Expression von CXCR5 [94]. CXCR5 wirkt als chemotaktischer Rezeptor, der den Chemokin C-X-C-Liganden 13 (CXCL13) erkennt, welcher von aktivierten T-Zellen sezerniert wird und die Migration von B-Zellen in lymphoide Organe ermöglicht [95, 96]. CXCL13 hingegen wird normalerweise von lymphatischem Gewebe produziert und ist entscheidend für die Entwicklung von sekundären lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten) sowie von B1-Zellen [97, 98, 99]. B1-Zellen sind eine Untergruppe der B-Zellen und wurden in der Vergangenheit mit der Autoantikörperproduktion und der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht [100, 101].

Diese Daten deuten darauf hin, dass der CXCR5/CXCL13-Signalweg ein potenzieller Treiber der B-Zell-Differenzierung bei EAMG und möglicherweise bei humaner MG ist. Allerdings berichteten eine Reihe von vorausgehenden Studien über abweichende CXCR5/CXCL13-Signalwege bei MG, insbesondere in Fällen, die mit einer Thymuspathologie assoziiert sind [93, 102]. Daher könnte die unterschiedliche Expression von CXCL13 bei MG-Patienten eine wichtige Rolle bei der Vorhersage des Krankheitsverlaufs spielen und sich als interessantes therapeutisches Ziel entwickeln.

3.4 Limitationen und Ausblick

Im Zuge des gewählten Versuchsansatzes zeigten sich verschiedene Einschränkungen. Eine zentrale Limitation besteht darin, dass das verwendete EAMG-Modell ausschließlich auf rekombinantem AChR basiert. Während die durch Anti-AChR-AK vermittelte MG erhebliches wissenschaftliches Interesse geweckt hat, bleiben die therapeutischen Optionen für durch Antikörper gegen die MuSK oder durch LRP4 induzierte MG begrenzt. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Wirkung von AChR untersucht. Daher lassen sich keine Aussagen darüber treffen, ob die Verabreichung von rekombinantem MuSK oder LRP4 ebenfalls geeignete Modelle zur Induktion der EAMG auslösen könnten. Hierbei sei jedoch darauf hingewiesen, dass frühere Studien an Mäusen gezeigt haben, dass eine Immunisierung mit MuSK oder LRP4 prinzipiell durchführbar ist [103, 104].

Eine weitere Einschränkung dieser Studie besteht darin, dass frühere Modelle nicht die gleiche Immunzellanalyse verwendet haben, sodass nicht festgestellt werden könnte, ob das immunologische Profil dieses Modells den vorherigen EAMG-Modellen entspricht. Daher möchten wir in zukünftigen Untersuchungen auch die Rolle weiterer Immunzellpopulationen bewerten, die in unserer Studie fehlten. Hierzu zählen vor allem die Bregs sowie angeborene Immunzellen. Ein weiterer wichtiger Aspekt, den wir in zukünftigen Arbeiten genauer untersuchen möchten, ist die zeitliche Dynamik der Immunantwort im EAMG-Modell. Eine differenzierte Betrachtung der Immunzellantworten zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Erkrankung könnte neue Einblicke in die pathophysiologischen Mechanismen liefern. Hierbei planen wir, die Immunantwort in verschiedenen Lebenswochen der Mäuse zu analysieren, da die Alterung der Tiere und die unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Immunsystems potenziell Einfluss auf die Krankheitsevolution und die Immunantwort haben können. Eine detaillierte Untersuchung der Immunzellveränderungen zu spezifischen Zeitpunkten könnte zudem helfen, die zeitliche Variation der Immunreaktionen besser zu verstehen.

Darüber hinaus planen wir, mittels mehrfacher Antikörperbestimmungen durch *Enzyme-linked-Immunosorbent Assay* (ELISA) zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Antikörperantwort im Verlauf der Erkrankung genauer zu überwachen. Dies würde es ermöglichen, tiefgreifende Erkenntnisse bezüglich der Immunantwort zu erlangen, insbesondere hinsichtlich der Spezifität und Quantität der Autoantikörper, die mit der MG assoziiert sind. Es wäre interessant zu untersuchen, wie sich diese Antikörperspiegel in Abhängigkeit von den verschiedenen Lebensphasen der Tiere verändern und ob es Korrelationen mit der Schwere der klinischen Symptome oder der histopathologischen Ausprägung der Erkrankung gibt.

Ein zentrales Ziel zukünftiger Untersuchungen sollte die detaillierte Charakterisierung immunologischer Veränderungen in den lymphatischen Organen im zeitlichen Verlauf der Erkrankung darstellen. Dabei ist insbesondere von Interesse, inwieweit sich unterschiedliche Immunzellpopulationen – etwa im Thymus, in der Milz und in den Lymphknoten – während der verschiedenen Lebenswochen der Tiere in ihrer Zusammensetzung, Aktivierung oder Differenzierung verändern. Neben der bereits beschriebenen Expansion von B-Zellen in diesen Organen wäre es zudem von Bedeutung, die Dynamik antikörperproduzierender B-Zell-Subpopulationen weiter zu analysieren. Frühere Arbeiten konnten sowohl bei MG-Patienten als auch im EAMG-Mausmodell eine Vermehrung dieser Zellen in lymphatischen Geweben nachweisen [69]. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass aktivierte und klonal expandierte B-Zellen nicht nur in zentralen lymphatischen Organen, sondern auch im peripheren Blut von MG-Patienten nachweisbar sind [105, 106, 107, 108]. Besonders interessant wäre es, diesen Befund zukünftig auch im EAMG-Mausmodell zu bestätigen, um die Relevanz peripher zirkulierender B-Zellen für die Krankheitsentstehung und -progression weiter einordnen zu können. Die genaue zeitliche und räumliche Einordnung dieser Prozesse könnte entscheidend zum besseren Verständnis der Pathogenese beitragen und neue therapeutische Ansatzpunkte eröffnen.

Zusätzlich beabsichtigen wir, den Einfluss auf neuromuskuläre Strukturen eingehender zu untersuchen, wobei der Fokus insbesondere auf den NMJs liegen soll. Unser besonderes Interesse gilt dabei der Frage, ab welcher Lebenswoche bei den Mäusen eine signifikante Schädigung der NMJ nachweisbar ist, insbesondere in Form von Komplementablagerungen (C3) und IgG. Darüber hinaus möchten wir untersuchen, ob die Komplexität der NMJ mit zunehmendem Krankheitsverlauf abnimmt beziehungsweise ein chronischer Schaden entsteht und in welchem Zusammenhang diese Veränderungen mit der Schwere der klinischen Symptome stehen.

Ein weiterer Aspekt unseres Modells war die Beurteilung des klinischen Phänotyps der Mäuse, vor allem der belastungsabhängigen Muskelschwäche. Die von uns gewählte Methode der Messung der Maximalkraft nach körperlicher Belastung mittels *Grip strength test* ist eine etablierte Methode in Tiermodellen. Trotz der Verblindung von Kontroll- und EAMG-Mäusen und der Einbeziehung von unterschiedlichen Untersuchern bleibt diese Methode in einem gewissen Maße subjektiv. Daher wäre es methodisch sinnvoll, zukünftig ergänzend den Rotarod-Test einzusetzen, um die motorische Aktivität der Mäuse objektiver zu bewerten. Der Rotarod ist ein weit verbreiteter Test zur Beurteilung der motorischen Koordination und Ausdauer. Hierbei werden die Mäuse auf einen sich rotierenden Stab gesetzt und es wird die Zeit gemessen bis sie herabfallen [109].

Ein wesentlicher Grund für die Wahl von Mäusen als Modellorganismus in der vorliegenden Studie war die Verfügbarkeit transgener Mauslinien, die gezielte Untersuchungen spezifischer genetischer Mechanismen ermöglichen. Zudem erlaubt die Verwendung dieser Mausmodelle die Evaluation potenzieller therapeutischer Ansätze. In diesem Zusammenhang planen wir die weitere Validierung unseres Modells unter Einsatz verschiedener KO-Mauslinien, die für zentrale Prozesse der Immunregulation, der neuromuskulären Signalübertragung sowie der Autoimmunität relevant sind. Von besonderem Interesse ist hierbei die Untersuchung der EAMG in CXCR5-KO-Mäusen, um die funktionelle Bedeutung der CXCR5/CXCL13-Signalachse zu analysieren. Diese Signalkaskade hat in unserem Modell eine zentrale Rolle eingenommen und könnte wesentlich zur Pathogenese der EAMG beitragen. Die gezielte Ausschaltung von CXCR5 erlaubt es, die immunologischen Mechanismen dieser Erkrankung weiter zu charakterisieren und potenzielle therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren. Die Untersuchung des EAMG-Modells in IL-17-Knockout-(IL-17^{-/-})-Mäusen könnte von besonderem Interesse sein, da IL-17 eine zentrale Rolle in der Pathogenese vieler Autoimmunerkrankungen spielt, einschließlich der MG. Frühere Studien haben eine erhöhte Frequenz IL-17-produzierender CD4⁺-T-Zellen in EAMG-Mäusen nachgewiesen [88]. Zudem zeigte sich in IL-17-defizienten Mäusen ein abgeschwächter EAMG-Phänotyp, was darauf hindeutet, dass IL-17 an der Modulation der Immunantwort und der Verstärkung der neuromuskulären Schädigung beteiligt sein könnte [110].

Die EAMG stellt ein bedeutendes Tiermodell zur Untersuchung der Pathogenese der MG dar. Jedoch sind die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen und die Generalisierbarkeit der daraus abgeleiteten Mechanismen mit wesentlichen Limitationen behaftet. Insbesondere die genetische Homogenität der verwendeten Mauslinien führt zu einer

standardisierten Immunantwort, die sich von der biologischen Variabilität des menschlichen Immunsystems unterscheidet, wodurch die Relevanz der Modellbefunde für die menschliche Krankheit eingeschränkt sein kann. Umweltfaktoren, wie sie bei Menschen den Krankheitsverlauf beeinflussen, bleiben in Mausmodellen unberücksichtigt, was die externe Validität der Studien begrenzt. Zusätzlich werden in Mausmodellen in der Regel akute Krankheitsphasen untersucht, wohingegen die chronische Natur der menschlichen MG, einschließlich langfristiger Komplikationen und Therapieanpassungen, nur unzureichend abgebildet werden kann. Vor diesem Hintergrund ist es notwendig, ergänzende klinische Studien sowie humanisierte Modelle zu entwickeln, die eine bessere Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse auf die menschliche Erkrankung ermöglichen.

Trotz dieser Limitationen bildet das vorgestellte EAMG-Modell zentrale immunologische und pathophysiologische Aspekte der MG ab und ermöglicht die gezielte Untersuchung von immunmodulatorischen Therapieansätzen. Die zentrale Rolle der B-Zell-Aktivierung und der Tfh-Dysregulation deutet auf potenzielle therapeutische Angriffspunkte hin, insbesondere in Bezug auf die CXCR5/CXCL13-Signalachse und IL-4-vermittelte B-Zell-Differenzierung. Ein entscheidender Vorteil des Modells besteht in der Verwendung von rekombinantem AChR, das eine standardisierte, hochreproduzierbare Immunantwort gewährleistet und damit die Vergleichbarkeit experimenteller Ergebnisse zwischen Versuchen und Laboren signifikant erhöht. Diese Standardisierung ermöglicht nicht nur eine präzisere Quantifizierung pathophysiologischer Mechanismen, sondern trägt auch wesentlich zur Umsetzung des 3R-Prinzips bei, indem die Anzahl der benötigten Versuchstiere reduziert und deren Belastung minimiert wird. Durch die Verbindung aus methodischer Robustheit, hoher Reproduzierbarkeit und ethischer Vertretbarkeit stellt das dargestellte EAMG-Modell eine exzellente Plattform für weiterführende pathophysiologische Studien sowie die präklinische Erprobung innovativer therapeutischer Strategien unter Umsetzung des 3R-Prinzips dar.

4. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Phillips LH 2nd. The epidemiology of myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;998:407-412. doi:10.1196/annals.1254.053
2. Punga AR, Maddison P, Heckmann JM, Guptill JT, Evoli A. Epidemiology, diagnostics, and biomarkers of autoimmune neuromuscular junction disorders. *Lancet Neurol.* 2022;21(2):176-188. doi:10.1016/S1474-4422(21)00297-0
3. Tannemaat MR, Huijbers MG, Verschuuren JJGM. Myasthenia gravis-Pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Handb Clin Neurol.* 2024;200:283-305. doi:10.1016/B978-0-12-823912-4.00026-8
4. Carr AS, Cardwell CR, McCarron PO, McConville J. A systematic review of population based epidemiological studies in Myasthenia Gravis. *BMC Neurol.* 2010;10:46. Published 2010 Jun 18. doi:10.1186/1471-2377-10-46
5. Heckmann JM, Owen EP, Little F. Myasthenia gravis in South Africans: racial differences in clinical manifestations. *Neuromuscul Disord.* 2007;17(11-12):929-934. doi:10.1016/j.nmd.2007.07.002
6. Boldingh MI, Maniaol A, Brunborg C, et al. Prevalence and clinical aspects of immigrants with myasthenia gravis in northern Europe. *Muscle Nerve.* 2017;55(6):819-827. doi:10.1002/mus.25408
7. Abukhalil F, Mehta B, Saito E, Mehta S, McMurtray A. Gender and Ethnicity Based Differences in Clinical and Laboratory Features of Myasthenia Gravis. *Autoimmune Dis.* 2015;2015:197893. doi:10.1155/2015/197893
8. Aarli JA, Stefansson K, Marton LS, Wollmann RL. Patients with myasthenia gravis and thymoma have in their sera IgG autoantibodies against titin. *Clin Exp Immunol.* 1990;82(2):284-288. doi:10.1111/j.1365-2249.1990.tb05440.x
9. Mygland A, Tysnes OB, Matre R, Volpe P, Aarli JA, Gilhus NE. Ryanodine receptor autoantibodies in myasthenia gravis patients with a thymoma. *Ann Neurol.* 1992;32(4):589-591. doi:10.1002/ana.410320419
10. Buckley C, Newsom-Davis J, Willcox N, Vincent A. Do titin and cytokine antibodies in MG patients predict thymoma or thymoma recurrence?. *Neurology.* 2001;57(9):1579-1582. doi:10.1212/wnl.57.9.1579
11. Dresser L, Wlodarski R, Rezania K, Soliven B. Myasthenia Gravis: Epidemiology, Pathophysiology and Clinical Manifestations. *J Clin Med.* 2021;10(11):2235. Published 2021 May 21. doi:10.3390/jcm10112235
12. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002;415(6868):198-205. doi:10.1038/415198a
13. Block BA, Imagawa T, Campbell KP, Franzini-Armstrong C. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 1988;107(6 Pt 2):2587-2600. doi:10.1083/jcb.107.6.2587
14. Berchtold MW, Brinkmeier H, Müntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev.* 2000;80(3):1215-1265. doi:10.1152/physrev.2000.80.3.1215
15. Melzer W, Herrmann-Frank A, Lüttgau HC. The role of Ca²⁺ ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1241(1):59-116. doi:10.1016/0304-4157(94)00014-5
16. Szent-Györgyi AG. Calcium regulation of muscle contraction. *Biophys J.* 1975;15(7):707-723. doi:10.1016/S0006-3495(75)85849-8

17. Gilhus NE. Myasthenia and the neuromuscular junction. *Curr Opin Neurol.* 2012;25(5):523-529. doi:10.1097/WCO.0b013e3283572588
18. Vincent A. Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):797-804. doi:10.1038/nri916
19. Nakano S, Engel AG. Myasthenia gravis: quantitative immunocytochemical analysis of inflammatory cells and detection of complement membrane attack complex at the end-plate in 30 patients. *Neurology.* 1993;43(6):1167-1172. doi:10.1212/wnl.43.6.1167
20. Adams ME, Kramarcy N, Fukuda T, Engel AG, Sealock R, Froehner SC. Structural abnormalities at neuromuscular synapses lacking multiple syntrophin isoforms [published correction appears in *J Neurosci.* 2004 Dec 15;24(50):11481]. *J Neurosci.* 2004;24(46):10302-10309. doi:10.1523/JNEUROSCI.3408-04.2004
21. Donaldson JG, Porat-Shliom N, Cohen LA. Clathrin-independent endocytosis: a unique platform for cell signaling and PM remodeling. *Cell Signal.* 2009;21(1):1-6. doi:10.1016/j.cellsig.2008.06.020
22. Drachman DB, Angus CW, Adams RN, Michelson JD, Hoffman GJ. Myasthenic antibodies cross-link acetylcholine receptors to accelerate degradation. *N Engl J Med.* 1978;298(20):1116-1122. doi:10.1056/NEJM197805182982004
23. Howard FM Jr, Lennon VA, Finley J, Matsumoto J, Elveback LR. Clinical correlations of antibodies that bind, block, or modulate human acetylcholine receptors in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci.* 1987;505:526-538. doi:10.1111/j.1749-6632.1987.tb51321.x
24. Gomez CM, Richman DP. Anti-acetylcholine receptor antibodies directed against the alpha-bungarotoxin binding site induce a unique form of experimental myasthenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(13):4089-4093. doi:10.1073/pnas.80.13.4089
25. Whiting PJ, Vincent A, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptor antibody characteristics in myasthenia gravis. Fractionation of alpha-bungarotoxin binding site antibodies and their relationship to IgG subclass. *J Neuroimmunol.* 1983;5(1):1-9. doi:10.1016/0165-5728(83)90022-x
26. Elmqvist d, hofmann ww, kugelberg j, quastel dm. An electrophysiological investigation of neuromuscular transmission in myasthenia gravis. *J physiol.* 1964;174(3):417-434. doi:10.1113/jphysiol.1964.sp007495
27. Guptill JT, Sanders DB, Evoli A. Anti-MuSK antibody myasthenia gravis: clinical findings and response to treatment in two large cohorts. *Muscle Nerve.* 2011;44(1):36-40. doi:10.1002/mus.22006
28. Chang T, Leite MI, Senanayake S, et al. Clinical and serological study of myasthenia gravis using both radioimmunoprecipitation and cell-based assays in a South Asian population. *J Neurol Sci.* 2014;343(1-2):82-87. doi:10.1016/j.jns.2014.05.037
29. Gilhus NE, Skeie GO, Romi F, Lazaridis K, Zisimopoulou P, Tzartos S. Myasthenia gravis - autoantibody characteristics and their implications for therapy. *Nat Rev Neurol.* 2016;12(5):259-268. doi:10.1038/nrneurol.2016.44
30. Okada K, Inoue A, Okada M, et al. The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science.* 2006;312(5781):1802-1805. doi:10.1126/science.1127142
31. Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, et al. Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. *Neurology.* 2011;77(20):1819-1826. doi:10.1212/WNL.0b013e318237f660
32. Higuchi O, Hamuro J, Motomura M, Yamanashi Y. Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann Neurol.* 2011;69(2):418-422. doi:10.1002/ana.22312

33. Zisimopoulou P, Evangelakou P, Tzartos J, et al. A comprehensive analysis of the epidemiology and clinical characteristics of anti-LRP4 in myasthenia gravis. *J Autoimmun.* 2014;52:139-145. doi:10.1016/j.jaut.2013.12.004
34. Pevzner A, Schoser B, Peters K, et al. Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibody-negative myasthenia gravis. *J Neurol.* 2012;259(3):427-435. doi:10.1007/s00415-011-6194-7
35. Yan M, Xing GL, Xiong WC, Mei L. Agrin and LRP4 antibodies as new biomarkers of myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci.* 2018;1413(1):126-135. doi:10.1111/nyas.13573
36. Tsonis AI, Zisimopoulou P, Lazaridis K, et al. MuSK autoantibodies in myasthenia gravis detected by cell based assay--A multinational study. *J Neuroimmunol.* 2015;284:10-17. doi:10.1016/j.jneuroim.2015.04.015
37. Witzemann V, Chevessier F, Pacifici PG, Yampolsky P. The neuromuscular junction: selective remodeling of synaptic regulators at the nerve/muscle interface. *Mech Dev.* 2013;130(6-8):402-411. doi:10.1016/j.mod.2012.09.004
38. Bernard C, Frih H, Pasquet F, et al. Thymoma associated with autoimmune diseases: 85 cases and literature review. *Autoimmun Rev.* 2016;15(1):82-92. doi:10.1016/j.autrev.2015.09.005
39. Marx A, Porubsky S, Belharazem D, et al. Thymoma related myasthenia gravis in humans and potential animal models. *Exp Neurol.* 2015;270:55-65. doi:10.1016/j.expneurol.2015.02.010
40. Wolfe GI, Kaminski HJ, Aban IB, et al. Randomized Trial of Thymectomy in Myasthenia Gravis [published correction appears in *N Engl J Med.* 2017 May 25;376(21):2097. doi: 10.1056/NEJMx170003. *N Engl J Med.* 2016;375(6):511-522. doi:10.1056/NEJMoa1602489
41. Marx A, Pfister F, Schalke B, Saruhan-Direskeneli G, Melms A, Ströbel P. The different roles of the thymus in the pathogenesis of the various myasthenia gravis subtypes. *Autoimmun Rev.* 2013;12(9):875-884. doi:10.1016/j.autrev.2013.03.007
42. Abdou NI, Lisak RP, Zweiman B, Abrahamsohn I, Penn AS. The thymus in myasthenia gravis. Evidence for altered cell populations. *N Engl J Med.* 1974;291(24):1271-1275. doi:10.1056/NEJM197412122912403
43. Shirai T, Miyata M, Nakase A, Itoh T. Lymphocyte subpopulation in neoplastic and non-neoplastic thymus and in blood of patients with Myasthenia gravis. *Clin Exp Immunol.* 1976;26(1):118-123.
44. Levinson AI, Zweiman B, Lisak RP, Dziarski A, Moskovitz AR. Thymic B-cell activation in myasthenia gravis. *Neurology.* 1984;34(4):462-468. doi:10.1212/wnl.34.4.462
45. Leprince C, Cohen-Kaminsky S, Berrih-Aknin S, et al. Thymic B cells from myasthenia gravis patients are activated B cells. Phenotypic and functional analysis. *J Immunol.* 1990;145(7):2115-2122.
46. Hill ME, Shiono H, Newsom-Davis J, Willcox N. The myasthenia gravis thymus: a rare source of human autoantibody-secreting plasma cells for testing potential therapeutics. *J Neuroimmunol.* 2008;201-202:50-56. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.06.027
47. Fujii Y, Hashimoto J, Monden Y, Ito T, Nakahara K, Kawashima Y. Specific activation of lymphocytes against acetylcholine receptor in the thymus in myasthenia gravis. *J Immunol.* 1986;136(3):887-891
48. Arce S, Cassese G, Hauser A, et al. The role of long-lived plasma cells in autoimmunity. *Immunobiology.* 2002;206(5):558-562. doi:10.1078/0171-2985-00204

49. Pevzner A, Schoser B, Peters K, et al. Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibody-negative myasthenia gravis. *J Neurol.* 2012;259(3):427-435. doi:10.1007/s00415-011-6194-7
50. Pineles SL, Avery RA, Moss HE, et al. Visual and systemic outcomes in pediatric ocular myasthenia gravis. *Am J Ophthalmol.* 2010;150(4):453-459.e3. doi:10.1016/j.ajo.2010.05.002
51. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol.* 2014;14(6):377-391. doi:10.1038/nri3667
52. Poëa-Guyon S, Christadoss P, Le Panse R, et al. Effects of cytokines on acetylcholine receptor expression: implications for myasthenia gravis. *J Immunol.* 2005;174(10):5941-5949. doi:10.4049/jimmunol.174.10.5941
53. Romi F, Skeie GO, Aarli JA, Gilhus NE. Muscle autoantibodies in subgroups of myasthenia gravis patients. *J Neurol.* 2000;247(5):369-375. doi:10.1007/s004150050604
54. Truffault F, de Montpreville V, Eymard B, Sharshar T, Le Panse R, Berrih-Aknin S. Thymic Germinal Centers and Corticosteroids in Myasthenia Gravis: an Immunopathological Study in 1035 Cases and a Critical Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2017;52(1):108-124. doi:10.1007/s12016-016-8558-3
55. Vrolix K, Fraussen J, Losen M, et al. Clonal heterogeneity of thymic B cells from early-onset myasthenia gravis patients with antibodies against the acetylcholine receptor. *J Autoimmun.* 2014;52:101-112. doi:10.1016/j.jaut.2013.12.008
56. Kaul R, Shenoy M, Goluszko E, Christadoss P. Major histocompatibility complex class II gene disruption prevents experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol.* 1994;152(6):3152-3157.
57. Christadoss P, Dauphinee MJ. Immunotherapy for myasthenia gravis: a murine model. *J Immunol.* 1986;136(7):2437-2440.
58. Zhang GX, Ma CG, Xiao BG, Bakhiet M, Link H, Olsson T. Depletion of CD8+ T cells suppresses the development of experimental autoimmune myasthenia gravis in Lewis rats. *Eur J Immunol.* 1995;25(5):1191-1198. doi:10.1002/eji.1830250509
59. Sommer N, Tackenberg B, Hohlfeld R. The immunopathogenesis of myasthenia gravis. *Handb Clin Neurol.* 2008;91:169-212. doi:10.1016/S0072-9752(07)01505-9
60. Tanaka A, Moriyama M, Nakashima H, et al. Th2 and regulatory immune reactions contribute to IgG4 production and the initiation of Mikulicz disease. *Arthritis Rheum.* 2012;64(1):254-263. doi:10.1002/art.33320
61. Çebi M, Durmus H, Aysal F, et al. CD4⁺ T Cells of Myasthenia Gravis Patients Are Characterized by Increased IL-21, IL-4, and IL-17A Productions and Higher Presence of PD-1 and ICOS. *Front Immunol.* 2020;11:809. Published 2020 May 19. doi:10.3389/fimmu.2020.00809
62. Mitsdoerffer M, Lee Y, Jäger A, et al. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(32):14292-14297. doi:10.1073/pnas.1009234107
63. Severinson E. Identification of the IgG1 Induction Factor (Interleukin 4). *Front Immunol.* 2014;5:628. Published 2014 Dec 9. doi:10.3389/fimmu.2014.00628
64. Ferretti E, Ponzoni M, Doglioni C, Pistoia V. IL-17 superfamily cytokines modulate normal germinal center B cell migration. *J Leukoc Biol.* 2016;100(5):913-918. doi:10.1189/jlb.1VMR0216-096RR

65. Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):849-859. doi:10.1038/nri2889
66. Berrih-Aknin S, Le Panse R. Myasthenia gravis: a comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms. *J Autoimmun*. 2014;52:90-100. doi:10.1016/j.jaut.2013.12.011
67. Luther C, Adamopoulou E, Stoeckle C, et al. Prednisolone treatment induces tolerogenic dendritic cells and a regulatory milieu in myasthenia gravis patients. *J Immunol*. 2009;183(2):841-848. doi:10.4049/jimmunol.0802046
68. Balandina A, Lécart S, Darteville P, Saoudi A, Berrih-Aknin S. Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood*. 2005;105(2):735-741. doi:10.1182/blood-2003-11-3900
69. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood*. 2005;105(12):4743-4748. doi:10.1182/blood-2004-10-3932
70. Matsui N, Nakane S, Saito F, et al. Undiminished regulatory T cells in the thymus of patients with myasthenia gravis. *Neurology*. 2010;74(10):816-820. doi:10.1212/WNL.0b013e3181d31e47
71. Thiruppathi M, Rowin J, Ganesh B, Sheng JR, Prabhakar BS, Meriggioli MN. Impaired regulatory function in circulating CD4(+)CD25(high)CD127(low/-) T cells in patients with myasthenia gravis. *Clin Immunol*. 2012;145(3):209-223. doi:10.1016/j.clim.2012.09.012
72. Vu T, Meisel A, Mantegazza R, et al. Terminal Complement Inhibitor Ravulizumab in Generalized Myasthenia Gravis. *NEJM Evid*. 2022;1(5):EVIDoa2100066. doi:10.1056/EVIDoa2100066
73. Howard JF Jr, Bril V, Vu T, et al. Safety, efficacy, and tolerability of efgartigimod in patients with generalised myasthenia gravis (ADAPT): a multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial [published correction appears in *Lancet Neurol*. 2021 Aug;20(8):e5. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00216-7.]. *Lancet Neurol*. 2021;20(7):526-536. doi:10.1016/S1474-4422(21)00159-9
74. Huntemann N, Gerischer L, Herdick M, et al. C5 complement inhibition versus FcRn modulation in generalised myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2025;96(4):310-321. Published 2025 Mar 24. doi:10.1136/jnnp-2024-334404
75. Morgan BP, Chamberlain-Banoub J, Neal JW, Song W, Mizuno M, Harris CL. The membrane attack pathway of complement drives pathology in passively induced experimental autoimmune myasthenia gravis in mice. *Clin Exp Immunol*. 2006;146(2):294-302. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03205.x
76. Howard JF Jr. Myasthenia gravis: the role of complement at the neuromuscular junction. *Ann N Y Acad Sci*. 2018;1412(1):113-128. doi:10.1111/nyas.13522
77. Losen M, Martinez-Martinez P, Molenaar PC, et al. Standardization of the experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) model by immunization of rats with Torpedo californica acetylcholine receptors--Recommendations for methods and experimental designs. *Exp Neurol*. 2015;270:18-28. doi:10.1016/j.expneurol.2015.03.010
78. Lennon VA, Lambert EH, Leiby KR, Okarma TB, Talib S. Recombinant human acetylcholine receptor alpha-subunit induces chronic experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol*. 1991;146(7):2245-2248.

79. Baggi F, Annoni A, Ubiali F, et al. Breakdown of tolerance to a self-peptide of acetylcholine receptor alpha-subunit induces experimental myasthenia gravis in rats. *J Immunol.* 2004;172(4):2697-2703. doi:10.4049/jimmunol.172.4.269
80. Nelke C, Spatola M, Schroeter CB, Wiendl H, Lünemann JD. Neonatal Fc Receptor-Targeted Therapies in Neurology. *Neurotherapeutics.* 2022;19(3):729-740. doi:10.1007/s13311-021-01175-7
81. Mantegazza R, Cordiglieri C, Consonni A, Baggi F. Animal models of myasthenia gravis: utility and limitations. *Int J Gen Med.* 2016;9:53-64. Published 2016 Mar 4. doi:10.2147/IJGM.S88552
82. Tuzun E, Berrih-Aknin S, Brenner T, et al. Guidelines for standard preclinical experiments in the mouse model of myasthenia gravis induced by acetylcholine receptor immunization. *Exp Neurol.* 2015;270:11-17. doi:10.1016/j.expneurol.2015.02.009
83. Bryda EC. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Mo Med.* 2013;110(3):207-211.
84. Gilhus NE, Tzartos S, Evoli A, Palace J, Burns TM, Verschuuren JJGM. Myasthenia gravis. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):30. Published 2019 May 2. doi:10.1038/s41572-019-0079-y
85. Wang ZY, Huang J, Olsson T, He B, Link H. B cell responses to acetylcholine receptor in rats orally tolerized against experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neurol Sci.* 1995;128(2):167-174. doi:10.1016/0022-510x(94)00235-g
86. Piehl F, Eriksson-Dufva A, Budzianowska A, et al. Efficacy and Safety of Rituximab for New-Onset Generalized Myasthenia Gravis: The RINOMAX Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.* 2022;79(11):1105-1112. doi:10.1001/jamaneurol.2022.2887
87. Wu N, Tüzün E, Cheng Y, et al. Central Role of T Follicular Helper Cells in Myasthenia Gravis. *Noro Psikiyatr Ars.* 2021;58(1):68-72. Published 2021 Jan 16. doi:10.29399/npa.27193
88. Schaffert H, Pelz A, Saxena A, et al. IL-17-producing CD4(+) T cells contribute to the loss of B-cell tolerance in experimental autoimmune myasthenia gravis. *Eur J Immunol.* 2015;45(5):1339-1347. doi:10.1002/eji.201445064
89. Yi Q, Ahlberg R, Pirskanen R, Lefvert AK. Acetylcholine receptor-reactive T cells in myasthenia gravis: evidence for the involvement of different subpopulations of T helper cells. *J Neuroimmunol.* 1994;50(2):177-186. doi:10.1016/0165-5728(94)90044-2
90. Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol.* 2019;4(33):eaau6085. doi:10.1126/sciimmunol.aau6085
91. Gonzalez SF, Degn SE, Pitcher LA, Woodruff M, Heesters BA, Carroll MC. Trafficking of B cell antigen in lymph nodes. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:215-233. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101255
92. Hofmann WE, Reuther P, Schalke B, Mertens HG. Splenectomy in myasthenia gravis: a therapeutic concept?. *J Neurol.* 1985;232(4):215-218. doi:10.1007/BF00313782
93. Shiao YM, Lee CC, Hsu YH, et al. Ectopic and high CXCL13 chemokine expression in myasthenia gravis with thymic lymphoid hyperplasia. *J Neuroimmunol.* 2010;221(1-2):101-106. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.02.013
94. Yamamoto Y, Matsui N, Uzawa A, et al. Intrathymic Plasmablasts Are Affected in Patients With Myasthenia Gravis With Active Disease. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2021;8(6):e1087. Published 2021 Sep 24. doi:10.1212/NXI.0000000000001087
95. Harrer C, Otto F, Radlberger RF, et al. The CXCL13/CXCR5 Immune Axis in Health and Disease-Implications for Intrathecal B Cell Activities in Neuroinflammation. *Cells.* 2022;11(17):2649. Published 2022 Aug 25. doi:10.3390/cells11172649

96. Gu-Trantien C, Migliori E, Buisseret L, et al. CXCL13-producing TFH cells link immune suppression and adaptive memory in human breast cancer. *JCI Insight*. 2017;2(11):e91487. Published 2017 Jun 2. doi:10.1172/jci.insight.91487
97. Förster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell*. 1996;87(6):1037-1047. doi:10.1016/s0092-8674(00)81798-5
98. Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Ekland EH, Cyster JG, Williams LT. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature*. 1998;391(6669):799-803. doi:10.1038/35876
99. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature*. 2000;406(6793):309-314. doi:10.1038/3501858
100. Hayakawa K, Hardy RR, Parks DR, Herzenberg LA. The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J Exp Med*. 1983;157(1):202-218. doi:10.1084/jem.157.1.202
101. Hardy RR, Hayakawa K. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:595-621. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.595
102. Saito R, Onodera H, Tago H, et al. Altered expression of chemokine receptor CXCR5 on T cells of myasthenia gravis patients. *J Neuroimmunol*. 2005;170(1-2):172-178. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.09.001
103. Reuveni D, Aricha R, Souroujon MC, Fuchs S. MuSK EAMG: Immunological Characterization and Suppression by Induction of Oral Tolerance. *Front Immunol*. 2020;11:403. Published 2020 Mar 17. doi:10.3389/fimmu.2020.00403
104. Ulusoy C, Çavuş F, Yılmaz V, Tüzün E. Immunization with Recombinantly Expressed LRP4 Induces Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis in C57BL/6 Mice. *Immunol Invest*. 2017;46(5):490-499. doi:10.1080/08820139.2017.1299754
105. Christensson B, Biberfeld P, Matell G. B-cell compartment in the thymus of patients with myasthenia gravis and control subjects. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;540:293-297. doi:10.1111/j.1749-6632.1988.tb27079.x
106. Zhang P, Liu Y, Chen S, et al. Distribution of multi-level B cell subsets in thymoma and thymoma-associated myasthenia gravis. *Sci Rep*. 2024;14(1):2674. Published 2024 Feb 1. doi:10.1038/s41598-024-53250-6
107. Hu Y, Wang J, Rao J, et al. Comparison of peripheral blood B cell subset ratios and B cell-related cytokine levels between ocular and generalized myasthenia gravis. *Int Immunopharmacol*. 2020;80:106130. doi:10.1016/j.intimp.2019.106130
108. Fichtner ML, Hoehn KB, Ford EE, et al. Reemergence of pathogenic, autoantibody-producing B cell clones in myasthenia gravis following B cell depletion therapy. *Acta Neuropathol Commun*. 2022;10(1):154. Published 2022 Oct 28. doi:10.1186/s40478-022-01454-0
109. Deacon RM. Measuring motor coordination in mice. *J Vis Exp*. 2013;(75):e2609. Published 2013 May 29. doi:10.3791/2609
110. Aguilo-Seara G, Xie Y, Sheehan J, Kusner LL, Kaminski HJ. Ablation of IL-17 expression moderates experimental autoimmune myasthenia gravis disease severity. *Cytokine*. 2017;96:279-285. doi:10.1016/j.cyt.2017.05.008

5. Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mich während meiner Promotion begleitet, unterstützt und motiviert haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Christopher Nelke, der mich mit fachlicher Expertise, Geduld und wertvollen Ratschlägen durch die Promotion geführt hat. Ohne seine Unterstützung, die inspirierende Zusammenarbeit und sein Engagement wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein Dank richtet sich zudem an meinen Mentor Prof. Dr. Tobias Ruck, der meine Begeisterung für neuromuskuläre Erkrankungen geweckt und mich jederzeit mit Rat, Vertrauen und Förderung unterstützt hat. Ebenfalls danke ich Prof. Dr. rer. nat. Norbert Gerdes für seine wertvollen Ratschläge und die hervorragende Betreuung während der Dissertation.

Herzlichen Dank auch an alle Kolleginnen und Kollegen der Neurologie sowie des Labors, die mich jederzeit mit Rat und Tat unterstützt und sorgfältig eingearbeitet haben.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der gesamten Promotionszeit unterstützt, motiviert und stets an mich geglaubt haben, insbesondere in herausfordernden Phasen. Mein besonderer Dank gilt meiner Partnerin Celine, die mir beständig Rückhalt gegeben, mich ermutigt und mit großer Geduld unterstützt hat.