

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie, CharitéCentrum 12  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Etablierung neuer Testverfahren am Institut für Medizinische  
Immunologie der Charité Campus Mitte zur Erweiterung des  
Diagnostikspektrums bei COVID- und sIgAD-Patienten

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Robert Bunk

aus Staaken

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H.-D. Volk

2. Prof. Dr. med. R. von Baehr

3. Prof. Dr. med. U. Sack

**Datum der Promotion: 22.02.2008**

Für Steffi

## **DANKSAGUNG**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Volk für die Überlassung des Promotionsthemas.

Besonderen Dank an Christa Liebenthal und Claudia Conert für ihre Hilfe, Beratung und Unterstützung in der Durchführung der experimentellen Untersuchungen. Weiterhin danke ich Dr. Anna-Maria Dittrich, Dr. Nora Laske und Dr. Ilka Schulze für ihre Hilfe bei der Gewinnung der teilnehmenden Patienten.

Vielen Dank auch an Julia Horn für die Überlassung von Proben der ICOS-defizienten Patientin, Prof. Ulrich Wahn für die Beratung und allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Immunologie CCM und der Kinderambulanz der Klinik für Pädiatrie CVK für ihre Unterstützung und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Vor allem möchte ich aber Dr. Conny Höflich für die umfassende Betreuung, Beratung und Hilfe bei der vorliegenden Arbeit danken.

**INHALTSVERZEICHNIS****ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS****ZUSAMMENFASSUNG**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Immunität und Antikörper	1
1.2	B-Zellen und Antikörpersynthese	2
1.3	Primäre Immundefekte mit Antikörpermangel	5
1.3.1	Common Variable Immunodeficiency (CVID)	6
1.3.1.1	Epidemiologie und Klinik der CVID	6
1.3.1.2	Ursachen und Einteilung der CVID	7
1.3.1.2.1	Inducible Co-Stimulator (ICOS) und CVID	8
1.3.1.2.2	Recent Thymic Emigrants und Thymusfunktion bei CVID	9
1.3.1.2.3	Regulatorische T-Zellen und CVID	10
1.3.1.3	Versuch einer neuen Klassifikation der CVID	11
1.3.2	Selektiver IgA-Defekt (slgAD)	13
1.3.2.1	Epidemiologie und Klinik des slgADs	13
1.3.2.2	Ursachen des slgADs	13
<b>2</b>	<b>ZIELSTELLUNGEN DER ARBEIT</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>16</b>
3.1	Patienten und Probanden	16
3.1.1	Patienten	16
3.1.2	Probanden	18
3.1.3	Blutentnahmen	18
3.2	Materialien und Geräte	19
3.2.1	Geräte	19
3.2.2	Verbrauchsmaterialien	19
3.2.3	monoklonale Antikörper	20
3.2.4	fluoreszenzmarkierte Reagenzien	21
3.2.5	Stimulanzen	21
3.2.6	andere Reagenzien und Lösungen	21

3.2.7	Software	22
3.3	Methoden	23
3.3.1	Immunphänotypisierung in Vollblut	23
3.3.2	Immunphänotypisierung von PBMCs	24
3.3.2.1	Dichtegraduelle Separation von Monozyten und Lymphozyten (PBMCs)	24
3.3.2.2	Kryokonservierung der PBMCs	25
3.3.2.3	Auftauen der PBMCs	25
3.3.2.4	Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer	25
3.3.3	B-Zell-Phänotypisierung nach Freiburg	26
3.3.4	<i>in-vitro</i> -IgG- und -IgM-Sekretion	27
3.3.5	Etablierung eines ICOS–Expressionstestes in Vollblut	28
3.3.6	Flowzytometrie	28
3.3.7	Statistik	30
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>31</b>
4.1	CVID-Patienten	31
4.1.1	B-Zell-Phänotypisierung	31
4.1.1.1	Auswertung nach Bryant und Freiburg	31
4.1.1.2	Auswertung der phänotypischen B-Zell-Klassifizierung nach Freiburg ohne Oberflächen-IgD	33
4.1.2	Immunphänotypisierung in Vollblut	34
4.1.2.1	Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen, T-Zell-Aktivierungsmarker	34
4.1.2.2	CD4 <sup>+</sup> Recent Thymic Emigrants	37
4.1.2.3	CD4 <sup>+</sup> regulatorische T-Zellen	39
4.2	slgAD-Patienten	40
4.2.1	B-Zell-Phänotypisierung	40
4.2.2	Immunphänotypisierung in Vollblut	41
4.3	Etablierung eines ICOS–Expressionstestes in Vollblut	43
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>44</b>
5.1	Ist die Aussage, dass die Freiburger Klassifikation der Klassifikation nach Bryant entspricht, zu bestätigen?	45

5.2	Ist die Freiburger Klassifizierung zur routinemäßigen Diagnostik bei Verdacht auf CVID noch zu vereinfachen?	46
5.3	Lassen sich bei der Immunphänotypisierung von Vollblut mittels neuer Marker wie CD4 <sup>+</sup> RTE definiert über CD31 oder CD4 <sup>+</sup> T <sub>REG</sub> definiert über CD25 in Kombination mit bekannten Markern weitergehende Aussagen zur Diagnostik bei CVID-Patienten machen?	47
5.4	Bieten die oben genannten Untersuchungen eine Hilfestellung bei der Differentialdiagnose sIgAD / CVID?	50
5.5	Etablierung eines einfachen und routinefähigen Vollblut-Tests zum Nachweis einer defekten ICOS-Expression	51
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>52</b>

**PUBLIKATION**

**ERKLÄRUNG**

**LEBENS LAUF**

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AI	Autoimmunerkrankung
AK	Antikörper
Abb.	Abbildung
ABC	„antibody per cell“ = Antikörper pro Zelle
APC	„Antigen presenting cell“ = Antigen-präsentierende Zelle bzw. in Verbindung mit Antikörpern: Allo-Phyco-Cyanin
bzw.	beziehungsweise
CD	„Cluster of differentiation“ = internationale Nomenklatur zellulärer Oberflächenmarker
CD40L	CD40Ligand
CSR	„class-switch recombination“ = Klassenswitch-Rekombination
CTLA-4	„cytotoxic T lymphocyte antigen 4“ = Zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4
CVID	„common variable immunodeficiency“ = Variables Immundefizienzsyndrom
Cy5.5	cyanine dye 5.5
d	Tage
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	„ethylene-diamine-tetraacetic acid“ = Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ = Enzymgekoppeltes photochemisches Testsystem mit Antikörpern
ESID	„European Society for Immunodeficiencies“ = Europäische Gesellschaft für Immundefekte
et al.	und Mitarbeiter
FACS	„Fluorescence activated cell sorting“ = Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung bzw. -analyse
FCS	„fetal calf serum“ = Fetales Kälberserum
FITC	„Fluorescein isothiocyanate“ = Fluoreszeinisothiozyanat
FoxP3	„forkhead box protein 3“ = Transkriptionsfaktor FoxP3
FSC	„Forward scatter“ = Vorwärtsstreulicht
g	Einheit der Relativen Zentrifugalkraft
GpT/L	Gigapartikel pro Liter
HCV	Hepatitis C Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen, entspricht MHC
HLA-DR	MHC-II-Protein
ICOS	„inducible co-stimulator“ = induzierbares co-stimulatorisches Molekül
IgG	Immunglobulin G
IVIG	intravenös appliziertes Immunglobulin
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
k.A.	keine Angaben
kD	Kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
LIP	lymphoide interstitielle Pneumonie
MHC-I/II	„Major histocompatibility complex“ = Haupthistokompatibilitätskomplex I/II
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
µl	Mikroliter
MW	Mittelwert
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle



nm	Nanometer
PBMC	„peripher blood mononuclear cells“ = periphere mononukleäre Blutzellen (= Monozyten und Lymphozyten)
PBS	„Phosphate buffered saline“ = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PC5	R-Phycoerythrin-Cyanin 5
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-A-Protein
PID	„Primary immunodeficiency“ = primäres Immundefizienzsyndrom
PMA	Phorbol-12-Myristat-12-Acetat
Prob	Probanden
PWM	„Pokeweed mitogen“ = Kermesbeeren-Mitogen
RPMI-1640	Zellkulturmedium in Anlehnung an das Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SAC	„Staphylococcus aureus Cowan Typ 1“ = Staphylococcus aureus vom Typ Cowan 1
SCIG	subkutan appliziertes Immunglobulin
SD	„standard deviation“ = Standardabweichung
SHM	somatische Hypermutation
slgAD	selektiver Immunglobulin A-Defekt
SSC	„Sideward scatter“ = Seitwärtsstreulicht
RTE	„recent thymic emigrants“ = neu aus dem Thymus emigrierte T-Zellen
T-Ly	T-Lymphozyt
Tab.	Tabelle
TCR	„T cell receptor“ = T-Zell-Rezeptor
TI-antigen 1/2	„T cell independent antigen“ = T-Zell unabhängiges Antigen Typ 1/2
T <sub>REG</sub>	regulatorische T-Zellen
TREC	„T cell receptor excision circles“ = zirkuläre Exzisionsbestandteile aus T- Zell-Rezeptor-DNA
T <sub>H</sub>	T-Helfer-Zelle
TLR	„Toll-like-receptor“ = der Gruppe der Toll-Rezeptoren ähnlicher Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
U	„Units“ = Einheiten
v/v	„volume/volume“ = Volumen/Volumen
w/v	„weight/volume“ = Masse/Volumen
XLA	„x-linked agammaglobulinaemia“ = X-chromosomale Agammaglobulinämie
XLP	„x-linked lymphoproliferative disease“ = X-chromosomale lymphoproliferative Erkrankung
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent

## ZUSAMMENFASSUNG

Die CVID (common variable immunodeficiency) ist ein bisher nur unzureichend geklärtes und erforschtes immunologisches Krankheitsbild, das durch einen Immunglobulinmangel verursacht wird. Verschiedene Ergebnisse in molekularbiologischen Forschungen konnten unterschiedliche Defekte auf genetischer und zellinteraktiver Ebene finden, so dass sich Vermutungen bestätigen, dass die CVID ein gemeinsamer klinischer Phänotyp unterschiedlichster Ursachen ist. Aufgrund dieser Heterogenität ist eine sinnvolle und einfache Klassifikation innerhalb der CVID von großer Bedeutung. Vor einiger Zeit wurde eine neue Klassifikation vorgestellt, die die bisher empfohlene Klassifikation nach Bryant [80] ersetzen könnte. Die Freiburger Klassifikation [29] nimmt die Einteilung durch flowzytometrische B-Zell-Immunphänotypisierung an peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) vor.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden die PBMC von je 10 CVID-Patienten und gesunden Kontrollpersonen untersucht. Ziel war es, diese Klassifikation zu überprüfen. Darüber hinaus beabsichtigten wir, bei einer positiven Überprüfung, diese Methode noch zu vereinfachen.

Weiterhin sollten bei der Immunphänotypisierung in Vollblut gängige Marker zur CVID-Diagnostik um neuere Markierungen wie CD31 für „Recent Thymic Emigrants“ (RTE, CD31<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen) zur Überprüfung der Thymusfunktion und CD25 für CD4<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (T<sub>REG</sub>, CD25<sup>+++</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen) ergänzt werden.

Aufgrund der Hinweise für die enge Verwandtschaft von CVID und sIgAD, überprüften wir außerdem sIgAD-Patienten auf immunphänotypische Eigenschaften der CVID und deren Zuordbarkeit in die CVID-Klassifikationen.

Als eine Ursache von CVID ist ein Defekt des Oberflächenproteins ICOS (inducible co-stimulator) erkannt worden. Die bisherige Testung auf ICOS-Expression erfolgte in PBMC. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer schnelleren und einfacheren Testung in Vollblut.

Folgende Ergebnisse können zusammengefasst werden:

- I. Die Freiburger Klassifikation konnte bestätigt werden. Unter Verzicht auf einen Zellmarker (IgD) konnten die gleichen Resultate erhoben werden. Die so modifizierte Klassifizierung wurde im Anschluss an die Studie in die Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Immunologie Charité Campus Mitte aufgenommen.
- II. Bei der Immunphänotypisierung der CVID-Patienten mit etablierten T-Zell-Markern zeigten sich überwiegend die gleichen Resultate wie in vorhergegangenen Studien. Der Anteil an CD4<sup>+</sup> RTE zeigte eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den Probanden, wobei der relative Anteil naiver T-Zellen jedoch deutlich verringert war, was (a) gegen einen Thymusdefekt bei unseren Patienten und (b) eher für einen peripheren Verbrauch der T-Zellen spricht.  
Die Population der CD4<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen zeigte weder zu den gesunden Probanden, noch zwischen den Patienten mit und ohne Autoimmunerkrankung einen signifikanten Unterschied. Studien zu möglichen funktionellen Defekten laufen am Institut für Medizinische Immunologie Charité Campus Mitte.
- III. Bei der Testung der beiden Patienten mit selektivem IgA-Defekt auf CVID-spezifische funktionelle und phänotypische Eigenschaften zeigte Patient slgAD-2 sowohl bei den Klassifikationen als auch bei der Immunphänotypisierung eine deutliche Übereinstimmung mit CVID-Patienten. Patient slgAD-1 war diesbezüglich unauffällig.
- IV. Die Entwicklung des ICOS-Testes in Vollblut konnte abgeschlossen werden und wurde in die Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Immunologie Charité Campus Mitte aufgenommen. Dieses Ergebnis wurde zudem publiziert. Eine Kopie ist im Anhang enthalten.

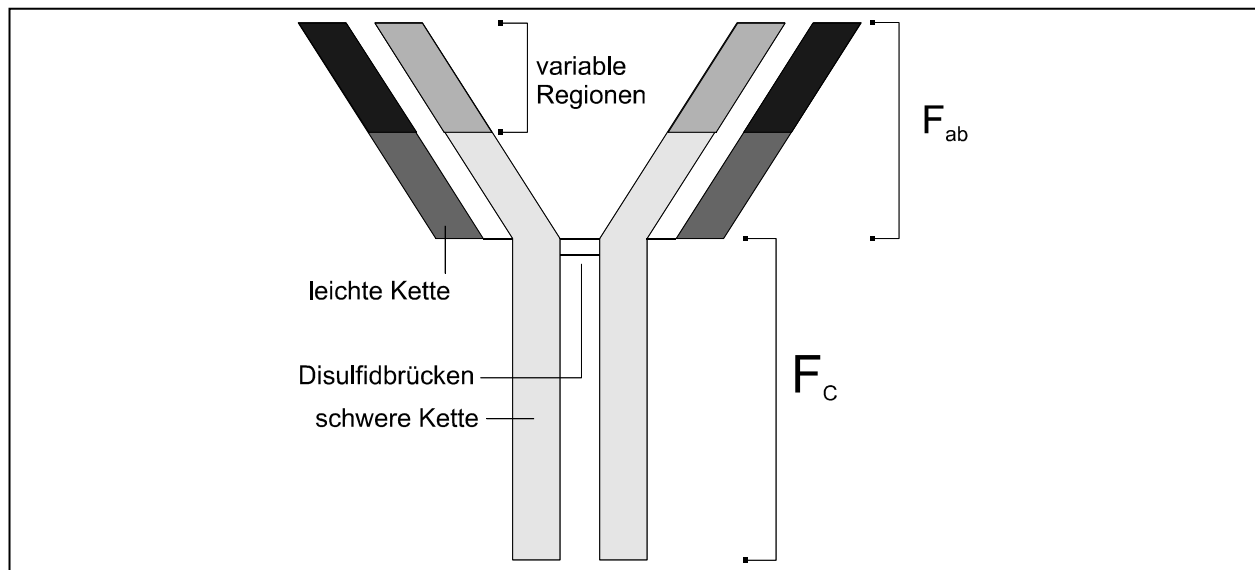
## **1. EINLEITUNG**

### **1.1 Immunität und Antikörper**

Während der Evolution haben höhere Lebewesen Fähigkeiten entwickelt, sich gegen fremde und schädigende Umwelteinflüsse zu schützen. Die Tatsache, dass ein menschlicher Organismus nach der Genesung von bestimmten (Infektions-) Erkrankungen im Laufe des weiteren Lebens nicht noch einmal von der gleichen Krankheit befallen wird, wurde schon in der Antike beobachtet. Die Römer bezeichneten diesen Prozess des lebenslangen Schutzes als „immunis“ [frei von Leistungen, befreit], was sich von „munus“ ableitet [Bürde, Pflicht] [1,2]. Erst Jahrhunderte später wurden Antikörper als eine der Grundlagen für den bestehenden Immunschutz erkannt.

Die moderne Wissenschaft der Immunologie nahm mit der Entwicklung der Vakzination durch Jenner 1798 [3] ihren Lauf. Große wissenschaftliche Erfolge des 19. Jahrhunderts, zum Beispiel in der Mikrobiologie, der Hämatologie und der Chemie brachten weitere Fortschritte im Verständnis der natürlichen Abwehrfunktionen [4]. Die „Immunität“ als Begriff tauchte 1891 erstmals in Ehrlichs „Immunitätslehre“ auf [5].

Die erste medizinische Anwendung von Antikörpern fand in Form von Antiseren gegen Skabies durch Pasteur [6] und gegen Diphtherie und Tetanus durch Behring [7] statt, ohne dass Struktur und Wirkprinzipien der Antikörper bereits bekannt waren. Die Existenz von Antikörpern wurde erstmals von Ehrlich in seiner Seitenkettentheorie in Betracht gezogen [8,9]. Mit der Erkenntnis, dass alle Antikörper des menschlichen Serums der Fraktion der Gammaglobuline angehören [10] und mit der Weiterentwicklung der Elektrophorese zur Immunoelktrophorese begannen umfassende Studien zu Antikörpern [11-13]. Der Begriff „Immunglobulin“ für Antikörper wurde schließlich von Janeway geprägt und allgemein übernommen [14,15]. Der prinzipielle Aufbau eines Immunglobulins ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abb. 1: Modell der Struktur eines monomeren Immunglobulins.** Vier Eiweißketten, zwei leichte und zwei schwere Ketten, bilden ein Tetramer. Der obere Teil einer jeden schweren Kette befindet sich neben einer leichten Kette. Dabei liegen die variablen Regionen nebeneinander und bilden die antigenbindende Stelle ( $F_{ab}$ ). Diese ist Ursprung der hohen Diversität zwischen den Antikörpern. Die schweren Ketten mit ihren konstanten Regionen ( $C_H$ ) bilden das  $F_C$ -Stück, das Klasse und Subklasse der Immunglobuline (IgG1-4  $\gamma$ -Ketten, IgM  $\mu$ -Ketten, IgA1,2  $\alpha$ -Ketten, IgD  $\delta$ -Ketten, IgE  $\epsilon$ -Ketten) festlegt und die entsprechenden Effektoreigenschaften vermittelt.

## 1.2 B-Zellen und Antikörpersynthese

Die Antikörpersynthese erfolgt durch B-Zellen. Im Knochenmark entwickeln sich aus lymphoiden Progenitorzellen über verschiedene Stufen zunächst unreife naive B-Zellen. Diese naiven B-Zellen gelangen in die Peripherie und zirkulieren während ihrer Lebensspanne zwischen Blutkreislauf und sekundären lymphatischen Organen. Erfolgt in dieser Zeit ein Kontakt mit einem körperfremden Antigen bei gleichzeitiger Kostimulation durch eine T-Helfer ( $T_H$ )-Zelle (positive Selektion), kommt es zur B-Zell-Aktivierung, und die B-Zelle reift entweder zur Memory-B-Zelle oder zur Plasmazelle, die dann mit der Synthese großer Mengen von entsprechenden Antikörpern beginnt (s.u.). Bei Reaktion auf ein körpereigenes Antigen erfolgt Apoptose (=programmierter Zelltod) (negative Selektion) [16].

Nach entsprechendem Antigenkontakt sind zwei Wege der B-Zellaktivierung bekannt, zum einen durch T-Zell-abhängige, zum anderen durch T-Zell-unabhängige Antigene. Antigene, die ohne T-Zell-Hilfe B-Zellen aktivieren können, werden als T-unabhängige Antigene („T cell independent antigen“, TI-Antigene) bezeichnet. Innerhalb dieser

Antigene gibt es zwei Gruppen, die sich in der B-Zellaktivierung nochmals unterscheiden. Einige TI-Antigene binden direkt an bestimmte B-Zell-Oberflächenmoleküle, z.B. B-Zell-Rezeptoren (BCR), Rezeptoren der Toll-like-Rezeptor (TLR)-Familie oder oberflächlich gebundene Immunglobuline und lösen die Aktivierung aus. Zu dieser Gruppe der Antigene, benannt als TI-1 Antigene, gehören zum Beispiel Wandbestandteile von Bakterien wie Lipopolysaccharide (LPS) von gramnegativen Bakterien. Diese Form der Aktivierung ist aber nur bei hoher Antigenkonzentration möglich. Als Folge kommt es zu einer antigen-spezifischen (oligoklonalen) oder antigen-unspezifischen (polyklonalen) B-Zellaktivierung.

Andere TI-Antigene, sogenannte TI-2 Antigene, überbrücken durch ihre Größe mehrere B-Zell-Rezeptoren oder oberflächengebundene spezifische Immunglobuline der B-Zelle. Es handelt sich dabei um polymerische Proteinstrukturen wie Bakterienflagella.

Die meisten Antigene können eine B-Zellaktivierung jedoch nur nach CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Zellunterstützung auslösen. Neben der Bindung des T-Zell-Rezeptors (TZR) an das von der B-Zelle mit MHC-II präsentierte Antigen wird die B-Zelle zum einen über lösliche Zytokine (insbesondere Interleukin (IL)-4 und IL-5) und zum anderen über Zell-Zell-Kontakte stimuliert. Diese Zell-Zell-Kontakte erfolgen in sekundären Lymphorganen über entsprechende Oberflächenmoleküle von B- (z.B. CD40) und aktivierten T-Zellen (z.B. CD40Ligand (CD40L)) [17].

Nach der Aktivierung wandelt sich ein Teil der B-Zellen in Memory-B-Zellen um, wogegen ein anderer Teil mit der Synthese von entsprechenden Antikörpern beginnt. Zunächst werden Immunglobuline vom IgM-Typ produziert. Durch Klassenswitch-Rekombination (CSR) und somatische Hypermutation (SHM) – beide Prozesse finden auf transkriptioneller Ebene statt - erfolgt ein Austausch des konstanten Teils der schweren Kette des IgM-Proteins gegen den entsprechenden Teil des IgG-, IgA- oder IgE-Proteins (CSR) gekoppelt mit einer Affinitätsreifung im variablen Teil des Antikörpers (SHM). Einige der aktivierten B-Zellen wandeln sich dann in Plasmazellen um, die keinen Klassenswitch mehr vollziehen können, dafür aber ein entsprechendes Immunglobulin in sehr großer Menge produzieren [18].

Eine Übersicht über wesentliche biologische und chemische Charakteristika der Immunglobuline gibt Tabelle 1.

**Tabelle 1: Übersicht über Charakteristika der Immunglobuline**

	<b>IgG</b>	<b>IgA</b>	<b>IgM</b>	<b>IgE</b>	<b>IgD</b>
<b>schwere Ketten</b>	$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$	$\alpha_1, \alpha_2$	$\mu$	$\epsilon$	$\delta$
<b>leichte Ketten</b>	$\kappa, \lambda$	$\kappa, \lambda$	$\kappa, \lambda$	$\kappa, \lambda$	$\kappa, \lambda$
<b>Subklassen</b>	IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2</sub> , IgG <sub>3</sub> , IgG <sub>4</sub>	IgA <sub>1</sub> , IgA <sub>2</sub>	-	-	-
<b>Molekular- masse (kD)</b>	150	150 oder 380 (Dimer)	900 (Pentamer)	190	180
<b>mittlere Serumkonzentration (mg/dl)</b>	1100	250	10	0,003	3
<b>Halbwertszeit (d)</b>	8 (IgG <sub>3</sub> ), 21 (IgG <sub>1,2</sub> , IgG <sub>4</sub> )	6	5	2,5	3
<b>Valenzen</b>	2	2 oder 4	10	2	2
<b>Vorkommen</b>	als Monomer auf peripheren B-Zellen und im Serum	als Monomer auf peripheren B-Zellen und im Serum, als Dimer in Körpersekreten (Tränen, Speichel, Muttermilch, Darmsäfte)	als Monomer auf peripheren B-Zellen, als Pentamer in Serum und Sekreten	als Monomer auf Mastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten und im Serum	als Monomer auf naiven B-Zellen und im Serum
<b>Komplement-Aktivierung</b>					
klassischer Weg	+ (IgG <sub>3</sub> > IgG <sub>1</sub> >IgG <sub>2</sub> )	-	++++	-	-
alternativer Weg	+	+	?	-	+
<b>Plazenta-gängigkeit</b>	+ (IgG <sub>1</sub> =IgG <sub>3</sub> = IgG <sub>4</sub> >IgG <sub>2</sub> )	-	-	-	-
<b>Bakterienlyse</b>	+	+	+++	?	?
<b>antivirale Aktivität</b>	+	+++	+	?	?
<b>Fc-Rezeptor - Interaktion</b>	Makrophagen, Neutrophile, Thrombozyten, Lymphozyten	Makrophagen	Lymphozyten	Eosinophile, Basophile, Mastzellen	-
<b>Funktionen</b>	Präzipitation, Agglutination, Opsonierung, Neutralisation, beteiligt an Sekundärantwort	Agglutination, Neutralisation	ähnlich IgG, aber Primärantwort	Abwehr gegen Helminthen und andere mehrzellige Parasiten, Allergie Typ I	?

### 1.3 Primäre Immundefekte mit Antikörpermangel

Im Zuge des wissenschaftlichen Fortschritts und der Entdeckung der Funktionen der Immunglobuline wurden auch Defekte und Störungen innerhalb dieses komplexen Systems festgestellt. Janeway beschrieb 1952 erstmals bei vier Jungen einen Mangel an Immunglobulinen [19]. Im gleichen Jahr erfolgte die erste Beschreibung einer Agammaglobulinämie durch Bruton [20]. Seitdem sind mehrere Formen von primären Immundefekten (PID) mit Antikörpermangel identifiziert worden. „Primär“ weist dabei darauf hin, dass die Ursache innerhalb des Immunsystems selbst liegt. Abzugrenzen sind hiervon die sekundären Antikörpermangelsyndrome, wie zum Beispiel das Eiweißverlust-Syndrom.

Folgende Erkrankungen gehören zu den klinisch relevantesten primären Antikörpermangelsyndromen:

- Common variable immunodeficiency (CVID) (siehe Kapitel 1.3.1),
- selektiver IgA-Defekt (sIGAD) (siehe Kapitel 1.3.2),
- IgG-Subklassenmangel,
- selektiver IgM-Defekt,
- X-linked Agammaglobulinämie (Morbus Bruton),
- Hyper-IgM-Syndrom,
- transiente Hypogammaglobulinämie des Neugeborenen.

Patienten, die an einem der genannten Immunglobulinmangelsyndrome leiden, zeigen in der Regel eine recht charakteristische Klinik. So sind insbesondere retardierende Infektionen des Sinopulmonarraumes und des Gastrointestinaltraktes zu beobachten [21,22], häufig durch bekapselte Bakterien, Protozoen, Pilze oder Viren verursacht [21,22]. Je nach Form des Antikörpermangels ist das Auftreten der Infektionen verschieden in Zeit und Ausmaß. Hinzu kommt bei einigen Krankheitsbildern eine erhöhte Prävalenz von Autoimmunphänomenen und malignen Erkrankungen [22-25].



### 1.3.1 Common Variable Immunodeficiency (CVID)

#### 1.3.1.1 Epidemiologie und Klinik der CVID

Die CVID wurde erstmals 1953 von Janeway beschrieben [26] und ist das häufigste klinisch manifestierte primäre Antikörpermangelsyndrom [27]. Die Inzidenz der CVID wird je nach Untersuchung auf 1:10.000 bis 1:50.000 geschätzt [22,28,29]. Männer und Frauen sind etwa gleich häufig betroffen [22]. Die Definition erfolgt entsprechend den durch die Europäische Gesellschaft für Immundefekte (ESID; [www.esid.org](http://www.esid.org)) veröffentlichten Kriterien:

Eine CVID ist wahrscheinlich, wenn:

- bei einem männlichen oder weiblichen Patienten zwei der drei Hauptimmunglobulinklassen (IgM, IgG, IgA) um mindestens zwei Standardabweichungen vom Mittelwert vermindert und folgende Kriterien erfüllt sind:
  - Auftreten der Symptome mit einem Alter > 2
  - fehlende Isohämagglutinine und/oder keine spezifische Ak-Bildung auf Vakzine
  - Ausschluss anderer Ursachen eines Immunglobulinmangelsyndroms

Eine CVID ist möglich, wenn:

- bei einem männlichen oder weiblichen Patienten eine der Hauptimmunglobulinklassen (IgM, IgG oder IgA) um mindestens zwei Standardabweichungen vom Mittelwert vermindert ist und folgende Kriterien erfüllt sind:
  - Auftreten der Symptome mit einem Alter > 2
  - fehlende Isohämagglutinine und/oder keine spezifische Ak-Bildung auf Vakzine
  - Ausschluss anderer Ursachen eines Immunglobulinmangelsyndroms

Eine CVID kann sich in jedem Lebensalter manifestieren, gehäuft aber innerhalb des zweiten oder dritten Lebensjahrzehnts [22]. Es wurden aber auch Inzidenzgipfel von 1-5 und 16-20 Jahren beobachtet [25]. Häufig tritt die CVID sporadisch auf, 20 bis 25% der Fälle treten jedoch familiär gehäuft auf, was auf eine autosomal-rezessive bzw. autosomal-dominante Vererbung hinweist [30,31].

Das klinische Erscheinungsbild der CVID stellt sich wie alle Defekte der humoralen Abwehr in der Regel mit gehäuften Infektionen der Atemwege dar. So finden sich chronische Sinusitiden, rezidivierende Otitiden und Pneumonien mit oft daraus resultierenden Bronchoektasien [22]. Häufige Erreger, die bei CVID gefunden werden, sind *Pneumocystis carinii*, Varizella-Zoster-Virus, verschiedene Pilze, *Haemophilus*

influenzae, Moraxella catarrhalis und Streptococcus pneumonia [32,33]. Etwa die Hälfte der CVID-Patienten leidet an Infektionen des Gastrointestinaltraktes, häufig durch Giardia lamblia, Campylobacter spp. oder Yersinia spp. [22,34], die sich mit Malabsorption oder chronischer Diarrhoe präsentieren [35,36]. In schweren Fällen kann sich eine durch Enteroviren hervorgerufene Meningoenzephalitis entwickeln [22,37]. Andere Manifestationen sind Infektionen des Bewegungsapparates mit Ureaplasma urealyticum und Mycoplasma hominis [38,39], lymphatische Hyperplasie und Infiltration des peripheren lymphatischen Gewebes [40], wodurch etwa ein Drittel der Patienten eine Splenomegalie und/oder Lymphadenopathie aufweist [22].

Weiterhin wurden erhöhte Inzidenzen von verschiedenen Autoimmunerkrankungen beobachtet, wie z. B. rheumatoide Arthritis, autoimmunologisch hämatologische Störungen, z.B. perniziöse oder hämolytische Anämie [41], autoimmunologisch neurologische Erkrankungen, wie z.B. Guillain-Barré-Syndrom [42], chronisch aktive Hepatitis nach HCV-Infektion [43] oder Erkrankungen der endokrinen Organe wie dem Thymus [44].

Daneben haben Patienten mit CVID ein erhöhtes Risiko für chronisch entzündliche Erkrankungen [34,45] und für maligne Erkrankungen, insbesondere des Darmes und des lymphatischen Gewebes [22] mit einer erhöhten Prävalenz in der 5. und 6. Lebensdekade [24,35]. Diese Erkrankungen sind Grund für die insgesamt kürzere Lebenserwartung der Patienten [46].

Obwohl viele Symptome schon früh auftreten, erfolgt die Diagnosestellung oft erst nach einem langen Krankheitsverlauf oder im Rahmen einer chronischen Lungenerkrankung [22,47].

Die momentane Therapieform ist die intravenöse oder subkutane Gabe von Immunglobulinen und die zum Teil auch prophylaktische antibiotische Behandlung.

### **1.3.1.2 Ursachen und Einteilung der CVID**

Eine einheitliche Ursache für die CVID ist bisher nicht gefunden. Die verschiedenen Ergebnisse deuten sogar darauf hin, dass es sich bei der CVID um einen gemeinsamen Phänotyp ursächlich verschiedener Erkrankungen des Immunsystems handeln könnte.

Beschriebene Störungen umfassen unter anderem numerische und funktionelle B- und T-Zell-Defekte, wie z.B. einen verringerten Anteil an Memory-B-Zellen, einen gestörten Klassenswitch und die mangelnde Fähigkeit der B-Zellen, in Plasmazellen zu differenzieren. Andere Untersuchungen zeigen eine mangelhafte T-Helfer-Zell-Funktion

oder Fehler in der T-Zell-Aktivierung, wie z.B. eine mangelnde Expression von CD40L durch T-Lymphozyten, eine überschießende T-Suppressor-Zell-Aktivität, und Zytokin-Mangel [22,46,48,49]. Für eine heterogene Ursache der Erkrankung spricht die Tatsache, dass alle genannten Defekte bzw. Normabweichungen immer nur in einem Teil der untersuchten CVID-Patienten auftraten.

Es gibt zudem Hinweise für eine enge Beziehung zwischen CVID und sIgAD (siehe 1.3.2). Eine aus einem primär selektiven IgA-Defekt heraus entwickelte CVID [49,50] und die Beobachtung, dass innerhalb einer Familie CVID und sIgA-Defekt auftreten können [35], lassen auf eine mögliche Vererbung schließen, wenngleich die Mendelschen Gesetze dabei nicht erkennbar sind [49]. Weitere Untersuchungen zeigen eine Verbindung zwischen sIgA-Defekt, CVID und Allelen des MHC (major histocompatibility complex) II und III [48,51], so dass dort der Genort für eine (gemeinsame) Ursache von sIgA-Defekt und CVID vermutet wird [30,52].

Genetisch nachgewiesene Defekte bei Patienten mit CVID sind u.a. ein Defekt der ICOS-Expression (siehe 1.3.1.2.1) und ein Defekt im sogenannten SAP-Molekül, das unter anderem durch T- und NK-Zellen exprimiert und dessen Fehlen mit einer häufig letal verlaufenden primären EBV-Infektion assoziiert wird (sogenannte XLP, „X-linked lymphoproliferative disease“) [53]. XLP-Patienten, die eine primäre EBV-Infektion überlebten, werden häufig klinisch auffällig durch CVID bzw. Hypogammaglobulinämie [54]. Zudem konnte bei einigen männlichen Patienten mit CVID und ausgeprägter B-Lymphopenie ein Defekt der Expression der Bruton'schen Tyrosin-Kinase (Btk) gefunden werden [48,55]. Die Btk wird hauptsächlich von B-Zellen intrazellulär exprimiert und ist an der B-Zellreifung beteiligt [56].

#### **1.3.1.2.1 Inducible Co-Stimulator (ICOS) und CVID**

Seit einiger Zeit steht der „inducible co-stimulator“ (ICOS) unter Verdacht, an der Entstehung von CVID beteiligt zu sein [48]. ICOS ist ein Mitglied der CD28/CTLA4-Familie und wird hauptsächlich durch aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert. Nach mitogener *in-vitro*-Stimulation von peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) ist es als Oberflächenmolekül auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachweisbar [57]. Der ICOS-Ligand (ICOS-L, B7H) wird auf der Oberfläche von B-Zellen und nicht-immunologischen Zellen exprimiert. ICOS ist beteiligt an der T-Zell-Aktivierung / T-Zell-Proliferation und spielt eine Rolle in der humoralen Abwehr und beim Ig-Klassenswitch durch B-Zellen [58].

Den Hinweis für die Beteiligung von ICOS an CVID erbrachten die Ergebnisse einer Studie von Grimbacher et al. [59]. Bei der Untersuchung von 32 Patienten mit CVID konnte bei 4 dieser Patienten keine ICOS-Expression auf T-Zellen nach mitogener Stimulation nachgewiesen werden. Neben der fehlenden ICOS-Expression waren bei diesen Patienten eine verminderte B-Zellzahl und ein geringerer Anteil an klassengeswitchten Memory-B-Zellen nachweisbar, was auf eine mögliche Rolle von ICOS in der B-Zellentwicklung hinweist. Der Klassenswitch der Immunglobuline war allerdings möglich. Zwischen der Verminderung der Immunglobulinserumspiegel und der verminderten Memory-B-Zellzahl im Blut besteht möglicherweise ein ursächlicher Zusammenhang. Ähnliches wurde schon bei ICOS knock-out Mäusen beobachtet [58,60-62]. Anders als bei vielen Fällen von CVID zeigten sich bei den 4 Patienten aber keine der häufigen Begleiterscheinungen von CVID wie z.B. Splenomegalie oder Autoimmunerkrankungen. Die Ursache könnte darin liegen, dass der ICOS-Defekt für die T-Zell-Funktion nicht hinreichend bedeutend ist.

#### **1.3.1.2.2 Recent Thymic Emigrants (RTE) und Thymusfunktion bei CVID**

Als eine andere Ursache für die Entstehung von CVID wurden Thymusdefekte diskutiert [63]. Periphere T-Zellen, die vor kurzem im Thymus generiert wurden und in der Peripherie noch keinen Kontakt mit Antigen hatten, werden als „Recent Thymic Emigrants“ (RTE) bezeichnet [64].

Zur Beurteilung der Thymusfunktion wurde lange nach einem Marker gesucht, um innerhalb des naiven peripheren T-Zell-Pools diese Zellen unterscheiden zu können. Einer der klassischen Parameter sind die sogenannten „T cell receptor excision circles“ (TRECs), die bei der Generierung der alpha-Kette des  $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptors entstehen und mit jeder Zellteilung „ausverdünnt“ werden. D.h. ein hoher Gehalt an TREC im peripheren T-Zell-Pool kann Zeichen einer intakten Thymusfunktion sein, ein niedriger Gehalt für eine verminderte / gestörte Thymusfunktion sprechen, vorausgesetzt, es liegt kein verstärkter peripherer Verbrauch von T-Zellen bzw. keine verstärkte periphere T-Zellexpansion vor [65,66]. Beobachtungen von einem im Vergleich zu gesunden Probanden verminderten TREC-Gehalt in peripheren T-Zellen von Patienten mit CVID [63,67] führten zu der Vermutung, dass eine Störung der T-Zellreifung im Thymus für die CVID verantwortlich sein könnte. Die TREC-Bestimmung ist jedoch aufwendig, und vorausgesetzt, es erfolgt keine Sortierung der naiven T-Zellen vor der TREC-Bestimmung, auch nicht spezifisch genug [68].

Vor kurzem beschrieb die Arbeitsgruppe um Thiel einen anderen Parameter, der den Anteil an CD4<sup>+</sup> RTE innerhalb des peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zell-Pools beschreiben soll [64]. Demnach sind naive CD31<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Zellen innerhalb des peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zell-Pools, die den höchsten TREC-Gehalt aufweisen. Passend dazu nimmt der Anteil an naiven CD31<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Laufe des Lebens kontinuierlich ab [69]. Die einfachere Bestimmung der CD4<sup>+</sup> RTE-Frequenz bezogen auf den naiven CD4<sup>+</sup> T-Zell-Pool mittels Flowzytometrie würde die RTE-Diagnostik erheblich erleichtern. Mit einer Ausnahme sind bisher jedoch keine klinischen Studien mit diesem RTE-Parameter veröffentlicht [70].

### 1.3.1.2.3 Regulatorische T-Zellen (T<sub>REG</sub>) und CVID

Schon um 1970 wurden T-Zellen entdeckt, die in der Lage sind, autoimmune Prozesse zu unterdrücken [71,72]. Jedoch erst als Sakaguchi et al. [73] nachwies, dass im Pool der CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen jene T-Zellen enthalten sind, konnten genauere Untersuchungen an den sogenannten regulatorischen T-Zellen (T<sub>REG</sub>) vorgenommen werden. T<sub>REG</sub> finden sich im Nabelschnurblut, im Thymus, in lymphatischen Geweben und im peripheren Blut [68]. Einige Funktionen und Wirkmechanismen sind mittlerweile relativ gut beschrieben [74]. Wohingegen in Mäusen fast alle CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit CD25<sup>-</sup> Expression regulatorische Eigenschaften besitzen [75], ist beim Menschen lediglich eine kleine Population mit sehr starker CD25-Expression (CD25<sup>+++</sup>, etwa 2-7% der CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen) beschrieben, die regulatorische Funktionen innehaben soll [76]. Der größte Anteil der CD25<sup>+++</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen (90%) in adultem Blut zeigt einen Memory-T-Zell-Phänotyp (CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>), was für einen bereits erfolgten Antigenkontakt spricht. Eine starke Koexpression von CD38, einem Marker für naive Zellen, findet sich meist bei Zellen im Thymus und im Nabelschnurblut [76].

Die Beteiligung von T<sub>REG</sub> an der Genese von Autoimmunerkrankungen ist mittlerweile gezeigt worden. So konnte in Maus-Modellen der Zusammenhang zwischen einem Mangel an T<sub>REG</sub> und entzündlichen Darmerkrankungen bzw. Autoimmungastritis festgestellt werden [77,78].

Eine gestörte T<sub>REG</sub>-Homöostase bzw. -Funktion ist bei der CVID bislang nicht untersucht bzw. beschrieben, der Verdacht einer Störung in diesem Bereich liegt angesichts der gehäuft zu beobachtenden Autoimmunprozesse bei CVID jedoch nahe [79].

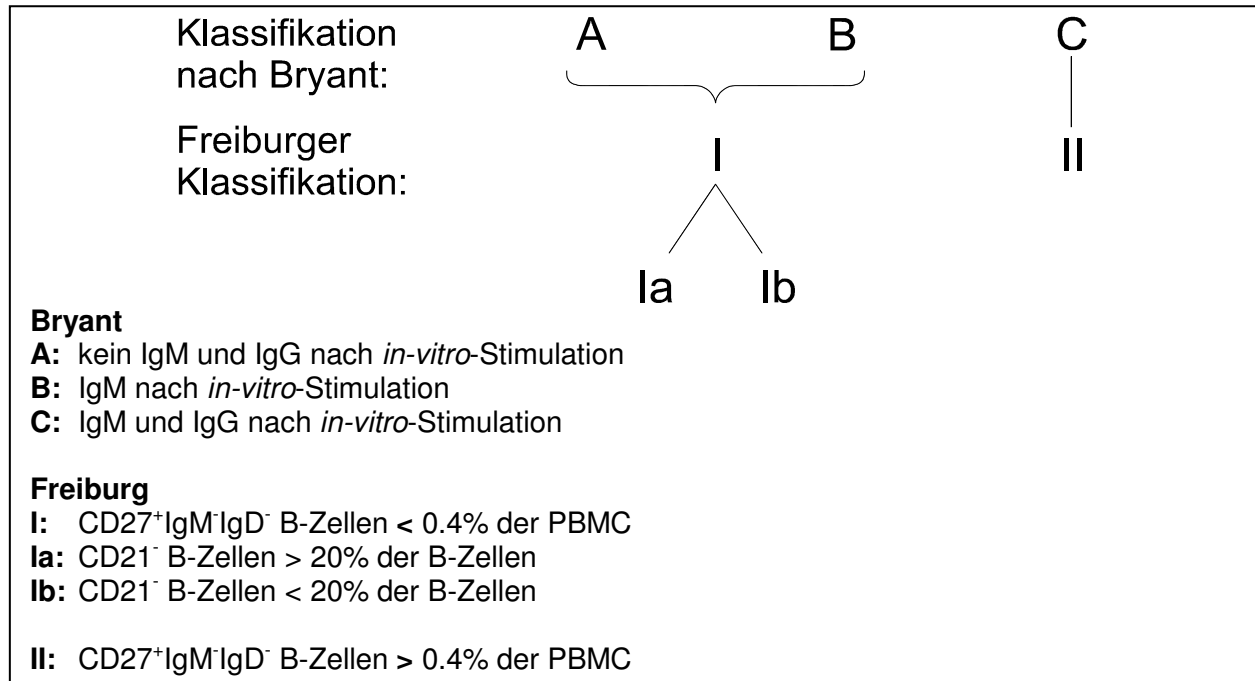
### 1.3.1.3 Versuch einer neuen Klassifikation der CVID

Da der CVID offensichtlich keine einheitliche Ursache zugeordnet werden kann und noch längst nicht alle Ursachen diagnostizierbar sind, liegt neben der Suche nach bereits beschriebenen Störungen / Defekten (siehe 1.3.1.2) derzeit ein besonderes Augenmerk auf der Etablierung einer einheitlichen Klassifikation. Bisherige Versuche die CVID einzuteilen, führten zu der Klassifikation nach Bryant et al. [80]. Als Grundlage der Einteilung verwendeten Bryant et al. die Testung auf die Fähigkeit der peripheren B-Zellen, nach mitogener *in-vitro*-Stimulation IgM bzw. IgG zu synthetisieren. Dementsprechend wurden die Patienten in drei Gruppen geteilt. Patienten in Gruppe A konnten *in-vitro* weder IgM noch IgG produzieren, Patienten in Gruppe B produzierten dagegen normale Mengen an IgM, aber kein IgG, und Patienten in Gruppe C schließlich zeigten *in-vitro* eine normale IgM- und IgG-Produktion wie bei gesunden Probanden. Das Problem dieser Einteilung ist die relativ aufwendige und schwer standardisierbare Testmethodik, weshalb sich diese Klassifikation international nicht durchgesetzt hat.

Eine weitere Einteilung wurde 2002 von Warnatz et al. vorgeschlagen [29]. Zur sogenannten Freiburger Klassifikation diente die unterschiedliche Verteilung der B-Zell-Subpopulationen. Die Einteilung erfolgte in die Gruppen I und II anhand der Anteile von Memory-B-Zellen mit Klassenswitch (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>). Gruppe I zeichnete sich durch einen CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> B-Zell-Anteil von < 0,4% der PBMC aus. Gruppe II wies einen Anteil der klassengeswitchten Memory-B-Zellen (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>) aus, der größer als 0,4% der PBMC war und dem Anteil gesunder Probanden entsprach.

Zudem wurde Gruppe I anhand der Expression von CD21, einem B-Zell-Reifemarker, in die Untergruppen Ia und Ib unterteilt. Patienten wurden Gruppe Ia zugeordnet, wenn der Anteil an CD21<sup>-</sup> B-Zellen mit > 20% erhöht war. Diese Patienten hatten im Vergleich zur Gruppe Ib (kein erhöhter Anteil an unreifen B-Zellen) deutlich häufiger eine Splenomegalie (100%, 10/10) und Autoimmunerkrankungen (60%, 6/10). Eine fehlende Antwort auf Vakzine wurde ebenfalls bei allen Vertretern der Gruppe Ia beobachtet. In Gruppe Ib hatten nur 42% (5/13) eine Splenomegalie, die Inzidenz der Autoimmunerkrankungen war ebenfalls geringer (46%, 6/13) und die Impfantwort nachweislich schwächer. In Gruppe II litt nur ein Patient, der zudem einen hohen Anteil unreifer B-Zellen aufwies, an Splenomegalie (14%, 1/7), 43% hatten eine Autoimmunerkrankung (3/7). Ihre Reaktion auf Vakzine war normal [29].

Der Vergleich der Einteilungen nach Bryant und Freiburg zeigte, dass die Gruppen A und B nach Bryant in die Gruppe I nach Freiburg eingehen, wobei sich die Gruppen A und B zu jeweils gleichen Teilen in den Gruppen Ia und Ib wiederfanden und die Gruppen C nach Bryant und II nach Freiburg sich entsprachen (siehe Abbildung 2).



**Abb. 2:** Beim Vergleich der Zuordnung der Patienten in die beiden Klassifizierungssysteme zeigte sich, dass die Patienten der Gruppen A und B nach Bryant Gruppe I nach Freiburg zugeordnet werden konnten und Gruppe C sich vollständig in Gruppe II wiederfand [29].

Von den Ergebnissen der Freiburger Klassifikation ausgehend, ergeben sich verschiedene klinisch relevante Anwendungsmöglichkeiten:

- die Diagnostik von CVID könnte deutlich vereinfacht und beschleunigt werden,
- es könnten Aussagen über die Wahrscheinlichkeit von Autoimmunerkrankungen getroffen werden,
- es könnten Vorhersagen zur Wirkung von Schutzimpfungen gemacht werden und
- es liegt der Verdacht nahe, dass es sich bei normalem bzw. vermindertem Memory-B-Zell-Pool um das Vorliegen verschiedener Ursachen handelt, zum Beispiel eine B-Zell-Reifungsstörung bei fehlenden B-Zellen, und sich somit eine Vorauswahl der Patienten für weiterführende Untersuchungen ergibt.

## **1.3.2 Selektiver IgA-Defekt (slgAD)**

### **1.3.2.1 Epidemiologie und Klinik des slgADs**

Ein selektiver IgA-Defekt (slgAD) ist definiert durch fehlendes oder nicht nachweisbares Serum-IgA (in unserer Einrichtung  $<7$  mg/dL), kein sekretorisches IgA, eine normale T-Zellimmunität und normale Serumspiegel der anderen Immunglobulinklassen einschließlich der IgG-Subklassen [17]. In der klinischen Praxis werden in der Regel jedoch nur die Serum-Immunglobulinspiegel für die Diagnosestellung verwendet [17,22,81]. Mit einer Prävalenz von 1/400 bis 1/3000 [82,83] (starke regionale Unterschiede: Kaukasier 1/700, in China 1/4000, in Japan 1/18000 [22,84]) ist der slgAD paraklinisch der häufigste primäre Immundefekt [48]. Im Gegensatz zur CVID ist die Mehrzahl der betroffenen Personen jedoch asymptomatisch, so dass keine Diagnose gestellt wird [22,46]. Männer und Frauen sind gleichermaßen betroffen. Beobachtungen in Familien lassen auf rezessive und dominante Vererbung der Krankheit schließen [83,85]. Nach der CVID-Definition der ESID ist bei Vorliegen eines slgAD eine CVID jedoch möglich, wenn entsprechende Kriterien erfüllt sind (siehe 1.3.1.1).

Klinisch auffällig werden slgAD-Patienten durch Infekte des Sinopulmonarraumes, des Gastrointestinaltraktes, insbesondere mit *Giardia lamblia*, und durch Lymphadenopathien [22,28]. Bei Patienten mit slgAD ist die Prävalenz von Autoimmunerkrankungen und Atopie [22,28,48] erhöht. Der Anteil von slgAD bei Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen, Infektionen des Gastrointestinaltraktes, Lymphadenopathien und Autoimmunerkrankungen ist im Vergleich zur Normalpopulation erhöht [17,22,46]. Koinzidenzen von slgAD mit anderen Immundefekten wie Ataxia-Telangiektasia [86] oder IgG-Subklassenmangel [87] sind gehäuft.

### **1.3.2.2 Ursachen des slgADs**

Die Ursache von slgAD ist weitgehend unbekannt. Allerdings zeigten verschiedene Untersuchungen enge Beziehungen zur CVID (siehe Absatz 1.3.1 dieser Arbeit). Neben MHC-Defekten [88] sind verschiedene Gene [48] im Verdacht, ursächlich im Zusammenhang mit dem Defekt zu stehen. Die klinisch-immunologischen Aspekte von slgAD sind sehr ähnlich mit denen von CVID [48]. Ein gemischtes Auftreten von slgAD und CVID in Familien ist beschrieben [48] (siehe Absatz 1.3.1.2 dieser Arbeit).



Patienten mit sIgA-Defekt weisen oft einen hohen Prozentsatz von unreifen B-Zellen auf, die IgA, IgM und IgD als Oberflächenproteine tragen und sich vermutlich nicht in IgA-produzierende Plasmazellen umwandeln können [48]. Der Nachweis der entsprechenden Gene für die Ketten  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  (siehe Tabelle 1) [89] und die Produktion der anderen Klassen weisen auf einen IgA-spezifischen Klassenswitch-Defekt hin [22,48].

Das Auftreten vom sIgA-Mangel bei einer zuvor immunologisch unauffälligen Person nach Knochenmarktransfer von einem Patienten mit sIgAD [90] bzw. das Ausheilen eines sIgA-Defekts nach der Transplantation von Knochenmark eines gesunden Spenders [91] lenken die Aufmerksamkeit auf das Knochenmark als möglicher Lokalisation des Defekts. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung zu der oben genannten Hypothese, dass ein Plasmazell-Defekt vorzuliegen scheint, da eine der Hauptlokalisationen von Plasmazellen das Knochenmark ist.

Da die meisten Personen mit sIgAD klinisch unauffällig bleiben [22], scheinen andere Faktoren für eine klinische Manifestation eine wichtige Rolle zu spielen. Untersuchungen von Ammann et al. [92] zeigten, dass Personen, die in der Lage sind, fehlendes sekretorisches IgA kompensatorisch durch sekretorisches IgM auszugleichen, weniger häufig an Infektionen leiden. Patienten mit zusätzlichem IgG-Subklassenmangel leiden dagegen stärker an Infektionen [93,94].

## 2 ZIELSTELLUNGEN DER ARBEIT

Im Institut für Medizinische Immunologie der Charité Campus Mitte werden seit Jahren im Rahmen einer ambulanten Diagnostik-Sprechstunde Patienten mit Verdacht auf immunologische Störungen betreut. Im Zuge einer Fokussierung dieser Sprechstunde auf Immundefekte im Erwachsenenalter sollten mit Hilfe dieser Studie folgende Fragen zur Verbesserung und Vereinfachung der ambulanten Diagnostik bei erwachsenen Patienten mit CVID bzw. sIgAD untersucht werden:

1. Ist die Aussage, dass die Freiburger Klassifikation der Klassifikation nach Bryant entspricht, zu bestätigen?
2. Ist die Freiburger Klassifizierung zur routinemäßigen Diagnostik bei Verdacht auf CVID noch zu vereinfachen?
3. Lassen sich bei der Immunphänotypisierung von Vollblut mittels neuer Marker wie CD4<sup>+</sup> RTE definiert über CD31 oder CD4<sup>+</sup> T<sub>REG</sub> definiert über CD25 in Kombination mit bekannten Markern weitergehende Aussagen zur Diagnostik bei CVID-Patienten machen?
4. Bieten die oben genannten Untersuchungen eine Hilfestellung bei der Differentialdiagnose sIgAD / CVID?
5. Etablierung eines einfachen und routinefähigen Vollblut-Tests zum Nachweis einer defekten ICOS-Expression.

### **3 MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 Patienten und Probanden**

##### **3.1.1 Patienten**

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit erfolgten an 10 erwachsenen CVID-Patienten und 2 erwachsenen Patienten mit selektivem IgA-Defekt.

Die Gruppe der CVID-Patienten setzte sich aus 8 Frauen im Alter von 18 – 64 Jahren (MW 41,8 Jahre, SD  $\pm$  17,5) und zwei Männern (33 und 43 Jahre) zusammen. Es fanden sich in 5 Fällen eine Splenomegalie und in 4 Fällen Autoimmunphänomene bzw. Befunde mit Verdacht auf eine autoimmune Genese (Vitiligo, Urtikaria, ausgeprägte Lymphopenie). Eine ausgeprägte B-Zell-Lymphopenie (B-Zellzahl  $<0,01$  Gpt/l) fand sich bei keinem der untersuchten CVID-Patienten, ebenso fanden sich keine Hinweise auf eine granulomatöse Erkrankung. Die Diagnose CVID erfolgte anhand der ESID-Kriterien ([www.esid.org](http://www.esid.org), siehe Kapitel 1.3.1.1) mit Ausnahme der Testung der Impfantwort (zum Zeitpunkt der Diagnosestellung war dieses Kriterium noch nicht bekannt).

Die Gruppe der Patienten mit selektivem IgA-Defekt setzte sich aus einem Mann und einer Frau zusammen (je 26 Jahre). Die Diagnose sIgA-Defekt wurde anhand der Serum-Immunglobulinspiegel gestellt. Eine Testung der Impfreaktion oder der Bestimmung der Isohämagglutinine zum Ausschluss der Differentialdiagnose CVID erfolgte zum Zeitpunkt der Diagnose nicht.

Bis auf den männlichen Patienten mit selektivem IgA-Defekt sind alle Patienten unter regelmäßiger Immunglobulinsubstitution (subkutan oder intravenös, 1 Patient war zum Untersuchungszeitpunkt mit i.m.-Substitution eingestellt). Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die Patienten klinisch unauffällig. Die Studienteilnahme erfolgte freiwillig und eine schriftliche Einverständniserklärung wurde nach Aufklärung von allen Patienten gegeben. Ein Ethikantrag wurde eingereicht und bewilligt.

Die Charakteristika der Patienten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Für die Etablierung eines ICOS-Expressionstests stand uns Blut einer Patientin mit molekularbiologisch festgestelltem homozygotem ICOS-Defekt zur Testvalidierung (Patient 1 in [59]) zu Verfügung, ein entsprechendes Etikvotum lag vor. Es handelte sich um eine 44-jährige Frau mit Diagnosestellung CVID im Alter von 28 Jahren. Die Diagnose wurde nach rezidivierenden Infekten der oberen Atemwege und Auftreten

einer Pneumonie gestellt. Die Patientin erhält seit Diagnosestellung intravenös Immunglobuline mit einem deutlichen Rückgang der Infektionsinzidenz als Folge.

**Tabelle 2:** Charakteristika der in der Studie untersuchten Patienten mit Ausnahme der Patientin mit bekanntem ICOS-Defekt

Diagnose	Patienten-Nr.	Geschlecht	Alter bei Aufnahme in die Studie	Alter bei Diagnosestellung	Therapie bei Aufnahme in die Studie	Splenomegalie (anamnestisch)	Autoimmunphänomene (anamnestisch)
<b>CVID</b>	CVID-1	♀	52	47	IG i.m.	k.A.	k.A.
	CVID-2	♀	64	42	SCIG	-	-
	CVID-3	♂	43	19	SCIG	+	+ <sup>(Δ)*</sup>
	CVID-4	♀.	46	25	SCIG.	-	-
	CVID-5	♀	29	26	SCIG	+	+ <sup>#</sup>
	CVID-6	♂	33	31	IVIG	-	-
	CVID-7	♀	18	5	SCIG	-	-
	CVID-8	♀	21	15	SCIG	+	-
	CVID-9	♀	43	42	IVIG	+	+ <sup>†</sup>
	CVID-10	♀	61	55	IVIG	-	-
<b>slgA-Defekt</b>	slgAD-1	♂	26	22	-	-	-
	slgAD-2	♀	26	22	SCIG	-	-

\*: LIP, †: Vitiligo, #: Urticaria, (Δ): Lymphopenie

### 3.1.2 Probanden

Als Vergleichsgruppe für die *in-vitro*-Stimulationen, die B-Zelltypisierung und die Immunphänotypisierung wählten wir je 5 klinisch unauffällige Männer und Frauen aus dem Laborpersonal, im folgenden Probanden genannt. Die Blutentnahmen erfolgten freiwillig.

Bei der Bestimmung der CD4<sup>+</sup> RTE- und T<sub>REG</sub>-Frequenzen nahmen wir neben den 10 bereits genannten erwachsenen Probanden zur Gewährleistung einer Altersentsprechung noch entsprechende Daten von 36 Kontrollpersonen, die im Rahmen einer Normwertstudie für das Institut für Medizinische Immunologie der Charité Campus Mitte ermittelt wurden, in unsere Untersuchung auf. Ein positives Ethikvotum für diese Studie lag vor.

Für die Etablierung eines ICOS-Expressionstests aus Vollblut konnten wir 8 Probanden aus dem Laborpersonal zur Blutspende gewinnen.

### 3.1.3 Blutentnahmen

Jedem der erwachsenen Patienten und den 10 Studien-Probanden wurden 50 ml Citratblut und 2,5 ml EDTA-Blut entnommen. Das Citratblut diente zur Gewinnung der PBMC und das EDTA-Blut zur Bestimmung der Leukozytenzahl und zur Immunphänotypisierung der Leukozyten im Vollblut (siehe 3.3.1).

Zur Etablierung des ICOS-Testes entnahmen wir von jedem der 8 Probanden und der ICOS-defizienten Patientin 4,5 ml Heparinblut.

## 3.2 Materialien und Geräte

### 3.2.1 Geräte

- Durchflusszytometer (FASCCalibur) [BD/Pharmingen]
- Zentrifuge Megafuge 1.0 [Heraeus Sepatech]
- Neubauer Zählkammer [Optic Labor]
- Vortex-Genie 2 [Scientific Industries]
- Unterdruckpipette (Pipetus®-standard) [Hirschmann]
- Brutschrank [Heraeus Sepatech]
- Wasserbad [Grant]
- Mikroskop Olympus BX40F [Olympus]
- Nalgen-Kühlboxen [NUNC]

### 3.2.2 Verbrauchsmaterialien

- sterile 48-well-Platten [NUNC]
- sterile 96-well-Platten [Falcon, BD/Pharmingen]
- Micronicröhrchen [Eppendorf]
- Eppendorftubes (0,5, 1,0, 2,0 ml) [Eppendorf]
- Conical tube (PP, 50 ml) [Falcon, BD]
- Rundboden Röhrchen (PP, 10 ml) [BD Pharmingen]
- Röhrchen zur sterilen Blutentnahme  
(Coagulation 9 NC/10 ml, EDTA K 2,7 ml) [Sarstadt]
- BD ValueSet Perfusionsbesteck  
mit Flügeln (0,8x20mm, 30cm) [Becton Dickinson]
- MultiAdapter [Sarstedt]
- Transferpipette 3,5 ml [Sarstedt]
- Unterdruckpipettenaufsätze  
(25, 10, 2 ml) (Spacesaver) [Falcon, BD]
- Kryoröhrchen (Cryotubes 1,8 ml) [NUNC]
- Unterdruckpipette [Labware]

### 3.2.3 monoklonale Antikörper (mit Klon)

- CD2- Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) S5.2 [BD/San Jose]
- CD4-FITC SK3 [BD/San Jose]
- CD8-FITC DK25 [Immunotech/Coulter]
- CD11a-FITC MHM24 [DAKO]
- CD16-FITC DJ130c [DAKO]
- CD19-FITC 89B (B4) [Immunotech]
- CD45RA-FITC ALB11 [Immunotech/Coulter]
- CD57-FITC NC1 [Immunotech/Coulter]
- CD62L-FITC DREG56 [Immunotech/Coulter]
- IgM-FITC R2-1A6a [CALTAG]
- CD3-Phycoerythrin (PE) UCHT1 [BD/Pharmingen]
- CD8-PE SK1 [BD/San Jose]
- CD19-PE SJ25C1 [BD/Pharmingen]
- CD21-PE B-ly4 [BD/Pharmingen]
- CD25-PE 2A3 [BD/Pharmingen]
- CD27-PE MT271 [DAKO]
- CD28-PE CD28.1 [DAKO]
- CD31-PE 1F11 [Immunotech/Coulter]
- CD69-PE FN50 [BD/Pharmingen]
- ICOS-PE C398-4A [eBioscience]
- HLA-DR-PE L243 [Becton Dickinson]
- CD3 Peridin-Chlorophyll-A-Protein (PerCP) SK7 [BD/Pharmingen]
- CD4-PerCP L200 [Becton Dickinson]
- CD45 PerCP 2D1 [BD/San Jose]
- CD3- Allo-Phyco-Cyanin (APC) SK7 [BD/Pharmingen]
- CD4-APC MT31 [DAKO]
- CD5-APC DK23 [DAKO]
- CD8-APC SK1 [BD/San Jose]
- CD14-APC MΦP9 [BD/San Jose]

- CD19-PC5 J4.119 [Immunotech/Coulter]
- Anti-IgD-Biotin IA6-2 [BD/Pharmingen]
- HLA-DR-PE / CD14-PerCP-Cy5.5  
(Mischung, siehe [95]) HLA-DR: L243  
CD14: MoP9 [BD/Pharmingen]

### 3.2.4 fluoreszenzmarkierte Reagenzien

- Streptavidin(SA)-APC [BD/Pharmingen]

### 3.2.5 Stimulanzen

- Staphylococcus aureus Cowan I (SAC) [Calbiochem]
- IL-2 [R&D]
- Pokeweed mitogen (PWM) [Sigma]
- Phorbol-Myristate-Acetat (PMA) [Sigma]
- Ionomycin [Sigma]

### 3.2.6 andere Reagenzien und Lösungen

- ELISA zur Bestimmung von humanem IgG bzw. IgM [Seramun]
  - FASC-Lyse-Lösung [Becton Dickinson]
  - Quantibrite™-PE [Becton Dickinson]
  - Ficoll Hypaque [Biochrom KG]
  - Formaldehyd [Merck]
  - PBS (phosphate based saline) [PAA Laboratorie GmbH]
  - RPMI-1640 [PAA Laboratorie GmbH]
  - Penicillin (10000 U/ml) /Streptomycin (10000 µg/ml) [Biochrom KG]
  - FCS (Fetales Kälberserum) (inaktiviert) [Biochrom KG]
  - Natriumnitrit (NaN<sub>3</sub>) [Serva]
  - DMSO [Sigma]
  - Glutamin (200 mM/ml) [Biochrom KG]
- steriles Nährmedium, im folgenden „Medium komplett“ (RPMI-1640, 10% Fetales Kälber Serum (FCS) (v/v), 1% Penicillin/Streptomycin (v/v), 1% Glutamin (v/v))



- FACS-Puffer (PBS, 2% FCS (v/v), 0,1% Natriumnitrit ( $\text{NaN}_3$ ) (w/v))
- Freeze-Lösung (FCS (inaktiviert), 10% DMSO (v/v))

### 3.2.7 verwendete Software

- CellQuest [Becton Dickinson]
- Microsoft Word [Microsoft]
- Microsoft Excel [Microsoft]
- Microsoft Powerpoint [Microsoft]
- Corel Draw 8.0 [Microsoft]
- SPSS 12.0 [SPSS]
- EndNote 10.0 [Adept Scientific]

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Immunphänotypisierung in Vollblut

Von jedem Patienten und jedem der 10 Studien-Probanden wurden 2,7 ml EDTA-Blut entnommen. Je 50  $\mu$ l EDTA-Vollblut wurden dann mit je einem von insgesamt acht Antikörperansätzen (siehe Tab. 3) für 30 Minuten bei 4°C in Dunkelheit inkubiert (Ausnahme Ansatz 5: Inkubation bei Raumtemperatur).

**Tabelle 3:** Antikörperansätze zur Immunphänotypisierung

AK-Ansatz	enthaltene AK entsprechend der zum Zeitpunkt der Untersuchungen aktuellen Anwendung im Institut für Medizinische Immunologie der Charité Campus Mitte	Aussagen
1	CD2-FITC, CD16-FITC, CD3-PE, CD19-PE, CD45-PerCP, CD14-APC	Lymphozytensubpopulationen (B-, T- und NK-Zellen)
2	CD4-FITC, CD8-PE, CD45-PerCP, CD3-APC	T <sub>H</sub> -Zellen (CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> ), zytotoxische T-Zellen (CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> ), CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> Ratio
3	CD11a-FITC HLA-DR-PE, CD3-PerCP, CD8-APC	akut aktivierte zytotoxische Zellen (HLA-DR <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ), naive zytotoxische T-Zellen (CD11a <sup>low</sup> CD8 <sup>+</sup> ), memory zytotoxische T-Zellen (CD11a <sup>high</sup> CD8 <sup>+</sup> )
4	CD57-FITC, CD28-PE, CD3-PerCP, CD8-APC	chronisch aktivierte zytotoxische T-Zellen (CD57 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , CD28 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> )
5	HLA-DR-PE, CD14-PerCP-Cy5.5	Quantifizierung der HLA-DR-Expression auf Monozyten
6	CD62L-FITC, CD25-PE, CD45-PerCP, CD4-APC	aktivierte CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ), regulatorische CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (CD25 <sup>+++</sup> CD62 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> )
7	CD62L-FITC, CD45-PerCP, CD4-APC	PE-Kontrolle für Ansatz 6
8	CD45RA-FITC, CD31-PE, CD3-PerCP, CD4-APC	naive CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (CD45RA <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ), CD4 <sup>+</sup> Recent Thymic Emmigrants (RTE's, CD31 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T- Zellen)

Die Lyse der Erythrozyten erfolgte durch fünfzehnminütige Inkubation mit FACS-Lyselösung (1fach) im Dunkeln bei Raumtemperatur (osmotische Lyse, durch Formaldehydzusatz gleichzeitige Fixierung der Leukozyten). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Die Messungen erfolgten am

Durchflußzytometer (FACSCalibur; mindestens 50.000 Leukozyten bzw. 5.000 CD3<sup>+</sup> Lymphozyten wurden gemessen). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von CellQuest.

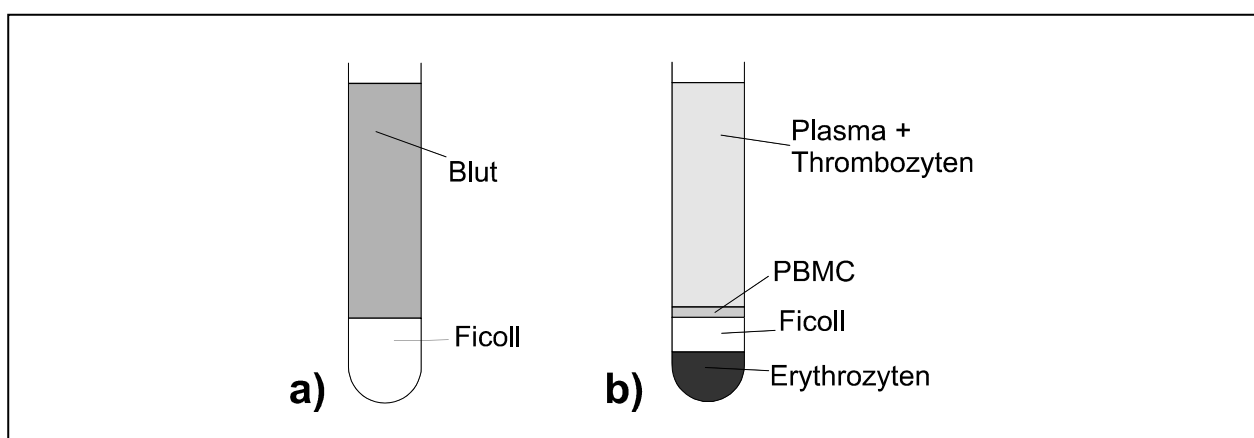
Die Leukozytenzahl im Vollblut wurde nach Lyse der Erythrozyten mit 3%iger Essigsäure in einer Neubauer-Zählkammer (siehe 3.3.2.4) ermittelt.

Fehlende Patienten- oder Probandenwerte (erkennbar durch N<10) in den Auswertungen sind auf fehlende Messergebnisse bei methodischen Problemen zurückzuführen.

### 3.3.2 Immunphänotypisierung von PBMCs

#### 2.3.2.1 Dichtegraduelle Separation von Monozyten und Lymphozyten (PBMCs)

Für die Präparation der PBMCs wurde zunächst 50 ml Citratblut steril entnommen und mit 50 ml PBS verdünnt. Vom verdünnten Blut (100 ml) wurden je 9 ml in 12 ml Röhrchen auf je 3 ml Ficoll geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 390 g und Zimmertemperatur über 40 Minuten. Anschließend wurde die zwischen Ficoll und Plasma entstandene PBMC-Schicht (bei gesunden erwachsenen Probanden und den klinisch unauffälligen erwachsenen Patienten dieser Studie überwiegend Monozyten und Lymphozyten; siehe Abbildung 3) mit einer Pasteurpipette in 50 ml BlueCap-Röhrchen überführt. Die BlueCap-Röhrchen wurden mit PBS aufgefüllt und bei 212 g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen resuspendiert und erneut in 50 ml PBS gewaschen und nun bei 209 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut dekantiert. Danach wurde das Zellpellet in 5 ml zuvor bei 37°C in einem Wasserbad erwärmtem Medium komplett aufgenommen. Die Zellzählung wurde in 3% Essigsäure (siehe 3.3.2.4) in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt.



**Abb. 3: PBMC-Dichtegradientenzentrifugation**

a) vor der Zentrifugation,

b) nach 40 min Zentrifugation bei 390 g

### 3.3.2.2 Kryokonservierung der PBMCs

Nach der Zellzählung wurden die Zellen über Zentrifugation bei 209 g und Dekantieren vom Medium komplett getrennt und in Freeze-Lösung (zuvor mindestens 30 Minuten im Eis gekühlt) überführt (maximal  $1 \times 10^7$  Zellen/ml Freeze-Lösung). Die Tiefkühlung erfolgte in bis zu 5 Aliquots/Patient ( $1,8 \times 10^7$  Zellen/Aliquot) in Nalgen-Kühlboxen um  $1^\circ\text{C}$  pro Minute auf  $-80^\circ\text{C}$ . Am nächsten Tag wurden die gefrorenen Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.3.2.3 Auftauen der PBMCs

Die gefrorenen Aliquots wurden im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  langsam schwenkend aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eisrest sichtbar war. Dann wurden die Zellen in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt und die Röhrchen mit kaltem Medium komplett (zuvor mindestens 30 Minuten auf Eis gekühlt) aufgefüllt. Die Röhrchen wurden 10 Minuten bei 209 g zentrifugiert, und die Zellen nach Dekantierung des Überstandes in zuvor bei  $37^\circ\text{C}$  in einem Wasserbad erwärmten Medium komplett aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend in der Neubauer-Zählkammer gezählt und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

### 3.3.2.4 Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer

Mit angefeuchteten Rändern wurde ein Deckgläschen unter Druck auf die Neubauer-Zählkammer geschoben. Das Ausbilden Newtonscher Ringe zeigte die Haftung an. Je  $10\ \mu\text{l}$  Zellsuspension (z.B. Zellen in Medium komplett) wurden in  $190\ \mu\text{l}$  Essigsäure (3%) (1:20) überführt und gemischt. Von dieser Lösung wurden dann  $10\ \mu\text{l}$  in eine vorbereitete Zählkammer überführt, so dass der gesamte Zählbereich ausgefüllt war. Die Zählung der Zellen erfolgte bei 10facher Vergrößerung innerhalb von 4 Gruppenquadraten (je 16 Quadrate pro Gruppenquadrat). Der Mittelwert aus den 4 Gruppenquadraten wurde mit 20 (Verdünnung) und 10.000 (Volumen eines Gruppenquadrates:  $0,1\ \text{mm} \times 1\ \text{mm} \times 1\ \text{mm} = 0,1\ \text{mm}^3 = 0,1\ \mu\text{l}$ ) multipliziert. Das Ergebnis entsprach dem Vielfachen von  $10^7$  Zellen pro ml Zellsuspension.

### 3.3.3 B-Zell-Typisierung nach Freiburg

Die B-Zell-Typisierung nach Freiburg erfolgte an aufgetauten PBMC unter Verwendung von 2 Färbeansätzen mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Antikörperansätze zur B-Zell-Typisierung nach Freiburg

Ak-Ansatz	enthaltende Antikörper und Endkonzentrationen
1	IgM-FITC: 1:40 CD21-PE: 1:40 CD19-PC5: 1:40
2	IgM-FITC: 1:40 CD27-PE: 1:20 CD19-PC5: 1:40 anti-IgD-Biotin/ SA-APC: 1:20/ 1:5

Dabei wurden je 50 µl Antikörper-Mix mit je 50 µl Zellsuspension (ca.  $5 \times 10^6$  Zellen) in Micronic-Röhrchen für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Waschung in 1 ml FASC-Puffer (200 g, 5 min) und Absaugen des Überstandes wurden die Zellen von Ansatz 1 zur Fixierung mit 500 µl FACS-Lyselösung 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit 1 ml FASC-Puffer gewaschen. Die Zellen verblieben nun bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln.

Die Zellen im Ansatz 2 wurden nach einer 2. Waschung mit FACS-Puffer mit 5 µl SA-APC bei 4°C im Dunkeln für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde wie mit den Zellen bei Ansatz 1 verfahren.

Die Messungen erfolgten am FACSCalibur, mindestens 10.000 CD19<sup>+</sup> Lymphozyten wurden gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von CellQuest.

Fehlende Patienten- oder Probandenwerte (erkennbar durch  $N < 10$ ) in den Auswertungen sind auf fehlende Messergebnisse bei methodischen Problemen zurückzuführen.

### 3.3.4 *In-vitro*-IgG- und -IgM-Sekretion

Zur quantitativen Bestimmung der *in-vitro*-Sekretion von Immunglobulin IgG bzw. IgM wurden die PBMCs unserer Patienten und Studien-Probanden zunächst nach Protokoll steril aufgetaut und auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Medium komplett eingestellt. Die Stimulationen erfolgten in 96-well-Platten mit PWM (Endkonzentration 10  $\mu\text{g/ml}$ ) bzw. SAC und IL-2 (Endkonzentrationen 1:4000 bzw. 20 U/ml). Unstimulierte Kontrollen wurden für jeden Patienten bzw. Studien-Probanden mitgeführt. Es wurden jeweils Triplikate angesetzt.

Nach 7 Tagen Inkubation bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte nach Zentrifugation der Platten (200 g, 5 min) die Abnahme der Überstände. Die Überstände der Triplikate wurden gemischt und bis zur weiteren Verwendung bei -30 °C gelagert.

Die Messungen von IgM und IgG erfolgten mit Hilfe von kommerziell erhältlichen ELISA. Ausgehend von den Ergebnissen der gesunden Probanden wurden die Sekretionen als insuffizient betrachtet, wenn <1000 ng/ml (Stimulation – Kontrolle).

#### **Testprinzip des verwendeten IgG- bzw. IgM-ELISAs**

Die zur Messung verwendeten kommerziell erhältlichen ELISA sind schnelle immunoenzymometrische 1-Schritt-Assays zur quantitativen Bestimmung von humanem IgG beziehungsweise IgM. Zur Messung werden isotypenspezifische hoch-affine polyklonale Antikörper verwendet. Auf die ELISA-Mikrotiterstreifen, beschichtet mit Primär-anti-human-Ig-Antikörpern, werden die zu untersuchende Probe und Peroxidase-markierte Sekundär-anti-human-Ig-Antikörper gegeben. Während der Inkubation binden die in der Probenlösung enthaltenen IgG bzw. IgM an die Primär-anti-human-Ig-Antikörper. Die Sekundär-anti-human-IgG- bzw. -IgM-Antikörper mit Peroxidase-Markierung wiederum binden an die F<sub>C</sub>-Stücke der humanen IgG bzw. IgM. Nichtgebundene Antikörper werden durch Waschung entfernt. Die nach Zugabe von Substrat (Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid) ablaufende enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt. Die Extinktion des umgewandelten TMB wird durch Vertikalphotometrie bei 450 nm gemessen. Die Umrechnung der Extinktionswerte in die entsprechenden Ak-Konzentrationen findet anhand einer Standardkurve statt.

### 3.3.5 Etablierung eines ICOS–Expressionstestes im Vollblut

Je 500 µl Heparinblut von 8 gesunden Probanden wurde mit PMA/Ionomycin (500 µl PMA/Ionomycin, Endkonzentrationen: PMA 100 ng/ml, Ionomycin 2 µg/ml) für 4 (2 gesunde Probanden) beziehungsweise 20 Stunden (8 gesunde Probanden) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Ein Kontrollansatz (Medium ohne Stimulanz) wurde jeweils mitgeführt. Zusätzlich untersuchten wir das Blut von einer homozygot ICOS-defizienten Patientin. Die Ansätze erfolgten in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen.

Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Röhrchen invertiert und je 50 µl Zellsuspension in Micronic-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Oberflächenfärbung mit den Ak-Gemischen A (CD8-FITC, ICOS-PE, CD3-APC) und B (CD69-PE, CD3-APC). Zur Differenzierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen benutzten wir jeweils anti-CD3 und anti-CD8 Antikörper (CD4 dimerisiert nach PMA-Stimulation, eine direkte Anfärbung des CD4-Proteins ist daher nur noch schlecht möglich [96]). Da ICOS hauptsächlich auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird, erfolgte die Gattung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen indirekt über die Darstellung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. CD69 diente als Stimulationskontrolle. Die Inkubationen erfolgten bei 4°C für 20 Minuten im Dunkeln. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert und in 1 ml FASC-Puffer gewaschen. Nun erfolgte die Lyse der Erythrozyten mit FACS-Lyselösung (1fach) (15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur) bei gleichzeitiger Fixation der Lymphozyten durch Formaldehydzusatz. Die Messungen erfolgten am FACSCalibur, mindestens 5000 T-Lymphozyten wurden gemessen, die Auswertung erfolgte mit Hilfe von CellQuest.

### 3.3.6 Flowzytometrie

Messungen am Durchflusszytometer erfolgten zur Immunphänotypisierung, B-Zelltypisierung nach Freiburg und Untersuchung der ICOS-Expression.

Nach der Färbung der PBMC bzw. von Vollblut mit monoklonalen Antikörpern wurden die Zellen bis zur Messung bei 4°C und Dunkelheit maximal 24 h gelagert. Die Messungen wurden am FACSCalibur durchgeführt, der mit einem Argon-Ionen-Laser (488 nm) und einem Helium Laser (635 nm) arbeitet.

### **Messprinzip**

Die Durchflußzytometrie (FACS–„Fluorescence Activated Cell Sorting bzw. Analysis“) ermöglicht die Charakterisierung von Antigenen einer Zelle mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper. Zusätzlich können Informationen über Größe und Granularität der Zelle gewonnen werden.

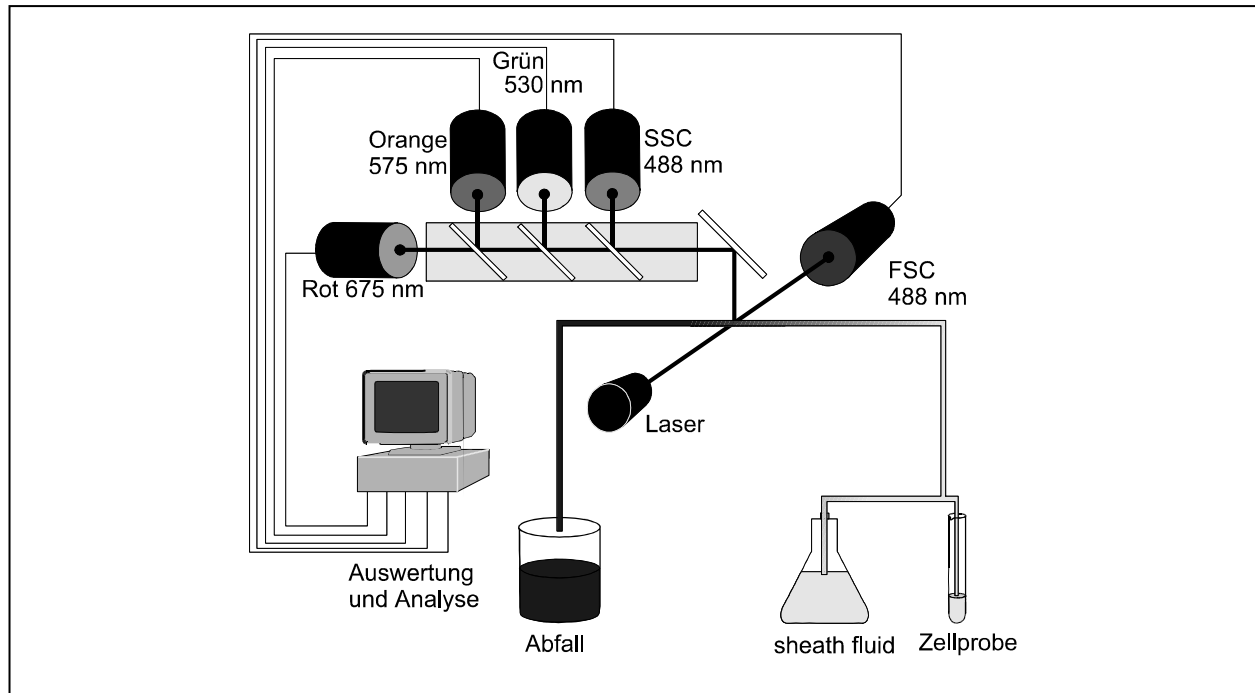
Die zu messenden Zellen werden zusammen mit einer speziellen Flüssigkeit („sheath fluid“) mit Hilfe eines Flüssigkeitssystems aus einem Probenröhrchen („Sample“) in das Gerät gesaugt. Die Flüssigkeit umhüllt die Zellen und zieht den Probenstrahl dabei so auseinander, dass die Zellen perlenschnurartig in den Strahlengang eines Lasers gelangen. Trifft der Laser auf Fluoreszenzfarbstoffe, die über spezifische Ak an ein Antigen der Zelle gebunden und somit proportional zur Anzahl der Bindungsstellen sind, führt dies zur Aussendung von Licht einer bestimmten Wellenlänge, die für den jeweiligen Farbstoff charakteristisch ist. Dieses wird durch ein Objektivsystem, verschiedene Farbfilter und Teilerspiegel auf die verschiedenen Detektoren gelenkt, gemessen und gibt Aufschluss über die erfolgten Ak-Bindungen und dadurch über das Vorhandensein der entsprechenden Antigene auf der Zelle.

Gleichzeitig erfährt der Laserstrahl durch Größe und Granularität der Zelle eine charakteristische Streuung, deren Erfassung Informationen über diese Eigenschaften liefert (FSC = Vorwärtsstreulicht = Größe, SSC = Seitwärtsstreulicht = Granularität).

Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mit entsprechenden Absorptions- und Emissionsmaxima kann die Koexpression von Antigenen auf einer Zelle analysiert werden. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden in dieser Arbeit FITC, PE, PerCP, PerCP-Cy5.5 und APC verwendet. Die Absorptionsmaxima der verwendeten Fluorochrome (FITC 495 nm, PE 565 nm, PerCP 490 nm, APC 650 nm) liegen im Wellenlängenbereich des Argon-Ionen-Lasers (FITC, PE, PerCP, PerCP-Cy5.5) bzw. des Helium-Lasers (APC). Die verschieden gemessenen Lichtsignale werden verstärkt, digitalisiert und mittels entsprechender Programme (CellQuest, BD) ausgewertet.

Den grundsätzlichen Aufbau eines Flowzytometers gibt Abbildung 4 wieder:





**Abb. 4:** Vereinfachtes Schema zum FACS-Prinzip (1 Laser): Zellen aus dem Zellprobenröhrchen werden im sogenannten „sheath fluid“ perlchnurartig separiert und von einem Laser (z. B. Argon-Laser - emittierende Wellenlänge 488 nm) bestrahlt. Je nach Beschaffenheit der Zellen wird das auftreffende Licht verschieden stark gestreut und die entsprechenden Lichtmengen werden über Photosensoren registriert. Sind die Zellen zudem noch mit Fluorochromen markiert, so werden diese durch den Laser angeregt. Die emittierten Fluoreszenzen werden über Photosensoren ermittelt. So hat zum Beispiel PerCP ein Emissionsmaximum von 675 nm (rot), PE 575 nm (orange) und FITC 520 nm (grün). Die erfassten Signale werden verstärkt, digital verarbeitet und analysiert.

### 3.3.7 Statistik

Zur Ermittlung von Mittelwerten und Standardabweichungen sowie zur Beantwortung aller anderen statistischen Fragestellungen verwandten wir SPSS 12.0.

Zum Vergleich des Alters und der immunphänotypischen Daten nutzten wir den Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Die graphischen Darstellungen erfolgten überwiegend mit Boxplots (Darstellung von Median, 25. und 75. Perzentilen, Minimal- und Maximalwerten).

Der Spearman' Rank Korrelation Koeffizient diente zur Korrelation des Alters mit den CD4<sup>+</sup> RTE-Frequenzen.

Unterschiede wurden ab  $p < 0,05$  als signifikant betrachtet.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 CVID-Patienten

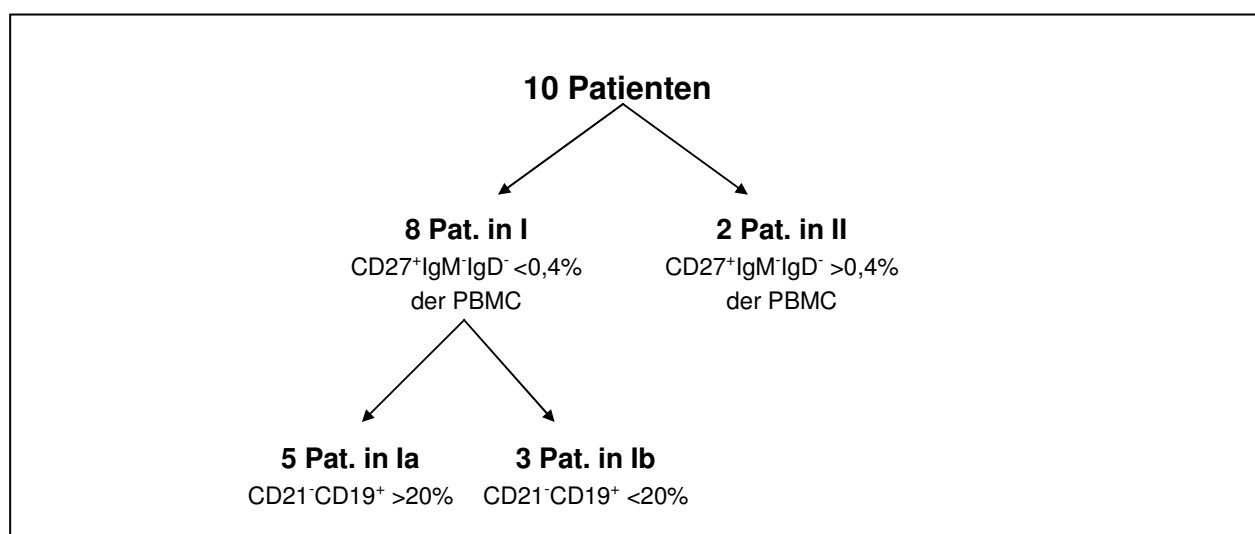
#### 4.1.1 B-Zell-Phänotypisierung

##### 4.1.1.1 Auswertung nach Bryant und Freiburg

Bei der Einteilung unserer CVID-Patienten anhand der Sekretion von IgM und IgG nach *in-vitro*-Stimulation mit SAC + IL-2 konnten wir Gruppe A (keine IgG-, keine IgM-Sekretion, n=6), Gruppe B (keine IgG-, aber IgM-Sekretion, n=2), sowie Gruppe C (sowohl IgG- als auch IgM-Sekretion, n=2) besetzen (modifizierte Einteilung nach Bryant).

Bei der phänotypischen Untersuchung der B-Zellen zeigte sich, dass 8 der 10 CVID-Patienten einen klassengeswitchten Memory-B-Zell-Anteil ( $CD27^+IgM^-IgD^-$ )  $<0,4\%$  der PBMC aufwiesen (Median 0,05%, Minimalwert-Maximalwert: 0,00 – 0,18%) und so der Gruppe I nach Freiburg zugeordnet werden konnten. Die anderen zwei Patienten hatten einen Anteil von 0,8% respektive 2,34% und waren damit in der Gruppe II nach Freiburg zugeordnet.

5 Patienten der Gruppe I (62,5%) zeigten zudem einen erhöhten Anteil von unreifen B-Zellen ( $CD21^-$  B-Zellen  $>20\%$ ) und erfüllten somit die Bedingung für die Gruppe Ia nach Freiburg. Die übrigen 3 Patienten der Gruppe I hatten keine entsprechend erhöhten Anteile an unreifen B-Zellen (37,5% der Gruppe I) und wurden folglich in Gruppe Ib nach Freiburg eingeteilt. Die Einteilung nach Freiburg ist in Abbildung 5 gezeigt.



**Abb. 5:** Einteilung der CVID-Patienten anhand der Freiburger Klassifikation. 8 Patienten konnten der Gruppe I ( $CD27^+IgM^-IgD^- <0,4\%$  der PBMC) zugeordnet werden, 2 der Gruppe II ( $CD27^+IgM^-IgD^- >0,4\%$  der PBMC). In Gruppe I konnten 5 Patienten der Gruppe Ia ( $CD21^-$  B-Zellen  $>20\%$ ) und die anderen 3 der Gruppe Ib ( $CD21^-$  B-Zellen  $<20\%$ ) zugeordnet werden.

40% (2/5) der Patienten in Gruppe Ia wiesen Splenomegalie und Autoimmunphänomene auf, der Anteil von Splenomegalie bei den Ib-Patienten lag bei 66% (2/3), wobei einer der beiden Patienten mit Splenomegalie zusätzlich ein Autoimmunphänomen aufwies. Die beiden Patienten in Gruppe II hatten weder eine Splenomegalie noch zeigten sie Autoimmunphänomene. Tabelle 5 fasst die Ergebnisse der Klassifikationen zusammen.

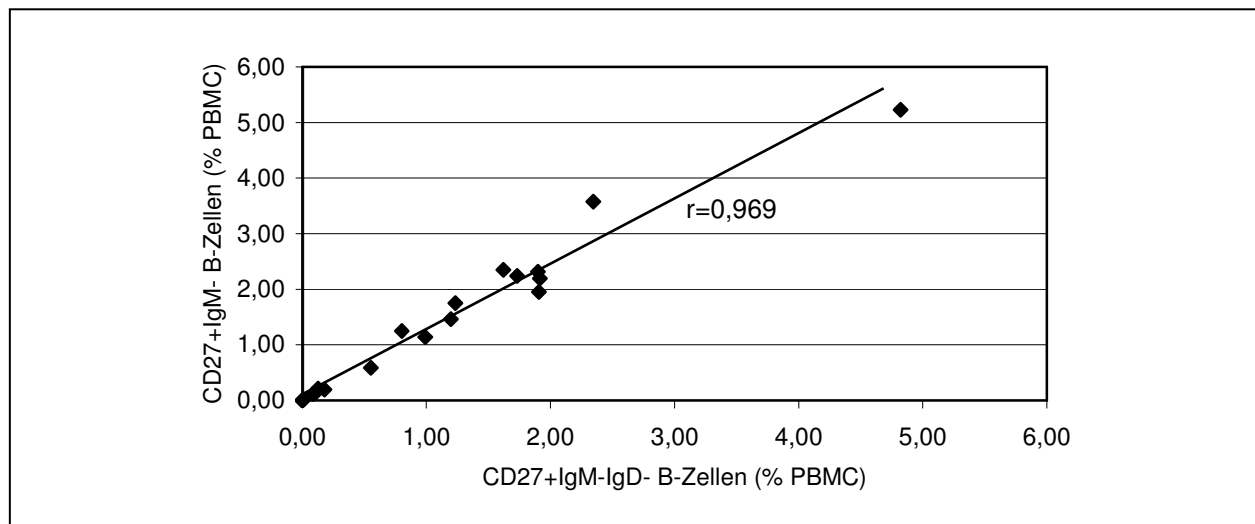
In der gesunden Vergleichsgruppe zeigten die Probanden weder einen verminderten klassengeswitchten Memory-B-Zellanteil noch einen erhöhten Anteil unreifer B-Zellen (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 5:** Übersicht über die nach Bryant bzw. Freiburg klassifizierten CVID-Patienten. Im Vergleich zur Norm gesunder Probanden erniedrigte (Ig-Synthese, CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> B-Zellen) bzw. erhöhte Messwerte (unreife B-Zellen) sind fett gedruckt.

Patienten	Splenomegalie	Autoimmunphänomene	B-Zell-Anteile					in-vitro-Ig-Synthese		Bryant Klassifikation	Freiburger Klassifikation
			in % PBMC				in % B-Zellen	IgM (ng/ml) (Stimulation-Kontrolle)	IgG (ng/ml) (Stimulation-Kontrolle)		
			naive B-Zellen (CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> )	nicht-klassengeswitchte Memory-B-Zellen (CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> )	IgM only Memory-B-Zellen (CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> )	Klassengeswitchte Memory-B-Zellen (CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> )	unreife B-Zellen (CD21 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> )				
CVID-1	+	+	10,97	3,99	0,40	<b>0,09 ↓</b>	<b>26,21 ↑</b>	>5000	<b>57,02 ↓</b>	B	Ia
CVID-2	-	-	6,97	3,47	0,33	0,80	14,49	>5000	>5000	C	II
CVID-3	+	+	1,21	0,03	0,00	<b>0,00 ↓</b>	<b>74,88 ↑</b>	<b>140,40 ↓</b>	<b>140,40 ↓</b>	A	Ia
CVID-4	-	-	7,46	0,42	0,10	<b>0,18 ↓</b>	12,21	<b>242,60 ↓</b>	<b>126,36 ↓</b>	A	Ib
CVID-5	+	+	11,40	1,84	0,11	<b>0,01 ↓</b>	13,39	<b>583,20 ↓</b>	<b>140,40 ↓</b>	A	Ib
CVID-6	-	-	8,99	3,19	0,21	<b>0,11 ↓</b>	<b>30,3 ↑</b>	>5000	<b>142,16 ↓</b>	B	Ia
CVID-7	-	+	7,61	0,40	0,19	<b>0,13 ↓</b>	<b>54,71 ↑</b>	<b>140,40 ↓</b>	<b>136,17 ↓</b>	A	Ia
CVID-8	+	-	10,50	0,21	0,00	<b>0,00 ↓</b>	9,09	<b>140,40 ↓</b>	<b>140,40 ↓</b>	A	Ib
CVID-9	+	+	4,51	0,09	0,00	<b>0,00 ↓</b>	<b>96,4 ↑</b>	<b>42,24 ↓</b>	<b>140,40 ↓</b>	A	Ia
CVID-10	-	-	3,61	3,56	0,88	2,34	8,76	1794,37	4734,40	C	II
Norm						>0,4	<20	>1000	>1000		

#### 4.1.1.2 Auswertung der phänotypischen B-Zell-Klassifizierung nach Freiburg ohne Oberflächen-IgD

Klassengeswitchte Memory-B-Zellen ( $CD27^+IgM^-IgD^-$ ) exprimieren weder IgD noch IgM. Demgegenüber gibt es nicht-klassengeswitchte Memory-B-Zellen, die IgM exprimieren ( $CD27^+IgM^+IgD^-$ ). Da beide Memory-B-Zell-Populationen IgD negativ sind, stellte sich die Frage, ob die Freiburger B-Zell-Markierung durch Weglassen der Auswertung der IgD-Oberflächenfärbung vereinfacht werden kann. Deshalb unternahmen wir eine erneute Klassifizierung der Studien-Probanden und COVID-Patienten nach Freiburg ohne Auswertung auf eine negative Expression von IgD. Dabei ergab sich zum einen eine sehr deutliche Korrelation zwischen der Auswertung nach  $CD27^+IgM^-$  und  $CD27^+IgM^-IgD^-$  B-Zellen ( $r=0,969$ ,  $p<0,01$ ; Abbildung 6) und zum anderen eine identische Gruppenzuordnung.



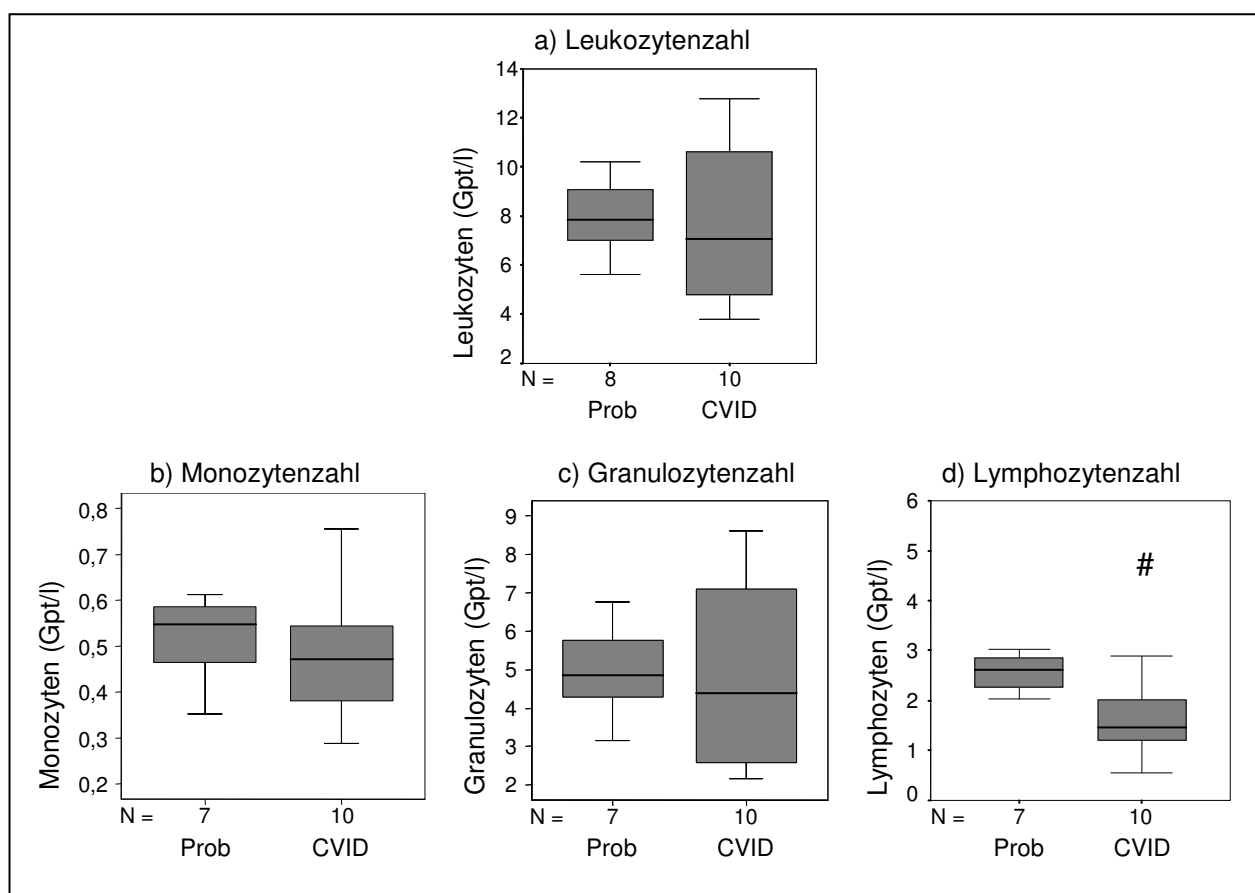
**Abb. 6:** Bei der direkten Gegenüberstellung der prozentualen Anteile der klassengeswitchten Memory-B-Zellen ohne IgD-Expression ( $CD27^+IgM^-IgD^-$  in % PBMC, X-Achse) und denen ohne Auswertung auf IgD-Negativität ( $CD27^+IgM^-$  in % PBMC, Y-Achse) zeigte sich nahezu eine Gerade mit der Funktion  $x = y$  mit dem Anstieg 1.

## 4.1.2 Immunphänotypisierung in Vollblut

### 4.1.2.1 Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen, T-Zell-Aktivierungsmarker

Die Ergebnisse der Immunphänotypisierung von Vollblut der CVID-Patienten wurden mit denen der Studien-Probanden verglichen (Ausnahme:  $CD4^+$  RTE und  $T_{REG}$ , siehe entsprechender Methodenteil).

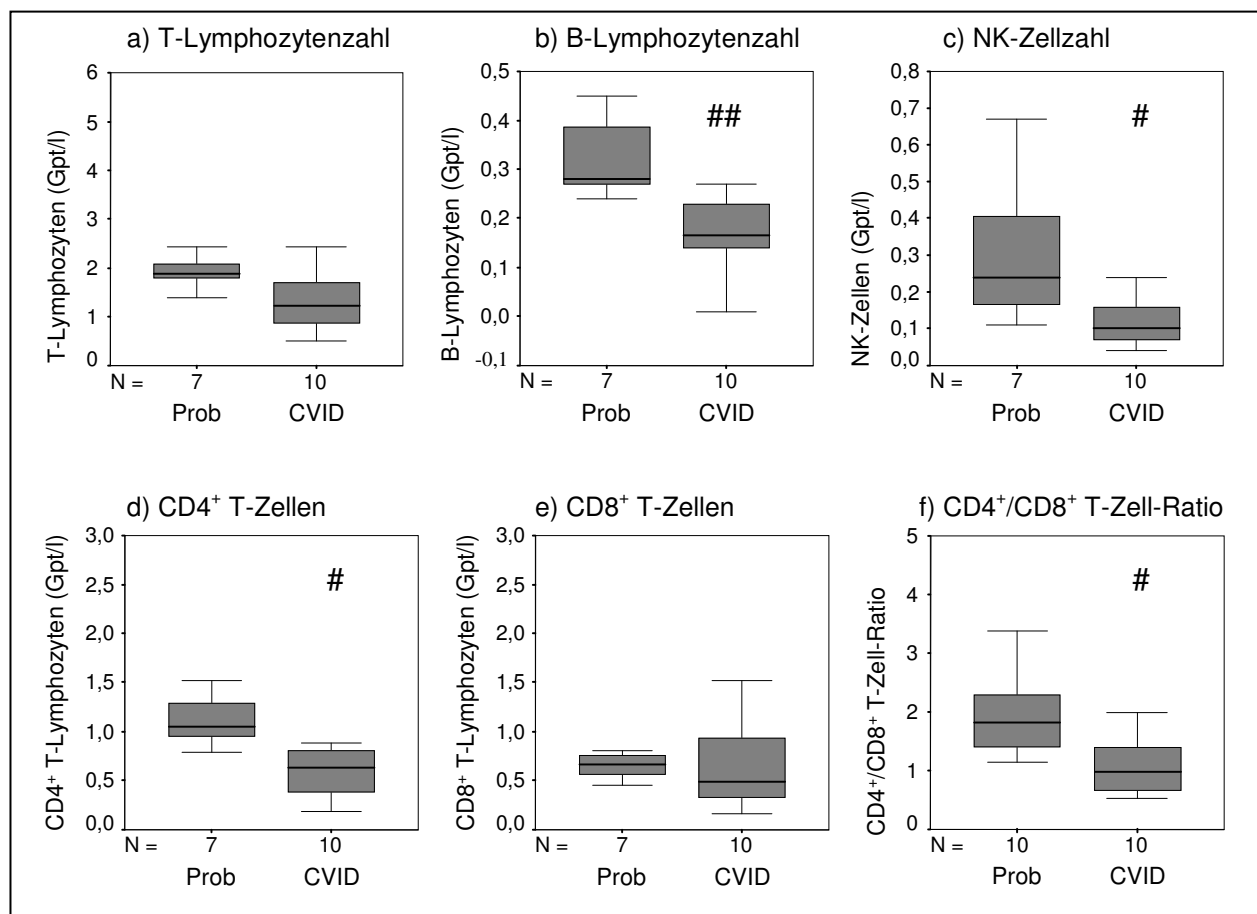
Beim Vergleich der Leukozytensubpopulationen ergab sich zwischen den Patienten und den Studien-Probanden mit Ausnahme der Lymphozytenzahl kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 7).



**Abb. 7:** Die Leukozytenzahl (a) der CVID-Patienten war nicht signifikant unterschiedlich zu der gesunder Probanden, ebenso verhielten sich die Monozyten- (b) und die Granulozytenzahl (c). Dagegen war die Lymphozytenzahl bei den CVID-Patienten signifikant vermindert (d) (#:  $p < 0,05$ ).

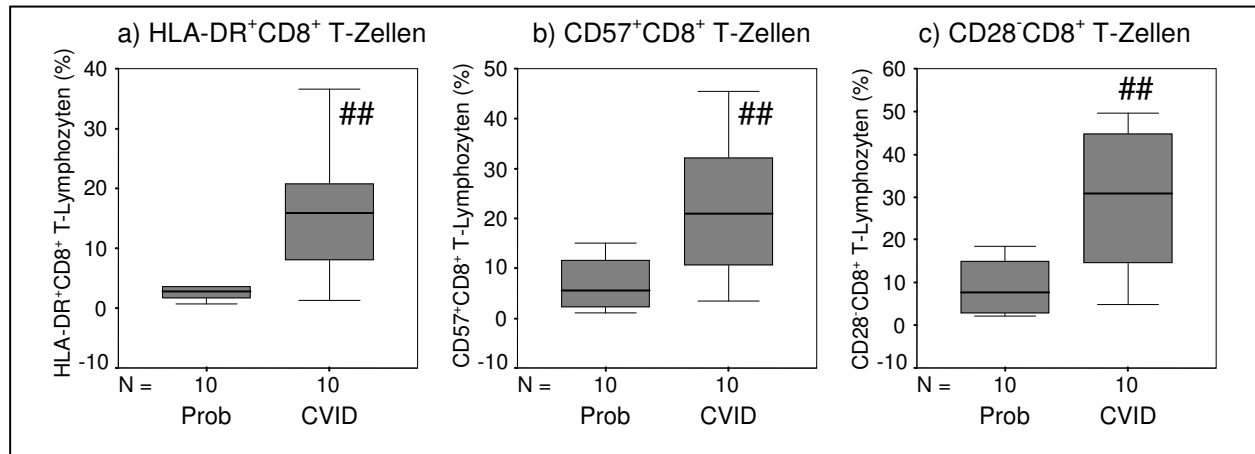
Die drei Lymphozytensubpopulationen (T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen) waren bei den CVID-Patienten alle vermindert im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 87), signifikant jedoch nur die B-Zellpopulation ( $p < 0,01$ ; Abb. 87b) und die NK-Zell-Population ( $p < 0,05$ ; Abb. 8c).

Innerhalb der T-Zell-Subpopulationen zeigten die  $CD4^+$  T-Zellen eine signifikante Verminderung bei den CVID-Patienten ( $p < 0,05$ ; 8d). Die  $CD8^+$  T-Zellen waren in den CVID-Patienten nicht signifikant vermindert (Abb. 8e). Die  $CD4^+/CD8^+$  T-Zell-Ratio war signifikant verringert ( $p < 0,05$ ; Abb. 8f).



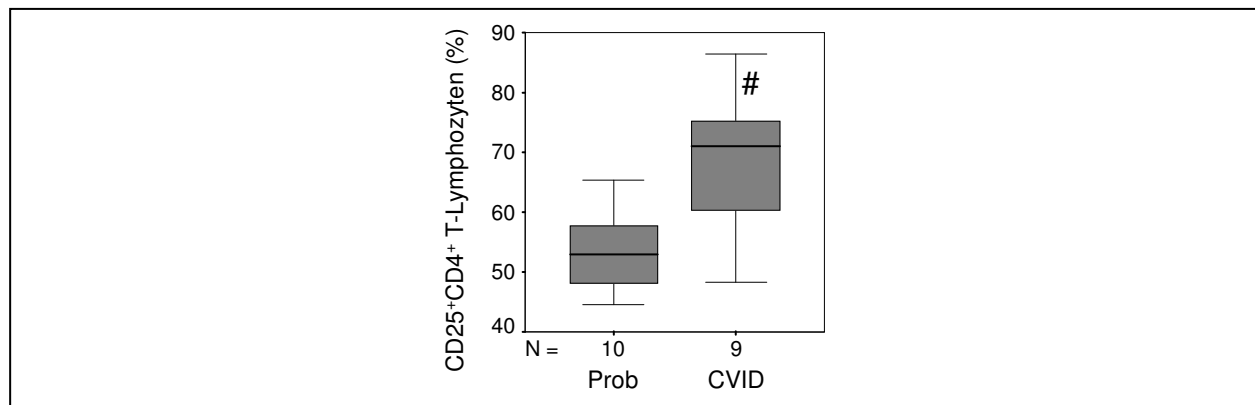
**Abb. 8:** Bei der Untersuchung der Lymphozytenpopulationen zeigte sich (a) eine nicht signifikante Verringerung der T-Lymphozytenzahl bei den CVID-Patienten. Die Anzahl der B-Zellen war signifikant vermindert (b), ebenso wie die NK-Zellzahl (c). Die tendenziell verringerte T-Zellzahl war durch eine signifikant niedrigere  $CD4^+$  T-Zellzahl bedingt (d), wogegen die  $CD8^+$  T-Zellzahl nicht signifikant vermindert war (e). Dementsprechend war die  $CD4^+/CD8^+$  T-Zell-Ratio signifikant verringert (f) (#:  $p < 0,05$ ; ##:  $p < 0,01$ ).

Innerhalb der CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich bei den Patienten eine signifikante relative Erhöhung von akut aktivierten Zellen (HLA-DR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, p<0,01; Abbildung 9a) und chronisch aktivierten Zellen (CD57<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, p<0,01, Abb. 9b; CD28<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, p<0,01, 9c).



**Abb. 9:** Die HLA-DR-Expression der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (akut aktivierte zytotoxische T-Zellen) war bei den Patienten mit CVID signifikant erhöht (a), ebenso wie der Anteil an chronisch aktivierten zytotoxischen Zellen (b, c) (##: p<0,01).

Der Anteil der aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ohne CD25<sup>+++</sup>CD4<sup>+</sup>) war bei den CVID-Patienten ebenfalls signifikant erhöht (p<0,05; Abbildung 10).

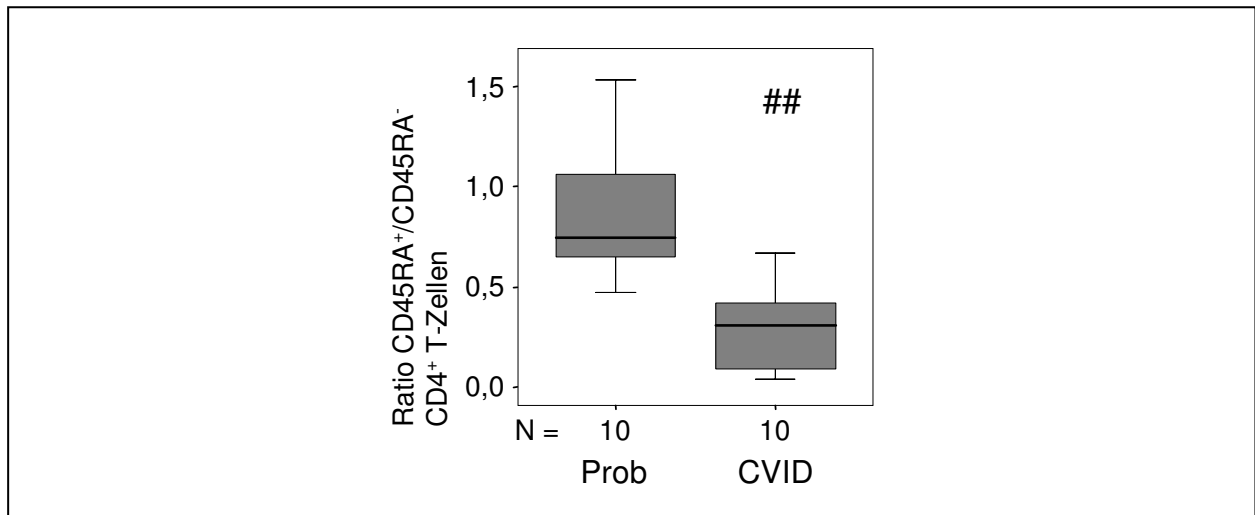


**Abb. 10:** Der Anteil aktivierter CD4<sup>+</sup> T Zellen war bei den CVID-Patienten signifikant erhöht (#: p<0,05).

Die HLA-DR-Expression auf Monozyten war bei den CVID-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe im Median ohne Signifikanz leicht erhöht, wies jedoch eine äußerst große Streubreite auf. (CVID-Patienten: Median 36414 Antibody per cell (ABC) / Minimalwert - Maximalwert 14321.33 - 73331.33, Kontrollgruppe: Median 30095.8 / Minimalwert - Maximalwert 23108.4 - 51715.04).

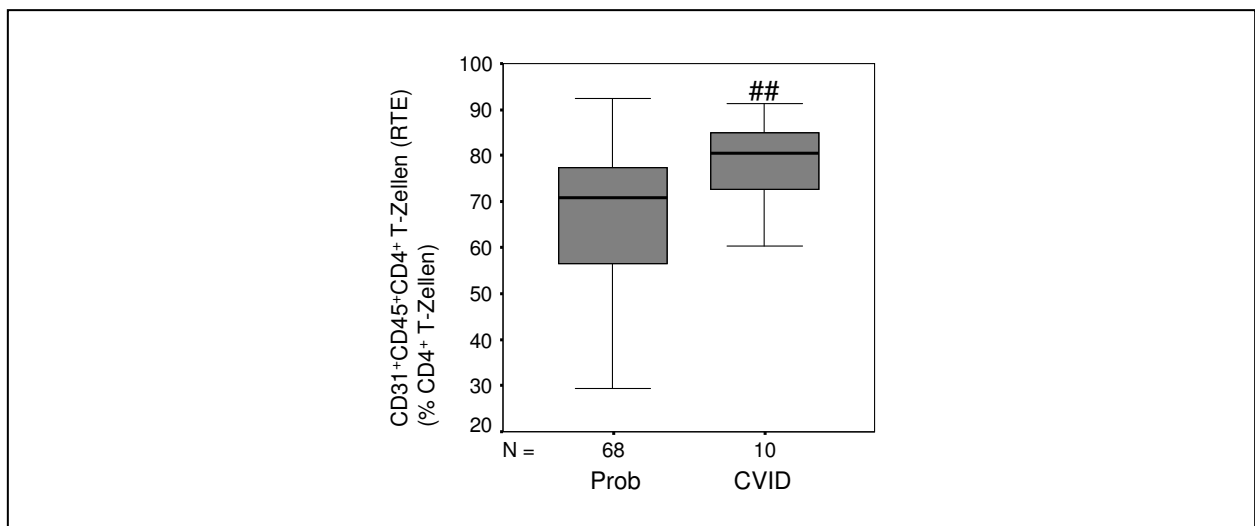
#### 4.1.2.2 CD4<sup>+</sup> RTE

Bei der Messung des Verhältnisses von CD4<sup>+</sup> Memory-T-Zellen (CD45RA<sup>-</sup>) zu naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen (CD45RA<sup>+</sup>) zeigte sich bei den COVID-Patienten ein stark signifikanter Unterschied zu den Probanden (siehe Abbildung 11).



**Abb. 11:** Deutlich signifikante Verminderung der Ratio naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen (CD45RA<sup>+</sup>) zu CD4<sup>+</sup> Memory-T-Zellen (CD45RA<sup>-</sup>) bei den COVID-Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden (p<0,01) (##: p<0,01).

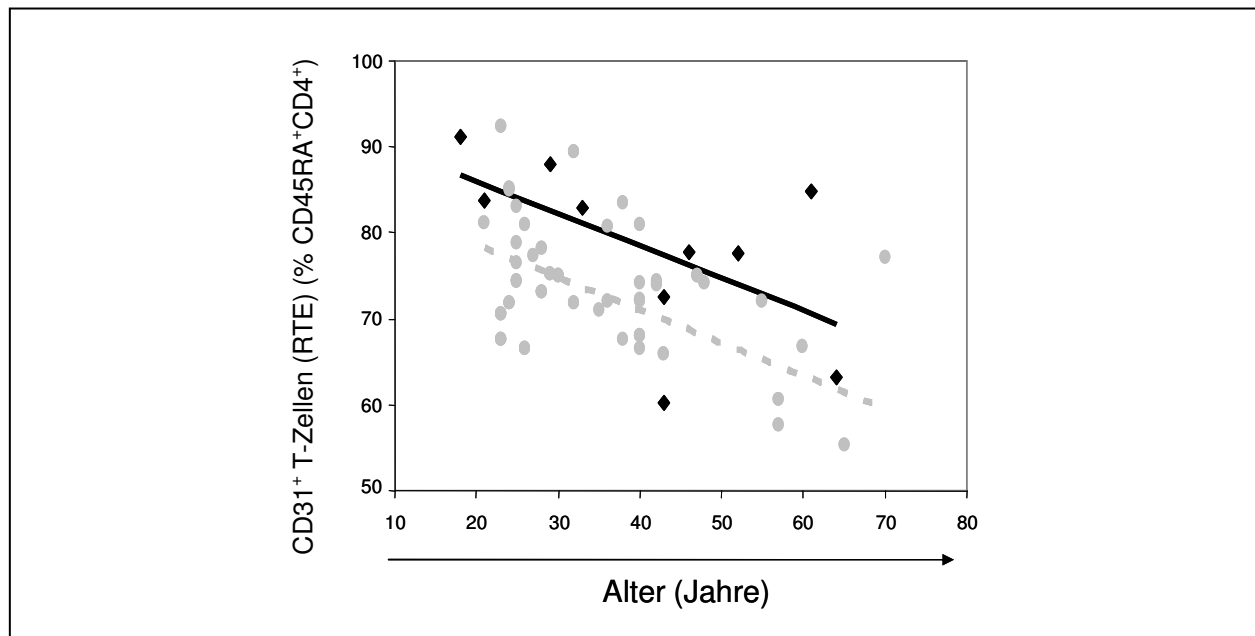
Beim Vergleich der relativen CD4<sup>+</sup> RTE-Anteile in Relation zu naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich bei den COVID-Patienten eine signifikante Erhöhung gegenüber der gesunden altersgepaarten Vergleichsgruppe (Abbildung 12).



**Abb. 12:** Die Bestimmung des relativen Anteils der peripheren CD31<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen (CD4<sup>+</sup> RTE T-Zellen) bei den 10 COVID Patienten und 68 gesunden Probanden zeigte einen signifikant höheren Anteil von CD4<sup>+</sup> RTE bei den COVID-Patienten (##: p<0,01).



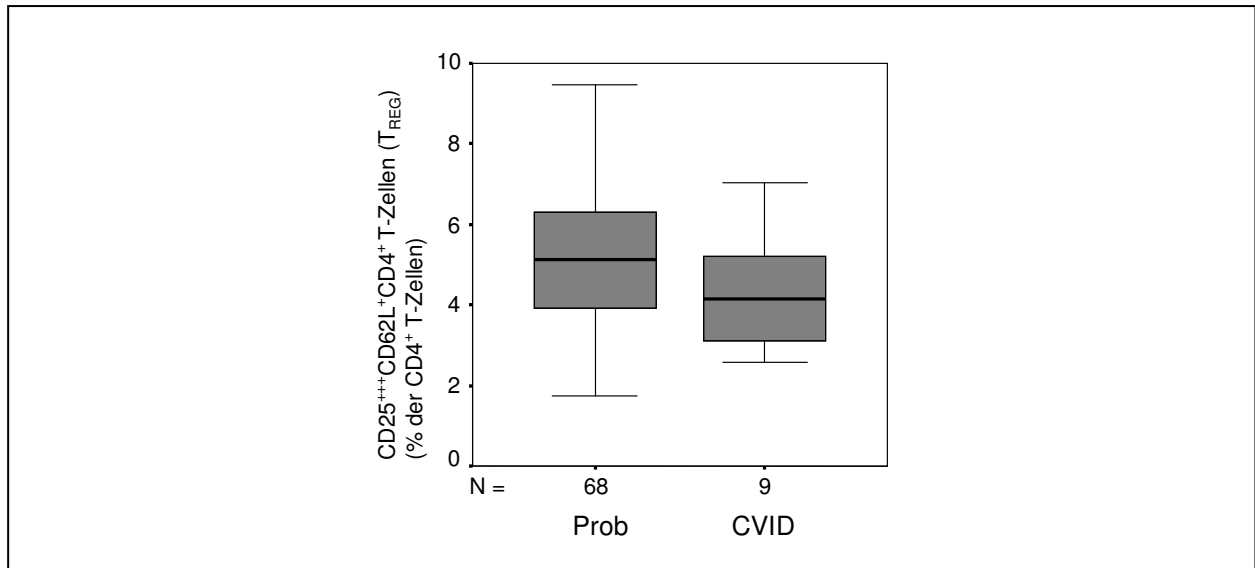
Betrachtete man die Korrelation zwischen Alter und  $CD4^+$  RTE-Frequenzen, zeigte sich bei den gesunden Kontrollen wie beschrieben eine signifikant negative Korrelation, bei den CVID-Patienten jedoch nicht, obgleich die Tendenz ähnlich war (Abb. 13).



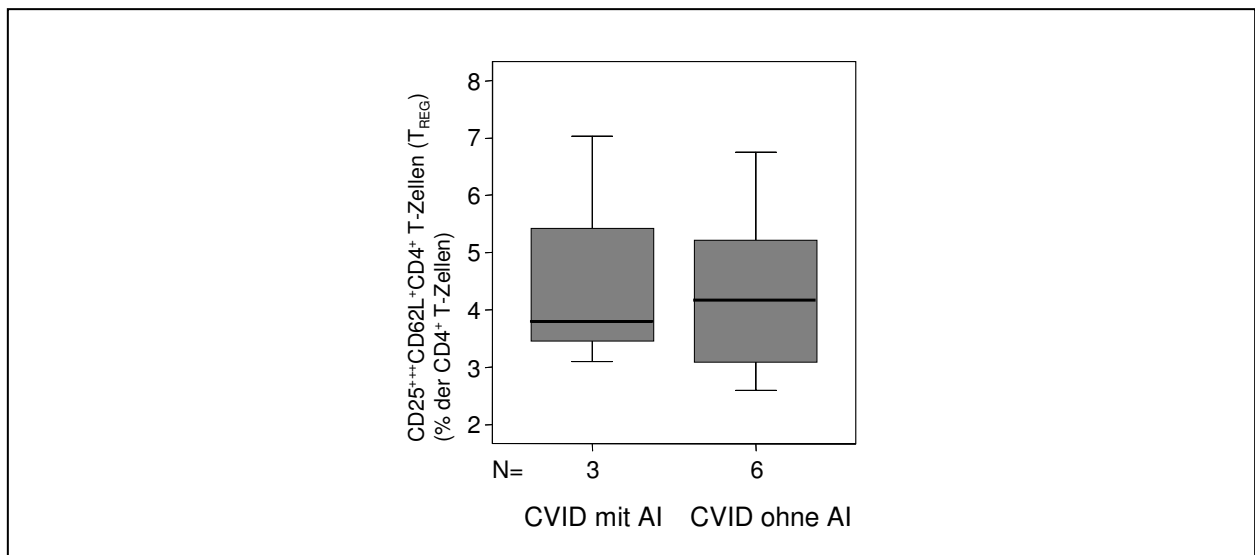
**Abb. 13:** Die mit dem Alter auftretende Verminderung der  $CD4^+$  RTE-Population war bei CVID-Patienten (schwarze Rhomben) im Vergleich zu den gesunden Probanden (hellgraue Kreise) nicht signifikant (CVID-Patienten  $r = -0.553$ ,  $p = 0.097$ ; Kontrollgruppe:  $r = -0.501$ ,  $p < 0.05$ ).

#### 4.1.2.3 regulatorische $CD4^+$ T-Zellen ( $T_{REG}$ )

Beim Vergleich unserer 10 CVID-Patienten mit den altersgepaarten gesunden Probanden zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abbildung 14). Beim Vergleich der relativen  $CD4^+$   $T_{REG}$  zwischen den Patienten mit und ohne Autoimmunerkrankung zeigte sich ebenfalls keine Signifikanz (Abb. 15).



**Abb. 14:** Beim Vergleich der relativen Anteile von natürlichen regulatorischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen CVID-Patienten und gesunden Probanden.



**Abb. 15:** Beim Vergleich der relativen CD4<sup>+</sup> T<sub>REG</sub> Anteile der CVID-Patienten mit Autoimmunerkrankung (AI) und ohne Autoimmunerkrankung zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

## 4.2 slgAD-Patienten

### 4.2.1 B-Zell-Phänotypisierung

Die Untersuchung der slgAD-Patienten nach Bryant und nach der Freiburger Klassifizierung zeigte bei slgAD-1 eine normale IgM-Sekretion nach *in-vitro*-Stimulation mit SAC/IL-2. Die IgG-Synthese war jedoch grenzwertig eingeschränkt, so dass wir Patient slgAD-1 der Gruppe B zuordnen konnten. Die Ergebnisse für die Freiburger Klassifizierung erfüllten mit einem Anteil von >0,4 % klassen-gewitchter Memory-B-Zellen und 6,82 % unreifer B-Zellen (CD21<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) die Kriterien für Gruppe II.

Patient slgAD-2 dagegen erfüllte die Kriterien für Gruppe A nach Bryant (IgM- und IgG-Sekretion vermindert) und für Gruppe Ib nach Freiburg (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>: 0,17 % der PBMC; CD21<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>: 21,66% der B-Zellen).

Die oben beschriebenen Daten sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

**Tabelle 6:** Übersicht über die nach Bryant und Freiburg klassifizierten slgAD-Patienten. Im Vergleich zur Norm gesunder Probanden erniedrigte (Ig-Synthese, CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> B-Zellen) bzw. erhöhte Messwerte (unreife B-Zellen) sind fett gedruckt.

Patienten	Splenomegalie	Autoimmunphänomene	B-Zell-Anteile					<i>in-vitro</i> -Ig-Synthese		Bryant Klassifikation	Freiburg Klassifikation
			in % PBMC				in % B-Zellen	IgM (ng/ml) (Stimulation-Kontrolle)	IgG (ng/ml) (Stimulation-Kontrolle)		
			naive B-Zellen (CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> )	nicht-klassengeswitchte Memory-B-Zellen (CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> )	IgM only Memory-B-Zellen (CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> )	Klassengeswitchte Memory-B-Zellen (CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> )	unreife B-Zellen (CD21 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup> )				
slgAD-1	-	-	6,91	2,57	0,31	1,18	6,82	1387,4	<b>949,5 (↓)</b>	B	(II)
slgAD-2	-	-	8,17	1,05	0,14	<b>0,17 ↓</b>	<b>21,66 ↑</b>	<b>773,2 ↓</b>	<b>113,68 ↓</b>	A	Ia
<i>Norm</i>						>0,4	<20	>1000	>1000		

#### 4.2.2 Immunphänotypisierung in Vollblut

Patient slgAD-1 zeigte beim Vergleich der Werte der Immunphänotypisierung keine signifikanten Abweichungen von den gesunden Probanden. Lediglich bei der absoluten NK-Zellzahl war eine Verringerung um eine Standardabweichung zu beobachten. Die restlichen Populationen waren unauffällig.

Deutliche Abweichungen dagegen konnte man bei einigen Parametern von Patient slgAD-2 feststellen. So war die absolute Lymphozytenzahl 2 SD unter dem Mittelwert der Vergleichsgruppe. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei den Lymphozytensubpopulationen. So waren die absoluten T-Lymphozytenzahlen und die absoluten B-Lymphozytenzahlen ebenfalls um mehr als 2 SD vermindert. Eine signifikante Verringerung zeigte sich zudem bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die absolute NK-Zellzahl war bei Patient slgAD-2 um eine Standardabweichung vermindert.

Die Populationen der HLA-DR<sup>+</sup> und CD28<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T-Zellen konnten bei Patient slgAD-2 nicht bestimmt werden. Der Marker für chronische T-Zell-Aktivität (CD57) unterschied sich nicht von dem Wert gesunder Probanden.

Beim Vergleich der aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) zeigte sich eine Erhöhung der Population um mehr als 2 SD verglichen mit dem Mittelwert der gesunden Kontrollgruppe.

Die CD4<sup>+</sup> RTE-Frequenz war um 2 SD vermindert. Die CD4<sup>+</sup> T<sub>REG</sub>-Frequenzen war unauffällig.

Alle Werte der Immunphänotypisierung der slgAD-Patienten sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

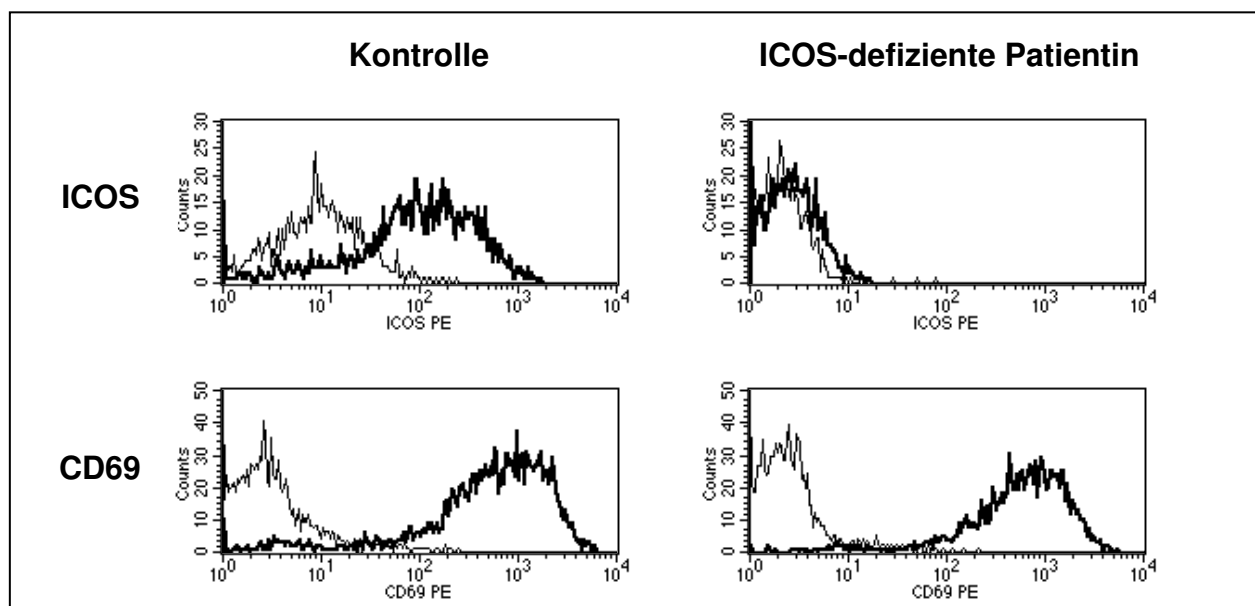
**Tabelle 7:** Ergebnisse der Immunphänotypisierung der slgAD-Patienten. Die **hervorgehobenen** Werte weichen um mehr als 2 SD vom jeweiligen Mittelwert der Kontrollgruppe ab.

Zellpopulation	Patient slgAD-1	Patient slgAD-2	Mittelwert +/- 2 SD des Mittelwertes der Kontrollgruppe
Leukozyten (Gpt/l)	9,7	5,3	8,11 ± 3,082
Monozyten (Gpt/l)	0,72	0,39	0,52 ± 0,195
Granulozyten (Gpt/l)	6,8	4,6	4,98 ± 2,41
Lymphozyten (Gpt/l)	2,11	<b>1,06 ↓</b>	2,56 ± 0,755
T-Lymphozyten (Gpt/l)	1,77	<b>0,86 ↓</b>	1,93 ± 0,672
B-Lymphozyten (Gpt/l)	0,23	<b>0,11 ↓</b>	0,33 ± 0,162
NK-Zellen (Gpt/l)	0,10	0,09	0,31 ± 0,395
CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten (Gpt/l)	1,18	0,52	1,17 ± 0,783
CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten (Gpt/l)	0,55	<b>0,30 ↓</b>	0,65 ± 0,266
CD4 <sup>+</sup> /8 <sup>+</sup> T-Zell-Ratio	2,16	1,73	2,10 ± 1,936
HLA-DR <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten (% der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen)	4,94	-	3,21 ± 4,924
CD57 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten (% der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen)	1,96	9,66	7,15 ± 10,953
CD28 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten (% der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen)	2,51	-	9,03 ± 12,541
CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten (% der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen)	49,76	<b>99,88 ↑</b>	54,12 ± 14,531
CD45RA <sup>+</sup> /CD45RA <sup>-</sup> Ratio (CD4 <sup>+</sup> T-Zellen)	1,52	0,44	0,88 ± 0,71
CD4 <sup>+</sup> RTE (CD31 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen) (% der CD45 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen)	50,11	27,25	66,56 ± 28,828
CD4 <sup>+</sup> T <sub>REG</sub> (CD25 <sup>+++</sup> CD62 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ) (% der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen)	7,33	5,14	5,18 ± 3,657

### 4.3 Etablierung eines Vollbluttestes zum Nachweis der ICOS-Expression

Mit dem Ziel, einen einfachen Vollbluttest zum Nachweis der ICOS-Expression zu entwickeln und in Anlehnung an den Vollbluttest zum Nachweis eines CD40L-Defekts [97] testeten wir die ICOS-Expression im Vollblut von 8 gesunden Probanden nach Stimulation mit PMA und Ionomycin. Nach 20 Stunden Stimulation waren etwa 80% der CD8<sup>-</sup> T-Zellen ICOS positiv (n=8, Mean  $\pm$  2 SD (%): 86,7  $\pm$  14,04). Auch nach 4 Stunden war eine deutlich messbare Expression vorhanden, aber im Vergleich zu 20 Stunden fiel sie deutlich schwächer aus (n=2, 42,6%, 48%). CD69 als Stimulationskontrolle ließ sich nach 20 Stunden Stimulation auf fast allen T-Zellen nachweisen (n=8, Mean  $\pm$  2 SD (%): 93,0  $\pm$  14,6).

Bei einer Patientin mit molekularbiologisch gesichertem homozygoten ICOS-Defekt (die Patientin wurde in [59] als Patient 1 beschrieben) fand sich eine deutliche Expression von CD69 auf fast allen T-Zellen, eine ICOS-Expression ließ sich jedoch nicht nachweisen (CD69<sup>+</sup> T-Zellen (%): 98,21, ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> T-Zellen (%): 0,95) (Abbildung 16).



**Abb. 16:** Testung der ICOS Expression im Vollblut. Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin (100 ng/ml bzw. 2  $\mu$ g/ml) bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> für 20 Stunden, Färbung mit anti-ICOS-PE, anti-CD3-APC und anti-CD8-FITC und Lyse der Erythrozyten zeigten die Zellen eines repräsentativen gesunden Probanden (Kontrolle) bei der flowzytometrischen Messung einen deutlichen Anstieg von ICOS auf CD8<sup>-</sup> T-Zellen. CD69 wurde als Stimulationskontrolle mitgeführt. Zellen einer molekularbiologisch gesicherten homozygoten ICOS-defekten Patientin nutzten wir zur Testvalidierung (ICOS-defiziente Patientin). Dünne Linien: CD8<sup>-</sup> T-Zellen ohne Stimulans, dicke Linien: mit PMA/Ionomycin stimulierte CD8<sup>-</sup> T-Zellen.

## 5 DISKUSSION

Am Institut für Medizinische Immunologie der Charité Campus Mitte werden seit Jahren im Rahmen einer ambulanten Diagnostik-Sprechstunde Patienten mit Verdacht auf immunologische Störungen betreut. Im Zuge einer Fokussierung dieser Sprechstunde auf Immundefekte im Erwachsenenalter sollten mit Hilfe dieser Studie folgende Fragen zur Verbesserung und Vereinfachung der ambulanten Diagnostik bei erwachsenen Patienten mit CVID bzw. sIgAD untersucht werden:

1. Ist die Aussage, dass die Freiburger Klassifikation der Klassifikation nach Bryant entspricht, zu bestätigen?

Die Aussage konnte bestätigt werden. Unterschiede gab es hinsichtlich des Zusammenhangs von Gruppenzugehörigkeit und Autoimmunerkrankungen bzw. Splenomegalie. Weitere Studien zur klinischen Anwendung müssen folgen.

2. Ist die Freiburger Klassifizierung zur routinemäßigen Diagnostik bei Verdacht auf CVID noch zu vereinfachen?

Durch Reduzierung der Vier-Farben-Fluoreszenz auf eine Dreifachfärbung durch Verzicht auf den Oberflächenmarker IgD konnten die gleichen Ergebnisse gewonnen werden. Aufgrund unterschiedlicher gerätetechnischer Voraussetzungen in den verschiedenen Diagnostikzentren kann die Dreifachmarkierung eine breitere Anwendung finden.

3. Lassen sich bei der Immunphänotypisierung von Vollblut mittels neuer Marker wie CD4<sup>+</sup> RTE definiert über CD31 oder CD4<sup>+</sup> T<sub>REG</sub> definiert über CD25 in Kombination mit bekannten Markern weitergehende Aussagen zur Diagnostik bei CVID-Patienten machen?

Bei den CVID Patienten zeigte sich ein signifikant höherer Anteil von CD4<sup>+</sup> RTE bei verminderter CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl. Dieser Befund spricht gegen einen Thymusdefekt als Ursache der verminderten T-Zellzahl. Weitere Untersuchungen zur Validierung des CD31-Markers sind noch ausstehend.

CD4<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen waren bei unseren CVID-Patienten nicht vermindert. Bezüglich möglicher funktioneller Störungen von CD4<sup>+</sup> T<sub>REG</sub> als Ursache für die bei CVID erhöhte Inzidenz von Autoimmunphänomene laufen

derzeit weitere Untersuchungen am Institut für Medizinische Immunologie der Charité Campus Mitte.

4. Bieten die oben genannten Untersuchungen eine Hilfestellung bei der Differentialdiagnosen slgAD / CVID?

Patient slgAD-2 zeigte immunphänotypische Gemeinsamkeiten mit CVID-Patienten. Patient slgAD-1 war diesbezüglich relativ unauffällig. Diese Daten legen eine diagnostische Relevanz der untersuchten Marker in der Abgrenzung eines slgAD von einer CVID nahe, weitere Studien zur sicheren Beantwortung dieser Frage müssen folgen.

5. Etablierung eines einfachen und routinefähigen Vollblut-Tests zum Nachweis einer defekten ICOS-Expression.

Der Test konnte erfolgreich entwickelt werden. Er findet Anwendung in der CVID-Diagnostik am Institut für Medizinische Immunologie der Charité Campus Mitte.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse im Detail diskutiert werden.

### **5.1 Ist die Aussage, dass die Freiburger Klassifikation der Klassifikation nach Bryant entspricht, zu bestätigen?**

Der Vergleich von der Klassifizierung nach Bryant und Freiburger Klassifizierung konnte die Ergebnisse von Warnatz et al. [29] hinsichtlich der Gruppeneinteilungen bestätigen.

Warnatz et al. [29] konnten in ihrer Studie zudem einen Zusammenhang zwischen Autoimmunphänomenen und der Gruppenzugehörigkeit der CVID-Patienten aufweisen. So hatten 100% (10/10) der Patienten in Gruppe Ia eine Splenomegalie und 60% von ihnen eine Autoimmunerkrankung. Bei den Patienten in Gruppe Ib waren es lediglich 42% mit Splenomegalie, aber auch 64% mit Autoimmunerkrankungen. Bei Gruppe II waren es 17% bzw. 42%. Unsere Untersuchungen konnten die relativ deutlichen Unterschiede vor allem hinsichtlich der Splenomegalie zwischen den Gruppen nicht bestätigen, was der kleineren Patientenzahlen pro Gruppe geschuldet sein kann.

Da in der Studie von Warnatz et al. die Patienten in Gruppe Ia und Ib nach der Freiburger Klassifikation keine bzw. eine abgeschwächte Impfantwort aufwiesen [29] und eine negative bzw. verringerte Impfreaktion eines der Diagnostik-Kriterien für CVID ist, würde die Messung des Anteils an klassengeswitchten Memory-B-Zellen die



diagnostische Testung der Impfantwort unter Umständen vermeidbar machen. Dahingehend sind jedoch ebenfalls umfassendere Studien mit einem größeren Patientenkollektiv notwendig. Unsere Patienten wurden vor Beginn der Immunglobulinsubstitution noch nicht auf eine Impfantwort getestet, so dass wir hinsichtlich dieser Hypothese keine Aussage machen können.

Neben der Beurteilung des Anteils an klassengeswitchten  $\text{IgM}^-$  Memory-B-Zellen ( $\text{CD27}^+\text{IgM}^-$ ) scheint auch die Beurteilung der anderen, durch die Freiburger B-Zell-Typisierung erfassten B-Zell-Subpopulationen von klinischer Relevanz zu sein. So konnte bei CVID-Patienten mit rezidivierenden Pneumonien ein Mangel an nicht-klassengeswitchten  $\text{IgM}^+$  Memory-B-Zellen ( $\text{CD27}^+\text{IgM}^+$ ) festgestellt werden, CVID-Patienten mit normalen  $\text{IgM}^+$  Memory-B-Zellen dagegen waren vor bakteriellen Pneumonien geschützt [98]. Eine retrospektive Analyse unseres Patientenkollektivs hinsichtlich dieses Zusammenhangs war aufgrund fehlender entsprechender anamnestischer Angaben nicht möglich.

## **5.2 Ist die Freiburger Klassifizierung zur routinemäßigen Diagnostik bei Verdacht auf CVID noch zu vereinfachen?**

Eine Auswertung der B-Zell-Subpopulationen unter Verzicht auf die IgD-Färbung konnte hinsichtlich der Freiburger Klassifikation die Gruppenzugehörigkeit bestätigen. Damit kann die Freiburger Klassifikation mit 3 anstelle von 4 Oberflächenmarkierungen vorgenommen werden kann und ist somit erstens kostengünstiger und kann zweitens eine breitere Anwendung finden (im Gegensatz zu 4-Farben-Geräten sind 3-Farben-FACS-Geräte in vielen Routine-Laboren verbreitet). Außerdem eröffnen sich für Forschungsfragen freie Fluoreszenz-Messkanäle.

Zur weiteren Vereinfachung der B-Zelltypisierung nach Freiburg scheint die Färbung in Vollblut zu ermöglichen. So konnte Ferry et al. [99] in einer Studie vergleichbare Ergebnisse zwischen PBMCs und Vollblut berichten. Bestätigende Untersuchungen stehen derzeit noch aus.

Die B-Zell-Typisierung nach Freiburg in PBMC ohne IgD-Färbung wurde nach Abschluss der Studie in die Routine-Diagnostik des Instituts für Medizinische Immunologie CCM aufgenommen.

Zusammenfassend sind zur Untersuchung der Freiburger B-Zelltypisierung in COVID-Patienten in unserer Studie folgende Aussagen zu treffen:

- Bestätigung der Korrelation zwischen der Freiburger Klassifikation und der Klassifikation nach Bryant.
- Die Freiburger Klassifikation ist durch den Verzicht auf die IgD-Färbung bei gleichem Ergebnis zu vereinfachen.
- Die Korrelation der Gruppenzugehörigkeit mit Splenomegalie bzw. Autoimmunerkrankungen war – möglicherweise angesichts unseres kleinen Patientenkollektivs – nicht zu bestätigen.

Durch weitergehende Untersuchungen an größeren Patientengruppen könnte es möglich werden, dass

- die B-Zelltypisierung in Vollblut und nicht wie bisher in PBMCs erfolgen kann,
- die diagnostische Impfung als notwendiges COVID-Kriterium ersetzbar wird,
- das Auftreten von Autoimmunerkrankungen vorhersagbar wird.

Zudem könnte die methodisch relativ einfache Bestimmung des Anteils an peripheren klassengeswitchten und nicht-klassengeswitchten Memory-B-Zellen zukünftig folgende klinisch relevante Fragen beantworten:

- Kann die frühzeitige Bestimmung eines verminderten nicht-klassengeswitchten IgM<sup>+</sup> B-Zell-Memory-Pools bei COVID-Patienten Aussagen über die erhöhte Wahrscheinlichkeit einer Pneumonie machen und kann diese durch entsprechend frühzeitige Antibiosen verhindert werden?

### **5.3 Lassen sich bei der Immunphänotypisierung von Vollblut mittels neuer Marker wie CD4<sup>+</sup> RTE definiert über CD31 oder CD4<sup>+</sup> T<sub>REG</sub> definiert über CD25 in Kombination mit bekannten Markern weitergehende Aussagen zur Diagnostik bei COVID-Patienten machen?**

Der Vergleich der Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen bestätigte z.T. bereits publizierte Unterschiede zwischen Patienten und Probanden. So waren die absoluten Lymphozytenzahlen bei COVID-Patienten signifikant verringert [100]. Ähnlich verhielt es sich bei der B-Zellpopulation [101]. Entgegen anderen Beobachtungen hinsichtlich einer signifikanten Verminderung der T-Lymphozyten [102] konnten wir bei den T-Zellen nur

eine tendenzielle Abnahme zeigen, die jedoch hauptsächlich auf der signifikant verringerten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozytenzahl beruhte. Farrant et al. [101] kamen zu gleichen Ergebnissen. Folge der starken Verminderung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist eine verminderte CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellratio. Andere Studien zeigten allerdings, dass auch eine erhöhte CD8<sup>+</sup> T-Zellzahl die Ratio entsprechend beeinflussen kann [102-104]. Unsere Beobachtung der signifikanten NK-Zellzahl-Verringerung bei den Patienten ist ebenfalls durch vorhergehende Studien gezeigt und bestätigt somit bereits vorhandene Ergebnisse [100,105]. Ebenso bestätigten wir entsprechende Unterschiede bei HLA-DR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen [104], CD57<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen [103-105], CD28<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen [106,107] und CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen [103].

Die erhöhten Anteile an akut und chronisch aktivierten T-Lymphozyten könnten Folge einer Antigenpersistenz im Sinne einer latenten Infektion sein, die trotz z.T. bereits jahrelanger IVIG/SCIG – möglicherweise aufgrund T-zellulärer Defekte – nicht beseitigt werden kann. Ein weiterer Grund könnte die Stimulanz des T-zellulären Systems durch Autoantigene sein (50% der CVID-Patienten wiesen Autoimmunphänome auf).

Für die verminderten CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl könnte, wie durch einige Arbeitsgruppen hypothetisiert, eine gestörte Thymusfunktion verantwortlich sein [63,67]. Zeichen dafür war die verstärkte Abnahme von peripheren RTE. Als Marker für die RTE Identifikation wurden in diesen Arbeiten „T cell excision circles“ (sjTREC) verwendet (siehe 1.3.1.2.2). Die Messung der CD4<sup>+</sup> RTE mittels CD31 war in CVID-Patienten bisher nicht erfolgt. Der Anteil an CD4<sup>+</sup> RTE gemessen über CD31 war signifikant höher in der CVID-Gruppe. Interpretiert man einen erhöhten relativen Anteil an CD4<sup>+</sup> RTE als das Ergebnis einer gesteigerten Produktion von CD4<sup>+</sup> RTE im Thymus, spricht dies zurzeit gegen einen gestörten Thymusdefekt als Ursache der T-Lymphopenie. Die tendenziell erhöhten CD4<sup>+</sup> RTE könnten dagegen sogar als (ineffizienter?) Kompensationsversuch der verminderten peripheren T-Zellzahl betrachtet werden. Die periphere T-Lymphopenie kann auch durch einen gesteigerten peripheren Verbrauch verursacht sein. In der Regel zieht ein gesteigerter peripherer Verbrauch von T-Zellen eine sogenannte „lymphopenia-driven proliferation (LDP)“ von Memory-T-Zellen nach sich [108]. Passend dazu zeigte sich eine entsprechende Erhöhung des Anteils an Memory-CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen über die CD45RA-Expression (wobei aber zu berücksichtigen ist, dass diese Erhöhung durch einen gesteigerten Antigen-Kontakt mit verursacht worden sein kann).

Zur weiteren Validierung der RTE-Messung mit Hilfe von CD31 läuft derzeit eine Evaluierung dieses Markers in thymektomierten Patienten am Institut für Medizinische Immunologie der Charité Campus Mitte (CCM) in Zusammenarbeit mit der Chirurgischen Klinik CCM mit der Hypothese, dass thymektomierte Patienten einen deutlich verminderten Anteil an CD31<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> RTE T-Zellen aufweisen.

Die Bedeutung von regulatorischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen für das Entstehen von Autoimmunerkrankungen (siehe 1.3.1.2.3) und das gehäufte Auftreten von Autoimmunphänomenen bei COVID-Patienten ließen die Frage nach einem verminderten Anteil und/oder einer verminderten Funktion von regulatorischen T-Zellen bei COVID-Patienten aufkommen.

Interessanterweise fand sich in den COVID-Patienten kein verminderter Anteil an regulatorischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen über die Expression von CD25, wie es bei Patienten mit Autoimmunphänomen zu erwarten wäre (Hypothese: fehlende Kontrolle autoreaktiver T-Zellen durch verminderten Anteil regulatorischer T-Zellen). Unsere Ergebnisse schließen jedoch eine funktionelle Beeinträchtigung der regulatorischen T-Zellen in den COVID-Patienten nicht aus bzw. müssen an einem größeren Patientenkollektiv bestätigt werden.

Ein anderer, neuerer Marker für T<sub>REG</sub> ist der Transkriptionsfaktor FoxP3 [109]. Der Nachweis von FoxP3 kann mit Real Time-PCR erfolgen [110] oder durch intrazelluläre Protein-Färbung mittels monoklonaler Antikörper [111]. Jüngere Untersuchungen zeigen die Bedeutung von FoxP3 innerhalb der T<sub>REG</sub>-Entwicklung und für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen [77]. Bedenkt man die Häufung von Autoimmunphänomenen bei COVID-Patienten, stellt sich die Frage, inwiefern auch diese Patienten einen FoxP3-Defekt aufweisen könnten. Die Etablierung des FoxP3-Nachweises bzw. von funktionellen Assays zur Beurteilung der T-suppressorischen Aktivität von PBMC gesunder Probanden und Patienten ist inzwischen am Institut für Medizinische Immunologie der Charité Campus Mitte erfolgt. Während meiner Tätigkeit stand der Test noch nicht zur Verfügung.

#### **5.4 Bieten die oben genannten Untersuchungen eine Hilfestellung bei der Differentialdiagnose sIgAD / CVID?**

Hinsichtlich der B-Typisierung konnte Patient sIgAD-1 wie auch gesunde Probanden der Gruppe II nach der Freiburger Klassifikation zugeordnet werden.

Bei Patient sIgAD-2 dagegen zeigte sich neben der teilweise deutlichen Übereinstimmung mit Leukozytenzahlveränderungen der CVID-Patienten (siehe unten) auch eine Gruppenzuteilung in Ia nach Freiburg. Das bedeutet, immunphänotypisch kann es sich bei diesem Patienten auch um eine CVID handeln bzw. es liegt unter Umständen die gleiche Ursache wie bei CVID vor. Nach den ESID Kriterien ist zur Abklärung der Differentialdiagnose von CVID und sIgAD die Impfreaktion zu beurteilen. Da der Patient sIgAD-2 seit Jahren mit Immunglobulinen substituiert wird, ist dieses Kriterium nicht mehr beurteilbar, da es Hinweise auf eine Langzeitpersistenz von substituierten Antikörpern auch nach Absetzen der Substitution gibt.

So finden sich bei nicht-infizierten Kindern HIV-positiver Mütter noch jahrelang HIV-Antikörper [mündlich: Prof. U. Wahn, Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie, Charité, CVK).

Hinsichtlich der Ergebnisse der Immunphänotypisierungen der sIgAD-Patienten zeigte sich, dass bei Patient sIgAD-1 die Immunphänotypisierung der Lymphozyten im Vergleich mit der gesunden Vergleichsgruppe unauffällig war.

Patient sIgAD-2 dagegen zeigte den CVID-Patienten vergleichbare Werte.

So fanden sich:

- signifikante Verminderungen um 2 Standardabweichungen bei den:
  - absoluten Lymphozyten,
  - absoluten T-Lymphozyten und
  - absoluten B-Lymphozyten,
- eine signifikante Erhöhung der
  - aktivierten Lymphozyten (CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>),
- sowie eine Abnahme um 1 Standardabweichung bei der
  - absoluten NK-Zellzahl.

Im Unterschied zu den CVID-Patienten und auch im Vergleich zur altersentsprechenden gesunden Vergleichsgruppe, war der relative CD4<sup>+</sup> RTE-Anteil jedoch deutlich

vermindert. Untersuchungen zur Thymusfunktion bei sIgAD-Patienten sind bisher jedoch nicht publiziert.

Der Anteil der T<sub>REG</sub>-Populationen war bei beiden sIgAD-Patienten im Vergleich zur altersentsprechenden gesunden Vergleichsgruppe unauffällig.

Weitere Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv sind jedoch notwendig, um sichere Aussagen zur diagnostischen Relevanz der untersuchten Marker für die differentialdiagnostische Abgrenzung eines sIgAD von einer CVID machen zu können.

### **5.5 Etablierung eines einfachen und routinefähigen Vollblut-Tests zum Nachweis einer defekten ICOS-Expression.**

Angesichts der Beobachtung, dass Patienten mit einem ICOS-Defekt an CVID erkranken können [59], erscheint eine entsprechende Screening-Diagnostik von CVID-Patienten sinnvoll. Als bisherige Screening-Methode findet sich in der Literatur die *in-vitro*-Stimulation von präparierten PBMC [59]. In Anlehnung an den CD40L-Nachweis in Vollblut [97] versuchten wir zur Vereinfachung des Screenings einen Nachweis von ICOS in Vollblut.

Mit einer Stimulation von PMA und Ionomycin über 20 Stunden kann eine fehlende ICOS-Expression festgestellt und eine PCR Analyse zur Diagnosesicherung veranlasst werden. Die einfache Kombination mit der Testung auf einen CD40L-Defekt ist möglich, da hier die gleichen Stimulanzen verwendet werden können.

Es muss jedoch beachtet werden, dass mit dieser Methode nur eine Nicht-Expression nachgewiesen werden kann. Eine funktionslose ICOS-Expression wird damit nicht erfasst. Eine funktionslose ICOS-Expression ist bisher noch nicht beschrieben, wohl aber finden sich Berichte über eine funktionslose CD40L-Expression [112,113].

Der kombinierte Expressions-Test (ICOS und CD40L) wurde nach Abschluss der Studie in die Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Immunologie CCM aufgenommen.

## 6 BIBLIOGRAPHIE

1. Silverstein A. **A history of immunology**. San Diego: Academic Press; 1989
2. Stettler A. **Ideas on infection and resistance. History of teachings on immunity until the time of Louis Pasteur**. Gesnerus 1972; **29**:255-273
3. Jenner E. **An enquiry into causes and effects of the virolae vaccinae**. London: Sampson Law; 1798
4. Hitzig WH. **The discovery of agammaglobulinaemia in 1952**. Eur J Pediatr 2003; **162**:289-304
5. Ehrlich P. **Experimentelle Untersuchungen über Immunität. I. Über Ricin**. Dtsch med Wschr 1891; **17**:976-979
6. Pasteur L. **Nouvelle communication sur la rage**. C R Acad Sci (Paris) 1886; **103**:777-785
7. Behring E. **Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Tieren**. Dtsch med Wschr 1890; **16**:1113/1114
8. Ehrlich P. **On immunity with special reference to cell life. Croonian Lecture**. Proc Soc London 1900; **66**:424-448
9. Heymann B. **Zur Geschichte der Seitenkettentheorie Paul Ehrlichs**. Klin Wschr 1928; **7**:1257-1260, 1305-1309
10. Tiselius A. **An electrophoretic study of immuna sera and purified antibody preparations**. J Exp Med 1939; **69**:119-131
11. Williams CA, Jr., Grabar P. **Immuno-electrophoretic studies on serum proteins. I. The antigens of human serum**. J Immunol 1955; **74**:158-168
12. Williams CA, Jr., Grabar P. **Immuno-electrophoretic studies on serum proteins. II. Immune sera: antibody distribution**. J Immunol 1955; **74**:397-403
13. Cohn EJ, Oncley JL, Strong LE, et al. **Chemical, Clinical, and Immunological Studies on the Products of Human Plasma Fractionation. I. the Characterization of the Protein Fractions of Human Plasma**. J Clin Invest 1944; **23**:417-432
14. CW Ordmann J, C G, Janeway C A. **Chemical, clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation. XII. The use of concentrated normal human serum gamma globulin (human immunserum globulin) in the prevention of and attenuation of measles**. J Clin Invest 1944; **23**:186-191
15. Hitzig W. **Die physiologische Entwicklung der "Immunglobuline" (Gamma- und Beta-2-Globuline)**. Helv Paedtr Acta 1961; **26**:596-605
16. Defrance T, Casamayor-Palleja M, Krammer PH. **The life and death of a B cell**. Adv Cancer Res 2002; **86**:195-225
17. Parslow TG SD, Terr AI, Imboden JB. **Medical Immunology**. 10 ed. London: McGraw-Hill; 2001
18. Ollila J, Vihinen M. **B cells**. Int J Biochem Cell Biol 2005; **37**:518-523
19. Bruton OC, Apt L, Gitlin D, Janeway CA. **Absence of serum gamma globulins**. AMA Am J Dis Child 1952; **84**:632-636

20. Bruton OC. **Agammaglobulinemia**. Pediatrics 1952; **9**:722-728
21. Stanley PJ, Corbo G, Cole PJ. **Serum IgG subclasses in chronic and recurrent respiratory infections**. Clin Exp Immunol 1984; **58**:703-708
22. **Primary immunodeficiency diseases. Report of an IUIS Scientific Committee. International Union of Immunological Societies**. Clin Exp Immunol 1999; **118 Suppl 1**:1-28
23. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. **Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies)**. Clin Immunol 1999; **93**:190-197
24. Cunningham-Rundles C, Siegal FP, Cunningham-Rundles S, et al. **Incidence of cancer in 98 patients with common varied immunodeficiency**. J Clin Immunol 1987; **7**:294-299
25. Hermaszewski RA, Webster AD. **Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications**. Q J Med 1993; **86**:31-42
26. Janeway CA, Apt L, Gitlin D. **Agammaglobulinemia**. Trans Assoc Am Physicians 1953; **66**:200-202
27. Spickett GP. **Current perspectives on common variable immunodeficiency (CVID)**. Clin Exp Allergy 2001; **31**:536-542
28. Hammarstrom L, Vorechovsky I, Webster D. **Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID)**. Clin Exp Immunol 2000; **120**:225-231
29. Warnatz K, Denz A, Drager R, et al. **Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease**. Blood 2002; **99**:1544-1551
30. Vorechovsky I, Cullen M, Carrington M, et al. **Fine mapping of IGAD1 in IgA deficiency and common variable immunodeficiency: identification and characterization of haplotypes shared by affected members of 101 multiple-case families**. J Immunol 2000; **164**:4408-4416
31. Vorechovsky I, Webster AD, Plebani A, Hammarstrom L. **Genetic linkage of IgA deficiency to the major histocompatibility complex: evidence for allele segregation distortion, parent-of-origin penetrance differences, and the role of anti-IgA antibodies in disease predisposition**. Am J Hum Genet 1999; **64**:1096-1109
32. Sneller MC, Strober W, Eisenstein E, et al. **New insights into common variable immunodeficiency**. Ann Intern Med 1993; **118**:720-730
33. Sewell WA, Buckland M, Jolles SR. **Therapeutic strategies in common variable immunodeficiency**. Drugs 2003; **63**:1359-1371
34. Ochs HD, Ament ME, Davis SD. **Structure and function of the gastrointestinal tract in primary immunodeficiency syndromes (IDS) and in granulocyte dysfunction**. Birth Defects Orig Artic Ser 1975; **11**:199-207
35. Cunningham-Rundles C. **Clinical and immunologic analyses of 103 patients with common variable immunodeficiency**. J Clin Immunol 1989; **9**:22-33



36. Hermans PE, Diaz-Buxo JA, Stobo JD. **Idiopathic late-onset immunoglobulin deficiency. Clinical observations in 50 patients.** Am J Med 1976; **61**:221-237
37. McKinney RE, Jr., Katz SL, Wilfert CM. **Chronic enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemic patients.** Rev Infect Dis 1987; **9**:334-356
38. Jorup-Ronstrom C, Ahl T, Hammarstrom L, et al. **Septic osteomyelitis and polyarthritis with ureaplasma in hypogammaglobulinemia.** Infection 1989; **17**:301-303
39. Roifman CM, Rao CP, Lederman HM, et al. **Increased susceptibility to Mycoplasma infection in patients with hypogammaglobulinemia.** Am J Med 1986; **80**:590-594
40. Hermans PE, Huizenga KA, Hoffman HN et al. **Dysgammaglobulinemia associated with nodular lymphoid hyperplasia of the small intestine.** Am J Med 1966; **40**:78-89
41. Conley ME, Brown P, Pickard AR, et al. **Expression of the gene defect in X-linked agammaglobulinemia.** N Engl J Med 1986; **315**:564-567
42. Conley ME, Park CL, Douglas SD. **Childhood common variable immunodeficiency with autoimmune disease.** J Pediatr 1986; **108**:915-922
43. Bjoro K, Skaug K, Haaland T, Froland SS. **Long-term outcome of chronic hepatitis C virus infection in primary hypogammaglobulinaemia.** Qjm 1999; **92**:433-441
44. Tarr PE, Sneller MC, Mechanic LJ, et al. **Infections in patients with immunodeficiency with thymoma (Good syndrome). Report of 5 cases and review of the literature.** Medicine 2001; **80**:123-133
45. Hausser C, Virelizier JL, Buriot D, Griscelli C. **Common variable hypogammaglobulinemia in children. Clinical and immunologic observations in 30 patients.** Am J Dis Child 1983; **137**:833-837
46. Ballou M. **Primary immunodeficiency disorders: antibody deficiency.** J Allergy Clin Immunol 2002; **109**:581-591
47. Pfluger H, Helbling A, Mordasini C, Pichler WJ. **CVID (common variable immunodeficiency): heterogeneous clinical manifestation of the commonest symptomatic primary immunodeficiency disease.** Schweiz Med Wochenschr 2000; **130**:1590-1599
48. Castigli E, Geha RS. **Molecular basis of common variable immunodeficiency.** J Allergy Clin Immunol 2006; **117**:740-746; quiz 747
49. Bayry J, Hermine O, Webster DA, et al. **Common variable immunodeficiency: the immune system in chaos.** Trends Mol Med 2005; **11**:370-376
50. Espanol T, Catala M, Hernandez M, et al. **Development of a common variable immunodeficiency in IgA-deficient patients.** Clin Immunol Immunopathol 1996; **80**:333-335
51. Olerup O, Smith CI, Bjorkander J, Hammarstrom L. **Shared HLA class II-associated genetic susceptibility and resistance, related to the HLA-DQB1 gene, in IgA deficiency and common variable immunodeficiency.** Proc Natl Acad Sci U S A 1992; **89**:10653-10657

52. Kralovicova J, Hammarstrom L, Plebani A, et al. **Fine-scale mapping at IGAD1 and genome-wide genetic linkage analysis implicate HLA-DQ/DR as a major susceptibility locus in selective IgA deficiency and common variable immunodeficiency.** *J Immunol* 2003; **170**:2765-2775
53. Gilmour KC, Gaspar HB. **Pathogenesis and diagnosis of X-linked lymphoproliferative disease.** *Expert Rev Mol Diagn* 2003; **3**:549-561
54. Morra M, Silander O, Calpe S, et al. **Alterations of the X-linked lymphoproliferative disease gene SH2D1A in common variable immunodeficiency syndrome.** *Blood* 2001; **98**:1321-1325
55. Kanegane H, Tsukada S, Iwata T, et al. **Detection of Bruton's tyrosine kinase mutations in hypogammaglobulinaemic males registered as common variable immunodeficiency (CVID) in the Japanese Immunodeficiency Registry.** *Clin Exp Immunol* 2000; **120**:512-517
56. Khan WN. **Regulation of B lymphocyte development and activation by Bruton's tyrosine kinase.** *Immunol Res* 2001; **23**:147-156
57. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, et al. **ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28.** *Nature* 1999; **397**:263-266
58. McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, et al. **ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching.** *Nature* 2001; **409**:102-105
59. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, et al. **Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency.** *Nat Immunol* 2003; **4**:261-268
60. Dong C, Juedes AE, Temann UA, et al. **ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function.** *Nature* 2001; **409**:97-101
61. Tafuri A, Shahinian A, Bladt F, et al. **ICOS is essential for effective T-helper-cell responses.** *Nature* 2001; **409**:105-109
62. Dong C, Temann UA, Flavell RA. **Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions.** *J Immunol* 2001; **166**:3659-3662
63. Guazzi V, Aiuti F, Mezzaroma I, et al. **Assessment of thymic output in common variable immunodeficiency patients by evaluation of T cell receptor excision circles.** *Clin Exp Immunol* 2002; **129**:346-353
64. Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, et al. **Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood.** *J Exp Med* 2002; **195**:789-794
65. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, et al. **Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection.** *Nature* 1998; **396**:690-695
66. Zhang L, Lewin SR, Markowitz M, et al. **Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1-infected individuals before and after effective therapy.** *J Exp Med* 1999; **190**:725-732
67. De Vera MJ, Al-Harhi L, Gewurz AT. **Assessing thymopoiesis in patients with common variable immunodeficiency as measured by T-cell receptor excision circles.** *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; **93**:478-484

68. Hazenberg MD, Verschuren MC, Hamann D, et al. **T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation.** *J Mol Med* 2001; **79**:631-640
69. Kohler S, Wagner U, Pierer M, et al. **Post-thymic in vivo proliferation of naive CD4+ T cells constrains the TCR repertoire in healthy human adults.** *Eur J Immunol* 2005; **35**:1987-1994
70. Nickel P, Kreuzer S, Bold G, et al. **CD31+ naive Th cells are stable during six months following kidney transplantation: implications for post-transplant thymic function.** *Am J Transplant* 2005; **5**:1764-1771
71. Gershon RK, Kondo K. **Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes.** *Immunology* 1970; **18**:723-737
72. Gershon RK, Kondo K. **Infectious immunological tolerance.** *Immunology* 1971; **21**:903-914
73. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. **Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.** *J Immunol* 1995; **155**:1151-1164
74. Holm TL, Nielsen J, Claesson MH. **CD4+CD25+ regulatory T cells: I. Phenotype and physiology.** *Apmis* 2004; **112**:629-641
75. Thornton AM, Shevach EM. **Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific.** *J Immunol* 2000; **164**:183-190
76. Wing K, Ekmark A, Karlsson H, et al. **Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood.** *Immunology* 2002; **106**:190-199
77. Paust S, Cantor H. **Regulatory T cells and autoimmune disease.** *Immunol Rev* 2005; **204**:195-207
78. Nielsen J, Holm TL, Claesson MH. **CD4+CD25+ regulatory T cells: II. Origin, disease models and clinical aspects.** *Apmis* 2004; **112**:642-650
79. Brandt D, Gershwin ME. **Common variable immune deficiency and autoimmunity.** *Autoimmun Rev* 2006; **5**:465-470
80. Bryant A, Calver NC, Toubi E, et al. **Classification of patients with common variable immunodeficiency by B cell secretion of IgM and IgG in response to anti-IgM and interleukin-2.** *Clin Immunol Immunopathol* 1990; **56**:239-248
81. Weber-Mzell D, Kotanko P, Hauer AC, et al. **Gender, age and seasonal effects on IgA deficiency: a study of 7293 Caucasians.** *Eur J Clin Invest* 2004; **34**:224-228
82. Bachmann R. **Studies on the serum gamma-A-globulin level. 3. The frequency of A-gamma-A-globulinemia.** *Scand J Clin Lab Invest* 1965; **17**:316-320
83. **Primary immunodeficiency diseases. Report of a WHO scientific group.** *Clin Exp Immunol* 1997; **109 Suppl 1**:1-28
84. Hammarstrom L, Smith C I E. **Genetic approach to common variable immunodeficiency and IgA deficiency.** In *Primary immunodeficient diseases, a*

- molecular and genetic approach*. Ochs H, Smith C I E, Puck J, eds, Oxford University Press; **1999**:250-262
85. Nell PA, Ammann AJ, Hong R, Stiehm ER. **Familial selective IgA deficiency**. Pediatrics 1972; **49**:71-79
  86. Peterson RD, Kelly WD, Good RA. **Ataxia-Telangiectasia. Its Association with a Defective Thymus, Immunological-Deficiency Disease, and Malignancy**. Lancet 1964; **13**:1189-1193
  87. Oxelius VA, Laurell AB, Lindquist B, et al. **IgG subclasses in selective IgA deficiency: importance of IgG2-IgA deficiency**. N Engl J Med 1981; **304**:1476-1477
  88. Schroeder HW, Jr. **Genetics of IgA deficiency and common variable immunodeficiency**. Clin Rev Allergy Immunol 2000; **19**:127-140
  89. Hammarstrom L, Carlsson B, Smith CI, et al. **Detection of IgA heavy chain constant region genes in IgA deficient donors: evidence against gene deletions**. Clin Exp Immunol 1985; **60**:661-664
  90. Hammarstrom L, Lonnqvist B, Ringden O, et al. **Transfer of IgA deficiency to a bone-marrow-grafted patient with aplastic anaemia**. Lancet 1985; **1**:778-781
  91. Kurobane I, Riches PG, Sheldon J, et al. **Incidental correction of severe IgA deficiency by displacement bone marrow transplantation**. Bone Marrow Transplant 1991; **7**:494-495
  92. Ammann AJ, Hong R. **Selective IgA deficiency: presentation of 30 cases and a review of the literature**. Medicine (Baltimore) 1971; **50**:223-236
  93. Proesmans W, Jaeken J, Eeckels R. **D-penicillamine-induced IgA deficiency in Wilson's disease**. Lancet 1976; **2**:804-805
  94. Bjorkander J, Bake B, Oxelius VA, et al. **Impaired lung function in patients with IgA deficiency and low levels of IgG2 or IgG3**. N Engl J Med 1985; **313**:720-724
  95. Docke WD, Hoflich C, Davis KA, et al. **Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study**. Clin Chem 2005; **51**:2341-2347
  96. Pelchen-Matthews A, Parsons IJ, Marsh M. **Phorbol ester-induced downregulation of CD4 is a multistep process involving dissociation from p56lck, increased association with clathrin-coated pits, and altered endosomal sorting**. J Exp Med 1993; **178**:1209-1222
  97. O'Gorman MR, Zaas D, Paniagua M, et al. **Development of a rapid whole blood flow cytometry procedure for the diagnosis of X-linked hyper-IgM syndrome patients and carriers**. Clin Immunol Immunopathol 1997; **85**:172-181
  98. Carsetti R, Rosado MM, Donnanno S, et al. **The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency**. J Allergy Clin Immunol 2005; **115**:412-417
  99. Ferry BL, Jones J, Bateman EA, et al. **Measurement of peripheral B cell subpopulations in common variable immunodeficiency (CVID) using a whole blood method**. Clin Exp Immunol 2005; **140**:532-539

100. Aspalter RM, Sewell WA, Dolman K, et al. **Deficiency in circulating natural killer (NK) cell subsets in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinaemia.** Clin Exp Immunol 2000; **121**:506-514
101. Farrant J, Spickett G, Matamoros N, et al. **Study of B and T cell phenotypes in blood from patients with common variable immunodeficiency (CVID).** Immunodeficiency 1994; **5**:159-169
102. Kokron CM, Errante PR, Barros MT, et al. **Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency.** An Acad Bras Cienc 2004; **76**:707-726
103. Wright JJ, Wagner DK, Blaese RM, et al. **Characterization of common variable immunodeficiency: identification of a subset of patients with distinctive immunophenotypic and clinical features.** Blood 1990; **76**:2046-2051
104. Jaffe JS, Strober W, Sneller MC. **Functional abnormalities of CD8+ T cells define a unique subset of patients with common variable immunodeficiency.** Blood 1993; **82**:192-201
105. Baumert E, Wolff-Vorbeck G, Schlesier M, Peter HH. **Immunophenotypical alterations in a subset of patients with common variable immunodeficiency (CVID).** Clin Exp Immunol 1992; **90**:25-30
106. North ME, Webster AD, Farrant J. **Primary defect in CD8+ lymphocytes in the antibody deficiency disease (common variable immunodeficiency): abnormalities in intracellular production of interferon-gamma (IFN-gamma) in CD28+ ('cytotoxic') and CD28- ('suppressor') CD8+ subsets.** Clin Exp Immunol 1998; **111**:70-75
107. Serrano D, Becker K, Cunningham-Rundles C, Mayer L. **Characterization of the T cell receptor repertoire in patients with common variable immunodeficiency: oligoclonal expansion of CD8(+) T cells.** Clin Immunol 2000; **97**:248-258
108. Almeida AR, Rocha B, Freitas AA, Tanchot C. **Homeostasis of T cell numbers: from thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells.** Semin Immunol 2005; **17**:239-249
109. Li B, Samanta A, Song X, et al. **FOXP3 ensembles in T-cell regulation.** Immunol Rev 2006; **212**:99-113
110. Sugimoto N, Oida T, Hirota K, et al. **Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis.** Int Immunol 2006; **18**:1197-1209
111. Roncador G, Garcia JF, Garcia JF, et al. **FOXP3, a selective marker for a subset of adult T-cell leukaemia/lymphoma.** Leukemia 2005; **19**:2247-2253
112. French LE, Huard B, Wysocka M, et al. **Impaired CD40L signaling is a cause of defective IL-12 and TNF-alpha production in Sezary syndrome: circumvention by hexameric soluble CD40L.** Blood 2005; **105**:219-225
113. Lee WI, Torgerson TR, Schumacher MJ, et al. **Molecular analysis of a large cohort of patients with the hyper immunoglobulin M (IgM) syndrome.** Blood 2005; **105**:1881-1890

## **Publikation**

Die Publikation darf aus rechtlichen Gründen in der elektronischen Version nicht veröffentlicht werden.

*Bunk R, Dittrich AM, Schulze I, Horn J, Schmolke K, Volk HD, Wahn V, Hoflich C. Rapid whole blood flow cytometric test to detect ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. Int Arch Allergy Immunol. 2006;140(4):342-4.*

## **Erklärung**

Ich, Robert Bunk, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Etablierung neuer Testverfahren am Institut für Medizinische Immunologie der Charité Campus Mitte zur Erweiterung des Diagnostikspektrums bei COVID- und sIgAD-Patienten.“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

## Lebenslauf

**„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“**