

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

DISSERTATION

**„Classification of common variable immunodeficiencies using flow
cytometry and memory B-cell functionality assay“**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Amelia Rösel

aus Brisbane

Datum der Promotion: 30.05.2015

Inhaltsverzeichnis

Deckblatt.....	1
Inhaltsverzeichnis.....	2
Abstrakt (Deutsch).....	3
Abstract (English).....	4
Eidesstattliche Versicherung einschl. Anteilserklärung.....	5
Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge SM).....	6
Publikation.....	7
Lebenslauf.....	23
Publikationsliste.....	24
Danksagung.....	24

Abstrakt (Deutsch)

Einleitung: Patienten mit kombiniertem variablen Immundefekt (Common Variable Immunodeficiency, CVID) gehören zu einer sehr heterogenen Gruppe mit verschiedenen Ursachen für Hypogammaglobulinämie, welche rezidivierende Infekte, eine höhere Inzidenz an Autoimmunität und Malignität begünstigt. Obwohl Gedächtnis-B-Zellen (memBc) eine Schlüsselrolle in der humoralen Abwehr einnehmen und sie bei diesen Patienten häufig erniedrigte Zellzahlen aufweisen, sind sie kein Bestandteil derzeitiger Klassifikationen.

Zielsetzung: Wir etablierten und validierten einen Enzym-gekoppelten Immunadsorptions-Spot-Test (enzyme-linked immunosorbent spot, ELISpot) für memBc, welcher deren Kapazität sich in Antikörper-sekretierende Zellen zu differenzieren zeigt und präsentiert eine Idee für eine neue Klassifikation auf der Basis dieses funktionalen Tests.

Methoden: Der memBc ELISpot wurde in Kombination mit Durchflußzytometrie an Patienten mit beständigem CVID angewandt im Vergleich zu altersnormierten gesunden Probanden.

Ergebnisse: Die ex vivo Häufigkeit von IgG-, IgM-, und IgA-sekretierenden Plasmablasten war im Vergleich zu den gesunden Probanden je um das 27.2-, 2.4-, und 23.3-fache signifikant erniedrigt. Darüber hinaus war die in vitro Differenzierung von memBc zu Antikörper-sekretierenden Zellen um je das 6.1-, 2.6-, and 3.7-fache für die Isotypen IgG, IgM und IgA reduziert. Die Proliferation von memBc korreliert invers zur Kapazität der Antikörpersekretion, welches eine kompensatorische Hyperproliferation andeutet. Außerdem können Patienten ohne Serum-IgA Titer dennoch messbare IgA ELISpot Antworten in vitro generieren. Vor allem aber, erlaubt die große Heterogenität der memBc Funktion der CVID Patienten, welche durchflußzytometrisch homogen gruppiert waren, eine weitere Subklassifikation auf der Basis der memBc/Plasmablasten Funktion.

Fazit: Diese Daten zeigen fast normale Funktionalität der memBc/Antikörper-sekretierenden Plasmablasten in manchen Patienten, wenn suffiziente stimulatorische Signale gegeben werden, welches Gelegenheiten für neue therapeutische Herangehensweisen ermöglichen kann.

(J Allergy Clin Immunol 2014)

Abstract (English)

Background: The population of patients with common variable immunodeficiency (CVID) comprises a heterogeneous group of patients with different causes of hypogammaglobulinemia predisposing to recurrent infections, higher incidence of autoimmunity, and malignancy. Although memory B cells (memBcs) are key players in humoral defense and their numbers are commonly reduced in these patients, their functionality is not part of any current classification.

Objective: We established and validated a memBc enzyme-linked immunosorbent spot (ELISpot) assay that reveals the capacity of memBcs to develop into antibody-secreting cells and present an idea for a new classification based on this functional capacity.

Methods: The memBc ELISpot assay combined with flow cytometry was applied to patients with confirmed CVID in comparison with age-matched healthy control subjects.

Results: Ex vivo frequency of IgG-, IgM-, and IgA-secreting plasmablasts was significantly diminished by 27.2-, 2.4-, and 23.3-fold, respectively, compared with that seen in healthy control subjects. Moreover, in vitro differentiation of memBcs into antibody-secreting cells was 6.1-, 2.6-, and 3.7-fold significantly reduced for IgG-, IgM-, and IgA-secreting cells, respectively. Proliferation of memBcs correlates inversely to immunoglobulin-secreting capacity, suggesting compensatory hyperproliferation. Furthermore, patients with no serum IgA can still have a detectable IgA ELISpot assay result in vitro. Most importantly, the large heterogeneity of memBc function in patients with CVID homogeneously grouped by means of fluorescence-activated cell sorting allowed additional subclassification based on memBc/plasmablast function.

Conclusion: These data suggest almost normal memBc/immunoglobulin-secreting plasmablast functionality in some patients if sufficient stimulatory signals are delivered, which might open opportunities for new therapeutic approaches.

(J Allergy Clin Immunol 2014)

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Amelia Rösel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Classification of common variable immunodeficiencies using flow cytometry and memory B-cell functionality assay“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist. Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

[Classification of common variable immunodeficiencies using flow cytometry and memory B-cell functionality assay]

[Amelia L. Rösel,1 Prof. Dr. med. Carmen Scheibenbogen,1-3 Dr. rer. nat. André Sollwedel,1 Dr. med. Bodo Hoffmeister,3 Dr. med. Leif Hanitsch,3 PD Dr. med. Horst von Bernuth,4 PD. Dr. med. Renate Krüger,4 Prof. Dr. med. Klaus Warnatz,5 Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk,1,2 and Dr. rer. nat. Sybill Thomas1] [Journal of Allergy and Clinical Immunology] [2014]

Beitrag im Einzelnen:

A.L.R und S.T. führten die Experimente durch und analysierten die Ergebnisse; A.L.R. erstellte die Grafen und schrieb das Manuskript; H.-D.V. und S.T. planten die Forschungsarbeit und trugen zum Schreiben des Manuskripts bei; C.S., ist die Direktorin der Immundefekt Ambulanz aus der die meisten Patienten rekrutiert wurden, beteiligte sich durch Ratschläge zur Patientengruppierung und durch Diskussion. B.H. und L.H. waren für das Patientenmanagement verantwortlich. A.S. unterstützte die klinische Einführung der Methode. H.vB. und R.K. aus der Abteilung für pädiatrische Immunologie sammelten Proben und trugen klinisches Wissen bei. K.W. half in der Diskussion bezüglich CVID Klassifikation und gab Anregungen für die Manuskriptvorbereitung.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk

Unterschrift der Doktorandin

Amelia Rösel

Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge) Sorted by: Impact Factor

Abbreviated Journal Title	Impact Factor	5-Year Impact Factor	2013 Articles	<i>Eigenfactor</i>[®] Score
ANNU REV IMMUNOL	41.392	46.174	24	0.04788
NAT REV IMMUNOL	33.836	37.762	65	0.10349
NAT IMMUNOL	24.973	25.566	136	0.14263
IMMUNITY	19.748	20.948	182	0.14034
J EXP MED	13.912	13.955	212	0.13872
IMMUNOL REV	12.909	12.238	108	0.04899
TRENDS IMMUNOL	12.031	10.339	75	0.02783
J ALLERGY CLIN IMMUN	11.248	9.664	301	0.07898
EXERC IMMUNOL REV	9.929	6.103	9	0.00118
CLIN INFECT DIS	9.416	9.177	431	0.12905
CURR OPIN IMMUNOL	7.867	8.202	103	0.03193
MUCOSAL IMMUNOL	7.537	6.894	104	0.01345
EMERG INFECT DIS	7.327	6.855	311	0.06399
AUTOIMMUN REV	7.095	5.792	119	0.01633
J AUTOIMMUN	7.018	5.632	102	0.01140
AIDS	6.557	6.102	347	0.05772
SEMIN IMMUNOPATHOL	6.482	6.420	49	0.00842
ONCOIMMUNOLOGY	6.283	6.283	167	0.00331
BRAIN BEHAV IMMUN	6.128	5.813	185	0.02126
SEMIN IMMUNOL	6.124	6.209	52	0.01139

Publikation

Rösel et al. Classification of common variable immunodeficiencies using flow cytometry and a memory B-cell functionality assay. J Allergy Clin Immunol. 2015 Jan;135(1):198-208.e5.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.06.022>

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

[Classification of common variable immunodeficiencies using flow cytometry and memory B-cell functionality assay]

[Amelia L. Rösel,¹ Prof. Dr. med. Carmen Scheibenbogen,¹⁻³ Dr. rer. nat. André Sollwedel,¹ Dr. med. Bodo Hoffmeister,³ Dr. med. Leif Hanitsch,³ PD Dr. med. Horst von Bernuth,⁴ PD. Dr. med. Renate Krüger,⁴ Prof. Dr. med. Klaus Warnatz,⁵ Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk,^{1,2} and Dr. rer. nat. Sybill Thomas¹] [Journal of Allergy and Clinical Immunology] [2014]

Danksagung

Vielen Dank für alle helfenden Hände, geniale Gedanken und detaillierte Diskussionen!
Vielen Dank an alle aufmerksamen AG-Angehörige, passenden Probanden/Patienten,
fördernde Familie/Freunde und maßgeblich meiner Mentorin!