

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die umgelagerten Gene für die variable Region der schweren Kette des B-Zellrezeptors von peripheren B-Lymphozyten Frühgeborener (FG) und reifer Neugeborener (RG) bei Geburt und in den ersten 16 Lebenswochen sowie von Erwachsenen untersucht. Erstmals wurden die Diversität der IgG-B-Zellrezeptorgene und die Mutationsraten in diesen verschiedenen Altersgruppen vergleichend analysiert.

Die Entwicklung des Repertoires der B-Zellrezeptoren und der Anstieg der Mutationsrate nach Antigenexposition läuft bei FG verzögert ab. Erst mit 10 Wochen erreichen die Frühgeborenen ein ähnliches Niveau wie Reifgeborene. Außerdem steigen die Mutationsraten mit dem postnatalen Alter bei Frühgeborenen langsamer als bei Reifgeborenen an und erreichen in den ersten 16 Lebenswochen nicht das Niveau von Erwachsenen.

5.1 Die Entwicklung der Diversität an IgG-B-Zellrezeptorgenen ist bei Frühgeborenen langsamer als bei Reifgeborenen

Eine mögliche Ursache für die zunächst niedrige und dann mit postnatalen Alter ansteigende Diversität der IgG-B-Zellrezeptorgene kann eine zunächst geringe Häufigkeit an klassengewechselten B-Lymphozyten sein, die mit dem postnatalen Alter ansteigt. Das Vorhandensein weniger klassengewechselter B-Zellen deutet auf eine temporär reduzierte Fähigkeit des Klassenwechsels IgM zu IgG bei frühgeborenen Kindern hin.

Intrauterin entwickelt sich das IgG-Repertoire nur sporadisch (Bauer 2002). So sind im Nabelschnurblut nur wenige IgG exprimierende B-Zellen vorhanden. Nur 0,2% der CD20+ B-Lymphozyten exprimieren IgG auf der Oberfläche. Bei Erwachsenen sind es 4-8% (Wedgwood 1997). In vitro Untersuchungen von Lymphozyten aus der Nabelschnur haben ergeben, dass diese Lymphozyten IgM produzieren können, jedoch nicht IgG und IgA (Andersson 1981).

Die Diversität der IgG-B-Zellrezeptorgene bei FG steigt mit dem postnatalen Alter an (Bauer 2002). Eine verzögerte Entwicklung war bisher noch nicht bekannt und wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gezeigt. Mögliche Ursachen für die verzögerte Entwicklung ist die Unreife von T- und B-Zellen. Da der Klassenwechsel antigenabhängig ist, sollte auch eine mögliche geringe Exposition mit Antigenen von FG diskutiert werden.

Ein wichtiges Signal für die Induktion des Klassenwechsels ist die Interaktion zwischen CD40-Ligand auf T-Zellen mit CD40-Molekül auf B-Zellen (Jumper 1994). Ein Defekt im CD40-Ligand-Molekül bei Menschen führt zu dem Hyper IgM Syndrom Typ 1 (Korthauer 1993), das durch eine hohe Konzentration an IgM und eine niedrige Konzentration an IgG und IgA gekennzeichnet ist. Die verminderte Expression von CD40L auf T-Zellen von Frühgeborenen könnte eine Ursache für die reduzierte Fähigkeit zum Klassenwechsel bei FG sein. Über die Expression von CD40L auf neonatalen T-Zellen gibt es widersprüchliche Daten. Zum einen wurde gezeigt, dass die Expression von CD40L auf neonatalen T-Zellen nach Stimulation mit Anti-CD3-Antikörpern *in vitro* mit dem Level auf adulten Zellen vergleichbar ist. Der exprimierte CD40L ist funktionsfähig (Splawski 1996). Zum anderen wurde jedoch eine verminderte Expression auf neonatalen T-Zellen gezeigt (Bugnoni 1994, Fuleihan 1994).

In vitro mit Anti-CD3-Antikörpern stimulierte adulte Lymphozyten können alle Immunglobulinisotypen sezernieren. Bei neonatalen Lymphozyten führt eine alleinige Stimulation mit Anti-CD3-Antikörpern *in vitro* zu keiner Sekretion von Immunglobulin. Die Zugabe von weiteren Stimulatoren, wie Überstand von Mitogen aktivierter T-Zellkulturen, führt zur Sekretion von IgM, nicht aber von IgG und IgA. Nach der Zugabe von exogenen Zytokinen wie Interleukin 2, Interleukin 4 und Interleukin 6 zeigte sich eine Sekretion von IgG und IgA (Splawski 1991a, Splawski 1991b). Neonatale T-Zellen benötigen eine höhere Stimulation als adulte T-Zellen (Adkins 1999). Gleichzeitig ist die Zytokinproduktion (IL 2, IL 4, IFN γ) gegenüber adulten T-Zellen eingeschränkt (Adkins 1999). Zytokine sind wichtige Induktoren für den Klassenwechsel. Sie fördern die Transkription der Keimbahn der Ig C_H-Gene (Stavnezer 1996). IL 4 induziert den Klassenwechsel zu IgG4 und IgE (Lundgren 1989) und IFN γ zu IgG3 (Snapper 1987). Die Zytokinproduktion von T-Zellen Frühgeborener ist möglicherweise weiter reduziert als die von T-Zellen Reifgeborener. Das kann eine mögliche Ursache für den temporär eingeschränkten Klassenwechsel sein.

Das Enzym AID (activation induced deaminase) spielt eine zentrale Rolle in der Induktion des Klassenwechsels. B-Zellen AID defizienter Mäuse zeigen eine komplette Blockade des Klassenwechsels (Muramatsu 2000). Das Hyper-IgM-Syndrom 2 (HIGM2), welches ebenfalls durch ein niedriges Level an IgG und IgA gekennzeichnet ist (Notarangelo 1992), ist bedingt durch unterschiedliche, unabhängige Mutationen im humanen AID-Gen. Das CD40-Ligand-Molekül weist keine Mutation auf (Reuy 2000). Dies zeigt, dass auch beim Menschen die AID eine zentrale Rolle beim Klassenwechsel einnimmt. Eine verminderte Aktivität der AID in B-

Lymphozyten bei Frühgeborenen als Zeichen der Unreife könnte eine Ursache für die Beobachtung des verminderten Klassenwechseles bei Frühgeborenen sein. Zhou et al. wiesen nach, dass Interleukin 4 die AID-Expression in menschlichen B-Zellen induziert (Zhou 2003).

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Serumkonzentration von IgG bei keim- und antigenfrei aufgezogenen Mäusen deutlich reduziert ist (Hooijkaas 1984). Die Konzentration von IgM ist normal (Haury 1997). Dies zeigt, dass für den Klassenwechsel die Antigenexposition von großer Bedeutung ist. Eine Ursache für den verzögerten Klassenwechsel bei FG könnte eine geringere Exposition mit Antigenen sein. B-Zellen von keimfrei aufgezogenen Mäusen besitzen nach Aktivierung die Fähigkeit zum Klassenwechsel (Hooijkaas 1985). Während der primären und sekundären Immunantwort auf ein T-Zellabhängiges Antigen ist die Gesamtanzahl von IgG sezernierenden B-Zellen in den konventionellen Mäusen deutlich höher als im Vergleich zu den keim- und antigenfreien Mäusen. Allerdings ist die spezifische Immunantwort bei antigenfreien Mäusen im Vergleich zu keimfreien und konventionellen Mäusen größer. Die Anzahl an spezifischen IgG sezernierenden B-Zellen ist bei antigenfreien Mäusen dreimal höher (Bos 1994). Frühgeborene sind nach der Geburt durch die Ernährung mit Muttermilch oder Kontakt mit der Umwelt mit Antigenen exponiert.

In vitro stimulierte B-Lymphozyten von Kindern zeigten erst nach 24 Monaten eine IgG Produktion auf dem Niveau von Erwachsenen (Anderson 1981). In unseren Untersuchungen zeigten RG schon nach der ersten Woche und FG nach 10 Wochen Diversitäten der IgG-B-Zellrezeptorgene, die auf dem Niveau von Erwachsenen liegen.

Da die Daten auf der Untersuchung von 1 bis 4 Kindern pro Zeitpunkt beruhen, sollte man das Ergebnis durch die Analyse weiterer früh- und reifgeborener Kinder in dem Zeitrahmen von 2 bis 10 Wochen, in dem sich eine Verzögerung der Klonfrequenz zeigte, bestätigen. Außerdem ist es sinnvoll, das Blut einzelner Individuen über mehrere Zeitpunkte hinweg zu untersuchen, um individuelle Schwankungen auszugleichen, wie es bei den Patienten 1.19, 1.21, 1.26 und 1.28 getan wurde. Die longitudinalen Verläufe bestätigen die Ergebnisse der Querschnittsuntersuchung.

5.2 Die Affinitätsreifung von FG ist gegenüber RG eingeschränkt

Die Daten bestätigen frühere Untersuchungen, die gleich geringe Mutationsraten bei RG und FG bei Geburt zeigen (Bauer 2002). Eine pränatale Entstehung von somatischen Mutationen ist unwahrscheinlich, da die Entstehung von Mutationen an eine Keimzentrumsreaktion gebunden ist. Bei einer Untersuchung der Lymphknoten von Feten im Alter von 16 bis 40 Schwangerschaftswochen wurden nur primäre Lymphfollikel gefunden. Es waren keine Keimzentren vorhanden (Westerga 1998). Im Gegensatz dazu fanden Cuisinier et al. in Leberlymphozyten eines 8 Wochen alten Fetus zahlreiche somatische Mutationen (Cuisinier 1993).

Ferner bestätigen unsere Daten Untersuchungen, die zeigen, dass die Mutationsrate von FG mit postnatalem Alter ansteigt (Bauer 2002) und dass die Fähigkeit der Mutationsbildung seit der Geburt vorhanden ist (Motari 1993). Bei Untersuchungen der Mutationsraten im Vh6-Segment von Kindern zwischen 2 bis 10 Monaten waren Mutationen bei Kindern unter 6 Monaten sehr selten. Nach 6 Monaten stieg die Mutationsfrequenz deutlich an. Sie erreichten jedoch nicht das Niveau von Erwachsenen. Erst mit einem Alter von 8 Monaten haben die Mutationsraten der Kinder dieses Niveau erreicht (Ridings 1998). Im Mausmodell dagegen waren Neonaten im gleichen Maße fähig affine AK nach gezielter Antigenexposition wie Erwachsene zu bilden (Schallert 2002). Es wurde jedoch eine verminderte Keimzentrenzahl beobachtet (Pihlgren 2003).

Die Entwicklung der Mutationsraten von RG und FG im Vergleich wurde bisher noch nicht untersucht. Erstmals wurde in dieser Studie gezeigt, dass die Affinitätsreifung der FG gegenüber RG eingeschränkt ist. Mögliche Ursachen sind unreife T-Zellen, unreife B-Zellen oder eine geringere Antigenexposition.

Für die Bildung des B-Zellgedächtnisses und der Affinitätsreifung sind T-Zellen von wichtiger Bedeutung. Bei der T-Zell-abhängigen Immunreaktion findet im Gegensatz zur T-Zell-unabhängigen Immunantwort eine Steigerung der Affinität in der sekundären Antwort statt (Stein 1992). Die Analyse von Immunglobulinen von Patienten mit dem DiGeorge-Syndrom, das durch eine Thymushypoplasie gekennzeichnet ist (Speer 2000), haben ergeben, dass keine oder nur sehr wenige Mutationen im V-Segment zu finden sind. Dies unterstreicht die Bedeutung von T-Zellen bei der Affinitätsreifung (Haire 1993). Unreife T-Zellen von Frühgeborenen könnten die verzögerte Affinitätsreifung erklären.

Eine weitere mögliche Ursache für die langsamere Entwicklung der Mutationsrate kann eine verminderte Aktivität der AID in B-Zellen bei FG sein. B-Zellen AID defizienter Mäuse zeigen einen Defekt in der Bildung von somatischen Hypermutationen (Muramatsu 2000). Die AID wird speziell in Keimzentrum-B-Zellen exprimiert und bei Aktivierung hochreguliert (Muramatsu 1999). Auch beim Menschen spielt die AID beim Hypermutationsprozess eine wichtige Rolle. Patienten, die an dem HIGM2-Syndrom erkrankt sind, weisen neben dem verminderten Klassenwechsel auch einen Defekt in der Bildung von somatischen Hypermutationen auf (Reuy 2000).

Die Anzahl der Mutationen scheint auch davon abzuhängen, welches Antigen die Immunreaktion induziert hat (Gioregette 1998). Es besteht die Möglichkeit, dass der Unterschied der Mutationsraten bei FG und RG durch eine Exposition mit unterschiedlichen Antigenen entstanden ist. Da auch der Klassenwechsel bei FG eingeschränkt ist und der molekulare Mechanismus Parallelen aufweist (Ehrenstein 1999, Rada 2002), ist eine verminderte Aktivität der AID und damit eine Unreife der frühgeborenen Kinder jedoch wahrscheinlicher.

Die Ergebnisse basieren auf Untersuchungen von 1 bis 5 Kindern pro Zeitpunkt. Um das Ergebnis zu bestätigen, sollte eine Analyse mit weiteren FG und RG in einem Zeitrahmen von 0 bis 16 Wochen durchgeführt werden. Außerdem ist es sinnvoll, die Mutationsraten von einzelnen RG über mehrere Zeitpunkte hinweg zu bestimmen, wie es bei FG getan wurde.

Nukleotidunterschiede gegenüber der Keimbahn können verschiedene Ursachen haben: somatische Mutationen, genetische Polymorphismen der Gensegmente oder Einbaufehler der Taq-Polymerase während der PCR („Taq error“). In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe betrug der „Taq error“ 0,076% (Zemlin 2001). Das heißt, dass alle 1300 Nukleotide eine falsche Base durch Taq-Polymerase eingebaut wurde. So muss in jeder achten Sequenz mit einem falsch eingebauten Nukleotid im Bereich CDR2 und FR3 gerechnet werden. Die Sequenzen von B-Lymphozyten aus dem Nabelschnurblut enthalten nur wenige Mutationen. Jede dritte bis vierte Sequenz enthält Mutationen. So muss davon ausgegangen werden, dass viele der Mutationen von Sequenzen aus Nabelschnurblut Einbaufehler der Taq-Polymerase sind. Da mit dem postnatalen Alter die Mutationsrate zunimmt, der Fehler aber im System gleich bleibt, ist anzunehmen, dass der Großteil der Abweichungen durch somatische Hypermutationen nach Antigenkontakt zu erklären ist.

5.3 Selektion der Mutationen

Bei RG und bei FG findet eine Selektion statt. RG weisen früher Antigen selektierte Mutationen auf.

Die Charakteristika für Antigen selektierte Mutationen sind:

1. im CDR2-Abschnitt eine höhere Mutationsrate als im FR3-Abschnitt
2. im FR-Bereich eine kleinere R/S-Rate als im CDR-Bereich (Weigert 1986).

Bei FG erfüllen die Mutationen, die im NSB und im peripheren Blut von 1 bis 8 Wochen alten Kindern gefunden wurden, die beiden Charakteristika noch nicht. RG weisen schon ab der Geburt antigenselektierte Mutationen auf. Bei FG können diese erst in der letzten Gruppe beobachtet werden.

Da die Mutationsraten der B-Zellen bei FG und RG bei Geburt und in den ersten Lebenswochen gering sind, kann mit den erhobenen Daten nur eine eingeschränkte Aussage zur R/S-Rate gemacht werden.

FG weisen am errechneten Geburtstermin (12 bis 14 Wochen) antigenselektierte Mutationen auf (Bauer 2002). Dies bestätigen die erhobenen Daten. Im Gegensatz dazu zeigten Untersuchungen von Ridings, dass Kinder erst ab einem Alter von 6 bis 8 Monaten eine Selektion erkennen lassen. Ein direkter Vergleich von RG und FG wurde bisher noch nicht analysiert.

5.4 Schlussfolgerung

Die Verzögerung im Klassenwechsel und die verminderte Affinitätsreifung bei Frühgeborenen zeigt, dass frühgeborene Kinder in den ersten postnatalen Wochen nur eingeschränkt auf Infektionen reagieren können. Infektionen können daher schwerwiegender verlaufen. Patienten mit einem variablen Immundefektsyndrom (CVID) können eine reduzierte Hypermutationsrate in der variablen Region haben. Dies ist mit einem Anstieg der Frequenz von Infektionen im Respirationstrakt assoziiert (Andersen 2004).

5.5 Zusammenfassung

Frühgeborene besitzen ein eingeschränktes B-Zellrezeptorrepertoire. Die kombinatorische Vielfalt ist bei Früh- und Reifgeborenen gleich, allerdings besitzen Frühgeborene zum Zeitpunkt der Geburt eine eingeschränkte junktionale Vielfalt. Dies macht ihre verkürzte CDR3-Region deutlich (Zemlin 2001). Die Zunahme der Länge der CDR3-Region scheint genetisch determiniert zu sein, da am errechneten Geburtstermin Frühgeborene (FG) die gleiche junktionale Vielfalt wie Reifgeborene (RG) bei der Geburt aufweisen (Bauer 2002). Nach Antigenkontakt steigen bei FG und RG die Mutationsraten im V_h -Segment an. Bisher gab es noch keine vergleichenden Untersuchungen des Anstieges der Mutationsraten in beiden Gruppen. Im Nabelschnurblut von RG und FG sind nur wenige IgG exprimierende B-Zellen vorhanden (Wedgwood 1997, Bauer 2002). Die Population IgG exprimierender B-Zellen vergrößert sich nach Antigenexposition. In dieser Untersuchung wurde die Entwicklung des Klassenwechsels und die Affinitätsreifung von RG und FG verglichen. Dazu wurden die Diversitäten der IgG-B-Zellrezeptorgene und die Mutationsraten im V_h -Segment der variablen Region des Immunglobulinrezeptorgens im NSB und im peripheren Blut bestimmt. Die mRNA der umgelagerten schweren Ketten der Immunglobulinrezeptorgens wurde isoliert, durch eine RT-PCR in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Anschließend wurde sie kloniert und sequenziert. Die einzelnen Sequenzen wurden computergestützt ausgewertet. Insgesamt wurden 636 Sequenzen von 8 FG (24-27 SSW), 5 RG, 11 reifgeborenen Säuglingen und 4 Erwachsenen untersucht. Bei den FG wurden im Verlauf ein bis drei Proben entnommen.

Die Diversität (Anteil der unterschiedlichen Gene an der Gesamtzahl der sequenzierten Gene eines Patienten) ist bei der Geburt bei RG und FG gering. Sie liegt im Median bei 32% bei den 4 Reifgeborenen und bei 27% bei den 4 Frühgeborenen. Sie steigt nach Antigenkontakt an. Bei den FG kommt es zu einer verzögerten Entwicklung der Diversität. Nach 8 Tagen weisen alle Reifgeborenen eine Diversität von über 80% auf. Frühgeborene besitzen erst in einem Alter von 10 Wochen vergleichbare Werte. Im Nabelschnurblut kommen sowohl bei RG als auch bei FG Mutationen nur selten vor. Nach Antigenexposition kommt es im V_h -Segment zum Anstieg der Mutationsraten. Bei den RG ist der Anstieg schneller. Beide erreichen nach 16 Wochen jedoch nicht die Mutationsraten von Erwachsenen. Ebenfalls weisen Reifgeborene früher Sequenzen mit multiplen Mutationen auf. Der Anteil der Sequenzen mit mehr als drei Mutationen nimmt bei Reifgeborenen schneller zu.

Die Ursache für die verzögerte Entwicklung der Diversitäten und damit des Klassenwechsels und die verzögerte Affinitätsreifung bei FG können in der Unreife von B- und T-Zellen sowie in einer verminderten Antigenexposition von FG liegen. Ein wichtiges Signal für die Induktion des Klassenwechsels ist die Interaktion zwischen dem CD40-Ligand auf T-Zellen und dem CD-40-Molekül auf B-Zellen (Jumper 1994). Eine verminderte Expression von CD40L auf T-Zellen von Frühgeborenen könnte eine Ursache für den verminderten Klassenwechsel sein. Auch eine verminderte Zytokinproduktion von FG kommt in Frage. Das Enzym AID (activation induced deaminase) spielt sowohl beim Klassenwechsel als auch bei der Affinitätsreifung eine zentrale Rolle. Eine verminderte Aktivität dieses Enzyms in B-Zellen Frühgeborener würde das Defizit bei FG erklären. So ist neben dem eingeschränkten IgG-B-Zellrezeptorrepertoire bei FG auch die Immunantwort nach Antigenkontakt verzögert. Frühgeborene Kinder können somit nur eingeschränkt auf Infektionen reagieren. Infektionen können daher schwerwiegender verlaufen.