Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie, Tumorimmunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von B- und T-Zellsubpopulationen bei Patienten mit Selektiver IgM-Immundefizienz

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Torben Krause

aus Großburgwedel

Datum der Promotion: 11.12.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkür	rzungsverzeichnis	1
Zusam	nmenfassung	4
1	Finleitung	6
11	B-7ellen	6
1.1	Entwicklung der B-Zellen und die B-Zell-Subpopulationen	6
112	Differenzierungssignale und -vorgänge <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	10
1.1.3	Bedeutung von B-Zell-Markern	
1.1.4	Synthese und Funktion von IgM	
1.2	Selektive IgM-Immundefizienz – Gegenwärtiger Forschungsstand	
1.2.1	Diagnostik und Epidemiologie	17
1.2.2	Klinische Manifestation, Therapie und Prognose	
1.2.3	Lymphozytäre Charakterisierung	20
1.2.4	Genetische Assoziationen und sekundäre IgM-Defizienz	21
1.3	Zielsetzung der Arbeit	21
2.	Material	23
2.1	Patienten und gesunde Kontrollprobanden	23
2.2	Geräte	24
2.3	Verbrauchsmaterialien	24
2.4	Kits	25
2.5	Reagenzien und Chemikalien	25
2.6	Zytokine und Elispotreagenzien	26
2.7	Puffer und Medien	26
2.8	Antikörper, Isotypkontrollen und Fluorochrome	27
2.9	Software	
3.	Methoden	29
3.1	Erhebung klinischer Patientendaten	29
3.2	Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut	29
3.2.1	Kryokonservierung von PBMCs	30
3.2.2	T-Zell-Depletion von PBMCs	
3.3	Durchflusszytometrie	
3.3.1	Immunfärbungen zur phänotypischen Charakterisierung von B- und T-Zellsubpopula	tionen und
	dendritischen Zellen mittels Durchflusszytometrie	32

3.3.2	Intrazelluläre Immunfärbungen zur durchflusszytometrischen Charakterisierung der IgM-	-
	Expression von B-Zellen	35
3.3.3	Gating-Strategien	36
3.3.3.1	B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen	37
3.3.3.2	B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen nach in vitro Stimulation	39
3.3.3.3	T-Zellen und T-Zell-Subpopulationen	40
3.3.3.4	Dendritische Zellen	40
3.4	Zellkultur	41
3.4.1	In vitro Stimulation von B-Zellen in Kultur	41
3.4.2	Zellkultur unter Einfluss von Rapamycin	42
3.5	ELISpot	42
3.5.1	Detektion unspezifischer und spezifischer ASZ	43
3.5.2	Desorption von Tetanustoxoid	44
3.6	Statistische Analysen	44
4.	Ergebnisse	44
4.1	Klinische und laborchemische Charakterisierung der SIgMID-Patienten	45
4.1.1	Krankheitsbild	46
4.1.2	Immunglobulin-Spiegel	47
4.2	Phänotypische Charakterisierung von Lymphozyten und dendritischen Zellen	49
4.2.1	Differentialblutbild	49
4.2.2	Lymphozytäre Hauptpopulationen und dendritische Zellen	50
4.2.3	T-Zell-Subpopulationen	51
4.2.4	Verteilung der B-Zell-Subpopulationen	52
4.2.5	IgM-Expression der Gesamt-B-Zellen	53
4.2.6	IgM-Expression der B-Zell-Subpopulationen	53
4.2.7	Anteil Marker-exprimierender B-Zellen und Subpopulationen	54
4.2.8	Expressionsdichte der Marker auf B-Zellen und Subpopulationen	57
4.3	Funktionelle Charakterisierung von PBMCs und B-Zellen	58
4.3.1	Expansionsverhalten der PBMCs	58
4.3.2	Expansionsverhalten der B-Zellen	59
4.3.3	Verteilung der B-Zell-Subpopulationen nach in vitro Stimulationen	60
4.3.4	IgM-Expression nach in vitro Stimulationen	64
4.3.5	Intrazelluläre IgM-Expression nach in vitro Stimulationen	67
4.3.6	Antikörper-sezernierende Zellen nach in vitro Stimulationen im ELISpot-Verfahren	68
4.3.6.1	ASZ nach in vitro Stimulationen	68
4.3.6.2	ASZ nach in vitro Stimulationen unter Berücksichtigung der Expansion	71

4.3.6.3	PnPS-spezifische ASZ nach in vitro Stimulationen	74
4.3.6.4	TT-spezifische ASZ nach in vitro Stimulationen	75
4.4	Einfluss von Rapamycin auf B-Zellsubpopulationen, IgM-Expression und Differenzierun	ng von
	Antikörper-sezernierenden Zellen bei in vitro Stimulationen	77
4.4.1	Verteilung der B-Zellen und Subpopulationen	77
4.4.2	IgM-Expression	79
4.4.3	ASZ nach in vitro Stimulationen unter Berücksichtigung der Expansion	80
5.	Diskussion	82
5.1	Klinische Präsentationen der SIgMID	82
5.2	Immunglobulin-Spiegel	88
5.3	Leukozytäre Hauptpopulationen	89
5.4	B-Zell-Subpopulationen, IgM-Expression und Oberflächenmarker	90
5.5	Expansionsdefizit und IgM-B-Zellmangel – T-Zell-abhängig oder B-Zell-intrinsisch?	94
5.6	Differenzierung der Antikörper-sezernierenden Zellen	99
5.7	Rapamycin – Therapieansatz oder Forschungsinstrument?	101
5.8	Ausblick	103
6.	Literaturverzeichnis	105
Eidesst	attliche Erklärung	114
Lebens	lauf	115
Danksa	gung	116

Abkürzungsverzeichnis

AB-Serum	Humanserum der Blutgruppe AB	
Abb.	Abbildung	
ABCB1	engl. ATP-binding Cassette B1	
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol	
AID	engl. Activation Induced Cytidine Deaminase	
Aqua dest.	destilliertes Wasser	
ASZ	Antikörper-sezernierende Zellen	
AW	Atemwege	
BAFF	engl. B Cell Activating Factor of the TNF-a Family	
BAFF-R	BAFF-Rezeptor	
Bregs	regulatorische B-Zellen	
BZR	B-Zell-Rezeptor	
bzw.	beziehungsweise	
CD	engl. Cluster of Differentiation	
CD40L	CD40-Ligand	
chron.	chronisch	
CNR2	Cannabinoid-Rezeptor-2	
CpG	Cytosin/Guanin-reiche DNA-Motive	
CVID	engl. Common Variable Immunodeficiency Syndrome (variables	
	Immundefektsyndrom)	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DN	Doppelt-negative B-Zellen	
DNA	engl. Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)	
DOCK8	engl. Dedicator of Cytokinesis 8	
EDTA	Di-Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure	
EG	Effektor-Gedächtniszellen	
ELISpot	engl. Enzyme Linked Immuno Spot Assay	
engl.	Englisch	
FACS	engl. Fluorescence Activated Cell Sorting	
FcR	engl. Crystallisable Fraction Receptor	
FCS	engl. Fetal Calf Serum (fötales Kälberserum)	
FMO	engl. Fluorescence Minus One	
FSC	engl. Forward Scatter	
g	Schwerebeschleunigung	

g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GZ	Gedächtniszellen
h	Stunden
hi	engl. high (hochgradig exprimiert)
HLA-DR	humanes Leukozytenantigen DR
IFN-γ	Interferon-y
Ig	Immunglobulin
IK	Isotypkontrolle
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iNKT	invariante natürliche Killer-T-Zellen
kDa	Kilodalton
KREC	engl. Kappa-deleting Recombination Excision Circle
kU	Kilo-Units
1	Liter
LD	engl. Live/Dead
m	männlich
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mTOR	engl. Mammalian Target of Rapamycin
MZ	Marginalzonen-ähnliche B-Zellen
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nM	Nanomolar
orc	engl. orchestrating (orchestrierend)
o.ä.	oder ähnlich
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAMPs	engl. Pathogen associated Molecular Patterns
PBMCs	engl. Peripheral Blood Mononuclear Cells (mononukleäre Zellen des
	peripheren Bluts)
PBS	engl. Phosphate Buffered Saline

PnPS	Pneumokokken-Polysaccharid	
PRR	engl. Pattern Recognition Receptor	
PWM	Pokeweed-Mitogen	
rez.	rezidivierend	
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium	
RT	Raumtemperatur	
S	Sekunden	
S.	siehe	
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor	
SAC	Staphylokokkus aureus Cowan strain I	
sec	engl. <i>secretory</i> (sekretorisch)	
SHM	somatische Hypermutation	
sIgMID	selektive IgM-Immundefizienz	
sog.	sogennant	
SSC	engl. Sideward Scatter	
Tab.	Tabelle	
TACI	engl. Transmembrane Activator and Calcium Modulator and Cyclophilin	
	Ligand Interactor	
TD	engl. Thymus Dependent (Thymus-abhängig)	
TGF-β	engl. Transforming Growth Factor β	
TI	engl. Thymus Independent (Thymus-unabhängig)	
TLR	Toll-like-Rezeptor	
TNF-α	Tumornekrosefaktor-a	
Tregs	regulatorische T-Zellen	
TT	Tetanustoxoid	
TZR	T-Zell-Rezeptor	
ÜN	über Nacht	
UNG	Uracil-DNA-Glykosilase	
UpM	Umdrehungen pro Minute	
W	weiblich	
z.B.	zum Beispiel	
ZG	zentrale Gedächtniszellen	
μl	Mikroliter	
°C	Grad Celsius	

Zusammenfassung

Die selektive IgM-Immundefizienz (SIgMID) stellt eine Dysgammaglobulinämie dar, die sich durch verminderte IgM-, aber normale IgG- und IgA-Spiegel im Serum auszeichnet. SIgMID ist häufig mit einer erhöhten Infektanfälligkeit assoziiert. Pathogenetisch wurden bisher B-Zell-intrinsische wie auch T-Zell-Defekte postuliert. In dieser Arbeit wurden klinische und laborchemische Parameter von Patienten ausgewertet, B- und T-Zell-Subpopulationen phänotypisch charakterisiert und das Expansions-, Differenzierungs- und Antikörpersekretionsverhalten von B-Zellen untersucht.

Die Analyse der klinischen Daten von 20 Patienten bestätigte Berichte aus der Literatur: 90 % der Patienten zeigten rezidivierende Infektionen, bei 75 % waren die oberen Atemwege betroffen. 40 % hatten eine atopische, 15 % eine autoimmunologische Symptomatik. Über gastrointestinale Beschwerden berichteten 30 % und 20 % litten an Fatigue.

Die durchflusszytometrische Analyse von 11 Patientenproben zeigte, dass die Gesamt-B-, T- und dendritischen Zellen, sowie Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut quantitativ unauffällig waren. Marginalzonen-ähnliche (MZ) und Transitionale B-Zellen waren signifikant erhöht, bei erniedrigten Anteilen von Aktivierungs-, Überlebens- und Migrationsmarker-exprimierenden MZ (Fas, Fas-Ligand, Taci, CXCR4). Die Anzahl IgM-exprimierender Zellen war normal, die oberflächliche Expressionsdichte von IgM auf Gesamt-B-Zellen jedoch signifikant erniedrigt.

Weiterhin wurde die Antikörperproduktion der B-Zellen nach *in vitro* Expansion analysiert. Im Vergleich zu gesunden Spendern zeigte sich eine verringerte *in vitro* Expansion der SIgMID-B-Zellen mit verringerten Zahlen besonders von MZ, Plasmablasten und Gedächtniszellen. IgM⁺ B-Zellen waren absolut und relativ erniedrigt, aufgrund verringerter Zahlen von MZ und Naiven, aber auch durch geringere Anteile IgM⁺ Zellen unter Gedächtnis- und Doppel-negativen (IgD⁻CD27⁻) B-Zellen.

Die Zahl der Antikörper-sezernierenden Zellen (ASZ) nach *in vitro* Stimulation mit autologer T-Zell-Beteiligung war aufgrund des B-Zell-Expansionsdefizits für IgG, IgA und IgM verringert. Das intrazellulär bestimmte IgM in IgM⁺ B-Zellen war unauffällig. Bezogen auf die einzelnen expandierten B-Zellen war die Produktion von IgG-, IgA- und IgM-ASZ sowie von Pneumokokken- und Tetanusspezifischen ASZ bei den meisten Patienten vergleichbar mit den gesunden Spendern.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine verminderte IgM-Expression auf der Oberfläche der B-Zellen, sowie *in vitro* eine Störung von Differenzierung und/oder Überleben der B-Zellen. Der Vergleich der durchgeführten Stimulationsprotokolle könnte auf einen B-Zell-intrinsischen Defekt hinweisen, auch eine T-Zell-assoziierte Störung ist jedoch möglich. *In vivo* könnten erhöhte Zahlen von MZ und Transitionalen B-Zellen bzw. erniedrigte Markerexpression Hinweis auf einen funktionellen Defekt sein.

Abstract

Selective IgM immunodeficiency (SIgMID) is a dysgammaglobulinemia characterized by low IgM but normal IgG and IgA serum levels. SIgMID is often associated with recurrent infections. B cell intrinsic defects as well as T cell effects have been discussed as pathogenetic causes. This paper engaged with clinical and laboratory parameters of SIgMID patients, the phenotypical characterization of B and T cell subsets and the evaluation of expansion, differentiation and antibody secretion of B cells.

Analysis of the clinical parameters confirmed data from the literature: 90 % of the patients had recurrent infections, 75 % of the upper airways. 40 % showed atopic, 15 % autoimmunological symptoms. 30 % reported gastrointestinal conditions and 20 % suffered from fatigue.

Flow cytometry of 11 samples showed that numbers of B cells, T cells, dendritic cells, granulocytes and monocytes in the peripheral blood were normal. Marginal zone (MZ)-like and transitional B cells were significantly elevated, percentages of MZ cells expressing activation, survival and migration markers (Fas, Fas ligand, Taci, CXCR4) were low. The number of IgM-expressing cells was normal, however the density of surface IgM was significantly reduced.

Furthermore, the antibody production of B cells after *in vitro* expansion was analyzed. Compared to healthy donors, SIgMID B cell expansion and especially numbers of MZ, plasmablasts and memory cells were reduced. Number and percentage of IgM^+ B cells were reduced after stimulation, due to both low numbers of MZ an naïve B cells and reduced percentages of IgM^+ memory and double negative (IgD^- CD27⁻) B cells.

The number of antibody secreting cells (ASC) after *in vitro* stimulation in cultures with autologous T cells was reduced for all isotypes due to the expansion defect. Intracellular IgM in IgM⁺ B cells was normal. Differentiation of IgG-, IgA- and IgM-ASC as well as ASC specific for pneumococcal and tetanus antigen was proportionally normal in most patients, when related only to living B cells after stimulation.

Overall, the results show a reduced expression of superficial IgM, and an *in vitro* deficiency of differentiation and/or survival of SIgMID B cells. As comparison of different stimulation protocols suggests, an intrinsic B cell defect could be accountable for this. However, T cell defects could also be involved. In vivo, elevated numbers of MZ and transitional B cells as well as decreased marker expression could point to a functional defect.

1. Einleitung

1.1 B-Zellen

B-Zellen sind neben den T-Zellen die zentralen Akteure der adaptiven Immunität. Sie produzieren Antikörper und sind somit die Träger der spezifischen humoralen Immunabwehr. Nach Ausdifferenzierung können sie verschiedene Immunglobulinklassen sezernieren, die in erster Linie der Opsonisierung, Neutralisierung und Blockierung, Komplementaktivierung und Vermittlung der zellulären Zytotoxizität dienen. Der membrangebundene B-Zell-Rezeptor (BZR) hat die gleiche Spezifität wie die sezernierten Antikörper. Neben T-Zellen sind dendritische Zellen, Granulozyten, Makrophagen und Natürliche Killer-T-Zellen an T-Zell-abhängiger und -unabhängiger B-Zell-Aktivierung und Differenzierung beteiligt (1). Je nach Differenzierungsweg können sich die B-Zellen zu langlebigen Gedächtnis-B-Zellen (GZ), Plasmazellen oder weiteren Subpopulationen entwickeln. Darüber entscheiden zelluläre und lösliche Einflussfaktoren im jeweiligen Zellmilieu (2).

1.1.1 Entwicklung der B-Zellen und die B-Zell-Subpopulationen

Das primäre lymphatische Organ der B-Zellen ist beim erwachsenen Menschen das rote Knochenmark, hier befinden sich die lymphoiden Vorläuferzellen, aus denen sich die B-Zellen antigenunabhängig entwickeln. Pro-B-Zellen stellen die erste Entwicklungsstufe dar, sie sind über CD22 identifizierbar. Sie leiten die Bildung des BZR ein, durch Genumlagerung bzw. -exzision (somatische Rekombination) und Paarung der vorläufigen leichten Ketten mit rearrangierten schweren Ketten wird der Pre-BZR zusammengefügt, der die Stufe der Pre-B-Zelle markiert. Das in diesem Stadium erstmals exprimierte CD19 bildet bei der reifen B-Zelle zusammen mit CD21 (und CD81/CD225) den B-Zell-Korezeptorkomplex. Die CD19-Expression wird später im Zuge der Differenzierung zu Plasmablasten und schließlich Plasmazellen konsekutiv bis unter die Nachweisbarkeitsgrenze herunterreguliert. Auf die Ausbildung des Pre-BZR folgt eine Phase der Expansion und der Austausch der vorläufigen Leichtketten gegen Kappa- oder Lambda-Leichtketten. Unreife B-Zellen zeichnen sich schließlich durch die erstmalige Oberflächenexpression von IgM aus, das bei der Paarung der schweren Kette vom μ -Typ mit einer leichten Kette entsteht. Nach erfolgreicher BZR-Generierung und der Negativselektion autoreaktiver unreifer B-Zellen – nur 10-20 % erreichen die Milz – ist der Übertritt ins periphere Blut als CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IgM⁺IgD⁺Transitionale B-Zellen möglich (3-5).

Transitionale B-Zellen lassen sich über die CD24/CD38-Expression weiter in T1- und T2-Zellen unterteilen, das Färbeverhalten aufgrund beginnender Expression des Transportproteins ABCB1 (engl.

ATP-binding Cassette B1) ermöglicht weiterhin die Diskriminierung von T3-Zellen (6). Darüber hinaus können T1-Zellen über die Expression von CD21 und T3-Zellen über die Expression von CD45RB^{MEM55} jeweils in zwei Populationen eingeteilt werden (7, 8). Für das Überleben und die weitere Differenzierung scheinen Signale über den BZR sowie BAFF (engl. *B Cell Activating Factor of the TNF-\alpha Family*), das den auf T2-Zellen erstmals exprimierten BAFF-Rezeptor (BAFF-R) aktiviert, Schlüsselregulatoren zu sein (9).

Nach dem Durchlaufen des Transitionalen-Stadiums sind B-Zellen in der Lage, spezifisch Antigen zu erkennen und bei Bedarf entsprechende Zellantworten zu generieren. Diese Naiven machen mehr als die Hälfte der im peripheren Blut zirkulierenden B-Zellen aus, sie zeigen den Phänotyp IgD⁺CD27⁻CD24^{+/-} CD38⁺ und werden auch als Reif-Naive oder Follikuläre bezeichnet. Dies erklärt sich durch ihr Migrationsverhalten, denn sie durchwandern sekundäre lymphatische Organe und rezirkulieren, bis ein passendes Antigen über den BZR gebunden wird. BZR-vermittelte Antigenbindung und Aktivierungssignale über zelluläre Liganden und Zytokine in extrafollikulären Regionen von Milz und Lymphknoten führen zur weiteren Differenzierung: Sie werden zu frühen IgM-sezernierenden Plasmazellen oder wandern in Follikel ein und werden zu Keimzentrums-B-Zellen (10), die sich im Rahmen der Keimzentrumsreaktion weiter zu GZ oder langlebigen Plasmazellen entwickeln können (11).

Der geläufigste Marker für GZ ist CD27 und wird auf B-Zellen im peripheren Blut mit somatisch hypermutierten BZR-Genen exprimiert, was das wichtigste Unterscheidungskriterium zu den Naiven darstellt (12). In Kombination mit IgD wird die Bestimmung von CD27⁺IgD⁻ Isotyp-gewechselten GZ (engl. *Switched Memory B Cells*) ermöglicht. CD27⁺IgD⁻ GZ sind einfacher zu aktivieren als Naive und nach erneutem Kontakt mit dem über den BZR spezifisch erkannten Antigen wird je nach Isotyp eine rasche spezifische IgG- oder IgA-Produktion induziert. Zirkulierende IgM- und IgE-GZ sind deutlich seltener (13-15). Die Entwicklung der konventionellen GZ erfolgt im Keimzentrum über das Zentrozyten- und proliferative Zentroblastenstadium unter T-Zell-Hilfe (siehe 1.2.2). Obwohl der ebenfalls während der Keimzentrumsreaktion erfolgende Klassenwechsel meist mit einem Verlust des auf den Naiven obligat-exprimierten IgM einhergeht, existiert auch eine CD27⁺IgD⁻IgM⁺ GZ-Subpopulation. Sie wird als IgM-only GZ bezeichnet und macht nur einen geringen Teil der GZ aus; bei erhaltener IgM-Expression wurde eine somatische Hypermutation durchlaufen (15).

Die Population der CD27⁺IgD⁺ B-Zellen wird in dieser Arbeit als Marginalzonen-ähnliche (MZ) B-Zellen bezeichnet. Nahezu 100 % dieser Population sind IgM⁺, weshalb sie in der Literatur mitunter auch als IgM^+ memory B cells, natural effector B cells oder innate-like B cells bezeichnet werden (16-18). Die BZR-Gene der MZ zeigen Spuren somatischer Hypermutationen, wofür möglicherweise koexistente T-Zell-abhängige und -unabhängige Differenzierungswege diskutiert werden (17, 19-23). Vermutlich besteht die CD27⁺IgD⁺ B-Zell-Population aus funktionell verschiedenen Zelltypen, von denen einige untereinander und mit den Isotyp-gewechselten GZ ontogenetisch in Verbindung stehen könnten und andere nicht (16, 22). Viele MZ haben polyreaktive BZR, die verschiedene PAMPs (engl. *Pathogen associated Molecular Patterns*) binden können (24), so werden Toll-like-Rezeptoren (TLR) in hoher Dichte exprimiert, was für Zellen des angeborenen Immunsystems typisch ist. MZ B-Zellen stellen gewissermaßen eine Synthese aus angeborenem und adaptivem Immunsystem dar: Bei gleichzeitiger Ligation von BZR und TLR wird die Produktion von niedrig-affinem IgM initiiert, die die Zeit bis zum Wirksamwerden der spezifischen T-Zell-abhängigen Immunantwort überbrückt. Die Lokalisation der MZ B-Zellen an der Schnittstelle zwischen Antigenkontaktstellen und lymphatischem Gewebe ermöglicht ein effektives Screening aller eindringenden Pathogene: MZ B-Zellen finden sich in der Marginalzone der B-Zell-Follikel in der Milz, den subkapsulären Sinus der Lymphknoten, unterhalb des Domepithels der Peyerschen Plaques und im tonsillären Kryptenbereich (25-28). Lipopolysaccharid-tragende, bekapselte Bakterien sind das klassische Beispiel für diesen Weg der initialen Immunisierung (29), so spielen MZ eine Schlüsselrolle bei der Infektabwehr von Streptokokkus pneumoniae (30, 31).



Abbildung 1: Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark und Migration in peripheres Blut und sekundäre lymphatische Organe. Im Knochenmark entwickeln sich über verschiedene Vorstufen (Pro-/Pre- und unreife B-Zellen) die peripheren Transitionalen B-Zellen (Trans, Typen 1 bis 3). In sekundären lymphatischen Organen differenzieren sie zu Marginalzonenähnlichen (MZ B), follikulären bzw. Naiven B-Zellen (fo B) und bei Antigenkontakt weiter zu Gedächtnis-B-Zellen (GZ) und Plasmablasten (PBI). MZ B, Naive und GZ können bis zum nächsten Antigenkontakt zwischen Blut und sekundären lymphatischen Organen zirkulieren. PBI migrieren über das Blut ins Knochenmark, Plasmazellen zirkulieren nicht im Blut. KZ = Keimzentrum. Nach Warnatz et al. (3).

CD27⁻ Isotyp-gewechselte B-Zellen können als CD27⁻IgD⁻ Doppelt-negative B-Zellen (DN) bezeichnet werden. Sie lassen sich in IgM⁺, IgG⁺ und IgA⁺ DN unterteilen (16, 18) und stellen nach ihrer Genese vermutlich eine heterogene Population dar: CD27⁻IgD⁻IgG⁺ DN entstammen der Milz, während CD27⁻IgD⁻IgA⁺ DN Eigenschaften der im Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) generierten B-

Zellen gleichen Phänotyps aufweisen (32). Genetische Analysen zeigten auch für die DN somatische Mutationen in den variablen Ig-Regionen, allerdings mit niedrigerer Frequenz als bei den konventionellen Isotyp-gewechselten GZ (33, 34). Für ihre Mitbeteiligung am immunologischen Gedächtnis spricht außerdem die Beteiligung an Impfantworten: Wie auch Isotyp-gewechselte GZ, können DN zur Sekretion von Anti-Tetanustoxinund Anti-Influenzavirus-Antikörpern angeregt werden (35). Genomsequenzierungen und Klonalitätsanalysen legen nahe, dass DN zu Isotyp-gewechselten GZ werden können und andersherum bzw. dass die Populationen einen gemeinsamen Ursprung haben. In diesem Fall wäre CD27 nur als temporaler Marker zu verstehen und kein Hinweis auf einen stets gleichgerichteten Differenzierungsvorgang. Die Heterogenität der DN-Fraktion, möglicherweise als Mischung aus ehemals konventionellen GZ und den verschiedenen Isotypen der DN, ist Hinweis auf eine komplexe Differenzierungssystematik, die auch unterschiedliche subpopulationsspezifische Effektorfunktionen zur Folge haben könnte (18).

Werden B-Zellen entsprechend stimuliert, können sie zu Antikörper-sezernierenden Zellen (ASZ) differenzieren. Die CD19^{+/lo}CD24⁻CD27^{hi}CD38^{hi} Plasmablasten werden bei Antigenkontakt in den Marksträngen der Lymphknoten und der roten Pulpa der Milz über verschiedene Differenzierungswege, extrafollikulär und im Rahmen einer Keimzentrumsreaktion, gebildet. Sie sezernieren Antikörper, haben die Morphologie einer Blastenzelle und sind zur Proliferation fähig. Plasmazellen werden als postmitotische Antikörper-sezerniernende Zellen definiert. Ausgangszelltypen der Differenzierung können MZ, Follikuläre/Naive B-Zellen, GZ, Transitionale und B1-B-Zellen sein (3, 36-38). Nach einem Antigenkontakt bei Impfung oder Infektion steigt der Anteil der Plasmablasten im peripheren Blut für einen kurzen Zeitraum deutlich an, der assoziierte Anstieg des Antikörpertiters im Serum kann jedoch dauerhaft erhalten bleiben, mitunter für den Rest der Lebenszeit (39-41). Es gibt kurzlebige ASZ, die weniger somatische Hypermutationen aufweisen und nach initialem Antigenkontakt rasch Antikörper produzieren, und terminal differenzierte langlebige Plasmazellen, die für den dauerhaften Erhalt der Antikörpertiter sorgen und hauptsächlich im Knochenmark und kaum im peripheren Blut nachweisbar sind (37, 41). Im Laufe des Reifungsprozesses steigt die CD27- und CD38-Expression, auch wenig bis kein Oberflächen-Ig, CD19-Verlust und CD138-Expression sind Teil der fortschreitenden Differenzierung und zeigen sich vor allem bei Plasmazellen (38, 42).

B1-B-Zellen waren lange Zeit nur aus der Maus bekannt, wo sie vornehmlich seröse Körperhöhlen besiedeln, bis auch beim Menschen eine B-Zell-Population beschrieben wurde, deren Zellen mit dem Phänotyp CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD70⁻ klassische murine B1-Eigenschaften aufweisen: Spontane IgM-Sekretion, die Fähigkeit zur CD4⁺ T-Zell-Stimulation und Aktivierungs- bzw. Liganden-unabhängige intrazelluläre Signalweiterleitung (engl. *Tonic Intracellular Signalling*). Da keine andere bekannte Population im Menschen diese Eigenschaften zeigt, wurde der genannte Phänotyp zur Definition einer humanen B1-Zelllinie vorgeschlagen. Zellen des gleichen Phänotyps wurden auch in humanem

Nabelschnurblut nachgewiesen und zeigten die gleichen *in vivo* Eigenschaften, wie die B1-Zellen des peripheren Blutes. Wegen der Keimzentrums- und Antigen-unabhängigen IgM-Sekretion werden sie als Träger einer angeborenen Ig-vermittelten humoralen Immunität funktionell mit den MZ verglichen. Das von B1-Zellen spontan sezernierte und deshalb auch als "natürliche Antikörper" (engl. *Natural IgM*) bezeichnete IgM zeigt autoreaktive Spezifitäten (u.a. gegen DNA), was für die Debris-Beseitigung und autoimmun-pathogenetisch relevant sein könnte. Eine kürzlich vorgenommene Unterteilung der B1-Zellen schreibt die IgM-Sekretion vor allem den CD11b⁻ B1sec (engl. *secretory*) zu, während die T-Zell-regulatorischen Funktionen – Anregung zur Proliferation sowie über spontane IL-10-Sekretion vermittelte T-Zell-Suppression – von den CD11b⁺ B1orc (engl. *orchestrating*) ausgeübt werden sollen. Über die Abstammung der B1-Zelllinie beim Menschen ist wenig bekannt, im murinen System werden eine Differenzierung aus konventionellen B-Zellen oder die Existenz einer separaten B1-Zelllinie diskutiert (43-45).

Regulatorische Funktionen werden einer weiteren Subpopulation zugeschrieben: Diese funktionell definierten regulatorischen B-Zellen oder Bregs tragen zum Erhalt der Immuntoleranz bei. Sie begrenzen überschießende inflammatorische Reaktionen im Rahmen von Autoimmunität oder persistierenden Infektionen. Zentraler Mediator der Bregs ist IL-10, das proinflammatorische Zytokinwirkungen inhibiert und die Differenzierung regulatorischer T-Zellen (Tregs) fördert (46). Weitere Effektor-Mechanismen bestehen in der Inhibition der Differenzierung naiver T-Zellen in T-1- und T-17-Helfer-Zellen und die Suppression der Interferon- γ -(IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α -(TNF- α) Sekretion (47). Eine einheitliche phänotypische Beschreibung der Bregs ist bisher nicht gelungen. IL-10-kompetente CD19+ B-Zellen wurden in CD24^{hi}CD27⁻CD38^{hi} und CD27⁺ Populationen nachgewiesen (48, 49). Auch ihr Ursprung ist ungeklärt, die Abstammung von Follikulären B-Zellen, MZ oder T2-Transitionalen wird diskutiert (50, 51). Letztere der Möglichkeiten wird von einigen Autoren favorisiert, wohl auch, weil die für Transitionale typische Stimulation über TLR (neben der CD40-Ligation) einen wichtigen Faktor für die Differenzierung von Bregs darstellt (46).

1.1.2 Differenzierungssignale und -vorgänge *in vivo* und *in vitro*

Naive B-Zellen können T-Zell-abhängig (auch engl. *Thymus dependent*, TD) oder -unabhängig (auch engl. *Thymus independent*, TI) aktiviert werden und differenzieren. Ausschlaggebend sind dabei die molekulare Struktur des vorliegenden Antigens, der Ort des Antigenkontakts mit den unterschiedlichen zellulären und humoralen Einflussgrößen, sowie die Differenzierung der antigenerkennenden B-Zelle.

Protein-Antigene leiten eine T-Zell-abhängige Immunantwort in den sekundären lymphatischen Organen ein. Dort besteht ein Mikromilieu, in dem B- und T-Zellen untereinander sowie mit interdigitierenden und

follikulären dendritischen Zellen interagieren können. T-Zellen sind für ihre Aktivierung stets auf die Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen angewiesen, die Antigene erkennen, phagozytieren und prozessiert über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) präsentieren, denn nur in dieser Form können T-Zell-Rezeptoren (TZR) Antigene erkennen. So kann eine dendritische Zelle ein Pathogen erkennen, nach Prozessierung die körperfremden Peptidfragmente über MHC-II präsentieren und bei Erkennung durch einen passenden TZR die dazugehörige T-Zelle aktivieren. Eine T-Helfer-Zelle kann dadurch nach weiteren Differenzierungsschritten klonal expandieren und in großer Zahl B-Zellen aktivieren, die das gleiche Antigen erkennen, wie sie selbst.



Abbildung 2: T-Zell-abhängige B-Zell-Differenzierung. T-Zellen werden bei spezifischer Erkennung eines Antigens (Ag) durch dendritische Zellen (DZ) aktiviert, exprimieren den Chemokinrezeptor CXCR5 und wandern in B-Zell-Follikel ein. Nach der Interaktion mit passenden B-Zellen differenzieren die T-Zellen zu follikulären T-Helfer-Zellen (T_{FH}). B-Zellen migrieren bei Antigenerkennung an die Grenze der T-Zell-Zone (über CXCR5 und CCR7), können zu extrafollikulären Plasmablasten oder frühen Gedächtnis-B-Zellen (GZ) differenzieren oder im Follikel durch Proliferation Keimzentren (KZ) bilden. T_{FH} -Zellen interagieren mit KZ-B-Zellen über verschiedene molekulare Bindungen: T-Zell-Rezeptor (TZR)-vermittelte Erkennung von MHC-II-präsentierten Epitopen garantiert die selbe Antigenspezifität, kostimulatorische Signale über die Paarung von CD28/B7-Komplex, CD40L/CD40 und lösliche Faktoren wie IL-21 ermöglichen unter der Beteiligung antigenpräsentierender follikulärer dendritischer Zellen (FDZ) die Differenzierung von affinitätsgereiften GZ und langlebigen Plasmazellen. Nach Nutt und Tarlinton (52).

Die B-Zelle muss dafür das Antigen über ihren BZR binden, was durch die unspezifische Konzentration von Fremdmaterial durch follikuläre dendritische Zellen in den Follikeln gefördert wird. Die Antigenbindung ermöglicht wiederum die Endozytose und lysosomale Prozessierung mit anschließender Präsentation der Peptidfragmente über den MHC-II-Komplex. Im Rahmen der Keimzentrumsreaktion in den Follikeln der sekundären lymphatischen Organe können die für dieses Antigen spezifischen T-Helfer-Zellen (unterteilt in Typ 1 und 2) dann über ihren TZR das präsentierte Peptidfragment erkennen und so mit der B-Zelle eine Bindung eingehen. Für die vollständige Aktivierung der B-Zelle ist nun neben dem

BZR-vermittelten ersten Signal stets ein zweites nötig: Die T-Zelle exprimiert CD40-Ligand (CD40L, CD153), das das CD40 auf der B-Zelle bindet und damit intrazelluläre Signalwege aktiviert, die Proliferation, Ig-Klassenwechsel und somatische Hypermutation (SHM) zur Folge haben. Weitere kostimulatorische Signale, wie die Interaktion von CD28 mit dem B7-Komplex (CD80/CD86) der B-Zelle, bewirken die Sekretion wichtiger Zytokine durch die T-Zelle, die richtungsweisend für den weiteren Differenzierungsweg der B-Zellen sind (52). Je nach beteiligten Aktivierungsfaktoren entscheidet sich, ob nach Kontakt mit einem TD-Antigen langlebige Plasmazellen oder GZ entstehen und welchen Isotyp diese exprimieren. Zu den zentralen Zytokinen zählen u.a. IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-21, IFN-γ und TGF-β (engl. *Transforming Growth Factor* β) (32, 53, 54). Abb. 2 fasst wichtige Abläufe der Interaktion zusammen.

Ein Schlüsselenzym, das im Zuge der B-Zell-Aktivierung hochreguliert wird, ist die AID (engl. *Activation Induced Cytidine Deaminase*). Sie bewirkt durch Erzeugung zahlreicher Punktmutationen in der variablen Region gemeinsam mit der UNG (Uracil-DNA-Glykosilase) die SHM des exprimierten Ig-Gens, so dass sich die Affinität des BZR und damit der zukünftigen Antikörper zum Antigen während der Keimzentrumsreaktion erhöht oder erniedrigt. B-Zellen mit höherer Affinität können das Antigen besser binden und effektiver präsentieren, was einen Selektionsvorteil darstellt und im Ergebnis die Bildung spezifischerer Antikörper ermöglicht. Dieser Vorgang wird als Affinitätsreifung bezeichnet. Der Klassenwechsel (zu IgG, IgA oder IgE) wird ebenfalls von der AID durch Rekombinationen im konstanten Bereich des Ig-Gens vermittelt (32).

Je nach experimenteller Fragestellung finden T-Zell-Faktoren, die *in vivo* von Bedeutung sind, als rekombinante Proteine auch bei *in vitro* Stimulationen von B-Zellen Verwendung.

CD40L kann in löslicher Form eingesetzt werden und so die oben erläuterte T-Zell-Hilfe simulieren (55).

IL-2 ist besonders in der Regulation der T-Zell-Entwicklung von Bedeutung. Aber auch B-Zellen exprimieren einen IL-2-Rezeptor, über den das Zytokin als Kostimulator Einfluss auf Proliferationsverhalten und die Differenzierung zu ASZ hat (56, 57).

IL-10 kann von den meisten Zellen des Immunsystems exprimiert werden, einschließlich B-Zellen. Es spielt eine tragende Rolle beim Schutz vor Autoimmunität und Allergien, aber auch vor Infektionen (58). In der B-Zell-Entwicklung ist seine Wirkung abhängig von kostimulatorischen Signalen und dem Aktivierungszustand der B-Zellen. So kann IL-10 in einer frühen Phase der TD-Immunantwort in B-Zellen Apoptose-induzierend wirken, zu einem späteren Zeitpunkt jedoch die ASZ-Bildung anregen. In Kombination mit IL-2 zeigt sich ein synergistischer Effekt der erhöhten Ausdifferenzierung mit Ig-Produktion (59, 60).

Für IL-21 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es bei der TD-Antwort einen essenziellen Beitrag zu Aktivierung, Proliferation und Ausdifferenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen leistet (61).

Viele Pathogene enthalten intra- oder extrazelluläre Moleküle, die keine Proteine sind und deshalb keine TD-Antwort auslösen können. TI-Antigene können trotzdem über sog. PRRs (engl. *Pattern Recognotion Receptors*, z.B. TLR) Antikörperantworten induzieren, dabei handelt es sich zunächst stets um "natürliches IgM". Man unterscheidet zwischen TI-1 und -2-Antigenen, viele von ihnen sind entwicklungsgeschichtlich hoch konservierte Moleküle, die wichtige Funktionen für den Erreger erfüllen. TI-1-Antigene induzieren direkt eine Proliferation und Differenzierung zu IgM-ASZ über die PRRs, ungeachtet der Spezifität des BZR, was man als polyklonale Aktivierung bezeichnet. Zu ihnen zählen z.B. LPS und bakterielle oder virale Nukleinsäuren. TI-2-Antigene sind typischerweise Moleküle mit hoch-repetitiver Struktur, wie bakterielle Kapsel-Polysaccharide, die im Gegensatz zu TI-1-Antigenen keine intrinsische B-Zell-Stimulationsaktivität aufweisen. Sie aktivieren die B-Zelle über eine Quervernetzung (engl. *Cross-linking*) mehrerer BZR.

Im Verlauf differenzieren TI-aktivierte B-Zellen rasch zu IgM-ASZ, ihre Antikörper sind die ersten, die nach Antigenkontakt im Serum nachweisbar sind. Auch bei der T-Zell-unabhängigen Immunantwort können Helfer-Zellen über Zytokinsekretion regulierend eingreifen: dendritische Zellen, Granulozyten und auch bestimmte T-Zellen (invariante natürliche Killer-T-Zellen, iNKT). Über solche Einflüsse kann es auch zu einem Ig-Klassenwechsel kommen (1, 53).

Für die *in vitro* Stimulierung von B-Zellen werden verschiedene Antigene und Stimulanzien verwendet, die in die Gruppe der TI-Antigene fallen. Unmethylierte Cytosin- und Guanin-reiche DNA-Motive (CpG) sind typisch für bakterielle DNA und Ligand des intrazellulären TLR9. Die Aktivierung des Rezeptors bewirkt in bestimmten Transitionalen B-Zellen SHM und regt sie zur Proliferation und terminalen Differenzierung zu IgM-ASZ an. Darüber hinaus spielt CpG eine Rolle im Erhalt des serologischen Gedächtnisses bei Abwesenheit von Antigen (36, 62).

Das bakterielle Antigen SAC (Staphylokokkus aureus Cowan strain I) gilt als polyklonaler B-Zell-Aktivator und kann außerdem eine Quervernetzung der BZR bewirken. *In vitro* wird es meist mit weiteren Stimulanzien wie T-Zell-Faktoren gemeinsam oder zur Voraktivierung von B-Zellen eingesetzt, es regt zur Proliferation und Antikörpersekretion an (55, 56, 63, 64).

Das pflanzliche Lektin Pokeweed-Mitogen (PWM) wird ebenfalls zur *in vitro* Stimulation von B-Zellen eingesetzt, bei *in vivo* Vorgängen spielt es keine Rolle. Es bewirkt nur in Kombination z.B. mit TLR-Liganden eine verstärkte B-Zell-Proliferation und Antikörpersekretion (65).

1.1.3 Bedeutung von B-Zell-Markern

Spezifische Oberflächenmoleküle werden auf B-Zellen wie auch auf sonstigen Lymphozyten zur Identifizierung des Zelltyps detektiert. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, über den Nachweis bestimmter konstitutiv oder fakultativ exprimierter Marker Aussagen über den Zustand einer Zelle zu

treffen. Bestehen einer grundsätzlichen Immunkompetenz, Aktivierungs- und Reifungszustand, Überlebens- und Apoptosefähigkeit, induzierbares Migrationsverhalten sind Beispiele für essenzielle Zellfunktionen, die über Oberflächenmarker reguliert und somit durchflusszytometrisch bestimmt werden können. Für die phänotypische Charakterisierung der B-Zellen in dieser Arbeit wurde eine Auswahl von Markern bestimmt, die im Folgenden vorgestellt werden.

HLA-DR ist Bestandteil des MHC-II-Moleküls, das von allen antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird. Bereits auf der Pro-B-Zelle wird MHC-II exprimiert, je nach Reifungsgrad der Zelle hat die von ihm vermittelte Antigenpräsentation unterschiedliche funktionelle Konsequenzen: Naive können darüber Toleranz induzieren, GZ leisten eine Immunantwort und in der Keimzentrumsreaktion garantiert Antigenpräsentation das Überleben (66-68). HLA-DR wird gemeinhin als (früher) Reifungsmarker und Zeichen einer grundsätzlichen Immunkompetenz gesehen.

CD95 (Fas-Rezeptor) wird bei Aktivierung von B-Zellen hochreguliert und kann bei Ligation durch CD178 (Fas-Ligand) Apoptose induzieren, ist also *in vivo* von homöostatischer Bedeutung. CD178 wird klassischerweise von T- und NK-Zellen, aber auch von aktivierten B-Zellen exprimiert (69, 70). Ein weiterer Aktivierungsmarker ist CD86, Bestandteil des kostimulatorischen B7-Komplexes und für die Interaktion mit T-Zellen unabdingbar (71, 72).

Für das Überleben von B-Zellen in der Peripherie ist ein intakter BZR und die Bindung des Überlebensfaktors BAFF an seinen Rezeptor BAFF-R erforderlich. Die Expression von BAFF-R findet erstmals auf unreifen B-Zellen im Knochenmark statt und variiert im weiteren Differenzierungsverlauf in verschiedene Subpopulationen (32). TACI (engl. *Transmembrane Activator and Calcium Modulator and Cyclophilin Ligand Interactor*) gehört zur Gruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie und wird ebenfalls durch BAFF aktiviert. Es reguliert TI-Immunantworten, kann aktivierende oder inhibierende Effekte vermitteln (32, 73). BAFF-R und TACI können somit als Differenzierungs- und Überlebensmarker bezeichnet werden.

Das Migrationsverhalten von B-Zellen wird entscheidend über Chemokinrezeptoren gesteuert. Die zelluläre Expression der Rezeptoren leitet im Zusammenspiel mit der Ligandenexpression in lymphatischen und entzündlichen Geweben die entsprechenden Leukozyten an den Ort des immunologischen Geschehens. Homöostatische Chemokinrezeptoren wie CXCR4, CXCR5 und CCR7 vermitteln die Migration und Rezirkulation von Leukozyten in primäre und sekundäre lymphatische Organe. Inflammatorische Chemokinrezeptoren wie CXCR3 werden infolge von Antigenkontakt hochreguliert und ermöglichen die Rekrutierung in entzündetes Gewebe (32, 53). Der Nachweis von Migrationsmarkern kann Aufschluss über migratorisch-regulatorische Störungen geben.

1.1.4 Synthese und Funktion von IgM

IgM ist die erste Antikörperklasse, die nach primärer Immunisierung gebildet wird und als erste im Serum nachweisbar ist. Sie vermittelt die früheste spezifische Antikörper-vermittelte Immunabwehr. Außerdem spielt IgM eine regulatorische Rolle in der nachfolgenden Immunantwort, in dem es u.a. die Bildung von hochaffinem IgG fördert (74). Neben dem klassischen, spezifischen IgM gibt es auch das "natürliche" IgM, das typischerweise keine oder weniger Mutationen aufweist und polyreaktiv ist. Es kann niedrigaffin bestimmte Antigene (PAMPs) binden oder autoreaktiv sein und durch die Beseitigung apoptotischer Zellen oder Zelltrümmer vor Autoimmunität und inflammatorischen Gewebeschäden schützen, sowie ebenfalls regulatorische Aufgaben übernehmen. Seine Bildung kann durch Antigenkontakt induziert werden, es besteht aber auch eine konstitutive Sekretion. Membrangebundenes IgM fungiert als BZR und vermittelt Antigenerkennung und -aufnahme, sowie wichtige Überlebenssignale für die B-Zelle (75-77).



Abbildung 3: Aufbau eines heterodimeren Antikörpers und pentameres IgM. Anhand eines IgG-Moleküls ist die Struktur eines Immunglobulins gezeigt (A). Die genetisch konstanten Domänen der schweren (C_H) und leichten (C_L) Ketten unterscheiden sich in ihrer Anzahl und der Ausbildung von Disulfidbrücken, die variablen Regionen (V_H , V_L) können nach somatischer Rekombination und Hypermutation spezifisch Antigenepitope binden. Fc = kristallisierbares Fragment; Fab = antigenbindendes Fragment. IgM besteht aus fünf oder sechs Heterodimeren, die über eine Verbindungskette (J-Kette) am Fc-Teil verbunden sind (B). Nach Schütt und Bröker (78).

Immunglobuline sind heterodimere Proteine, die aus zwei bis drei schweren Ketten (H) und zwei leichten Ketten (L) bestehen. Diese weisen jeweils variable Domänen (V) auf, an die Antigen binden kann, sowie konstante Domänen (C), die die Effektorfunktionen vermitteln und den Isotyp bestimmen. Abb. 3 zeigt exemplarisch die Anordnung der Domänen. Entsprechend gibt es fünf verschiedene Klassen von C-Domänen der schweren Ketten (δ , μ , γ , α , ε), die den Isotypen entsprechen: IgD, IgM, IgG, IgA und IgE. Von IgG existieren vier weitere Subtypen, von IgA gibt es zwei. Durch Wechsel der exprimierten C-Domäne der schweren Kette kann bei unveränderter Spezifität die Effektorfunktion variiert werden. Auch im strukturellen Aufbau unterscheiden sich die Isotypen: Die Länge der schweren Ketten, das Vorliegen

von Gelenkregionen zwischen den Domänen, Anzahl und Lage von Disulfidbrücken und die Verbindung mehrerer Heterodimere sind Unterscheidungsmerkmale. Sekretorisches IgM besteht aus fünf oder sechs IgM-Monomeren, die über J-Ketten miteinander zu Penta- oder Hexameren verbunden werden. Membrangebundenes IgM liegt als klassisches Heterodimer vor.

Die Synthese aller Antikörperklassen beginnt gemeinsam auf genomischer Ebene. Durch Genumlagerung wird zu diesem frühen Entwicklungszeitpunkt bereits ein großes Spektrum unterschiedlicher Spezifitäten der späteren Ig-Moleküle ermöglicht. In einem ersten Schritt wird der VDJ-Komplex der schweren Kette durch Exzision stets unterschiedlicher DNA-Abschnitte rearrangiert. Der Pre-BZR besteht aus nun schon diversifizierten schweren Ketten mit, je nach Splicing, proximaler C μ - oder C δ -Region und vorläufigen leichten Ketten und wird in dieser Form erstmals auf der Oberfläche der Pre-B-Zelle exprimiert. Im nächsten Reifungsschritt werden die leichten Ketten κ oder λ rearrangiert, die nach Zusammenlagerung mit der schweren µ-Kette ein komplettes IgM-Protein bilden, das auf der Zelloberfläche der unreifen B-Zelle exprimiert wird. Damit ist die somatische Rekombination abgeschlossen und die reife B-Zelle kann bei nicht vorliegender Autoreaktivität das Knochenmark verlassen. Zu diesem Zeitpunkt werden beide schweren Ketten exprimiert, so dass die Zelle IgD und IgM auf der Oberfläche trägt. Da sie die selbe V-Region teilen, haben beide Rezeptoren die selbe Spezifität (74). Nun setzt sich die Entwicklung in der Peripherie fort und verschiedene Einflussgrößen entscheiden über den weiteren Werdegang der B-Zelle. Kommt es zu einer entsprechenden Aktivierung, sezerniert die Zelle die lösliche Form des Oberflächen-IgM. In der Folge kann es zu einer Keimzentrumsreaktion kommen, dann ermöglicht die SHM mit anschließender Affinitätsreifung eine Erhöhung der Spezifität und ein Klassenwechsel kann erfolgen (siehe 1.2.2).

Die Effektorfunktionen der Antikörper werden über die Isotyp-bestimmende C-Domäne der schweren Ketten vermittelt, die auch als Fc-Fragment (engl. *Crystallisable Fraction*) bezeichnet wird. Entsprechende Fc-Rezeptoren oder andere Moleküle erkennen den passenden Antikörper (meist nach Antigenbindung) und vermitteln die Mechanismen, die das Pathogen unschädlich machen sollen. Dazu zählen effektorzellunabhängig die Aktivierung des Komplementsystems und die Neutralisierung von Pathogenen. Unter Opsonisierung versteht man die Markierung von Pathogenen durch Antikörper für phagozytierende Effektorzellen wie Makrophagen oder Granulozyten. Bei der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität ist die Erkennung von Antikörpern, die an eine Zielzelle gebunden haben, das Signal für die Ausschüttung zytotoxischer Substanzen z.B. durch NK-Zellen. Ig haben außerdem immunregulierende Funktionen, etwa in Form negativer Rückkopplung zur Beendigung einer Immunantwort. Penetrierende Antikörper können bestimmte Zellen durchqueren, um wie IgA und IgM mukosal sezerniert zu werden oder wie IgG über die Plazenta in den Blutkreislauf eines Feten überzutreten (54, 77, 79). Tab. 1 gibt einen Überblick zu den wichtigsten Eigenschaften der Isotypen.

Isotyp	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Serum (%)	10	<0,5	50	17	5	3	15	<0,01
Struktur	Penta-/	Mono-	Mono-	Mono-	Mono-	Mono-	Mono-/	Monomer
	Hexamer	mer	mer	mer	mer	mer	Dimer	
Neutralisie-		_						_
rung	Т						TT	
Komplement-		_		1	_L_L_L	_	1	_
aktivierung				Ŧ	+++		Т	
Opsonisierung	+	-	+++	+/	++	+	+	-
NK-	_	_		_		_	_	_
Zytotoxizität		_	++		++			
Plazentagängig	-	_	+++	+	++	+/-	_	_
Transepithel.	I		_	_		_		_
Transport	+	_					+++	
Interstitielle	±/							1
Verteilung	17		+++	+++	+++	+++	++	Ŧ
Weitere	Primär-	Homö-	Sekundärantwort, Neutralisierung Mukos. Allergie,			Allergie,		
Funktionen	antwort	ostase	von Toxinen und Viren Schutz Parasiten					
Fc-Rezeptor	FcµR	FcδR	FcyR I,	FcyR	FcγR I,	FcyR I,	FcaR	FceR I, II
	Fcα/µR		II, III	II	II, III	II	$Fc\alpha/\mu R$	

Tabelle 1: Eigenschaften der Immunglobulinklassen. Mukos. Schutz = Mukosaler Schutz. Nach Schroeder, Murphy, Hughey, Cassidy (53, 54, 80, 81).

1.2 Selektive IgM-Immundefizienz – Gegenwärtiger Forschungsstand

IgM ist die erste Antikörperklasse, die bei einer initialen Immunantwort bei Antigenkontakt nachweisbar wird und hat protektive wie regulative Funktionen. Die selektive IgM-Immundefizienz (SlgMID) stellt eine bisher wenig charakterisierte Dysgammaglobulinämie dar, die sich durch verminderte IgM-, aber normale IgG- und IgA-Spiegel im Serum auszeichnet. Neben der hohen Infektanfälligkeit ist die SIgMID häufig mit anderen Krankheitsbildern, darunter Allergien, Autoimmunität, gastrointestinale sowie Tumorerkrankungen, assoziiert. Zelluläre, molekulare und genetische Pathomechanismen sind bisher nicht oder nur unvollständig verstanden.

1.2.1 Diagnostik und Epidemiologie

Die slgMID ist definiert als Dysgammaglobulinämie mit einem isoliert niedrigen IgM-Serumspiegel. Dabei sollten keine weiteren Immundefizienzen vorliegen und weitere Grunderkrankungen ausgeschlossen werden, die zu einer sekundären IgM-Defizienz führen könnten. Ein einheitlich definierter Grenzbereich besteht nicht, vorgeschlagen wurden Werte <0,2-0,3 g/l bei Erwachsenen, <0,2 g/l bei Kindern, <2 Standardabweichungen bzw. <10 % des altersangepassten Mittels (82, 83). In der klinischen Praxis der Immundefekt-Ambulanz für Erwachsene der Charité – Universitätsmedizin Berlin, wo diese Arbeit durchgeführt wurde, wird die Diagnose bei Erwachsenen gemäß der Richtwerte des assoziierten Labors nach dreimaliger Messung von Werten <0,4 g/l innerhalb eines halben Jahres gestellt.

Die Angaben zur Prävalenz differieren in der Literatur je nach untersuchter Population. In einem allgemeinen Gesundheitsscreening mit zufälligen Probanden lag die Prävalenz einer kompletten SIgMID bei 1,68 %, unter Kindern bei 0,03 % (84). Unter hospitalisierten Patienten lag die Prävalenz von erniedrigten, aber nachweisbaren IgM-Spiegeln zwischen 0,1-3,8 % (85-88) und unter Immundefektpatienten lag bei 6 % der Erwachsenen und 2,1 % der Kinder eine SIgMID vor (89, 90). In einer 155 erwachsene SIgMID-Patienten einschließenden Gesamtbetrachtung lag das Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zwischen 18 und 87 Jahren, im Mittel bei 45,6 Jahren (82).

1.2.2 Klinische Manifestation, Therapie und Prognose

Die Diagnose einer slgMID erfolgt in der Regel im Rahmen einer immunologischen Grunduntersuchung, die wegen der auffälligen Häufung von Infektionen oder anderen Begleiterscheinungen veranlasst wird. Die häufigsten Manifestationen bzw. Präsentationen sind Infektionen, Allergien und Asthma bronchiale, Autoimmunkrankheiten und maligne Erkrankungen, sowie gastrointestinale Beschwerden. Bei Kindern treten Infektionen häufig auf, während Allergien, Autoimmunität und Malignome selten sind (91). Im Erwachsenenalter werden diese Manifestationen dann ebenfalls häufiger (82, 92).

An erster Stelle stehen bei einem Großteil der Betroffenen rezidivierende oder chronische bakterielle, virale, Pilz- und Protozoen-Infektionen. Insbesondere die oberen und unteren Atemwege sind betroffen: Akute und chronische Rhinosinusitis, Otitis media, Bronchitis, Bronchiektasie und Pneumonie sind typische Krankheitsbilder (82, 89, 92). Des Weiteren wurde über Hautinfektionen und -abszesse, Leberabszesse, Harnwegsinfektionen, Aspergillose, chronischen Soor, Meningitis, Diarrhoe, Cholangitis, Hepatitis, Sepsis und Anaphylaxie berichtet (82, 83, 85, 86, 88, 92-100). Die Angaben zum prozentualen Auftreten der Symptome differieren stark, abhängig von der untersuchten Kohorte oder der Auswertungsmethodik. Unstrittig sind die Atemwegsinfektionen am häufigsten, zwischen 25 und 64 % (82) bzw. 67 % (10 von 15 Patienten) (92) der Patienten sind betroffen, bei Kindern sogar 78 % (91).

Autoimmunkrankheiten werden bei 3-14 % (82) bzw. 20 % (92) beobachtet. Am häufigsten scheinen systemischer Lupus erythematodes und rheumatoide Arthritis zu sein. Außerdem wurden beschrieben:

Hashimoto-Thyreoiditis, Morbus Crohn, Zöliakie, Vitiligo, Polymyositis, Psoriasis, autoimmunhämolytische Anämie, idiopathische thrombozytopenische Purpura (82, 92, 101-107).

Im Zusammenhang mit SIgMID ist vereinzelt auch über maligne Neoplasien berichtet worden. Neben einigen hämatologischen Erkrankungen wie Non-Hodgkin-Lymphom, multiples Myelom, primär kutanes anaplastisches großzelliges Lymphom, Promyelozytenleukämie waren auch solide Tumoren wie hepatozelluläres Karzinom, gastrales Leiomyom und Klarzellsarkom darunter (108-111).

Ein weiterer Symptomenkomplex wurde bei mehreren SIgMID-Patienten beschrieben. So zeigten in einer Untersuchung 28 % der Patienten eine Fatigue-Symptomatik mit Myalgien und Arthralgien (92). Die Angaben zum Vorliegen einer atopischen Diathese liegen bei 33 % für allergische Erkrankungen allgemein und für den Komplex Asthma/allergische Rhinitis bei 25 % (89), bzw. 36 und 47 % (82, 89). Damit liegen die Zahlen im Bereich des Bevölkerungsdurchschnitts bzw. etwas darüber (112).

Eine systembezogene Häufung von Beschwerden zeigt sich bei der Betrachtung klinischer Manifestationsformen, wenn man das Hauptaugenmerk auf betroffene Körperbereiche richtet. So sind die respiratorischen Schleimhäute besonders stark von Infektionen betroffen. Das gastrointestinale System – in diesem Bereich treten Beschwerden bei SIgMID-Patienten ebenfalls gehäuft auf (82) – ist in pathogenetischer Hinsicht gruppenübergreifend betroffen. So können Diarrhoen Folge infektiöser Geschehen, autoimmunologischer Phänomene (Morbus Crohn, Zöliakie), von Allergien oder Nahrungsmittelunverträglichkeiten sein. Auch zahlreiche dermatologische Manifestationen mit infektiösem oder autoimmunologischem Hintergrund wurden beschrieben: Tiefe Hautabszesse, rezidivierende Impetigo contagiosa, Pyoderma gangraenosum, disseminierte Mollusca contagiosa, kutane lymphoproliferative Störungen, Epidermodysplasia verruciformis (82, 97, 108, 113-115). Eine häufige Beteiligung der äußeren und inneren Körperoberflächen lässt sich aus dieser Perspektive also festhalten.

Der Anteil asymptomatischer Individuen mit SIgMID wurde in unterschiedlichen Kohorten auf 4 bzw. 19 % bestimmt. In anderen Patientengruppen waren alle Untersuchten symptomatisch (82), was bei behandlungsbedürftigen Patienten selbsterklärend und somit auf die Art der Aquirierung zurückzuführen ist. Daten zu verminderten IgM-Spiegeln in der Gesamtbevölkerung mit Berücksichtigung der Symptomatik liegen nach Wissen des Autors nicht vor.

Die SIgMID für sich ist keine lebensbedrohliche Erkrankung. Die Prognose der Patienten variiert jedoch entsprechend der klinischen Manifestation, vor allem mit dem Ausmaß der Folgeerkrankungen bei rezidivierenden Atemwegserkrankungen oder schwerwiegenden Infektionsgeschehen und mit dem Auftreten anderer SlgMID-assoziierter Erkrankungen wie Autoimmunkrankheiten oder malignen Neoplasien.

Bei Infektionen wird meist ein gutes Ansprechen auf antibiotische Therapien beobachtet, so dass eine prophylaktische Gabe in der Regel nicht notwendig ist. Vereinzelt werden aufgrund der chronischen

Infektions- und Entzündungsvorgänge bei Sinusitiden Nasennebenhöhlen-Operationen erforderlich (82). Eine Immunglobulinsubstitution (intravenöses oder subkutanes gepooltes IgG) gehört bislang nicht zur Standarttherapie, Patienten können allerdings davon profitieren (92, 104).

1.2.3 Lymphozytäre Charakterisierung

Die Heterogenität der klinischen Manifestationen und assoziierter Erkrankungen legt eine heterogene Pathogenese nahe. Hinsichtlich der pathogenetischen Mechanismen werden in der Literatur neben den genetischen Faktoren auch experimentell beschriebene funktionelle Defekte diskutiert. Verschiedene phänotypische und funktionelle Charakterisierungen von Lymphozyten wurden durchgeführt, die unterschiedliche Interpretationen und Erklärungsansätze erlauben. Entsprechend werden verschiedene zelluläre Pathomechanismen diskutiert. Die Mehrheit der Patienten hat normale CD19⁺, CD20⁺ und IgM⁺ B-Zell-Werte (92, 93), es wurde aber auch über Patienten mit erniedrigten B-Zellen berichtet (92). Das CD4/CD8-Verhältnis war bei einigen Patienten erniedrigt (116-118). Bei der Untersuchung von Patienten mit variablem Immundefektsyndrom (engl. *Common Variable Immunodeficiency Syndrome, CVID*) fiel in einer Untersuchung die Korrelation von erniedrigten B1-B-Zellpopulationen mit erniedrigten IgM-Spiegeln auf. Bei dem Syndrom sind stets mehrere Ig-Isotypen und Gedächtnis-B-Zellen vermindert, die Korrelation wurde indes exklusiv für B1-Zellen und IgM gezeigt (119).

Einige wenige Studien lassen einen intrinsischen B-Zelldefekt vermuten. Während die Expression von Oberflächen-IgM auf peripheren B-Lymphozyten normal war (116-118), zeigte sich bei der *in vitro* Stimulation der B-Zellen mit SAC ein Ausbleiben der IgM-Produktion bei ausgeprägter IgG- und IgA-Produktion (118) bzw. nach *in vitro* Stimulation mit SAC und IL-2 eine subnormale IgM- und IgG-Produktion bei normalem IgG-Serumlevel (101).

Andere Untersuchungen weisen auf T-Zelldefekte hin. Oberflächen-IgM-exprimierende B-Zellen zeigten in der Ko-Kultur mit T-Zellen desselben Patienten unter PWM eine verminderte IgG-, IgA- und IgM-Produktion, die sich mit T-Zellen gesunder Kontrollen normalisierte. Dies wurde auf eine reduzierte Aktivität der CD4⁺ T-Helferzellen zurückgeführt, da *in vitro* keine erhöhte Suppressorfunktion vorlag (120). Eine weitere Studie zeigte teilweise erhöhte Suppressor-T-Zell-Populationen und erhöhte Suppressor-Aktivität, einen umgekehrten CD4/CD8-Quotienten und eine spezifisch verminderte IgM-Antwort auf die Stimulation mit Pokeweed-Mitogen. Daraus wurde die pathogenetische Beteiligung von Suppressor-T-Zellen bei einigen, aber nicht allen Patienten, abgeleitet (117). Auch die Kombination aus fehlender Helfer-Aktivität und gesteigerter Suppression wurde beschrieben (121). Weniger spezifische Untersuchungen zeigten eine leicht verminderte proliferative Aktivität von peripheren mononukleären Zellen als Antwort auf *in vitro* Stimulation mit Mitogenen und Antigen. Dieser Befund zeigte sich hier bei 78 % der untersuchten Patienten (92).

1.2.4 Genetische Assoziationen und sekundäre IgM-Defizienz

Genetische oder molekulare Grundlagen konnten bisher nur in Einzelfällen nachgewiesen werden. Es treten familiäre Fälle der SlgMID auf, mit Betroffenen in mehreren Generationen (93). Vereinzelte Berichte über Zusammenhänge mit Chromosomenanomalien wie Deletionen auf den Chromosomen 1 und 18, sowie die Deletion von 22q11.2 liegen vor (122-124). Die 22q11.2-Region liegt im Bereich des VDJ-Komplexes, der für die λ -Leichtkette kodiert, was als genetische Ursache für eine verminderte Ig-Sekretion diskutiert wurde (124). Die selektive IgM-Defizienz lässt sich dadurch jedoch nicht erklären. Über einige SIgMID-Fälle wurde im Zusammenhang mit Erbkrankheiten berichtet, darunter Wiskott-Aldrich-Syndrom, Bloom-Syndrom und Silver-Russel-Syndrom (91, 125, 126). Bei Patienten, die eine Mutation eines zentralen Steuerproteins im TLR-Signalling aufwiesen (engl. *Dedicator of Cytokinesis 8, DOCK8*), wurde bei allen Untersuchten ein erniedrigter IgM-Spiegel bei normalem IgG und erhöhtem IgE festgestellt. Die IgM-Antwort auf Tetanustoxin war vermindert (127).

Über sekundär bzw. transient auftretende IgM-Defizienz im Zusammenhang mit malignen Neoplasien, autoimmunologischen und gastrointestinalen Erkrankungen, sowie über möglicherweise therapeutisch induzierte Fälle wurde berichtet (114). Bei Zöliakie-Patienten mit SIgMID wurde unter Gluten-freier Diät ein Anstieg der IgM-Serumspiegel beobachtet (87, 128, 129).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Analyse der vorhandenen Literatur zur SIgMID zeigt, dass bisherige Arbeiten nur die Funktion der Gesamt-B-Zellen untersuchten, während die verschiedenen Subpopulationen nicht berücksichtigt wurden. Klinische Charakterisierungen wurden bislang überwiegend in Fallberichten sowie an kleineren Patientenkohorten durchgeführt.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist die weitergehende immunologische Charakterisierung von Patienten mit SIgMID:

- Die klinische Charakterisierung von SIgMID-Patienten Neben der experimentellen Analyse werden das klinische Beschwerdebild sowie Routinelaborparameter erfasst.
- Die phänotypische Charakterisierung der B- und T-Zellen von SIgMID-Patienten Dies schließt die Erfassung der B-Zell-Subpopulationszugehörigkeiten mit Zellzahlen und Verhältnissen der Zelltypen untereinander ein, sowie Aussagen zum Aktivierungs- und Funktionsstatus über Oberflächenmarker. T-Zellen sollen erstmals hinsichtlich der Verteilung wichtiger Subpopulationen erfasst werden.
- 3. Die funktionelle Charakterisierung der B-Zellen

Mittels *in vitro* Stimulation soll die Expansion und Differenzierungsfähigkeit von B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Zellen untersucht werden. Dabei werden durch den Einsatz verschiedener Stimulationsprotokolle die unterschiedlichen Aktivierungswege der B-Zellen und der Einfluss patienteneigener T-Zellen beleuchtet.

Ziel der Untersuchung soll ein besseres Verständnis der zellulären und molekularen Mechanismen der SIgMID sein. So könnten quantitative Veränderungen der B-Zellsubpopulationen, Auffälligkeiten in der Markerexpression, der Expansion, Differenzierung und dem Antikörper-Sekretionsverhalten Hinweise auf pathogenetisch relevante Ursachen der IgM-Defizienz geben. Die Identifizierung dieser immunologischen Defekte soll schließlich der Entwicklung und Etablierung effektiver Therapiemöglichkeiten dienen.

2. Material

2.1 Patienten und gesunde Kontrollprobanden

Die untersuchten SIgMID-Patienten wurden akquiriert über die Immundefekt Ambulanz für Erwachsene der Charité – Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. med. Carmen Scheibenbogen. Die Patienten wurden durch das betreuende ärztliche Personal aufgeklärt und gaben im Vorfeld der Blutabnahme und der anschließenden Untersuchungen eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Ein entsprechendes Ethikvotum mit dem Titel "Umfassende immunologische Untersuchungen von erwachsenen und pädiatrischen Patienten mit Immunglobulin-Synthesestörungen" liegt vor. Es wurden 30-50 ml peripheres Blut von insgesamt elf Patienten in Natriumcitrat-Vakuumblutabnahmeröhrchen abgenommen.

Die Patienten wurden ausgewählt nach Verfügbarkeit und Erfüllen des Einschlusskriteriums einer dreimaligen Messung von Serum-IgM-Werten unter 0,4 g/l in einem Abstand von jeweils drei Monaten. Ausschlusskriterium war das Vorliegen weiterer immunologischer Diagnosen. Insbesondere das Vorliegen eines Variablen Immundefektsyndroms bei dem eine IgM-Immundefizienz mit einem Mangel weiterer Antikörperklassen sowie erniedrigten Werten von Gedächtnis-B-Zellen einhergehen kann, führte zum Ausschluss. Zwei eingeschlossene Patienten zeigten einen additiven Mangel von Immunglobulinen der Klasse G3 (IgG3).

Das mittlere Alter der elf Patienten zum Zeitpunkt der Blutabnahme zwecks zellulärer Charakterisierungen betrug 39 Jahre (Spannweite 22-63, Median 42 Jahre). Sieben Patienten waren weiblich, vier männlich. Zwei Patienten erhielten zum Zeitpunkt der Untersuchung eine subkutane Substitutionstherapie mit gepooltem IgG (Subcuvia®), zweimal wöchentlich 20 ml. Ein Patient erhielt eine intravenöse Substitutionstherapie mit gepooltem IgG, IgM und IgA (Pentaglobin®) in zweiwöchentlichen Intervallen. Neben einem bei manchen Patienten vorliegenden chronischen Infektionsgeschehen lagen aktuell keine zusätzlichen akuten Infektionen vor. Nicht bei allen Patienten wurden sämtliche Untersuchungen durchgeführt.

Zur Generierung von Vergleichsdaten für die durchgeführten Untersuchungen wurde peripheres Blut von insgesamt 20 klinisch gesunden Probanden gewonnen. Die Auswahl erfolgte nach Altersmatching und Verfügbarkeit. Das mittlere Alter lag bei 39 (Spannweite 22-59, Median 41 Jahre), das Geschlechterverhältnis von weiblich zu männlich bei elf zu neun. Nicht bei allen Probanden wurden sämtliche Untersuchungen durchgeführt.

Nach Erhalt der Blutproben wurden die Untersuchungen möglichst zeitnah am selben Tag durchgeführt. Eine Blutprobe eines auswärtigen Patienten wurde über Nacht übermittelt und anschließend umgehend den Untersuchungen zugeführt. Die Aufarbeitung des Blutes wurde unter sterilen Bedingungen in einem gentechnischen S1-Labor durchgeführt.

2.2 Geräte

Abzug Airflow Control	Arge, Wathlingen, Deutschland
Brutschrank Forma Steri-Cycle	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Durchflusszytometer LSR II Fortessa	BD Biosciences, New Jersey, USA
Elektronische Semi-Mikrowaage	Sartorius Research, Göttingen, Deutschland
ELISpot Reader ImmunoSpot®	CTL Analyzers, Ohio, USA
Gefrierschrank -80 °C UF755G	Dometic Medical Systems, Hosingen, Luxemburg
Gefrierschrank Premium NoFrost GN2553	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kleinschüttler MS1 Minishaker	IKA, Staufen, Deutschland
Kühl-Gefrierschrank-Kombination	Siemens, Berlin/München, Deutschland
Kühl-Gefrierschrank-Kombination KGK2833	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank	Lec, Prescot, United Kingdom
Mikropipetten (0,5-10, 10-100, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop BX 300	Will, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Labovert	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Milli-Q Labwater Purification System	Merck Millipore, Massachusetts, USA
Multipipette (50-300 µl)	VWR, Pennsylvania, USA
Nalgene® 1 °C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Pipettierhilfe Pipetus® Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Schüttler KM-2 Akku	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Sterilbank HERAsafe® (Klasse II)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Sterilbank LaminAir 2010 1.2 (Klasse II)	Heto-Holten, Allerød, Dänemark
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer Reax top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad WBT12	Medingen, Arnsdorf, Deutschland
Zellzählkammer Neubauer (0,1 mm/0,0025 mm ²)	Laboroptik, Lancing, United Kingdom
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

2.3 Verbrauchsmaterialien

96-well MultiSreen HTS IP Filter Plate	Millipore, Massachusetts, USA
EDTA-Röhrchen Vacutainer®	BD Biosciences, New Jersey, USA

FACS-Röhrchen (5 ml, Polystyrene)	BD Biosciences, New Jersey, USA	
Kryotubes (1,6 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	
Reagiergefäße SafeSeal® (0,5 ml, 1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	
Rundbodenplatte 96-Well (Polystyrene)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	
Safety-Lok [™] Blood Collection Set	BD Biosciences, New Jersey, USA	
SealPlate® Adhesive Sealing Films	EXCEL Scientific, California, USA	
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	BD Biosciences New Jersey USA	
Falcon®	bb biosciences, new jersey, USA	
Spritzen 5ml Discardit II TM	BD Biosciences, New Jersey, USA	
Transferpipette (3,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	
Whatman [®] Spritzen-Filter (0,2 µm)	Whatman, Dassel, Deutschland	
Zellkulturplatte Falcon® 24-well plate	BD Biosciences, New Jersey, USA	
Zentrifugenröhrchen Falcon® (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences, New Jersey, USA	
Zitratröhrchen Vacutainer®	BD Biosciences, New Jersey, USA	

2.4 Kits

Qiagen QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland
BD Compbeads	BD Biosciences, New Jersey, USA
BD Cytofix/Cytoperm Kit	BD Biosciences, New Jersey, USA
Live/Dead Fixable Violet Kit 405 nM exc.	Invitrogen, Oregon, USA
RosetteSep® CD3-Depletion-Kit	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada

2.5 Reagenzien und Chemikalien

3-Amino-9-Ethylcarbazol (Tabletten)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
AB Serum (human)	Valley Biomedical, Virginia, USA
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe, Germany
Ampuwa Wasser für Injektionszwecke	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Biocoll Trennlösung	Biochrom, Berlin, Deutschland
Dimethylsulfoxid (100 %)	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, New Jersey, USA
Dulbecco's PBS (1x)	Life Technologies, California, USA
EDTA-Dinatrium-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
FACS Clean	BD Biosciences, New Jersey, USA
FACS Flow	BD Biosciences, New Jersey, USA
FACS Rinse	BD Biosciences, New Jersey, USA
FCS (Fötales Kälberserum, Hitze-inaktiviert)	PAA, New Jersey, USA
Flebogamma, humanes IgG	BioTest, Dreieich, Deutschland
$H_2O_2(3\%)$	Charité, Berlin, Deutschland

IMDM Medium (+L-Glutamin)	PAA, New Jersey, USA
ITS (5 µg/ml Insulin & Transferrin, 5 ng/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Selenium)	
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAA, New Jersey, USA
RPMI 1640 Medium (+L-Glutamin)	PAA, New Jersey, USA
Steptavidin HRP	Biolegend, California, USA
Trypanblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20 Detergent	Calbiochem, California, USA

2.6 Zytokine und Elispotreagenzien

CpG ODN 2006	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Zellwandpolysaccharid, CWPS	Statens Serum Institute, Kopenhagen, Dänemark
Humaner rekombinanter CD40-Ligand	R&D Systems, Minnesota, USA
Pneumokokken-Polysaccharid Typ 19F	ATCC, Virginia, USA
Pneumokokken-Polysaccharid Typ 22F	ATCC, Virginia, USA
Pokeweed Mitogen Extrakt	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Rekombinantes humanes IL-10 (0,5-2,0 ng/ml)	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
Rekombinantes humanes IL-2	R&D Systems, Minnesota, USA
Rekombinantes humanes IL-21 (biol. Aktivität ≤	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
5 ng/ml)	
Staphylokokkus aureus Cowan I	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tetanus-Adsorbat-Impfstoff "Mérieux"	Sanofi Pasteur MDS, Lyon, Frankreich

2.7 Puffer und Medien

Einfriermedium	IMDM, 40 % AB Serum, 10 % DMSO
0,1 M Acetat-Puffer (pH 5,0)	Destilliertes Wasser, 0,17 % Essigsäure (100 %),
	35,2 % Natriumacetat-Lösung (0,2 M)
AEC-Lösung	1 Tablette AEC, 2 ml N,N-Dimethylformamid
AEC-Puffer	0,1 M Acetatpuffer, 3,3 % AEC-Lösung, 1%
	$H_2O_2(3\%)$
FACS-Puffer	1x PBS, 2 % Flebogamma
FACS-Puffer für fixierte, permeabilisierte Zellen	Milli-Q-Wasser, 10 % Wash Buffer (BD Cytofix)
IMDM-Stimulationsmedium	IMDM, 10 % FCS, ITS 0,1 %
IMDM-Stimulationsmedium + CD40L, IL-2, IL- 10, IL-21	IMDM-Stimulationsmedium, CD40L 1 µg/ml,
	IL-2 300 units/ml, IL-10 12,5 ng/ml, IL-21 500
	ng/ml
IMDM-Stimulationsmedium + CpG	IMDM-Stimulationsmedium, CpG 1,25 µg/ml
IMDM-Stimulationsmedium + CpG, CD40L, IL-	IMDM-Stimulationsmedium, CpG 1,25 µg/ml,

2, IL-10, IL-21, SAC, PWM ("Vollstimulation")	CD40L 1 µg/ml, IL-2 300 units/ml, IL-10 12,5
	ng/ml, IL-21 500 ng/ml, SAC 20 µg/ml, PWM 10
	µg/ml
IMDM-Stimulationsmedium + SAC, PWM	IMDM-Stimulationsmedium, SAC 20 µg/ml,
	PWM 10 µg/ml
RPMI-FCS-P/S-Medium	RPMI, 10 % FCS, 1 % P/S
Waschpuffer	PBS, 0,05 % Tween 20, 1 % Albumin Fraktion V

2.8 Antikörper, Isotypkontrollen und Fluorochrome

CD268 (BAFF-R) FITC	Biolegend, California, USA
CD11c AF700	BD Biosciences, New Jersey, USA
CD14 Pacific Blue	Biolegend, California, USA
CD16 Pacific Blue	Biolegend, California, USA
CD178 FITC	Abcam, Milton, United Kingdom
CD183 (CXCR3) PE-Cy7	BD Biosciences, New Jersey, USA
CD184 (CXCR4) PE	Biolegend, California, USA
CD185 (CXCR5) PE	R&D Systems, Minnesota, USA
CD19 V500	BD Biosciences, New Jersey, USA
CD197 (CCR7) FITC	R&D Systems, Minnesota, USA
CD20 AF700	Biolegend, California, USA
CD24 PerCP-Cy5.5	BD Biosciences, New Jersey, USA
CD267 (Taci) PE	Biolegend, California, USA
CD27 AlexaFluor700	Biolegend, California, USA
CD27 eFluor650NC	eBioscience, California, USA
CD27 PE	BD Biosciences, New Jersey, USA
CD3 eFluor650NC	eBioscience, California, USA
CD3 Pacific Blue	BD Biosciences, New Jersey, USA
CD303 APC	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD38 APC	Biolegend, California, USA
CD38 FITC	Biolegend, California, USA
CD43 FITC	Biolegend, California, USA
CD45 Pacific Blue	Biolegend, California, USA
CD70 PE	BD Biosciences, New Jersey, USA
CD86 PE-Cy7	Biolegend, California, USA
CD95 PE-Cy7	Biolegend, California, USA
HLA-DR PE	Biolegend, California, USA
HLA-DR PerCP Cy5.5	Biolegend, California, USA
IgD APC-H7	BD Biosciences, New Jersey, USA
IgM APC	Biolegend, California, USA
Mouse IgG1 FITC (Isotypkontrolle)	Biolegend, California, USA
Mouse IgG1 PE Cy7 (Isotypkontrolle)	Biolegend, California, USA
Mouse IgG2a PE (Isotypkontrolle)	Biolegend, California, USA
Mouse IgG2a PerCP Cy5.5 (Isotypkontrolle)	Biolegend, California, USA

Mouse IgG2b FITC (Isotypkontrolle)	Biolegend, California, USA
Mouse IgG2b PE Cy7 (Isotypkontrolle)	Biolegend, California, USA
Propidiumiodid	Biolegend, California, USA

2.9 Software

CTL Switchboard 2.5	CTL Analyzers, Ohio, USA
EndNote Web basic	Thomson Reuters, New York, USA
EndNote X5	Thomson Reuters, New York, USA
FACSDiva [™] Software Version 6.2	BD Biosciences, New Jersey, USA
FlowJo Version 9.5.3 und 9.6.1	Tree Star, Oregon, USA
GeneTalk	GeneTalk, Berlin, Germany
GraphPad Prism Version 5.00.288	GraphPad Software, California, USA
ImmunoCapture [™] 6.4	CTL Analyzers, Ohio, USA
ImmunoSpot® 5.1	CTL Analyzers, Ohio, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Washington, USA
Microsoft Power Point 2010	Microsoft Corporation, Washington, USA
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, Washington, USA
SAP ERP 6.0 (EHP 4)	SAP, Walldorf, Deutschland

3. Methoden

3.1 Erhebung klinischer Patientendaten

Für die Erhebung klinischer Daten von 21 SIgMID-Patienten wurde auf die ärztliche und laborchemische Dokumentation zurückgegriffen, die im Rahmen der fachärztlichen Behandlung in der Immundefekt-Ambulanz für Erwachsene des Instituts für Medizinische Immunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt wurde. So weit verfügbar, wurden Informationen zu diesen Patienten den Arztbriefen und Verlaufsdokumentationen entnommen. Wie auch die laborchemischen Parameter wurden diese Informationen über die klinische Informationssoftware von SAP[®] eingesehen oder, insbesondere bei älteren Daten, den Krankenakten entnommen. Bei der Sichtung der Daten wurde das Hauptaugenmerk auf die klinische Präsentation mit Symptomatik und subjektivem Beschwerdebild, Krankheitsverlauf und Komorbiditäten gerichtet. Außerdem wurden die gemessenen Immunglobulinspiegel erfasst.

3.2 Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) wurden steril aus Zitratblut durch eine Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wurde verdünntes Vollblut auf eine Biocoll-Trennlösung (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gebracht. Diese enthält Polysucrose, ein Polymer mit einem Molekulargewicht von etwa 400 kDa und einer spezifischen Dichte von 1,077 g/ml. Plasma und mononukleäre Zellen (B-, T-Zellen, Monozyten, natürlichen Killerzellen) haben eine geringere spezifische Dichte als die Trennlösung, Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen hingegen eine höhere. Durch Zentrifugation kann daher eine Separation der Komponenten im Blut entlang des Dichtegradienten erfolgen.

Das Zitratblut wurde zunächst im Verhältnis 1:1 mit 1x PBS gemischt. Anschließend erfolgte die vorsichtige Überschichtung der Zellsuspension auf 15 ml Biocoll-Trennlösung und eine Zentrifugation ohne Dezeleration mit 2000 UpM für 15 min bei Raumtemperatur (RT). Danach wurden die PBMCs zwischen Plasma- und Biocollschicht mit einer Transferpipette abgenommen, zum Waschen in 50 ml 1x PBS suspendiert und 10 min bei 1300 UpM, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und mit dem für einen zweiten Waschschritt in 50 ml 1x PBS resuspendierten Zellpellet nach gleichem Vorgehen erneut zentrifugiert. Nun wurden die Überstände verworfen und die pelletierten Zellen in 10 ml RPMI, 10 % FCS, 1 % P/S resuspendiert.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Zellzählkammer von Neubauer (0.1 mm/0.0025 mm²) unter dem Lichtmikroskop, dafür wurden 5 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau (1:1 mit 1x

PBS vorverdünnt) gemischt auf den Objektträger gebracht. Trypanblau färbt Zellen mit beschädigter Membran und Detritus blau an, was den Ausschluss abgestorbenen Zellmaterials bei der Zählung ermöglicht.

Der bei der Dichtegradientenzentrifugation entstandene Plasma-PBS-Überstand wurde mit einer serologischen Pipette abgenommen und bei -20 °C für spätere Analysen konserviert.

Die Zellen wurden unmittelbar im Anschluss den Vorbereitungen zur durchflusszytometrischen Analyse bzw. der Zellkultur zugeführt.

3.2.1 Kryokonservierung von PBMCs

Für spätere Analysen wurden PBMCs kryokonserviert. PBMCs wurden in einer Dichte von 1x10⁷ Zellen/ml mit kaltem Einfriermedium (IMDM, 40 % AB Serum, 10 % DMSO) versetzt und in Kryotubes überführt, die dann in einem vorgekühlten Isopropanol-Einfriercontainer (1 °C Temperaturabnahme/min) bei -80 °C gelagert werden konnten. Zur längeren Konservierung wurden die Proben in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.2 T-Zell-Depletion von PBMCs

Um die Stimulation von B-Zellen unter Ausschluss regulatorischer Einflüsse durch T-Zellen durchführen zu können, wurde mit einem Teil des Blutes eine CD3-Depletion durchgeführt. Mit Hilfe des RosetteSep® CD3-Depletion-Kits wurden T-Zellen weitestgehend depletiert. Der Depletionscocktail enthält Antikörper-Tetramere, die gegen das T-Zell-Antigen CD3 und das erythorozytäre Antigen Glycophorin A gerichtet sind. Während der 20-minütigen Inkubation von 10 ml Vollblut mit 500 µl Depletionscocktail bei RT wurden T-Zellen über die Tetramere an Erythorzyten gekoppelt. Die anschließende Verdünnung und Dichtegradientenzentrifugation wurde wie unter Punkt 3.2 beschrieben durchgeführt, wobei die Erythrozyten-T-Zell-Komplexe dem höheren Gradienten folgend mit den übrigen Erythrozyten pelletierten und nicht oberhalb des Trennmediums verblieben. Im Mittel lag der Anteil von T-Zellen an den CD3-depletierten PBMCs bei 0,49 % (Median 0,04 %, Spannweite 0,006-2,8 %).

3.3 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie konnten relativ-quantitativ verschiedene B-Zellpopulationen im Blut nach vorhergehender Antikörperfärbung bestimmt werden. Durch separate Bestimmung von Zellzahlen (Differentialblutbild) durch ein externes Labor (Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH, Berlin) konnten
daraus absolut-quantitative Werte errechnet werden. Die Messungen erfolgten am LSR II Fortessa und wurden anschließend mit dem Computerprogramm FlowJo ausgewertet.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse (engl. *Fluorescence Activated Cell Sorting*) beruht auf der Analyse verschiedener chemisch-biologischer und physikalischer Eigenschaften von Zellen auf Einzelzellebene. Dabei wird statistisch stets nur eine Zelle in einem hydrodynamisch fokussierten Flüssigkeitsstrom in einer hochpräzisen lichtdurchlässigen Küvette durch einen Laserstrahl geleitet. So ist es möglich, gleichzeitig mehrere physikalische sowie (artifizielle) Fluoreszenz-Parameter einzelner Zellen nacheinander quantitativ zu bestimmen. Solange der direkt auf den Flüssigkeitsstrom gerichtete Laserstrahl von Zellen oder Partikeln ungehindert auf den Detektor trifft, entsteht kein Streulicht. Durchquert hingegen eine Zelle den Strahl, wird das Licht in verschiede Richtungen gestreut. Gemessen wird das Streulicht in der Regel an zwei Stellen. Der Detektor des Vorwärtsstreulichtes (engl. *Forward Scatter*, FSC), welcher dem Laserstrahl direkt gegenüber positioniert ist, misst die Beugung des Lichts im flachen Winkel. Daraus ergibt sich die Größe der Zelle und somit das Zellvolumen. Mit dem Detektor für das Seitwärtsstreulicht (engl. *Sideward Scatter*, SSC), der sich in einem Winkel von 90° zum Laserstrahl befindet, kann neben der Größe auch die Granularität der Zelle bestimmt werden. Anhand dieser Informationen ist in der Analyse bereits eine gute Auftrennung der verschiedenen Zelltypen des menschlichen Blutes möglich.

Neben diesen natürlichen physikalischen Eigenschaften können über fluorochrom-konjugierte Antikörper Zellen gezielt auf oberflächliche oder intrazelluläre Antigene untersucht werden. Dies ist die Grundlage für antigengestützte Phänotypisierungen jeglicher Art. Die spezifischen Antikörper binden an das zu detektierende Antigen, die konjugierten Fluorochrome können durch monochromatisches Licht angeregt werden und die emittierte Fluoreszenz ist wiederum auf Einzelzellebene messbar. Es werden auch ungekoppelte Fluorochrome eingesetzt, die aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften spezifische Bindungen eingehen. Optional hinzufügbare Laser, Spiegel, Filter und Detektoren ermöglichen zusammen mit dem Einsatz verschiedener Fluorochrome die Messung von Fluoreszenzsignalen unterschiedlicher Spektren und somit die synchrone Analyse multipler Zelleigenschaften. Durch die Analyse einer großen Anzahl von Zellen innerhalb eines sehr kurzen Zeitintervalls (bis zu 10000 Zellen/s) ergeben sich vielfältige Informationen über gesamte Zellpopulationen.

Da sich beim Einsatz mehrerer Fluorochrome mit unterschiedlichen Emissionsspektren bei der Mehrfarbenanalyse die Spektren teilweise überschneiden, muss vor einer Messung eine Kompensation durchgeführt werden. Dabei wird die Streuung verschiedener Farben in das Spektrum anderer Farben erkannt und rechnerisch korrigiert.

3.3.1 Immunfärbungen zur phänotypischen Charakterisierung von B- und T-Zellsubpopulationen und dendritischen Zellen mittels Durchflusszytometrie

Das Prinzip der phänotypischen Charakterisierung von Leukozyten per Durchflusszytometrie basiert auf der Markierung systematisch ausgesuchter leukozytärer Antigene, deren Expression einzeln oder in Kombination mit weiteren Antigenen den zu bestimmenden Zelltyp definiert. Mit spezifischen Antikörpern, in dieser Untersuchung ausschließlich murin, werden die gewünschten Antigene markiert und über antikörperkonjugierte Fluorochrome vom Durchflusszytometer detektiert. Durch die Anfärbung mehrerer Antigene auf einer Zelle kann diese gleichzeitig mehreren Populationen bzw. Subpopulationen zugeordnet oder anderweitig charakterisiert werden.

Die phänotypische Charakterisierung von B-Zellsubpopulationen wurde durchgeführt mit unstimulierten PBMCs am Tag der Blutabnahme sowie mit PBMCs nach verschiedenen siebentägigen *in vitro* Stimulationen. Zusätzlich wurden in den unstimulierten PBMCs T-Zellsubpopulationen, plasmazytoide und myeloide dendritische Zellen bestimmt und auf den B-Zellen sowie B-Zellsubpopulationen verschiedene Reifungs-, Differenzierungs- und Aktivierungsmarker nachgewiesen.

Unstimulierte PBMCs wurden im Anschluss an die Zellzählung zu etwa 1×10^6 Zellen pro Well (engl. Loch) einer 96-Well-Rundbodenplatte verteilt, wobei in jedem Well eine Färbung durchgeführt wurde. Die Zellsuspension wurde 1 min bei 1500 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die menschlichen Immunglobuline des Flebogamma besetzen freie Fc-Rezeptoren auf den Zellen und sollen so unspezifische Bindungen der spezifischen murinen Antikörper der anschließenden Immunfärbung verhindern. Diese Blockierung wurde für 20 min bei 4 °C, dunkel durchgeführt.

Stimulierte PBMCs wurden nach erfolgter Zellzählung und Volumenmessung des Überstands in 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und 10 min bei 1300 UpM abzentrifugiert. Die Überstände wurden zur späteren Analyse bei -20 °C eingefroren, zur Lagerung später in -80 °C überführt. Die Zellen wurden nun ebenfalls zur 20-minütigen Blockierung bei 4 °C, dunkel in 100 μ l FACS-Puffer je Stimulation und Well einer 96-Well-Rundbodenplatte aufgenommen. Die Zellzahl je Stimulation und Well war hierbei variabel, jedoch stets unter 10⁶ Zellen.

Im Anschluss an den Blockierungsschritt erfolgte die Färbung der unstimulierten und stimulierten Zellen nach dem gleichen Verfahren. Die Zellen wurden 1 min bei 1500 UpM abzentrifugiert und in 90 μ l Antikörpermix des entsprechendem Panels (s. Tab. 2) je Well resuspendiert. Die Färbung erfolgte in 30 min bei 4 °C, dunkel. Nach einer Zentrifugation für 1 min bei 1500 UpM und zweimaliger Waschung mit

100 μl FACS-Puffer wurden die Zellen in 200 μl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen (5 ml) der durchflusszytometrischen Analyse zugeführt.

Tabelle 2: Zusammenstellung der Färbungspanels. Die angegebenen Mengen in μ l beziehen sich jeweils auf ein Panel. Die Antikörperlösungen der Mastermixe und die entsprechenden panelspezifischen Antikörper wurden in FACS-Puffer zu einem Endvolumen von 90 μ l aufgenommen. mIkIgG = murine Isotypkontrolle für IgG; n. Perm. = nach Permeabilisierung und Fixierung; IgM intra. = IgM intrazellulär; CD3-Depl. = CD3-Depletion.

Antikörper/Isotypkontrolle	Mastermix 1-6	Mastermix 7-11,	Mastermix 12-	Panel 17
		14-15	13	
CD3 Pacific Blue	2,5	2,5		2,50
CD14 Pacific Blue	0,7	0,7		0,70
CD16 Pacific Blue	0,5	0,5		1,00
CD19 V500	1,25	1,25	1,25	1,25
CD27 eFluor650 NC	1,25	1,25		1,25
IgM APC	1,67			2,50
IgD APC-H7	1,25	8,75		1,25
CD38 APC		2,5		
CD24 PerCP-Cy5.5		1,25		1,25
CD3 eFluor650 NC			2,5	
CD45 Pacific Blue			2,5	
CD11c AlexaFluor 700			2,5	
CD4 FITC			0,5	
CD8 PE			0,125	
CD303 APC			5	
CD38 FITC				2,5

Antikörper/Isotypkontrolle	Panel 1, 2	Panel 3, 4, 9, 10	Panel 5, 6, 11
CD20 AlexaFluor 700	0,5		
CD70 PE	20		
CD43 FITC	2,5		
HLA-DR / mIkIgG2a PerCP-	2.5		
Cy5.5	2,5		
CD86 / mIKIgG2b PE-Cy7	5		
CD95 / mIKIgG1 PE-C7		10,0/5	
CD178 / mIKIgG2b FITC		0,5/5	
Taci PE / FMO		5	
BAFF-R / mIKIgG1 FITC			5/0,5
CXCR4 / mIKIgG2a PE			2,5/1,25
CXCR3 / mIKIgG1 PE-Cy7			5/2,5

Antikörper/Isotypkontrolle	Panel 7, 8	Panel 14, 15
HLA-DR / mIKIgG2a PE	20/2,5	
CD86 / mIKIgG2b PE-Cy7	5	
IK mouse IgG1 FITC	- /0,5	
CXCR5 / mIKIgG2b PE		10/2,5
CCR7 / mIKIgG2a FITC		10

Antikörper/Isotypkontrolle	Panel 12, 13	T-Zell-Panel	IgM intra.	CD3-Depl.
HLA-DR / mIKIgG2b PE-Cy7	2,5			
CD86 / mIKIgG2b PE-Cy7	5			
CD3 Pacific Blue		2,5	2,5	2,5
CD4 APC-H7		2,5		
CD8 PE		0,25		
CCR7 FITC		10		
CD45 RA PE Cy7		5		
CD25 APC		10		
CD19 V500			1,25	5
CD14 Pacific Blue			0,7	
CD16 Pacific Blue			1	
CD27 eFluor650 NC			1,25	
IgM APC / mIKIgG1 APC			2,5 (n. Perm.)	
IgD APC-H7			1,25	
CD38 FITC			2,5	
CD24 PerC-Cy5.5			1,25	

Um mögliche unspezifische Bindungen der Antikörper zu erkennen und falsch-positive Messergebnisse auszuschließen wurden für die markerspezifischen Antikörper entsprechende Isotypkontrollen (IK) mit gleicher Konzentration oder FMO (*Fluorescence Minus One*)-Kontrollen bei identischen Mastermixen gefärbt. IK-Antikörper sind Immunglobuline gleicher Klasse und Subklasse wie der eingesetzte Antikörper, die mit dem gleichen Fluorochrom konjugiert, jedoch nicht spezifisch für ein Antigen sind. Über die weitgehende molekulare Ähnlichkeit ohne eine Bindungsspezifität sollen mögliche unspezifische Bindungen der Antikörper durch Vergleich mit der passenden IK erkannt werden. In einer FMO-Kontrolle wird die Hintergrundfluoreszenz in einem Kanal dargestellt, die durch Spektrenüberlappung von anderen Fluorochromen ausgeht und nach erfolgter Kompensation Sensitivität und Auftrennungsschärfe vermindern kann. Dazu wird eine Probe untersucht, die identisch mit der zu analysierenden ist, abgesehen vom Fehlen des in diesem Kanal maximal aktiven Fluorochroms, mit dem das gefragte Molekül markiert werden soll. Durch Abgleich dieses Ausgangsbildes mit der eigentlichen Messung wird die Detektion insbesondere schwach exprimierter Marker erleichtert und präzisiert.

Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurden unmittelbar vor der Messung 1-2 μ l Propidiumiodid zugegeben. Propidiumiodid ist ein fluoreszierender DNA-interkalierender Farbstoff, der

die Zellmembran von toten Zellen durchdringen und so mit der DNA reagieren kann. Bei lebenden Zellen mit intakter Membran ist dies nicht möglich.

Für die Kompensation am Durchflusszytometer wurden ungefärbte Zellen sowie Kompensations-Beads verwendet, welche zuvor mit den Antikörpern separiert nach Fluorophoren gefärbt wurden. Die Messung erfolgte am LSR II Fortessa mit Hilfe der FACSDiva-Software (Version 6.2), die spätere Auswertung mit der FlowJo-Software (Versionen 9.5.3 und 9.6.1).

3.3.2 Intrazelluläre Immunfärbungen zur durchflusszytometrischen Charakterisierung der IgM-Expression von B-Zellen

Nach der Durchführung der Vollstimulationen (siehe 2.3) von T-Zell-depletierten und nicht-depletierten PBMCs erfolgte neben der oberflächlichen Phänotypisierungsfärbung eine intrazelluläre Färbung von IgM. Die Zellen wurden dafür wie oben beschrieben abzentrifugiert, je Stimulation auf zwei Wells einer 96-Well-Rundbodenplatte verteilt und in FACS-Puffer mit Flebogamma blockiert. Alle Färbungsschritte wurden bei 4 °C im Dunkeln durchgeführt. Um eine Unterscheidung von zum Färbungszeitpunkt bereits toten und noch lebenden Zellen zu ermöglichen, wurde zunächst ein Lebend/Tot-Fluorochrom (engl. *Live/Dead*, LD, 1:1000) für 20 min auf die Zellen gegeben. LD bindet an zelluläre Amine, von denen bei defekter Zellmembran toter Zellen weit mehr für das Fluorochrom zugänglich sind, als nur auf der Zelloberfläche. Durch die höhere Fluoreszensintensität in der FACS-Analyse sind tote Zellen identifizierbar.

Die Zellen wurden 1 min bei 1500 UpM abzentrifugiert und in 90 μ l Antikörpermix (s. Tab. 2) resuspendiert. Dieser Färbungsschritt erfolgte vor der Permeabilisierung der Zellmembran und diente somit als Oberflächenfärbung der späteren Identifizierung der B-Zellen bzw. der B-Zellsubpopulationen. Nach 30 min wurde wie gehabt abzentrifugiert und einfach mit FACS-Puffer gewaschen. Nun wurde laut Herstellerangabe das BD Cytofix/Cytoperm-Kit angewandt. Die Zellpellets wurden in 100 μ l der Cytofix/Cytoperm-Lösung resuspendiert und somit über 20 min gleichzeitig fixiert und permeabilisiert. Dann wurde wie gehabt zentrifugiert und zweifach gewaschen mit 200 μ l der 1:10 mit Reinstwasser (Merck Milli-Q[®]) verdünnten Perm/Wash-Lösung des Kits. Nun erfolgte die intrazelluläre Färbung von IgM durch Aufnahme in 100 μ l 1:10 Perm/Wash-Lösung mit dem Anti-IgM-Antikörper bzw. der entsprechenden IK für 30 min. Nach anschließendem zweimaligem Waschen wie im vorigen Schritt wurden die Zellen in FACS-Röhrchen (5 ml) für die FACS-Analyse überführt.

Für die Analyse der intrazellulären Färbung wurde eine gesonderte Kompensation mit ebenfalls permeabilisierten und fixierten Zellen durchgeführt. Messung und Auswertung erfolgten wie bei der konventionellen Färbung.

3.3.3 Gating-Strategien

Es wurden die in 2.2.1 aufgeführten Zusammenstellungen von monoklonalen anti-humanen Fluorochromkonjugierten Antikörpern erarbeitet (Färbe-Panels), um die gewünschten Zelltypen, Subpopulationen und zellulären Marker am Durchflusszytometer detektieren zu können. Im Folgenden wird das Vorgehen bei der durchflusszytometrischen Analyse erläutert.

3.3.3.1 B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen

Abb. 4 zeigt ein repräsentatives Beispiel für die Gating-Strategie, um B-Zellen und die zugehörigen Subpopulationen aus PBMCs zu identifizieren. Durch die Färbung mit unmittelbar vor der Analyse zugeführtem Propidium Iodid wurden zunächst tote Zellen ausgeschlossen. Lymphozyten wurden über typische Größe und Granularität in der FSC-A/SSC-A-Darstellung identifiziert. Durch die Auftragung FSC-A/FSC-H wurde die Erkennung und Exklusion von Zelldoubletten und aggregierten Zelltrümmern ermöglicht. Im nächsten Schritt wurden CD3⁺ T-Zellen, CD16⁺ NK-Zellen und CD14⁺ Monozyten ausgeschlossen, um im Folgenden nur CD19⁺ B-Zellen auszuwerten.



Abbildung 4: Identifizierung von B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen aus PBMCs. Die Zellen wurden nach an den Achsen angegebenen Parametern aufgetrennt, die rot umrahmten Zellen mit Pfeil erscheinen jeweils im folgenden Diagramm. Die Zahlen bezeichnen für jedes Gate den prozentualen Anteil an der Gesamtzellzahl des jeweiligen Diagramms.

Über die Auftragung von CD38/CD24 ließen sich in einem ersten Schritt die CD38^{hi}CD24⁻ Plasmablasten identifizieren. Die übrigen B-Zellen wurden nun nach IgD- und CD27-Expression eingeteilt in IgD⁻ CD27⁺ Isotyp-gewechselte Gedächtnis-B-Zellen, IgD⁺CD27⁺ Marginalzonen-ähnliche Gedächtnis-B-Zellen, IgD⁻CD27⁻ Doppelt-negative B-Zellen und die IgD⁺CD27⁻ Population der Naiven und Transitionalen B-Zellen. In einem nächsten Schritt ließen sich diese auseinanderdifferenzieren als CD38^{hi}CD24^{hi} Transitionale und CD38⁺CD24^{+/-} Naive B-Zellen.

In Abb. 5 ist die Strategie zur Identifizierung einer weiteren B-Zell-Subpopulation, der B1-B-Zellen, dargestellt. Das Vorgehen zur Identifizierung der B-Zellen erfolgte wie in Abb. 4 gezeigt. In der Folge wurden CD20⁻ Plasmablasten ausgeschlossen und mit dem Phänotyp CD27⁺CD43⁺CD70⁻ konnten aus den übrigen B-Zellen die B1-B-Zellen ermittelt werden.



Abbildung 5: Identifizierung von B1-B-Zellen aus Gesamt-B-Zellen. Über die Detektion der an den Achsen angegebenen Oberflächenmarker wurden über das dargestellte Gatingverfahren B1-B-Zellen identifiziert. Die rot umrahmte Zellpopulation erscheint jeweils im nächsten Bild, Zahlen geben den Anteil der umrahmten Zellen an der Gesamtzellzahl des Bildes an.

Auf den Gesamt-B-Zellen wie auch auf den einzelnen Subpopulationen wurde nach der Identifizierung durch entsprechendes Gating die IgM-Oberflächenexpression gemessen, um in IgM⁺ und IgM⁻ Zellen aufzuteilen. Abb. 6 zeigt dies beispielhaft für Isotyp-gewechselte Gedächtnis-B-Zellen, die Identifizierung erfolgte wie in Abb. 4 gezeigt.



Abbildung 6: Identifizierung IgM-exprimierender B-Zellen am Beispiel Isotyp-gewechselter Gedächtnis-B-Zellen. Nach vorangegangener Populationsidentifizierung wurde der Anteil IgM-exprimierender Zellen für jede Population einzeln untersucht. Die rot umrahmten Isotyp-gewechselten Gedächtnis-B-Zellen sind im folgenden Bild dargestellt, die Zahlen geben den %-Anteil an allen im Bild dargestellten Zellen an.

3.3.3.2 B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen nach *in vitro* Stimulation

Zur Analyse der Differenzierung der B-Zellen bzw. Verschiebung der Verhältnisse zwischen den verschiedenen Subpopulationen nach den in vitro Stimulationen erfolgten im Anschluss FACS-Analysen der stimulierten PBMCs und T-Zell-depletierten PBMCs. Das Gating bis zur Identifizierung der B-Zellen erfolgte wie in Abb. 4 gezeigt, stets auch unter Ausschluss von T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten. In der FSC-A/SSC-A-Auftrennung wurden stimulationsbedingte Größen- und Granularitätsveränderungen der Lymphozyten berücksichtigt. Die B-Zellen wurden anhand der Expression von IgD und CD27 eingeteilt in die Subpopulationen der IgD⁺CD27⁻ Naiven, IgD⁺CD27⁺ Marginalzonen-ähnlichen, IgD⁻ CD27⁻ Doppelt-negativen und IgD⁻CD27⁺ Isotyp-gewechselten B-Zellen, sowie IgD⁻CD27^{hi} Plasmablasten. Die Auswahl der Oberflächenantigene zur Identifizierung der jeweiligen Subpopulation wich teilweise von der Zusammenstellung des Panels zur phänotypischen Charakterisierung vor der Zellkultur ab. Da nach in vitro Stimulation keine verbliebenen Transitionalen nachzuweisen waren, wurden diese nicht gesondert detektiert. Plasmablasten wurden als IgD⁻CD27^{hi} B-Zellen definiert, da die Zuordnung über CD24 und CD38 nach Stimulation mangels eindeutiger Auftrennung nicht mehr möglich war. Die weitere Bezeichnung als "Plasmablasten" ist als vereinfachende Anlehnung an die Situation vor Stimulation zu verstehen. Marker zur Differenzierung von Plasmablasten und Plasmazellen wurden nicht detektiert, so dass Letztere ggf. in die Plasmablastenpopulation eingeschlossen sind.

Abb. 7 zeigt die Gating-Strategie von den B-Zellen ausgehend anhand einer FACS-Analyse von Zellen nach einer Voll-Stimulation T-Zell-depletierter PBMCs. Im ersten Diagramm der Abbildung kann man gut die typische verminderte CD19-Expression der CD27^{hi} Plasmablasten erkennen.



Abbildung 7: Identifizierung der B-Zell-Subpopulationen nach *in vitro* Stimulation T-Zell-depletierter PBMCs. B-Zellen wurden im Lymphozytengate identifiziert und nach an den Achsen angegebenen Parametern in weitere Subpopulationen aufgetrennt. Die rot umrahmten B-Zellen mit Pfeil erscheinen im folgenden Diagramm. Die Zahlen bezeichnen den prozentualen Anteil an der dargestellten Gesamtzellzahl im Bild.

3.3.3.3 T-Zellen und T-Zell-Subpopulationen

Die Analyse der T-Zellen erfolgte nach Ausschluss toter Zellen (siehe Abb. 4) und der Erfassung aller Lymphozyten in der FSC-A/SSC-A-Darstellung über die Anfärbung des T-Zell-Markers CD3, wie Abb. 8 zeigt. Im nächsten Gating-Schritt wurden die CD3⁺ T-Zellen in CD4⁺ T-Helfer-Zellen und CD8⁺ Zytotoxische T-Zellen aufgeteilt. Für diese beiden Subpopulationen konnten jeweils drei weitere Populationen identifiziert werden: naive T-Zellen mit dem ergänzenden Phänotyp CD45RA⁺CCR7⁺, sowie CD45RA⁻CCR7⁺ Zentrale Gedächtnis-T-Zellen und CD45RA⁻CCR7⁻ Effektor-Gedächtnis-T-Zellen.



Abbildung 8: Identifizierung der T-Zellen, T-Helfer- und zytotoxischen-T-Zellen, sowie der jeweiligen Subpopulationen aus PBMCs. Die CD3⁺ Zellen wurden in CD4⁺ Helfer- und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen eingeteilt. Die Zellen wurden nach CCR7- und CD45RA-Expression aufgetrennt, die rot umrahmten Zellen mit Pfeil erscheinen jeweils im folgenden Diagramm. Zahlen an den Gates bezeichnen den prozentualen Anteil an der Gesamtzellzahl im jeweiligen Bild.

3.3.3.4 Dendritische Zellen

In Abb. 9 ist die Analyse dendritischer Zellen exemplarisch dargestellt. Wie gehabt wurden tote Zellen über Propidium Iodid ausgeschlossen um in der Folge Lymphozyten mit weiteren PBMCs in einem erweiterten Gate zusammenzufassen. Es erfolgte der Ausschluss von Doubletten, CD3⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen unter Berücksichtigung der SSC-A-Intensität. Die Unterscheidung der dendritischen Zellen erfolgte schließlich über zwei Marker in CD303⁺CD11c⁻ plasmazytoide dendritische Zellen und CD303⁻CD11c⁺ myeloide dendritische Zellen.



Abbildung 9: Identifizierung plasmazytoider und myeloider dendritischer Zellen aus PBMCs. Die Zellen wurden aus einem "Lymphozyten-Monozyten-Gate" nach an den Achsen angegebenen Parametern aufgetrennt, die rot umrahmten Zellen mit Pfeil erscheinen immer im folgenden Diagramm. Angegebene Zahlen bezeichnen den prozentualen Anteil an der im jeweiligen Bild dargestellten Zellzahl.

3.4 Zellkultur

Isolierte PBMCs und T-Zell-depletierte PBMCs wurden polyklonal stimuliert, um die Expansions- bzw. Überlebensfähigkeit von Gesamt-PBMCs und B-Zellen, die relative Dynamik innerhalb der B-Zellsubpopulationen, die IgM-Expression nach Stimulation und die Differenzierung zu Antikörpersezernierenden Zellen (ASZ) zu untersuchen.

3.4.1 *In vitro* Stimulation von B-Zellen in Kultur

1-1,5x10⁶ Zellen wurden in 1 ml IMDM-Stimulationsmedium (IMDM, 10 % FCS, 0,1 % Insulin/Transferrin/Selenium) resuspendiert. Zur *in vitro* Stimulation wurden je nach Stimulationsmedium in unterschiedlicher Zusammenstellung polyklonale Mitogene wie ein modifiziertes Oligonukleotid mit CpG-Motiven (CpG ODN 2006: 5'-tcgtcgttttgtcgtttgtcgtt-3', CpG), Staphylococcus Aureus Cowan I (SAC), Pokeweed Mitogen (PWM), CD40-Ligand (CD40L), Interleukin (IL)-21, IL-2 und IL-10 dazugegeben. Zu den Konzentrationen siehe Kapitel 2.7, die Stimulanzien werden in 1.1.2 erläutert.

Es ergaben sich fünf unterschiedliche Stimulationsansätze und zusätzlich je ein Kontrollansatz für T-Zelldepletierte und nicht-depletierte PBMCs mit IMDM-Medium ohne Zugabe von Stimulanzien:

- 1. T-Zell-depletierte PBMCs ohne Stimulanzien
- 2. T-Zell-depletierte PBMCs mit SAC, PWM
- 3. T-Zell-depletierte PBMCs mit CpG
- 4. T-Zell-depletierte PBMCs mit CD40L, IL-2, IL-10, IL-21 (T-Zell-Faktoren)
- 5. T-Zell-depletierte PBMCs mit CpG, SAC, PWM, CD40L, IL-2, IL-10, IL-21 (Vollstimulation)
- 6. Gesamt-PBMCs ohne Stimulanzien
- 7. Gesamt-PBMCs mit CpG, SAC, PWM, CD40L, IL-2, IL-10, IL-21 (Vollstimulation)

Die Zellen im Stimulationsmedium wurden für 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ verteilt auf Wells einer 24-Well-Platte inkubiert. Am siebten Tag wurden sie geerntet. Das Stimulationsmedium-Volumen wurde mit Hilfe einer Mikropipette und die Zellkonzentration in der Neubauer-Zählkammer bestimmt, so dass eine absolute Zellzahl berechnet werden konnte. Die Überstände (abzentrifugiert mit 1300 UpM, 10 min, RT) wurden abgenommen und bei -20 °C, später -80 °C zur späteren Analyse eingefroren. Die Zellkonzentration wurde zum weiteren Vorgehen auf 1x10⁶/100 µl in RPMI-FCS-P/S-Medium eingestellt um die gewünschten Zellzahlen für die Durchflusszytometrie und den ELISpot abnehmen zu können.

3.4.2 Zellkultur unter Einfluss von Rapamycin

Der Einfluss von Rapamycin auf die Abläufe der *in vitro* Stimulationen "Vollstimulation" mit Gesamt-PBMCs und T-Zell-depletierte PBMCs mit "T-Zell-Faktoren" wurde für die Konzentrationen von 20 und 100 mmol/l durch Zugabe entsprechender Mengen von Rapamycin überprüft. Das Rapamycin wurde zu Beginn der Stimulation in das Kulturmedium gegeben, alle weiteren Schritte erfolgten wie vorangehend und nachfolgend beschrieben.

3.5 ELISpot

Die Enzyme Linked Immuno Spot (ELISpot)-Technik ist ein sehr sensitives Verfahren, um Zellaktivierung und dadurch bedingtes Sekretionsverhalten auf Einzelzellniveau *in vitro* zu messen. Die Technik basiert auf der Fixierung und Detektion von Sekretionsprodukten. Auf einer Polyvinylidenfluorid-Membran einer ELISpot-Platte werden Antigene oder spezifische Antikörper immobilisiert. Die Fixierung des Sekretionsproduktes erfolgt entweder über die Bindung des Antigens durch spezifische Antikörper oder durch Bindung des immobilisierten Primärantikörpers an das Sekretionsprodukt (bei Sekretion von Antikörpern oder anderen Produkten). Da die zu untersuchenden Zellen für einen Zeitraum von mehreren Stunden auf die Membran gebracht werden, lagern sie sich ab

und die Fixierung des Sekretionsprodukts am direkten Ort der Freisetzung wird ermöglicht. Nach gründlicher Entfernung der Zellen wird mit einem für das Sekretionsprodukt spezifischen Sekundärantikörper inkubiert. Dieser kann Biotin-konjugiert sein oder über andere Bindungsstellen oder direkte Konjugation in den nächsten Schritten eine visuelle Detektion der Sekretionsstellen etwa per Enzymreaktion oder Fluoreszenz ermöglichen. Somit ist die funktionelle Analyse auf Einzelzellebene bzw. auf Ebene sog. Spot-Forming Units, also zusammenhängender Zellgrüppchen, gegeben und auch seltene Zellpopulationen können über ihre spezifischen Sekretionsprodukte in einer großen Zellpopulation nachgewiesen werden.

3.5.1 Detektion unspezifischer und spezifischer ASZ

Für diese Arbeit sollte die Zahl der ASZ für IgM, IgA und IgG ermittelt werden, sowie die Produktion spezifischer Antikörper gegen Tetanus-Toxoid (TT) und den bakteriellen Zellwandbestandteil Pneumokokken-Polysaccharid (PnPS) Typ 19F. Dafür wurden die Primärantikörper Anti-humanes-IgM (10 μ g/ml), -IgA (15 μ g/ml) und -IgG (1,2 μ g/ml) sowie die Antigene TT (5-10 μ g/ml) und PnPS (10 μ g/ml) auf einer 96-Well-Mikrotiter-ELISpot-Platte immobilisiert. Am ersten Tag erfolgte die Immobilisierung der Primärantikörper und Antigene über Nacht (ÜN) bei 4 °C. Am Folgetag wurden freie Bindungsstellen durch 30-minütige Inkubation mit 100 μ l/Well RPMI-FCS-P/S-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ geblockt, um den Anteil unspezifischer Bindungen zu verringern. Anschließend wurde dreimal mit 200 μ l/Well 1x PBS gewaschen um dann die Zellen am siebten Tag der Stimulation auszusäen.

In 100 μ l RPMI-FCS-P/S-Medium wurden die Zellen wie folgt auf die Wells verteilt. Für den Nachweis der unspezifischen IgM, IgA und IgG wurden Zellen in einer dreistufigen Verdünnungsreihe ausgesät (12500, 6250, 3125 Zellen/100 μ l pro Well für IgM und IgA; 6250, 3125, 1563 Zellen/100 μ l pro Well für IgG). 1x10⁵-10⁶ Zellen (in seltenen Fällen weniger) wurden pro TT- und PnPS-Well ausgesät. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde zu den Zellen in den PnPS-Wells PnPS Typ 22F und Zellwandpolysaccharid (je 5 μ g/ml) hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurden 3125 Zellen/100 μ l pro Well in nicht antikörper- oder antigenbedeckte, geblockte Wells ausgesät, jeweils für IgM, IgA und IgG. Im Verlauf wurde mit den Negativkontroll-Wells wie mit den übrigen verfahren. Nach drei Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden Zellen und ungebundene Sekretionsprodukte mit Waschpuffer (PBS, 0,05 % Tween 20, 1 % Albumin Fraktion V) in sechs Waschschritten entfernt. 1 μ g/ml Biotin-konjugierte Anti-Human-IgM, -IgA und -IgG Antikörper wurden in 100 μ l Waschpuffer/Well (sterilfiltriert durch 0,2 μ m Whatman-Spritzenfilter) in die entsprechenden Wells gebracht. Nach gleichem Vorgehen wurden TT-spezifische IgG und PnPS-spezifische IgG und IgM markiert. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C ÜN, nachfolgend dreimaliges Waschen mit 200 μ l Waschpuffer/Well und die

Inkubation mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin (2,5 μ g/ml) in 100 μ l Waschpuffer/Well (sterilfiltriert durch 0,2 μ m Whatman-Spritzenfilter) für 45 min bei RT. Im Anschluss wurde dreimal mit 200 μ l 1x PBS/Well gewaschen und 100 μ l/Well AEC-Farbsubstrat zugegeben (0,1 M Acetatpuffer pH 5,0, 1:30 3-Amino-9-Ethylcarbazol, sterilfiltriert durch 0,2 μ m Whatman-Spritzenfilter, dann 1:100 3 % H₂O₂). Die über den Streptavidin-Biotin-Komplex spezifisch gebundene Meerrettichperoxidase ermöglichte innerhalb von 3-5 min eine Farbumsetzung der Lösung mit Einfärbung der Membran und somit die Detektion der Spots. Die Plastikabdeckung auf der Unterseite der Platte wurde entfernt und die Reaktion durch Abwaschen der Lösung unter fließendem Wasser gestoppt, anschließend wurde die Platte an der Luft getrocknet. Die Auszählung der Spots erfolgte am ELISpot-Reader ImmunoSpot® 5.1 und ImmunoCaptureTM 6.4 Software. Die Ergebnisse wurden über die ebenfalls erfolgte FACS-Analyse der verwendeten Zellen in Spots/10⁶ B-Zellen berechnet.

3.5.2 Desorption von Tetanustoxoid

Für die Bestimmung der Tetanus-spezifischen ASZ im ELISpot-Verfahren wurde der Tetanus Adsorbat-Impfstoff "Mérieux" von Sanofi Pasteur MSD aufgereinigt um TT für die Bedeckung der ELISpot-Platten-Membran zu gewinnen. Nach Herstellerangaben enthält eine Impfung mindestens 40 Internationale Einheiten (IE) TT und 1,25 mg Al(OH)₃. Zur Desorption von TT wurden 500 µl Impfstoff zentrifugiert (1200 G, 10 min, RT). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in frischem Mix aus einem Teil (3,3 µl) von 56 g/l Di-Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA) und 49 Teilen (163,3 µl) von 90 g/l Di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung (beides gelöst in Aqua dest.) resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 6 h bei 37 °C. Nach Zentrifugation (1200 G, 10 min, RT) wurde der klare Überstand mit dem gelösten TT abgenommen und bei -80 °C gelagert.

3.6 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism (Version 5.00.288). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von p \leq 0,05 gilt als schwach statistisch signifikant (*), p \leq 0,01 als signifikant (**) und p \leq 0,001 (***) als stark signifikant. Unterschiede wurden unter Annahme eines nichtgauss'schen Verteilungsmusters mit einem Mann-Whitney-U-Test untersucht. Die Daten wurden einzeln oder als Mittelwert plus/minus den Standardfehler angegeben. Zur grafischen Darstellung der Daten wurden in GraphPad Balkendiagramme und Scatter-Plots generiert.

4. Ergebnisse

4.1 Klinische und laborchemische Charakterisierung der SIgMID-Patienten

Es wurden klinische Daten von 20 bzw. laborchemische Daten von 21 SIgMID-Patienten erhoben. Das mittlere Alter der Patientengruppe zum Zeitpunkt der Erfassung betrug 41 Jahre (Median 42, Spannweite 22-65 Jahre), mit zehn männlichen und elf weiblichen Patienten. Tab. 3 zeigt die wichtigsten Charakteristika.

Die klinische Befunderhebung erfolgte im Rahmen der ambulanten Vorstellung der Patienten durch das ärztliche Personal der Immundefekt-Ambulanz für Erwachsene des Instituts für Medizinische Immunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Dabei wurden auch anamnestische Angaben früherer Arztbesuche berücksichtigt.

Tabelle 3: Charakteristika der SIgMID-Patienten. IgM	I-Wert zum Zeitpunkt der Erstvorstellung. m = männlich; w = weiblich;
GI = Gastrointestinaltrakt; rez. = rezidivierend; AW = Ate	mwege; chron. = chronisch. $n=21$.

Patient	Alter	Geschlecht	Beschwerdebild	IgM (g/l)
1	33	m	Rez. Infektionen (obere AW, chron. Sinusitiden, Mukositiden,	0,46
			Otitiden), chron. Prostatitis, chron. Osteomyelitis, Pulmonale	
			Granulome, rez. Herpes labialis, GI-Beschwerden (chron.	
			Obstipation), Fatigue	
2	24	W	Rez. Infektionen (obere AW), GI-Beschwerden (Tenesmen,	0,25
			Meteorismus, Diarrhoe), Unverträglichkeiten (Fructose,	
			Histamin)	
3	25	m	Rez. Infektionen (obere AW), GI-Beschwerden	0,27
			(Meteorismus), div. Allergien	
4	46	m	Protrahierte Infektionen (obere AW), Allergien	0,31
5	57	W	Rez. Infektionen (obere, untere AW), Myalgien, Allergien,	0,46
			Psoriasisarthritis, Hashimoto-Thyreoiditis	
6	45	W	Rez. Infektionen (obere AW), rez. Zystitiden, GI-	0,33
			Beschwerden (Diarrhö, Übelkeit), rez. Herpes labialis	
7	42	m	Keine Angaben	0,36
8	42	m	Rez. Infektionen (obere AW), Harnwegsinfektion, GI-	0,24
			Beschwerden (Obstipation), Arthralgien	
9	29	W	Rez. Genitalabszesse, rez. anokutaner Soor, rez. Hordeola,	0,39
			rez. kutane Noduli mit spontaner blutig-seröser Drainage	
10	22	W	Rez. Infektionen (obere AW), Herpes zoster, rez.	0,34
			Harnwegsinfektionen, Allergien	
11	63	W	Rez. Infekionen (untere AW)	0,23
12	48	W	Rez. Infektionen (obere AW), GI-Beschwerden (Übelkeit,	0,29
			Erbrechen, Diarrhoe, Refluxbeschwerden), rez. Zystitiden	
13	27	W	Fatigue, rez. Infektionen (obere AW, GI)	0,25
14	33	m	keine vermehrten Infektionen	0,32
15	49	m	Rez. Infektionen, chron. Sinusitis mit rez. Polypen, Fatigue	0,19
16	25	W	Atopische Diathese	0,32

17	37	W	Rez. Infektionen (obere AW), rez. Lymphadenitis, Fatigue	0,31
18	62	W	Rez. Infektionen (obere AW)	0,37
19	50	m	Rez. Infektionen (obere AW), chron. Bronchitis, rez. enoraler	0,28
			Soor, Allergien	
20	65	m	Rez. Infektionen (obere, untere AW), chron. Sinusitis,	0,31
			infektionsassoziierte Effloreszenzen, einmalige	
			Harnwegsinfektion, Meningitis als Kind	
21	27	m	Rez. Infektionen (obere AW)	0,33

4.1.1 Krankheitsbild

Die vorherrschende Manifestation der SIgMID war das Auftreten von Infektionen (90 % der Patienten), die oftmals protrahiert, rezidivierend (rez.) oder chronisch (chron.) verlaufen. Bei 75 % waren die oberen Atemwege betroffen, was hauptsächlich Rhinitiden, Pharyngitiden, Tonsillitiden und Sinusitiden umfasste. Bei mind. 25 % lag eine chron. Sinusitis-Symptomatik vor, teilweise mit rez. polypösen Raumforderungen (15 %), in einem Fall durch Aspergillus species (5 %). Rez. Infektionen der unteren Atemwege lagen bei 20 % der Untersuchten vor, darunter ein Patient mit einmaliger ambulant erworbener Pneumonie. Das Auftreten von Harnwegsinfektionen wurde mit 25 % angegeben, 10 % entfielen auf männliche Patienten. Des Weiteren zeigten Patienten rez. Haut- und Weichteilinfektionen mit Abszedierung (Hautinfektionen insgesamt 25 %), enoralen bzw. anokutanen Soor, Herpes-Simplex-Virus-Reaktivierungen (labial, mental; je 10 %) und einzelne Patienten berichteten über chron. Prostatitis und Osteomyelitis, Herpes zoster und als Kind stattgehabte Meningitis.

Wiederkehrende gastrointestinale Beschwerden wurden bei 30 % der Patienten beobachtet, in erster Linie Diarrhoe und Übelkeit, weiterhin Meteorismus und Obstipation. Dabei schienen für einige Patienten auch die Diät bzw. ausgeprägte Nahrungsmittelunverträglichkeiten eine ausschlaggebende Rolle zu spielen (15 %). Starke Abgeschlagenheit oder eine Fatigue-Symptomatik war bei 20 % der Patienten vorhanden. Allergien bzw. eine atopische Diathese lag bei 40 % vor.

Erkrankungen mit autoimmunologischem Hintergrund lagen bei 15 % der Patienten vor: Arthritiden (Psoriasisarthritis und nicht näher bezeichnet, 10 %) und bei einzelnen Patienten eine Hashimoto-Thyreoiditis bzw. Psoriasis. Ebenfalls bei einzelnen Patienten wurde über Mamma-Karzinom, pulmonale Granulome, unspezifische Hauteffloreszenzen, Fibromyalgie, berichtet (je 5 %). Bei mehreren Patienten lagen psychiatrische Beschwerden vor, diese wurden jedoch nicht strukturiert eruiert und nicht näher bezeichnet.

Bei 10 % der untersuchten Patienten lag keine erhöhte Infektneigung vor. Tab. 4 fasst die Ergebnisse zusammen.

 $\label{eq:constraint} \textbf{Tabelle 4: Diagnosen bzw. Symptome mit immunologischer Assoziation der untersuchten SIgMID-Patienten. n=20.$

Befund	Betroffene (n=20)	% der Patienten
Rezidivierende Infektionen	18	90
Infektionen der oberen Atemwege	15	75
Harnwegsinfektionen	5	25
Infektionen der unteren Atemwege	5	25
Enoraler/anokutaner Soor	2	10
Haut-/Weichteilinfektionen	2	10
Herpes simplex	2	10
Chronische Osteomyelitis	1	5
Herpes Zoster	1	5
Meningitis	1	5
Mukositis	1	5
Otitis media	1	5
Prostatitis	1	5
Allergien/Atopie	8	40
Allergien	8	40
Asthma bronchiale	2	10
Gastrointestinale Beschwerden	6	30
Diarrhoe	3	15
Übelkeit	3	15
Nahrungsmittelunverträglichkeiten	3	15
Meteorismus	2	10
Obstipation	1	5
Autoimmunität	3	15
Arthritiden	2	10
Hashimoto-Thyreoiditis	1	5
Psoriasis	1	5
Malignome	1	5
Mamma-Karzinom	1	5
Sonstige Befunde		
Fatigue	4	20
Diabetes mellitus, nicht näher bezeichnet	1	5
Fibromyalgie	1	5
Hauteffloreszenzen, nicht näher bezeichnet	1	5
Pulmonale Granulome, nicht näher bezeichnet	1	5

Bei der Einzelbetrachtung der Krankengeschichten fällt auf, dass die Verteilung der Symptome und Befunde interindividuell ungleich ist. So gab es Patienten ohne eine erhöhte Infektneigung, solche mit leicht protrahiertem Verlauf der oberen Atemwegsinfektionen als einzigem Befund und andere, die unter chronischen Infektionen multipler Lokalisationen litten.

4.1.2 Immunglobulin-Spiegel

Es wurden die IgM-Werte bei Erstvorstellung und im Verlauf, sowie IgG-, IgA- und IgE-Werte erfasst. Die Ergebnisse zeigt Tab. 5.

Tabelle 5: Mittlere und mediane Serumspiegel der vier Antikörperhauptklassen von SIgMID-Patienten. Referenzwerte nach Angaben des durchführenden Labors. n=21.

Antikörperklasse	Mittlerer Serumspiegel	Median	Referenzwert	Einheit
IgM	0,31	0,31	0,4-2,3	g/l
IgG	10,04	10,06	7-16	g/l
IgA	2,41	2,54	0,7-4	g/l
IgE	160	37	<100	kU/l

Der IgM-Spiegel lag bei den 21 Patienten im Mittel und Median bei 0,31 g/l mit einem Referenzbereich von 0,4-2,3 g/l. Drei Einzelwerte von drei unterschiedlichen Patienten waren im Verlauf niedrig normal (0,45; 0,46; 0,46 g/l), der niedrigste gemessene Wert insgesamt lag bei 0,19 g/l (49 Messpunkte insgesamt). Der IgG-Spiegel lag mit 10,04 g/l Mittelwert im Referenzbereich (7-16 g/l). Zwei Patienten zeigten einen IgG₃-Subklassenmangel. IgA lag mit 2,4 g/l (0,7-4 g/l) ebenfalls im Referenzbereich. Die Erhöhung des IgE-Wertes von 160 kU/l ergab sich aus erhöhten Werten von fünf Patienten (100; 162; 282; 293; 188 kU/l), ohne diese betrug der Mittelwert 31,8 kU/l und bewegte sich somit im Normbereich. Vier dieser fünf Patienten litten an multiplen Allergien bzw. zeigten eine atopische Diathese, der fünfte litt an unklaren rez. Hautekzemen. Bei drei weiteren von Allergien betroffenen Patienten wurden hingegen normwertige IgE-Spiegel gemessen.



Abbildung 10: IgM-Serumspiegel im Verlauf. Es wurden der Wert bei Erstvorstellung (1.) sowie die zwei Folgewerte (2. und 3.) in mindestens 3-monatigen Abständen erfasst. Die gestrichelte Linie markiert die Untergrenze des Referenzbereichs (0,4-2,3 g/l). n=12.

Die Verlaufskurven der IgM-Serumspiegel in Abb. 10 zeigen eine weitestgehend konstant erniedrigte Konzentration des Antikörpers mit individuell geringer Schwankungsbreite. Drei Einzelwertbestimmungen lagen im niedrigen Referenzbereich, jedoch bei erniedrigten Zweit- und Drittbestimmungen.

4.2 Phänotypische Charakterisierung von Lymphozyten und dendritischen Zellen

Um den lymphozytären Phänotyp der einzelnen SIgMID-Patienten und somit auch die Verteilung der Haupt- und Subpopulationen von B- und T-Zellen im Patientenkollektiv zu ermitteln, wurde eine durchflusszytometrische Analyse von PBMCs durchgeführt, denn mögliche Abweichungen von Populationsverteilung oder -zellzahlen könnten von pathogenetischer Relevanz sein. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der B-Zellen mit ihren Subpopulationen. Neben den Lymphozyten wurden auch dendritische Zellen untersucht.

Im Rahmen der ambulanten Patientenvorstellung wurde unter anderem ein Differentialblutbild erstellt, das in diesem Zusammenhang mit betrachtet wird. Auch die Berechnung absoluter Zellzahlen aus den eigenen Messungen beruht auf diesen Bestimmungen. Bis zu elf Patienten wurden in die Analysen eingeschlossen, sie waren Teil der in 4.1 beschriebenen Kohorte.

4.2.1 Differentialblutbild

Es wurden die Zahlen der Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile, Basophile und unreife) in einem externen Labor bestimmt. Die Gesamtleukozytenzahlen zeigten keine wesentlichen quantitativen Abweichungen bei SIgMID-Patienten (n=11) im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden (n=13). Sie lagen bei den Patienten im Durchschnitt bei 6,4 Zellen/nl im Vergleich zu 5,8 bei den Kontrollprobanden (s. Abb 11, A). Lymphozyten- und Monozytenzahlen zeigten keine wesentlichen Abweichungen zwischen den beiden Gruppen. Lediglich ein Patient zeigte erniedrigte Werte für die Gesamtlymphozytenzahl, dies schlug sich auch in den B- und T-Zellwerten nieder (siehe 4.3.2), wo jeweils der niedrigste Messwert auf ihn entfiel. Die Granulozytenwerte waren insgesamt unauffällig, Neutrophile lagen bei den Patienten im Mittel mit 3,9 Zellen/nl leicht über dem Mittleren-Kontroll-Wert von 3,2 (nicht dargestellt). Keine der Unterschiede waren statistisch signifikant.



Abbildung 11: Zellzahlen von Leukozyten, B-, T- und dendritischen Zellen im peripheren Blut. Lymphozyten und Monozyten wurden durchflusszytometrisch bestimmt (A). $CD19^+$ B-Zellen (B), $CD3^+$ T-Zellen mit der Aufteilung in $CD4^+$ T-Helfer-Zeller und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen (C), myeloide (mDZ) und plasmazytoide dendritische Zellen (pDZ) (D) wurden bei Patienten (n=11) und Kontrollprobanden (n=13) aus isolierten PBMCs durchflusszytometrisch bestimmt und die Konzentrationen im peripheren Vollblut berechnet. Werte der Kontrollprobanden sind als Kreise, der SIgMID-Patienten als Quadrate dargestellt. Striche und Balken kennzeichnen die mittlere Zellzahl \pm SEM.

4.2.2 Lymphozytäre Hauptpopulationen und dendritische Zellen

Um mögliche Störungen in der Leukozytenhomöostase zu erkennen, wurden aufbauend auf dem Differentialblutbild die Hauptpopulationen der Lymphozyten und dendritische Zellen von SIgMID-Patienten und gesunden Kontrollprobanden verglichen, dies zeigt Abb. 11, B-D. Die Isolierung der PBMCs zur durchflusszytometrischen Analyse erfolgte aus den selben Blutproben, mit denen das Differentialblutbild extern angefertigt wurde, was eine Berechnung absoluter Zellzahlen auch für die B-, T- und dendritischen Zellen ermöglichte.

Mit einer Streuungsbreite zwischen 17 und 235 Zellen/µl Blut bei den Patienten war die B-Zell-Zahl recht variabel, was sich bei den Kontrollprobanden jedoch in vergleichbarer Weise zeigte.

Die T-Zell-Zahlen zeigten sich insgesamt ebenfalls ohne nennenswerte Abweichungen, auch in der Aufteilung in $CD4^+$ Helfer- und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen. Nicht gezeigt ist das Verhältnis der

Zellzahlen/µl Blut von CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen, das bei Patienten und gesunden Kontrollen bestimmt wurde. Es lag im Mittel bei 3,47 (Kontrollen) und 2,91 (SIgMID) (Median 2,57 und 2,54) und war damit weder verschoben noch im Vergleich signifikant unterschiedlich.

Über die Expression der Marker CD303 und CD11c konnten plasmazytoide und myeloide dendritische Zellen identifiziert werden. Die Bestimmung der dendritischen Zellen zeigte neben einer etwas größeren Spannweite vergleichbare Mittelwerte für beide Subpopulationen.

Alle in Abb. 11 dargestellten Werte zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden Kontrollprobanden und SIgMID-Patienten.

4.2.3 T-Zell-Subpopulationen

Zur Überprüfung rein quantitativer Auffälligkeiten wurden aus PBMCs jeweils für CD4⁺ T-Helfer-Zellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen Zentrale- (ZG) und Effektor-Gedächtnis-Zellen (EG) sowie naive T-Zellen identifiziert.

Zellzahlen und Streuungsbreite waren bei allen Subpopulationen vergleichbar, wie Abb. 12 zeigt. Lediglich bei den EG und Naiven der zytotoxischen T-Zellen zeigten sich für einige wenige SIgMID-Patienten leicht verminderte Werte.

Es gab keine signifikanten Zellzahlunterschiede der T-Zell-Subpopulationen zwischen Gesunden und Patienten.



Abbildung 12: Zellzahlen der T-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut. Für $CD4^+$ T-Helfer-Zellen und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen wurden jeweils die Subpopulationen $CD45RA^-CCR7^+$ zentrale Gedächtnis-T-Zellen (ZG), $CD45RA^-CCR7^-$ Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (EG) und $CD45RA^+CCR7^+$ naive T-Zellen aus PBMCs durchflusszytometrisch bestimmt und die Konzentrationen im peripheren Vollblut von Patienten (n=8) und Kontrollprobanden (n=7) berechnet. Werte der Kontrollprobanden sind als Kreise, der SIgMID-Patienten als Quadrate dargestellt. Striche und Balken kennzeichnen die mittlere Zellzahl \pm SEM.

4.2.4 Verteilung der B-Zell-Subpopulationen

Um eine möglichst umfassende Charakterisierung der B-Zellen des peripheren Blutes unter quantitativen und somit auch schon bedingt funktionellen Gesichtspunkten zu erreichen, wurden folgende Subpopulationen erfasst: Transitionale, Naive, Marginalzonen-ähnliche, Doppelt-negative, Isotyp-gewechselte, B1-B-Zellen sowie Plasmablasten. Für die Ergebnisse s. Abb. 13.

Signifikant waren die Erhöhungen der Zellzahlen von MZ-ähnlichen B-Zellen mit 17 \pm 3,6 Zellen/µl gegenüber 6,4 \pm 1,8 Zellen/µl bei den Kontrollprobanden (p=0,021). Auch die Transitionalen B-Zellen zeigten sich signifikant vermehrt im peripheren Blut der Patienten, das Mittel lag bei 4,4 \pm 0,5 Zellen/µl im Vergleich zu 2,2 \pm 0,6 Zellen/µl bei den Gesunden (p=0,0106).

Bei den weiteren Subpopulationen zeigten sich vereinzelte Abweichungen bei den Patienten: Naive B-Zellen waren bei drei Patienten erhöht, dadurch auch im Mittel etwas angehoben. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den Isotyp-gewechselten GZ, DN B-Zellen und Plasmablasten. Bei Letzteren ist auch die Messung von zwei erniedrigten Werten erwähnenswert. Signifikanzen wurden durch die einzelnen Abweichler nicht erreicht. Auch der Mittelwert der B1-B-Zellen war gegenüber den gesunden Kontrollen leicht erhöht, jedoch nicht signifikant.



Abbildung 13: Zellzahlen der B-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut. Aus CD19⁺ B-Zellen wurden acht verschiedene Subpopulationen von SIgMID-Patienten (n=11) und Kontrollprobanden (n=12-13) bestimmt: CD27⁻IgD⁺CD38⁺CD24^{+/-} Naive, CD27⁺IgD⁺ MZ-ähnliche, CD27⁺IgD⁻ Isotyp-gewechselte GZ, CD27⁺IgD⁻IgM⁺ IgM-only GZ, CD27⁻IgD⁻ DN, CD38^{hi}CD24^{+/-} Plasmablasten, CD27⁻IgD⁺CD38^{hi}CD24^{hi} Transitionale, CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD70⁻ B1-B-Zellen. Die Bestimmung erfolgte durchflusszytometrisch aus PBMCs, die Konzentrationen wurden für peripheres Vollblut berechnet. MZ-ähnliche = Marginalzonen-ähnliche B-Zellen; Isotyp-gew. = Isotyp-gewechselt; GZ = Gedächtnis-B-Zellen; DN = Doppelt-negative B-Zellen. Werte der Kontrollprobanden sind als Kreise, der SIgMID-Patienten als Quadrate dargestellt. Striche und Balken kennzeichnen die mittlere Zellzahl ± SEM. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden sind dargestellt (*p≤0,05).

Der Anteil oberflächlich IgM-exprimierender B-Zellen ist in Abb. 14, A dargestellt. Im Mittel waren 73,5 % der Gesamt-B-Zellen der Patienten und 72,4 % der Kontrollprobanden IgM⁺. Der nach unten abweichende Einzelwert von 44 % erklärt sich durch einen niedrigen Anteil an Naiven und MZ-ähnlichen B-Zellen bei diesem Patienten.

Auf den IgM⁺ B-Zellen wurde die Expressionsdichte des membrangebundenen IgM durch die Ermittlung der IgM-abhängigen Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) untersucht. Anders als beim Nachweis der verschiedenen Marker (s. unten) wurde für die extrazelluläre IgM-Färbung keine Isotypkontrolle eingesetzt, was die Abhängigkeit der Messergebnisse von Kompensations- und Lasereinstellungen des Durchflusszytometers erhöht.

Die gemessenen MFI-Werte zeigen grundsätzlich eine relativ hohe Streuungsbreite, s. Abb. 14, B. Die Oberflächen-IgM-Expression der IgM⁺ B-Zellen der Patienten war signifikant erniedrigt. Die Mittelwerte lagen bei 36.242 für die Kontrollprobanden und 23.942 für die SIgMID-Patienten (p=0,0276).



Abbildung 14: IgM-Expression der Gesamt-B-Zellen. Der Anteil oberflächlich IgM-exprimierender CD19⁺ B-Zellen (A) wurde durchflusszytometrisch bestimmt; ebenso die IgM-Expressionsdichte auf IgM⁺ B-Zellen (B), die über die IgM-assoziierte Mittlere Fluoreszenzaktivität (MFI) ermittelt wurde. Kontrollprobanden n=13; SIgMID n=12. Werte der Kontrollprobanden sind als Kreise, der SIgMID-Patienten als Quadrate dargestellt. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden sind dargestellt (*p≤0,05).

4.2.6 IgM-Expression der B-Zell-Subpopulationen

Der signifikante Unterschied in der IgM-Expressionsdichte der IgM⁺ Gesamt-B-Zellen ließ die Frage aufkommen, wie sich das verminderte Oberflächen-IgM in den B-Zell-Subpopulationen widerspiegelt. In einem explorativen Ansatz konnte für vier der in 4.2.6 untersuchten Patienten die IgM-Expression auf Subpopulationsebene ermittelt werden.

Die IgM⁺ Anteile der einzelnen Subpopulationen zeigten sich weitestgehend ohne nennenswerte Unterschiede. MZ-ähnliche, Naive und Transitionale exprimierten erwartungsgemäß zu nahezu 100 % IgM. Einzig die DN zeigten im Mittel mit 23,7 % einen statistisch signifikant geringeren Anteil IgM⁺ Zellen gegenüber 47,7 % der Gesunden. Eine etwas höhere Streuungsbreite beim Anteil der Plasmablasten der Gesunden fiel ebenfalls auf.

Die IgM-Expressionsdichte auf den IgM⁺ B-Zellen der Subpopulationen war bei den SIgMID-Patienten im Vergleich mit den Kontrollen unauffällig. Einzig für die DN B-Zellen lässt sich eine Tendenz zur reduzierten IgM-Expression festhalten. Bemerkenswert ist auch die hohe Expressionsdichte der DN B-Zellen im Vergleich zu den anderen Subpopulationen, nur die Transitionalen zeigten im Durchschnitt eine höhere Dichte. Keine der Abweichungen waren statistisch signifikant.



Abbildung 15: IgM-Expression der B-Zell-Subpopulationen. Der Anteil oberflächlich IgM-exprimierender B-Zellen innerhalb der Subpopulationen wurde durchflusszytometrisch bestimmt (A). Die IgM-Expressionsdichte auf IgM⁺ B-Zellen der Subpopulationen wurde über die IgM-assoziierte Mittlere Fluoreszenzaktivität (MFI) ermittelt (B). Kontrollprobanden n=9; SIgMID n=4. Isotyp-gew. GZ = Isotyp-gewechselte Gedächtnis-B-Zellen; DN = Doppelt-negative B-Zellen; MZ-ähnliche = Marginalzonen-ähnliche B-Zellen. Werte der Kontrollprobanden sind als Kreise, der SIgMID-Patienten als Quadrate dargestellt. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden sind dargestellt (*p \leq 0,05).

4.2.7 Anteil Marker-exprimierender B-Zellen und Subpopulationen

Zur weiteren phänotypischen Charakterisierung der B-Zellen im peripheren Blut von SIgMID-Patienten wurde die Expression verschiedener Marker untersucht, die Hinweise zu Reifung (HLA-DR), Aktivierung und Apoptose (CD86, CD95, CD178), Differenzierung und Überlebens- (Taci, BAFF-R) sowie Migrationsverhalten (CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR7) geben können. Diese Analyse des B-Zell-Status kann möglicherweise vorliegende Störungen der B-Zell-Entwicklung und -Funktion offenlegen, die mit der symptomatischen IgM-Defizienz mittelbar oder unmittelbar zusammenhängen könnten.

Der Anteil CD86-exprimierender Zellen war bei Patienten und Kontrollprobanden relativ großen interindividuellen Schwankungen unterworfen, wie Abb. 16 zeigt. Unterschiede von etwa 40-60 % fanden sich in allen Populationen. Im Vergleich der beiden Gruppen zeigte sich auf den DN B-Zellen eine signifikant höhere CD86-Expression (p=0,0256). Auf den Plasmablasten konnten mit Medianwerten von 86,1 (Kontrollprobanden) bzw. 87,9 % (SIgMID) die mit Abstand höchsten Expressionswerte gemessen werden.



Abbildung 16: Expression der Aktivierungs-, Überlebens- und Differenzierungsmarker CD86, CD95, CD178 und Taci auf B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen. Aus Vollblut isolierte PBMCs wurden mit entsprechenden Antikörpern markiert, um B-Zell-Populationen und, unter Verwendung von Isotypkontrollen (Taci: *Fluorescence Minus One* = FMO-Abgleich), die dargestellten Marker durchflusszytometrisch detektieren zu können. Dargestellt ist jeweils der Marker-exprimierende Anteil der entsprechenden Population in % aller Zellen der Population. Kontrollprobanden n=13-15 bzw. n=5-7 (Taci); SIgMID n=8-11. Isotyp-gew. = Isotyp-gewechselte; GZ = Gedächtnis-B-Zellen; DN = Doppelt-negative B-Zellen; MZ-ähnliche = Marginalzonenähnliche B-Zellen. Die Boxen beinhalten die 25. bis 75. Perzentile, der Strich zeigt den Medianwert an, die Balken markieren die Maximal- und Minimalwerte. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden sind dargestellt (*p≤0,05; **p≤0,01).

Für die Expression von CD95 (Fas) konnte ein signifikant erniedrigter Wert für die MZ-ähnlichen B-Zellen gemessen werden (p=0,016). Ein tendenziell erhöhter, jedoch nicht signifikanter Wert zeigte sich für die DN B-Zellen der Patientengruppe. Die Plasmablasten stellten die Subpopulation mit dem höchsten Anteil CD95⁺ Zellen, sie lag im Median bei 93,7 (Kontrollprobanden) bzw. 96,4 % (SIgMID).

CD178 (Fas-Ligand) wurde auf allen analysierten Populationen bei den Patienten von einem geringeren Anteil der Zellen exprimiert. Eine statistische Signifikanz (p=0,0079) ergab sich für die MZ-ähnlichen B-Zellen der Patienten mit einem Median von 11 % im Vergleich zu 26,4 % bei den Kontrollprobanden.

Der Anteil Taci⁺ Zellen zeigte sich für die MZ-ähnlichen Zellen der Patienten deutlich statistisch signifikant erniedrigt (p=0,0017). Der Median lag bei 50,8 % im Vergleich zu 90,5 % bei den Kontrollprobanden. Des Weiteren war bei Plasmablasten und Transitionalen der Patienten ein erhöhter Anteil Taci-exprimierender Zellen zu beobachten, ohne statistisch signifikant zu sein.

Bei der Analyse der Expression des homöostatischen Chemokinrezeptors CCR7 fällt eine weitere Streuungsbreite der Patientenwerte bei allen Populationen auf, s. Abb. 17. Diese kommt zustande durch eine Aufspaltung der Patientengruppe in einen Teil mit höheren, teilweise etwas über den Kontrollprobanden liegenden Werten, und eine Gruppe von hauptsächlich drei Patienten mit niedrigeren Werten. Die Medianwerte zeigen somit keine relevanten Abweichungen.

Für den homöostatischen Chemokinrezeptor CXCR4 ergaben sich bei den Patienten gemessen an den Medianwerten tendenziell etwas höhere Anteile exprimierender Zellen im Vergleich zu den Kontrollprobanden. Statistisch signifikant (p=0,0073) war ein erhöhter Anteil bei den MZ-ähnlichen mit einem Median von 94,4 gegenüber 77,4 %. Auch die Erhöhung bei den IgM-only GZ erreichte eine statistische Signifikanz (p=0,0127) mit den Medianwerten bei 81,6 bzw. 67 %. Bei den Plasmablasten bewirkten drei deutlicher erhöhte Patientenwerte eine Tendenz nach oben, die übrigen Populationen sind als gleichwertig zu beurteilen.

Die Expression des inflammatorischen Chemokinrezeptors CXCR3 stellte sich im Vergleich von Patienten und Probanden unauffällig dar. Einzig ein geringerer Anteil von CXCR3-tragenden MZähnlichen B-Zellen ist mit einem Median von 15,9 % bei den Patienten im Vergleich zu 37,3 % erwähnenswert.



Abbildung 17: Expression der migrationsrelevanten Chemokinrezeptoren CCR7, CXCR4 und CXCR3 auf B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen. Aus Vollblut isolierte PBMCs wurden mit entsprechenden Antikörpern markiert, um B-Zell-Populationen und, unter Verwendung von Isotypkontrollen, die dargestellten Marker durchflusszytometrisch detektieren zu können. Dargestellt ist jeweils der Marker-exprimierende Anteil der entsprechenden Population in % aller Zellen der Population. Kontrollprobanden n=12-15; SIgMID n=11. Isotyp-gew. = Isotyp-gewechselte; GZ = Gedächtnis-B-Zellen; DN = Doppeltnegative B-Zellen; MZ-ähnliche = Marginalzonen-ähnliche B-Zellen. Die Boxen beinhalten die 25. bis 75. Perzentile, der Strich zeigt den Medianwert an, die Balken markieren die Maximal- und Minimalwerte. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden sind dargestellt ($*p \le 0,05$; $**p \le 0,01$).

Die Analyse der anteiligen Expression der Marker HLA-DR (ein MHC-II-Molekül), BAFF-R (Rezeptor für Überlebenssignale) und CXCR5 (homöostatischer Chemokinrezeptor) auf den bestimmten Populationen zeigte keine nennenswerten Unterschiede oder Auffälligkeiten zwischen Patienten und Kontrollprobanden (nicht gezeigt).

4.2.8 Expressionsdichte der Marker auf B-Zellen und Subpopulationen

Auf den Zellen aller zuvor bestimmten B-Zell-Subpopulationen, die einen jeweiligen Marker exprimierten, wurde die mittlere Fluoreszenzaktivität dieses Markers durchflusszytometrisch bestimmt. Bei allen gemessenen Markern (siehe 4.2.8) zeigten sich vergleichbare Werte für SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden. Auffällige Tendenzen oder statistisch signifikante Unterschiede wurden nicht gemessen (nicht gezeigt).

4.3 Funktionelle Charakterisierung von PBMCs und B-Zellen

Im Anschluss an sieben verschiedene *in vitro* Stimulationen wurden die Zellantworten analysiert: Untersucht wurde die Fähigkeit zur Expansion, Differenzierung und Dynamik innerhalb der B-Zellsubpopulationen einschließlich der IgM-Expression, sowie Antikörpersekretion auf zellulärer Ebene. Im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung des T-Zell-Systems an der Pathogenese der SIgMID wurden Stimulationen mit T-Zell-depletierten und nicht-depletierten PBMCs durchgeführt und gleichermaßen ausgewertet, um in der Endbetrachtung auf T-Zell-Einflüsse rückschließen zu können. Zwecks differenzierter und individualisierter Analyse der Ergebnisse sind den Messwerten der Patientengruppe durchgehend patientenspezifische Symbole zugeordnet. Zu den Stimulationsprotokollen

s. 3.4.

4.3.1 Expansionsverhalten der PBMCs

Aufgrund leicht differierender Ausgangszellzahlen wurden die Werte im Sinne der Vergleichbarkeit als Prozentwerte der zu Beginn der Stimulation eingesetzten Zellzahlen dargestellt ("% der Zellzahl an Tag $0^{\circ\circ}$).

Es wurden die lebenden PBMCs nach siebentägiger Kultur ausgezählt, s. Abb. 18. Es zeigte sich eine Abnahme der gemittelten Zellzahlen über den Zeitraum der Stimulation, mit Ausnahme der Gesamt-PBMCs in Vollstimulation. Bei den T-Zell-depletierten PBMCs erwies sich expansiv am schwächsten wirksam die Stimulation mit SAC und PWM (Mittelwerte der Kontrollen und SIgMID bei 25,9 bzw. 25%), gefolgt vom Ansatz ohne Stimulanzien, dem CpG- und dem T-Zellfaktoren-Ansatz (CD40L, Interleukine). Die Vollstimulation brachte mit 66,7 bzw. 61,4% der ausgesäten PBMC-Zahl nach Stimulation die höchsten Expansionswerte.

Die Gesamt-PBMCs ließen sich ohne Stimulanzien (56,8 bzw. 71,9 %) und in der Vollstimulation (132,1 bzw. 124 %) durchweg besser expandieren als die T-Zell-depletierten. Bei durch einzelne Messwerte bedingten relativ großen Streuungsbreiten zeigte sich im Vergleich der Kontroll- und Patientengruppe ein weitestgehend gleichwertiges Bild ohne bedeutende Abweichungen der Expansionsfähigkeit für beide Stimulationen.



Abbildung 18: Expansion von PBMCs unter verschiedenen *in vitro* Stimulationen von T-Zell-depletierten und Gesamt-PBMCs. Die Zellen wurden sieben Tage bei 37 °C ohne bzw. unter Zugabe der angegebenen Stimulanzien kultiviert und anschließend mikroskopisch ausgezählt. Auf der x-Achse sind die Stimulationsansätze aufgeführt, auf der y-Achse ist die PBMC-Zahl der jeweiligen Stimulation in Prozent der Ausgangs-PBMC-Zahl aufgetragen. Vollstimulation = SAC, PWM, CpG, CD40L, IL-2, IL-10, IL-21. Kontrollprobanden n=7 bzw. n=3 (SAC, PWM); SIgMID n=5-7. SAC = Staphylokokkus aureus Cowan Strain I; PWM = Pokeweed mitogen; CpG = Cytosin-Phosphat-Guanosin-Oligodesoxyribonukleotid; CD40L = Cluster of Differentiation 40 Ligand; IL = Interleukin. Werte der Kontrollprobanden sind als ausgefüllte Kreise, der SIgMID-Patienten als übrige Symbole dargestellt. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert \pm SEM.

4.3.2 Expansionsverhalten der B-Zellen

Aus der PBMC-Expansion und den durchflusszytomtrischen Daten wurde die CD19⁺ B-Zellzahl nach Stimulation bestimmt und rechnerisch auf die zu Beginn der Stimulation ausgesäte B-Zellzahl bezogen, die Ergebnisse zeigt Abb. 19.

Die auffälligsten Ergebnisse ergab die B-Zellexpansion mit T-Zellen in der Kultur: Bei den gesunden Probanden war sie eindeutig am effektivsten (727,8 % \pm 223,6 %), mit einem T-Zell-assoziierten mittleren Zugewinn von etwa 570 %. Ganz im Gegensatz zu den meisten Patienten, bei denen die Zunahme der Expansion unter T-Zelleinfluss im Vergleich zur Vollstimulation T-Zell-depletierter PBMCs nahezu ausblieb (237,2 % \pm 120,9 %). Der Unterschied der Mittelwerte beider Gruppen erwies sich mit einem p-Wert von 0,0530 als annähernd statistisch signifikant. Von den sechs Kontrollprobanden fand sich lediglich einer im Bereich der sechs Patienten mit niedrigen Werten, die übrigen lagen höher. Einzig Patient 3 zeigte mit 939,6 % ein höheres Ergebnis als die übrigen und lag damit im weiter gestreuten Bereich der Kontrollprobanden.

Vergleicht man die Effektivität der sonstigen Stimulationen untereinander, so zeigt sich die Reihenfolge wie in 4.3.1 beschrieben: *SAC, PWM* mit der schwächsten (Probanden und SIgMID bei 29,5 bzw. 19,4 %) und die Vollstimulation mit der stärksten (155,3 bzw. 149,6 %) B-Zellexpansion bei den T-Zell-depletierten Ansätzen. Größere Mittelwertabweichungen zwischen Kontrollen und Patienten ohne T-

Zellen wurden bei *SAC*, *PWM* (siehe oben) und *CpG* (89,1 bzw. 70,2 %) gemessen, ohne bei teilweise niedrigen n-Werten (n=3 bei Kontrollen von SAC, PWM) statistisch signifikant zu sein.

In der Stimulation mit *CD40L*, *IL-2*, *IL-10*, *IL-21* ließ sich bei den Patienten eine Vierergruppe mit niedrigen Werten abgrenzen, auf diesem Niveau fand sich lediglich ein Kontrollproband. Zwei weitere Patienten lagen im höheren Bereich der Kontrollprobanden und Patient 6 hebt sich mit 223,1 % von allen übrigen Messwerten ab.



Abbildung 19: Expansion von B-Zellen unter verschiedenen *in vitro* Stimulationen von T-Zell-depletierten und Gesamt-PBMCs. Die Zellen wurden sieben Tage bei 37 °C ohne bzw. unter Zugabe der angegebenen Stimulanzien kultiviert und anschließend mikroskopisch ausgezählt. Auf der x-Achse sind die Stimulationsansätze aufgeführt, auf der y-Achse ist die B-Zellzahl der jeweiligen Stimulation in Prozent der Ausgangs-B-Zellzahl aufgetragen. Vollstimulation = SAC, PWM, CpG, CD40L, IL-2, IL-10, IL-21. Kontrollprobanden n=7 bzw. n=3 (SAC, PWM); SIgMID n=5-7. Werte der Kontrollprobanden sind als ausgefüllte Kreise, der SIgMID-Patienten als übrige Symbole dargestellt. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert \pm SEM.

4.3.3 Verteilung der B-Zell-Subpopulationen nach *in vitro* Stimulationen

Zum Vergleich ist in den Abbildungen neben den Populationsverhältnissen nach Stimulation ("Tag 7") auch die Verteilung im peripheren Blut der Probanden und Patienten unmittelbar nach Abnahme bzw. vor Beginn der Stimulation ("Tag 0", siehe 4.2.4) dargestellt.

T-Zell-depletierte PBMCs

Der Ansatz *Ohne Stimulanzien* zeigte die Dynamik der B-Zellpopulationen, wenn keine stimulierenden Agenzien zum Kulturmedium gegeben wurden: GZ, MZ und Naive stellten wie an Tag 0 die stärksten Populationen, eine Differenzierung in Richtung Plasmablasten fand kaum statt. Statistisch signifikante Unterschiede waren nicht zu beobachten.



Abbildung 20: Die Verteilung der B-Zell-Subpopulationen nach verschiedenen *in vitro* Stimulationen von T-Zelldepletierten PBMCs. Die Zellen von SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden wurden nach $CD3^+$ T-Zell-Depletion für sieben Tage bei 37 °C ohne bzw. unter Zugabe der verschiedenen Stimulanzien kultiviert, anschließend mikroskopisch ausgezählt und durchflusszytometrisch analysiert. Auf der y-Achse ist die Zellzahl im peripheren Blut vor Stimulation (Titel Tag 0) bzw. die B-Zellzahl nach der jeweiligen Stimulation in Prozent der Ausgangs-B-Zellzahl (Titel Tag 7) aufgetragen. Vollstimulation = SAC, PWM, CpG, CD40L, IL-2, IL-10, IL-21. Für Tag 7: Kontrollprobanden n=6-7 bzw. n=3 (SAC, PWM); SIgMID n=5-6. Isotypgew. GZ = Isotyp-gewechselte Gedächtnis-B-Zellen; DN = Doppelt-negative B-Zellen; MZ-ähnliche = Marginalzonen-ähnliche B-Zellen. Logarithmisch nicht darstellbare Nullwerte in SAC, PWM (1x SIgMID Plasmablast). Werte der Kontrollprobanden sind als ausgefüllte Kreise, der SIgMID-Patienten als übrige Symbole dargestellt. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden sind dargestellt (*p \leq 0,05; **p \leq 0,01).

Im Ansatz *SAC*, *PWM* zeigte sich eine dem Ansatz *Ohne Stimulanzien* vergleichbare B-Zellantwort. Bei lediglich drei Kontrollwerten gab es keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Vergleichsgruppen zu benennen.

Die Stimulation mit *CpG* bewirkte eine deutliche quantitative und qualitative Verschiebung der B-Zellverteilung ausgehend von "Tag 0". Die Patienten wiesen statistisch signifikant weniger GZ (13,7 \pm 2,9 %; p=0,0140) und etwas geringere Plasmablastenzahlen (19,2 %) auf. Bei den Probanden machten die GZ im Mittel den größten Anteil aus (27,6 \pm 3,9 %) gefolgt von den Plasmablasten (24,9 %), während bei den Patienten die Plasmablasten vor den GZ lagen. Die weiteren Subpopulationen zeigten sich unauffällig.

Der Stimulationsansatz *CD40L*, *IL-2*, *IL-10*, *IL-21* legte diverse Abweichungen offen: GZ, MZ und Naive waren bei den Patienten statistisch signifikant erniedrigt. Es wurden weniger GZ bei den Patienten ($8,2 \pm 1,6 \%$) gegenüber den Probanden ($17,7 \pm 2,6 \%$) gemessen (p=0,0043); ebenso MZ (9,1 ± 3 bzw. 1,6 ± 0,4 %; p=0,0022) und Naive ($7,8 \pm 2,2$ bzw. 2,3 ± 0,4 %; p=0,0152). DN waren tendenziell ebenfalls erniedrigt. Die größte Population stellten bei Probanden und Patienten die Plasmablasten ($35 \pm 9,6$ bzw. 56,6 ± 27,1 %). Bei deutlicher Erhöhung des Mittelwertes der Patienten lag keine Signifikanz vor, da sich die Messwerte der Patienten gruppenartig in drei niedrige, unterhalb der Kontrollwerte liegende, und drei höhere Werte aufteilten.

In der *Vollstimulation* zeigte sich ein deutliches Bild bei Probanden und Patienten im Sinne der Differenzierung hin zu Plasmazellen (93,5 bzw. 102 %) und der Abnahme IgD-exprimierender Zellen (MZ, Naive) auf Werte unter 4 %. Die einzige nennenswerte Abweichung zeigte sich in einer Erniedrigung bei den GZ der Patienten mit 28,2 % im Mittel gegenüber 46,3 %.

In der Zusammenschau der obigen Beschreibungen kann man mit Blick auf die drei aussagekräftigsten Ansätze *CpG*, *CD40L*, *IL-2*, *IL-10*, *IL-21* und *Vollstimulation* festhalten, dass die GZ die auffälligste Subpopulation bei den Patienten bildeten. Sie zeigten sich bei allen drei Ansätzen erniedrigt, in zwei Fällen signifikant. DN und MZ zeigten, am deutlichsten im Ansatz *CD40L*, *IL-2*, *IL-10*, *IL-21*, ebenfalls niedrigere Werte, die sich jedoch meist im Bereich unter 10 % bewegten und somit einen vergleichsweise kleinen Teil der Gesamt-B-Zellen ausmachten mit entsprechend geringeren Differenzwerten. Die Plasmablasten ließen keinen eindeutigen Trend erkennen. Am auffälligsten war hier die Aufspaltung der Patientengruppe im Ansatz *CD40L*, *IL-2*, *IL-10*, *IL-21* in einen Teil mit erniedrigten und einen Teil mit hohen Zellzahlen.

Gesamt-PBMCs

Das Bild der Subpopulationsverteilung nach *Vollstimulation* unter T-Zell-Einfluss zeigte sich passend zur eingeschränkten Expansion der Gesamt-B-Zellen (s. 4.3.2), wie Abb. 21 zeigt. Erniedrigte Zellzahlen der

Probanden und Patienten waren bei allen Populationen erkennbar: So lag der Mittelwert der Probanden für Plasmablasten bei 434,5 % und für die Patienten bei 152,2 %, was den Großteil des Expansionsdefizits ausmacht. Der Unterschied war mit p=0,0513 fast statistisch signifikant. Die schwächere Expansion der Patienten-B-Zellen zeigte sich weiterhin in den Zahlen der GZ (216,4 bzw. 81,5 %) und DN (58 bzw. 20,5 %), sowie im für die Gesamtzellzahl kaum noch bedeutenden Bereich bei Naiven (5,4 bzw. 1,5 %) und statistisch signifikant bei den MZ (13 \pm 2,8 bzw. 2,2 \pm 1 %; p=0,0047).



Abbildung 21: Die Verteilung der B-Zell-Subpopulationen nach *in vitro* Stimulation von Gesamt-PBMCs. Die Zellen von SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden wurden für sieben Tage bei 37 °C mit und ohne Zugabe der Stimulanzien SAC, PWM, CpG, CD40L, IL-2, IL-10, IL-21 (Vollstimulation) kultiviert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Auf der y-Achse ist die Zellzahl im peripheren Blut vor Stimulation (Titel Tag 0) bzw. die B-Zellzahl nach Stimulation in Prozent der Ausgangs-B-Zellzahl (Titel Tag 7) aufgetragen. Für Tag 7: Kontrollprobanden n=7; SIgMID n=6. Isotyp-gew. GZ = Isotyp-gewechselte Gedächtnis-B-Zellen; DN = Doppelt-negative B-Zellen; MZ-ähnliche = Marginalzonen-ähnliche B-Zellen. Logarithmisch nicht darstellbare Nullwerte in der Vollstimulation (1x SIgMID MZ, 1x Kontrolle Naive). Werte der Kontrollprobanden sind als ausgefüllte Kreise, der SIgMID-Patienten als übrige Symbole dargestellt. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden sind dargestellt (*p \leq 0,05; **p \leq 0,01).

Es wurde der Anteil oberflächlich IgM-exprimierender Zellen nachgewiesen (s. Abb. 22). Die MZ und Naiven zeigten nach allen Stimulationen eine IgM-Expression im Bereich gegen 100%, einzelne Abweichungen unter 90% bildeten die Ausnahme. Auf sie wird im Folgenden aus diesem Grund nicht gesondert eingegangen.

T-Zell-depletierte PBMCs

Der deutlichste Befund zeigte sich nach Stimulation mit *CD40L*, *IL-2*, *IL-10*, *IL-21*: ein statistisch signifikant verringerter Anteil IgM⁺ B-Zellen (48,1 \pm 5,2 bzw. 23,7 \pm 8,4 %; p=0,0360). Das Zustandekommen der verringerten IgM-Expression erklärt sich zum einen durch geringere Anteile IgM⁺ GZ und DN, zum anderen durch den geringeren Anteil an MZ und Naiven nach dieser Stimulation (s. Abb. 20), die als IgM-tragende Zellen einen wichtigen Teil der gesamten IgM⁺ B-Zellpopulation bilden. Der Ansatz *Ohne Stimulanzien* hatte kaum einen Effekt auf die extrazelluläre IgM-Expression im Vergleich zum Ausgangsbild vor Stimulation. Lediglich die DN zeigten leicht gestiegene Werte. Zwischen Probanden und Patienten waren insgesamt keine bedeutenden Unterschiede zu beobachten.

Auch der Ansatz *SAC, PWM* zeigte bei den Probanden keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zur IgM-Expression an "Tag 0". Einige Patienten hatten jedoch einen erniedrigten Anteil IgM-exprimierender B-Zellen insgesamt, wobei die größte Differenz auf DN (63,9 bzw. 45,5 %) und GZ (34,6 \pm 2,8 bzw. 20 \pm 4,1 %) entfiel. Letztere zeigten sogar statistische Signifikanz (p=0,0303).

Der Ansatz *CpG* bewirkte als einziger eine durchgehend unauffällige IgM-Expression bei den Probanden. Der Anteil IgM⁺ B-Zellen lag bei Probanden und Patienten mit 71,7 bzw. 72,4 % so hoch wie nach keiner anderen Stimulation und knapp über den Werten vor Stimulation.

Aus der *Vollstimulation* ergab sich ein recht gleichwertiger Anteil IgM⁺ Gesamt- und DN B-Zellen bei Probanden und Patienten. Die Plasmablasten zeigten einen im unteren Bereich der Probanden gelegenen IgM⁺ Anteil, die GZ waren im Mittel reduziert.

Betrachtet man die IgM-Expression der Subpopulationen mit Blick auf die vier Stimulationsansätze, so ist der reduzierte Anteil IgM⁺ GZ und DN durchgehend am auffälligsten. Die Stimulation mit CpG im Vergleich zu den übrigen Stimulationen, wie auch in Bezug auf die beiden Gruppen, konnte am ehesten das Bestehen bzw. die Differenzierung IgM-exprimierender Zellen bei Probanden und Patienten gleichermaßen bewirken.



Abbildung 22: Der Anteil oberflächlich IgM-exprimierender B-Zellen und Subpopulationen nach verschiedenen *in vitro* Stimulationen von T-Zell-depletierten PBMCs. Die Zellen von SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden wurden nach CD3⁺ T-Zell-Depletion für sieben Tage bei 37 °C ohne bzw. unter Zugabe der verschiedenen Stimulanzien kultiviert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Für Gesamt-B-Zellen und Subpopulationen wurde der %-Anteil IgM⁺ Zellen der jeweiligen Population ermittelt. Vollstimulation = SAC, PWM, CpG, CD40L, IL-2, IL-10, IL-21. Für Tag 7: Kontrollprobanden n=7-9 bzw. n=5 (SAC, PWM); SIgMID n=5-6. Isotyp-gew. GZ = Isotyp-gewechselte Gedächtnis-B-Zellen; DN = Doppelt-negative B-Zellen; MZ-ähnliche = Marginalzonen-ähnliche B-Zellen. Werte der Kontrollprobanden sind als ausgefüllte Kreise, der SIgMID-Patienten als übrige Symbole dargestellt. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert ± SEM. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden sind dargestellt (*p≤0,05).

Gesamt-PBMCs

Die *Vollstimulation* mit T-Zellen in der Kultur bewirkte bei den B-Zellen insgesamt und bei den einzelnen Subpopulationen einen höheren Anteil IgM⁺ Zellen als die *Vollstimulation* ohne T-Zellen, dies galt besonders für die Probanden (s. Abb. 23). Bei der Patientengruppe konnte dieser Effekt nicht bei allen Subpopulationen festgestellt werden und teilweise sogar niedrigere IgM⁺ Anteile unter T-Zelleinfluss (GZ, DN) bedingten stärkere Abweichungen der IgM-Expression zwischen den beiden Gruppen: Die Probanden hatten im Mittel statistisch signifikant höhere Anteile IgM⁺ B-Zellen als die Patienten (47,2 ± 4,6 bzw. 28,8 ± 6,8 %; p=0,0426). Dies zeigte sich ebenfalls mit statistischer Signifikanz bei den DN (77,3 ± 5 bzw. 41,6 ± 11,6 %; p=0,0293), tendenziell bei den GZ (59,8 bzw. 30,1 %) und den Plasmablasten.



Abbildung 23: Der Anteil oberflächlich IgM-exprimierender B-Zellen und Subpopulationen nach *in vitro* Stimulation von Gesamt-PBMCs. Die Zellen von SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden wurden für sieben Tage bei 37 °C mit und ohne Zugabe der Stimulanzien SAC, PWM, CpG, CD40L, IL-2, IL-10, IL-21 (Vollstimulation) kultiviert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Für Gesamt-B-Zellen und Subpopulationen wurde der %-Anteil IgM⁺ Zellen der jeweiligen Population ermittelt. Für Tag 7: Kontrollprobanden n=7-8; SIgMID n=6. Isotyp-gew. GZ = Isotyp-gewechselte Gedächtnis-B-Zellen; DN = Doppelt-negative B-Zellen; MZ-ähnliche = Marginalzonen-ähnliche B-Zellen. Werte der Kontrollprobanden sind als ausgefüllte Kreise, der SIgMID-Patienten als übrige Symbole dargestellt. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden sind dargestellt (*p \leq 0,05).
Im Ansatz *Ohne Stimulanzien* zeigte sich eine IgM-Expression, wie sie in vergleichbarer Weise vor Stimulation bestand, ohne relevantere Abweichungen zwischen Probanden und Patienten.

4.3.5 Intrazelluläre IgM-Expression nach *in vitro* Stimulationen

Die Stimulationen (hier die *Vollstimulationen*) erfolgten wie oben beschrieben mit T-Zell-depletierten und Gesamt-PBMCs. Zur durchflusszytometrischen Analyse der IgM-spezifischen mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der CD19⁺IgM⁺ B-Zellen wurde ein Teil der Zellen anschließend der intrazellulären IgM-Färbung zugeführt.

Die poststimulatorische intrazelluläre IgM-Expression war im Gesamtbild unauffällig (s. Abb. 24). Nach der Stimulation T-Zell-depletierter PBMCs zeigten die IgM⁺ B-Zellen von Probanden und Patienten im Mittel und auch im Einzelabgleich vergleichbare IgM-assoziierte MFI (96929 bzw. 111678). Die Stimulation mit Gesamt-PBMCs ergab bei insgesamt etwas niedrigeren Werten bei Probanden und Patienten (75847 bzw. 101047) ein ähnliches Bild, wobei die Differenz der Mittelwerte vor allem durch die höheren Werte der Patienten 2 und 5 bedingt war.



Abbildung 24: Mittlere intrazelluläre IgM-Fluoreszenzintensitäten der IgM⁺ **B-Zellen nach** *in vitro* **Stimulation.** T-Zell-depletierte und Gesamt-PBMCs wurden nach siebentägiger Kultur bei 37 °C (mit SAC, PWM, CpG, CD40L, IL-2, IL-10, IL-21) fixiert und permeabilisiert, um nach Färbung mit Anti-IgM-Antikörpern durchflusszytometrisch die IgM-assoziierte Mittlere Fluoreszenzaktivität (MFI) der CD19⁺IgM⁺ B-Zellen zu bestimmen. Kontrollprobanden n=9; SIgMID n=6. T-Zell-depl. = T-Zell-depletiert. Werte der Kontrollprobanden sind als ausgefüllte Kreise, der SIgMID-Patienten als sonstige Symbole dargestellt. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert \pm SEM.

4.3.6 Antikörper-sezernierende Zellen nach *in vitro* Stimulationen im ELISpot-Verfahren

Es wurden Zellen nachgewiesen, die unspezifische IgM, IgA und IgG (4.3.5.1 und 4.3.5.2) sowie PnPsund Tetanustoxoid-spezifische IgM und IgG (4.3.5.3 und 4.3.5.4) sezernierten. Die Auszählung erfolgte in Form sog. Spots, diese stehen in der vorliegenden Untersuchung für einzelne oder zusammenhängende Zellen, die den nachzuweisenden Ig-Isotyp sezerniert haben, also Antikörper-sezenierende Zellen (ASZ). Spots und ASZ werden hier vereinfachend synonym verwendet.

Die Zellen für dieses Experiment stammten aus den zuvor besprochenen *in vitro* Stimulationen. Für die Durchführung des Assays wurden stets gleiche Zellzahlen eingesetzt, anhand der ebenfalls durchgeführten Durchflusszytometrie mit Ermittlung des B-Zell-Anteils konnten die Spot-Zahlen dann auf eine definierte B-Zellzahl (hier 10⁶) bezogen werden, um Abweichungen in der Zusammensetzung der PBMCs zu nivellieren. Die Bezugsgröße war zum einen die B-Zellzahl nach durchgeführter Stimulation (Tag 7), um die Sekretionsleistung der B-Zellen ungeachtet vorangegangener Proliferationsund Apoptosegeschehen isoliert zu betrachten. Zum anderen wurden die Spot-Zahlen auf die B-Zellzahl zu Beginn der Stimulation (Tag 0) bezogen, um das Expansionsverhalten zu inkludieren und somit ein *in-vivo*-näheres Szenario zu simulieren bzw. das tatsächliche quantitative Outcome zu ermitteln.

4.3.6.1 ASZ nach *in vitro* Stimulationen

In diesem Abschnitt wird die ASZ-Differenzierung unabhängig von der Expansionsleistung in Bezug auf die B-Zellzahlen nach Stimulation (Tag 7) betrachtet.

T-Zell-depletierte PBMCs

Probanden und Patienten zeigten insgesamt kaum relevante Unterschiede im ASZ-Anteil der B-Zellen nach den Stimulationen.

Im Kontrollansatz *Ohne Stimulanzien* konnten ASZ aller Isotyp-Klassen nachgewiesen werden (s. Abb. 25). Probanden und Patienten zeigten durchweg vergleichbare Werte, die Rate der IgM-ASZ lag bei 3669 bzw. 2760 pro 10⁶ B-Zellen an Tag 7 und damit im Vergleich zu den weiteren Stimulationen sehr niedrig, gleiches gilt für IgA und IgG.

In der Stimulation *SAC*, *PWM* wurden ebenfalls Ig der drei Isotypen nachgewiesen (IgA mit Probanden n=2 nicht gezeigt) ohne dass Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen feststellbar wurden.

Die Stimulation mit *CpG* zeigte eine eindeutige Präferenz für die Bildung von IgM-ASZ. Probanden und Patienten lagen hier in etwa auf einem Niveau (167.206 bzw. 183.370 ASZ/ 10^6), während IgA- und IgG-ASZ von beiden Gruppen gleichermaßen in geringerem Umfang ausgebildet wurden.

Nach *CD40L, IL-2, IL-10, IL-21* zeigte sich IgG als stärkster Isotyp mit höherem Mittelwert und größerer Streuungsbreite bei den Patienten (141.801 bzw. 236.754 ASZ/10⁶). Auch die Werte für IgM und IgA waren bei den Patienten mit erneut größerer Streuungsbreite im Vergleich etwas höher (IgM 8.082 bzw. 19.940 ASZ/10⁶).



Abbildung 25: Nachweis unspezifischer Antikörper-sezernierender Zellen (ASZ) der Isotypen IgM, IgA und IgG nach *in vitro* Stimulationen CD3⁺ T-Zell-depletierter PBMCs im ELISpot-Verfahren. Die Zellen von SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden wurden nach CD3⁺ T-Zell-Depletion für sieben Tage bei 37 °C ohne bzw. unter Zugabe der verschiedenen Stimulanzien kultiviert und anschließend zur CD19⁺ B-Zell-Detektion durchflusszytometrisch analysiert. Per ELISpot wurde die ASZ-Zahl des jeweiligen Isotyps über die Spot-Zahl pro 10⁶ B-Zellen nach Stimulation bestimmt. Vollstimulation = SAC, PWM, CpG, CD40L, IL-2, IL-10, IL-21. Kontrollprobanden n=7 bzw. n=3 (SAC, PWM); SIgMID n=6. Werte der Kontrollprobanden sind als ausgefüllte Kreise, der SIgMID-Patienten als sonstige Symbole dargestellt. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert \pm SEM.

In der *Vollstimulation* zeigte sich die effektivste Differenzierung von ASZ für alle drei Isotypen. Die Patienten wiesen durchweg höhere Mittelwerte auf, bei IgA (87.967 bzw. 129.884 ASZ/ 10^6) und IgG (257.106 bzw. 344.586 ASZ/ 10^6) am deutlichsten, jedoch nicht statistisch signifikant. IgM lag bei 162.356 bzw. 187.841 ASZ/ 10^6 .

Gesamt-PBMCs

Im Kontrollansatz *Ohne Stimulanzien* konnten ASZ aller Isotyp-Klassen nachgewiesen werden (s. Abb. 26). Die Patienten zeigten dabei durchgehend geringere Anteile von ASZ. Während die Mittelwertabweichung bei den IgM-ASZ noch vor allem durch zwei hohe Einzelwerte der Probanden entstand (13.617 bzw. 4.534 ASZ/10⁶ B-Zellen an Tag 7), war die Tendenz bei den IgA- (18.769 bzw. 6.367 ASZ/10⁶) und IgG-ASZ (17.545 bzw. 11.145 ASZ/10⁶) etwas eindeutiger, jedoch statistisch nicht signifikant.

Nach der *Vollstimulation* war die Spot-Bildung in beiden Gruppen am Mittelwert gemessen gleich effektiv. Die IgM-Werte der Patienten zeigten jedoch eine Aufspaltung in hohe (Patient 1, 4) und niedrige (Patient 2, 3, 6) Werte (Patient 5 aufgrund fehlerhafter durchflusszytometrischer Analyse an Tag 7 nicht gezeigt). Es wurden ähnlich viele IgM- (254.589 bzw. 244.719 ASZ/10⁶), IgG- (267.118 bzw. 275.782 ASZ/10⁶) und IgA-Spots (72.013 bzw. 94.490 ASZ/10⁶) bei Probanden und Patienten detektiert.



Abbildung 26: Nachweis unspezifischer Antikörper-sezernierender Zellen (ASZ) der Isotypen IgM, IgA und IgG nach *in vitro* Stimulationen von Gesamt-PBMCs im ELISpot-Verfahren. Die Zellen von SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden wurden für sieben Tage bei 37 °C ohne bzw. unter Zugabe der Stimulanzien SAC, PWM, CpG, CD40L, IL-2, IL-10, IL-21 (Vollstimulation) kultiviert und anschließend zur CD19⁺ B-Zell-Detektion durchflusszytometrisch analysiert. Per ELISpot wurde die ASZ-Zahl des jeweiligen Isotyps über die Spot-Zahl pro 10⁶ B-Zellen nach Stimulation bestimmt. Kontrollprobanden n=5-7; SIgMID n=5-6. Werte der Kontrollprobanden sind als ausgefüllte Kreise, der SIgMID-Patienten als sonstige Symbole dargestellt. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert \pm SEM.

In der Gesamtbetrachtung der Stimulationen und Isotypen kann man festhalten, dass Probanden und Patienten ein weitgehend gleichartiges Bild abgaben. Ungeachtet der vorangegangenen Expansionsleistung hatten die B-Zellen von Patienten und Probanden also etwa gleiche Anteile unspezifischer ASZ. Besonders unter Beteiligung der T-Zellfaktoren zeigte sich ein gleichwertiger bis tendenziell erhöhter ASZ-Nachweis bei den Patienten.

Die *Vollstimulation* mit T-Zellen bewirkte bei den Probanden insgesamt eine etwas effektivere IgM-ASZ-Bildung im Vergleich zur *Vollstimulation* ohne T-Zellen. Für den Patient 1 galt dies ebenfalls, nicht jedoch für die Patienten 2, 3 und 6. Die erhöhte IgG-ASZ-Frequenz der Patienten bei T-Zell-Depletion war unter T-Zell-Einfluss aufgehoben und ohne den Einfluss weiterer Stimulanzien war die ASZ-Bildung der Patienten unter T-Zell-Einfluss eingeschränkt.

4.3.6.2 ASZ nach *in vitro* Stimulationen unter Berücksichtigung der Expansion

In diesem Abschnitt wird die ASZ-Differenzierung abhängig von der Expansionsleistung in Bezug auf die B-Zellzahlen vor Stimulation (Tag 0) betrachtet.

T-Zell-depletierte PBMCs

Wird die Expansion durch Bezugnahme auf die B-Zell-Anteile vor Stimulation mit einbezogen, ändert sich am Gesamtbild der ASZ-Bildung nach Stimulationen T-Zell-depletierter PBMCs nicht viel, entsprechend der Ausgangsdaten aus ASZ-Frequenz und Expansion (s. 4.3.6.1 und 4.3.2) sind kaum relevante Abweichungen zwischen Patienten und Probanden zu verzeichnen. Abb. 27 zeigt die Ergebnisse im Überblick.

Die Ansätze *Ohne Stimulanzien* und *SAC*, *PWM* zeigten weiterhin den schwächsten Effekt auf die ASZ-Differenzierung, durch die Berücksichtigung der niedrigen Expansionswerte lagen die Zahlen in ähnlicher Verteilung wie bei Bezug auf Tag 7, jedoch auf niedrigerem Niveau.

Aufgrund der im Mittel schlechteren Expansion und eines hohen Einzelwertes der Probanden war die IgM-ASZ-Bildung nach *CpG*-Stimulation bei den Patienten niedriger (161.075 bzw. 112.408 ASZ/10⁶), im Einzelwertabgleich jedoch eher gleichwertig. Auch *CD40L*, *IL-2*, *IL-10*, *IL-21* bewirkte eine weitgehend ausgeglichene ASZ-Bildung bei Probanden und Patienten.

In der Vollstimulation war die Tendenz der Patientengruppe zur oben beschriebenen erhöhten Spot-Bildung bei Betrachtung unter Einschluss der Expansionsleistung kaum mehr auszumachen. Die IgM-ASZ-Bildung bewegte sich auf vergleichbarem Niveau (254.584 bzw. 219.115 ASZ/10⁶), hohe Werte von Patient 6 bewirkten erhöhte Mittelwerte bei IgA und IgG bei ansonsten gleichwertiger Verteilung.

Keine der genannten Unterschiede waren statistisch signifikant. Im Vergleich der Stimulationseffektivität war die Vollstimulation durch die hohen Expansionszahlen weit überlegen.



Abbildung 27: Nachweis unspezifischer Antikörper-sezernierender Zellen (ASZ) der Isotypen IgM, IgA und IgG nach *in vitro* Stimulationen CD3⁺ T-Zell-depletierter PBMCs im ELISpot-Verfahren unter Berücksichtigung der Expansion. Die Zellen von SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden wurden nach CD3⁺ T-Zell-Depletion für sieben Tage bei 37 °C ohne bzw. unter Zugabe der verschiedenen Stimulanzien kultiviert und anschließend zur CD19⁺ B-Zell-Detektion durchflusszytometrisch analysiert. Per ELISpot wurde die ASZ-Zahl des jeweiligen Isotyps über die Spot-Zahl pro 10⁶ B-Zellen zu Beginn der Stimulation bestimmt. Vollstimulation = SAC, PWM, CpG, CD40L, IL-2, IL-10, IL-21. Kontrollprobanden n=7 bzw. n=3 (SAC, PWM); SIgMID n=6. Werte der Kontrollprobanden sind als ausgefüllte Kreise, der SIgMID-Patienten als sonstige Symbole dargestellt. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert ± SEM.

Gesamt-PBMCs

In der Differenzierung von IgM- und IgG-ASZ zeigten sich eindeutige Unterschiede zwischen Probanden und Patienten in der *Vollstimulation*, s. Abb. 28. Auch bedingt durch einen hohen Einzelwert stand ein Mittelwert der Kontrollgruppe von 2.175.130 IgM-ASZ/10⁶ B-Zellen an Tag 0 dem Patienten-Mittel von 793.178 ASZ/10⁶ gegenüber. Besonders wenige ASZ wurden bei den Patienten 2, 4 und 6 gezählt, die übrigen lagen im Bereich der Kontrollgruppe. Der Unterschied war mit p=0,0734 statistisch nicht signifikant. Dies traf allerdings auf die IgG-ASZ zu: Im Mittel 1.831.610 \pm 214.488 ASZ/10⁶ der Probanden waren bei weniger großer Streuungsbreite als bei vielen zuvor besprochenen Messungen statistisch signifikant mehr als die 795.111 \pm 299.687 ASZ/10⁶ der Patienten (p=0,0260). Die IgA-ASZ waren bei den Patienten tendenziell ebenfalls vermindert.

Dass die großen Differenzen zwischen den Vergleichsgruppen, vor allem bei den IgG-ASZ, in erster Linie auf die niedrigere Expansionsrate der Patienten-B-Zellen zurückzuführen sind, wird beim Vergleich mit dem Bild nach Vollstimulation mit Bezugnahme auf die B-Zellzahl an Tag 7 klar (Abb. 26).

Unterschiede zwischen den Mittelwerten liegen im Ansatz *Ohne Stimulanzien* zwar vor, sind angesichts hoher Einzelwerte bei den Probanden aber kaum relevant. Bei vergleichbarer Expansion sind die Unterschiede hier auf eine teilweise anteilig verminderte ASZ-Differenzierung der Patienten-B-Zellen bei T-Zell-Beteiligung zurückzuführen.



Abbildung 28: Nachweis unspezifischer Antikörper-sezernierender Zellen (ASZ) der Isotypen IgM, IgA und IgG nach *in vitro* Stimulationen von Gesamt-PBMCs im ELISpot-Verfahren unter Berücksichtigung der Expansion. Die Zellen von SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden wurden für sieben Tage bei 37 °C ohne bzw. unter Zugabe der Stimulanzien SAC, PWM, CpG, CD40L, IL-2, IL-10, IL-21 (Vollstimulation) kultiviert und anschließend zur CD19⁺ B-Zell-Detektion durchflusszytometrisch analysiert. Per ELISpot wurde die ASZ-Zahl des jeweiligen Isotyps über die Spot-Zahl pro 10⁶ B-Zellen zu Beginn der Stimulation bestimmt. Kontrollprobanden n=6-7; SIgMID n=6. Werte der Kontrollprobanden sind als ausgefüllte Kreise, der SIgMID-Patienten als sonstige Symbole dargestellt. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden sind dargestellt (*p≤0,05).

4.3.6.3 PnPS-spezifische ASZ nach *in vitro* Stimulationen

Es erfolgte der Sekretionsnachweis Pneumokokkenpolysaccharid-spezifischer Antikörper der Klassen IgM und IgG im ELISpot-Verfahren nach verschiedenen *in vitro* Stimulationsansätzen mit CD3⁺ T-Zelldepletierten und Gesamt-PBMCs. Zellen aus den in 4.3.1 beschriebenen siebentägigen Stimulationen wurden auch für diese Untersuchung verwendet. Aus den Kontrollansätzen *Ohne Stimulanzien* konnten bei zwei Kontrollprobanden keine spezifischen ASZ nachgewiesen werden, weshalb der Ansatz nicht weiter verfolgt wurde. Unter *SAC, PWM* zeigte sich eine schwache oder keine Differenzierung spezifischer ASZ bei Probanden und Patienten, die Daten sind nicht dargestellt.

Die Vergleichsmöglichkeiten zwischen Probanden- und Patientengruppe sind begrenzt und statistische Berechnungen nicht möglich, da nur 2-3 Probandenwerte vorliegen. Eine grobe Orientierung zur spezifischen ASZ-Bildung wird jedoch ermöglicht, wie auch ein Vergleich der Auswirkungen verschiedener Stimulationen untereinander.

Abb. 29 zeigt den Nachweis PnPS-spezifischer IgM- und IgG-ASZ nach *in vitro* Stimulationen unter Berücksichtigung der B-Zell-Expansion. Durch die Stimulation mit CpG konnte eine Induktion von PnPS-IgM-ASZ erzielt werden. Die Patienten lagen im Mittel (1928 ASZ/10⁶ B-Zellen an Tag 0) etwas über den beiden Probanden (785 ASZ/10⁶). Unter *CD40L, IL-2, IL-10, IL-21* war die Effektivität äußerst gering (Höchstwert 310 ASZ/10⁶), zwei von drei Probanden und drei von sechs Patienten zeigten überhaupt PnPS-spezifische ASZ. Effektiver zeigten sich die Vollstimulationen T-Zell-depletierter (*CD3-Vollstimulation*) und nicht-depletierter (*CD3+ Vollstimulation*) PBMCs. Ohne T-Zellen zeigte sich eine durchweg gute Antwort der Patienten, im Mittel besser als die drei Probanden (7446 bzw. 14597 ASZ/10⁶). Mit T-Zellen war eine Aufteilung der Patientengruppe zu beobachten, mit zwei hohen Werten über 60.000 und drei niedrigen unter 3.500 ASZ/10⁶ (Probandenmittel 17.034 ASZ/10⁶).

Die Bildung von PnPS-spezifischen IgG-ASZ fand im Vergleich zu den IgM-Isotypen deutlich weniger statt. Nach *CpG* und *CD40L, IL-2, IL-10, IL-21* konnten bei den meisten Probanden und Patienten keine ASZ nachgewiesen werden. Die *CD3- Vollstimulation* ohne T-Zellen zeigte sich etwas effektiver: Neben zwei Patienten ohne PnPS-IgG-ASZ gab es vier mit einer Antwort auf Probandenniveau, der Mittelwert lag etwas niedriger (639 bzw. 407 ASZ/10⁶). Unter Beteiligung von T-Zellen in der *CD3+ Vollstimulation* zeigten vier Patienten keine Aktivität im Sinne der Fragestellung, bei zwei waren ASZ nachweisbar. Zwei von drei Probanden entwickelten PnPS-IgG-ASZ, allerdings in größerer Zahl, der Mittelwert lag entsprechend höher (2302 bzw. 219 ASZ/10⁶).



Abbildung 29: Pneumokokken-Polysaccharid (PnPS)-spezifische IgM- und IgG-Antikörper-sezernierende Zellen im ELISpot-Verfahren nach *in vitro* Stimulationen von PBMCs unter Berücksichtigung der Expansion. $CD3^+$ T-Zell-depletierte PBMCs (Ansätze CpG; CD40L, ILs; CD3- Voll.) und Gesamt-PBMCs (Ansätz CD3+ Voll.) von SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden wurden für sieben Tage bei 37 °C unter Zugabe der verschiedenen Stimulanzien kultiviert. Per ELISpot mit immobilisiertem PnPS-Antigen wurde die Zahl spezifischer ASZ der Isotypen IgM und IgG über die Spot-Zahl pro 10⁶ B-Zellen zu Beginn der Stimulation (Tag 0) bestimmt. CD40L, ILs = CD40L, IL-2, IL-10, IL-21; CD3- = T-Zell-depletierte PBMCs; CD3+ = Gesamt-PBMCs; Voll. = Vollstimulation (SAC, PWM, CpG, CD40L, IL-2, IL-10, IL-21). Kontrollprobanden n=3 bzw. n=2 (CpG); SIgMID n=6. Werte der Kontrollprobanden sind als ausgefüllte Kreise, der SIgMID-Patienten als sonstige Symbole dargestellt. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert \pm SEM.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Stimulationen *CpG* und *CD3- Vollstimulation* bei den Patienten eine homogene Differenzierung von PnPs-spezifischen IgM-ASZ bewirkten, während sich unter T-Zell-Einfluss ein heterogenes Antwortverhalten mit neben effektiver auch schlechterer ASZ-Bildung zeigte. Die Bildung PnPs-spezifischer IgG-ASZ war insgesamt schwächer als von IgM-ASZ, unter T-Zell-Beteiligung wurden keine oder wenige spezifische-ASZ in der Patientengruppe, mehr in der Probandengruppe nachgewiesen. Die Stimulation mit *CD40L*, *IL-2*, *IL-10*, *IL-2* hatte die schwächste Induktionswirkung für PnPS-spezifische IgM- und IgG-ASZ.

4.3.6.4 TT-spezifische ASZ nach *in vitro* Stimulationen

Es erfolgte der Sekretionsnachweis Tetanustoxoid-spezifischer Antikörper der Klasse IgG im ELISpot-Verfahren nach verschiedenen *in vitro* Stimulationsansätzen mit CD3⁺ T-Zell-depletierten und Gesamt-PBMCs. Tetanustoxoid (TT) wird als Impfantigen bei der Tetanusvakzinierung verwendet und ruft bei intakter Immunantwort die Bildung langlebiger TT-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen hervor. Alle untersuchten Probanden und Patienten wurden innerhalb der letzten zehn Jahre gegen Tetanus geimpft.

In Abb. 30 ist der Nachweis TT-spezifischer IgG-ASZ nach *in vitro* Stimulationen unter Berücksichtigung der B-Zell-Expansion dargestellt. *CpG* konnte keine oder nur eine schwache Antwort der TT-spezifischen GZ auslösen (Mittelwerte Probanden 56 bzw. Patienten 82 ASZ/ 10^6 B-Zellen an Tag 0). Die Stimulation mit *CD40L*, *IL-2*, *IL-10*, *IL-21* war erfolgreicher, vier der sechs Patienten lagen im Bereich der Probanden. Zwei Patienten zeigten sogar eine größere Anzahl TT-spezifischer B-Zellen (292 bzw. 968 ASZ/ 10^6).

Nach der *CD3- Vollstimulation* ohne T-Zellen war bei den Patienten eine tendenziell geringere Anzahl von TT-spezifischen ASZ nachzuweisen. Bei im Mittel 704 ASZ/10⁶ lagen fünf der sechs Patienten unterhalb der Hauptgruppe der Probanden, Patient 1 deutlich darüber. Die Probanden zählten im Mittel 1152 ASZ/10⁶, mit nur einem niedrigeren Wert auf Höhe der Patientengruppe (123 ASZ/10⁶).

Als effektivste Stimulation der Anti-TT-Sekretion erwies sich die CD3+ Vollstimulation unter Beteiligung der T-Zellen. Die homogene Probandengruppe lag mittelwertig bei 3822 ASZ/10⁶, während fünf von sechs Patienten unter den Probandenzahlen lagen, Patient 6 jedoch sehr hoch. Daraus ergab sich der vergleichbare Mittelwert von 3488 ASZ/10⁶. Betrachtet man die Gruppe der lebenden B-Zellen an Tag 7 (nicht gezeigt), stellt man fest, dass der Anteil der TT-spezifischen ASZ auf einem Niveau liegt. Der Unterschied zwischen Probanden- und Patientengruppe resultiert in diesem Fall also nahezu ausschließlich aus der schlechteren Expansion der Patienten-B-Zellen. Für die *CD3- Vollstimulation* trifft dies nicht in gleicher Weise zu.



Abbildung 30: Tetanustoxoid (TT)-spezifische IgG-Antikörper-sezernierende Zellen im ELISpot-Verfahren nach *in vitro* Stimulationen von PBMCs unter Berücksichtigung der Expansion $CD3^+$ T-Zell-depletierte PBMCs (Ansätze CpG; CD40L, ILs; CD3- Voll.) und Gesamt-PBMCs (Ansatz CD3+ Voll.) von SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden wurden für sieben Tage bei 37 °C unter Zugabe der verschiedenen Stimulanzien kultiviert. Per ELISpot mit immobilisiertem TT-Antigen wurde die Zahl spezifischer IgG-ASZ über die Spot-Zahl pro 10⁶ B-Zellen zu Beginn der Stimulation (Tag 0) bestimmt. CD40L, ILs = CD40L, IL-2, IL-10, IL-21; CD3- = T-Zell-depletierte PBMCs; CD3+ = Gesamt-PBMCs; Voll. = Vollstimulation (SAC, PWM, CpG, CD40L, IL-2, IL-10, IL-21). Kontrollprobanden n=3 bzw. n=2 (CpG); SIgMID n=6. Werte der Kontrollprobanden sind als ausgefüllte Kreise, der SIgMID-Patienten als sonstige Symbole dargestellt. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert \pm SEM.

4.4 Einfluss von Rapamycin auf B-Zellsubpopulationen, IgM-Expression und Differenzierung von Antikörper-sezernierenden Zellen bei *in vitro* Stimulationen

Bei Betrachtung und Auswertung der vorangehend besprochenen Daten ist die schlechtere B-Zell-Expansion unter T-Zell-Beteiligung (*Vollstimulation* der Gesamt-PBMCs) bei sechs von sieben Patienten einer der auffälligsten Befunde. Die Patienten 1 und 7 zeigten beide ausgeprägte und ähnliche klinische Beschwerdebilder, bei Patient 1 bestätigte sich die schlechte B-Zell-Expansion in einer wiederholten Messung (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus fielen bei Patient 1 wiederholt erniedrigte B-Zellzahlen *in vivo* auf. Da eine eingeschränkte B-Zell-Expansion in dieser Ausprägung und bei fast allen Patienten unter T-Zelleinfluss beobachtet wurde, wäre eine Beteiligung der T-Zellen an einem verursachenden Mechanismus naheliegend. Eine T-Zell-vermittelte Inhibition wäre beispielsweise ebenso denkbar wie eine überschießende Stimulation, die in der vorzeitigen Apoptose der B-Zellen endet.

Um einen möglicherweise pathogenetisch relevanten T-Zell-Einfluss experimentell zu überprüfen, wurden zwei der schon etablierten *in vitro* Stimulationen ohne und mit dem Immunsuppressivum Rapamycin (Sirolimus) durchgeführt: T-Zell-depletierte PBMCs unter Zugabe von *CD40L*, *IL-2*, *IL-10*, *IL-21* und Gesamt-PBMCs unter Zugabe von SAC, PWM, CpG, CD40L, IL-2, IL-10, IL-21 (*Vollstimulation*). Erstere beinhaltete zwar T-Zellfaktoren, aber keine T-Zellen, während Letztere beides vereinte. Die Stimulationen wurden auch in dieser Form durchgeführt, um Vergleichsmöglichkeiten mit den vorigen Ergebnissen zu erhalten. Rapamycin ist ein potentes Immunsuppressivum, dass durch die Inhibition der Kinase mTOR (engl. *Mammalian Target of Rapamycin*) intrazelluläre Signalwege u.a. in B- und T-Zellen blockiert.

Je Stimulation wurde ein Kontrollansatz ohne Immunsuppressivum, ein Ansatz mit 20 nM und ein Ansatz mit 100 nM Rapamycin versetzt. Die Zellen wurden wie gehabt sieben Tage bei 37 °C inkubiert und anschließend gezählt und durchflusszytometrisch analysiert, um die Expansion der B-Zellen mit Verteilung der B-Zell-Subpopulationen und den Anteil der IgM-exprimierenden B-Zellen zu ermitteln. Des Weiteren wurde ein Teil der Zellen abgezweigt, um im ELISpot die Antikörpersekretion zu überprüfen.

4.4.1 Verteilung der B-Zellen und Subpopulationen

Nach durchgeführten *in vitro* Stimulationen wurden die absoluten Zellzahlen durch Zählung in der Neubauerzählkammer ermittelt und B-Zellen mit ihren Subpopulationen in der durchflusszytometrischen Analyse detektiert. Abb. 31 zeigt die Zahlen der B-Zellen und Subpopulationen in Bezug auf die B-Zellzahl zu Stimulationsbeginn. Bei der Betrachtung der Rapamycineffekte ist auf die Gesamttendenz und die Verschiebung der Subpopulationsverhältnisse zu achten. In beiden Stimulationen war ein positiver Effekt von Rapamycin auf das Expansionsverhalten zu beobachten.

In der Stimulation mit *CD40L*, *IL-2*, *IL-10*, *IL-21* zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe bei den Patienten 1 und 7 erniedrigte B-Zell-Expansionswerte (5,5 bzw. 11,1 % der B-Zellzahl an Tag 0), die sich unter Rapamycin tendenziell erhöhten. Bei Patient 1 erzielte der Ansatz mit 20 nM die besten Ergebnisse (15,9 %), während 100 nM nahezu Ausgangswerte erbrachte. Bei Patient 7 war kaum ein Effekt des Immunsuppressivums auf die Expansion nachweisbar, 14,1 % war der Höchstwert unter 100 nM Rapamycin. Die Kontrollprobanden lagen im Mittel bei 65,7 %. Mit Blick auf die Subpopulationen wird ein Effekt besonders deutlich: Unter hoher Rapamycin-Dosierung sind die wenigsten Plasmablasten nachweisbar, dafür mehr GZ, DN, MZ und Naive (bei Patient 1 letztere unter 20 nM höher). Das Verhältnis der Subpopulationen außer Plasmablasten bleibt dabei weitestgehend unbeeinflusst.

Nach der *Vollstimulation* mit T-Zellen war bei beiden untersuchten Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erniedrigte B-Zell-Expansion messbar (28,4 bzw. 113,9 gegenüber 727,6 %). Rapamycin hatte bei Patient 1 einen proexpansiven Effekt (bis 65,8 %), bei Patient 7 waren kaum Auswirkungen beobachtbar (bis 117,5 %). Im Gegensatz zur zuvor besprochenen Stimulation ohne T-Zellen war keine Reduktion der Plasmablastenzahl unter Rapamycin nachweisbar, sondern die erhöhte B-Zellzahl verteilte sich auf alle Subpopulationen. Bei Patient 1 war insgesamt ein stärkerer Einfluss des Rapamycins zu erkennen. Beide Patienten blieben jedoch mit Blick auf die Kontrollprobanden auch unter Rapamycin-Einfluss unterhalb der Vergleichswerte.



Abbildung 31: Die Verteilung der B-Zell-Subpopulationen nach verschiedenen *in vitro* Stimulationen von T-Zelldepletierten und Gesamt-PBMCs mit und ohne Zugabe von Rapamycin. CD3⁺ T-Zell-depletierte PBMCs (Ansatz CD40L, IL-2, IL-10, IL-21) und Gesamt-PBMCs (Ansatz Vollstimulation) von SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden wurden für sieben Tage bei 37 °C unter Zugabe der angegebenen Stimulanzien ohne, mit 20 nM sowie 100 nM Rapamycin kultiviert, anschließend mikroskopisch ausgezählt und durchflusszytometrisch analysiert. Auf der y-Achse ist die B-Zellzahl nach der jeweiligen Stimulation in Prozent der Ausgangs-B-Zellzahl (Tag 0) aufgetragen. Vollstimulation = SAC, PWM, CpG, CD40L, IL-2, IL-10, IL-21. Kontrollprobanden n=6-7; übrige SIgMID n=6. Isotyp-gew. GZ = Isotyp-gewechselte Gedächtnis-B-Zellen; DN = Doppelt-negative B-Zellen; MZ-ähnliche = Marginalzonen-ähnliche B-Zellen. Logarithmisch nicht darstellbarer Nullwert bei Vollstimulation/MZ-ähnliche. Werte der Kontrollprobanden in weißen, übriger Patienten in grauen Boxen. Die Boxen beinhalten die 25. bis 75. Perzentile, der Strich zeigt den Medianwert an, die Balken markieren die Maximal- und Minimalwerte. Werte von Patient 1 sind als Kreise, von Patient 7 als Dreiecke dargestellt: nicht gefüllt = ohne Rapamycin; halb gefüllt = 20 nM Rapamycin; ausgefüllt = 100 nM Rapamycin.

4.4.2 IgM-Expression

In der durchflusszytometrischen Analyse wurde auch die IgM-Expression untersucht, um die Anteile IgM⁺ B-Zellen zu bestimmen. Unter beiden Stimulationen zeigte sich ein erhöhter Prozentsatz IgMexprimierender B-Zellen, der sich rechnerisch über zwei Mechanismen zusammensetzte: Die durch Subpopulations-Verhältnisse (z.B. absolut mehr Naive) bedingte und die populationsspezifisch-erhöhte (z.B. mehr IgM⁺ unter den Plasmablasten) IgM-Expression, die Ergebnisse sind Abb. 32 zu entnehmen. Nach *CD40L, IL-2, IL-10, IL-21* ohne Rapamycin lagen die Anteile IgM⁺ B-Zellen bei Patient 1 mit 49,1 % der B-Zellen nahe dem Mittel der Probanden (48,1 %), steigerten sich bei 20 nM kaum, aber mit 100 nM deutlich auf 80,1 %. Patient 7 lag ohne Suppression mit 19,1 % unterhalb des Normbereichs, Rapamycin bewirkte einen abgestuften Anstieg auf 55,2 %. Der Mehranteil IgM⁺ Zellen setzte sich zusammen aus einer verhältnismäßig und absolut größeren Anzahl der annähernd zu 100 % IgM⁺ Naiven und MZ, sowie mehr DN und GZ, wie in 4.4.1 besprochen. All diese Populationen haben höhere Anteile IgM⁺ Zellen als Plasmablasten, welche sich unter Rapamycin eher vermindert bildeten. Zusätzlich zu diesem Verteilungseffekt gab es unter Rapamycin besonders bei den GZ und DN mehr Zellen, die IgM-exprimierten.



Abbildung 32: Der Anteil oberflächlich IgM-exprimierender B-Zellen und Subpopulationen nach verschiedenen *in vitro* Stimulationen von T-Zell-depletierten und Gesamt-PBMCs mit und ohne Zugabe von Rapamycin. CD3⁺ T-Zell-depletierte PBMCs (Ansatz CD40L, IL-2, IL-10, IL-21) und Gesamt-PBMCs (Ansatz Vollstimulation) von SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden wurden für sieben Tage bei 37 °C unter Zugabe der angegebenen Stimulanzien ohne, mit 20 nM sowie 100 nM Rapamycin kultiviert und durchflusszytometrisch analysiert. Für Gesamt-B-Zellen und Subpopulationen wurde der %-Anteil IgM⁺ Zellen der jeweiligen Population ermittelt. Vollstimulation = SAC, PWM, CpG, CD40L, IL-2, IL-10, IL-21. Kontrollprobanden n=7-9; übrige SIgMID n=6. Isotyp-gew. GZ = Isotyp-gewechselte Gedächtnis-B-Zellen; DN = Doppeltnegative B-Zellen; MZ-ähnliche = Marginalzonen-ähnliche B-Zellen. Werte der Kontrollprobanden in weißen, übriger Patienten in grauen Boxen. Die Boxen beinhalten die 25. bis 75. Perzentile, der Strich zeigt den Medianwert an, die Balken markieren die Maximal- und Minimalwerte. Werte von Patient 1 sind als Kreise, von Patient 7 als Dreiecke dargestellt: nicht gefüllt = ohne Rapamycin; halb gefüllt = 20 nM Rapamycin; ausgefüllt = 100 nM Rapamycin.

Die Vollstimulation brachte ohne Rapamycin im Vergleich zum Probandenmittel (47,2 %) nur geringe Anteile IgM⁺ B-Zellen hervor. Patient 1 lag bei 17,4 % und zeigte im Ansatz mit 100 nM eine mäßige Steigerung auf 27,2 %, Patient 7 stieg von 8,3 % nur leicht auf 13,9 % unter höchster Rapamycin-Konzentration. Diese leichten Steigerungen erklären sich unter anderem durch etwas höhere Anteile IgMexprimierender GZ und Plasmablasten, wobei GZ zusätzlich insgesamt die größte Zunahme unter Rapamycin zeigten (siehe 4.4.1). Die Antwort der DN in Bezug auf IgM-exprimierende Anteile war uneindeutig (Patient 1 bei max. 73,8 % unter 100 nM, Patient 7 bei max. 57,7 unter 20 nM), mit leichter Tendenz zu höherer IgM-Quote unter Rapamycin-Einfluss. Die MZ von Patient 7 zeigten von ungewöhnlich niedrigen 79,8 % ausgehend einen IgM-Zugewinn auf 95,3 %. Die Verhältnisse der Subpopulationen zueinander blieben unter Suppression weitestgehend unverändert, was keine Zunahme der IgM-starken Populationen Naive und MZ gegenüber IgM-schwächeren bedeutete und somit zum im Vergleich zu *CD40L, IL-2, IL-10, IL-21* weniger ausgeprägten Rapamycin-vermittelten IgM-Anstieg beitrug.

4.4.3 ASZ nach *in vitro* Stimulationen unter Berücksichtigung der Expansion

Mit den T-Zell-depletierten bzw. Gesamt-PBMCs wurde nach den *in vitro* Stimulationen eine ELISpot-Analyse durchgeführt, um die Differenzierung intakter IgM- und IgG-ASZ unter Rapamycin zu untersuchen. Bei Einsatz gleicher Zellzahlen im Experiment wurden anhand des per Durchflusszytometrie ermittelten B-Zell-Anteils die Spot-Zahlen auf die Ausgangs-B-Zellzahlen rückgerechnet (B-Zellen an Tag 0), dies zeigt auch Abb. 33.

Die Anzahl der IgM-ASZ nach *CD40L*, *IL-2*, *IL-10*, *IL-21* lag bei beiden Patienten im Bereich der Probandengruppe (Pat. 1 5319 bzw. Pat. 7 1903 ASZ/10⁶ B-Zellen an Tag 0). 20 nM Rapamycin in der Kultur zeigte kaum einen Effekt, während bei 100 nM Patient 1 noch 324 und bei Patient 7 nur noch 1 ASZ/10⁶ nachgewiesen werden konnten.

Für die IgG-ASZ ergab sich ein vergleichbares Bild: Ohne (Pat. 1 39607 bzw. Pat. 7 58296 ASZ/10⁶) und unter kaum effektiven 20 nM Rapamycin waren die Patientenwerte unauffällig, während bei 100 nM eine klare Abnahme der IgG-ASZ (3028 bzw. 8161 ASZ/10⁶) zu verzeichnen war.

Die Spotbildung nach *Vollstimulation* fand im Vergleich zum Probandenkollektiv nur eingeschränkt statt. Die Patienten 1 und 7 lagen im rapamycinfreien Ansatz beim Nachweis von IgM-ASZ unterhalb der Probanden (Mittelwert 2.203.260 ASZ/10⁶ B-Zellen an Tag 0) und der übrigen Patienten (793.178 ASZ/10⁶) bei 33.620 bzw. 24.116 ASZ/10⁶. Unter 20 und 100 nM waren nur leichte Veränderungen nachweisbar: Patient 1 sank stufenweise auf 20.800 ASZ/10⁶ unter 100 nM, Patient 7 stieg entgegengesetzt leicht an auf max. 48.372 ASZ/10⁶.

Die Bildung von IgG-ASZ wurde hingegen bei beiden Patienten positiv von Rapamycin beeinflusst. Etwa vom Niveau der übrigen Patienten ausgehend (Pat. 1 77.937 bzw. Pat. 7 253.739 ASZ/10⁶) stieg die Zahl der IgG-ASZ mit zunehmender Konzentration bis auf 162.241 bzw. 452.093 ASZ/10⁶ an. Patient 7 zeigte

durchgehend eine bessere Spotbildung als Patient 1, der Mittelwert der Probanden lag mit 1.831.610 ASZ/10⁶ immer noch über den Maximalwerten der Patienten.



Abbildung 33: Nachweis unspezifischer Antikörper-sezernierender Zellen (ASZ) der Isotypen IgM und IgG nach *in vitro* Stimulationen von T-Zell-depletierten und Gesamt-PBMCs mit und ohne Zugabe von Rapamycin im ELISpot-Verfahren unter Berücksichtigung der Expansion. CD3⁺ T-Zell-depletierte PBMCs (Ansatz CD40L, IL-2, IL-10, IL-21) und Gesamt-PBMCs (Ansatz Vollstimulation) von SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden wurden für sieben Tage bei 37 °C unter Zugabe der angegebenen Stimulanzien ohne, mit 20 nM sowie 100 nM Rapamycin kultiviert. Per ELISpot wurde die ASZ-Zahl des jeweiligen Isotyps über die Spot-Zahl pro 10⁶ B-Zellen zu Beginn der Stimulation (Tag 0) bestimmt. Kontrollprobanden n=6-7; SIgMID n=6. Isotyp-gew. GZ = Isotyp-gewechselte Gedächtnis-B-Zellen; DN = Doppelt-negative B-Zellen; MZ-ähnliche = Marginalzonen-ähnliche B-Zellen. Werte der Kontrollprobanden in weißen, übriger Patienten in grauen Boxen. Die Boxen beinhalten die 25. bis 75. Perzentile, der Strich zeigt den Medianwert an, die Balken markieren die Maximal- und Minimalwerte. Werte von Patient 1 sind als Kreise, von Patient 7 als Dreiecke dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen übrigen SIgMID-Patienten und Kontrollprobanden sind dargestellt (*p≤0,05).

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Untersuchungen durchgeführt, deren gemeinsames Ziel die weiterführende immunologische Charakterisierung von SIgMID-Patienten war. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen hier kritisch hinterfragt und eingeordnet werden, um daraus die möglichen Schlussfolgerungen zu ziehen. Grundlage für die letztlich angestrebte Etablierung effektiver Therapiemöglichkeiten ist das Verständnis der pathologischen Zusammenhänge, die zur klinischen Symptomatik bzw. dem Befund der IgM-Defizienz führen. Dabei spielt besonders unter klinischen Gesichtspunkten die Frage nach Ursachen und Wirkungen dieser beiden Komponenten eine zentrale Rolle, da die Kausalität von erniedrigtem IgM-Spiegel bzw. assoziierter Beschwerden keinesfalls als belegt betrachtet werden kann.

5.1 Klinische Präsentationen der SIgMID

Das klinische Präsentationsbild von 20 SIgMID-Patienten wurde durch Auswertung von Krankenunterlagen und Absprache mit den behandelnden Ärzten retrospektiv zusammengetragen. Gesammelte Erwachsenen-Fallstudien von dieser Größenordnung sind nur aus zwei Veröffentlichungen bekannt (82, 92), was der vorliegenden Arbeit eine große Bedeutung in der weitergehenden klinischen Beschreibung der SIgMID zukommen lässt. Das retrospektive Vorgehen hat sich bei der Untersuchung seltener Erkrankungen bewährt, da eine prospektive Datenerhebung unter erheblichen zeitlichen und finanziellen Aufwendungen praktisch nicht durchführbar wäre. Es sei jedoch auf die statistische Verzerrung hingewiesen, die durch die Dokumentation von Beschwerden bzw. den Einschluss von Patienten mit Untersuchungs- und Behandlungsbedarf gegenüber der naturgemäß weniger gründlichen oder nicht erfolgenden ärztlichen Erfassung der beschwerdefreien Patienten entsteht. Aufgrund der begrenzten Datenlage basieren die Angaben zur SIgMID außerdem auf relativ kleinen und für die Gesamtbevölkerung begrenzt repräsentativen Patientenkollektiven und es ist mit der Häufung bestimmter Präsentationen abhängig von den Schwerpunkten der behandelnden Einrichtung zu rechnen. Solcherlei Tendenzen lassen sich nur über große Übersichtsbetrachtungen normalisieren.

Die Erfassung der Patienten erfolgte aufgrund erniedrigter IgM-Spiegel bei Erstvorstellung. Eine international einheitliche Anwendung einer gemeinsamen Definition hat sich bislang jedoch nicht durchgesetzt. So wird die Unterschreitung des Mittelwertes um die zweifache Standardabweichung ebenso angewendet wie festgelegte Grenzwerte. Aufgrund labortechnischer Unterschiede sind einheitliche Standards ohnehin kaum realisierbar und die Diagnosestellung wird meist die Berücksichtigung der klinischen Präsentation mit einschließen. Diese Vorgehensweise muss mangels objektiverer Alternativen hingenommen werden.

In der Übersicht stimmt die Gesamtheit der klinischen Manifestationsformen in der untersuchten Kohorte durchaus mit den in der Literatur beschriebenen Fallsammlungen überein. Die Hauptbeschwerdebilder waren die gleichen, lediglich die Prävalenz unterschied sich in einigen Punkten. Am häufigsten waren rezidivierende Infektionen, mit 90 % waren in der untersuchten Kohorte etwas mehr Patienten betroffen als zuvor beschrieben, wobei gleichfalls am häufigsten die oberen Atemwege betroffen waren. Eine atopische Diathese mit allergischen Beschwerden und Asthma bronchiale wurde in der Literatur wie in der vorliegenden Arbeit am zweithäufigsten beobachtet. Beschwerden mit autoimmunologischer Genese zeigten 15 % der Patienten, was ebenfalls vergleichbar mit den in der Vergangenheit berichteten Werten ist (82, 92). Eine in der Literatur weniger erwähnte Entität stellen die Harnwegsinfekte dar, immerhin 25 % der Patienten bzw. zwei Männer und drei Frauen waren betroffen, ebenso häufig lagen Hautinfektionen vor. Ein weiterer Beschwerdekomplex stand in dieser Arbeit stärker im Vordergrund als zuvor dokumentiert: Über gastrointestinale Beschwerden wurde am dritthäufigsten berichtet, 30 % der Patienten klagten über Diarrhoen, Obstipation, Übelkeit oder Meteorismus.

Kaum Erwähnung findet in früheren umfassenden Übersichtsarbeiten (82) eine Erschöpfungs- und Schmerzsymptomatik, die mit mehr oder weniger spezifischen Begleitsymptomen wie Arthralgien und Myalgien einhergeht. Das Beschwerdebild wird als Fibromyalgie-ähnlich mit begleitender Fatigue beschrieben. In der jüngsten Fallsammlung klagten 28 % der SIgMID-Patienten über eben jene Beschwerden (92), was mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten 25 % bestätigt werden konnte.

Die im Rahmen dieser Arbeit erfassten Hauptmanifestationen lassen sich durch die Einteilung in fünf Komplexe zusammenfassen: Infektneigung, Atopie, gastrointestinale Beschwerden, Fatigue und Autoimmunität. Um die Zusammenhänge des Befundes eines erniedrigten IgM-Spiegels mit dem Auftreten der klinischen Manifestationen näher zu analysieren, ist es hilfreich, sich die Schlüsselfunktionen des sekretorischen IgM zu vergegenwärtigen und mögliche Auswirkungen eines Ausfalls dieser Funktionen abzuwägen. Die zentralen Aufgaben sind Protektion, Regulation und Detritus-Abräumung ("Scavenger"-Funktion) (77).

Infektionen

Die protektive Komponente des IgM in Form der frühen gezielten Infektabwehr und der konstitutiven Bereitstellung des unspezifischen "natürlichen" IgM steht bei seiner Charakterisierung traditionell im Vordergrund. Denn als protektiver Faktor kann IgM humoral bzw. systemisch wirksam werden, indem es sich im Blutstrom, den lymphatischen Geweben und im Interstitium verteilt. Darüber hinaus ist es dank seiner Befähigung zum transepithelialen Transport neben IgA auch Teil der mukosalen Immunabwehr und kann so bereits die lokale Invasion von Pathogenen verhindern.

Eindeutige klinische Befunde der SIgMID-Patienten weisen darauf hin, dass IgM ein essentieller Bestandteil der Immunabwehr ist und auch normale IgG-Spiegel unter Umständen die IgM-Defizienz nicht kompensieren können. Eine direkte Kausalität von IgM-Mangel und Infektanfälligkeit lässt sich jedoch nicht herstellen. Trotz normaler IgG-Spiegel können spezifische Antikörperantworten gegen PnPS, TT oder Diphterie beeinträchtigt sein (89, 94), andererseits können bei nachgewiesener intakter spezifischer Antikörperproduktion trotzdem rezidivierende Infektionen vorliegen (89). Über seine neutralisierenden und agglutinierenden Eigenschaften bildet IgM gleichzeitig eine wichtige Schnittstelle zu anderen Komponenten der Immunabwehr: In IgM-defizienten Mäusen wurden schwerer verlaufende Infektionen mit Cryptokokkus neoformans auf die eingeschränkte T-Helfer-Zell-Aktivierung durch Makrophagen bei mangelhafter Phagozytose und Antigenpräsentation wegen mangelnder IgM-Opsonisierung zurückgeführt (130). Außerdem war die T-Zell-abhängige Bereitstellung von affinitätsgereiftem IgG bei IgM-defizienten Mäusen erheblich verzögert (131). Folglich ist die Infektionsneigung bei SIgMID vermutlich auf verschiedene Faktoren zurückzuführen, an denen IgM mehr oder weniger Anteil hat.

Die weitaus häufigste Präsentation unter SIgMID ist die Infektion der oberen Atemwege, eines Kompartiments, das unter dem Schutz des sekretorischen IgA und IgM steht. Ob eine Häufung dieser Infektionen nun auf den lokalen Mangel von IgM zurückzuführen ist, oder Ausdruck einer generellen Immunschwäche, die sich lediglich mit einer erhöhten Frequenz und schwererem Verlauf des auch in der Allgemeinbevölkerung häufigen Infektionsgeschehens präsentiert, ist nicht zu belegen. Insbesondere da noch keine systematische Erfassung der IgM-Sekretionskompetenz bei SIgMID dokumentiert ist. Auch die zweit- und dritthäufigsten Infektionslokalisationen mit den Harn- und unteren Atemwegen sowie gastrointestinale Affektionen betreffen ebenfalls Schleimhäute, auf denen IgM eine wichtige protektive Funktion hat (132). Bei 25 % der Patienten lagen allerdings auch Haut- oder Weichteilinfektionen vor, hier war also das interstitielle Kompartiment betroffen.

In der Zusammenschau fällt auf, dass lediglich 10 % der Patienten kompliziertere Infektionen präsentierten (Menigitis und chronische Osteomyelitis, Prostatitis), eine Septikämie oder Sepsis als schwere Komplikation einer systemischen Entzündung lag bei keinem Patienten vor. Obwohl IgM u.a. für die humorale Abwehr von bekapselten Bakterien wie Pneumokokken von essenzieller Bedeutung ist (29), scheint diese Funktion zumindest in der systemischen Immunabwehr erhalten zu sein. Dahingegen kann der Infektionsschutz der Körperoberflächen bei symptomatischen Patienten nur selten aufrechterhalten werden. Ein weiterer Schritt wäre also die genauere Analyse des sekretorischen IgM-Status bei SIgMID zur Differenzierung von gestörter sekretorischer IgM-Funktion und allgemeiner Immundefizienz aufgrund eines systemischen IgM-Mangels als Ursache der deutlichen Häufung oberflächenbezogener Infektgeschehen. Dabei wäre auch die Rolle des für den transepithelialen Ig-Transport verantwortlichen polimerischen Ig-Rezeptors genau zu beleuchten (132) und eine Beteiligung an beeinträchtigter mukosaler oder systemischer Abwehr etwa durch verminderte oder sogar erhöhte Affinität zu überprüfen. Interessant ist in diesem Zusammenhang ein Blick auf einen weniger gut erforschten Mechanismus der respiratorisch-mukosalen Immunprotektion durch IgD. In der Schleimhaut des oberen Respirationstraktes wurde ein nichtkanonischer Klassenwechsel von IgM- zu IgD-sezernierenden B-Zellen nachgewiesen, der hoch reaktives, protektives IgD bereitstellen soll (133). Bei gestörter Homöostase IgM⁺ B-Zellen könnte ein konsekutiver Defekt der IgD-getragenen Schleimhautimmunität an der Pathogenese SIgMIDassoziierter Infektionen beteiligt sein.

Gastrointestinale Beschwerden

Die gastrointestinale Mukosa beherbergt mehr als 80 % aller aktivierten B-Zellen eines Erwachsenen in Form von Plasmablasten und Plasmazellen, was den Verdauungstrakt zum größten antikörperproduzierenden Organ des Körpers macht (132). Ein Zusammenhang zwischen erniedrigten IgM-Spiegeln und unspezifischen Magen-Darm-Beschwerden kann auf verschiedenen Ebenen bestehen. Infektiöse Geschehen dürften eine zentrale Rolle spielen, werden jedoch in der ambulanten Praxis meist nicht mikrobiologisch nachgewiesen, was beweisende Befunde zur Ausnahme macht. Darüber hinaus wurde bereits mehrfach über eine Assoziation von SIgMID und Zöliakie (82) sowie über enterischen Proteinverlust berichtet (94), ohne dass plausible Erklärungsmodelle vorlägen. In der untersuchten Kohorte litten vier Patienten unter Nahrungsmittelunverträglichkeiten, die sich in unspezifischen gastrointestinalen Beschwerden äußerten. Ein Patient zeigte eine nicht näher bezeichnete Unverträglichkeit von Weizenmehl. Die drei weiteren Patienten waren eine Mutter mit Sohn und Tochter, die unterschiedlich stark ausgeprägte Unverträglichkeiten präsentierten und über einen Zusammenhang von Diät und Beschwerden, darunter interessanterweise auch die Infektanfälligkeit, berichteten. Durch den Verzicht auf verschiedene Nahrungsmittel sei eine deutliche Besserung des Allgemeinzustandes zu erreichen gewesen. Das Vorliegen einer Zöliakie wurde bei durchaus vereinbarer Klinik, aber fehlendem Nachweis der entsprechenden Antikörper, ausgeschlossen. Bei dem Sohn wurde indes per Dünndarmbiopsie eine unspezifische chronische Entzündung der Mukosa nachgewiesen, die Tochter litt unter einer Gastroparese. In Anbetracht dieser komplexen Symptom- und Befundkonstellation ist eine Einordnung der IgM-Defizienz kompliziert. Eine unabhängige Koinzidenz ist durchaus denkbar, insbesondere eine neuromuskuläre Störung des Magens im Sinne einer Gastroparese würde das Beschwerdebild zumindest teilweise erklären. Eine Abhängigkeit von erniedrigten IgM-Spiegeln ließe sich nicht unmittelbar ausmachen. Auch eine unspezifische Entzündungsreaktion der Darmschleimhaut könnte für die Beschwerden ursächlich sein, wobei der Grund für das Inflammationsgeschehen zwar mit der IgM-Defizienz zusammenhängen könnte, faktisch aber unklar bleibt.

Autoimmunität

Geht man an dieser Stelle von einer autoimmunen Genese aus, stellt sich die selbe Frage nach der Abhängigkeit von Autoimmunität und Serum-IgM wie bei der Betrachtung der typischen autoimmunologischen Manifestationen bzw. Komorbiditäten bei SIgMID: systemischer Lupus erythematodes (SLE), Arthritiden, Thyreoiditiden und neben weiteren auch die Zöliakie. Eine Kausalkette zwischen Immundefizienz und Autoimmunität ist schwer nachzuweisen. In Langzeitstudien sind Fälle beschrieben, bei denen nach primärer SIgMID im Verlauf Autoimmunkrankheiten auftraten (89, 105). Eine sekundäre IgM-Defizienz als Folge autoimmuner Dysregulation ist jedoch ebenso denkbar (102).

Ein Blick auf die spezifischen Funktionen des IgM kann einen Zusammenhang von Autoimmunität und IgM-Defizienz durchaus wahrscheinlich erscheinen lassen. So ist bekannt, dass "natürliches" IgM, wie es von B1-Zellen und MZ-ähnlichen konstitutiv sezerniert werden soll, auch autoreaktive Eigenschaften zeigt und an der Bindung und dem Abbau von Zellzerfallsprodukten beteiligt ist (77). Dauerhaft vorliegende Autoantigene können die Bildung autoreaktiver Antikörper oder Effektorzellen begünstigen (134), was sich auf verschiedenste Weise manifestieren könnte. Die Unterstützung der Bildung von hochaffinem IgG durch eine initiale IgM-Bildung unter einer Infektion (74) ist ein weiterer wichtiger Effektormechanismus von IgM. Findet dieser Prozess bei IgM-Defizienz nicht oder nur unzureichend statt, könnte die Folge bei ungenügender Antigenabräumung durch spezifisches IgG und gleichzeitig erniedrigtem IgM eine protrahiert verlaufende oder persistierende Infektion sein, die neben den Primärbeschwerden bei langfristiger Aktivierung von Immunreaktionen auch Autoimmunphänomene zur Folge haben könnte (77).

Im Mausexperiment wurde beschrieben, dass IgM-Defizienz mit einer leicht erhöhten Inzidenz von Autoimmunität einhergeht (135, 136). Erhöhte MZ-B-Zellzahlen, die bei IgM-defizienten Mäusen – wie auch bei der in dieser Arbeit untersuchten Patientenkohorte – vorliegen, wurden als Verursacher von Autoreaktivität diskutiert (77). Außerdem konnte über den Verlust des Fcµ-Rezeptors gezeigt werden, dass IgM bzw. ein intakter Rezeptor für den Erhalt der Immuntoleranz gegenüber Autoantigenen essenziell ist: Im Laufe des Alterungsprozesses entwickelten die Rezeptor-defizienten Mäuse zunehmend Autoantikörper (137), eine Zunahme von Autoimmunität im Erwachsenenalter wurde auch bei SIgMID-Patienten beobachtet (89). Im Umkehrschluss konnte gezeigt werden, dass IgM vor der Entwicklung SLE-assoziierter Organschäden schützt (75). Untersuchungen des Fc-Rezeptorrepertoires und der FcµR-Expression bei SIgMID stellen somit einen vielversprechenden Ansatz dar, um weiteren Aufschluss über die Genese von Autoimmunität, aber auch über die SIgMID selbst zu geben. Denn mit dem FcµR-Verlust gingen auch IgM-Defizienz, verminderte Plasmazell- und GZ-Bildung sowie eingeschränkte Proliferation und Überleben nach *in vitro* Stimulation einher (137), was neben der Autoimmunität einige der in dieser Arbeit beschriebenen *in vitro* Befunde miteinschließt.

Welche der postulierten Mechanismen bestimmend sein könnten, oder ob womöglich andere, noch nicht hinreichend bekannte Beziehungen für die Entstehung autoreaktiver Vorgänge verantwortlich sind und welche molekularen Wechselwirkungen letztlich zur Pathologie führen, können nur kommende Untersuchungen zeigen.

Atopie

Eine fehlregulatorisch geprägte Pathogenese gilt für allergische Erkrankungen als sicher, auch wenn die Abläufe im Detail noch nicht verstanden sind. Über den Zusammenhang von erniedrigtem IgM-Spiegel und dem veränderten T-Zell-Antwortverhalten, das bei der Entstehung von allergischen Erkrankungen eine zentrale Rolle spielt, herrscht Unklarheit und nicht bei allen atopischen SIgMID-Patienten sind in vorangegangenen Untersuchungen typische Allergie-assoziierte Befunde wie erhöhte IgE-Spiegel und

Eosinophilie nachweisbar gewesen (89). In der vorliegenden Arbeit zeigten fünf von acht Betroffenen erhöhtes IgE. Der ermittelte Anteil der Patienten mit atopischer Diathese von 40 % bestätigt die Ergebnisse anderer Autoren, die bei 33 % (92) sowie 47 bzw. 36 % (82) lagen. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass die Atopie-Prävalenz in der Normalbevölkerung bei etwa 20-30 % liegt (89, 112). Damit fällt die Häufung bei SIgMID relativ gering aus und sollte entsprechend kritisch betrachtet werden.

Für IgA konnte eine inverse Korrelation zwischen Serumspiegeln und der Inzidenz von allergischen Atemwegserkrankungen bzw. ein protektives Potential von mukosalem IgA bei allergischem Asthma gezeigt werden (138). Ähnliche Zusammenhänge könnten auch bei IgM bestehen, wobei ein gestörter Klassenwechsel hin zu erhöhter IgE⁺ B-Zellzahl sowohl mit der atopischen Diathese als auch mit der IgM-Defizienz vereinbar wäre (139).

Fatigue

Erst in jüngerer Vergangenheit wurde dem Symptom der Fatigue und unspezifischen, somatisch nicht zuzuordnenden Schmerzzuständen eine größere gesamtmedizinische Aufmerksamkeit zuteil, was das Fehlen solcher Beschwerden in älteren Fallbeschreibungen erklären kann. Welche Rolle diese Symptomenkomplexe bei Immunschwächen und damit oft verbundenen chronischen Entzündungszuständen spielen, ist noch nicht hinreichend verstanden (140). So könnten sie als gewöhnliche Begleitsymptome von Infektionen bewertet werden, die entsprechend einer erhöhten Infektfrequenz ebenfalls gehäuft auftreten. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass Fatigue-artige Beschwerden unter Immundefekten, chronischen Virusreaktivierungen oder langanhaltender Überstimulation des Immunsystems chronifizieren können (140, 141), was die Rolle der reinen Begleitsymptomatik übersteigt und somit die Einordnung als eigenständige Entität rechtfertigen würde. Diese Betrachtungsweise könnte nicht zuletzt den Patienten zugute kommen, da sie den Grundstein für eine umfassende ursachen- und symptombezogene Therapie legt und somit das Potential zur Verbesserung der Lebensqualität vieler immunologisch beeinträchtigter Patienten birgt. Bei Patienten mit chronischem Fatigue-Syndrom (CFS) wurde eine direkte Assoziation von IgM-vermittelter Autoreaktivität und Fatigue beschrieben (142). Ebenfalls bei CFS-Patienten wurde eine signifikante negative Korrelation von Serum-Zinkspiegeln und der Ausprägung von Fatigue-Symptomen nachgewiesen (143), was angesichts anamnestisch erniedrigter Zink-Werte bei 45 % der in dieser Arbeit untersuchten SIgMID-Patienten (Daten nicht gezeigt) erwähnenswert scheint.

Malignome

In der Literatur wurden verschiedene Malignitäten mit einem Überwiegen hämatologischer Neoplasien bei insgesamt 3 % der SIgMID-Patienten beschrieben (82, 108-111). In der untersuchten Kohorte lag bei einer Patientin anamnestisch ein Mamma-Karzinom vor, was bei 20 Patienten einer Inzidenz von 5 % entspricht. Eine deutliche Häufung maligner Entartung ist also nicht erkennbar. Aufschlussreich wäre die Verlaufsbeobachtung der untersuchten Kohorte, die mit einem Durchschnittsalter von 40 Jahren (Median

40 Jahre) in Bezug auf Malignitätsentwicklung noch recht jung ist, um die Rate an Krebserkrankungen im Alter im Vergleich zu nicht-IgM-defizienten Probaden zu überprüfen. Zur Auswirkung von erniedrigten IgM-Spiegeln auf die Entwicklung von malignen Erkrankungen gibt es in den Untersuchungen zu SIgMID keine gesicherten Erkenntnisse. Insbesondere bei Leukämien oder Lymphomen muss stets auch die Möglichkeit einer Erstmanifestation des neoplastischen Geschehens als verminderter IgM-Serumspiegel in Betracht gezogen werden.

Nicht alle Patienten sind klinisch gleichermaßen von Begleiterscheinungen der IgM-Defizienz betroffen. In Intensität und Anzahl der Beschwerden bestehen große Unterschiede, die von seltenen lebensbedrohlichen Zuständen (86, 96) bis zur Symptomlosigkeit (88) reichen. Dieses heterogene Manifestationsmuster lässt auch verschiedenartige Ätiologien und daraus resultierende Pathogenesen vermuten, die ein erniedrigter IgM-Spiegel als gemeinsames Merkmal eint. In der komplexen Orchestrierung des Immunsystems kann die Veränderung eines einzelnen Parameters zahlreiche Ursachen und entsprechend vielgestaltige klinische Auswirkungen und Abstufungen haben, wie die Betrachtung der SIgMID-assoziierten Beschwerden zeigt.

5.2 Immunglobulin-Spiegel

Bei der Bestimmung der IgM-Serumspiegel bei Erstkontakt ergab sich ein Mittelwert von 0,31 g/l für einen Referenzbereich von 0,4-2,3 g/l. Bei wiederholten Messungen zeigten sich die Werte relativ konstant, von insgesamt 49 erfassten lagen nur drei im sehr niedrig-normalen Bereich (max. 0,46 g/l). Der niedrigste gemessene Wert betrug 0,19 g/l, was die äußerst geringe Schwankungsbreite verdeutlicht: Alle Patientenmessungen bewegten sich in einer Spannweite von 0,27 g/l bei einer vom Labor definierten Spanne von 1,9 g/l im Gesunden-Bereich. Beachtlich ist damit zum einen die Konstanz der Werte, die bei den Patienten offenbar nur geringen Schwankungen unterworfen sind. Zum anderen aber auch die Tatsache, dass kein Betroffener weniger als 0,19 g IgM/l Serum aufwies, also keine absolute Defizienz nachgewiesen wurde. Damit stellt sich die Frage, wie eine basale IgM-Produktion überhaupt erhalten bleibt und warum die Werte, wenn eine grundsätzliche Synthesefähigkeit erhalten ist, nicht weiter ansteigen können. Erklären ließe sich dies mit einem Modell, das die Gesamt-IgM-Produktion im Gesunden (mindestens) zwei unterschiedlichen Systemen zuordnet, die zumindest teilweise auch unabhängigen Regulationsmechanismen unterliegen. Der Ausfall eines der Systeme könnte eine partielle IgM-Defizienz bedingen, während die rudimentäre Versorgung erhalten bliebe. Ansatzpunkte für eine solche Theorie bieten etwa bereits beschriebene duale Systeme wie T-Zell-abhängige und -unabhängige IgM-Differenzierung oder "natürliches" und spezifisches IgM. Defekte könnten auf zellulärer Ebene die Generierung oder den Erhalt bereitstellender Populationen betreffen oder sich auf regulative Bereiche innerhalb einer einzelnen Population beziehen und dort nur bestimmte unter mehreren IgM-assoziierten Signalwegen beeinträchtigen. Beispiele hierfür sind die Korrelation von IgM-Spiegel und B1-B-Zellzahl bei CVID-Patienten (119) oder die partielle IgM-Defizienz bei Mutationen von TLR-assoziierten Adapterproteinen (127). Folge wäre nicht nur ein erniedrigter IgM-Spiegel, sondern auch ein partieller Verlust der IgM-Funktionen, was sich durchaus mit den klinischen Befunden der SIgMID-Patienten decken würde.

Die Bestimmung von IgG und IgA zeigte unauffällige Werte, während sich IgE bei fünf Patienten erhöht präsentierte. Interessanterweise hatten diese Patienten auch entsprechende atopische Beschwerden, drei weitere Patienten mit Atopie zeigten kein erhöhtes IgE. Die Rolle des IgE als Vermittler pathologischer Immunreaktionen im Sinne einer Hypersensibilität (144) scheint sich in diesem Setting zu bestätigen, erhöhte Werte decken sich mit den klinischen Befunden. Dies stellt an sich keine neuen Erkenntnisse dar, ist aber diagnostisch relevant und für das Verständnis der Allergie- und Asthmapathogenese unter SIgMID förderlich. Über erhöhte IgE-Werte bei SIgMID wurde bereits mehrfach berichtet (93, 116, 118, 120).

5.3 Leukozytäre Hauptpopulationen

Die quantitativen Untersuchungen der Leukozyten in SIgMID-Patienten zeigten insgesamt keine eindeutigen Abweichungen. Einen ersten Überblick zum leukozytären Status gibt das Differentialblutbild, das für alle untersuchten Patienten und Probanden maschinell erstellt wurde. Die Gesamtleukozytenzahl sowie Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten zeigten im Mittel keine relevanten Unterschiede zu den Normwerten. Daraus wird ersichtlich, dass keine grundsätzlichen Störungen der leukozytären Zellzahlregulation vorliegen. Ein rein quantitativer Lymphozytenmangel kann hiermit bereits als Ursache erniedrigter IgM-Spiegel ausgeschlossen werden. Bestehende normwertige Granulozyten- und Monozytenzahlen geben ebenfalls Hinweise auf ein intaktes Bestehen zellulärer Komponenten des angeborenen Immunsystems. Dies ist auch im Hinblick auf B-Zell-regulatorische Eigenschaften erwähnenswert: Von NK-Zellen, Granulozyten und dendritischen Zellen vermittelte T-Zell-abhängige und -unabhängige B-Zell-Helfer-Signale beeinflussen unter anderem direkt die IgM-Sekretion (1). Auch in dieser Hinsicht ist ein rein quantitativer Defekt angesichts normaler Helfer-Zellzahlen unwahrscheinlich.

Anamnestisch zeigten 35 % der Patienten eine Granulopenie, 30 % eine Lymphopenie. So könnten grundsätzliche regulatorische Störungen bei einzelnen Patienten durchaus eine Rolle spielen, aufgrund der Unspezifität solcher Befunde und natürlicher Schwankungen sind Rückschlüsse daraus jedoch kaum möglich.

In einem nächsten Schritt wurden die für die adaptive Immunabwehr wichtigsten peripheren Zellen betrachtet: Die Bewertung des quantitativen B- und T-Zellstatus bildet den Grundstein weiterführender Untersuchungen und kann bei Auffälligkeiten richtungsweisend für folgende Analysen sein. Nachdem Abweichungen der Leuko- und Lymphozytenzahlen ausgeschlossen waren, konnte dies für B- und T-Zellen bestätigt werden, was zunächst eine grundsätzlich intakte Homöostase des lymphozytären Systems belegt. In der Literatur sind normale B-Zellzahlen bei SIgMID mehrfach gezeigt worden (92, 93), aber auch über Patienten mit erniedrigten oder nicht nachweisbaren B-Zellen wurde berichtet (92, 145). Die myeloiden und plasmazytoiden dendritischen Zellen zeigten sich unauffällig.

Die Gegenüberstellung der bei Patienten und Kontrollen analysierten T-Zell-Subpopulationen lässt mehrmals postulierte T-Zell-Einflüsse auf die Entwicklung der SIgMID (120, 121) zumindest auf quantitativer Ebene unwahrscheinlicher erscheinen: Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die für die B-Zell-Interaktion verantwortlichen Subpopulationen der T-Helfer-Zellen, nämlich zentrale und Effektor-Gedächtnis- sowie naive CD4⁺ T-Zellen, zahlenmäßig unbeeinträchtigt waren. Gleiches wurde für die entsprechenden Subpopulationen der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen gezeigt. Niedrige Zahlen zytotoxischer T-Zellen, wie sie in der Vorgeschichte durch Einzelmessungen bei 25 % der Patienten festgestellt wurden, haben ebenfalls nur bedingte Aussagekraft, da sie der klinischen Erfahrung gemäß großen Schwankungen unterworfen sind. In der Literatur wurde wiederholt über erniedrigte sowie erhöhte CD4/CD8-Verhältnisse berichtet, die über erhöhte bzw. erniedrigte CD4- und CD8-Werte entstanden (116-118), was in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine diskutierte T-Zell-bezogene Pathogenese der SIgMID sehr wahrscheinlich auf funktionellen Defiziten beruhen würde und nicht auf einer eingeschränkten Verfügbarkeit der Zell-Zell-Interaktion. Der ebenfalls berichtete pathologische Einfluss von vermutlich regulatorischen T-Zellen (146) ist eine pathogenetische Möglichkeit, die anhand der durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen quantitativ und qualitativ nicht überprüft werden konnte.

Auf diesen Erkenntnisgrundlagen stellen die weiterhin erfolgten Experimente, zunächst die phänotypische B-Zell-Charakterisierung mit anschließenden funktionellen Tests unter Einbeziehung und Ausschluss der T-Zell-Einflüsse, nächste sinnvolle Untersuchungsschritte dar.

5.4 B-Zell-Subpopulationen, IgM-Expression und Oberflächenmarker

Subpopulationen

Die Bestimmung des lymphozytären Phänotyps beschränkte sich in vorangegangenen Untersuchungen der SIgMID meist auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sowie CD19⁺/CD20⁺ B-Zellen, wie oben bereits diskutiert. Abgesehen von der oberflächlichen IgM-Expression wurden kaum detailliertere Charakterisierungen der B-Zell-Populationen durchgeführt. In zwei einzelnen Fällen wurde über

verminderte Gedächtnis-B-Zellen berichtet (114, 145). Somit konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit das periphere B-Zell-Kompartiment erstmals ausführlich charakterisiert werden.

Die deutlichsten Befunde waren signifikant erhöhte Zahlen der MZ und Transitionalen B-Zellen, was angesichts ihrer theoretischen Fähigkeit zur IgM-Produktion interessant ist. Im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Zellzahlen lagen nicht bei allen Patienten vor, so dass auch an dieser Stelle zu diskutierende Schlussfolgerungen nur für einen Teil der Untersuchten zutreffen können. Gemeinsam haben beide Zelltypen neben der IgM-Expression auch die Fähigkeit zur Generierung einer T-Zellunabhängigen Antigenantwort und sie sind potenzielle Produzenten des "natürlichen" IgM (36, 147). IgM-defiziente Mäuse haben erhöhte Zahlen von B1- und MZ-B-Zellen, wofür ein kompensatorischer Mechanismus diskutiert wird: Das Fehlen des "natürlichen" oder auch des spezifischen IgM könnte über noch unbekannte Rückkopplungssignale die Expansion der eigentlich produzierenden Populationen ankurbeln, oder die Differenzierung etwa in follikuläre B-Zellen behindern (131, 148, 149). Unter den gegebenen Beobachtungen wäre ein entsprechendes Szenario durchaus auf SIgMID-Patienten übertragbar, jedoch nicht in vollem Umfang, da die B1-Zellzahlen unverändert waren.

Verschiebungen Weiterhin könnten die Populationsverteilung der durch fehlreguliertes Migrationsverhalten entstehen. Die Untersuchung von Chemokinrezeptoren ermöglichte bei der Maus das Verstehen von Auswanderung aus dem Knochenmark (Transitionale) und Ansiedlung in der Marginalzone der Milz (MZ-B-Zellen). Die Ligation von Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren (S1PR) bewirkt die Migration aus Knochenmarksinus ins periphere Blut, während der Cannabinoid-Rezeptor-2 (CNR2) B-Zellen in die Marginalzone leitet. Für beide Rezeptortypen wurde gezeigt, dass eine Defizienz bzw. Blockade oder artifizielle Ligation zu entsprechenden Populationsverschiebungen führen kann (32, 150, 151). Die Differenzierung von B-Zellen ist auch vom Kompartiment und dem immunologischen Milieu abhängig, insofern könnte eine Dysgammaglobulinämie auch auf solcherlei Migrations- mit konsekutiven Differenzierungsstörungen zurückzuführen sein (152).

Eine weitere plausibel erscheinende Ursache der Populationsabweichungen könnte in der vermehrten Pathogenexposition unter erhöhter Infektinzidenz liegen, im Sinne einer ständigen Aktivierung des Immunsystems. Dazu passend wurde gezeigt, dass TLR9-vermittelte Signale, wie sie bei bakteriellen Infektionen ausgelöst werden, die Differenzierung von Transitionalen zu MZ bewirken und überdies die Entstehung von Autoimmunität befördern (153).

Ob die diskutierten Mechanismen tatsächlich ursächlich oder zumindest beteiligt sind, lässt sich anhand der aktuellen Datenlage nicht abschließend beurteilen. Wahrscheinlich ist jedoch, dass auch angesichts des heterogenen Patientenkollektivs verschiedene Fehlfunktionen in die Regulationsmechanismen eingreifen.

IgM-Expression

Der Anteil IgM⁺ B-Zellen bei den untersuchten Patienten war unauffällig im Vergleich mit den Kontrollprobanden. Diese Ergebnisse decken sich gut mit Berichten aus der Literatur, die mehrheitlich normale Anteile bezeugen, teilweise erhöhte und selten erniedrigte (101, 116-118, 120).

Die Analyse der IgM-Expressionsdichte (MFI) ergab eine statistisch signifikant verminderte IgM-Expression pro B-Zelle. Daraufhin wurde die explorative IgM-MFI-Bestimmung der Subpopulationen bei vier verfügbaren Patienten durchgeführt. Die erniedrigte IgM-Expressionsdichte konnte in diesen Messungen nicht bestätigt werden. Welche Subpopulationen die verminderte IgM-Expressionsdichte mittragen, ließ sich also nicht eruieren. Dies zeigt zum einen, dass das IgM-Expressionsmuster innerhalb des Patientenkollektivs durchaus heterogen ist und weist zum anderen darauf hin, dass zumindest bei einigen Patienten die Zellanzahl und Dichte der IgM-Expression weitestgehend intakt sind. Innerhalb der Subpopulationen zeigte sich einzig der Anteil der IgM⁺ DN erniedrigt, bei einem leichten Trend zu geringerer IgM-Expressionsdichte. Hinsichtlich der Signifikanz sei hier auf die geringe Anzahl der Patientenwerte bei einer großen Streuungsbreite der Kontrollprobandenwerte hingewiesen.

In der Literatur konnten keine vergleichbaren Analysen gefunden werden und der beschriebene Befund ist schwierig zu interpretieren, wenn auch eine Tendenz zur verringerten IgM-Oberflächenexpression auf Einzelzellebene – nicht jedoch die Anzahl der positiven Zellen – gezeigt werden konnte. Die Möglichkeit eines kompensatorischen Zusammenhangs zwischen reduzierter IgM-Expressionsdichte und erhöhten Zahlen IgM-exprimierender Zellen, wie MZ und Transitionale, kann von dieser Warte nochmals in Erwägung gezogen werden.

Ableiten lässt sich aus diesem Befund zumindest, dass die generelle IgM-Expression der Subpopulationen nicht grundsätzlich gestört ist. Ein Großteil der peripheren IgM⁺ B-Zellen sind Naive, MZ, Transitionale – sie exprimieren zwar, sezernieren jedoch (noch) kein IgM. Die dafür zuständigen Zellen residieren in der Regel in den lymphatischen Geweben und können über periphere Blutproben kaum erfasst werden. Somit lässt das Ergebnis lediglich eine Verlagerung pathogenetisch relevanter Abläufe bzw. das Wirksamwerden derselben in die Phasen der weiteren Aktivierung, Differenzierung oder Sekretion vermuten, die vorwiegend abseits des peripheren Blutstroms ablaufen. Folgerichtige Untersuchung ist daher die Abbildung des Stimulationsprozesses *in vitro*, wie sie in der Folge durchgeführt wurde.

Oberflächenmarker

Um die phänotypische Charakterisierung der B-Zellen weiter zu ergänzen und damit verbundene Hinweise auf funktionelle Eigenschaften zu erlangen, wurde erstmals die umfassende Detektion diverser Marker bei SIgMID-Patienten durchgeführt. Unter einem funktionellen Gesichtspunkt kann man die Oberflächenproteine den Komplexen Aktivierung, Überleben und Migration zuordnen. Neben konzeptbestätigenden Befunden, wie die erwartungsgemäß aktivierten Plasmablasten als Population mit dem höchsten CD86⁺ und CD95⁺ Anteil bei Patienten und Kontrollen, waren auch Abweichungen in der SIgMID-Gruppe zu verzeichnen. Auffällig war ein Verlust von Aktivierungs- und Überlebensmarkern auf den MZ-B-Zellen: Fas⁺, Fas-Ligand⁺ und Taci⁺ Anteile waren signifikant verringert, was in Bezug auf die IgM-Defizienz einige interessante Anlehnungen zulässt. So könnte ein eingeschränkter Aktivierungsstatus der MZ etwa durch herabgesetzte Antigenantworten unmittelbar eine verringerte IgM-Sekretion dieser Population zur Folge haben. Ebenso wäre bei gestörter Homöostase durch mangelnde Taci-vermittelte Überlebenssignale eine eingeschränkte IgM-Sekretion unter verkürzter Überlebenszeit, möglicherweise begleitet von einer kompensatorischen Nachbildung der betroffenen Zellen (peripher nachgewiesene erhöhte Transitionale und MZ) denkbar. Ein Verlust der Fas-FasL-vermittelten Apoptose könnte aber auch das Überleben nicht-aktivierter, anerger MZ-B-Zellen begünstigen, mit der Folge einer verminderten IgM-Produktion dieser Zellen bei erhöhter Anzahl im peripheren Blut.

Diese Überlegungen könnten durch weitere Befunde gestützt werden: Transitionale zeigten eine Tendenz zu vermehrten Taci⁺ Anteilen, womöglich ebenfalls ein Zeichen kompensatorisch forcierter Neubildung aus dem Knochenmark. Und die bisher nur unzureichend charakterisierten DN B-Zellen wiesen einen signifikant höheren Anteil CD86-exprimierender, also aktivierter Zellen auf, was unter der Annahme, dass es sich um (Gedächtnis)-Effektorzellen handelt (35), als ausgleichender Mechanismus betrachtet werden könnte. Weiterhin wäre es jedoch auch als Hinweis auf eine stärkere Aktivierung der Mukosa-assoziierten IgA⁺ DN (32) unter vermehrter Pathogen-Exposition deutbar.

Die Migration von Leukozyten und die Formierung lymphatischer Gewebe wird maßgeblich durch die Signalvermittlung über Chemokinrezeptoren gesteuert. Die Assoziation von gestörter Chemokinrezeptorexpression und primären Antikörpermangelsyndromen ist bekannt (154). Auffällig war bei drei Patienten ein verminderter Anteil CCR7-exprimierender B-Zellen in allen Subpopulationen. CCR7 ist an der Endotheladhäsion in den hochendothelialen Venolen beteiligt und leitet die Zellen über die Bindung seiner Liganden CCL19 und CCL21 schließlich in die T-Zell-Zone der sekundären lymphatischen Organe. Die Expression von CCR7 wird bei Naiven B-Zellen durch spezifischen Antigen-Kontakt induziert (155). Ein CCR7-Mangel könnte also die homöostatische Migration der B-Zellen beeinträchtigen, bis hin zu einer gestörten T-Zell-Interaktion, was mit konsekutiv vermindertem Serum-IgM einhergehen könnte. Die Selektivität des IgM-Mangels gegenüber normalen Serumspiegeln der übrigen Ig-Isotypen lässt sich damit jedoch nicht unmittelbar erklären und fehlgesteuerte IgM-spezifische Regulationsmechanismen müssten weiterhin beteiligt sein.

Die CXCR3-Expression war insgesamt unauffällig. Der inflammatorische Chemokinrezeptor wird bei erfolgreicher Antigenpräsentation durch dendritische Zellen auf B-Zellen hochreguliert und bewirkt über die Liganden CXCL9, 10 und 11 die Migration zum Entzündungsort. Die Beteiligung an allergischen und autoimmunen Erkrankungen konnte gezeigt werden (156), scheint im Sinne einer Überexpression bei SIgMID aber keine Rolle zu spielen. Bei den MZ allerdings war ein tendenziell geringerer CXCR3⁺ Anteil zu messen, was zum oben diskutierten Phänotyp der nicht-aktivierten oder anergen MZ-B-Zelle passen würde.

CXCR4 ist ein homöostatischer Chemokinrezeptor, der von B-Zellen konstitutiv exprimiert wird und dessen Ligand CXCL12 in vielen lymphatischen Kompartimenten nachgewiesen werden kann. In der B-Zell-Entwicklung spielt CXCR4 eine tragende Rolle, er bewirkt die Retention bzw. Migration u.a. von Plasmablasten ins Knochenmark und hat weitere, teilweise redundante homöostatische Funktionen (157). Der gemessene signifikant erhöhte Anteil von CXCR4⁺ IgM-only GZ und MZ stellt somit einen vergleichsweise unspezifischen Befund dar, der entsprechend vielgestaltige Beeinflussungen des Migrationsverhaltens bedingen könnte. Bei einigen Patienten zeigten sich größere Anteile CXCR4-tragender Plasmablasten als in der Vergleichsgruppe, was durch eine stärkere Knochenmarksassoziierung der Population mit funktionellen Alterationen einhergehen könnte.

Über die MFI wurde auch die Expressionsdichte der Marker bestimmt. Es zeigten sich keine relevant abweichenden Werte bei den Patienten, was gegen generelle Expressionsdefekte spricht und eher auf veränderte Regulationsgeschehen hinweist. Angesichts der kausal IgM-fokussierten Diskussion der Befunde sollte auch bedacht werden, dass Abweichungen im Chemokinexpressionsmuster – wie auch sonstige phänotypische Veränderungen – ebenso Folge und nicht nur potenzielle Ursache einer SIgMID sein können.

5.5 Expansionsdefizit und IgM-B-Zellmangel – T-Zell-abhängig oder B-Zellintrinsisch?

Im ersten Schritt der funktionellen Charakterisierung wurden mit Zellen von sechs bis sieben Patienten verschiedene in vitro Stimulationen durchgeführt und die Expansion und B-Zell-Subpopulationsverteilung im Anschluss untersucht. Proliferative Zellantworten wurden im Rahmen von Fallberichten und bei kleineren Patienten-Kohorten schon mehrfach untersucht. Dabei beobachtete Störungen in der Proliferation wurden auf bestimmte Pathomechanismen zurückgeführt: Erhöhte T-Suppressor-Aktivität (116, 117, 146), verminderte T-Helfer-Aktivität (120) und intrinsische B-Zell-Defekte (118). Darüber hinaus wurde auch unauffälliges Proliferationsverhalten beschrieben (92). In den vorliegenden Studien wurden meist unspezifische Stimulanzien wie Lektine (PWM, ConA) und bakterielle Antigene (SAC) verwendet. Für diese Arbeit wurden unterschiedliche Stimulationsprotokolle etabliert, darunter auch physiologisch orientierte zytokin- und ligandenbasierte, um unterschiedliche B-Zell-Aktivierungswege parallel zu überprüfen.

Die Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen nach *in vitro* Stimulation stellt in der SIgMID-Forschung ein Novum dar und kann, mit oder ohne Auffälligkeiten im Expansionsverhalten, weiter Aufschluss über Differenzierungs- und Überlebensvorgänge geben.

Expansion

Die Expansion von Gesamt-PBMCs und T-Zell-depletierten PBMCs zeigte sich bei den Patienten in allen Stimulationen unauffällig. Weiterhin wurde das quantitative Ergebnis der B-Zellexpansion bestimmt, die in der Vollstimulation (SAC, PWM, CpG, CD40L, IL-2, IL-10, IL21) unter Beteiligung von T-Zellen bei sechs von sieben Patienten im Vergleich zu den Probanden deutlich herabgesetzt war (p=0,053 im zweiseitigen Mann-Whitney-Test). Die gleiche Stimulation ohne T-Zellen in der Kultur ergab hingegen bei Patienten und Probanden ein gleichwertiges Bild, was Hinweis auf eine Fehlfunktion der Patienten-T-Zellen sein könnte. Dafür spricht ebenfalls der direkte Vergleich der Patienten-B-Zell-Expansion mit und ohne T-Zellen in den selben Stimulationen, der deutlich für ein Ausbleiben der bei den Kontrollen sichtbaren proexpansiven T-Zell-Einflüsse spricht: Alle Patienten zeigten mit und ohne T-Zellen eine weitgehend gleichbleibende Expansionsrate; abgesehen vom siebten Patienten, der wie die Kontrollen unter T-Zell-Beteiligung eine erhöhte Expansionsrate zeigte.

Der Bezug zwischen eingeschränkter Expansion und T-Zellen scheint also recht deutlich und ein Ausbleiben T-Zell-vermittelter Expansionssignale, möglicherweise auch in Form der klassischen T-Zell-Hilfe (120), bietet aus dieser Perspektive ein plausibles Erklärungsmodell. Aus dem Vergleich mit weiteren Stimulationen wird jedoch ersichtlich, dass diese Option eher ausgeschlossen werden kann (siehe unten). Ein suppressiver T-Zell-Effekt, der spezifisch Expansion oder Überleben bestimmter Populationsanteile inhibiert (146) und in der Endsumme damit erfolgte Proliferationen quantitativ aufhebt, lässt sich anhand der Daten ebenfalls in Erwägung ziehen.

In den beiden T-Zell-Faktor-unabhängigen Stimulationen mit SAC, PWM und CpG waren im Mittel leichte Verminderungen der B-Zell-Expansionsantworten zu verzeichnen, was für SAC oder PWM zuvor beschrieben wurde (92, 118) und Hinweis auch auf eine B-Zell-intrinsische Expansionseinschränkung sein könnte. Zentral in diesem Zusammenhang ist die Signalvermittlung über TLR, die T-Zell-unabhängig insbesondere IgM-Immunantworten induzieren kann. In Anbetracht der begrenzten Messwertzahlen (n=3-7) können die vergleichsweise geringfügigen Abweichungen jedoch nur eingeschränkt Anlass zur Diskussion geben.

Die Stimulation mit T-Zell-Faktoren (CD40L, IL-2, IL-10, IL21) ergab insgesamt betrachtet ein eher unspezifisches Bild: Vier Patienten zeigten eher niedrige Expansionsantworten, bei einem Patient war sie deutlich erhöht. In der Gesamtbetrachtung ergab sich ein Mittelwert auf Probandenniveau, als allgemeine Schlussfolgerungen lässt sich an dieser Stelle nur ein heterogenes Antwortverhalten festhalten.

Subpopulationen nach in vitro Stimulation

Anhand der Phänotypisierung nach Simulation lässt sich eruieren, welche Differenzierungsvorgänge durch die verschiedenen Protokolle ausgelöst wurden und welche Populationen bei eingeschränkter Expansion vermindert waren. Im Fall der reduzierten Expansionsantwort in der Vollstimulation unter T- Zell-Einfluss waren verminderte Zellzahlen aller nachgewiesenen B-Zell-Subpopulationen ursächlich für die Gesamtverminderung: Plasmablasten, GZ, DN, MZ und Naive. Die Vollstimulation ohne T-Zell-Einfluss hatte eine nicht signifikante aber tendenziell erkennbare Verminderung der GZ zur Folge, die übrigen Subpopulationen, insbesondere die Plasmablasten, zeigten sich unauffällig, was sich im intakten Gesamtbild der Expansion niederschlägt. Zur weiteren Abwägung bietet sich der Blick auf die übrigen Stimulationen an. Unter Einfluss der T-Zell-Faktoren ohne T-Zell-Beteiligung (CD40L, IL-2, IL-10, IL-21) zeigte sich eine Reduktion aller Subpopulationen, nur drei von sechs Patienten zeigten hohe Plasmablastenzahlen, was die mittlere Expansionsrate an die Werte der Kontrollprobanden anglich (siehe oben) und die überwiegende Reduktion der Subpopulationen in dieser Betrachtung maskierte. Als ersten putativen Pathomechanismus ließe sich somit die eingeschränkte T-Helfer-Aktivität für die weitere Diskussion weitestgehend ausschließen, denn auch ohne jeglichen T-Zell-Einfluss bleiben eminente Reduktionen der Subpopulationen – wie in der Vollstimulation mit T-Zell-Einfluss – bestehen. Ein unmittelbar durch T-Zellen vermittelter inhibitorischer Effekt lässt sich zumindest insoweit eingrenzen, als dass dieser nicht über Zell-Zell-Kontakte vermittelt sein könnte (abgesehen vom hier in löslicher Form eingesetzten CD40L) und auf die eingesetzten Faktoren beschränkt sein müsste. Da bei gleichen Konzentrationen der gleichen Stimulanzienkombination die Patienten aber reduzierte Populationszahlen im Vergleich zu den Probanden zeigten, könnte die Ursache nicht in den Faktoren selbst, sondern nur im Antwortverhalten der B-Zellen auf T-Zell-Faktoren liegen. Folgt man dieser Argumentation, scheidet auch die These der T-Zell-vermittelten Inhibition als solche aus. Es bliebe also noch die Möglichkeit eines intrinsischen B-Zell-Defekts, für den weitere Beobachtungen sprechen: So zeigte sich bei Stimulation mit CpG eine signifikante Erniedrigung der GZ- und tendenzielle Erniedrigung der DN-Zahl. Da in dieser Stimulation weder T-Zellen noch T-Zell-Faktoren beteiligt waren, können diese nicht an den beobachteten Expansionsdefiziten beteiligt sein. Für CpG wurde beschrieben, dass es Differenzierungsund Überlebenssignale vermittelt: Rund 50 % der GZ regulieren unter CpG-Stimulation die CD27-Expression herauf, was per definitionem die Differenzierung zu Plasmablasten bedeutet. Die übrigen 50 % zeigen ein verlängertes Überleben bei Ausbleiben weiterer Differenzierung (36). In der durchgeführten CpG-Stimulation der SIgMID-Zellen zeigten sich keine Defizite in der Plasmablastenzahl, die GZ-Population war jedoch, wie erwähnt, deutlich erniedrigt und lag auf dem gleichen Niveau wie im Kontrollansatz ohne Stimulanzien. Dies lässt ein Ausbleiben der CpG-vermittelten Überlebenssignale in den Patienten-GZ (und DN) vermuten, Anzeichen für eine vermehrte Ausdifferenzierung etwa zu Plasmablasten fehlen. Mit Blick auf die T-Zell-Faktoren-Stimulation und die Vollstimulationen könnte dieser Effekt nicht nur auf CpG-vermittelte Signale beschränkt sein, denn ein eingeschränktes B-Zell-Überleben bei Stimulation, von dem besonders die GZ betroffen sind, lässt sich bei allen Ansätzen beobachten. Auch die besonders großen Unterschiede in der Vollstimulation mit T-Zellen könnten Folge einer defekten B-Zell-Antwort auf die für gesunde B-Zellen optimalen Überlebens- und Differenzierungsbedingungen sein. Die Einordnung der Stimulation mit SAC und PWM ist in diesem Zusammenhang schwierig und muss bei nur drei Kontrollprobanden von eingeschränkter Relevanz sein.

Tendenziell ist auch hier eher ein eingeschränktes Überleben bzw. Differenzierung zu Plasmablasten festzuhalten.

Ein intrinsischer B-Zelldefekt, der sich in einer verminderten Expansionsantwort besonders bei T-Zellund T-Zell-Faktor-vermittelter *in vitro* Stimulation zeigt und ein weniger stimulanzienspezifisches GZ-Überlebensdefizit bewirkt, scheint in Anbetracht obiger Argumente der plausibelste Erklärungsansatz für die beobachteten Auffälligkeiten zu sein. Gleichzeitig bestehende T-Zell-Defekte, wie eingeschränkte Helfer- oder erhöhte Suppressor-Aktivität, können jedoch nicht ausgeschlossen werden und haben möglicherweise sogar aggravierende Effekte. Wie bereits angemerkt, gibt auch die Heterogenität in Expansion und Subpopulationsdifferenzierung Anlass zu der Vermutung, dass zugrundeliegende Störungen bei den Patienten verschiedenartiger Natur sein könnten.

IgM-Expression nach in vitro Stimulation

Ein weiterer bedeutender Befund ist der verminderte Anteil IgM-exprimierender B-Zellen nach Stimulation. Dies zeigte sich bei fast allen durchgeführten Protokollen, ausgenommen die CpG-Stimulation. Dabei war nicht nur der Anteil IgM⁺ Zellen an den Gesamt-B-Zellen betroffen, der auch durch den beobachteten Verlust der IgM-tragenden MZ und Naiven bedingt war, sondern auch der Anteil je Subpopulation war erniedrigt. Bei den GZ war dies konstant in jeder betroffenen Stimulation zu beobachten (SAC, PWM; T-Zell-Faktoren; Vollstimulationen), DN waren in drei von vier Stimulationen betroffen, bei den Plasmablasten war der Effekt weniger stark ausgeprägt. Wurden keine Stimulanzien zur Kultur gegeben, so war wie bei CpG kein vergleichbarer IgM-Populationsverlust zu beobachten. In der Schlussfolgerung könnte dies als stimulations- oder aktivierungsinduzierter Verlust (Plasmablasten) bzw. verminderte Zunahme (GZ, DN) IgM-tragender B-Zellen bezeichnet werden, die nicht von T-Zellen beeinflusst werden. Es stellt sich die Frage, ob jener Verlust durch ein Nicht-Überleben der entsprechenden Zellen oder durch Differenzierungsvorgänge, was in diesem Fall einen Klassenwechsel bedeuten würde, hervorgerufen wird. In Anlehnung an den oben postulierten intrinsischen B-Zell-Defekt hinsichtlich des Antwortverhaltens auf Überlebenssignale könnte man ein verringertes Überleben der IgM⁺ Populationen vermuten. Für Naive und MZ könnte dies durchaus der Fall sein, auch angesichts verminderter anteiliger Expression der Aktivierungs- und Überlebensmarker Fas, Fas-L und Taci bei MZ. Für GZ ergibt sich jedoch aus der CpG-Stimulation der Hinweis, dass der IgM-Verlust eher nicht auf ein IgM-spezifisches Überlebensdefizit zurückzuführen ist: Als einzige Subpopulation zeigten sich die GZ hier insgesamt erniedrigt, jedoch lag relativ keine Reduktion des IgM⁺ Anteils vor. Dies würde man bei einem selektiven Verlust IgM-tragender Zellen erwarten, im vorliegenden Fall jedoch ist der GZ-Verlust eher durch die gleichwertige Verminderung IgM^+ und IgM^- GZ erfolgt. Auch in den Stimulationen mit erniedrigter GZ-Zahl und geringerem IgM⁺ GZ-Anteil können jene verringerten IgM-Anteile den Verlust der GZ-Zahl rechnerisch nicht in vollem Umfang erklären, was darauf hinweist, dass auch GZ anderer Isotypen verringert sein müssen. Davon abgesehen, wäre bei einem IgM-spezifischen Überlebensdefekt die Erniedrigung der IgM-Populationen in allen Stimulationen naheliegend. Dies ist jedoch nur bei jenen

Protokollen der Fall, die potenziell Klassenwechsel-induzierende Stimulanzien beinhalten, also nicht bei CpG und den Kontrollansätzen ohne Stimulanzien. Die Expansions- oder Überlebensdefizite gehen also nicht zwangsläufig mit dem IgM-Verlust einher bzw. sind nicht durch diesen begründet. Diese Überlegungen ließen sich auf die übrigen Subpopulationen übertragen, was die Möglichkeit eines erhöhten Klassenwechsels auch bei GZ, DN und Plasmablasten bzw. ihren Vorgängerzellen unter Stimulation bedeuten würde, bei gleichzeitigem Isotyp-unabhängigem Überlebens- bzw. Expansionsdefizit.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Defizienz IgM-tragender B-Zellen unter bestimmten Stimulationsverhältnissen eintritt. Die Beobachtungen lassen den Rückschluss zu, dass es sich um eine induzierbare, aber intrinsiche Fehlregulation handelt: Obligat (MZ, Naive) und fakultativ (GZ, teilweise DN und Plasmablasten) IgM-exprimierende Populationen zeigten sich vermindert unter SAC, PWM und T-Zell-Faktoren. Dabei mussten T-Zellen an sich nicht beteiligt sein, sie schienen den Anti-IgM-Effekt jedoch zu verstärken, wie sich im Vergleich der Vollstimulationen zeigt. Eine Aktivierung über TLR9 durch CpG bewirkt keinen selektiven Verlust von IgM-Populationen. Ursächlich könnte ein erhöhter Klassenwechsel bei Aktivierung sein.

Passend hierzu liegt die Beschreibung eines Falles von IgM-Defizienz vor, die auf die Überexpression des B-Zell-Schlüsselenzyms AID (engl. *Activation Induced Cytidine Deaminase*) (158, 159) zurückgeführt wurde. Die Patientin zeigte zusätzlich verminderte periphere B-Zellzahlen und hohe IgGund IgA-Spiegel, was als Hinweis auf einen erhöhten Isotypklassenwechsel gewertet wurde (111). Im Mausexperiment wurde ferner gezeigt, dass AID-Expression in B-Zellen im Vergleich zu nichtexprimierenden Zellen eine Abnahme von Proliferation und Überleben bewirkt (160), was interessanterweise auch zum in dieser Arbeit beobachteten Expansionsdefizit passen würde. Eine Überaktivität der AID – etwa durch Mutationen im Protein selbst oder Regulationsdefekte in der vorgeschalteten Signalkaskade – könnte somit sowohl das beobachtete Expansions- als auch das IgM-Defizit nach *in vitro* Stimulation erklären.

Zusammenfassung zu Expansion und IgM-Expression

Die oben angeführten Überlegungen zu den beobachteten Auffälligkeiten nach *in vitro* Stimulationen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Am wahrscheinlichsten erscheint ein intrinsischer B-Zell-Defekt, der ein herabgesetztes Proliferations- und/oder Überlebensverhalten unter bestimmten Stimulationsreizen bedingt. Ferner besteht bei den durchgeführten nicht TLR-9-abhängigen Stimulationen ein Verlust IgM-exprimierender B-Zellen, der auf einen erhöhten Ig-Klassenwechsel zurückzuführen sein könnte. Der Zusammenhang von Expansionseinschränkung und IgM-Verlust ist unklar, könnte aber auf einen gemeinsamen ursächlichen Defekt zurückzuführen sein (z.B. Fehlregulationen der AID). Am stärksten betroffen von den fehlregulativen Vorgängen sind die GZ-B-Zellen.

Andere Pathomechanismen lassen sich jedoch nicht sicher ausschließen, da in einigen Fällen die Ergebnisse nicht eindeutig bzw. signifikant sind und zwischen den Werten der einzelnen Patienten große Unterschiede bestehen können. So sind unterschiedliche molekulare Ursachen für die beobachteten Abweichungen nicht unwahrscheinlich. Außerdem kann über die genauen Abläufe einer eingeschränkten Expansionsleistung keine genauere Aussage getroffen werden, denn die gemessene Expansion ist immer ein Gesamtbild aus Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Denkbar sind neben einer herabgesetzten Suszeptibilität für Überlebenssignale auch eine Proliferationsinhibition oder direkte Apoptoseinduktion, sowie eine Überstimulation mit sukzessivem Zelltod. Denn die angewandte Methodik schließt den genauen Nachweis von Proliferations- und Apoptosevorgängen während der Zellkultivierung nicht mit ein, sondern erlaubt nur Aussagen über den Zellbestand nach Ende der Stimulation.

5.6 Differenzierung der Antikörper-sezernierenden Zellen

Unspezifische ASZ

Im Anschluss an die Expansions- und Phänotypcharakterisierung wurde die Antikörpersekretionsleistung der stimulierten B-Zellen per ELISpot überprüft. Dieses Verfahren ermöglicht quantitative Aussagen auf Einzelzellebene, also wie hoch der Anteil sezernierender Zellen ist. Nach den *in vitro* Stimulationen ohne T-Zell-Beteiligung zeigte sich bei Patienten und Probanden eine weitestgehend gleichwertige ASZ-Zahl. Die Vollstimulation bewirkte bei den Patienten für IgG und IgA einen tendenziell höheren Anteil sezernierender Zellen an der Gesamtheit lebender B-Zellen nach Stimulationsende, die rechnerische Einbeziehung der vorangegangenen Expansionsraten hob die leichten Unterschiede auf. Ein höherer Anteil von Plasmablasten nach Stimulation war nicht nachzuweisen, was bei einigen Patienten eine etwas höhere Aktivitätsrate unter den bereits ausgebildeten ASZ vermuten lässt.

In den Kontrollansätzen ohne Stimulanzien bewirkte die Beteiligung von T-Zellen einen Effekt, der in ähnlicher Weise auch bei der Populationsexpansion beobachtet werden konnte: In der Kultur mit T-Zellen war der Anteil "spontan" IgM-sezernierender Zellen im Vergleich zum gleichen Ansatz ohne T-Zellen bei den Gesunden im Mittel etwas höher, die Patientenzellen reagierten mit einem verminderten IgM-ASZ-Zuwachs. Eine T-Zell-vermittelte Verstärkung der "Autosekretion" wird also von den Patienten-B-Zellen nicht in der Effektivität der meisten Gesunden umgesetzt. Der gleiche Effekt wurde in noch deutlicherer Ausprägung bei allen Isotypen in den Vollstimulationen unter Expansionsberücksichtigung beobachtet: Unter-T-Zell-Einfluss nahm die ASZ-Zahl bei den Probanden mehr als doppelt so stark zu wie bei den Patienten. Dies unterstreicht die Rolle des Expansionsdefizits als pathogenetisch leitender Faktor auch in der ASZ-Bildung. Isoliert betrachtet könnten B-Zell-intrinsische, inhibitorische oder mangelnde T-Helfer-Effekte ursächlich sein.

In die Überlegungen können jedoch weitere Befunde miteinbezogen werden: Ausgehend vom Ansatz ohne Stimulanzien nahm durch die Zugabe der Stimulanzien der Vollstimulation der ASZ-Anteil an allen poststimulatorisch lebenden B-Zellen deutlich zu, wobei die Patienten eine sehr große Streuungsbreite mit zwei erniedrigten und einem sehr hohen Wert bei vergleichbaren Mittelwerten aller Ig-Klassen zeigten. Eine einheitliche Interpretation dieser Ergebnisse ist kaum möglich und spricht für die viel diskutierte ätiologische Heterogenität solcher Befunde und damit auch der SIgMID.

Der Mangel an IgG-ASZ war interessanterweise das einzige signifikant abweichende Ergebnis der ELISpot-Untersuchungen und gleichzeitig ohne *in vivo* Korrelat. Ein ähnliches Ergebnis wurde für poststimulatorisch erniedrigte IgG-Konzentrationen bei normalen Serumwerten von Patienten berichtet (101) und könnte Hinweis auf weiterreichende Defekte sein, die nur unter bestimmten *in vitro* Bedingungen zutage treten und *in vivo* durch Kompensationsmechanismen aufgefangen werden können. Des Weiteren spricht der Befund wiederum gegen eine IgM-spezifische Suppression, die in der Literatur vorgeschlagen wurde (146). Auf eine generelle Erhöhung des B-Zell-Umsatzes, als mögliche Folge des hier gezeigten Isotyp-übergreifenden ASZ-Expansionsdefizits, könnte wiederum die nachgewiesene erhöhte Anzahl Transitionaler im peripheren Blut der Patienten hinweisen.

Die Ig-Sekretionsfähigkeit wurde im Zuge einiger SIgMID-Fallstudien untersucht, dabei wurden Konzentrationen von IgM und weiteren Isotypen im Kulturüberstand gemessen. Ig-Sekretionsanalysen auf zellulärer Ebene, wie in dieser Arbeit per ELISpot-Verfahren durchgeführt, sind aus dem SIgMID-Forschungsfeld nicht bekannt. Unter Anwendung unterschiedlicher Stimulationsprotokolle (hauptsächlich unspezifisch mit PWM, Concanavalin A, SAC u.a.) wurde bei sechs von sechs Analysen eine verminderte IgM-Produktion festgestellt (101, 116-118, 120, 146). Darunter berichteten zwei von vier Autoren über ebenfalls erniedrigte IgG-Konzentrationen und einer von drei über erniedrigtes IgA nach den in vitro Stimulationen. Die Bestimmung der Ig-Konzentrationen der kryokonservierten Kulturüberstände steht für diese Arbeit noch aus, da für die geplante parallele Bestimmung weiterer potenziell pathogenetisch relevanter Faktoren die Ergebnisse dieser Arbeit und anschließender Untersuchungen für deren Identifizierung noch abgewartet werden. Ein Vergleich absolut quantitativer Sekretionsleistungen wird also erst nach Durchführung der entsprechenden Analysen möglich sein. Aufgrund der beschriebenen durchgängig erniedrigten IgM-Sekretionswerte nach in vitro Stimulationen in der Literatur wären ähnliche Befunde auch in dieser Arbeit recht wahrscheinlich. Mit Blick auf das Stimulationsprotokoll wäre allerdings nur der Ansatz mit SAC, PWM hinlänglich vergleichbar, dieser zeigte sich bei niedrigen Probanden-Zahlen unauffällig.

Der durchflusszytometrisch erfolgte semiquantitative Nachweis von intrazellulärem IgM über die mittlere Fluoreszenzintensität der Gesamt-B-Zellen nach Vollstimulationen mit und ohne T-Zell-Beteiligung zeigte normale bis leicht erhöhte Werte bei den Patienten. Dies beweist zumindest, dass eine Synthese grundsätzlich stattfindet, gibt jedoch noch keinen Aufschluss über deren Umfang und die Sekretion, die gleichwohl eingeschränkt oder sogar erhöht sein könnten. Eine Korrelation zwischen intrazellulärem IgM-Gehalt und der IgM-ASZ-Zahl war nicht erkennbar.

Spezifische ASZ

Per ELISpot wurden auch Pneumokokken- (PnPS) und Tetanustoxoid (TT)-spezifische ASZ nachgewiesen. PnPS-IgM-ASZ waren bei allen Patienten nach der CpG- und Vollstimulation ohne T-Zellen vorhanden, nach Vollstimulation mit T-Zellen waren bei drei Patienten analog zur Bestimmung der unspezifischen ASZ, also auch expansionsabhängig, nur sehr niedrige Werte messbar. Die erfolgreiche IgM-ASZ-Differenzierung nach CpG könnte ein Hinweis auf intaktes Bestehen der "natürlichen" IgM-Antwort sein, die möglicherweise nicht in gleichem Maße expansionsabhängig ist, wie die ASZ-Generierung nach Vollstimulation. Außerdem bestätigt es, wie Expansions- und poststimulatorische Subpopulationsanalyse, die zumindest vergleichsweise gut erhaltene Funktionalität dieses Signalweges.

Die Induktion von PnPS-IgG-ASZ war insgesamt weniger effektiv. Unter Vollstimulation ohne T-Zellen zeigten zwei von sechs Patienten keinerlei Antwort, mit T-Zellen vier von sechs und einer von drei Probanden. Wie zuvor beschrieben, scheint die zusätzliche T-Zellhilfe bei den Patienten im Endergebnis kaum den prostimulatorischen Effekt zu haben, wie er bei den Probanden zu erkennen ist. Beeinträchtigte Antikörperantworten auf PnPS bei SIgMID sind bekannt, in einer Untersuchung zeigten 45 % der Patienten eine verminderte Impf- oder Pathogenkontaktantwort (92). Auch hier wurden jedoch Ig-Titer und nicht spezifische ASZ detektiert.

Die Anzahl TT-spezifischer IgG-ASZ war nach CpG- und T-Zell-Faktoren-Stimulation bei Probanden und Patienten gleichermaßen niedrig bis nicht nachweisbar. Die Vollstimulationen mit und ohne T-Zellen brachten unter Einberechnung der Expansion bei den Patienten größtenteils weniger TT-ASZ hervor, unter T-Zell-Beteiligung war dafür das Expansionsdefizit ursächlich. Dies zeigt abermals die Bedeutung der herabgesetzten B-Zellzahl für eine erniedrigte ASZ-Antwort, obwohl die Generierung TT-spezifischer Effektor-B-Zellen intakt ist. In der Literatur wurde über durchgehend vorhandene protektive TT-Titer bei SIgMID-Patienten berichtet (92, 124).

Inwieweit die gezeigte grundsätzlich intakte TT- und PnPS-spezifische Immunantwort *in vivo* quantitativ oder qualitativ beeinträchtigt ist, lässt sich aus den Ergebnissen nicht ersehen.

5.7 Rapamycin – Therapieansatz oder Forschungsinstrument?

Aus der Beobachtung, dass die stärkste beobachtete Einschränkung der B-Zell-Expansion in der *in vitro* Stimulation mit T-Zell-Beteiligung einherging, ergab sich der Ansatz über Hemmung der T-Zell-vermittelten Signale bzw. direkte Hemmung der T-Zellen möglicherweise fehlregulatorische Abläufe

außer Kraft zu setzen. Außerdem könnten sich mit diesem Ansatz AID-vermittelte Abläufe supprimieren lassen, was angesichts der oben diskutierten Assoziation von erhöhter AID-Aktivität und IgM-Defizienz interessant erscheint (158, 161). Das Immunsuppressivum Rapamycin wird klinisch vor allem nach allogenen Organtransplantationen eingesetzt, um Abstoßungsreaktionen zu verhindern. Es hemmt die Wirkung der Kinase mTOR, deren Aktivierung für die B-Zellfunktion essentiell ist und u.a. durch die Bindung von IL-2 an den IL-2-Rezeptor der B-Zelle erfolgen kann. Die Funktion von mTOR ist komplex und seine Inhibition kann bestimmte B-Zellantworten unterdrücken, während andere gefördert werden. Auch die Aktivierung und Funktion von Effektor- und regulatorischen T-Zellen wird entscheidend über mTOR vermittelt (162, 163). Aufgrund dieser Eigenschaften schien der Einsatz von Rapamycin geeignet, um eine mögliche T-Zell- oder T-Zell-Faktor-vermittelte Störung der B-Zell-Funktion bei den Patienten 1 und 7 zu überprüfen.

In der Stimulation mit T-Zell-Faktoren bewirkte Rapamycin vor allem einen Differenzierungsblock der Plasmablasten, die Gesamt-Expansion konnte dosisabhängig maximal nur um etwa 10 % gesteigert werden. Der Anteil IgM-exprimierender B-Zellen stieg unter Rapamycin hauptsächlich in Folge des Differenzierungsblocks und damit einhergehenden größeren Anteilen IgM⁺ Naiver, MZ und DN an. GZ und DN zeigten außerdem deutlich erhöhte IgM⁺ Anteile. Letzteres ist angesichts des bei GZ und DN besonders ausgeprägten IgM-Verlustes unter den meisten durchgeführten *in vitro* Stimulationen hervorzuheben. Der ASZ-Nachweis im ELISpot zeigte normale Zahlen für IgM und IgG ohne Rapamycin und kaum einen Effekt unter 20 nM. 100 nM sorgte hingegen für einen massiven Einbruch der Spot-Produktion, was zumindest tendenziell mit dem beschriebenen Plasmablasten-Differenzierungsblock übereinstimmt.

In der Vollstimulation mit T-Zellen hatte Rapamycin geringere Auswirkungen. Es führte zu erhöhten Zellzahlen in allen Subpopulationen, ein Differenzierungsblock mit erniedrigten Plasmablastenzahlen war nicht erkennbar. Es konnte ein leichter Anstieg des IgM-Anteils an den Gesamt-B-Zellen verzeichnet werden, der hauptsächlich auf höheren IgM⁺ Anteilen der GZ und DN beruhte. Die ASZ-Bildung lag für IgM auf einem sehr niedrigen Niveau, das auch durch Rapamycin nicht entscheidend beeinflusst wurde. Die IgG-ASZ waren ebenfalls vermindert, mit ansteigender Rapamycin-Dosis konnten die Zahlen aber bei beiden Patienten etwa verdoppelt werden, was immerhin zur Annäherung an den Probanden-Bereich führte.

Die leichte Zunahme der Plasmablastenzahl unter Rapamycin kann die ASZ-Entwicklung nur unzureichend erklären. Während bei Patient 1 erhöhte Plasmablastenzahlen mit der IgG-ASZ-Zunahme gut vereinbar sind, kann die Reduktion der IgM-ASZ bei jenem Patienten und der IgG-ASZ-Zuwachs bei Patient 7 ohne entsprechende Plasmablasten-Erhöhung über die Zellzahlen nicht erklärt werden. Wahrscheinlich werden also auch funktionelle Parameter durch das Rapamycin erfasst, die sich nicht in Zellzahlen ablesen lassen und das Sekretionsverhalten maßgeblich beeinflussen.
Der Effekt des Rapamycins differierte stark in Abhängigkeit des Stimulationsprotokolls. Dies dürfte maßgeblich durch die Beteiligung von T-Zellen in der Vollstimulation begründet sein, deren Beteiligung an den Expansionsabläufen durch das Rapamycin verändert wurde. Während die ASZ-Bildung ohne T-Zell-Hilfe unter Rapamycin stark eingeschränkt wurde, zeigte sich in der Vollstimulation eher ein positiver Effekt: Die Expansionsraten bzw. Subpopulationszahlen näherten sich den Gesunden-Bereichen an, einer eindeutig verbesserten IgG-ASZ-Differenzierung stand nur in einem Fall eine leichte Abnahme der IgM-ASZ-Zahl gegenüber. Zusammenfassend kann man für die Vollstimulation, die zumindest hinsichtlich der T-Zell-Beteiligung eine in-vivo-ähnlichere Situation darstellt, eine stabilisierende Wirkung des Rapamycins feststellen. Besonders bei hyperinflammatorischen Zuständen oder einer generellen Tendenz zu überschießenden Immunantworten, wie sie klinisch bei SIgMID-Patienten oftmals vorliegen, könnte ein stabilisierender Effekt erwünscht sein. Dieser zeichnet sich vor allem durch eine Verbesserung der B-Zell-Expansion aus – über welche Mechanismen, bleibt dabei noch unklar. Um einer klinischen Anwendung einen Schritt näher zu kommen, müssten die Erkenntnisse über die SIgMID eine klarere Identifizierung pathogenetisch wirksamer Mechanismen erlauben, um auch die Rolle der expansionsbildenden Abläufe wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung einordnen zu können und so den Effekt des Rapamycins besser zu verstehen. Auch wenn die Wirkung des Rapamycins nicht die ursächlichen Defekte ausgleichen kann, so ist doch mit der Verbesserung der IgG-ASZ-Differenzierung und erhöhten IgM-B-Zell-Anteilen eine partielle Kompensation der eminentesten in vitro Defizite gelungen.

5.8 Ausblick

Weiterführende Untersuchungen bieten sich auf mehreren Ebenen an. Wichtig ist die Bestimmung der Ig in den eingefrorenen Zellkulturüberständen, die Aufschluss über die quantitative Antikörpersynthese in Abhängigkeit der unterschiedlichen Stimulationsprotokolle geben kann. Neben der durchgeführten Sekretionsanalyse auf Einzelzellebene (ELISpot) sind diese Informationen für die Bewertung der ASZ-Funktion von großer Relevanz. Des Weiteren empfiehlt sich die Bestimmung weiterer löslicher Faktoren, angesichts des nachgewiesenen Expansionsdefizits und teilweise erniedrigter Taci-Expression z.B. Überlebens- oder Differenzierungsfaktoren wie BAFF, APRIL o.ä. (32). Eine umfassende Erhebung des Zytokinstatus in Überständen und ebenfalls eingefrorenen Serumproben würde diesen Ansatz sinnvoll weiterführen. Interessant wäre die Bestimmung der IgM-Spezifitäten bzw. die Zuordnung des *in vitro* sezernierten oder Serum-IgM der Patienten im Hinblick auf die Verteilung von "natürlichem" polyreaktiven und andererseits affinitätsgereiftem IgM, um mögliche Defizite der IgM-Produktion weiter eingrenzen zu können. Auch auf zellulärer Ebene wurde mit der Untersuchung von Expression und Funktionalität des Fcµ-Rezeptors ein vielversprechender Ansatz herausgearbeitet (s. 5.1), der die Überprüfung eines möglichen Zusammenhangs von Autoimmunität und IgM- oder Rezeptor-Defizienz bei SIgMID-Patienten nahelegt (135-137). Außerdem wäre eine weitergehende Bewertung des Helferzellstatus von Interesse: in Form der Kokultivierung von jeweils Patienten- und Probanden B- und T-Zellen (116, 118), um T-Zell-Einflüsse weiter zu überprüfen, sowie eine Funktionsanalyse "unkonventionellerer" Helferzellen (s. 5.3), wie Granulozyten, NKT- und dendritische Zellen, die direkten Einfluss auf die IgM-Produktion haben (1). Aufwändigere immunhistochemische Untersuchungen sekundärer lymphatischer Gewebe könnten zunächst im Mausmodell Erkenntnisse etwa über Follikel- und Keimzentrumsarchitektur sowie lymphozytäre Migrations- und Interaktionsverhältnisse geben, deren Intaktheit Grundvoraussetzung für die Generierung einer umfassenden Immunantwort ist.

Das beobachtete Expansionsdefizit und die verminderten IgM-Zellzahlen nach *in vitro* Stimulationen ließen sich möglicherweise gestörten Antworten bestimmter Subpopulationen zuordnen, wenn die Stimulationen an zuvor gesorteten B-Zell-Subpopulationen (mit und ohne T-Zell-Einfluss) durchgeführt würden. Essenziell ist auch die Entschlüsselung des Ablaufs der "Expansion": Ob das *in vitro* Defizit durch Störungen der Proliferation, Apoptose, Differenzierung bzw. Klassenwechsel erfolgt, lässt sich anhand der bisher durchgeführten Experimente nicht feststellen und könnte beispielsweise über Zell-Labeling-Techniken, Apoptose-Messung oder zeitlich eng gestaffelte Verlaufsanalysen der kultivierten, bestenfalls gesorteten Zellen gelingen. Eine Untersuchung der *in vivo* Proliferationsgeschichte der Subpopulationen kann über das Sorten und anschließende KREC (engl. *Kappa-deleting Recombination Excision Circle*)-Quantifizierung (164) peripherer B-Zellen gelingen und könnte eine möglicherweise auch *in vivo* vorliegende Expansionsstörung aufdecken.

Die genetische Untersuchung von SIgMID-Patienten stellt eine weitere Möglichkeit dar, sich ätiologischen Faktoren zu nähern. So könnte etwa die AID bzw. Komponenten des assoziierten Signaltransduktionssystems Ziel solcher Untersuchungen sein. Als besonders wertvoll könnte sich hier der weitestgehend unauffällige Befund der CpG-Stimulation erweisen, da er in weiterführenden Untersuchungen hilfreich bei der Eingrenzung funktionaler und dysfunktionaler Teilstrecken von Signaltransduktionssystemen sein könnte.

Der *in vitro* Effekt von Rapamycin weist mit der partiellen Kompensation zentraler Defekte zumindest auf die Möglichkeit einer ursächlichen Therapie bei SIgMID hin, Vergleichswerte weiterer Patienten und Kontrollprobanden für eine eindeutigere Einordnung stehen jedoch noch aus. Auch die *in vitro* Anwendung anderer immunmodulatorischer Agenzien ist angesichts der Rapamycin-Ergebnisse im weiteren experimentellen Vorgehen denkbar und könnte für die Etablierung einer kausalen SIgMID-Therapie in der Zukunft von Vorteil sein.

6. Literaturverzeichnis

- 1. Cerutti A, Puga I, Cols M. New helping friends for B cells. Eur J Immunol. 2012;42:1956-68.
- 2. Kaminski DA, Wei C, Qian Y, Rosenberg AF, Sanz I. Advances in human B cell phenotypic profiling. Front Immunol. 2012;3:302.
- 3. Warnatz K, Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. Cytometry B Clin Cytom. 2008;74:261-71.
- 4. Wang K, Wei G, Liu D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. Exp Hematol Oncol. 2012;1:36.
- 5. Rolink AG, Andersson J, Melchers F. Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity. Eur J Immunol. 1998;28:3738-48.
- 6. Palanichamy A, Barnard J, Zheng B, Owen T, Quach T, Wei C, et al. Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. J Immunol. 2009;182:5982-93.
- 7. Suryani S, Fulcher DA, Santner-Nanan B, Nanan R, Wong M, Shaw PJ, et al. Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. Blood. 2010;115:519-29.
- Bemark M, Friskopp L, Saghafian-Hedengren S, Koethe S, Fasth A, Abrahamsson J, et al. A glycosylation-dependent CD45RB epitope defines previously unacknowledged CD27(-)IgM(high) B cell subpopulations enriched in young children and after hematopoietic stem cell transplantation. Clin Immunol. 2013;149:421-31.
- 9. Meyer-Bahlburg A, Andrews SF, Yu KO, Porcelli SA, Rawlings DJ. Characterization of a late transitional B cell population highly sensitive to BAFF-mediated homeostatic proliferation. J Exp Med. 2008;205:155-68.
- 10. Goodnow CC, Vinuesa CG, Randall KL, Mackay F, Brink R. Control systems and decision making for antibody production. Nat Immunol. 2010;11:681-8.
- 11. Hamel KM, Liarski VM, Clark MR. Germinal center B-cells. Autoimmunity. 2012;45:333-47.
- 12. Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. J Exp Med. 1998;188:1679-89.
- 13. Bemark M, Bergqvist P, Stensson A, Holmberg A, Mattsson J, Lycke NY. A unique role of the cholera toxin A1-DD adjuvant for long-term plasma and memory B cell development. J Immunol. 2011;186:1399-410.
- Wang NS, McHeyzer-Williams LJ, Okitsu SL, Burris TP, Reiner SL, McHeyzer-Williams MG. Divergent transcriptional programming of class-specific B cell memory by T-bet and RORα. Nat Immunol. 2012;13:604-11.
- 15. Klein U, Küppers R, Rajewsky K. Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. Blood. 1997;89:1288-98.
- 16. Berkowska MA, Driessen GJ, Bikos V, Grosserichter-Wagener C, Stamatopoulos K, Cerutti A, et al. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and independent maturation pathways. Blood. 2011;118:2150-8.
- 17. Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, et al. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. Blood. 2004;104:3647-54.
- 18. Wu YC, Kipling D, Dunn-Walters DK. The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. Front Immunol. 2011;2:81.

- 19. Tsuiji M, Yurasov S, Velinzon K, Thomas S, Nussenzweig MC, Wardemann H. A checkpoint for autoreactivity in human IgM+ memory B cell development. J Exp Med. 2006;203:393-400.
- 20. Kruetzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter HH, et al. Human immunoglobulin M memory B cells controlling Streptococcus pneumoniae infections are generated in the spleen. J Exp Med. 2003;197:939-45.
- 21. Seifert M, Küppers R. Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation. J Exp Med. 2009;206:2659-69.
- 22. Tangye SG, Good KL. Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or "memory" B cells? J Immunol. 2007;179:13-9.
- 23. Snapper CM. Mechanisms underlying in vivo polysaccharide-specific immunoglobulin responses to intact extracellular bacteria. Ann N Y Acad Sci. 2012;1253:92-101.
- 24. Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. Nat Rev Immunol. 2002;2:323-35.
- 25. Puga I, Cols M, Barra CM, He B, Cassis L, Gentile M, et al. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. Nat Immunol. 2012;13:170-80.
- 26. Spencer J, Finn T, Pulford KA, Mason DY, Isaacson PG. The human gut contains a novel population of B lymphocytes which resemble marginal zone cells. Clin Exp Immunol. 1985;62:607-12.
- Tierens A, Delabie J, Michiels L, Vandenberghe P, De Wolf-Peeters C. Marginal-zone B cells in the human lymph node and spleen show somatic hypermutations and display clonal expansion. Blood. 1999;93:226-34.
- 28. Dono M, Zupo S, Leanza N, Melioli G, Fogli M, Melagrana A, et al. Heterogeneity of tonsillar subepithelial B lymphocytes, the splenic marginal zone equivalents. J Immunol. 2000;164:5596-604.
- 29. Wasserstrom H, Bussel J, Lim LC, Cunningham-Rundles C. Memory B cells and pneumococcal antibody after splenectomy. J Immunol. 2008;181:3684-9.
- 30. Kelly DF, Snape MD, Clutterbuck EA, Cutterbuck EA, Green S, Snowden C, et al. CRM197conjugated serogroup C meningococcal capsular polysaccharide, but not the native polysaccharide, induces persistent antigen-specific memory B cells. Blood. 2006;108:2642-7.
- 31. Langley JM, Dodds L, Fell D, Langley GR. Pneumococcal and influenza immunization in asplenic persons: a retrospective population-based cohort study 1990-2002. BMC Infect Dis. 2010;10:219.
- 32. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. J Allergy Clin Immunol. 2013;131:959-71.
- 33. Fecteau JF, Côté G, Néron S. A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. J Immunol. 2006;177:3728-36.
- 34. Wei C, Anolik J, Cappione A, Zheng B, Pugh-Bernard A, Brooks J, et al. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. J Immunol. 2007;178:6624-33.
- 35. Wirths S, Lanzavecchia A. ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells. Eur J Immunol. 2005;35:3433-41.
- Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E, Rosado MM, Plebani A, Auriti C, et al. CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. J Immunol. 2008;180:800-8.
- 37. MacLennan IC, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DM, Zúñiga E, et al. Extrafollicular antibody responses. Immunol Rev. 2003;194:8-18.
- 38. Oracki SA, Walker JA, Hibbs ML, Corcoran LM, Tarlinton DM. Plasma cell development and survival. Immunol Rev. 2010;237:140-59.

- 39. Wrammert J, Smith K, Miller J, Langley WA, Kokko K, Larsen C, et al. Rapid cloning of highaffinity human monoclonal antibodies against influenza virus. Nature. 2008;453:667-71.
- 40. Halliley JL, Kyu S, Kobie JJ, Walsh EE, Falsey AR, Randall TD, et al. Peak frequencies of circulating human influenza-specific antibody secreting cells correlate with serum antibody response after immunization. Vaccine. 2010;28:3582-7.
- 41. Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. Immunity. 1998;8:363-72.
- 42. Cocco M, Stephenson S, Care MA, Newton D, Barnes NA, Davison A, et al. In vitro generation of long-lived human plasma cells. J Immunol. 2012;189:5773-85.
- 43. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-. J Exp Med. 2011;208:67-80.
- 44. Rothstein TL, Griffin DO, Holodick NE, Quach TD, Kaku H. Human B-1 cells take the stage. Ann N Y Acad Sci. 2013;1285:97-114.
- 45. Griffin DO, Rothstein TL. Human "orchestrator" CD11b(+) B1 cells spontaneously secrete interleukin-10 and regulate T-cell activity. Mol Med. 2012;18:1003-8.
- 46. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. Annu Rev Immunol. 2012;30:221-41.
- Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. Sci Transl Med. 2013;5:173ra23.
- 48. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. Immunity. 2010;32:129-40.
- Bouaziz JD, Calbo S, Maho-Vaillant M, Saussine A, Bagot M, Bensussan A, et al. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. Eur J Immunol. 2010;40:2686-91.
- 50. Lampropoulou V, Hoehlig K, Roch T, Neves P, Calderón Gómez E, Sweenie CH, et al. TLRactivated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. J Immunol. 2008;180:4763-73.
- 51. Dalwadi H, Wei B, Schrage M, Spicher K, Su TT, Birnbaumer L, et al. B cell developmental requirement for the G alpha i2 gene. J Immunol. 2003;170:1707-15.
- 52. Nutt SL, Tarlinton DM. Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends? Nat Immunol. 2011;12:472-7.
- 53. Murphy K. Janeway's Immunobiology. 8 ed. New York, New York: Garland Science; 2012.
- 54. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. J Allergy Clin Immunol. 2010;125:S41-52.
- 55. Fecteau JF, Néron S. CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. J Immunol. 2003;171:4621-9.
- 56. Mingari MC, Gerosa F, Carra G, Accolla RS, Moretta A, Zubler RH, et al. Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells. Nature. 1984;312:641-3.
- 57. Jelinek DF, Splawski JB, Lipsky PE. The roles of interleukin 2 and interferon-gamma in human B cell activation, growth and differentiation. Eur J Immunol. 1986;16:925-32.
- 58. Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. Front Immunol. 2013;4:129.
- 59. Itoh K, Inoue T, Ito K, Hirohata S. The interplay of interleukin-10 (IL-10) and interleukin-2 (IL-2) in humoral immune responses: IL-10 synergizes with IL-2 to enhance responses of human B lymphocytes in a mechanism which is different from upregulation of CD25 expression. Cell Immunol. 1994;157:478-88.

- 60. Itoh K, Hirohata S. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. J Immunol. 1995;154:4341-50.
- 61. Kuchen S, Robbins R, Sims GP, Sheng C, Phillips TM, Lipsky PE, et al. Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4+ T cell-B cell collaboration. J Immunol. 2007;179:5886-96.
- 62. Aranburu A, Ceccarelli S, Giorda E, Lasorella R, Ballatore G, Carsetti R. TLR ligation triggers somatic hypermutation in transitional B cells inducing the generation of IgM memory B cells. J Immunol. 2010;185:7293-301.
- 63. Romagnani S, Del Prete G, Giudizi MG, Biagiotti R, Almerigogna F, Tiri A, et al. Direct induction of human B-cell differentiation by recombinant interleukin-2. Immunology. 1986;58:31-5.
- 64. Suzuki N, Ueda Y, Sakane T. Differential mechanism for differentiation into immunoglobulinsecreting cells in human resting B lymphocyte subsets isolated on the basis of cell density. J Clin Invest. 1988;81:261-9.
- 65. Bekeredjian-Ding I, Foermer S, Kirschning CJ, Parcina M, Heeg K. Poke weed mitogen requires Toll-like receptor ligands for proliferative activity in human and murine B lymphocytes. PLoS One. 2012;7:e29806.
- 66. Chalouni C, Banchereau J, Vogt AB, Pascual V, Davoust J. Human germinal center B cells differ from naive and memory B cells by their aggregated MHC class II-rich compartments lacking HLA-DO. Int Immunol. 2003;15:457-66.
- 67. Eynon EE, Parker DC. Small B cells as antigen-presenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens. J Exp Med. 1992;175:131-8.
- 68. Chen X, Jensen PE. The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2008;56:77-83.
- 69. Hahne M, Renno T, Schroeter M, Irmler M, French L, Bornard T, et al. Activated B cells express functional Fas ligand. Eur J Immunol. 1996;26:721-4.
- 70. Hao Z, Duncan GS, Seagal J, Su YW, Hong C, Haight J, et al. Fas receptor expression in germinalcenter B cells is essential for T and B lymphocyte homeostasis. Immunity. 2008;29:615-27.
- Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Sugita K, Freedman AS, Morimoto C, et al. B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88:6575-9.
- 72. Ding L, Shevach EM. Activated B cells express CD28/B7-independent costimulatory activity. J Immunol. 1996;157:1389-96.
- 73. Mackay F, Schneider P. TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties. Cytokine Growth Factor Rev. 2008;19:263-76.
- 74. Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. Annu Rev Immunol. 2002;20:165-96.
- 75. Mannoor K, Matejuk A, Xu Y, Beardall M, Chen C. Expression of natural autoantibodies in MRLlpr mice protects from lupus nephritis and improves survival. J Immunol. 2012;188:3628-38.
- 76. Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, Carroll MC, Chen J. A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. J Exp Med. 1998;188:2381-6.
- 77. Ehrenstein MR, Notley CA. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. Nat Rev Immunol. 2010;10:778-86.
- 78. Schütt C, Bröker B. Grundwissen Immunologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
- 79. Woof JM, Mestecky J. Mucosal immunoglobulins. Immunol Rev. 2005;206:64-82.
- Hughey CT, Brewer JW, Colosia AD, Rosse WF, Corley RB. Production of IgM hexamers by normal and autoimmune B cells: implications for the physiologic role of hexameric IgM. J Immunol. 1998;161:4091-7.

- 81. Kubagawa H, Oka S, Kubagawa Y, Torii I, Takayama E, Kang DW, et al. Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcmuR) in humans. J Exp Med. 2009;206:2779-93.
- 82. Goldstein MF, Goldstein AL, Dunsky EH, Dvorin DJ, Belecanech GA, Shamir K. Selective IgM immunodeficiency: retrospective analysis of 36 adult patients with review of the literature. Ann Allergy Asthma Immunol. 2006;97:717-30.
- 83. Thong YH, Maxwell GM. Primary selective deficiency of immunoglobulin M. Aust N Z J Med. 1978;8:436-8.
- 84. Cassidy JT, Nordby GL. Human serum immunoglobulin concentrations: prevalence of immunoglobulin deficiencies. J Allergy Clin Immunol. 1975;55:35-48.
- 85. Faulk WP, Kiyasu WS, Cooper MD, Fudenberg HH. Deficiency of IgM. Pediatrics. 1971;47:399-404.
- Hobbs JR, Milner RD, Watt PJ. Gamma-M deficiency predisposing to meningococcal septicaemia. Br Med J. 1967;4:583-6.
- 87. Hobbs JR. IgM deficiency. Birth Defects Orig Artic Ser. 1975;11:112-6.
- 88. Ross IN, Thompson RA. Severe selective IgM deficiency. J Clin Pathol. 1976;29:773-7.
- 89. Louis AG, Gupta S. Primary Selective IgM Deficiency: An Ignored Immunodeficiency. Clin Rev Allergy Immunol. 2013.
- 90. Ozen A, Baris S, Karakoc-Aydiner E, Ozdemir C, Bahceciler NN, Barlan IB. Outcome of hypogammaglobulinemia in children: immunoglobulin levels as predictors. Clin Immunol. 2010;137:374-83.
- 91. Goldstein MF, Goldstein AL, Dunsky EH, Dvorin DJ, Belecanech GA, Shamir K. Pediatric selective IgM immunodeficiency. Clin Dev Immunol. 2008;2008:624850.
- 92. Yel L, Ramanuja S, Gupta S. Clinical and immunological features in IgM deficiency. Int Arch Allergy Immunol. 2009;150:291-8.
- 93. Yocum MW, Strong DM, Chusid MJ, Lakin JD. Selective immunoglobulin M (IgM) deficiency in two immunodeficient adults with recurrent staphylococcal pyoderma. Am J Med. 1976;60:486-94.
- 94. Guill MF, Brown DA, Ochs HD, Pyun KH, Moffitt JE. IgM deficiency: clinical spectrum and immunologic assessment. Ann Allergy. 1989;62:547-52.
- 95. Zaka-ur-Rab Z, Gupta P. Pseudomonas septicemia in selective IgM deficiency. Indian Pediatr. 2005;42:961-2.
- 96. Hong R, Gupta S. Selective immunoglobulin M deficiency in an adult with Streptococcus pneumoniae sepsis and invasive aspergillosis. J Investig Allergol Clin Immunol. 2008;18:214-8.
- 97. Kouvalainen K, Backman A, Rehtijärvi K. Chronic moniliasis, pyodermia and impaired capacity to form gamma-M antibodies. Ann Paediatr Fenn. 1966;12:256-62.
- 98. Jones DM, Tobin BM, Butterworth A. Three cases of meningococcal infection in a family, associated with a deficient immune response. Arch Dis Child. 1973;48:742-3.
- 99. Kiratli HK, Akar Y. Multiple recurrent hordeola associated with selective IgM deficiency. J AAPOS. 2001;5:60-1.
- 100. Chandra RK, Kaveramma B, Soothill JF. Generalised non-progressive vaccinia associated with IgM deficiency. Lancet. 1969;1:687-9.
- 101. Takeuchi T, Nakagawa T, Maeda Y, Hirano S, Sasaki-Hayashi M, Makino S, et al. Functional defect of B lymphocytes in a patient with selective IgM deficiency associated with systemic lupus erythematosus. Autoimmunity. 2001;34:115-22.
- 102. Saiki O, Saeki Y, Tanaka T, Doi S, Hara H, Negoro S, et al. Development of selective IgM deficiency in systemic lupus erythematosus patients with disease of long duration. Arthritis Rheum. 1987;30:1289-92.
- 103. Bandilla KK, Pitts NC, McDuffie FC. Immunoglobulin M deficiency in the immune response of patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1970;13:214-21.

- 104. Stoelinga GB, van Munster PJ. Antibody deficiency syndrome and autoimmune haemolytic anaemia in a boy with isolated IgM deficiency dysimmunoglobulinaemia type 5. Acta Paediatr Scand. 1969;58:352-62.
- 105. Antar M, Lamarche J, Peguero A, Reiss A, Cole S. A case of selective immunoglobulin M deficiency and autoimmune glomerulonephritis. Clin Exp Nephrol. 2008;12:300-4.
- 106. Morita M, Saibara T, Nakazawa Y, Miyao M, Okazaki K, Onishi S, et al. [A case of Crohn's disease associated with selective IgM deficiency]. Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi. 1984;81:1070-5.
- 107. Sugita K, Eguchi M. Chronic idiopathic thrombocytic purpura in a young male patient with isolated IgM deficiency. Int J Hematol. 2001;73:532-3.
- 108. Saini S, Dettore AJ, Bhambhani KJ, Buck S, Poulik J, Savaşan S. Selective IgM deficiency in CD30+ cutaneous lymphoproliferative disorder. J Pediatr Hematol Oncol. 2011;33:e156-9.
- 109. Vogelzang NJ, Corwin H, Finlay JL, Pellettiere EV, Luskin AT, Di Camelli RF, et al. Clear cell sarcoma and selective IgM deficiency: a case report. Cancer. 1982;49:234-8.
- 110. Takenaka T, Nakamine H, Nishihara T, Tsuda T, Tsujimoto M, Maeda J. Prolymphocytic leukemia with IgM hypogammaglobulinemia. Am J Clin Pathol. 1983;80:237-42.
- 111. Arahata M, Tajiri K, Nomoto K, Tsuneyama K, Minami S, Shimizu Y. A novel type of selective immunoglobulin m deficiency in a patient with autoimmune liver cirrhosis with recurrent hepatocellular carcinoma: a case report and review of the literature. Int Arch Allergy Immunol. 2013;161:91-6.
- 112. Faniran AO, Peat JK, Woolcock AJ. Prevalence of atopy, asthma symptoms and diagnosis, and the management of asthma: comparison of an affluent and a non-affluent country. Thorax. 1999;54:606-10.
- 113. Mayumi M, Yamaoka K, Tsutsui T, Mizue H, Doi A, Matsuyama M, et al. Selective immunoglobulin M deficiency associated with disseminated molluscum contagiosum. Eur J Pediatr. 1986;145:99-103.
- 114. Belgemen T, Suskan E, Dogu F, Ikinciogullari A. Selective immunoglobulin M deficiency presenting with recurrent impetigo: a case report and review of the literature. Int Arch Allergy Immunol. 2009;149:283-8.
- 115. Iraji F, Faghihi G. Epidermodysplasia verruciformis: association with isolated IgM deficiency and response to treatment with acitretin. Clin Exp Dermatol. 2000;25:41-3.
- 116. Inoue T, Okumura Y, Shirama M, Ishibashi H, Kashiwagi S, Okubo H. Selective partial IgM deficiency: functional assessment of T and B lymphocytes in vitro. J Clin Immunol. 1986;6:130-5.
- 117. Ohno T, Inaba M, Kuribayashi K, Masuda T, Kanoh T, Uchino H. Selective IgM deficiency in adults: phenotypically and functionally altered profiles of peripheral blood lymphocytes. Clin Exp Immunol. 1987;68:630-7.
- 118. Yamasaki T. Selective IgM deficiency: functional assessment of peripheral blood lymphocytes in vitro. Intern Med. 1992;31:866-70.
- Kraljevic K, Wong S, Fulcher DA. Circulating phenotypic B-1 cells are decreased in common variable immunodeficiency and correlate with immunoglobulin M levels. Clin Exp Immunol. 2013;171:278-82.
- 120. De la Concha EG, Garcia-Rodriguez MC, Zabay JM, Laso MT, Alonso F, Bootello A, et al. Functional assessment of T and B lymphocytes in patients with selective IgM deficiency. Clin Exp Immunol. 1982;49:670-6.
- 121. Raziuddin S, Bilal N, Benjamin B. Transient T-cell abnormality in a selective IgMimmunodeficient patient with Brucella infection. Clin Immunol Immunopathol. 1988;46:360-7.
- 122. Haddad ZH, Allen RF, Towner JW, Wilson MG. IgA, IgM, and partial deletion of chromosome 18. Lancet. 1969;1:678.

- 123. Ostergaard PA. A girl with recurrent infections, low IgM and an abnormal chromosome number 1. Acta Paediatr Scand. 1973;62:211-5.
- 124. Kung SJ, Gripp KW, Stephan MJ, Fairchok MP, McGeady SJ. Selective IgM deficiency and 22q11.2 deletion syndrome. Ann Allergy Asthma Immunol. 2007;99:87-92.
- 125. Kondo N, Ozawa T, Kato Y, Motoyoshi F, Kasahara K, Kameyama T, et al. Reduced secreted mu mRNA synthesis in selective IgM deficiency of Bloom's syndrome. Clin Exp Immunol. 1992;88:35-40.
- 126. Conley ME, Wang WC, Parolini O, Shapiro DN, Campana D, Siminovitch KA. Atypical Wiskott-Aldrich syndrome in a girl. Blood. 1992;80:1264-9.
- 127. Jabara HH, McDonald DR, Janssen E, Massaad MJ, Ramesh N, Borzutzky A, et al. DOCK8 functions as an adaptor that links TLR-MyD88 signaling to B cell activation. Nat Immunol. 2012;13:612-20.
- 128. Hobbs JR. Secondary antibody deficiency. Proc R Soc Med. 1968;61:883-7.
- 129. Blecher TE, Brzechwa-Ajdukiewicz A, McCarthy CF, Read AE. Serum immunoglobulins and lymphocyte transformation studies in coeliac disease. Gut. 1969;10:57-62.
- Subramaniam KS, Datta K, Quintero E, Manix C, Marks MS, Pirofski LA. The absence of serum IgM enhances the susceptibility of mice to pulmonary challenge with Cryptococcus neoformans. J Immunol. 2010;184:5755-67.
- Ehrenstein MR, O'Keefe TL, Davies SL, Neuberger MS. Targeted gene disruption reveals a role for natural secretory IgM in the maturation of the primary immune response. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:10089-93.
- 132. Brandtzaeg P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. Scand J Immunol. 2009;70:505-15.
- 133. Chen K, Cerutti A. The function and regulation of immunoglobulin D. Curr Opin Immunol. 2011;23:345-52.
- Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. J Exp Med. 1994;179:1317-30.
- 135. Boes M, Schmidt T, Linkemann K, Beaudette BC, Marshak-Rothstein A, Chen J. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97:1184-9.
- 136. Ehrenstein MR, Cook HT, Neuberger MS. Deficiency in serum immunoglobulin (Ig)M predisposes to development of IgG autoantibodies. J Exp Med. 2000;191:1253-8.
- 137. Ouchida R, Mori H, Hase K, Takatsu H, Kurosaki T, Tokuhisa T, et al. Critical role of the IgM Fc receptor in IgM homeostasis, B-cell survival, and humoral immune responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:E2699-706.
- 138. Gloudemans AK, Lambrecht BN, Smits HH. Potential of immunoglobulin a to prevent allergic asthma. Clin Dev Immunol. 2013;2013:542091.
- 139. Takhar P, Smurthwaite L, Coker HA, Fear DJ, Banfield GK, Carr VA, et al. Allergen drives class switching to IgE in the nasal mucosa in allergic rhinitis. J Immunol. 2005;174:5024-32.
- 140. Griffith JP, Zarrouf FA. A systematic review of chronic fatigue syndrome: don't assume it's depression. Prim Care Companion J Clin Psychiatry. 2008;10:120-8.
- 141. Patarca R. Cytokines and chronic fatigue syndrome. Ann N Y Acad Sci. 2001;933:185-200.
- 142. Maes M, Mihaylova I, Leunis JC. Chronic fatigue syndrome is accompanied by an IgM-related immune response directed against neopitopes formed by oxidative or nitrosative damage to lipids and proteins. Neuro Endocrinol Lett. 2006;27:615-21.

- 143. Maes M, Mihaylova I, De Ruyter M. Lower serum zinc in Chronic Fatigue Syndrome (CFS): relationships to immune dysfunctions and relevance for the oxidative stress status in CFS. J Affect Disord. 2006;90:141-7.
- 144. Hamelmann E, Oshiba A, Schwarze J, Bradley K, Loader J, Larsen GL, et al. Allergen-specific IgE and IL-5 are essential for the development of airway hyperresponsiveness. Am J Respir Cell Mol Biol. 1997;16:674-82.
- 145. Ideura G, Agematsu K, Komatsu Y, Hatayama O, Yasuo M, Tsushima K, et al. Selective IgM deficiency accompanied with IgG4 deficiency, dermal complications and a bronchial polyp. Allergol Int. 2008;57:99-105.
- 146. Matsushita S, Inoue T, Okubo H. A case of selective IgM deficiency: isotype-specific suppressor T lymphocytes. Jpn J Med. 1984;23:149-51.
- 147. Carey JB, Moffatt-Blue CS, Watson LC, Gavin AL, Feeney AJ. Repertoire-based selection into the marginal zone compartment during B cell development. J Exp Med. 2008;205:2043-52.
- 148. Boes M, Esau C, Fischer MB, Schmidt T, Carroll M, Chen J. Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM. J Immunol. 1998;160:4776-87.
- 149. Baker N, Ehrenstein MR. Cutting edge: selection of B lymphocyte subsets is regulated by natural IgM. J Immunol. 2002;169:6686-90.
- 150. Muppidi JR, Arnon TI, Bronevetsky Y, Veerapen N, Tanaka M, Besra GS, et al. Cannabinoid receptor 2 positions and retains marginal zone B cells within the splenic marginal zone. J Exp Med. 2011;208:1941-8.
- 151. Pereira JP, Xu Y, Cyster JG. A role for S1P and S1P1 in immature-B cell egress from mouse bone marrow. PLoS One. 2010;5:e9277.
- 152. Düber S, Hafner M, Krey M, Lienenklaus S, Roy B, Hobeika E, et al. Induction of B-cell development in adult mice reveals the ability of bone marrow to produce B-1a cells. Blood. 2009;114:4960-7.
- 153. Guerrier T, Youinou P, Pers JO, Jamin C. TLR9 drives the development of transitional B cells towards the marginal zone pathway and promotes autoimmunity. J Autoimmun. 2012;39:173-9.
- 154. Payne D, Drinkwater S, Baretto R, Duddridge M, Browning MJ. Expression of chemokine receptors CXCR4, CXCR5 and CCR7 on B and T lymphocytes from patients with primary antibody deficiency. Clin Exp Immunol. 2009;156:254-62.
- 155. Pereira JP, Kelly LM, Cyster JG. Finding the right niche: B-cell migration in the early phases of T-dependent antibody responses. Int Immunol. 2010;22:413-9.
- 156. Lacotte S, Brun S, Muller S, Dumortier H. CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. Ann N Y Acad Sci. 2009;1173:310-7.
- 157. Nie Y, Waite J, Brewer F, Sunshine MJ, Littman DR, Zou YR. The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. J Exp Med. 2004;200:1145-56.
- 158. Werner M, Hobeika E, Jumaa H. Role of PI3K in the generation and survival of B cells. Immunol Rev. 2010;237:55-71.
- 159. Dengler HS, Baracho GV, Omori SA, Bruckner S, Arden KC, Castrillon DH, et al. Distinct functions for the transcription factor Foxo1 at various stages of B cell differentiation. Nat Immunol. 2008;9:1388-98.
- 160. Zaheen A, Boulianne B, Parsa JY, Ramachandran S, Gommerman JL, Martin A. AID constrains germinal center size by rendering B cells susceptible to apoptosis. Blood. 2009;114:547-54.
- 161. Zhang S, Pruitt M, Tran D, Du Bois W, Zhang K, Patel R, et al. B cell-specific deficiencies in mTOR limit humoral immune responses. J Immunol. 2013;191:1692-703.
- 162. Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. Nat Rev Immunol. 2009;9:324-37.

- 163. Limon JJ, Fruman DA. Akt and mTOR in B Cell Activation and Differentiation. Front Immunol. 2012;3:228.
- 164. Mensen A, Ochs C, Stroux A, Wittenbecher F, Szyska M, Imberti L, et al. Utilization of TREC and KREC quantification for the monitoring of early T- and B-cell neogenesis in adult patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. J Transl Med. 2013;11:188.

Eidesstattliche Erklärung

"Ich, Torben Krause, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: 'Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von B- und T-Zellsubpopulationen bei Patienten mit Selektiver IgM-Immundefizienz' 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.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§ 156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst."

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

Ich möchte PD Dr. Il-Kang Na für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit danken. Sowohl in praktischen als auch in fachlichen Fragen wusste ich mich stets bestens unterstützt. Insbesondere die zeitlich und persönlich stets enge Betreuung und den organisatorischen Rahmen weiß ich sehr zu schätzen.

Prof. Dr. Carmen Scheibenbogen möchte ich weiterhin meinen Dank aussprechen. Neben der Vermittlung der zu untersuchenden Patienten über die von ihr geleitete Immundefekt-Ambulanz war vor allem ihr kompetenter Rat in fachlichen Angelegenheiten besonders wertvoll für die Planung und Durchführung meiner Dissertation.

Für die methodische Einarbeitung und Hilfestellungen in allen Phasen meiner Arbeit im Labor und darüber hinaus möchte ich Dr. Angela Mensen danken. Ihre großartige Unterstützung und die sehr gute Zusammenarbeit haben in besonderer Weise zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Auch den weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Na und Scheibenbogen möchte ich für ihre Hilfbereitschaft in praktischen Fragen und das stets freundliche Arbeitsklima danken.

Mein Dank gilt ferner den Mitarbeitern der Immundefekt-Ambulanz um Dr. Leif Harnitsch, die mir klinisch-praktische Einblicke in die Patientenbetreuung ermöglicht und mich organisatorisch unterstützt haben.

Allen beteiligten Patienten und Spendern möchte ich für die Teilnahme an meiner Arbeit danken. Damit haben sie die wichtigste Grundlage für dieses Forschungsanliegen geschaffen.

Meine Familie, meine Freundin und meine Freunde haben mich nicht nur während der Arbeit an meiner Dissertation begleitet. Sie haben mich unterstützt, wann immer es nötig war, und damit alles erst möglich gemacht – ich danke euch.