

**Aus der Kinderklinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. C. P. Speer**

**Lymphozyten-Subtypisierung und mRNA-Nachweis des  
Transkriptionsfaktors PRDI-BF1/Blimp-1 in B- und T-  
Lymphozyten von Patienten mit Common Variable  
Immunodeficiency und gesunden Probanden**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Niklas Thilo  
aus Göttingen**

**Würzburg, Juli 2011**

**Referent: Professor Dr. med. H. W. Kreth**

**Korreferent: Professor Dr. rer. nat. M. B. Lutz**

**Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 25. Mai 2012**

**Der Promovend ist Arzt.**

*Meiner Mutter*

# Inhalt

1. Einleitung.....	1
1.1. Common Variable Immunodeficiency (CVID).....	1
1.1.1. Definition.....	1
1.1.2. Epidemiologie.....	1
1.1.3. Ätiologie, Pathogenese und Genetik.....	2
1.1.4. Klinik.....	3
1.1.5. Diagnose, Differentialdiagnose und Klassifikation.....	4
1.1.6. Therapie.....	7
1.1.7. Prognose.....	8
1.2. Bedeutung von PDRI-BF1 für die terminale Differenzierung von B-Zellen.....	9
1.2.1. Terminale Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen.....	9
1.2.2. Der Transkriptionsfaktor PRDI-BF1 (Blimp-1).....	11
1.2.3. Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	13
2. Material und Methoden.....	14
2.1. Gewinnung der Untersuchungsmaterialien und Untersuchungsgang.....	14
2.1.1. Patienten und gesunde Probanden.....	14
2.1.2. Blutentnahme.....	17
2.2. Durchflusszytometrie.....	19
2.2.1. Materialien.....	19
2.2.2. Panels.....	20
2.2.3. Vorbereitung der Zellen.....	21
2.2.4. Messung und Auswertung.....	22
2.2.5. Statistik.....	23
2.3. Isolierung der mononukleären Zellen aus peripherem Blut mittels Dichtegradienten-Zentrifugation.....	24
2.4. Isolierung von B- und T-Lymphozyten.....	25
2.4.1. Aufreinigung mittels Microbead Associated Cell Sorting (MACS).....	25
2.4.2. Aufreinigung mit Schafererythrozyten.....	25
2.4.3. Aufreinigung mittels Durchflusszytometer (FACSVantage).....	26
2.5. Zelllinien, Zellkultur und Zellstimulation.....	26
2.5.1. Etablierung von B-lymphoblastoiden Zelllinien (B-LCLs).....	26
2.5.2. Jurkat-Zellen.....	26
2.5.3. Kultur.....	27
2.5.4. Stimulation.....	27
2.6. ELISA zur Messung der Immunglobulinsekretion.....	28
2.6.1. Etablieren der Methode.....	28

2.6.2.	Testdurchführung.....	29
2.6.3.	Messung und Auswertung.....	30
2.7.	Molekularbiologische Methoden (RT-PCR).....	30
2.7.1.	RNA-Extraktion.....	30
2.7.2.	Reverse Transkription.....	31
2.7.3.	Nukleinsäureamplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
2.7.4.	Agarose-Gel-Elektrophorese.....	34
3.	Ergebnisse.....	35
3.1.	Immuntypisierung der Lymphozyten-Subpopulationen von COVID-Patienten im Vergleich mit gesunden Probanden.....	35
3.1.1.	Quantitativer Vergleich zwischen den Lymphozyten-Subpopulationen gesunder Probanden und COVID-Patienten.....	35
3.1.2.	Immunphänotypisierung der permanenten Zelllinien.....	43
3.2.	Reinheitskontrolle nach Isolierung von B-Lymphozyten.....	45
3.2.1.	Kontrolle nach Aufreinigung mittels Microbead Associated Cell Sorting (MACS).....	45
3.2.2.	Kontrolle nach Aufreinigung mittels Durchflusszytometer (FACSVantage).....	46
3.3.	In-vitro-Immunglobulinsekretion aus Zellen von gesunden Probanden und COVID-Patienten...46	
3.4.	PRDI-BF1-Expression der B-Lymphozyten von COVID-Patienten und gesunden Probanden sowie der B-LCLs.....	48
3.5.	Expression der mRNA von PRDI-BF1 in primären T-Lymphozyten und T-Zell-Linien.....	51
4.	Diskussion.....	54
4.1.	Unterschiede in den Leukozyten-Subpopulationen zwischen COVID-Patienten und gesunden Probanden.....	54
4.1.1.	Differentialblutbild.....	55
4.1.2.	Immuntypisierung der Lymphozyten-Subpopulationen.....	56
4.2.	Immunglobulin-Sekretion in vitro.....	59
4.3.	PRDI-BF1-mRNA-Expression bei gesunden Probanden und COVID-Patienten.....	61
4.4.	PRDI-BF1 – ein B-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor?.....	63
5.	Zusammenfassung.....	66
6.	Anhang (Literatur, Abkürzungen, Danksagung).....	68

# 1. Einleitung

## 1.1. Common Variable Immunodeficiency (CVID)

### 1.1.1. Definition

Unter Common Variable Immunodeficiency (CVID) versteht man einen häufigen angeborenen Immundefekt überwiegend unbekannter Ursache, der mit Hypogammaglobulinämie und verminderter spezifischer Antikörperantwort einhergeht und sich in der Regel im jungen Erwachsenenalter durch rekurrende bakterielle Infektionen manifestiert (*Cunningham-Rundles 2001*). Es handelt sich bei der CVID in den meisten Fällen um eine Ausschlussdiagnose.

### 1.1.2. Epidemiologie

Unter den primären (angeborenen) Immundefekten wird die CVID als diejenige Diagnose angesehen, die bei symptomatischen Patienten am häufigsten gestellt wird. In einer europäischen internetbasierten Datenbank von Patienten mit primären Immundefekten betrug der Anteil der CVID 31,6 % (*Eades-Perner 2007*). Der selektive IgA-Mangel (Immunoglobulin A Deficiency, IgAD) kommt zwar mit einer Prävalenz von ca. 1 : 500 bei Kaukasiern häufiger vor (*Latiff 2007*), verläuft aber in der Mehrzahl der Fälle asymptomatisch. Die Prävalenz der CVID wird in der kaukasischen Bevölkerung mit 1 : 10 000 bis 1 : 200 000 angegeben (*Cunningham-Rundles 2001, Rosen 1999, Sneller 1993*), in der neueren Literatur vorwiegend mit 1 : 10 000 bis 1 : 50 000 (*Salzer 2006*). Beide Geschlechter sind gleich häufig von der CVID betroffen. Die Erkrankung tritt teilweise familiär gehäuft auf, wobei in betroffenen Familien ebenfalls eine Häufung des selektiven IgA-Mangels gefunden wird (*Vorechovský 2000*).

Das mediane Alter bei Symptombeginn betrug in einer Serie von 248 Patienten für weibliche Betroffene 28 Jahre, für männliche 23 Jahre; das mittlere Alter bei Diagnosestellung lag mit 33 Jahren für weibliche und 29 Jahren für männliche Patienten deutlich höher (*Cunningham-Rundles 1999*).

### 1.1.3. Ätiologie, Pathogenese und Genetik

CVID wird zunehmend als Sammelbegriff für Hypogammaglobulinämien bisher ungeklärter Ätiologie verwendet. In den letzten Jahren ist es gelungen, für einen kleinen Teil der bisher als CVID geführten Krankheitsfälle eine monogene Ursache zu finden, u. a. bei Patienten mit ICOS-Defizienz (Inducible T-Cell Costimulator, Chromosom 2q33, in der Online-Datenbank OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) OMIM-Nr. 604558), mit Mutationen in Genen der TNF-Rezeptor-Superfamilie (z. B. *TNFRSF13B*, codierend für TACI – Transmembrane Activator and CAML Interactor, Chromosom 17p11.2, OMIM-Nr. 604907) oder mit Mutationen im CD19-Gen (Chromosom 16p11.2, OMIM-Nr. 107265) (*Grimbacher 2003, Park 2008*). Einige Autoren gehen daher davon aus, dass das Syndrom der CVID eine heterogene Gruppe einer größeren Zahl verschiedener Gendefekte darstellt (*Rosen 1999*). Die bisher bekannten Gendefekte werden überwiegend autosomal-rezessiv vererbt, der Erbgang der *TNFRSF13B*-Mutationen ist teilweise autosomal-dominant (*Castigli 2005, Salzer 2006*).

Das Muster der bei CVID beschriebenen familiären Häufung in 10-25 % der Fälle bei-derlei Geschlechts über mehrere Generationen legt nahe, dass auch andere, möglicherweise nicht monogene Erbgänge vorkommen (*Vorechovský 1999*). Eine Assoziation mit bestimmten MHC-Haplotypen ist bereits länger bekannt (*Volanakis 1992*). Als möglicher Genlocus für eine Empfänglichkeit gegenüber CVID bzw. IgAD kommt die HLA-DQ/DR-Region auf Chromosom 6 (MHC Klasse II) infrage (*Kralovicova 2003*). Die Autoren der zuletzt genannten Arbeit leiten daraus ein Modell der gemeinsamen autoimmun Pathogenese der IgAD und CVID mit genetisch determinierter Empfänglichkeit ab, bei dem die Interaktion von MHC-Klasse-II-Antigenen (pMHCII) mit dem T-Zell-Rezeptor eine entscheidende Rolle spielt. Diese Hypothese wird durch publizierte Fallberichte von bisher gut 20 Patienten unterstützt, bei denen IgAD in CVID übergegangen ist, teilweise über ein Zwischenstadium mit Kombination aus IgAD und IgG-Subklassendefekten (meist IgG<sub>2</sub>, *Aghamohammadi 2008*).

Einem Teil der Fälle von familiärer Häufung der beiden Phänotypen CVID und IgAD liegt aber auch nachgewiesenermaßen eine *TNFRSF13B*-Mutation zugrunde (*Castigli 2005*).

#### 1.1.4. Klinik

Klinisches Leitsymptom der CVID sind rezidivierende bakterielle Infekte vor allem der oberen und unteren Atemwege (Sinusitis, Bronchitis, Pneumonie) sowie der Ohren (Otitis media) (*Cunningham-Rundles 1999*). Die am häufigsten isolierten Erreger sind Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* sowie *Moraxella catarrhalis* (*Hammarström 2000*). Als Folge der wiederholten Atemwegsinfektionen bilden sich häufig Bronchiektasen. Auch invasive bakterielle Infektionen (Sepsis, Meningitis), durch Enteroviren verursachte chronische Meningoenzephalitiden sowie rezidivierende, teils schwere Zoster-Episoden treten bei CVID gehäuft auf (*Oksenhendler 2008, Park 2008, Rudge 1996*).

Zur groben Differenzierung von physiologischer Infektanfälligkeit einerseits und anderen Formen von Immundefizienzen wie z. B. zellulären oder kombinierten Immundefekten andererseits wurden folgende Warnzeichen definiert, die auf einen Antikörpermangel hindeuten (*Wahn 2006/2007*):

- positive Familienanamnese für Antikörpermangel
- acht oder mehr eitrige Otitiden pro Jahr
- zwei oder mehr schwere Sinusitiden pro Jahr
- zwei oder mehr Pneumonien innerhalb eines Jahres
- zwei oder mehr andere schwere, systemische Infektionen (Meningitis, Sepsis)
- begründete antibiotische Therapie über zwei oder mehr Monate ohne Effekt
- Impfkomplicationen nach Gabe der oralen Polio-Lebendvaccine

Weiterhin findet man bei einigen Patienten Autoimmunphänomene (z. B. Autoimmunthrombozytopenie, autoimmunhämolytische Anämie), granulomatöse Entzündungen (z. B. nicht verkäsende Granulome in Leber, Milz, Lunge oder Knochenmark) und gastrointestinale Komplikationen (z. B. Malabsorption, Giardiasis). Die Erstmanifestation der Erkrankung erfolgt (im Gegensatz z. B zu schweren kombinierten Immundefekten) per definitionem nicht im Alter von unter zwei Jahren. Häufig treten die ersten



Symptome im jungen Erwachsenenalter auf. Die Diagnose wird meist erst mit einer Verzögerung von einigen Jahren gestellt. Einige der Begleiterscheinungen bei CVID wie Autoimmunphänomene und granulomatöse Entzündungen können den rezidivierenden bakteriellen Atemwegsinfektionen zeitlich vorausgehen. Bei CVID-Patienten ist die Inzidenz maligner Neoplasien (insbesondere Non-Hodgkin-Lymphome) im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht (*Cunningham-Rundles 1987*) und auch nicht-maligne lymphoproliferative Erkrankungen kommen gehäuft vor (z. B. persistierende Lymphadenopathie, Splenomegalie). Das gemeinsame Auftreten der CVID mit einem Thymom wird als Good-Syndrom bezeichnet (*Bonilla 2005*).

### **1.1.5. Diagnose, Differentialdiagnose und Klassifikation**

Neben der Klinik sind der wiederholte Nachweis einer Hypogammaglobulinämie (Gesamt-IgG um mehr als zwei Standardabweichungen vermindert), eine gestörte funktionelle spezifische Antikörperantwort (Abwesenheit von Isohämagglutininen und schwache Antikörperbildung nach Tetanus-, Diphtherie- und/oder Pneumokokkenimpfung mit Polysaccharidimpfstoff) sowie der vorherige Ausschluss anderer bekannter, wohldefinierter Immundefekte wegweisende diagnostische Kriterien für die CVID. Der Verdacht auf einen Immunglobulinmangel kann zum Teil schon aus der Serumelektrophorese als Zufallsbefund abgeleitet werden. Die Serumeiweiß-Elektrophorese wird allerdings zur gezielten Abklärung eines Antikörpermangel-Syndroms nicht empfohlen; stattdessen sollten die Immunglobuline IgG, IgA und IgM quantitativ bestimmt werden (*Wahn 2006/2007*). Serum-IgA und -IgE sind bei fast allen, Serum-IgM bei vielen Patienten ebenfalls vermindert. Bei der Mehrzahl der Patienten ist eine normale Anzahl von B- und T-Lymphozyten im peripheren Blut nachweisbar, eine reduzierte B-Zell-Zahl kommt ebenfalls vor. Funktionelle Abnormalitäten im T-Zell-Kompartiment sind häufig zusätzlich nachweisbar (*Cunningham-Rundles 1999*).

Formale diagnostische Kriterien wurden von der Pan-American Group for Immunodeficiency und der European Society for Immunodeficiencies gemeinsam erarbeitet. Danach werden wahrscheinliche und mögliche CVID-Fälle unterschieden (siehe **Tabelle 1**, *Conley 1999*).

CVID wahrscheinlich	CVID möglich
Serum-IgG und -IgA deutlich vermindert (mindestens zwei Standardabweichungen unter dem altersentsprechenden Mittelwert)	einer der Immunglobulin-Hauptisotypen (IgM, IgG, IgA) im Serum deutlich vermindert (mindestens zwei Standardabweichungen unter dem altersentsprechenden Mittelwert)
<b>UND</b> Symptombeginn nach Vollendung des zweiten Lebensjahres	
<b>UND</b> fehlende Isohämagglutinine und/oder schwache Impfantwort	
<b>UND</b> Ausschluss einer Liste definierter anderer Ursachen von Hypogammaglobulinämien aus folgenden Bereichen: medikamenteninduziert, genetisch, Chromosomenanomalien, Infektionskrankheiten, Malignome, systemische Erkrankungen	

**Table 1:** formale Diagnosekriterien für CVID (nach Conley 1999)

Zu den differentialdiagnostisch relevanten Erkrankungen, die je nach klinischer Situation vor Diagnose einer CVID ausgeschlossen werden sollten, gehören z. B. symptomatische Formen von IgG-Subklassendefekten und selektivem IgA-Mangel (IgAD), milde Formen der Agammaglobulinämie Bruton (XLA) und des schweren kombinierten Immundefekts (SCID), die autosomal-rezessive Agammaglobulinämie, das Hyper-IgM-Syndrom, X-chromosomal vererbte Lymphoproliferation (XLP), die Trisomie 21, medikamenteninduzierte Hypogammaglobulinämien (u. a. durch Glukokortikoide, Carbamazepin und Phenytoin), Neoplasien des lymphatischen Systems (z. B. chronische lymphatische Leukämie, multiples Myelom), Erkrankungen mit starkem Proteinverlust (z. B. nephrotisches Syndrom, exsudative Enteropathie) und eine HIV-Infektion (Conley 1999, Hammarström 2000, Kanegane 2000, Park 2008, Shovlin 1994).

Eine weitere wichtige Differentialdiagnose bei kleinen Kindern stellt die transiente Hypogammaglobulinämie des Kindesalters dar, die bis zum Alter von vier Jahren teilweise schwierig von der CVID abzugrenzen ist (Cunningham-Rundles 2010).

Eine erste Klassifikation der Erkrankung wurde 1990 von Bryant und Webster vorgeschlagen, die die Patienten anhand der IgG- und IgM-Synthese in vitro (nach Stimulation mit Anti-IgM und Interleukin-2) in die Gruppen A, B und C einteilten (Bryant 1990). Rump et al. verfeinerten diese Klassifikation insbesondere durch weitere Unterteilung

der Patienten mit nachweisbarer IgG- und IgM-Synthese in vitro in die Gruppen C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> unter Zuhilfenahme weiterer Agenzien zur Stimulation (OKT3, Staphylococcus aureus Stamm Cowan I (SAC), Tetanustoxoid und Pokeweed Mitogen, *Rump 1992*).

Nach immunphänotypischen und klinischen Kriterien wurden kürzlich verschiedene Subgruppen von CVID-Patienten definiert, die sich unter anderem hinsichtlich der Komplikationen der Erkrankung unterscheiden. Das rein immunphänotypische und somit eher deskriptive EUROclass-Schema berücksichtigt folgende Parameter (*Wehr 2008*):

- Anteil der B-Lymphozyten an den gesamten Lymphozyten im peripheren Blut (bei einem Anteil von  $\leq 1\%$  als Hinweis auf Defekte der frühen B-Zell-Differenzierung werden die Subpopulationen der B-Lymphozyten nicht näher analysiert)
- Anteil „geswitchter“ Memory-B-Zellen (IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>) an den gesamten B-Lymphozyten (ein Wert von  $\leq 2\%$  korreliert mit niedrigen IgG- und IgA-Konzentrationen im Serum, granulomatösen Entzündungen und Splenomegalie)
- Anteil der B-Zellen im Übergangsstadium („transitional B cells“, CD38<sup>hi</sup>IgM<sup>hi</sup>; ein Wert von  $\geq 9\%$  ist bei Patienten mit verminderten „geswitchten“ Memory-B-Lymphozyten assoziiert mit Lymphadenopathie) und Anteil der B-Zellen mit niedriger Expression von CD21 und CD38 sowie starker Expression von CD19 auf der Oberfläche an den gesamten B-Lymphozyten (ein Anteil des Phänotyps CD21<sup>low</sup>CD38<sup>low</sup>CD19<sup>hi</sup> von  $\geq 10\%$  ist assoziiert mit Splenomegalie und granulomatösen Entzündungen).

Anhand der Daten des „European Common Variable Immunodeficiency Disorders Registry“ lassen sich fünf klinische Phänotypen unterscheiden, die sich hinsichtlich ihrer Prognose unterscheiden: Patienten mit Autoimmunphänomenen (I), polyklonaler lymphozytärer Infiltration (II), lymphatischen Malignomen (III), Enteropathie (IV) oder ohne eine dieser genannten Komplikationen (V). Die Patienten der zuletzt genannten

Gruppe (nur Infektionen) zeigten in dieser Untersuchung eine deutlich längere Überlebenszeit als diejenigen der übrigen Gruppen mit weiteren erkrankungsassoziierten Komplikationen (vgl. Abschnitt 1.1.7, *Chapel 2008*).

### **1.1.6. Therapie**

Standardtherapie der CVID ist die parenterale Immunglobulin-Substitution. Traditionell erfolgt die Gabe von 300-400 mg polyvalenten Immunglobulinen pro kg Körpergewicht alle drei bis vier Wochen intravenös (IVIG-Therapie, *Park 2008*). In den letzten Jahren wird auch die wöchentliche subkutane Applikation geringerer Dosen von Immunglobulinen häufiger eingesetzt (SCIG-Therapie). Eine Umfrage unter deutschen Behandlungszentren primärer humoraler Immundefekte im Jahre 2002 ergab, dass 86,3 % der substituierten Patienten mit IVIG und 13,7 % mit SCIG behandelt wurden (*Borte 2005*). Patienten, die mit IVIG therapiert werden, erhalten zum Teil eine Prämedikation mit Glukokortikoiden und/oder H<sub>1</sub>-Antihistaminika. Die Immunglobulintherapie wird mit dem Ziel angewendet, die Serum-IgG-Konzentration mindestens über 5 g/l zu halten („Talspiegel“), teilweise werden auch höhere Konzentrationen bis 9 g/l angestrebt (*Wahn 2006/2007*). In einer kontrollierten Studie konnte gezeigt werden, dass eine höher dosierte Immunglobulintherapie (600 mg/kg Körpergewicht alle vier Wochen bei Erwachsenen, 800 mg/kg Körpergewicht bei Kindern) die Zahl und Dauer der Infektionen gegenüber der Standardtherapie reduziert (*Eijkhout 2001*). Dieser Effekt wurde zuvor bereits bei Patienten mit XLA festgestellt (*Liese 1992*).

Die Indikation zur Substitutionstherapie mit Immunglobulinen kann z. B. unter folgenden Voraussetzungen gestellt werden (*Wahn 2006/2007*):

- Serum-IgG < 2 g/l
- Serum-IgG zwischen 2 und 5 g/l, zusätzlich defiziente Antikörperbildung oder chronisch-rezidivierende Infektionen trotz nachweisbarer, aber begrenzter Antikörperbildung
- Serum-IgG > 5 g/l, zusätzlich nachgewiesene Antikörperbildungsstörung und schwere Infektionen

Die am häufigsten beschriebenen unerwünschten Wirkungen der Immunglobulin-Substitutionstherapie sind Kopfschmerzen, Fieber, Schüttelfrost, Müdigkeit, Reaktionen an der Injektionsstelle und gastrointestinale Beschwerden wie Übelkeit, Erbrechen oder Diarrhoe (*Berger 2007, Church 2006*).

Interkurrente sinopulmonale Infektionen erfordern eine prompte antibiotische Therapie, für die insbesondere Fluorchinolone und Amoxicillin in Kombination mit Clavulansäure eingesetzt werden (*Park 2008*). Ein Teil der Patienten wird auch über längere Zeiträume prophylaktisch mit Antibiotika behandelt, in einigen Fällen nur in den Herbst- und Wintermonaten, zum Teil auch ganzjährig (*Borte 2005*). Für die täglich applizierte prophylaktische Antibiotikatherapie werden z. B. Makrolide und Cotrimoxazol verwendet (*Cunningham-Rundles 2010*).

Bei einem Good-Syndrom sollte das Thymom operativ entfernt werden (*Bonilla 2005*).

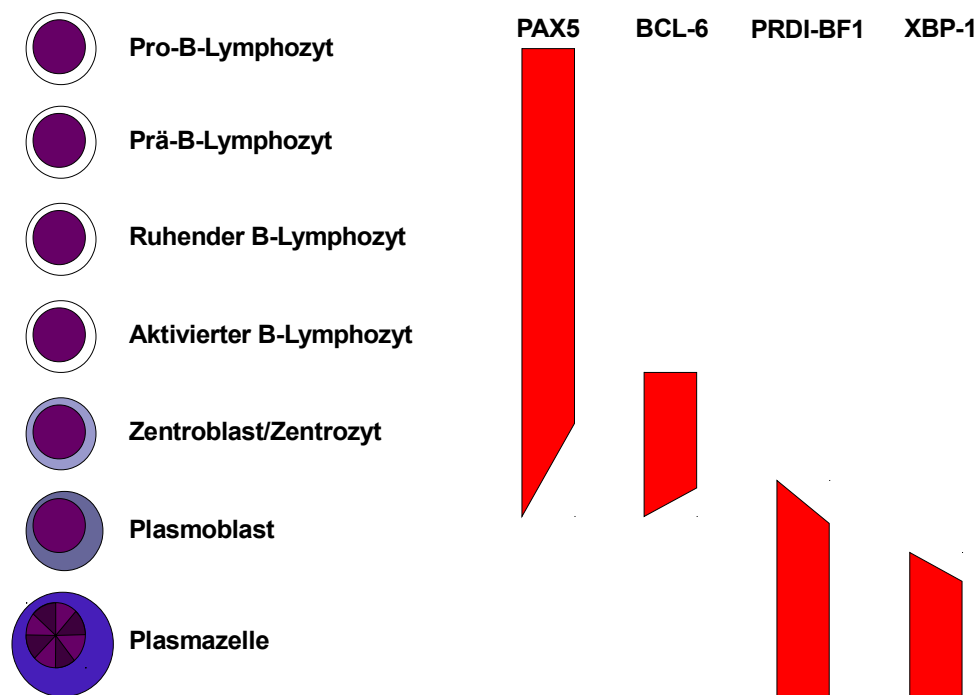
### **1.1.7. Prognose**

CVID-Patienten weisen eine gegenüber der Normalbevölkerung deutlich erhöhte Morbidität und Mortalität auf (*Cunningham-Rundles 1999*). Dies gilt in besonderem Maße für unbehandelte Patienten, das Risiko ist aber auch unter Substitutionstherapie mit Immunglobulinen noch nachweisbar. Patienten mit CVID ohne weitere Komplikationen scheinen deutlich länger zu überleben als solche mit Komplikationen: 30 Jahre nach Diagnosestellung lebten noch ca. 85 % der Patienten ohne Komplikationen, die in einem europäischen CVID-Register erfasst waren, jedoch nur ca. 50 % der Patienten mit Komplikationen wie polyklonaler lymphozytärer Infiltration, Autoimmunität, Enteropathie oder lymphatischen Malignomen (vgl. Abschnitt 1.1.5, *Chapel 2008*). Als seltene, aber prognostisch ungünstige Komplikation, deren Ursache noch nicht genau bekannt ist und die möglicherweise auch therapiebedingt sein könnte, wurde eine progrediente neurodegenerative Erkrankung mit unspezifischer Enzephalitis beschrieben. In einer publizierten Fallserie verstarben 12 von 14 Patienten, im Median 4,3 Jahre nach Beginn der neurologischen Auffälligkeiten (*Ziegner 2002*).

## **1.2. Bedeutung von PRDI-BF1 für die terminale Differenzierung von B-Zellen**

### **1.2.1. Terminale Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen**

Aus der Tatsache, dass bei den meisten COVID-Patienten die Zahl der B-Lymphozyten im peripheren Blut normal oder nur leicht, die Immunglobulinkonzentration im Serum jedoch deutlich vermindert ist, lässt sich die Vermutung ableiten, dass ein Block in der terminalen Differenzierung der B-Lymphozyten zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen vorliegen könnte. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einen für die Differenzierung von B-Lymphozyten wichtigen Transkriptionsfaktor bei COVID-Patienten und gesunden Kontrollpersonen nachzuweisen. In erster Linie kam dafür der für die terminale Differenzierung zu Plasmazellen entscheidende Faktor PRDI-BF1 (Positive Regulatory Domain I Binding Factor 1, Gen auch als *Prdm1* bezeichnet, bei der Maus B-Lymphocyte Induced Maturation Protein, kurz Blimp-1) in Betracht. Einen Überblick über die wichtigsten an der Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen beteiligten Transkriptionsfaktoren gibt **Abbildung 1**.



**Abbildung 1:** für die B-Zell-Differenzierung wichtige Transkriptionsfaktoren (nach Nera 2006, links Differenzierungsstadien von B-Lymphozyten, oben geringer differenziert, unten terminal differenziert, rechts Balken, die die Expression der Transkriptionsfaktoren symbolisieren)

PAX5 (Paired Box Gene 5), ein wichtiger Transkriptionsfaktor der frühen B-Zell-Differenzierung, wird als derjenige Faktor betrachtet, der B-Lymphozyten ihre Identität gibt, indem er für die Expression B-Lymphozyten-spezifischer Oberflächenmarker und einer Reihe weiterer zellspezifischer Moleküle sorgt. PAX5 inhibiert die terminale Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen und wird daher im Laufe dieses Prozesses herunterreguliert (Nera 2006). Während der Keimzentrumsreaktion der B-Lymphozyten wird zusätzlich der Transkriptionsfaktor BCL-6 (B-Cell Lymphoma 6) stark exprimiert und im Verlauf der terminalen Differenzierung wieder herunterreguliert. Im Verlauf der späten Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen kommt zu der Expression von PRDI-BF1 diejenige von XBP-1 (X-box-binding protein-1) hinzu (Calame 2003).

### 1.2.2. Der Transkriptionsfaktor PRDI-BF1 (Blimp-1)

Der humane Transkriptionsfaktor PRDI-BF1 wurde 1991 erstmals von Keller und Maniatis kloniert und beschrieben (Keller 1991). 1994 zeigte Huang, dass PRDI-BF1 homolog zu dem kurz zuvor bei der Maus beschriebenen Blimp-1 ist (Huang 1994). Seitdem wird für PRDI-BF1 beim Menschen ebenfalls teilweise die Bezeichnung Blimp-1 verwendet. Das Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 6 (6q21, OMIM-Nr. 603423) lokalisiert und wird in jüngerer Zeit meist als *Prdm1* (PR Domain-Containing Protein 1) bezeichnet (Martins 2008). Die mRNA der auch als PRDI-BF1 $\alpha$  bezeichneten Haupt-Isoform wird aus sieben Exons zusammengesetzt. PRDI-BF1 ist ein Protein, das aus 789 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von ca. 88 kDa besitzt. Seine Funktion eines Repressors der Transkription wird unter anderem durch fünf Zinkfinger-Domänen vom Krüppel-Typ ausgeübt. PRDI-BF1 wird bei einem Teil der Plasmoblasten sowie in allen Plasmazellen exprimiert, dabei von Plasmoblasten hin zu langlebigen Plasmazellen quantitativ zunehmend. Mit sensitiven Methoden kann PRDI-BF1 auch in einigen B-Lymphozyten des Keimzentrums (Zentrozyten) nachgewiesen werden, die zur Weiterdifferenzierung zu Plasmazellen bestimmt sind (Cattoretti 2006). In B-Gedächtnis-Zellen wird es hingegen im Vergleich zu anderen Transkriptionsfaktoren der späten B-Zell-Differenzierung nur schwach exprimiert (Kuo 2007).

Mit PRDI-BF1 $\beta$  wurde eine zweite, verkürzte Isoform des Proteins mit 691 Aminosäuren beschrieben, die hauptsächlich in Zellen multipler Myelome von Bedeutung zu sein scheint. PRDI-BF1 $\beta$  wird durch alternative Initiation der Transkription gebildet, das codierende Gen ist ebenfalls *Prdm1* (Györy 2003). Der mRNA von PRDI-BF1 $\beta$  fehlen die Exons 2, 3 und 4. Das Exon 1 beider Isoformen besitzt eine unterschiedliche Sequenz.

Bei der Maus bleibt in Abwesenheit von Blimp-1 die Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen in einem frühen Plasmoblasten-Stadium („Prä-Plasmoblasten“) stehen, in großer Menge Immunglobuline bildende Plasmazellen können dann nicht mehr entstehen (Kallies 2007). Wegen der großen strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit von Blimp-1 bei der Maus und PRDI-BF1 beim Menschen lassen sich diese



Ergebnisse vermutlich auf humane B-Lymphozyten übertragen. PRDI-BF1 wird daher als wichtigster Faktor für die Bildung von Plasmazellen aus B-Lymphozyten betrachtet (Kallies 2004).

Die Wirkung von PRDI-BF1 beruht wahrscheinlich unter anderem auf der Repression der Transkription verschiedener in frühen Stadien der B-Lymphozyten exprimierter Gene wie z. B. *c-myc*, *Pax5*, *CIITA* (MHC Class II Transactivator) und *Bcl-6*. Als Korepressoren werden dabei Proteine der Groucho-Familie und Histon-Deacetylasen (HDAC) benötigt (Ren 1999, Yu 2000). Durch die Repression von *Pax5* können dann einige für die Immunglobulinsekretion wichtige Gene wie z. B. das der Immunglobulin-J-Kette aktiviert werden.

Die Expression von *Prdm1* ist wiederum abhängig von der Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren wie z. B. NF- $\kappa$ B, IRF4 und STAT3 sowie vom Wegfall von Repressoren wie PAX5 und BCL-6. Mit PAX5 ergibt sich dadurch eine negative autoregulatorische Rückkopplungsschleife, die auch in vitro nachgewiesen wurde (Mora-López 2007). Signale aus dem Extrazellulärraum, die zur Expression von *Prdm1* führen, sind z. B. die Interleukine 2 und 21 sowie Lipopolysaccharid (letzteres über den Rezeptor TLR4).

Nach der Entdeckung von Blimp-1/PRDI-BF1 war man zunächst der Meinung, dass es sich um einen für B-Lymphozyten spezifischen Transkriptionsfaktor handelt (Turner 1994). In der Folge wurde dann die Bedeutung für Zellen der myeloischen Reihe (Chang 2000) und die frühe Embryonalentwicklung der Maus (Chang 2002) beschrieben. Erst in den letzten Jahren wurde (unter anderem von unserer Arbeitsgruppe) über die Expression und Funktion in T-Lymphozyten bei Mäusen und Menschen berichtet (Kallies 2006, Martins 2006, Santner-Nanan 2006). Zunächst konnte gezeigt werden, dass Blimp-1/PRDI-BF1 eine Rolle in der Spezialisierung von CD4-positiven T-Lymphozyten zukommt (Inhibition der Th1-Differenzierung, Cimmino 2008). Kürzlich wurden auch Expression und Funktion in kurzlebigen CD8-positiven Effektor-T-Zellen nachgewiesen (Kallies 2009). Weiterhin wurde Blimp-1 als wichtiger Faktor für die Entstehung von Talgdrüsen und die Verhornung von Keratinozyten bei Mäusen identifiziert (Horsley 2006, Magnúsdóttir 2007).

Daneben kommt *Prdm1* eine Bedeutung als Tumorsuppressorgen zu. *Prdm1*-Mutationen wurden insbesondere bei malignen Lymphomen (vorwiegend der B-Zell-Reihe) gefunden (*Hangaishi 2010*).

### **1.2.3. Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Ursprüngliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Unterschiede in der mRNA-Expression des für die terminale Differenzierung von B-Lymphozyten wichtigen Transkriptionsfaktors PRDI-BF1 zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Common Variable Immunodeficiency (CVID) festzustellen. Die Pathogenese dieser Erkrankung könnte mit einem PRDI-BF1-Defekt in Verbindung stehen, da bei betroffenen Patienten zwar in der Regel B-Lymphozyten nachweisbar sind, die Endprodukte ihrer Differenzierung zu Plasmazellen (die Immunglobuline) jedoch nicht in ausreichendem Maße produziert werden.

Vorbereitend wurden die Lymphozytensubpopulationen der Probanden und Patienten durchflusszytometrisch untersucht, begleitend auch die Immunglobulin-Synthese der B-Lymphozyten *in vitro*.

T-Lymphozyten sowie Jurkat-Zellen waren in der ursprünglichen Konzeption der Arbeit als Negativkontrollen vorgesehen, da PRDI-BF1 zuvor als spezifisch für B-Lymphozyten betrachtet wurde. Im Verlauf der Arbeit stellte sich aber heraus, dass T-Lymphozyten und Jurkat-Zellen ebenfalls für PDRI-BF1 codierende mRNA exprimieren.

Die Arbeiten für diese Dissertation wurden vom Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der Julius-Maximilians-Universität Würzburg im Rahmen des Teilvorhabens A-13 inhaltlich und finanziell gefördert.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Gewinnung der Untersuchungsmaterialien und Untersuchungsgang**

#### **2.1.1. Patienten und gesunde Probanden**

Für die Untersuchungen wurde folgenden Personen jeweils bis zu 200 ml Venenblut entnommen (bei gesunden Probanden teilweise mehrfach):

- 15 gesunden Probanden als Kontrollpersonen (überwiegend Studierende und Mitarbeiter der Universität Würzburg, Durchschnittsalter 33 Jahre, Altersbereich 22 bis 57 Jahre, 10 Frauen, 5 Männer)
- 4 Patienten mit CVID aus der immunologischen Ambulanz der Universitäts-Kinderklinik (Durchschnittsalter 35 Jahre, Altersbereich 31 bis 38 Jahre, 4 Männer)

#### ***Patient 1***

**Anamnese:** Der zum Zeitpunkt der Blutentnahme für diese Untersuchung 31jährige männliche Arzt und Leistungssportler hatte Varizellen im Kindesalter durchgemacht, eine Tonsillektomie war im Alter von sechs Jahren durchgeführt worden. Mit 29 Jahren trat eine Infektion der oberen und unteren Luftwege mit verzögerter Rekonvaleszenz auf. Aus diesem Anlass erfolgte eine Durchuntersuchung, nachdem bereits einige Jahre zuvor eine gehäufte Infektneigung aufgefallen war.

**Klinische Untersuchungsbefunde:** Ultraschall ohne pathologischen Befund (keine Splenomegalie)

**Laborbefunde bei Diagnosestellung:** Leukozyten 7 400/ $\mu$ l, Lymphozyten 1 550/ $\mu$ l, T-Zellen 82 % (1 271/ $\mu$ l), CD4<sup>+</sup> 47 % (729/ $\mu$ l), CD8<sup>+</sup> 18 % (279/ $\mu$ l), CD4/CD8-Quotient 2,6, B-Zellen 6,6 % (102/ $\mu$ l), Immunglobuline: IgG 1,42 g/l, IgA < 0,2 g/l, IgM 0,18 g/l, IgE 18 IU/ml, IgD < 20 U/ml, IgG-Subklassen: IgG<sub>1</sub> 0,82 g/l, IgG<sub>2</sub> 0,69 g/l, IgG<sub>3</sub> 0,18 g/l, IgG<sub>4</sub> 0,06 g/l, sekretorisches IgA im Speichel < 0,6 mg/dl, Gesamteiweiß 65 g/l, Albumin 55 g/l, bei regelrechtem Impfstatus spezifische AK gegen Tetanustoxo-

id, VZV, Poliovirus Typ I, II und III nachgewiesen, keine spezifischen AK gegen Diphtherietoxoid, HSV-1/2, EBV, CMV, MMR, HBsAg und Parvovirus B19 nachgewiesen, Anti-Human-IgA positiv (Titer 1 : 40), sonst keine Autoantikörper nachgewiesen, Knochenmarkpunktion und Ösophagogastroduodenoskopie ohne pathologischen Befund (kein Hinweis auf Giardiasis)

**Diagnose:** CVID (Diagnosestellung im Alter von 30 Jahren)

**Therapie:** bisher keine IgG-Substitution wegen Anti-IgA-Antikörpern

### **Patient 2**

**Anamnese:** Bei dem zum Zeitpunkt der Blutentnahme für diese Untersuchung 38jährigen Mann waren bereits seit dem frühen Säuglingsalter rezidivierende bakterielle Hautinfektionen aufgetreten. In der Folge kam es häufig zu Fieber unklarer Genese, Bindehautentzündungen, Halsschmerzen und Durchfällen. Eine eitrige Meningitis trat im Alter von drei Jahren auf. Vermehrte Bronchitiden und Sinusitiden, Splenomegalie und Hypogammaglobulinämie waren seit dem Kleinkindalter bekannt.

**Klinische Untersuchungsbefunde:** Haut von alten Narben übersät, Milz derb ca. 10 cm unterhalb des Rippenbogens palpabel, keine Lymphadenopathie

**Laborbefunde:** Thrombozytopenie (30 000 – 120 000/ $\mu$ l), Leukopenie (2 500 – 4 000/ $\mu$ l), Lymphozytopenie (häufig < 1 000/ $\mu$ l), Immunglobuline in substitutionsfreien Zeiten: IgG 2,4 – 3,6 g/l, IgA 0,24 – 0,75 g/l, IgM 0,20 – 0,55 g/l, IgE 7 IU/ml, IgA-Subklassen: IgA<sub>1</sub> stark vermindert, IgA<sub>2</sub> nicht nachweisbar, alle IgG-Subklassen proportional vermindert, T-Zellen 88 %, CD4+ 23 %, CD8+ 56 %, CD4/CD8-Quotient 0,4, B-Zellen 2,7 % (erste Lymphozyten-Subtypisierung im Alter von 22 Jahren), Ig-Synthese in vitro (Jerne-Test) stark vermindert, spezifische AK gegen EBV und Rötelnvirus nachgewiesen, nach Impfung mit Tetanus-Diphtherie-Kombinationsimpfstoff, Typhus-/Paratyphus-A/B-Impfstoff und inaktivierter Poliovakzine keine spezifischen Antikörper nachgewiesen, keine Autoantikörper nachgewiesen

**Diagnose:** CVID (wobei die ausgeprägte und frühe Hautmanifestation eher ungewöhnlich ist; die Lungenbeteiligung ist geringer: HR-CT der Lunge im Alter von 40 Jahren ohne pathologischen Befund)

**Therapie:** IgG-Substitution nur bei erhöhter Infektanfälligkeit, wie z. B. in den Wintermonaten

### **Patient 3**

**Anamnese:** Bei dem zum Zeitpunkt der Blutentnahme für diese Untersuchung 37jährigen Mann war seit dem 23. Lebensjahr regelmäßig eine Pneumonie pro Jahr aufgetreten, dazu häufig Fieber unklarer Genese, Otitis media und Bronchitis (chronischer Husten), hingegen keine vermehrten Durchfälle. Im Alter von 30 Jahren war radiologisch eine beidseitige Hilusvergrößerung aufgefallen, histologisch zeigten sich vernarbende Granulome. Die pathologischen Veränderungen wurden als pulmonale Sarkoidose Stadium II gedeutet, es kam zu einer spontanen Abheilung (retrospektiv handelte es sich wahrscheinlich eher um unspezifische Granulome im Rahmen der CVID). Eine Meningoenzephalitis durch einen unbekanntem Erreger trat im Alter von 37 Jahren auf.

**Klinische Untersuchungsbefunde:** keine Lymphadenopathie, keine Splenomegalie

**Laborbefunde bei Diagnosestellung:** Thrombozyten 275 000/ $\mu$ l, Leukozyten 7 800/ $\mu$ l, Lymphozyten 1 250/ $\mu$ l, CD4<sup>+</sup> 48 % (600/ $\mu$ l), CD8<sup>+</sup> 30 % (375/ $\mu$ l), CD4/CD8-Quotient 1,6, B-Zellen 8 % (100/ $\mu$ l), Immunglobuline: IgG 2,13 g/l, IgA < 0,077 g/l, IgM 0,61 g/l, IgE < 0,05 IU/ml, IgG-Subklassen: IgG<sub>1</sub> 2,05 g/l, IgG<sub>2</sub> 0,34 g/l, IgG<sub>3</sub> 0,09 g/l, IgG<sub>4</sub> < 0,06 g/l, spezifische AK gegen Tetanustoxoid, Poliovirus Typ I und II nachgewiesen, keine spezifischen AK gegen Diphtherietoxoid, EBV, CMV, Poliovirus Typ III, Masern und Röteln nachgewiesen, kein weiterer Anstieg der AK gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid 10 Tage nach Boosterung

**Diagnose:** CVID (Diagnosestellung im Alter von 27 Jahren)

**Therapie:** seit dem Alter von 27 Jahren regelmäßige Substitution mit 30 g IVIG alle 4 Wochen, mit 41 Jahren Umstellung auf subkutane IgG-Substitution (SCIG)

### **Patient 4**

**Anamnese:** Bei dem zum Zeitpunkt der Blutentnahme für diese Untersuchung 35jährigen Mann war seit dem Alter von 9 Jahren ein Diabetes mellitus Typ 1 bekannt. Rezidivierende Infektionen der oberen und unteren Atemwege und eine chronisch-rezidivie-

rende Urtikaria bestanden seit dem Alter von 26 Jahren, Durchfälle waren bislang nicht aufgetreten.

**Laborbefunde:** Thrombozyten 202 000/ $\mu$ l, Leukozyten 8 400/ $\mu$ l, Lymphozyten 2 350/ $\mu$ l, CD4<sup>+</sup> 24 % (564/ $\mu$ l), CD8<sup>+</sup> 41 % (964/ $\mu$ l), CD4/CD8-Quotient 0,6, B-Zellen 20 % (470/ $\mu$ l), Immunglobuline: IgG 1,59 g/l, IgA 0,08 g/l, IgM 0,14 g/l, IgE < 0,05 IU/ml, IgG-Subklassen: IgG<sub>1</sub> 0,8 g/l, IgG<sub>2</sub> 0,3 g/l, IgG<sub>3</sub> 0,16 g/l, IgG<sub>4</sub> < 0,01 g/l, Gesamteiweiß 68 g/l, Albumin 51 g/l, Normalwerte für CH<sub>50</sub>, AP<sub>50</sub> und C1-Esterase-Inhibitor, keine spezifischen AK gegen HSV, VZV, EBV, CMV, HHV-6, MMR, Poliovirus Typ I und III, Candida sowie Streptolysin O nachgewiesen, ANA negativ, Anti-Human-IgA positiv

**Diagnose:** CVID (Diagnosestellung im Alter von 27 Jahren im Rahmen der Urtikaria-Abklärung)

**Therapie:** i.v.-Substitution mit konventionellen Präparaten führte wiederholt zu mittelschweren anaphylaktischen Reaktionen (Hautrötung, Kopfschmerzen, Schwindelgefühl und Atemnot), später problemlose Substitution mit Alphaglobin<sup>®</sup>, einem pasteurisierten Präparat, das nur sehr geringe Spuren von IgA enthält

Die Teilnehmerinnen und Teilnehmer waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme anamnestisch infektfrei und litten nicht an sonstigen interkurrenten Erkrankungen.

Die Teilnahme an der Untersuchung war freiwillig und erfolgte nach vorheriger schriftlicher Aufklärung durch eine Probandeninformation und Unterzeichnung einer Einverständniserklärung. Es erfolgte keine Randomisierung, die Auswahl der gesunden Probanden und Patienten richtete sich vielmehr nach der Verfügbarkeit und der Bereitschaft zur Teilnahme. Die persönlichen Daten der Probanden und Patienten wurden vor der definitiven Auswertung pseudonymisiert.

### **2.1.2. Blutentnahme**

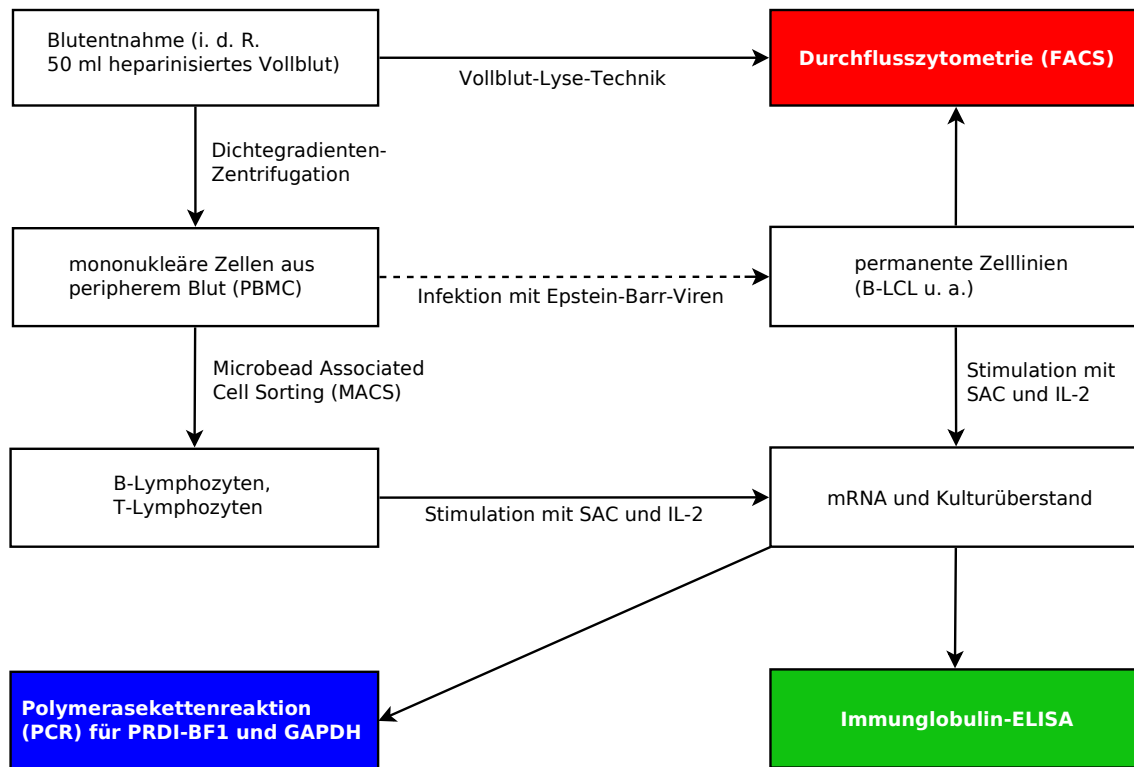
Zunächst wurde in Spritzen mit 50 ml Volumen („Perfusorspritzen“) jeweils 1 000 IE Natrium-Heparin (Liquemin<sup>®</sup>, Fa. Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) unter steri-

len Arbeitsbedingungen (Sterilwerkbank) vorgelegt, die Endkonzentration des Heparins betrug 20 IE/ml. Nach Stauung wurde den gesunden Probanden oder Patienten Venenblut (bis maximal 200 ml, bei Patienten maximal 50 ml) mit einer großlumigen Schmetterlingskanüle entnommen, mit der Heparinlösung vorsichtig durchmischt und anschließend entweder sofort im Labor weiterverarbeitet oder bis maximal 24 Stunden im Kühlschrank zwischengelagert.

Weiterhin wurde allen gesunden Probanden und Patienten 2,7 ml EDTA-Blut in einer Kalium-EDTA-Monovette zur Messung eines großen Blutbildes abgenommen. Allen Patienten sowie einigen gesunden Probanden wurden zusätzlich 7,5 ml Vollblut ohne Antikoagulans zur nephelometrischen Messung der Immunglobuline im Serum entnommen.

Bei einem Patienten (Nummer 2) reichte die Menge des entnommenen Blutes nicht für die Durchführung sämtlicher Experimente aus.

Der auf die Materialgewinnung folgende Untersuchungsgang ist in **Abbildung 2** zusammenfassend dargestellt.



*Abbildung 2: Flussdiagramm der wichtigsten Elemente des Untersuchungsgangs (Schritte farbig markiert, bei denen die wesentlichen Ergebnisse erzielt wurden)*

## 2.2. Durchflusszytometrie

### 2.2.1. Materialien

Bei allen gesunden Probanden und Patienten wurde zur Bestimmung der absoluten Lymphozytenzahl und weiterer Parameter der Leukozytendifferenzierung ein großes Blutbild im klinisch-chemischen Labor der Universitäts-Kinderklinik Würzburg angefordert. Die Analyse wurde auf einem Hämatologiegerät der Firma Bayer (Leverkusen, Deutschland) durchgeführt. Die Bestimmung einzelner Lymphozyten-Subpopulationen erfolgte mit einem FACSCalibur-Gerät (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Folgende Antikörper wurden verwendet:

- mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluoreszeinisothiozyanat) markierte Antikörper der Fa. Dako (Hamburg, Deutschland) gegen folgende Antigene: CD8, CD16, CD19, CD21, CD22, CD25, Oberflächen-IgG, Oberflächen-IgM



- mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE (Phycoerythrin) markierte Antikörper der Fa. Dako (Hamburg, Deutschland) gegen folgende Antigene: CD2, CD3, CD4, CD20, CD23, CD56, Oberflächen-IgD
- mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markierte Antikörper der Fa. BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) gegen folgende Antigene: CD45RA, CD69, HLA-ABC
- mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE markierte Antikörper der Fa. BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) gegen folgende Antigene: CD27, CD45RO, HLA-DR
- mit dem Fluoreszenzfarbstoff APC (Allophycocyanin) markierte Antikörper der Fa. BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) gegen folgende Antigene: CD3, CD19

Technologisch wurde die Durchflusszytometrie mit maximal drei Fluoreszenzfarbstoffen gleichzeitig eingesetzt (s. **Tabelle 2**).

Fluoreszenzfarbstoff	FITC	PE	APC
Emissionsmaximum (nm)	525	576	660
Absorptionsmaximum (nm)	495	565	650

**Tabelle 2:** Fluoreszenzfarbstoffe für die Durchflusszytometrie und deren Emissions- und Absorptionsmaxima im Farbspektrum (nach Baumgarth 2000, Petit 1993 und Telford 2005), FITC=Fluoresceinisothiozyanat, PE=Phycoerythrin, APC=Allophycocyanin

### 2.2.2. Panels

Für die durchflusszytometrische Analyse der Zellen wurden je nach Zielsetzung unterschiedliche Antikörper-Panels verwendet.

- Basisanalyse der Spenderlymphozyten:
  - Röhrchen 1: ohne Antikörper
  - Röhrchen 2: CD8 FITC, CD4 PE, CD3 APC
  - Röhrchen 3: CD16 FITC, CD56 PE
  - Röhrchen 4: HLA-ABC FITC, HLA-DR PE, CD19 APC

- Röhrchen 5: CD69 FITC, CD27 PE, CD19 APC
- Röhrchen 6: CD21 FITC, CD20 PE, CD19 APC
- Röhrchen 7: CD19 FITC, CD3 PE
- Röhrchen 8: CD22 FITC, CD23 PE, CD19 APC
- Analyse der B-Gedächtnis-Zellen:
  - Röhrchen 1: ohne Antikörper
  - Röhrchen 2: Oberflächen-IgM FITC, Oberflächen-IgD PE, CD19 APC
  - Röhrchen 3: Oberflächen-IgM FITC, CD27 PE, CD19 APC
  - Röhrchen 4: Oberflächen-IgG FITC, CD27 PE, CD19 APC
- Erfolgskontrolle der Aufreinigung von B-Lymphozyten:
  - Röhrchen 1: ohne Antikörper
  - Röhrchen 2: CD19 FITC, CD3 PE
  - Röhrchen 3: CD16 FITC, CD56 PE

### **2.2.3. Vorbereitung der Zellen**

Nach den Blutentnahmen bei gesunden Probanden und Patienten wurde jeweils aus einem kleinen Aliquot des entnommenen Heparinblutes (ca. 0,5 ml) mit der Vollblut-Lyse-Technik ein zellulärer Immunstatus erhoben. Dazu wurde jeweils in ein Polystyrol-Röhrchen ein definiertes Volumen der Antikörperlösungen (zwischen 1 und 10 µl, abhängig von der Antikörperspezifität) vorgelegt, mit 75 µl antikoaguliertem Vollblut überschichtet und mit dem Vortex-Reagenzglasschüttler gemischt. Nach der 10minütigen Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss wurde in jedes Röhrchen 1 ml FACS-Lysispuffer (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gegeben, erneut mit dem Vortex-Reagenzglasschüttler gemischt und für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit FACS-Puffer (PBS mit Zusatz von 0,1 % BSA und 0,02 % Natriumazid (NaN<sub>3</sub>)), die

jeweils aus Zugabe von 3 ml FACS-Puffer, Mischen, Zentrifugieren (5 Minuten bei 1700 U/min) und Dekantieren bestanden.

#### **2.2.4. Messung und Auswertung**

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen in einem speziellen FACS-Puffer (siehe Abschnitt 2.2.3.) suspendiert und jeweils ca. 10 000 im Lymphozytengate liegende Zellen pro Ansatz mit dem FACSCalibur-Gerät akquiriert. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mithilfe der Software CellQuest (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

Bei allen Versuchsreihen wurde das Vorwärtsstreulicht des Lasers (Forward Scatter, FSC) als Maß für den Durchmesser der Zellen und das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) als Maß für die Granularität bzw. innere Komplexität der Zellen bestimmt. Diese beiden Parameter wurden in Punktwolken-Diagrammen (so genannten „Dot Plots“) linear gegeneinander aufgetragen. In diesen Punktwolken-Diagrammen wurden Zellen mit geringer Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung mithilfe eines so genannten Gates (in diesem Fall ovale Teilfläche des Diagramms) als Lymphozyten ausgewählt, da Lymphozyten klein (Durchmesser ca. 6-8  $\mu\text{m}$ ) und nicht granulär strukturiert sind. Zudem wurde die Lichtemission von Fluoreszenzfarbstoffen nach Anregung mittels Laserlicht definierter Wellenlängen auf bis zu drei verschiedenen Fluoreszenzkanälen mit wiederum jeweils definiertem Wellenlängenbereich gemessen. Die Auftragung der Fluoreszenzintensität in Punktwolken-Diagrammen oder Histogrammen erfolgte mit logarithmischer Skalierung. Die Punktwolken-Diagramme wurden anhand der Unterscheidung von Zellen mit negativer und positiver Fluoreszenz in den beiden betrachteten Kanälen in vier Quadranten eingeteilt. In den Histogrammen wurde die positive Fluoreszenz durch Setzen eines Markers gekennzeichnet.

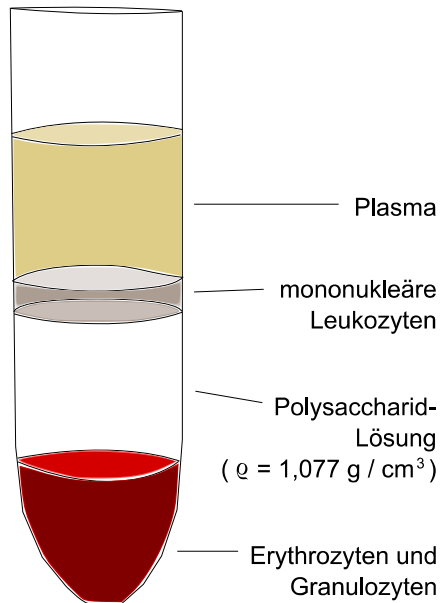
In der Auswertung wurden CD3-positive Zellen im Lymphozytengate als T-Zellen interpretiert (CD3-Histogramm). Diese wurden in einem weiteren CD3-Gate den Subpopulationen (CD4-positive T-Helfer-Zellen und CD8-positive zytotoxische T-Zellen) zugeordnet. CD56- und CD16-positive Zellen im Lymphozytengate wurden als NK-Zellen gewertet, CD19-positive Lymphozyten als B-Zellen.

Innerhalb der B-Lymphozyten wurden CD20, CD22 und HLA-DR als weitere zu erwartende Oberflächenmarker analysiert. CD23, das in einer Subpopulation von B-Lymphozyten exprimiert wird, diente als möglicher Aktivierungsmarker. B-Gedächtnis-Zellen wurden durch ihre Expression von CD27 detektiert. Die B-Gedächtnis-Zellen wurden nach den auf ihrer Oberfläche exprimierten Immunglobulinen weiter unterteilt in „nicht gewitchte“ (Nachweis von CD19, CD27 und IgM) und „gewitchte“ (Nachweis von CD19 und CD27, nicht jedoch IgM) B-Gedächtnis-Zellen. „Gewitchte“ B-Gedächtnis-Zellen haben den Immunglobulin-Klassenwechsel von IgM zu einer anderen Klasse (IgG, IgA oder IgE) bereits durchlaufen (*Warnatz 2002*).

### **2.2.5. Statistik**

Die Ergebnisse der Blutbilduntersuchungen sowie der Durchflusszytometrie wurden einer statistischen Analyse unterzogen. Die Mittelwerte, Standardabweichungen der Stichproben und 95 %-Konfidenzintervalle der einzelnen Zellpopulationen wurden getrennt für die beiden Gruppen (gesunde Probanden und Patienten) errechnet. Die beiden Gruppen wurden mittels eines homoskedastischen t-Tests verglichen; in diesem Zuge wurden die p-Werte zur Einschätzung der statistischen Signifikanz errechnet. Jede Berechnung wurde ein zweites Mal durchgeführt, wobei nur die männlichen gesunden Probanden berücksichtigt wurden. Die Analyse erfolgte mithilfe der Software OpenOffice.org Calc (Fa. Oracle, Redwood Shores, CA, USA).

### 2.3. Isolierung der mononukleären Zellen aus peripherem Blut mittels Dichtegradienten-Zentrifugation



**Abbildung 3:** schematische Darstellung eines Röhrchens nach diskontinuierlicher Dichtegradienten-Zentrifugation zur Gewinnung von PBMC (nach Fuss 2009)

In Polypropylenröhrchen wurden 20 ml Ficoll-Paque (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) vorgelegt und vorsichtig mit 30 ml eines 1 : 2-Gemisches des heparinisierten Venenblutes mit RPMI-1640-Medium (mit L-Glutamin, Fa. Gibco BRL Life Technologies, Paisley, Schottland) überschichtet. Anschließend wurde bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 400 g für 20 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Bremse der Standzentrifuge (Fa. Sorvall, Newton, CT, USA) wurde deaktiviert, um die Auftrennung des diskontinuierlichen Dichtegradienten zu erhalten (siehe auch **Abbildung 3**).

Nach der Zentrifugation wurde der schmale Ring mononukleärer Leukozyten (überwiegend Lymphozyten mit unterschiedlichen Anteilen von Monozyten sowie Thrombozyten) mit einer elektrischen Pipettierhilfe (Fa. Integra, Zizers, Schweiz) vorsichtig von der oberen Oberfläche der Ficoll-Lösung abgezogen und zur weiteren Verarbeitung in RPMI-1640-Medium gegeben. Auf diese Weise isolierte Leukozyten werden im neueren englischsprachigen Schrifttum überwiegend „peripheral blood mononuclear cells“ (PBMC) genannt.

## **2.4. Isolierung von B- und T-Lymphozyten**

### **2.4.1. Aufreinigung mittels Microbead Associated Cell Sorting (MACS)**

Als Standardmethode zur Trennung der B-Lymphozyten von den übrigen mononukleären Zelltypen wurden magnetische Mikropartikel (Microbeads) verwendet. Die Reagenzien wurden von der Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) unter der Bezeichnung „MACS (Microbead Associated Cell Sorting) B Cell Isolation Kit“ hergestellt.

Es handelt sich dabei um eine indirekte Methode, mit der durch Antikörper noch unberührte B-Lymphozyten gewonnen werden können (*Grützkauf 2010*). Mithilfe eines Antikörpergemischs (gegen CD2, CD4, CD11b, CD16, CD36 und IgE) werden die Nicht-B-Zellen unter den mononukleären Zellen markiert. Die Antikörper sind an ein Hapten gekoppelt. Anschließend werden Anti-Hapten Microbeads hinzugegeben. Die Zellsuspension wird dann durch eine Säule an einem starken Magneten vorbeigeführt, der die magnetischen Anti-Hapten Microbeads so stark anzieht, dass diese in der Säule festgehalten werden. Die aufgereinigten B-Zellen befinden sich nach Einbringen der Zellsuspension in die Säule im Durchfluss, die übrigen Zellpopulationen im Eluat.

Zusätzlich wurde die MACS-Methode auch zur Isolierung von T-Lymphozyten genutzt, hier wurde ein Anti-CD3-Antikörper statt des oben beschriebenen Antikörpergemisches benutzt. Die T-Zellen befinden sich bei dieser Variation im Eluat.

### **2.4.2. Aufreinigung mit Schaferythrozyten**

Zu Beginn der Arbeit wurde versucht, B-Lymphozyten mithilfe von Schaferythrozyten (Fa. BAG, Lich, Deutschland), Neuraminidase (Fa. Sigma, St. Louis, MO, USA), diskontinuierlicher Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque sowie NH<sub>4</sub>Cl-Lösung zu gewinnen (T-Zell-Rosettierung durch Bindung an CD2). Diese Methode wurde insbesondere wegen hoher Zellverluste, aber auch wegen geringerer Reinheit der isolierten B-Zellen im Vergleich zu MACS zum Ende der Experimente hin nicht mehr verwendet. Sie wurde anfangs teilweise der Isolierung mittels MACS vorgeschaltet, um T-Zellen im

Vorhinein zu depletieren und dadurch den Verbrauch an MACS-Microbeads zu verringern.

### **2.4.3. Aufreinigung mittels Durchflusszytometer (FACSVantage)**

Um besonders hoch aufgereinigte B-Lymphozyten zu gewinnen, kam zusätzlich teilweise auch eine durchflusszytometrische Trennung mittels eines FACSVantage-Gerätes (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) zur Anwendung.

## **2.5. Zelllinien, Zellkultur und Zellstimulation**

### **2.5.1. Etablierung von B-lymphoblastoiden Zelllinien (B-LCLs)**

Zur Etablierung von immortalisierten B-Zelllinien wurde der EBV-haltige Überstand von B95-8-Zellen benutzt (ATCC Number CRL-1612). Da natürliche Killerzellen und zytotoxische T-Zellen vom CD8<sup>+</sup>-Typ das Auswachsen der B-Zelllinie verhindern können (insbesondere bei EBV-seropositiven Blutspendern), wurden diese Zellen vor der Infektion mit dem lysosomotropen Agens L-Leucin-Methyl-Ester entfernt (*Thiele 1985*).

Dazu wurden die PBMC in serumfreiem RPMI-1640-Medium mehrmals gewaschen und anschließend 45 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 5 mM L-Leucin-Methyl-Ester (Endkonzentration) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von RPMI-1640-Medium unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) gestoppt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Kulturmedium gewaschen. Die Zellen wurden dann mit EBV infiziert und bei einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml weiter bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **2.5.2. Jurkat-Zellen**

Als „Negativkontrolle“ wurden neben T-Lymphozyten der Blutspender und Patienten auch Jurkat-Zellen verwendet (Klon E6-1, akute T-Zell-Leukämie, ATCC Number TIB-152). Bei diesen Zellen handelt es sich um eine permanente humane T-Lymphoblasten-Zelllinie mit Expression von CD3.

### **2.5.3. Kultur**

Die permanenten Zelllinien (B-LCLs, Jurkat-Zellen) wurden in sogenanntem Komplettmedium (CM, RPMI-1640-Medium unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS, Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 100 IU/ml Penicillin (Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 0,1 mg/ml Streptomycin (Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) sowie 1 % HEPES-Puffer) bei 37 °C in 5%-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bebrütet und alle zwei bis vier Tage unter einer Sterilwerkbank passagiert. Die Zellen wurden bei der Passage jeweils auf eine Dichte von  $3 \times 10^5$ /ml eingestellt und in Zellkulturflaschen aus Polystyrol (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) gefüllt. Die mononukleären Zellen der Patienten und gesunden Probanden wurden im gleichen Medium (CM) kultiviert bzw. stimuliert, jedoch zuvor nicht passagiert.

Vor der Passage bzw. dem Einsatz in die Experimente wurde jeweils ein Aliquot der Zellsuspension 1+1+1 mit 3 %iger Essigsäure (Fa. Merck, Darmstadt) und 4%iger Trypanblau-Lösung (Fa. Sigma, St. Louis, MO, USA) gemischt und in der Neubauer-Kammer ausgezählt. Zusätzlich wurden die Zellen morphologisch unter einem Umkehrmikroskop kontrolliert.

Ein Teil der frisch isolierten mononukleären Zellen und derjenigen aus den permanenten Zelllinien vor der Passagierung wurde zur späteren Verwendung in einem aus RPMI-1640 mit Zusatz von 20 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) bestehenden Medium in speziellen Kryo-Röhrchen (Fa. Nunc, Wiesbaden, Deutschland) eingefroren und in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

### **2.5.4. Stimulation**

Die frisch isolierten B-Lymphozyten und die B-LCLs wurden mit einem Gemisch aus Staphylococcus aureus Stamm Cowan I (SAC, Fa. Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) in einer Endverdünnung von 1 : 5 000 und humanem rekombinanten Interleukin-2 (Fa. Sigma, St. Louis, MO, USA) in einer Endkonzentration von 35 U/ml über drei Tage zur Sekretion von Immunglobulinen angeregt. Die Stimulation wurde in Flachboden-Mikrotiterplatten für die Zellkultur aus Polystyrol durchgeführt (48 Vertiefungen, Fa.



Greiner, Frickenhausen, Deutschland), die initiale Einsaat erfolgte in einer Zellkonzentration von  $2 \times 10^6$ /ml.

Nach der Stimulation wurde der Zellkulturüberstand bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren und später für die Messung der Immunglobulinsekretion weiterverwendet. Aus den Zellen wurde die Ribonukleinsäure (RNA) isoliert und bei  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren.

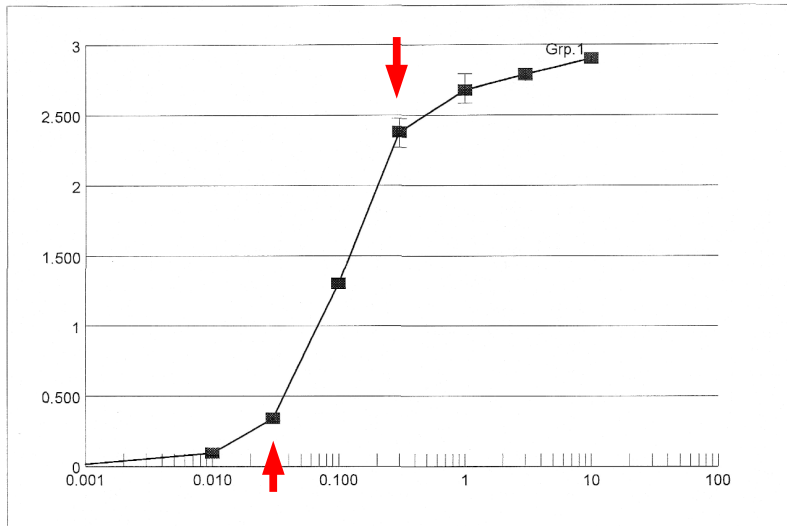
## **2.6. ELISA zur Messung der Immunglobulinsekretion**

### **2.6.1. Etablieren der Methode**

Ein ELISA-Test zur Messung der Immunglobulinsekretion stimulierter und unstimulierter Lymphozyten und Zelllinien wurde eigens für diese Arbeit etabliert. 96-Well-Rundbodenplatten aus Polystyrol wurden über zwei Stunden mit einem Primärantikörper beschichtet (Ziege Anti-Human-Immunglobulin G+A+M 1 : 50 verdünnt in 0,05 M Tris-HCl, Fa. Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Nach Waschen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung unter Zusatz des Detergens Tween (PBS-Tween) wurden die Kavitäten der Mikrotiterplatten zur Vermeidung unspezifischer Bindungen über Nacht mit einer 1%igen Lösung bovines Serumalbumins (BSA) in PBS bei  $+4\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert.

Aus einem Spenderserum wurden Standardlösungen mit folgenden Gesamt-Immunglobulin-Konzentrationen hergestellt (jeweils Konzentration von IgG, IgA und IgM addiert): 0,001 mg/l, 0,01 mg/l, 0,03 mg/l, 0,1 mg/l, 0,3 mg/l, 1 mg/l, 3 mg/l, 10 mg/l und 100 mg/l. Die Verdünnungen der Standards wurden in einem Blocking-Tween-Puffer angesetzt (PBS mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA, Fa. Sigma, St. Louis, MO, USA) und 0,05 Volumen-% Tween 20 (Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)).

Die Standardlösungen wurden in jedem Testlauf als Kalibratoren mitgeführt, um daraus eine Standardkurve erstellen zu können (*Lai 2005*). Als linearer Bereich der Standardkurve wurden Konzentrationen zwischen 0,03 und 0,3 mg/l definiert, Messergebnisse innerhalb dieses Bereichs wurden als valide betrachtet. Die Standardkurve eines ELISA-Laufs ist exemplarisch in **Abbildung 4** gezeigt.



**Abbildung 4:**  
 Standardkurve des  
 Immunglobulin-ELISA,  
 auf der Abszisse die  
 Immunglobulin-  
 Konzentration des  
 jeweiligen Standards in  
 mg/l (0,03 mg/l und 0,3  
 mg/l durch rote Pfeile  
 markiert), auf der  
 Ordinate die  
 fotometrisch  
 gemessene Extinktion

Zur Überprüfung der Methode wurde Serum einiger Probanden parallel mit dem hier beschriebenen ELISA und nephelometrisch im klinisch-chemischen Labor der Universitäts-Kinderklinik Würzburg auf seine Immunglobulinkonzentration hin untersucht.

## 2.6.2. Testdurchführung

Nach Einpipettieren der Standardlösungen (jeweils 50 µl pro Kavität) wurden die zu untersuchenden Lösungen (in der Regel Kulturüberstände) in dreifachem Ansatz hinzugefügt (Volumen ebenfalls jeweils 50 µl verdünnt in Blocking-Tween-Puffer). Um jeweils im linearen Bereich des Tests liegende Resultate zu erzielen, wurden die Proben in der Regel in drei verschiedenen Verdünnungen (z. B. 1 : 5, 1 : 10 und 1 : 25) eingesetzt. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Überstand- bzw. Seruminkubation folgten vier Waschschrte jeweils mit PBS-Tween-Puffer.

Anschließend wurden je Kavität 100 µl 1 : 1 000 verdünnte Lösung eines mit alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-Human-Immunglobulin-Antikörpers (Fa. Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach weiteren sechs Waschschrten (siehe oben) wurden in jede Kavität 100 µl Lösung des chromogenen Substrates para-Nitrophenylphosphat (pNPP, Fa. Sigma, St. Louis,

MO, USA) gefüllt. Die Farbreaktion wurde nach zehn Minuten mit 100 µl 3 N NaOH-Lösung gestoppt.

### **2.6.3. Messung und Auswertung**

Die Messung der Extinktionen erfolgte mithilfe eines Spectra-Fotometers der Fa. Tecan (Männedorf, Schweiz). Während und nach der Substratinkubation wurden die Mikrotiterplatten mehrmals bei einer Wellenlänge von 405 nm fotometriert (nach vier, sieben und neun Minuten sowie nach dem Abstoppen). Zur Auswertung wurde die Software easyWIN kinetics verwendet (ebenfalls Fa. Tecan, Männedorf, Schweiz).

## **2.7. Molekularbiologische Methoden (RT-PCR)**

### **2.7.1. RNA-Extraktion**

Als erster Schritt der RT-PCR wurde aus der jeweiligen Zellsuspension RNA extrahiert. Hierfür wurde das „Absolutely RNA RT-PCR Miniprep Kit“ der Fa. Stratagene (La Jolla, CA, USA) verwendet. Bei dieser Methode werden die Zellen zunächst mithilfe von Guanidin-Thiocyanat und  $\beta$ -Mercaptoethanol lysiert. Durch diesen Schritt werden gleichzeitig die Proteine denaturiert und Ribonukleasen (RNasen) inhibiert. Das Lysat wird dann zur Entfernung von kontaminierenden Partikeln und des Großteils der DNA in einem 2-ml-Reaktionsgefäß aus Kunststoff filtriert. Die verbleibenden Nukleinsäuren binden im nächsten Schritt an eine Säulenmatrix. Die restliche genomische DNA wird mittels RNase-freier DNase I verdaut und mit einem Puffer geringen Salzgehaltes ausgewaschen. Verbleibende DNase I und sonstige Proteine werden wiederum durch Waschen mit einem Puffer entfernt. Zuletzt wird die an die Matrix gebundene RNA mit einem 60 °C warmen Spezialpuffer eluiert.

Die eluierte RNA wurde im Anschluss an die Extraktion mit 3 M Natriumacetat und Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation wurde das Pellet luftgetrocknet und in sterilem, nukleasefreien und deionisierten Wasser gelöst.

Für jede Probe wurde anschließend die RNA-Konzentration sowie die Reinheit anhand der 260-/280-nm-Ratio fotometrisch bestimmt (BioPhotometer, Fa. Eppendorf, Ham-

burg, Deutschland mit für UV-Licht durchlässiger Spezialküvette „UVette“). Pro in die Experimente eingesetztem B-Lymphozyten konnte eine relativ konstante Menge von Gesamt-RNA extrahiert werden; diese betrug bei unstimulierten B-Lymphozyten ca. 1-1,5 pg und bei stimulierten B-Zellen ca. 3-8 pg.

### **2.7.2. Reverse Transkription**

Aus der isolierten RNA wurde sofort oder nach zwischenzeitlicher Lagerung bei -70 °C mithilfe des Enzyms reverse Transkriptase (RT) komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert (First Strand cDNA Synthesis Kit, Fa. MBI Fermentas, Vilnius, Litauen). Es wurde jeweils 1 µg RNA mit nukleasefreiem DEPC-Wasser auf 10 µl Volumen verdünnt, dann 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer (0,5 µg/µl) zugegeben, bei 70 °C im Heizblock für 5 Minuten inkubiert, dann auf Eis abgekühlt. Im nächsten Schritt wurden 4 µl fünffach konzentrierter Reaktionspuffer, 1 µl Ribonukleaseinhibitor mit einer Aktivität von 20 U/µl und 2 µl Desoxyribonukleotid-Mix (dNTPs, je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) einpipettiert und für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurden 2 µl reverse Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) mit einer Aktivität von 20 U/µl zugegeben. Die eigentliche Reaktion dauerte 60 Minuten bei einer Temperatur von 37 °C; gestoppt wurde sie durch 10minütiges Erhitzen auf 70 °C und anschließendes Abkühlen auf Eis.

Die auf diesem Wege synthetisierte cDNA wurde entweder sofort in die PCR-Reaktion eingesetzt oder zur späteren Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren.

### **2.7.3. Nukleinsäureamplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Für die Nukleinsäureamplifikation wurde zunächst ein „Mastermix“ aus PCR-Puffer-Konzentrat, nukleasefreiem Wasser, Desoxyribonukleotiden (dNTPs, je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und Magnesiumchlorid hergestellt. Die Reagenzien des Mastermixes wurden von Fa. MBI Fermentas (Vilnius, Litauen) bezogen. Anschließend wurde der Mastermix in eine der Anzahl der Reaktionen plus Negativkontrollen entsprechende Zahl von Portionen aliquotiert. Jeder Portion wurde nun der spezifische Primer-

mix (Fa. MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) und die Taq-Polymerase (aus der Bakterienspezies *Thermus aquaticus* gewonnene DNA-Polymerase, Fa. MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) zugegeben. In jedes Aliquot wurde dann entweder cDNA oder nukleasefreies Wasser (als Negativkontrolle) einpipetiert. Die Amplifikation wurde im Thermocycler T3 (Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Der PCR-Ansatz enthielt folgende Substanzen in den jeweils genannten Endkonzentrationen bzw. -aktivitäten:

- native Taq-DNA-Polymerase (ohne BSA, 0,02 U/ $\mu$ l)
- Desoxyribonukleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP, je 0,2 mM)
- Primer (vorwärts und rückwärts, je 0,5  $\mu$ M)
- aus 0,05  $\mu$ g Gesamt-RNA gewonnene komplementäre DNA (cDNA) pro 30  $\mu$ l
- Tris-HCl 10 mM (ph 8,8 bei 25 °C)
- KCl (50 mM)
- MgCl<sub>2</sub> (1,67 mM)
- Octylphenolpolyethylenglykoether (Nonidet P40, 0,08 %)
- steriles, nukleasefreies und deionisiertes Wasser (bis zum Endvolumen von 30  $\mu$ l)

Neben der eigentlichen Ziel-mRNA-Sequenz von PRDI-BF1 wurde aus jeder cDNA-Probe auch Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als „Housekeeping“-Gen amplifiziert. Dadurch war gewährleistet, dass die reverse Transkription und die Amplifikation nicht durch technische Fehler oder Inhibitoren gestört wurden. Zudem kann der Vergleich der Amplifikatmengen möglicherweise eine grobe Einschätzung der in der jeweiligen Probe vorhandenen mRNA-Konzentrationen erlauben (*Garcia 2005*).

Bei der Auswahl der spezifischen Primerpaare wurden die Software DNAsis sowie das Internet-Werkzeug „Primer 3“ ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) zu Hilfe genommen. Die Spezifität für alle Zielgene wurde durch eine Online-Su-

che mit dem „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) bestätigt. Folgende Primer wurden verwendet:

### ***Prdm1/PRDI-BF1***

PRDI-BF1 vorwärts: 5'-TTT GGA CCC CTA ATA GGT GAA ATC-3' (Exon 3, Nukleotide 571 bis 594,  $T_m$  52,2 °C, GC-Gehalt 41,7 %)

PRDI-BF1 rückwärts: 5'-TTT CTC AGT GCT CGG TTG CTT TAG-3' (Exon 5, Nukleotide 939 bis 916,  $T_m$  55,7 °C, GC-Gehalt 45,8 %)

Dieses Primerpaar überspannt zwei Introns und amplifiziert ein 369 bp langes PCR-Produkt. Die Isoform PRDI-BF1 $\beta$  wird nicht amplifiziert, da der vorwärts gerichtete Primer in einem Bereich des Exons 3 liegt, der in der mRNA von PRDI-BF1 $\beta$  nicht enthalten ist.

Die Primer-BLAST-Suche ergab keine anderen Zielsequenzen als PDRI-BF1 bei *Homo sapiens*, *Mycoplasmataceae* und *Acholeplasma laidlawii* (letztere als theoretisch mögliche Kontamination der Zellkulturen).

Die PRDI-BF1-PCR wurde in 32 Zyklen folgenden Aufbaus durchgeführt: Denaturierung für 30 s bei 94 °C, Hybridisierung für 30 s bei 58 °C und Elongation für 45 s bei 72 °C.

Zur Bestätigung der Spezifität der PRDI-BF1-PCR wurde das PCR-Produkt einmalig im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg sequenziert. Dabei zeigte sich eine 100%ige Homologie zur publizierten cDNA-Sequenz von humanem PRDI-BF1 (*Keller 1991*).

### ***GAPDH***

GAPDH vorwärts: 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3' (auf der Grenze zwischen Exon 2 und 3, Nukleotide 113 bis 138,  $T_m$  60,1 °C, GC-Gehalt 50,0 %)

GAPDH rückwärts: 5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3' (Exon 9, Nukleotide 1095 bis 1072,  $T_m$  61,5 °C, GC-Gehalt 62,5 %)

Dieses Primerpaar (Sequenzen nach *Stauffer 1993*) überspannt insgesamt sieben Introns und amplifiziert ein 983 bp langes PCR-Produkt. Die ersten 19 Basen des vorwärts orientierten Primers (Sequenz der Plusstrang-DNA) liegen dabei am Ende des Exons 2, die letzten neun Basen am Anfang des Exons 3, sodass das erste überspannte Intron noch im Bereich des vorwärts orientierten Primers liegt, die übrigen sechs überspannten Introns liegen zwischen den Primern.

Die Primer-BLAST-Suche ergab keine anderen Zielsequenzen als humane GAPDH, die mit diesem Primerpaar amplifiziert werden könnten.

Die GAPDH-PCR wurde in 26 Zyklen folgenden Aufbaus durchgeführt: Denaturierung für 30 s bei 94 °C, Hybridisierung für 30 s bei 63 °C und Elongation für 40 s bei 72 °C.

#### **2.7.4. Agarose-Gel-Elektrophorese**

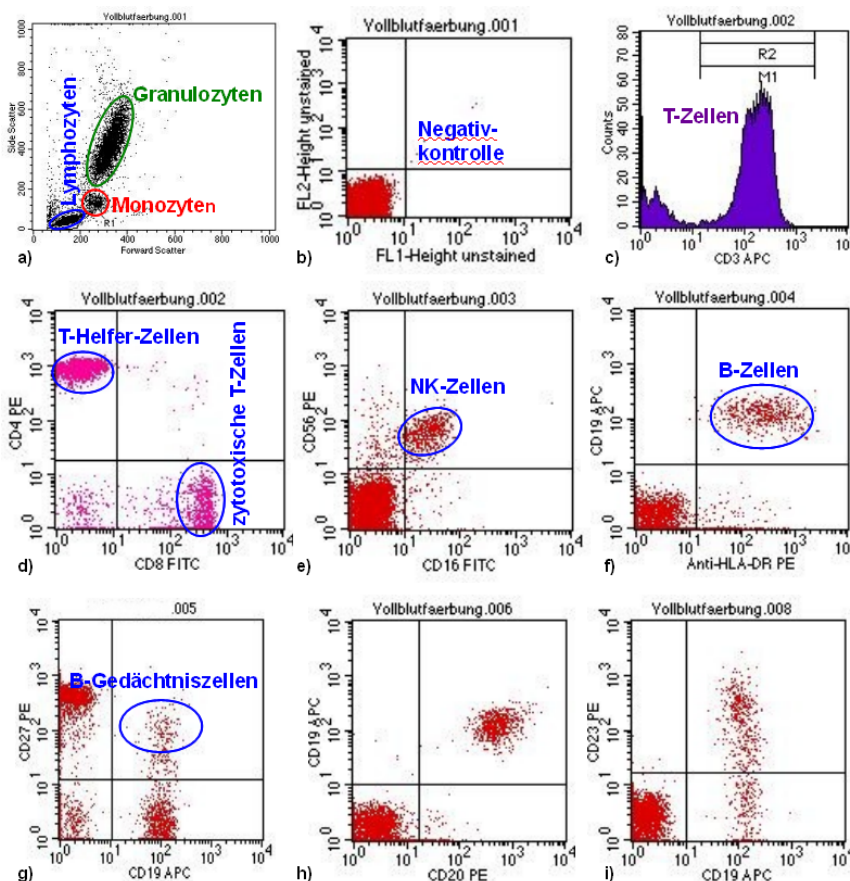
Agarose-Gele wurden aus je 110 ml einer erhitzten, 1,2 %igen Agaroselösung gegossen, der 5,5 µl des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid (Fa. Sigma, St. Louis, MO, USA) zugesetzt wurden. In die Taschen der Gele wurde gefärbter Ladepuffer (5 % Glycerin, 1,4 mM EDTA pH 8,0, 0,025 % Bromphenolblau, 0,025 % Xylen-cyanol) gefüllt, in den als Längenmarker die „GeneRuler 100 bp DNA Ladder“ und die „GeneRuler 1 kb DNA Ladder“ (Fa. MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) sowie jeweils 4 µl der PCR-Produkte gegeben wurden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90 V mit einer Laufzeit von ca. 100 Minuten. Anschließend wurde die DNA mithilfe einer UV-Lampe sichtbar gemacht und das Gel mit einer Sofortbildkamera (Fa. Polaroid, Concord, MA, USA) abgelichtet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Immuntypisierung der Lymphozyten-Subpopulationen von COVID-Patienten im Vergleich mit gesunden Probanden

##### 3.1.1. Quantitativer Vergleich zwischen den Lymphozyten-Subpopulationen gesunder Probanden und COVID-Patienten

Die durchflusszytometrische Immuntypisierung peripherer Leukozyten eines gesunden Probanden ist beispielhaft in **Abbildung 5** gezeigt.



**Abbildung 5:** Beispiel der Immuntypisierung peripherer Lymphozyten eines gesunden Probanden. Röhrchen 1 (Negativkontrolle) ist mit Auswertung nach verschiedenen Kriterien (Vorwärts- und Seitwärtsstreuung (a)) sowie Fluoreszenzkanäle 1 und 2 (b)) dargestellt. Die Region 2 (R2) = Marker 1 (M1) im Histogramm c) markiert die CD3-positiven T-Zellen.



Von 14 weiteren gesunden Probanden und den vier COVID-Patienten liegen vollständige Ergebnisse in gleicher Weise vor (nicht abgebildet), die ebenfalls in die statistische Auswertung einbezogen wurden. Die Ergebnisse der Statistik zeigen die **Tabellen 3, 4** und **5**. In **Tabelle 3** sind die Parameter des großen Blutbilds aufgelistet, in **Tabelle 4** die des T- und NK-Zell-Kompartiments, in **Tabelle 5** schließlich die der B-Lymphozyten.

## Großes Blutbild

Bei den Parametern des großen Blutbildes zeigten sich folgende statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Patienten und den gesunden Probanden: Bei den Patienten lag eine relative Lymphozytopenie ( $p=0,034$ ), eine relative Neutrophilie ( $p=0,044$ ) sowie eine relative ( $p=0,042$ ) und absolute ( $p=0,046$ ) Eosinopenie vor. Bei Weglassen der Frauen in der Kontrollgruppe ergaben sich für die relative Lymphozytopenie ( $p=0,159$ ) und Neutrophilie ( $p=0,125$ ) keine statistische Signifikanz mehr.

Parameter (Einheit)	Probanden (MW $\pm$ SD)	Patienten (MW $\pm$ SD)	Probanden (95 %-Konf.-Intervall)	Patienten (95 %-Konf.-Intervall)	p-Wert (t-Test)
Leukozyten ( $\mu$ l)	5973 $\pm$ 1582	5290 $\pm$ 2341	5222 – 6725	3238 – 7342	0,495
Lymphozyten (% Leuko)	31,6 $\pm$ 5,2	24,5 $\pm$ 6,8	29,2 – 34,1	18,5 – 30,5	<b>0,034</b>
Lymphozyten ( $\mu$ l)	1865 $\pm$ 557	1232 $\pm$ 416	1600 – 2130	867 – 1597	0,051
Monozyten (% Leuko)	5,8 $\pm$ 1,7	6,6 $\pm$ 2,3	5,0 – 6,6	4,5 – 8,6	0,455
Monozyten ( $\mu$ l)	332 $\pm$ 86	334 $\pm$ 145	291 – 373	208 – 461	0,964
Neutrophile (% Leuko)	58,3 $\pm$ 6,4	66,9 $\pm$ 9,8	55,2 – 61,3	58,3 – 75,5	<b>0,044</b>
Neutrophile ( $\mu$ l)	3518 $\pm$ 1142	3617 $\pm$ 1864	2975 – 4061	1983 – 5251	0,893
Eosinophile (% Leuko)	2,0 $\pm$ 1,3	0,6 $\pm$ 0,4	1,4 – 2,6	0,2 – 0,9	<b>0,042</b>
Eosinophile ( $\mu$ l)	121 $\pm$ 87	25 $\pm$ 22	80 – 163	6 – 44	<b>0,046</b>
Basophile (% Leuko)	0,7 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,3	0,6 – 0,8	0,2 – 0,8	0,257
Basophile ( $\mu$ l)	40 $\pm$ 14	24 $\pm$ 11	33 – 46	14 – 34	0,050

**Table 3:** statistische Auswertung der Parameter des großen Blutbildes bei gesunden Probanden ( $n=15$ ) und Patienten ( $n=4$ )

### **T- und NK-Zellen**

Im T- und NK-Zell-Kompartiment waren ebenfalls einige Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Patienten nachweisbar. Es zeigte sich eine Tendenz zu einer geringeren relativen und absoluten Zahl von T-Helfer-Zellen bei den Patienten, dadurch auch zu einer relativ erhöhten Zahl von zytotoxischen T-Lymphozyten und einer Verminderung des CD4/CD8-Quotienten. Nur die relative Expansion der zytotoxischen T-Lymphozyten war dabei mit einem p-Wert von 0,021 (bei allerdings sehr großer Streuung der Patientenergebnisse) statistisch signifikant, in der Auswertung ohne Frauen in der Kontrollgruppe ebenfalls nicht mehr signifikant ( $p=0,129$ ).

Auffällig war die verstärkte Streuung der Ergebnisse bei den T-Zell-Subpopulationen im Vergleich zu anderen Parametern. Zwei der vier Patienten zeigten dabei eine Verteilung der T-Zell-Subpopulationen mit relativ und absolut niedriger Zahl von T-Helfer-Zellen sowie niedrigem CD4/CD8-Quotienten, bei einem weiteren Patienten war diese Verschiebung ebenfalls angedeutet zu beobachten.

Die Absolutzahl der NK-Zellen lag bei den Patienten knapp signifikant niedriger als bei den gesunden Probanden ( $p=0,048$ ), nach Herausnahme der weiblichen gesunden Probanden aus der Auswertung war der Unterschied sogar hoch signifikant ( $p=0,006$ ).

Parameter (Einheit)	Probanden (MW ±SD)	Patienten (MW ±SD)	Probanden (95 %-Konf.-Intervall)	Patienten (95 %-Konf.-Intervall)	p-Wert (t-Test)
T-Zellen (% Lympho)	70,6 ±8,9	78,9 ±10,0	67,0 – 74,2	69,6 – 85,6	0,187
T-Zellen (/µl)	1321 ±470	955 ±331	1097 – 1544	665 – 1244	0,165
T-Helfer-Z. (% Lympho)	41,9 ±7,5	32,7 ±12,9	38,3 – 45,4	22,4 – 43,1	0,079
T-Helfer-Z. (/µl)	802 ±391	396 ±225	617 – 988	199 – 593	0,066
zytotox. T-Z. (% Lympho)	23,4 ±6,4	38,0 ±20,1	20,4 – 26,5	22,0 – 54,1	<b>0,021</b>
zytotox. T-Z. (/µl)	427 ±124	467 ±290	368 – 486	213 – 721	0,673
CD4/CD8-Quotient	1,91 ±0,61	1,21 ±1,06	1,62 – 2,20	0,28 – 2,14	0,100
NK-Zellen (% Lympho)	7,1 ±3,2	5,1 ±2,3	5,6 – 8,6	3,3 – 7,0	0,277
NK-Zellen (/µl)	129 ±59	63 ±37	101 – 157	30 – 95	<b>0,048</b>

**Table 4:** statistische Auswertung der Typisierung von T- und NK-Zellen bei gesunden Probanden (n=15) und Patienten (n=4)

### **B-Zellen**

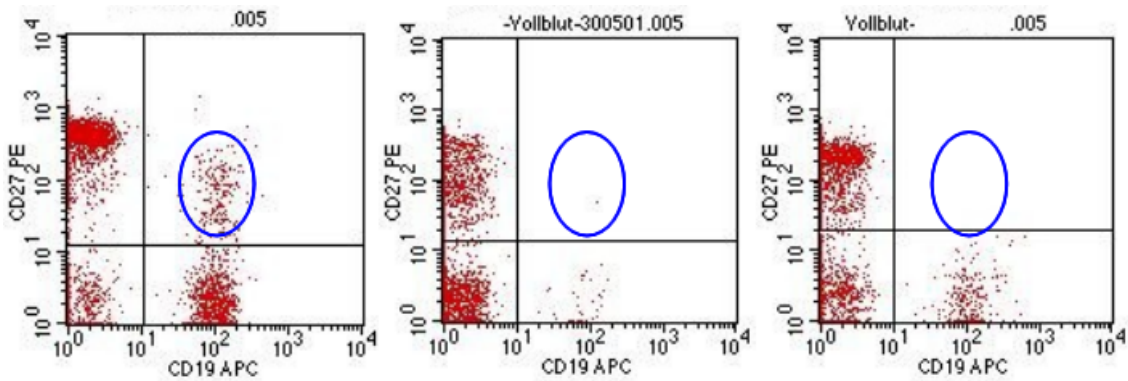
Die Auswertung der Zellen des B-Zell-Kompartimentes ergab insbesondere zwei Auffälligkeiten: Zunächst war der relative Anteil HLA-DR-positiver Zellen an den Lymphozyten in der Patientengruppe signifikant höher als in der Gruppe der gesunden Probanden (p=0,001). Gleichzeitig waren relativer Anteil und Absolutzahl der B-Lymphozyten in der Patientengruppe eher geringer als bei den gesunden Probanden (wenn auch statistisch nicht signifikant). Dies spricht für eine relative Expansion HLA-DR-positiver Nicht-B-Lymphozyten. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Zellen um aktivierte T-Lymphozyten handelt (*Moriya 1987*).

Parameter (Einheit)	Probanden (MW ±SD)	Patienten (MW ±SD)	Probanden (95 %-Konf.-Intervall)	Patienten (95 %-Konf.-Intervall)	p-Wert (t-Test)
B-Zellen (% Lympho)	11,8 ±4,0	8,0 ±6,8	9,9 – 13,7	2,5 – 13,4	0,157
B-Zellen (/µl)	226 ±113	105 ±113	173 – 280	7 – 204	0,074
HLA-DR pos. (% Lympho)	13,9 ±4,5	24,1 ±3,8	11,7 – 16,0	21,1 – 27,2	<b>0,001</b>
HLA-DR pos. (/µl)	248 ±101	294 ±106	200 – 296	201 – 387	0,446
CD23 pos. (% Lympho)	9,6 ±3,1	5,8 ±6,9	8,1 – 11,0	-2,0 – 13,6	0,139
CD23 pos. (/µl)	175 ±79	83 ±109	137 – 212	-40 – 207	0,087
Anteil CD23 pos. an B-Zellen (%)	74,2 ±12,8	84,1 ±9,2	68,1 – 80,2	73,6 – 94,5	0,177
B-Gedächtnis (% Lympho)	3,1 ±1,7	0,9 ±1,2	2,3 – 3,9	0,0 – 1,9	<b>0,033</b>
B-Gedächtnis (/µl)	58 ±45	14 ±18	37 – 79	-2 – 30	0,079
Anteil B-Gedächtnis an B-Zellen (%)	27,3 ±10,4	8,7 ±7,1	22,4 – 32,2	3,1 – 14,4	<b>0,005</b>
Anteil „geswitchte“ B-Gedächtnis an B-Zellen (%)	16,2 ±9,0	1,04 ±0,85	11,9 – 20,5	-0,1 – 2,2	<b>0,007</b>
„geswitchte“ B-Gedächtnis (/µl)	26 ±12	1 ±1	21 – 32	0 – 3	<b>0,002</b>

**Table 5:** statistische Auswertung der Typisierung von B-Zellen bei gesunden Probanden (n=15) und Patienten (n=4)

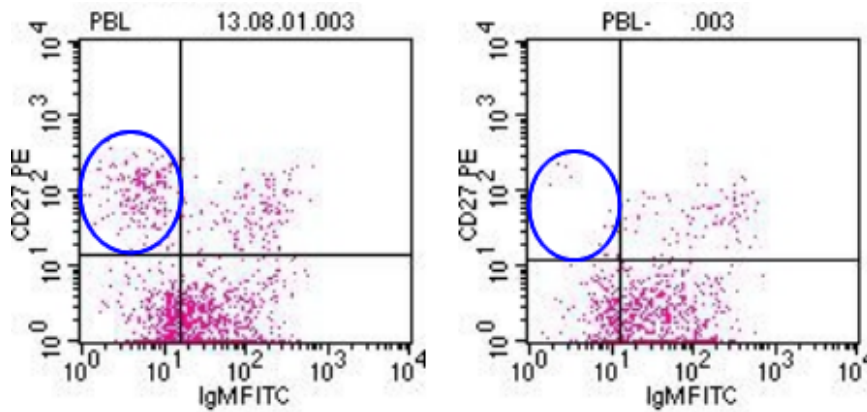
Weiterhin war eine Verminderung von B-Gedächtnis-Zellen (definiert als Zellen im Lymphozytengate, die sowohl für CD19 als auch für CD27 positiv sind) zu verzeichnen. Der Anteil der B-Gedächtnis-Zellen an den gesamten Lymphozyten (p=0,033) wie auch an den B-Zellen (p=0,005) war in der Patientengruppe signifikant geringer als in der Gruppe der gesunden Probanden, die Absolutzahl zeigte bei nicht erreichter statistischer

Signifikanz die gleiche Tendenz. Bei Betrachten der einzelnen Patienten fiel insbesondere auf, dass bei zwei der vier CVID-Patienten nahezu keine Gedächtnis-B-Zellen nachgewiesen werden konnten (siehe **Abbildung 6**).



**Abbildung 6:** B-Gedächtnis-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) bei einem gesunden Probanden (links) und zwei CVID-Patienten (Patient 2 in der Mitte und Patient 3 rechts)

Statistisch hoch signifikant war eine Verminderung „geswitchter“ B-Gedächtnis-Zellen bei den Patienten, und zwar sowohl als prozentualer Anteil an den B-Lymphozyten (p=0,007) als auch als Anzahl pro µl (p=0,002). „Geswitchte“ B-Gedächtnis-Zellen haben den Immunglobulin-Klassenwechsel (zu IgG, IgA oder IgE) bereits durchlaufen und exprimieren daher auf ihrer Oberfläche zwar CD19 und CD27, aber kein IgM mehr (siehe **Abbildung 7**).



*Abbildung 7: Mangel "geswitchter" B-Gedächtnis-Zellen bei einem CVID-Patienten (Patient 1, rechts) im Vergleich mit einem gesunden Probanden (links). Nach dem Immunglobulin-Klassenwechsel ist auf der Oberfläche dieser Zellen kein IgM mehr nachweisbar. Dieser Analyse ist ein CD19-Gate vorgeschaltet (nicht grafisch dargestellt).*

Außerdem war die Tendenz zu beobachten, dass die CVID-Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden weniger im peripheren Blut zirkulierende B-Lymphozyten aufwiesen, diese jedoch zu einem höheren Anteil CD23 exprimierten (beide Ergebnisse statistisch nicht signifikant).

Die Untersuchungsergebnisse der einzelnen Patienten zeigt **Tabelle 6**.

Parameter	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Alter	31 Jahre	38 Jahre	37 Jahre	35 Jahre
Geschlecht	♂	♂	♂	♂
Diagnose	CVID	CVID	CVID	CVID
Leukozyten (/μl)	7450	3620	<b>2940</b>	7150
Lymphozyten (% der Leukozyten)	20,2	34,7	21,6	21,4
Lymphozyten (/μl)	1505	1256	<b>635</b>	1530
T-Lymphozyten (/μl)	1187	1138	<b>470</b>	1023
T-Helferzellen (/μl)	730	<b>295</b>	<b>241</b>	<b>319</b>
zytotoxische T-Zellen (/μl)	271	822	194	583
CD4/CD8-Quotient	2,7	<b>0,4</b>	1,3	<b>0,6</b>
NK-Zellen (/μl)	101	<b>23</b>	<b>41</b>	86
B-Zellen (% der Lymphozyten)	<b>6,5</b>	<b>1,1</b>	<b>6,9</b>	17,4
B-Zellen (/μl)	98	<b>13</b>	<b>44</b>	266
Anteil B-Gedächtnis-Z. an B-Zellen (%)	16,6	<b>3,9</b>	<b>1,7</b>	12,7
Anteil „geswitchter“ B-Gedächtnis-Zellen an B-Zellen (%)	<b>2,0</b>	<b>0,04</b>	<b>1,4</b>	<b>0,7</b>
„geswitchte“ B-Gedächtnis-Zellen (/μl)	<b>2</b>	<b>&lt; 1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
Anteil CD21 <sup>low</sup> CD19 <sup>hi</sup> an B-Zellen (%)	0	0	9,2	0
IgG (g/l)	<b>&lt;1,41</b>	<b>2,85</b>	<b>6,11</b>	<b>&lt;1,41</b>
IgA (g/l)	<b>&lt;0,225</b>	<b>0,24</b>	<b>&lt;0,225</b>	<b>&lt;0,225</b>
IgM (g/l)	<b>0,22</b>	<b>0,37</b>	<b>0,31</b>	<b>&lt;0,183</b>
Ig-Synthese in vitro?	ja	n. u.	ja	ja
PRDI-BF1-mRNA nachweisbar?	ja	ja	ja	ja (schwach)

**Table 6:** Untersuchungsergebnisse der vier CVID-Patienten (pathologische Ergebnisse fett und kursiv; Referenzwerte u. a. nach Jentsch-Ullrich 2005, Morbach 2010, Thomas 2008 und Wehr 2008; n. u. = nicht untersucht; bei Patient 3 Blutentnahme unter laufender IVIG-Therapie)

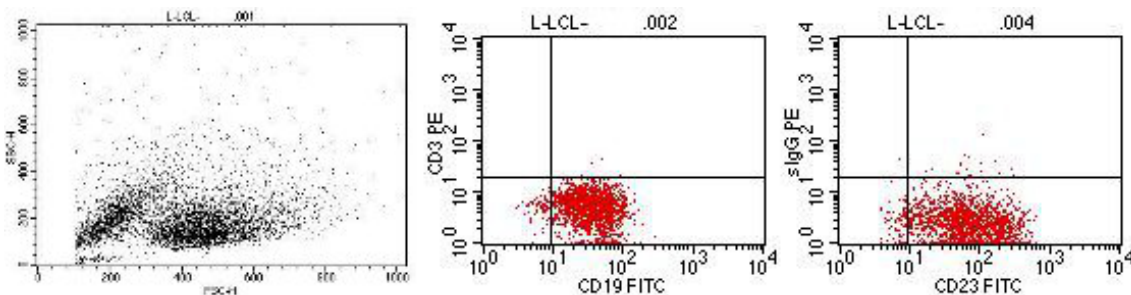
### 3.1.2. Immunphäotypisierung der permanenten Zelllinien

Die in den Experimenten verwendeten permanenten Zelllinien wurden ebenfalls einer durchflusszytometrischen Immunphäotypisierung unterzogen, um die jeweilige Linienzugehörigkeit und Reinheit zu bestätigen.



### **B-lymphoblastoide Zelllinien (B-LCLs)**

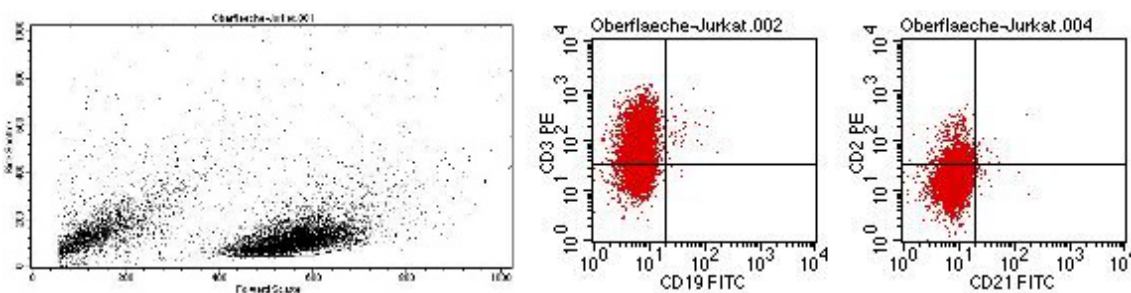
Die Phänotypisierung der B-lymphoblastoiden Zelllinien (B-LCLs) zeigte – wie bei einer transformierten Zelllinie zu erwarten – eine leicht erhöhte Vorwärtslichtstreuung als Ausdruck eines größeren Zelldurchmessers im Vergleich zu untransformierten Lymphozyten. Die Seitwärtslichtstreuung als Maß der Granularität bzw. inneren Komplexität der Zellen war ähnlich wie bei Lymphozyten, die aus peripherem Blut isoliert wurden. Nachweisbare Oberflächenmarker waren CD19, CD20, CD23, HLA-ABC und HLA-DR. Oberflächen-IgG und -IgM, CD3 sowie CD25 waren nicht nachweisbar (siehe **Abbildung 8**).



**Abbildung 8:** durchflusszytometrische Phänotypisierung einer B-LCL (links Vorwärts- und Seitwärtsstreuung, in der Mitte exemplarisch Zugehörigkeit zur B-Zell-Reihe mit Expression von CD19 und Fehlen von CD3, rechts exemplarisch Expression von CD23)

### **Jurkat-Zellen**

Die Analyse der Jurkat-Zellen ergab folgenden Immunphänotyp: Die Vorwärtslichtstreuung war im Vergleich zu Lymphozyten erwartungsgemäß deutlich erhöht, die Seitwärtslichtstreuung etwa gleich. Auf der Oberfläche zeigte sich eine im Vergleich zu aus peripherem Blut isolierten humanen T-Lymphozyten etwas verminderte Expression von CD3 und deutlich verminderte Expression von CD2. Folgende Marker waren auf der Zelloberfläche nicht nachweisbar: CD16, CD19, CD21, CD56 (siehe **Abbildung 9**).

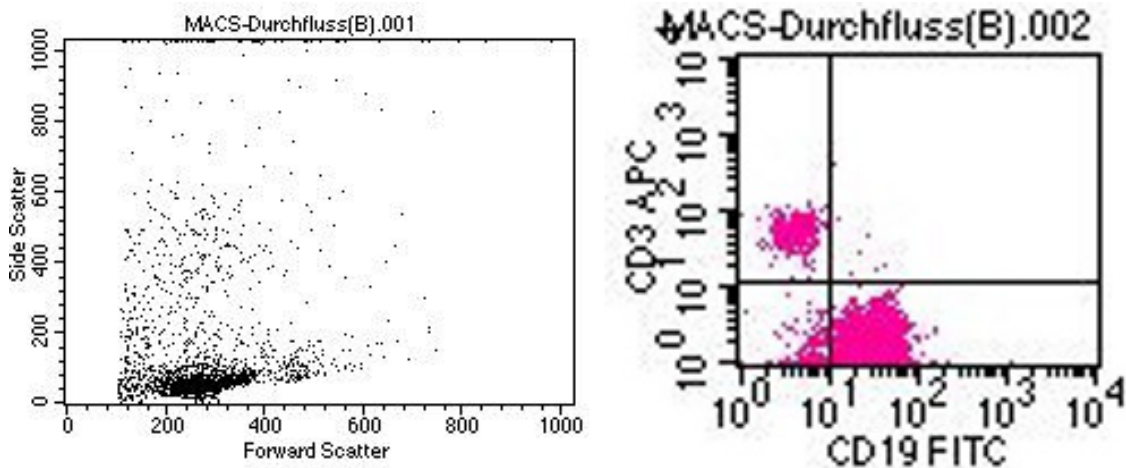


**Abbildung 9:** durchflusszytometrische Phänotypisierung der Jurkat-Zellen (links Vorwärts- und Seitwärtsstreuung, in der Mitte exemplarisch Zugehörigkeit zur T-Zell-Reihe mit Expression von CD3 und Fehlen von CD19, rechts exemplarisch verminderte Expression von CD2 und Fehlen von CD21)

## 3.2. Reinheitskontrolle nach Isolierung von B-Lymphozyten

### 3.2.1. Kontrolle nach Aufreinigung mittels Microbead Associated Cell Sorting (MACS)

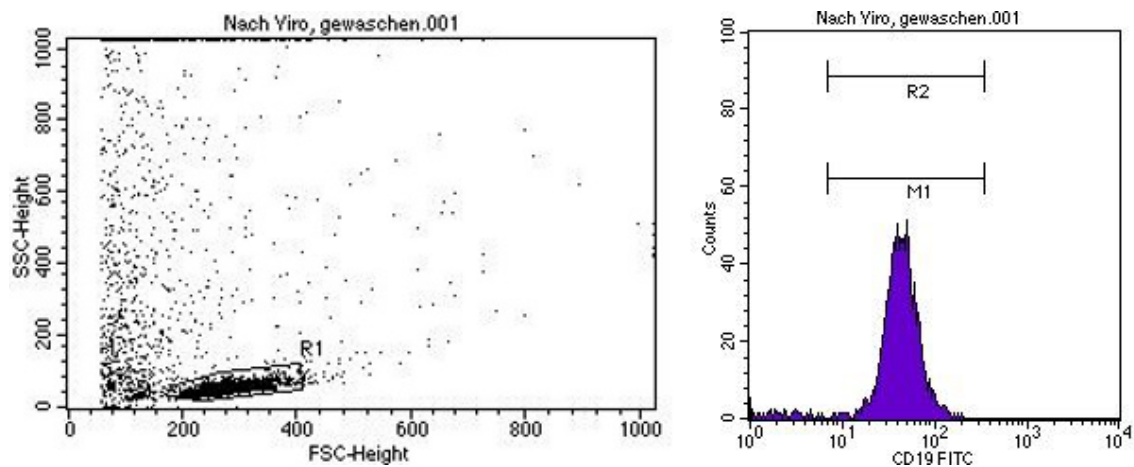
Durch die magnetische B-Zell-Isolierung wurden in den meisten Fällen B-Lymphozyten mit einem Reinheitsgrad von über 90 % gewonnen. Die durchflusszytometrische Untersuchung (FACSCalibur-Gerät) einer entsprechenden Zellsuspension ist beispielhaft in **Abbildung 10** gezeigt.



**Abbildung 10:** durchflusszytometrische Reinheitskontrolle der B-Lymphozyten nach Isolierung mittels MACS

### 3.2.2. Kontrolle nach Aufreinigung mittels Durchflusszytometer (FACSVantage)

In Einzelfällen wurde auch die weit aufwendigere durchflusszytometrische B-Zell-Isolierung im Institut für Virologie der Universität Würzburg am dortigen Zellsortiergerät FACSVantage durchgeführt. Dadurch wurde ein Reinheitsgrad der B-Lymphozyten von über 95 % erzielt (bei der in **Abbildung 11** exemplarisch gezeigten Sortierung 98,7 %).



*Abbildung 11: durchflusszytometrische Reinheitskontrolle der B-Lymphozyten nach Isolierung mittels FACSVantage*

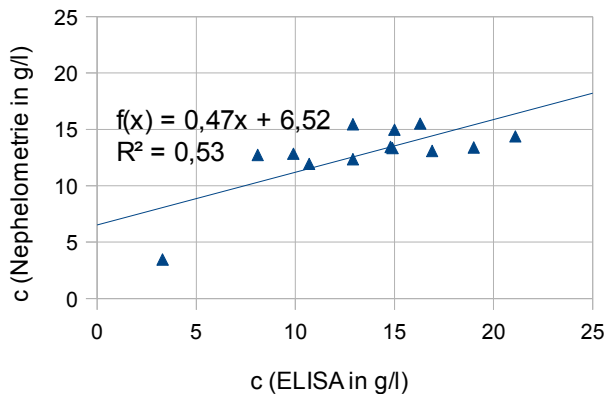
### 3.3. In-vitro-Immunglobulinsekretion aus Zellen von gesunden Probanden und COVID-Patienten

Zunächst wurde die Methode durch Vergleich mit nephelometrischen Immunglobulin-Messungen im klinisch-chemischen Labor der Universitäts-Kinderklinik Würzburg extern validiert. Für diesen Methodenvergleich wurden Serumproben von elf Probanden und einem Patienten verwendet.

Bei der Auswertung zeigte sich eine mäßige Korrelation der Ergebnisse mit einem Korrelationskoeffizienten  $R$  von 0,73 und einem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von 0,53 (siehe **Abbildung 12**). Die Ergebnisse dreier weiterer Patienten, die aus methodischen Gründen (Immunglobulin-Konzentrationen nephelometrisch unter der Nachweisgrenze) nicht in den Methodenvergleich einbezogen werden konnten, zeigten aber, dass der ELISA zuverlässig zwischen gesunden Probanden mit normaler Immunglobulin-Konzentration im Serum und COVID-Patienten mit Immunglobulinmangel unterscheiden konnte.

## Immunglobulin-Messung

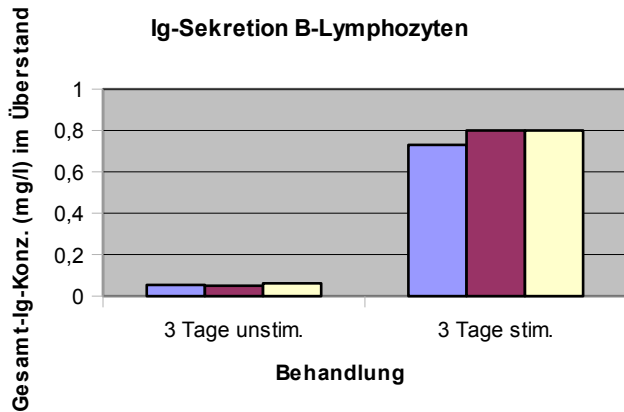
Korrelation zwischen ELISA und Nephelometrie



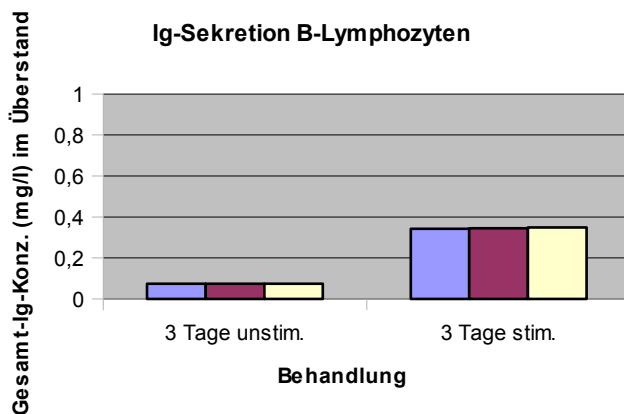
**Abbildung 12:**  
Methodenvergleich zur externen Validierung des Immunglobulin-ELISA (Referenzmethode: Nephelometrie)

Bei der anschließenden Messung der Immunglobulin-Konzentration in den Kulturüberständen stimulierter und nicht stimulierter B-Lymphozyten waren bei allen gesunden Probanden und Patienten Immunglobuline nachweisbar (bei Patient 2 wegen eines technischen Fehlers nicht untersucht). Bei einem Teil der untersuchten Proben (von COVID-Patient 1, COVID-Patient 3 und einer gesunden Probandin) zeigte sich allerdings nicht der erwartete Immunglobulin-Anstieg durch die Stimulation. Aufgrund dieser sehr heterogenen Ergebnisse war ein statistischer Vergleich zwischen gesunden Probanden und Patienten oder eine sonstige quantitative Auswertung nicht sinnvoll.

Die Messergebnisse einer gesunden Probandin und eines CVID-Patienten sind exemplarisch in **Abbildung 13** gezeigt.



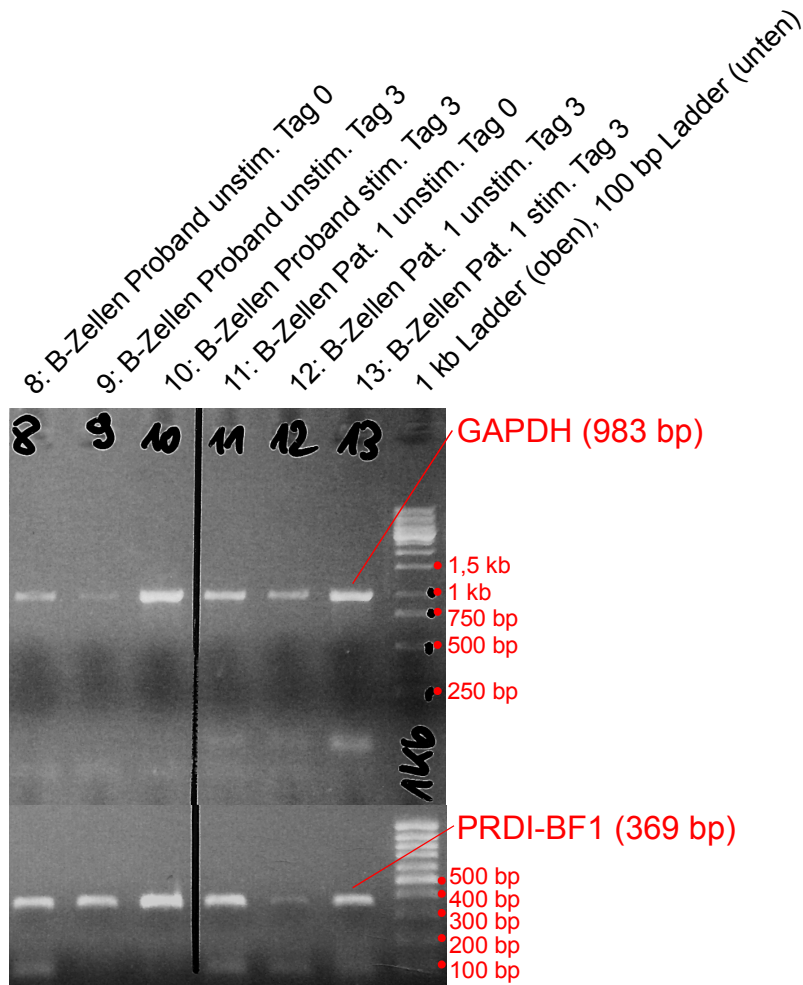
**Abbildung 13:** Immunglobulin-Sekretion der B-Lymphozyten einer gesunden Probandin (oben, dreifacher Ansatz, links unstimuliert, rechts mit SAC und Interleukin-2 stimuliert) und eines CVID-Patienten (Patient 4, unten, gleiche Ansätze wie bei o. g. Probandin) *in vitro*



### 3.4. PRDI-BF1-Expression der B-Lymphozyten von CVID-Patienten und gesunden Probanden sowie der B-LCLs

Mittels RT-PCR ließ sich in den stimulierten B-Lymphozyten aller untersuchten gesunden Probanden und Patienten mRNA von PRDI-BF1 nachweisen. In den immortalisierten B-Zelllinien (B-LCLs) konnte nach Stimulation mit SAC und Interleukin-2 ebenfalls PRDI-BF1-mRNA nachgewiesen werden.

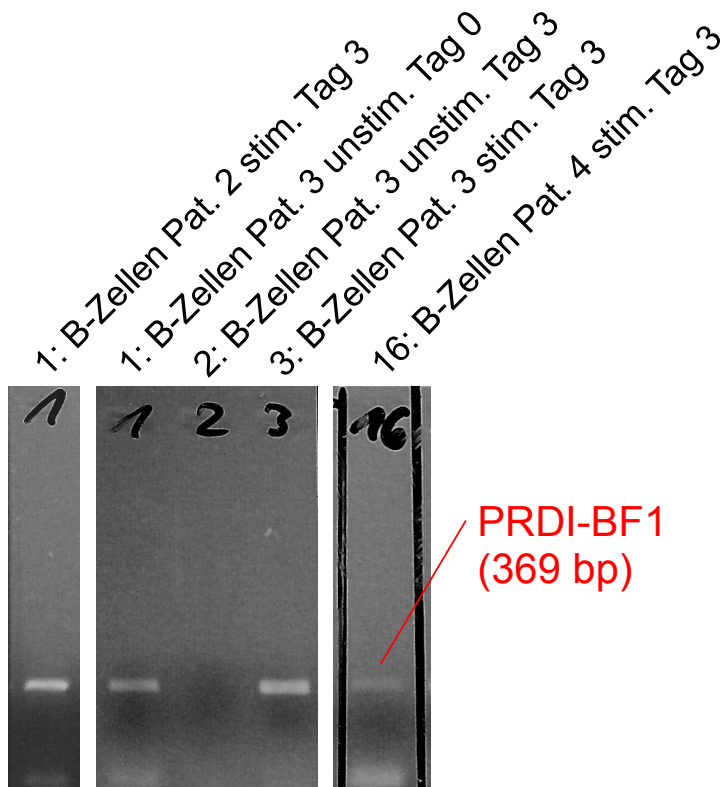
**Abbildung 14** zeigt zunächst beispielhaft den mRNA-Nachweis des „Housekeeping-Gens“ GAPDH und von PRDI-BF1 in B-Lymphozyten eines gesunden Probanden und eines COVID-Patienten (Patient 1) mit und ohne Stimulation über drei Tage (SAC+Interleukin-2). In stimulierten B-Zellen erschien das PCR-Signal sowohl für PRDI-BF1 wie auch für GAPDH in variablem Ausmaß stärker, obwohl jeweils eine identische Menge



**Abbildung 14:**  
 Nachweis von  
 GAPDH-mRNA  
 (oben) und PRDI-  
 BF1-mRNA (unten)  
 in B-Lymphozyten  
 mit und ohne  
 Stimulation:  
 links gesunder  
 Proband (Spuren 8-  
 10);  
 rechts COVID-Patient  
 (Patient 1, Spuren  
 11-13)

RNA (1 µg) in die reverse Transkription eingesetzt wurde. Dieser Effekt wurde bei gesunden Probanden und Patienten beobachtet, führte zu insgesamt sehr heterogenen Bandenstärken bei GAPDH und machte eine quantitative Auswertung für die PRDI-BF1-Banden unmöglich.

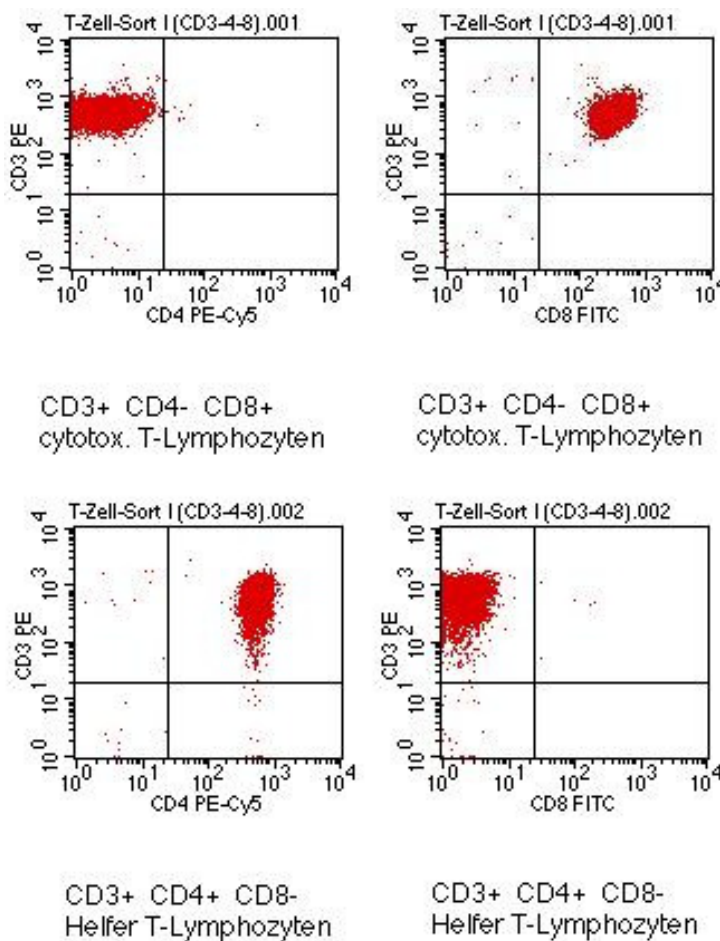
Bei allen weiteren gesunden Probanden und Patienten zeigten sich mit Ausnahme von Patient 4 ähnliche Ergebnisse. Bei Patient 4 konnte lediglich ein schwaches PCR-Signal detektiert werden, und dieses auch nur in einem von drei Analysenläufen. Die Ergebnisse des PRDI-BF1-mRNA-Nachweises mittels RT-PCR der Patienten 2 bis 4 sind in **Abbildung 15** gezeigt.



*Abbildung 15: Nachweis von PRDI-BF1-mRNA in B-Lymphozyten der COVID-Patienten 2, 3 und 4 (von links)*

### 3.5. Expression der mRNA von PRDI-BF1 in primären T-Lymphozyten und T-Zell-Linien

Der überraschende Befund, dass mRNA von PRDI-BF1 auch in T-Lymphozyten exprimiert wird, konnte durch Experimente aus durchflusszytometrisch hoch aufgereinigten humanen peripheren T-Lymphozyten sowie Jurkat-Zellen aus der Zellkultur bestätigt werden. Die in diesen Versuchen eingesetzten mononukleären Zellen exprimierten im Lymphozytengate in allen Fällen zu über 99 % CD3 (siehe **Abbildung 16**), waren also hoch angereicherte T-Lymphozyten.



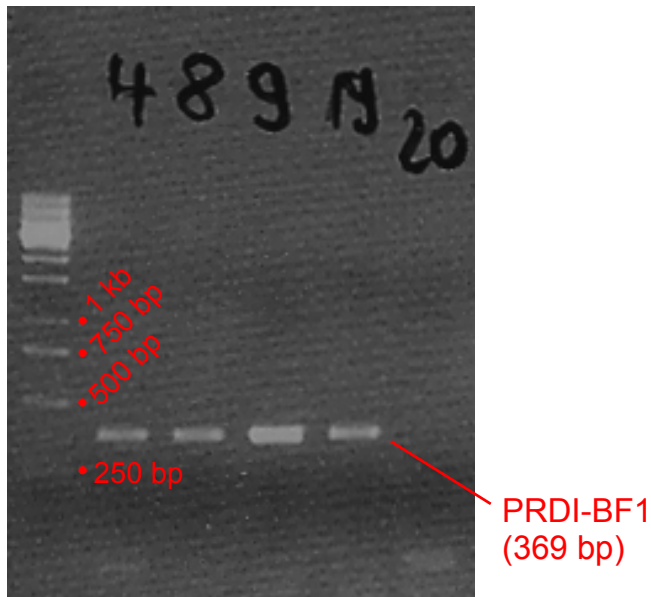
**Abbildung 16:** Reinheit der zytotoxischen T-Lymphozyten (oben) und T-Helfer-Zellen (unten) für die PRDI-BF1-PCR

Der Nachweis von PRDI-BF1-mRNA in Zellen T-lymphozytären Ursprungs ist in den **Abbildungen 17** und **18** gezeigt. Aus methodischen Gründen war ein echt quantitativer Vergleich der mRNA-Expression der in diesen Experimenten eingesetzten Lymphozyten

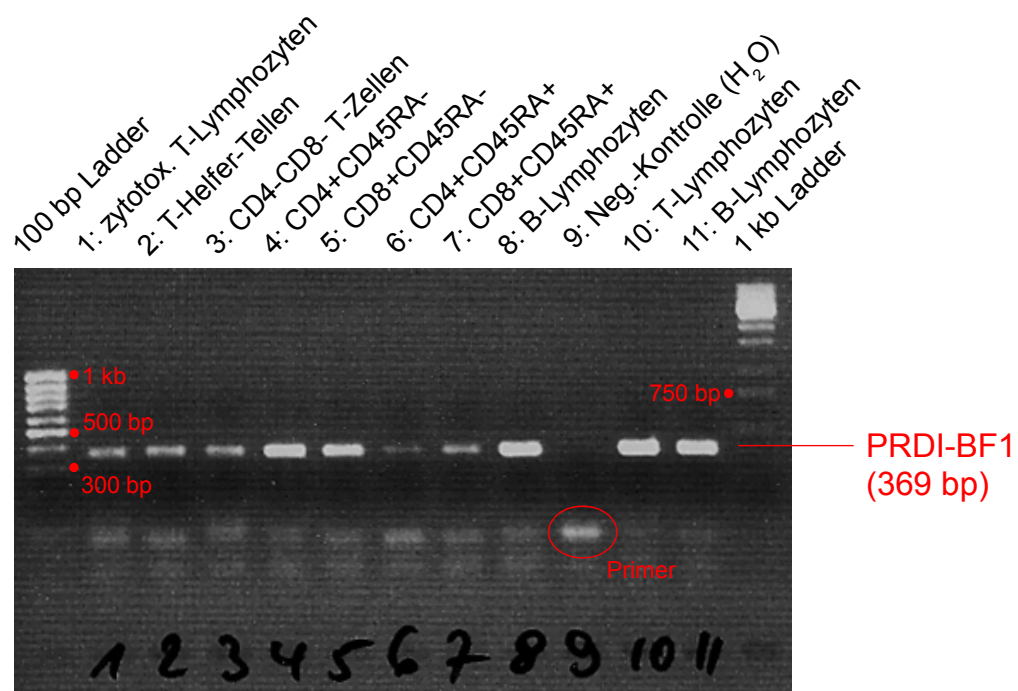


nicht möglich (kein Realtime-PCR-Verfahren, große Schwankungen in der Expression des „Housekeeping“-Gens). Insgesamt schien aber die PRDI-BF1-Expression in den Antigen-erfahrenen, nicht mehr naiven T-Zellen (CD45RA<sup>-</sup>) stärker zu sein.

1 kb Ladder  
4: Jurkat-Zellen  
8: T-Zellen unstim.  
9: T-Zellen stim.  
19: Jurkat-Zellen  
20: Neg.-Kontrolle  
(Jurkat ohne RT)



**Abbildung 17:** Nachweis von PRDI-BF1-mRNA in Jurkat-Zellen (Spuren 4 und 19, in Spur 20 zur Kontrolle Ansatz ohne reverse Transkriptase im cDNA-Synthese-Schritt)



**Abbildung 18:** Nachweis von PRDI-BF1-mRNA in peripheren humanen T-Lymphozyten (T-Helferzellen in den Spuren 2, 4 und 6; zytotoxische T-Zellen in den Spuren 1, 5 und 7; nicht aufgetrennte T-Zellen in Spur 10).

## 4. Diskussion

### 4.1. *Unterschiede in den Leukozyten-Subpopulationen zwischen COVID-Patienten und gesunden Probanden*

Grundsätzlich bestehen hinsichtlich der statistischen Auswertung der durchflusszytometrischen Befunde einige Limitationen: Neben den kleinen Fallzahlen in der Gruppe der gesunden Probanden und v. a. der Patienten betrifft dies u. a. das Geschlecht. Da alle vier COVID-Patienten männlich waren, jedoch mehr als die Hälfte der gesunden Kontrollpersonen weiblich, könnten Unterschiede zwischen beiden Gruppen teilweise geschlechtsbedingt sein. Die Berechnungen wurden daher nach Herausnahme der gesunden Probandinnen aus der Statistik erneut durchgeführt, wobei statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen in den meisten Fällen erhalten blieben (anderenfalls ist dies im Text vermerkt). Gegen einen starken Einfluss des Geschlechts auf die durchflusszytometrischen Ergebnisse spricht auch die Tatsache, dass geschlechtsspezifische Referenzbereiche für die betreffenden Parameter bisher nicht etabliert wurden. Lediglich Hämoglobin- und Erythrozytenkonzentration werden üblicherweise für Frauen und Männer unterschiedlich angegeben. Bereits bei der Thrombozytenkonzentration, die bei Frauen zwar nur etwas, aber statistisch hoch signifikant größer ist als bei Männern (*Segal 2006, Stevens 1977*), werden in der Praxis keine unterschiedlichen Referenzbereiche angegeben (*Thomas 2008*). Für die Leukozyten-Subpopulationen sind nur geringe derartige Unterschiede publiziert, nämlich für Frauen eine relative und absolute Verminderung der B-Lymphozyten sowie eine Vermehrung der T-Helfer-Zellen und eine relative Vermehrung der T-Lymphozyten, als Folge davon auch ein erhöhter CD4/CD8-Quotient bei Frauen (*Bartlett 1998*).

Generell hätte sich die Vergleichbarkeit der Patienten- mit der Kontrollgruppe der gesunden Probanden verbessern lassen, wenn die Kontrollpersonen hinsichtlich bestimmter Merkmale wie Alter, Geschlecht, Raucherstatus usw. „gematcht“ worden wären. Dies war allerdings wegen der zu geringen Verfügbarkeit potentieller Kontrollpersonen nicht möglich.

#### 4.1.1. Differentialblutbild

Die Veränderungen des Differentialblutbilds der CVID-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden wiesen ein Muster auf, wie es in ausgeprägterem Maße auch bei bakteriellen Infektionen zu finden ist. Die vier signifikanten Auffälligkeiten der Patienten (relative Lymphozytopenie, relative Neutrophilie, relative und absolute Eosinopenie) sind dabei im Prinzip alle in diesem Sinne erklärbar – die Eosinopenie wird in den letzten Jahren zunehmend als Sepsismarker diskutiert (*Abidi 2008, Shaaban 2010*). Möglicherweise besteht bei CVID-Patienten auch außerhalb akut infektiöser Komplikationen eine latente Alarmbereitschaft der unspezifischen zellulären Immunabwehr. Insofern kann dieses Ergebnis als plausibel betrachtet werden, auch wenn ähnliche Ergebnisse von anderen Autoren bisher nicht publiziert wurden. Ein systematischer Vergleich des kompletten Differentialblutbildes zwischen CVID-Patienten und gesunden Probanden war in der gesichteten Literatur nicht zu finden. In einer Veröffentlichung waren Absolutwerte von Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten genannt, wobei auf die signifikant erhöhte Neutrophilenzahl der CVID-Patienten nicht näher eingegangen wurde (*Melo 2009*). Eine Lymphozytopenie wurde ebenfalls bereits beschrieben (*Farrant 1994*). Weiterhin war in einer Arbeit der relative Monozytenanteil an den Leukozyten bei den Patienten (nicht jedoch bei den gesunden Probanden) genannt (*Rump 1992*), dieser war bei zwei von 15 Patienten erhöht.

Einschränkend ist zu erwähnen, dass die relative Lymphozytopenie und die relative Neutrophilie nach Herausnahme der weiblichen Probanden aus der statistischen Auswertung nicht mehr signifikant waren. Die Eosinopenie bleibt daher das robusteste Ergebnis dieser Arbeit im Bereich des Differentialblutbildes, da sie sowohl relativ ( $p=0,042$ ) als auch absolut ( $p=0,046$ ) betrachtet bestand und gleichermaßen vor und nach Herausnahme der Probandinnen (dann  $p=0,024$  bzw.  $p=0,025$ ) statistisch signifikant war.

#### 4.1.2. Immuntypisierung der Lymphozyten-Subpopulationen

Unter den in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen des T-Zell-Kompartimentes der Lymphozyten erreichte die relative Expansion zytotoxischer T-Lymphozyten statistische Signifikanz. Der Effekt war allerdings nach Herausnahme der Frauen aus der Probandengruppe nicht mehr statistisch signifikant, sodass es sich (mit geringerer Wahrscheinlichkeit) auch um eine geschlechtsbedingte Verzerrung der Ergebnisse gehandelt haben könnte. Die übrigen beobachteten Veränderungen im Bereich der T-Zellen waren statistisch ebenfalls nicht signifikant. Dies könnte im Vergleich zum Differentialblutbild z. B. durch eine weniger robuste Methodik mit höherer Inter-Assay-Varianz bedingt sein (selbst etablierte Methode im Gegensatz zum kommerziellen Analyseautomaten beim großen Blutbild). Eine absolute Verminderung der T-Helfer-Zellen und die damit einhergehende relative Vermehrung der zytotoxischen T-Lymphozyten sowie die Verminderung des CD4/CD8-Quotienten, wie sie in den vorliegenden Ergebnissen angedeutet zu erkennen sind, wurden von zahlreichen weiteren Arbeitsgruppen ebenfalls berichtet (*Genre 2009, Giovannetti 2007, Spickett 1992*).

Hinsichtlich der verminderten Konzentration von NK-Zellen in dieser Untersuchung besteht die Limitation, dass die NK-Zellen als CD16- und CD56-positive Zellen im Lymphozytengate definiert wurden. In der Literatur findet man inzwischen häufig folgende Definition: CD3-negativ sowie CD16- und/oder CD56-positiv im Lymphozytengate (*Tarazona 2002*). Die Ergebnisse sind daher nur eingeschränkt mit denen anderer Untersuchungen mit etwas abweichender NK-Zell-Definition vergleichbar, obwohl die quantitativen Abweichungen eher gering sein dürften. Wahrscheinlich wurden einige nur entweder CD16- oder CD56-positive NK-Zellen nicht als solche betrachtet (ca. 10-25 %, *Robertson 1990*). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Konzentration der NK-Zellen leicht unterschätzt wurde. Die Koexpression von CD16 und CD56 auf T-Lymphozyten hingegen, die zu einer Überschätzung geführt hätte, dürfte eine Rarität darstellen (*Lanier 1986*).

Die in den Ergebnissen zu erkennende Tendenz niedrigerer NK-Zell-Zahlen bei COVID-Patienten gegenüber gesunden Probanden wurde auch von anderen Untersuchern beobachtet und publiziert (*Aspalter 2000*). Insofern ist die Verminderung der absoluten NK-

Zell-Zahl trotz lediglich grenzwertiger statistischer Signifikanz ( $p=0,048$ ) wahrscheinlich von Bedeutung, zumal der Effekt auch nach Herausnahme der weiblichen Probanden nachweisbar war ( $p=0,006$ ).

Ebenfalls gut in den Kontext anderer publizierter Ergebnisse lassen sich die Auffälligkeiten des B-Zell-Kompartiments bei den CVID-Patienten einordnen. Im Vergleich zu den gesunden Probanden waren die B-Lymphozyten relativ und absolut vermindert, wenn auch statistisch nicht signifikant. Dies ist mit der Beobachtung vereinbar, dass die Anzahl der B-Lymphozyten bei CVID-Patienten variabel von normal bis stark vermindert sein kann (*Spickett 1992*). Der gleichzeitig signifikant erhöhte Anteil HLA-DR-positiver Lymphozyten bei eher niedrigen B-Lymphozyten spricht für eine Vermehrung HLA-DR-positiver Nicht-B-Zellen, wobei im Lymphozytengate hierfür am ehesten aktivierte T-Zellen in Betracht kommen. Deren Vermehrung wurde in der vorliegenden Arbeit zwar nicht bewiesen, da HLA-DR als B-Zell-Marker und nicht in Kombination mit CD3, CD4 oder CD8 eingesetzt wurde. Eine Expansion aktivierter T-Lymphozyten (insbesondere CD4<sup>+</sup>, aber auch CD8<sup>+</sup>) wurde aber bereits mehrfach von anderen Autoren publiziert (*Baumert 1992, Carbone 2006, Viillard 2006*).

Eine Verminderung CD27-positiver B-Gedächtnis-Zellen ist ebenfalls in der Literatur beschrieben (*Agematsu 2002, Brouet 2000*); unter zusätzlicher Berücksichtigung des IgM- bzw. IgD-Status auf der Zelloberfläche ist diese Alteration inzwischen in die aktuelle CVID-Klassifikation eingegangen (*Piqueras 2003, Wehr 2008*). Dabei zeigte sich bei zwei der hier untersuchten vier Patienten (2 und 3) eine nahezu vollständige Abwesenheit CD27-positiver B-Lymphozyten (siehe **Abbildung 6**). Bei allen vier Patienten ließ sich ein geringer Anteil „geswitchter“ B-Gedächtnis-Zellen an den B-Lymphozyten nachweisen (siehe auch **Tabelle 6**). Nach der EUROClass-Studie wären die Patienten in Gruppe smB- (Anteil „geswitchter“ Memory-Zellen an den gesamten B-Lymphozyten < 2 %) einzustufen (*Wehr 2008*), wobei der Wert für Patient 1 genau auf der Entscheidungsgrenze lag (2,0 %).

Bei Patient 3 zeigte sich zudem eine grenzwertig expandierte Population von B-Lymphozyten mit dem Phänotyp CD21<sup>low</sup>, der nach der EUROClass-Studie mit Splenomegalie und granulomatösen Entzündungen assoziiert ist. Nach den formalen Klassifikations-

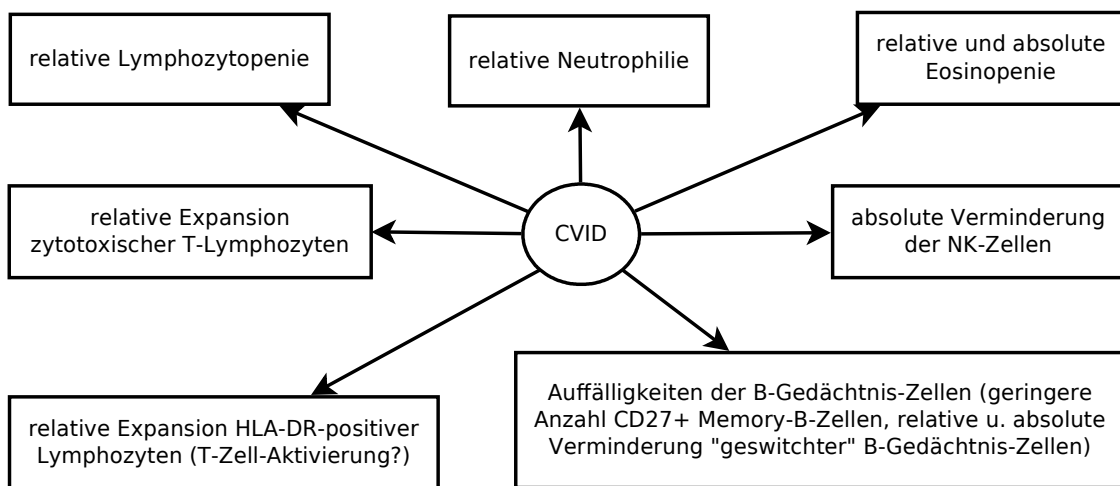
kriterien wäre diese Population allerdings mit 9,2 % noch nicht erhöht (Grenzwert 10 %). Klinisch war bei diesem Patienten keine Splenomegalie nachweisbar, möglicherweise aber CVID-assoziierte pulmonale Granulome. Bei Patient 2 mit einer ausgeprägten Splenomegalie war keine derartige Zellpopulation vorhanden. An dieser Stelle wird deutlich, dass die EUROClass-Gruppierung keine absolut scharfe Trennung von Patienten mit unterschiedlichen klinischen Merkmalen ermöglicht, sondern lediglich (teilweise recht schwache) statistische Assoziationen zwischen Immunphänotypen und klinisch definierten Subgruppen von Patienten beschreibt.

Die beobachtete Tendenz zu einer verstärkten Expression von CD23 auf der Oberfläche der (verbliebenen) B-Lymphozyten von CVID-Patienten wäre in dem Sinne erklärbar, dass durch die insuffiziente Immunglobulin-Produktion gegenregulatorisch die B-Lymphozyten aktiviert werden. Der niedrig affine Fc- $\epsilon$ -Rezeptor CD23 wird als Aktivierungsmarker von B-Zellen und deren Proliferation fördernder Faktor betrachtet (*Bonnefoy 1997, Pezzutto 2007*). Allerdings war das Ergebnis statistisch nicht signifikant ( $p=0,177$ ) und wurde bisher auch nicht von anderen Untersuchern berichtet. Insofern wäre es interessant, in weiteren Untersuchungen der Frage nachzugehen, ob es sich um einen zufälligen oder einen systematischen Unterschied zwischen CVID-Patienten und gesunden Probanden handelt und ob sich weitere Zeichen der B-Zell-Aktivierung (z. B. ein erhöhter Anteil CD25-positiver B-Lymphozyten) bei den Patienten nachweisen lassen.

Eine grundsätzliche Limitation der durchflusszytometrischen Untersuchungen besteht darin, dass die Lymphozyten lediglich mittels eines Gates in der Darstellung Vorwärts- gegenüber Seitwärtsstreulicht (jeweils linear) definiert wurden. Eine zuverlässigere Identifizierung wäre (allerdings auf Kosten eines Fluoreszenz-Kanals) durch die zusätzliche Verwendung eines Pan-Leukozyten-Markers wie CD45 möglich gewesen (*Gelman 2000*). Dies wäre insbesondere bei Patienten oder Probanden mit erhöhten Anteilen von Erythrozytenvorstufen (Normoblasten) von Bedeutung gewesen, da Normoblasten hinsichtlich der Streulichteigenschaften den Lymphozyten so ähnlich sind, dass beide Zellpopulationen durch Gaten in der Darstellung Vorwärts- gegenüber Seitwärtsstreulicht nicht voneinander getrennt werden können (*Nicholson 1996*). Vermutlich spielte diese

Einschränkung in der hier vorgelegten Auswertung keine wesentlich Rolle, da bei keinem der Patienten (oder auch der gesunden Probanden) im Blutbild Hinweise auf eine autoimmunhämolytische Anämie bestanden. In einer großen Referenzwertstudie für B-Zell-Subpopulationen zeigte sich ebenfalls, dass ein vorgeschaltetes CD45-Gate nicht zwingend erforderlich ist (*Morbach 2010*).

Die in dieser Arbeit beobachteten immunologischen Auffälligkeiten, die sich bei den CVID-Patienten signifikant von den gesunden Probanden unterschieden, sind in **Abbildung 19** zusammengefasst.



**Abbildung 19:** Immunologische Auffälligkeiten der CVID-Patienten (bezogen auf Werte gesunder Probanden, Zusammenfassung der statistisch signifikanten Unterschiede)

## 4.2. Immunglobulin-Sekretion in vitro

Die B-Lymphozyten aller untersuchten gesunden Probanden und Patienten zeigten sich in der Lage, nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* Stamm Cowan I und Interleukin-2 Immunglobuline zu sezernieren.

Allerdings ergaben sich bereits bei der Etablierung der Methode des Gesamt-Immunglobulin-ELISAs Schwierigkeiten, wie sich im Methodenvergleich mit der Immunelektrophorese im klinisch-chemischen Labor der Universitäts-Kinderklinik zeigte. Da die technische Durchführung bis auf einen relativ geringen linearen Messbereich problemlos



und robust wirkt (siehe auch gute Reproduzierbarkeit der Dreifachansätze), ist die Ursache eher subtil im Bereich der Konzeption des Testverfahrens (polyvalenter Primärantikörper gegen IgG, IgA und IgM) oder der Inter-Assay-Varianz, die nicht systematisch untersucht wurde, zu vermuten.

Ein gravierendes Problem bei der Messung der Immunglobulin-Sekretion isolierter B-Lymphozyten bereitete die hier nicht im Detail dargestellte starke Abhängigkeit der Ergebnisse von der Art der B-Zell-Isolierung. Je nachdem, ob eine T-Zell-Depletion mit Schafererythrozyten vorgeschaltet wurde und welches MACS-Kit genau verwendet wurde (CD19-Positiv- gegenüber Negativ-Selektion), unterschieden sich die Ergebnisse, die aus derselben Blutprobe erzielt wurden, deutlich voneinander. Insofern muss die Feststellung, dass die Immunglobulinsynthese bei insgesamt drei Patienten und einer gesunden Probandin nicht durch SAC und Interleukin-2 stimulierbar war, mit großer Vorsicht interpretiert werden. Als Gemeinsamkeit fanden sich bei diesen Probanden und Patienten bereits in den Kulturüberständen ohne Stimulation verhältnismäßig hohe Immunglobulin-Konzentrationen im Vergleich zu den meisten anderen Probanden und Patienten, sodass in diesen Fällen möglicherweise eine unspezifische Stimulation unabhängig von dem zugegebenen SAC und Interleukin-2 vorlag. Weiterhin wäre auch denkbar, dass die als Kompromiss zwischen guter Messbarkeit von mRNA- und Protein-Signalen gewählte Stimulationszeit von drei Tagen für eine zuverlässige Messung der Immunglobulinsynthese *in vitro* zu kurz war – in Publikationen anderer Arbeitsgruppen sind teilweise längere Inkubationszeiten bis zu neun Tagen beschrieben (*Bryant 1990, Rump 1992*). Die genannten Effekte konnten auch durch mehrfache methodische Variationen nicht kontrolliert werden, sodass über die Feststellung der grundsätzlichen Fähigkeit aller Patienten und gesunden Probanden zur Immunglobulin-Sekretion hinaus keine quantitativen Aussagen möglich waren.

### **4.3. PRDI-BF1-mRNA-Expression bei gesunden Probanden und CVID-Patienten**

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass das klassische immunologische Erscheinungsbild der CVID bei einer großen Subgruppe von Patienten (Immunglobulinmangel bei gleichzeitig nachweisbaren B-Lymphozyten im peripheren Blut) zum Teil durch eine Unfähigkeit der B-Lymphozyten bedingt sein könnte, in die terminale Differenzierung zu Plasmazellen einzutreten und konsekutiv Immunglobuline zu sezernieren. Dieses Phänomen wiederum könnte durch einen intrinsischen Defekt der B-Lymphozyten oder durch eine insuffiziente T-Zell-Hilfe bedingt sein. Dabei sprechen einige Beobachtungen bei CVID-Patienten für die erste Variante, andere für die zweite. Beispielsweise ließe sich aus der insuffizienten Impfantwort von CVID-Patienten auch auf Polysaccharid-Impfstoffe (z. B. Pneumokokken-Polysaccharidimpfstoff, *Al-Herz 2003*) ableiten, dass ein intrinsischer B-Zell-Defekt wahrscheinlicher ist, da die Immunantwort auf Polysaccharid-Antigene von der T-Zell-Hilfe unabhängig ist (*Janeway 1999*). Andererseits sprechen die Auffälligkeiten der T-Lymphozyten, die bei CVID-Patienten häufig zu finden sind (u. a. Verminderung der T-Helfer-Zellen, niedrige CD4/CD8-Quotienten), eher für eine pathogenetische Bedeutung der T-Zell-Hilfe. Denkbar wäre auch, dass bei einem Teil der Patienten intrinsische B-Zell-Defekte vorliegen, bei einem anderen wiederum Defekte der T-Zell-Hilfe.

Ein weiterer wichtiger pathogenetischer Erklärungsansatz ist die Unfähigkeit der B-Lymphozyten von CVID-Patienten, in B-Gedächtnis-Zellen zu differenzieren oder als solche langfristig zu überleben. Diese Eigenschaft scheint zumindest partiell abhängig von T-Lymphozyten zu sein, da im Falle des ersten beschriebenen monogenen Defekts, der sich klinisch als CVID manifestiert, ein Molekül betroffen ist, das in T-Zellen gefunden wird (homozygoter ICOS-Mangel, *Grimbacher 2003*).

In der Tat scheint die Diagnose CVID am ehesten einen heterogenen Sammeltopf unterschiedlicher Einzeldefekte darzustellen, die jeweils unterschiedlich erklärbar sind und zum kleinen Teil bereits als monogene Erkrankungen identifiziert wurden (z. B. ICOS-,

CD19-, TACI-, BAFF-Rezeptor- und MSH5-Defizienz). Diese Hypothese wurde bereits um die Jahrtausendwende aufgestellt, da eine einzelne genetische Ursache der CVID nicht identifiziert werden konnte (*Ballow 2002*).

Es erscheint daher denkbar, dass bei einem Teil der CVID-Patienten ein Defekt eines Transkriptionsfaktors vorliegt, der für die terminale Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen von Bedeutung ist. Bei diesem Transkriptionsfaktor könnte es sich neben XBP-1 und IRF4 auch um PRDI-BF1 handeln (*Calame 2003*). Bei Mäusen ist das vollständige Fehlen des murinen PRDI-BF1-Homologs Blimp-1 bereits in der Fetalperiode letal (*Vincent 2005*), wobei dieses Ergebnis nicht notwendigerweise auf den Menschen übertragbar ist.

Bei den untersuchten Patienten ließ sich in allen Fällen PRDI-BF1-mRNA in stimulierten B-Zellen nachweisen. Diese Beobachtung steht in Einklang mit dem immunhistochemischen Nachweis von PRDI-BF1-Protein in Lymphknoten dreier CVID-Patienten (*Taubenheim 2005*). Bei den beiden Patienten mit sehr niedrigen B-Gedächtnis-Zellen war ein PRDI-BF1-Defekt auch eher nicht zu erwarten, da das murine Homolog Blimp-1 für die Bildung von B-Gedächtnis-Zellen nicht erforderlich ist (*Martins 2008*), PRDI-BF1 in murinen und humanen B-Gedächtnis-Zellen kaum nachweisbar ist (*Blink 2005*, *Kuo 2007*) und somit mit höherer Wahrscheinlichkeit andere pathogenetische Mechanismen wie z. B. eine ICOS-Defizienz als Störung im Bereich der T-Lymphozyten oder ein „stromaufwärts“ der terminalen Differenzierung liegender Defekt der B-Zellen vorliegen.

Bei einem der CVID-Patienten (Patient 4, siehe auch **Abbildung 15**) war die PRDI-BF1-mRNA nur in einem von drei PCR-Läufen und dort auch nur schwach nachweisbar. Dennoch kann von diesem Ergebnis nicht unbedingt auf einen quantitativen PRDI-BF1-Defekt geschlossen werden, da die verwendete PCR-Methodik zu wenig robust und für eine Quantifizierung der mRNA wahrscheinlich nicht ideal geeignet war. Eine der Ursachen des Problems lag vermutlich in der verwendeten Taq-DNA-Polymerase. Damit kam es immer wieder auch zu Ausfällen der Amplifikation des „Housekeeping“-

Gens GAPDH, die nicht hätten vorkommen sollen. Gegen Ende der Experimente wurde die DNA-Polymerase versuchsweise gegen das Produkt eines anderen Herstellers ausgetauscht, wodurch sich die Ausfälle der GAPDH-Amplifikation deutlich reduzierten.

Zusammenfassend kann ein vollständiger PRDI-BF1-Defekt im Sinne einer homozygoten Gendeletion bei den vier untersuchten CVID-Patienten weitgehend ausgeschlossen werden, da in jedem Fall mindestens einmal der mRNA-Nachweis gelang. Es könnte aber dennoch eine zum Funktionsverlust führende Mutation vorgelegen haben, die mit der verwendeten Methode nicht nachgewiesen werden konnte. Insofern wäre eine Komplettssequenzierung von PRDI-BF1 bei einer größeren Zahl von CVID-Patienten eine interessante Fortsetzung dieser Arbeit. Ebenfalls wäre eine Alteration der quantitativen PRDI-BF1-Expression weiterhin denkbar, zum Beispiel durch den Defekt eines „stromaufwärts“ gelegenen Transkriptionsfaktors wie IRF4 oder STAT3.

#### **4.4. PRDI-BF1 – ein B-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor?**

Nach der Erstbeschreibung von PRDI-BF1 (*Keller 1991*) und des murinen Homologs Blimp-1 (*Turner 1994*) war man zunächst davon ausgegangen, dass es sich um einen spezifischen Transkriptionsfaktor von reifen B-Lymphozyten und Plasmazellen handelt. Die Annahme, dass Blimp-1 in murinen T-Lymphozyten nicht exprimiert wird, basierte allerdings lediglich auf der Northern-Blot-Analyse einer T-Zell- und zweier Prä-T-Zell-Linien (*Turner 1994*). Durch den mRNA-Nachweis in Geweben wie Lymphknoten, Knochenmark und Milz war es nicht möglich, zwischen der Herkunft aus B- oder T-Lymphozyten zu unterscheiden. Ebenfalls zu dieser Zeit wurde bereits über das Vorkommen von Blimp-1-mRNA in der murinen Haut berichtet, ohne dass eine Vorstellung von dessen Funktion bestanden hätte. In den ersten Jahren nach dessen Entdeckung wurde Blimp-1 daher als ein Faktor betrachtet, der eine Differenzierung von B-Lymphozyten zu frühen Plasmazellen sowie deren Immunglobulin-Sekretion bewirkt (*Turner 1994*). Experimente an *Xenopus*-Embryonen deuteten dann auf eine Rolle des dortigen Homologs Xblimp1 in der embryofetalen Entwicklung hin (*de Souza 1999*). Der Gedanke, dass Blimp-1 auch bei der terminalen Differenzierung anderer Zelltypen eine Rolle

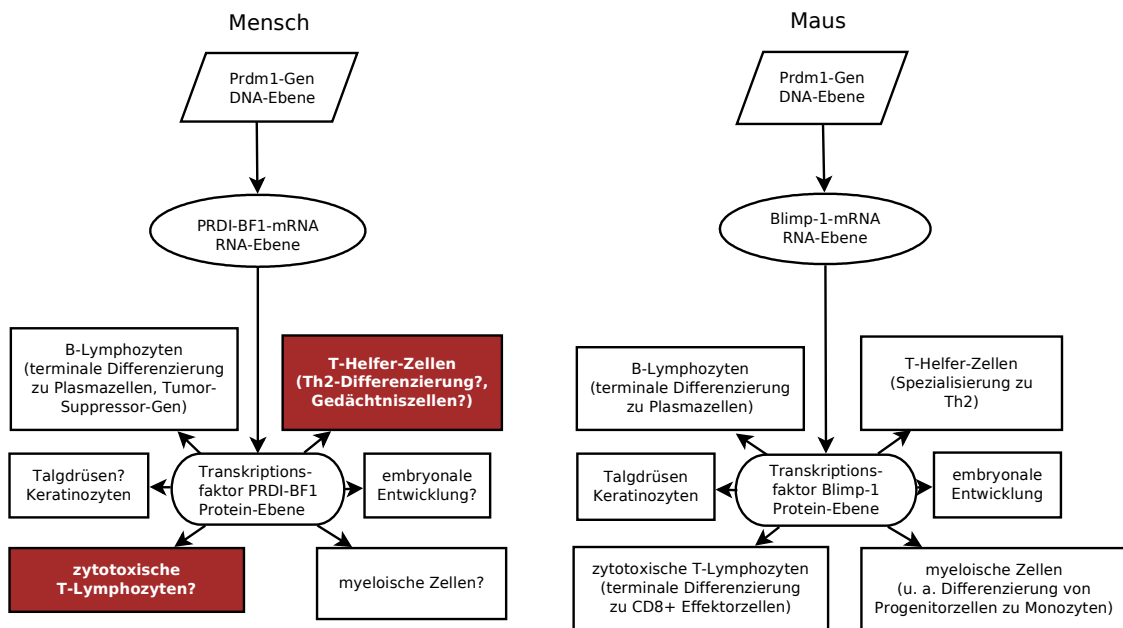
spielen könnte, wurde erstmals im Rahmen des Nachweises in Zellen der myeloischen Reihe bei Mäusen publiziert (*Chang 2000*). Die Verfügbarkeit von monoklonalen Antikörpern ermöglichte kurz darauf auch den Nachweis, dass Blimp-1 bei Mäusen ebenfalls in einem bestimmten zeitlichen und räumlichen Muster während der intrauterinen Entwicklung exprimiert wird (*Chang 2002*).

Der Nachweis von PRDI-BF1-Protein in humanen T-Lymphozyten wurde erst einige Jahre später erstmals publiziert (*Cattoretti 2005*). Die Autoren fanden das stärkste Signal bei reaktiv infiltrierenden T-Lymphozyten in B-Zell-Lymphomen und bewerteten das Ergebnis als völlig überraschend, wobei noch keine funktionelle Bedeutung in T-Lymphozyten diskutiert wurde. Kurz darauf wurde von drei Arbeitsgruppen (darunter auch unsere) unabhängig voneinander und nahezu gleichzeitig der Nachweis von Blimp-1- bzw. PRDI-BF1-mRNA und -Protein sowie Hinweise auf eine Bedeutung für die Differenzierung von T-Lymphozyten bei Mäusen und teilweise auch bei Menschen publiziert (*Kallies 2006, Martins 2006, Santner-Nanan 2006*).

Auch aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergeben sich starke Hinweise darauf, dass PRDI-BF1 in humanen T-Lymphozyten exprimiert wird und dass es sich weder um eine Kontamination auf der Ebene der Zellpräparation noch auf der Ebene der Nukleinsäureamplifikation handelt, wie von uns zunächst vermutet wurde. Dafür spricht neben dem PRDI-BF1-mRNA-Nachweis in hoch aufgereinigten T-Lymphozyten und deren Subgruppen (sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup>, tendenziell stärker in CD45RA<sup>-</sup> Memory-/Effektor-T-Zellen) auch das positive Signal in der Jurkat-Zelllinie, deren Kontamination durch B-Lymphozyten sehr unwahrscheinlich ist. Aus Jurkat-Zellen wurde auch ein RT-PCR-Ansatz mit und ohne reverse Transkriptase im Reaktionsansatz der cDNA-Synthese durchgeführt, der zu einem eindeutig negativen Ergebnis für PRDI-BF1 im Ansatz ohne reverse Transkriptase führte. Dies spricht gegen eine Kontamination der PCR-Ansätze (z. B. des Mastermix) durch PRDI-BF1-Amplifikate, die ebenfalls ein positives Signal hätte vortäuschen können. Der zu erahnende Unterschied in der PRDI-BF1-mRNA-Synthese der T-Lymphozyten in Abhängigkeit vom CD45RA-Status als Marker für die Antigen-Unerfahrenheit („Naivität“) ließ bereits vermuten, dass PRDI-BF1 durch Antigenkontakt im Rahmen der T-Zell-Gedächtnis-Bildung hinaufreguliert wird

und dementsprechend in diesem Prozess eine Rolle spielen könnte. Die RT-PCR-Methodik in der vorliegenden Arbeit ließ allerdings aufgrund der oben bereits diskutierten Limitationen keinen Beweis dieser Hypothese zu. Dieser wurde für Mäuse später von einer anderen der an der Entdeckung beteiligten Arbeitsgruppen erbracht (*Kallies 2009*).

Eine Zusammenfassung der bisher nachgewiesenen bzw. vermuteten Funktionen von PRDI-BF1 beim Menschen bzw. Blimp-1 bei der Maus zeigt **Abbildung 20**.



**Abbildung 20:** Funktionen von PRDI-BF1 beim Menschen (links) bzw. dem homologen Blimp-1 bei der Maus (rechts). Rot markiert sind die Bereiche, in denen mit dieser Arbeit Beiträge geleistet wurden.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden 15 gesunde Probanden und vier Patienten mit dem primären humoralen Immundefekt „Common Variable Immunodeficiency“ (CVID) auf den Immunphänotyp ihrer Lymphozyten sowie die Expression des Transkriptionsfaktors PRDI-BF1/Blimp-1 hin untersucht. Zu Kontrollzwecken wurden zusätzlich einige permanente Lymphozyten-Zelllinien verwendet (B-lymphoblastoide Zelllinien und Jurkat-Zellen).

Nach der Blutentnahme wurde zunächst in Vollblut-Lyse-Technik der Immunphänotyp bestimmt, begleitend wurde ein großes Blutbild auf einem Hämatologieautomaten gemessen. Im Vergleich zu den gesunden Probanden zeigten die CVID-Patienten im Differentialblutbild folgende statistisch signifikante Abweichungen: relative Lymphopenie, relative Neutrophilie, relative und absolute Eosinopenie (insgesamt im Sinne einer entzündlichen Reaktion). Durchflusszytometrisch zeigten die Patienten folgende Auffälligkeiten: relative Expansion der zytotoxischen T-Lymphozyten, absolute Verminderung der NK-Zellen, relative Expansion HLA-DR-positiver Lymphozyten, absolute Verminderung CD27-positiver Lymphozyten, relative und absolute Verminderung CD27-positiver B-Zellen (B-Gedächtnis-Zellen). Bei allen vier Patienten war der Anteil IgM-negativer („geswitchter“) Memory-Zellen an den gesamten B-Lymphozyten stark vermindert.

Nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* Stamm Cowan I und Interleukin 2 waren bei allen untersuchten Patienten und gesunden Probanden Immunglobuline im Zellkulturüberstand sowie PRDI-BF1-mRNA im Zelllysat nachweisbar, sodass auf einen gravierenden Defekt von PRDI-BF1 als Ursache der CVID (z. B. im Sinne einer homozygoten Gendeletion) kein Hinweis bestand.

Bei den als Negativkontrolle vorgesehenen T-Lymphozyten und in einer permanenten T-Zelllinie (Jurkat) wurde überraschend ebenfalls PRDI-BF1-mRNA nachgewiesen. Dieser Befund konnte durch mehrfache Wiederholung, Kontrollen und hohe Aufreinigung der T-Lymphozyten sowie Auftrennung in ihre Subpopulationen bestätigt werden und wurde von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls reproduziert und publiziert. Die Ergebnis-

se ließen vermuten, dass PRDI-BF1 bei Antigen-erfahrenen, CD45RA-negativen T-Lymphozyten stärker exprimiert wird und daher ebenso wie bei B-Lymphozyten eine Rolle in deren terminaler Differenzierung spielt.



## **6. Anhang**

**(Literatur, Abkürzungen, Danksagung)**

## Literatur

- Abidi, K.; Khoudri, I.; Belayachi, J.; Madani, N.; Zekraoui, A.; Zeggwagh, A. A. & Abouqal, R.:** Eosinopenia is a reliable marker of sepsis on admission to medical intensive care units. *Critical Care (London, England)* **2008**; 12 (2): R59
- Agematsu, K.; Futatani, T.; Hokibara, S.; Kobayashi, N.; Takamoto, M.; Tsukada, S.; Suzuki, H.; Koyasu, S.; Miyawaki, T.; Sugane, K.; Komiyama, A. & Ochs, H. D.:** Absence of memory B cells in patients with common variable immunodeficiency. *Clinical Immunology* **2002**; 103 (1): 34-42
- Aghamohammadi, A.; Mohammadi, J.; Parvaneh, N.; Rezaei, N.; Moin, M.; Espanol, T. & Hammarstrom, L.:** Progression of selective IgA deficiency to common variable immunodeficiency. *International Archives of Allergy and Immunology* **2008**; 147 (2): 87-92
- Al-Herz, W. & McGeady, S. J.:** Antibody response in common variable immunodeficiency. *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology* **2003**; 90 (2): 244-247
- Aspalter, R. M.; Sewell, W. A.; Dolman, K.; Farrant, J. & Webster, A. D.:** Deficiency in circulating natural killer (NK) cell subsets in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinaemia. *Clinical and Experimental Immunology* **2000**; 121 (3): 506-514
- Ballow, M.:** Primary immunodeficiency disorders: antibody deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2002**; 109 (4): 581-591
- Bartlett, J. A.; Schleifer, S. J.; Demetrikopoulos, M. K.; Delaney, B. R.; Shiflett, S. C. & Keller, S. E.:** Immune function in healthy adolescents. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **1998**; 5 (1): 105-113
- Baumert, E.; Wolff-Vorbeck, G.; Schlesier, M. & Peter, H. H.:** Immunophenotypical alterations in a subset of patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clinical and Experimental Immunology* **1992**; 90 (1): 25-30
- Baumgarth, N. & Roederer, M.:** A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of Immunological Methods* **2000**; 243 (1-2): 77-97
- Berger, M. & Flebogamma 5% DIF Investigators:** A multicenter, prospective, open label, historically controlled clinical trial to evaluate efficacy and safety in primary immunodeficiency diseases

(PID) patients of Flebogamma 5% DIF, the next generation of Flebogamma. *Journal of Clinical Immunology* **2007**; 27 (6): 628-633

**Blink, E. J.; Light, A.; Kallies, A.; Nutt, S. L.; Hodgkin, P. D. & Tarlinton, D. M.:** Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *Journal of Experimental Medicine* **2005**; 201 (4): 545-554

**Bonilla, F. A.; Bernstein, I. L.; Khan, D. A.; Ballas, Z. K.; Chinen, J.; Frank, M. M.; Kobrynski, L. J.; Levinson, A. I.; Mazer, B.; Nelson, R. P.; Orange, J. S. et al.:** Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology* **2005**; 94 (5 Suppl 1): S1-63

**Bonnefoy, J. Y.; Lecoanet-Henchoz, S.; Gauchat, J. F.; Graber, P.; Aubry, J. P.; Jeannin, P. & Plater-Zyberk, C.:** Structure and functions of CD23. *International Reviews of Immunology* **1997**; 16 (1-2): 113-128

**Borte, M.; Oertelt, C. & Högy, B.:** Behandlung von Patienten mit primären Antikörpermangelsyndromen in Deutschland. *Klinische Pädiatrie* **2005**; 217 (5): 276-280

**Brouet, J. C.; Chedeville, A.; Ferman, J. P. & Royer, B.:** Study of the B cell memory compartment in common variable immunodeficiency. *European Journal of Immunology* **2000**; 30 (9): 2516-2520

**Bryant, A.; Calver, N. C.; Toubi, E.; Webster, A. D. & Farrant, J.:** Classification of patients with common variable immunodeficiency by B cell secretion of IgM and IgG in response to anti-IgM and interleukin-2. *Clinical Immunology and Immunopathology* **1990**; 56 (2): 239-248

**Calame, K. L.; Lin, K.-I. & Tunyaplin, C.:** Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annual Review of Immunology* **2003**; 21: 205-230

**Carbone, J.; Sarmiento, E.; Micheloud, D.; Rodríguez-Molina, J. & Fernández-Cruz, E.:** Elevated levels of activated CD4 T cells in common variable immunodeficiency: association with clinical findings. *Allergologia et Immunopathologia* **2006**; 34 (4): 131-135

**Castigli, E.; Wilson, S. A.; Garibyan, L.; Rachid, R.; Bonilla, F.; Schneider, L. & Geha, R. S.:** TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nature Genetics* **2005**; 37 (8): 829-834

**Cattoretti, G.; Angelin-Duclos, C.; Shaknovich, R.; Zhou, H.; Wang, D. & Alobeid, B.:** PRDM1/Blimp-1 is expressed in human B-lymphocytes committed to the plasma cell lineage. *Journal of Pathology* **2005**; 206 (1): 76-86

- Cattoretti, G.; Shakhovich, R.; Smith, P. M.; Jäck, H.-M.; Murty, V. V. & Alobeid, B.:** Stages of germinal center transit are defined by B cell transcription factor coexpression and relative abundance. *Journal of Immunology* **2006**; 177 (10): 6930-6939
- Chang, D. H.; Angelin-Duclos, C. & Calame, K.:** BLIMP-1: trigger for differentiation of myeloid lineage. *Nature Immunology* **2000**; 1 (2): 169-176
- Chang, D. H.; Cattoretti, G. & Calame, K. L.:** The dynamic expression pattern of B lymphocyte induced maturation protein-1 (Blimp-1) during mouse embryonic development. *Mechanisms of Development* **2002**; 117 (1-2): 305-309
- Chapel, H.; Lucas, M.; Lee, M.; Bjorkander, J.; Webster, D.; Grimbacher, B.; Fieschi, C.; Thon, V.; Abedi, M. R. & Hammarstrom, L.:** Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood* **2008**; 112 (2): 277-286
- Church, J. A.; Leibl, H.; Stein, M. R.; Melamed, I. R.; Rubinstein, A.; Schneider, L. C.; Wasserman, R. L.; Pavlova, B. G.; Birsthite, K.; Mancini, M.; Fritsch, S. et al.:** Efficacy, safety and tolerability of a new 10% liquid intravenous immune globulin [IGIV 10%] in patients with primary immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology* **2006**; 26 (4): 388-395
- Cimmino, L.; Martins, G. A.; Liao, J.; Magnusdottir, E.; Grunig, G.; Perez, R. K. & Calame, K. L.:** Blimp-1 attenuates Th1 differentiation by repression of ifng, tbx21, and bcl6 gene expression. *Journal of Immunology* **2008**; 181 (4): 2338-2347
- Conley, M. E.; Notarangelo, L. D. & Etzioni, A.:** Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clinical Immunology* **1999**; 93 (3): 190-197
- Cunningham-Rundles, C.; Siegal, F. P.; Cunningham-Rundles, S. & Lieberman, P.:** Incidence of cancer in 98 patients with common varied immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology* **1987**; 7 (4): 294-299
- Cunningham-Rundles, C. & Bodian, C.:** Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clinical Immunology* **1999**; 92 (1): 34-48
- Cunningham-Rundles, C.:** Common variable immunodeficiency. *Current Allergy and Asthma Reports* **2001**; 1 (5): 421-429
- Cunningham-Rundles, C.:** How I treat common variable immune deficiency. *Blood* **2010**; 116 (1): 7-15

- Eades-Perner, A.-M.; Gathmann, B.; Knerr, V.; Guzman, D.; Veit, D.; Kindle, G.; Grimbacher, B. & E. S. I. D. Registry Working Party:** The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: results 2004-06. *Clinical and Experimental Immunology* **2007**; 147 (2): 306-312
- Eijkhout, H. W.; van Der Meer, J. W.; Kallenberg, C. G.; Weening, R. S.; van Dissel, J. T.; Sanders, L. A.; Strengers, P. F.; Nienhuis, H.; Schellekens, P. T. & Inter-University Working Party for the Study of Immune Deficiencies:** The effect of two different dosages of intravenous immunoglobulin on the incidence of recurrent infections in patients with primary hypogammaglobulinemia. A randomized, double-blind, multicenter crossover trial. *Annals of Internal Medicine* **2001**; 135 (3): 165-174
- Farrant, J.; Spickett, G.; Matamoros, N.; Copas, D.; Hernandez, M.; North, M.; Chapel, H. & Webster, A. D.:** Study of B and T cell phenotypes in blood from patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Immunodeficiency* **1994**; 5 (2): 159-169
- Fuss, I. J.; Kanof, M. E.; Smith, P. D. & Zola, H.:** Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Current Protocols in Immunology* **2009**; Chapter 7: Unit 7.1
- Garcia, J. G. N. & Ma, S.-F.:** Polymerase chain reaction: a landmark in the history of gene technology. *Critical Care Medicine* **2005**; 33 (12 Suppl): S429-S432
- Gelman, R. & Wilkening, C.:** Analyses of quality assessment studies using CD45 for gating lymphocytes for CD3(+)4(+)%. *Cytometry* **2000**; 42 (1): 1-4
- Genre, J.; Errante, P. R.; Kokron, C. M.; Toledo-Barros, M.; Câmara, N. O. S. & Rizzo, L. V.:** Reduced frequency of CD4(+)CD25(HIGH)FOXP3(+) cells and diminished FOXP3 expression in patients with Common Variable Immunodeficiency: a link to autoimmunity? *Clinical Immunology* **2009**; 132 (2): 215-221
- Giovannetti, A.; Pierdominici, M.; Mazzetta, F.; Marziali, M.; Renzi, C.; Mileo, A. M.; Felice, M. D.; Mora, B.; Esposito, A.; Carello, R.; Pizzuti, A. et al.:** Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *Journal of Immunology* **2007**; 178 (6): 3932-3943
- Grimbacher, B.; Hutloff, A.; Schlesier, M.; Glocker, E.; Warnatz, K.; Dräger, R.; Eibel, H.; Fischer, B.; Schäffer, A. A.; Mages, H. W.; Kroczeck, R. A. & Peter, H. H.:** Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nature Immunology* **2003**; 4 (3): 261-268

- Grützkau, A. & Radbruch, A.:** Small but mighty: how the MACS-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* **2010**; 77 (7): 643-647
- Györy, I.; Fejér, G.; Ghosh, N.; Seto, E. & Wright, K. L.:** Identification of a functionally impaired positive regulatory domain I binding factor 1 transcription repressor in myeloma cell lines. *Journal of Immunology* **2003**; 170 (6): 3125-3133
- Hammarström, L.; Vorechovsky, I. & Webster, D.:** Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clinical and Experimental Immunology* **2000**; 120 (2): 225-231
- Hangaishi, A. & Kurokawa, M.:** Blimp-1 is a tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *International Journal of Hematology* **2010**; 91 (1): 46-53
- Horsley, V.; O'Carroll, D.; Tooze, R.; Ohinata, Y.; Saitou, M.; Obukhanych, T.; Nussenzweig, M.; Tarakhovsky, A. & Fuchs, E.:** Blimp1 defines a progenitor population that governs cellular input to the sebaceous gland. *Cell* **2006**; 126 (3): 597-609
- Huang, S.:** Blimp-1 is the murine homolog of the human transcriptional repressor PRDI-BF1. *Cell* **1994**; 78 (1): 9
- Janeway, C. A., Jr.; Travers, P. & Walport, M.:** *Immunobiology*. Current Biology Publications, London. 4. Auflage **1999**
- Jentsch-Ullrich, K.; Koenigsmann, M.; Mohren, M. & Franke, A.:** Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults – a monocentric German study. *Clinical Immunology* **2005**; 116 (2): 192-197
- Kallies, A.; Hasbold, J.; Tarlinton, D. M.; Dietrich, W.; Corcoran, L. M.; Hodgkin, P. D. & Nutt, S. L.:** Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *Journal of Experimental Medicine* **2004**; 200 (8): 967-977
- Kallies, A.; Hawkins, E. D.; Belz, G. T.; Metcalf, D.; Hommel, M.; Corcoran, L. M.; Hodgkin, P. D. & Nutt, S. L.:** Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nature Immunology* **2006**; 7 (5): 466-474

- Kallies, A.; Hasbold, J.; Fairfax, K.; Pridans, C.; Emslie, D.; McKenzie, B. S.; Lew, A. M.; Corcoran, L. M.; Hodgkin, P. D.; Tarlinton, D. M. & Nutt, S. L.:** Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity* **2007**; 26 (5): 555-566
- Kallies, A.; Xin, A.; Belz, G. T. & Nutt, S. L.:** Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity* **2009**; 31 (2): 283-295
- Kanegane, H.; Tsukada, S.; Iwata, T.; Futatani, T.; Nomura, K.; Yamamoto, J.; Yoshida, T.; Agematsu, K.; Komiyama, A. & Miyawaki, T.:** Detection of Bruton's tyrosine kinase mutations in hypogammaglobulinaemic males registered as common variable immunodeficiency (CVID) in the Japanese Immunodeficiency Registry. *Clinical and Experimental Immunology* **2000**; 120 (3): 512-517
- Keller, A. D. & Maniatis, T.:** Identification and characterization of a novel repressor of beta-interferon gene expression. *Genes and Development* **1991**; 5 (5): 868-879
- Kralovicova, J.; Hammarström, L.; Plebani, A.; Webster, A. D. B. & Vorechovsky, I.:** Fine-scale mapping at IGAD1 and genome-wide genetic linkage analysis implicate HLA-DQ/DR as a major susceptibility locus in selective IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Journal of Immunology* **2003**; 170 (5): 2765-2775
- Kuo, T. C.; Shaffer, A. L.; Haddad, J.; Choi, Y. S.; Staudt, L. M. & Calame, K.:** Repression of BCL-6 is required for the formation of human memory B cells in vitro. *Journal of Experimental Medicine* **2007**; 204 (4): 819-830
- Lai, Y.; Feldman, K. L. & Clark, R. S. B.:** Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). *Critical Care Medicine* **2005**; 33 (12 Suppl): S433-S434
- Lanier, L. L.; Phillips, J. H.; Hackett, J.; Tutt, M. & Kumar, V.:** Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *Journal of Immunology* **1986**; 137 (9): 2735-2739
- Latiff, A. H. A. & Kerr, M. A.:** The clinical significance of immunoglobulin A deficiency. *Annals of Clinical Biochemistry* **2007**; 44 (Pt 2): 131-139
- Liese, J. G.; Wintergerst, U.; Tympner, K. D. & Belohradsky, B. H.:** High- vs low-dose immunoglobulin therapy in the long-term treatment of X-linked agammaglobulinemia. *American Journal of Diseases of Children* **1992**; 146 (3): 335-339
- Magnúsdóttir, E.; Kalachikov, S.; Mizukoshi, K.; Savitsky, D.; Ishida-Yamamoto, A.; Panteleyev, A. A. & Calame, K.:** Epidermal terminal differentiation depends on B lymphocyte-induced

maturation protein-1. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* **2007**; 104 (38): 14988-14993

**Martins, G. A.; Cimmino, L.; Shapiro-Shelef, M.; Szabolcs, M.; Herron, A.; Magnusdottir, E. & Calame, K.:** Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. *Nature Immunology* **2006**; 7 (5): 457-465

**Martins, G. & Calame, K.:** Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. *Annual Review of Immunology* **2008**; 26: 133-169

**Melo, K. M.; Carvalho, K. I.; Bruno, F. R.; Ndhlovu, L. C.; Ballan, W. M.; Nixon, D. F.; Kallas, E. G. & Costa-Carvalho, B. T.:** A decreased frequency of regulatory T cells in patients with common variable immunodeficiency. *PLoS One* **2009**; 4 (7): e6269

**Mora-López, F.; Reales, E.; Brieva, J. A. & Campos-Caro, A.:** Human BSAP and BLIMP1 conform an autoregulatory feedback loop. *Blood* **2007**; 110 (9): 3150-3157

**Morbach, H.; Eichhorn, E. M.; Liese, J. G. & Girschick, H. J.:** Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clinical and Experimental Immunology* **2010**; 162 (2): 271-279

**Moriya, N.; Sanjoh, K.; Yokoyama, S. & Hayashi, T.:** Mechanisms of HLA-DR antigen expression in phytohemagglutinin-activated T cells in man. Requirement of T cell recognition of self HLA-DR antigen expressed on the surface of monocytes. *J Immunol* **1987**; 139 (10): 3281-3286

**Nera, K.-P. & Lassila, O.:** Pax5 – a critical inhibitor of plasma cell fate. *Scandinavian Journal of Immunology* **2006**; 64 (3): 190-199

**Nicholson, J. K.; Hubbard, M. & Jones, B. M.:** Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. *Cytometry* **1996**; 26 (1): 16-21

**Oksenhendler, E.; Gérard, L.; Fieschi, C.; Malphettes, M.; Mouillot, G.; Jaussaud, R.; Viallard, J.-E.; Gardembas, M.; Galicier, L.; Schleinitz, N.; Suarez, F. et al.:** Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clinical Infectious Diseases* **2008**; 46 (10): 1547-1554

**Park, M. A.; Li, J. T.; Hagan, J. B.; Maddox, D. E. & Abraham, R. S.:** Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. *Lancet* **2008**; 372 (9637): 489-502

**Petit, J. M.; Denis-Gay, M. & Ratinaud, M. H.:** Assessment of fluorochromes for cellular structure and function studies by flow cytometry. *Biology of the Cell* **1993**; 78 (1-2): 1-13



- Pezzutto, A.; Ulrichs, T. & Burmester, G.-R.:** *Taschenatlas der Immunologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York. 2. Auflage **2007**
- Piqueras, B.; Lavenu-Bombled, C.; Galicier, L.; van der Cruyssen, F. B.; Mouthon, L.; Chevret, S.; Debré, P.; Schmitt, C. & Oksenhendler, E.:** Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *Journal of Clinical Immunology* **2003**; 23 (5): 385-400
- Ren, B.; Chee, K. J.; Kim, T. H. & Maniatis, T.:** PRDI-BF1/Blimp-1 repression is mediated by corepressors of the Groucho family of proteins. *Genes and Development* **1999**; 13 (1): 125-137
- Robertson, M. J. & Ritz, J.:** Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* **1990**; 76 (12): 2421-2438
- Rosen, F. S.; Eibl, M.; Roifman, C.; Fischer, A.; Volanakis, J.; Aiuti, F.; Notarangelo, L.; Kishimoto, T.; Resnick, I. B.; Hammarstrom, L.; Seger, R. et al.:** Primary immunodeficiency diseases. Report of an IUIS Scientific Committee. International Union of Immunological Societies. *Clinical and Experimental Immunology* **1999**; 118 Suppl 1: 1-28
- Rudge, P.; Webster, A. D.; Revesz, T.; Warner, T.; Espanol, T.; Cunningham-Rundles, C. & Hyman, N.:** Encephalomyelitis in primary hypogammaglobulinaemia. *Brain* **1996**; 119 ( Pt 1): 1-15
- Rump, J. A.; Jahreis, A.; Schlesier, M.; Dräger, R.; Melchers, I. & Peter, H. H.:** Possible role of IL-2 deficiency for hypogammaglobulinaemia in patients with common variable immunodeficiency. *Clinical and Experimental Immunology* **1992**; 89 (2): 204-210
- Salzer, U. & Grimbacher, B.:** Monogenetic defects in common variable immunodeficiency: what can we learn about terminal B cell differentiation? *Current Opinion in Rheumatology* **2006**; 18 (4): 377-382
- Santner-Nanan, B.; Berberich-Siebelt, F.; Xiao, Z.; Poser, N.; Sennefelder, H.; Rauthe, S.; Vallabhapurapu, D. S.; Berberich, I.; Schimpl, A.; Kreth, H.-W. & Nanan, R.:** Blimp-1 is expressed in human and mouse T cell subsets and leads to loss of IL-2 production and to defective proliferation. *Signal Transduction* **2006**; 6 (4): 268-279
- Segal, J. B. & Moliterno, A. R.:** Platelet counts differ by sex, ethnicity, and age in the United States. *Annals of Epidemiology* **2006**; 16 (2): 123-130

- Shaaban, H.; Daniel, S.; Sison, R.; Slim, J. & Perez, G.:** Eosinopenia: Is it a good marker of sepsis in comparison to procalcitonin and C-reactive protein levels for patients admitted to a critical care unit in an urban hospital? *Journal of Critical Care* **2010**; 25 (4): 570-575
- Shovlin, C. L.; Simmonds, H. A.; Fairbanks, L. D.; Deacock, S. J.; Hughes, J. M.; Lechler, R. I.; Webster, A. D.; Sun, X. M.; Webb, J. C. & Soutar, A. K.:** Adult onset immunodeficiency caused by inherited adenosine deaminase deficiency. *Journal of Immunology* **1994**; 153 (5): 2331-2339
- Sneller, M. C.; Strober, W.; Eisenstein, E.; Jaffe, J. S. & Cunningham-Rundles, C.:** NIH conference. New insights into common variable immunodeficiency. *Annals of Internal Medicine* **1993**; 118 (9): 720-730
- de Souza, F. S.; Gawantka, V.; Gómez, A. P.; Delius, H.; Ang, S. L. & Niehrs, C.:** The zinc finger gene Xblimp1 controls anterior endomesodermal cell fate in Spemann's organizer. *EMBO Journal* **1999**; 18 (21): 6062-6072
- Spickett, G. P.; Matamoros, N. & Farrant, J.:** Lymphocyte surface phenotype in common variable immunodeficiency. *Disease Markers* **1992**; 10 (2): 67-80
- Stauffer, T. P.; Hilfiker, H.; Carafoli, E. & Strehler, E. E.:** Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes. *Journal of Biological Chemistry* **1993**; 268 (34): 25993-26003
- Stevens, R. F. & Alexander, M. K.:** A sex difference in the platelet count. *British Journal of Haematology* **1977**; 37 (2): 295-300
- Tarazona, R.; Casado, J. G.; Delarosa, O.; Torre-Cisneros, J.; Villanueva, J. L.; Sanchez, B.; Galiani, M. D.; Gonzalez, R.; Solana, R. & Peña, J.:** Selective depletion of CD56(dim) NK cell subsets and maintenance of CD56(bright) NK cells in treatment-naive HIV-1-seropositive individuals. *Journal of Clinical Immunology* **2002**; 22 (3): 176-183
- Taubenheim, N.; von Hornung, M.; Durandy, A.; Warnatz, K.; Corcoran, L.; Peter, H.-H. & Eibel, H.:** Defined blocks in terminal plasma cell differentiation of common variable immunodeficiency patients. *J Immunol* **2005**; 175 (8): 5498-5503
- Telford, W.; Murga, M.; Hawley, T.; Hawley, R.; Packard, B.; Komoriya, A.; Haas, F. & Hubert, C.:** DPSS yellow-green 561-nm lasers for improved fluorochrome detection by flow cytometry. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* **2005**; 68 (1): 36-44

- Thiele, D. L. & Lipsky, P. E.:** Modulation of human natural killer cell function by L-leucine methyl ester: monocyte-dependent depletion from human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Immunology* **1985**; 134 (2): 786-793
- Thomas, L.:** *Labor und Diagnose*. TH-Books, Frankfurt/Main. 7. Auflage **2008**
- Turner, C. A.; Mack, D. H. & Davis, M. M.:** Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* **1994**; 77 (2): 297-306
- Viallard, J.-F.; Blanco, P.; André, M.; Etienne, G.; Liferman, F.; Neau, D.; Vidal, E.; Moreau, J.-F. & Pellegrin, J.-L.:** CD8+HLA-DR+ T lymphocytes are increased in common variable immunodeficiency patients with impaired memory B-cell differentiation. *Clinical Immunology* **2006**; 119 (1): 51-58
- Vincent, S. D.; Dunn, N. R.; Sciammas, R.; Shapiro-Shalef, M.; Davis, M. M.; Calame, K.; Bikoff, E. K. & Robertson, E. J.:** The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. *Development* **2005**; 132 (6): 1315-1325
- Volanakis, J. E.; Zhu, Z. B.; Schaffer, F. M.; Macon, K. J.; Palermos, J.; Barger, B. O.; Go, R.; Campbell, R. D.; Schroeder, H. W. & Cooper, M. D.:** Major histocompatibility complex class III genes and susceptibility to immunoglobulin A deficiency and common variable immunodeficiency. *Journal of Clinical Investigation* **1992**; 89 (6): 1914-1922
- Vorechovský, I.; Webster, A. D.; Plebani, A. & Hammarström, L.:** Genetic linkage of IgA deficiency to the major histocompatibility complex: evidence for allele segregation distortion, parent-of-origin penetrance differences, and the role of anti-IgA antibodies in disease predisposition. *American Journal of Human Genetics* **1999**; 64 (4): 1096-1109
- Vorechovský, I.; Cullen, M.; Carrington, M.; Hammarström, L. & Webster, A. D.:** Fine mapping of IGAD1 in IgA deficiency and common variable immunodeficiency: identification and characterization of haplotypes shared by affected members of 101 multiple-case families. *Journal of Immunology* **2000**; 164 (8): 4408-4416
- Wahn, V.; Belohradsky, B. H.; Borte, M.; Ganschow, R.; Horn, J. C.; Linde, R.; Niehues, T.; Schmidt, R. E. & Schulze, I.:** Früherkennung von Patienten mit primären Immundefekten, Behandlung von Patienten mit Antikörpermangel. *Pädiatrische Praxis* **2006/2007**; 69: 91-98

**Warnatz, K.; Denz, A.; Dräger, R.; Braun, M.; Groth, C.; Wolff-Vorbeck, G.; Eibel, H.; Schlesier, M. & Peter, H. H.:** Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* **2002**; 99 (5): 1544-1551

**Wehr, C.; Kivioja, T.; Schmitt, C.; Ferry, B.; Witte, T.; Eren, E.; Vlkova, M.; Hernandez, M.; Detkova, D.; Bos, P. R.; Poerksen, G. et al.:** The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* **2008**; 111 (1): 77-85

**Yu, J.; Angelin-Duclos, C.; Greenwood, J.; Liao, J. & Calame, K.:** Transcriptional repression by blimp-1 (PRDI-BF1) involves recruitment of histone deacetylase. *Molecular and Cellular Biology* **2000**; 20 (7): 2592-2603

**Ziegner, U. H. M.; Kobayashi, R. H.; Cunningham-Rundles, C.; Español, T.; Fath, A.; Huttenlocher, A.; Krogstad, P.; Marthinsen, L.; Notarangelo, L. D.; Pasic, S.; Rieger, C. H. L. et al.:** Progressive neurodegeneration in patients with primary immunodeficiency disease on IVIG treatment. *Clinical Immunology* **2002**; 102 (1): 19-24

# Abkürzungen

AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ANA	Antinukleäre Antikörper
APC	Allophycocyanin
ATCC	American Type Culture Collection
B-LCL	B-Lymphoblastoid Cell Line (B-lymphoblastoide Zelllinie)
BAFF	B Cell Activating Factor
BCL	B Cell Lymphoma (Name einer Familie von Transkriptionsfaktoren)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Blimp	B Lymphocyte Induced Maturation Protein (Name eines Transkriptionsfaktors)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
BSAP	B Cell-specific Activator Protein (Name eines Transkriptionsfaktors)
CA	California
CAML	Calcium-modulierender Cyclophilin-Ligand
CD	Cluster of Differentiation (Kurzbezeichnungsschema für zelluläre Antigene)
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CIITA	MHC Class II Transactivator (Name eines Transkriptionsfaktors)
CM	Complete Medium (Komplettmedium für die Zellkultur)
CMV	Cytomegalievirus
CT	Connecticut
CVID	Common Variable Immunodeficiency

dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Link Immuno Sorbent Assay
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting (fluoreszenzaktivierte Zellsortierung, Bezeichnung der Fa. Becton-Dickinson für Durchflusszytometrie)
Fc	Fragment crystallizable (kristallisierbares Fragment von Antikörpern)
FCS	Fetal Calf Serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HBsAg	Hepatitis-B-Virus Surface-Antigen
HDAC	Histon-Deacetylasen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HR-CT	High Resolution Computed Tomography (hochauflösende Computertomographie)

HSV	Herpes-simplex-Virus
ICOS	Inducible T cell Co-Stimulator (induzierbarer T-Lymphozyten-Co-Stimulator)
IE	Internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
IgAD	Immunglobulin A Deficiency (selektiver IgA-Mangel)
IL	Interleukin
IRF	Interferon Regulatory Factor (Name einer Familie von Transkriptionsfaktoren)
IU	International Units (internationale Einheiten)
IVIG	Immunglobuline zur intravenösen Anwendung
IZKF	Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung der Universität Würzburg
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MA	Massachusetts
MACS	Magnetic-activated Cell Sorting (magnetisch aktivierte Zellsortierung)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MMR	Mumps, Masern, Röteln
MO	Missouri
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MSH	mutS Homolog
MW	Mittelwert (d. h. arithmetisches Mittel)
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells (Name eines Transkriptionsfaktors)
NK	Natural Killer
OKT3	Präparatename eines monoklonalen Antikörpers gegen CD3

OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man (Name einer humangenetischen Online-Datenbank)
PA	Pennsylvania
PAX	Paired Box (Name einer Familie von Transkriptionsfaktoren)
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
pMHCII	Peptide Major Histocompatibility Complex Class II
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
PRDI-BF	Positive Regulatory Domain I Binding Factor (Name eines Transkriptionsfaktors)
Prdm	PR Domain-Containing Protein (Name eines Transkriptionsfaktors)
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Bezeichnung für ein Zellkulturmedium)
RT	Reverse Transkriptase
SAC	Staphylococcus aureus Stamm Cowan I
SCID	Severe Combined Immunodeficiency (schwerer kombinierter Immundefekt)
SCIG	Immunglobuline zur subkutanen Anwendung
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
sIgG	Surface Immunoglobulin G (Oberflächen-IgG)
spp.	species pluralis
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription (Name einer Familie von Transkriptionsfaktoren)
TACI	Transmembrane Activator and CAML Interactor



Taq	Thermus aquaticus
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U	Units (Einheiten)
UV	Ultraviolett
VZV	Varizella-Zoster-Virus
XBP	X-Box Binding Protein (Name eines Transkriptionsfaktors)
XLA	X-linked Agammaglobulinemia (X-chromosomal vererbte Agammaglobulinämie vom Typ Bruton)
XLP	X-linked Lymphoproliferative Disease (X-chromosomal vererbtes lymphoproliferatives Syndrom)

## **Danksagung**

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Hans Wolfgang Kreth für die Überlassung des Themas, seine sehr konstruktiven Korrekturen und Anmerkungen sowie seinen großen persönlichen Einsatz im Promotionsverfahren. Weiterhin danke ich meinem Betreuer Herrn Professor Dr. med. Ralph Nanan für die konkrete Anleitung im Labor.

Für die ausgezeichnete technische (und teilweise auch moralische sowie inhaltliche) Unterstützung danke ich Frau Helga Sennefelder, Frau Barbara Ottensmeier, Frau Simone Kraus, Frau Silvia Seidenspinner und Frau Sonja Rotzoll.

Den Patienten und gesunden Probanden möchte ich für die Bereitschaft zur Teilnahme an der Untersuchung und die Überlassung der Blutproben danken.

Herrn Professor Dr. rer. nat. Manfred B. Lutz danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Meine Familie hat ebenfalls wesentlich zum Zustandekommen dieser Arbeit beitragen, sei es durch Erdulden meiner körperlichen oder geistigen Abwesenheit von ihr oder durch fachlichen Rat und Korrekturen. Hier möchte neben meinem Vater Professor Dr. med. Wolfgang Poser ganz besonders meiner Frau Dorothea danken, ohne deren inhaltliche, formale und emotionale Unterstützung diese Dissertation wohl nicht zustande gekommen wäre.

Für fachlichen und administrativen Rat in einzelnen Fragen möchte ich weiterhin Frau Professor Dr. phil. Anneliese Schimpl, Herrn Professor Dr. med. Christian P. Speer, Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Ingolf Berberich, Frau Dr. rer. nat. Friederike Berberich-Siebelt, Herrn Dr. rer. nat. Sergej Chuvpilo und Herrn Dr. rer. nat. Matthias Knödel danken. Frau Dr. rer. nat. Elita Avota gilt mein Dank für die Überlassung der Jurkat-Zelllinie.